



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO
DE MICROALGAS: ASPECTOS METABÓLICOS

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

OSCAR ALFREDO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ**
VOCAL: **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**
SECRETARIO: **Profesor: JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA**
1er. SUPLENTE: **Profesor: MARTHA GILES GÓMEZ**
2º SUPLENTE: **Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada _____

SUSTENTANTE:

Oscar Alfredo Martínez Rodríguez _____

Índice

Índice	i
Índice de Tablas	ii
Índice de Figuras.....	iii
Resumen.....	iv
1. Introducción	1
1.1. Microalgas: aspectos generales.....	1
1.1.1. Clasificación.....	3
1.1.2. Composición bioquímica	5
1.1.3. Aplicaciones de las microalgas.....	7
1.1.4. Microalgas heterótrofas	9
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos particulares.....	11
3. Microalgas fotoautótrofas obligadas	12
4. Cultivo heterotrófico de microalgas	15
5. Aspectos metabólicos de las microalgas heterotróficas	21
5.1. Sistemas de transporte de las fuentes de carbono.....	21
5.2. Vías metabólicas	25
5.3. Ingeniería genética de cepas de algas.....	33
6. Conclusiones.....	36
7. Bibliografía	38

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las microalgas.....	4
Tabla 2. Clasificación de microalgas de acuerdo a su metabolismo....	4
Tabla 3. Resumen de algunos productos de alto valor sintetizados con microalgas y su uso.	8
Tabla 4. Comparación del uso de microalgas heterotróficas y fotoautotróficas en la producción de compuestos de interés humano.	14
Tabla 5. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la producción de biomasa.....	18
Tabla 6. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la producción de lípidos.	19
Tabla 7. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la obtención de productos de interés humano e industrial.	20

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema general del metabolismo de las microalgas fotoautótrofas obligadas.....	10
Figura 2. Tipos y clases de transportadores de solutos.....	22
Figura 3. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el citoplasma de las microalgas heterotróficas	26
Figura 4. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el glioxisoma de las microalgas heterotróficas.	28
Figura 5. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el plástido de las microalgas heterotróficas	30
Figura 6. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en la mitocondria de las microalgas heterotróficas	32
Figura 7. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en las microalgas heterotrófica	34

Resumen

Las microalgas son consideradas microorganismos fototróficos. Sin embargo, existen algunas especies capaces de crecer de manera heterotrófica, en ambientes oscuros y usando diferentes fuentes de carbono. El cultivo heterotrófico de las microalgas posee varios beneficios en comparación con los cultivos fotoautotróficos. Desafortunadamente estos microorganismos no han sido ampliamente estudiados, limitando su uso y aplicación en diferentes sectores y resultando en un desaprovechamiento de sus beneficios. Motivos por los cuales en este trabajo monográfico de actualización se recopila la información más relevante y actual de los aspectos metabólicos del cultivo de microalgas heterotróficas.

Existen dos principales factores que influyen la capacidad del crecimiento heterotrófico de las microalgas:

- La presencia de sistemas funcionales y eficientes de transporte de energía que permitan a las microalgas metabolizar los nutrientes.
- Vías metabólicas activas que permiten el procesamiento y utilización de las fuentes de carbono. Estos compuestos deben de asimilados por diferentes vías metabólicas para la obtención de ATP o esqueletos de carbono usados para la síntesis de diferentes estructuras celulares.

En la medida que se descubran nuevas especies de microalgas en diferentes ecosistemas, se logre un mejor entendimiento de su fisiología de su metabolismo y se implementen herramientas de ingeniería molecular y metabólica, el número de microalgas heterotróficas aumentará, llevando a un incremento en las variedades de fuentes de carbono utilizadas por éstas, y de igual manera una producción mas eficiente de diversos compuestos de utilidad para los humanos.

1. Introducción:

1.1. Microalgas: aspectos generales

Las microalgas han sido usadas como alimento humano desde la antigüedad, sin embargo no fue hasta los años cincuenta y sesenta, en Alemania, que empezaron a ser estudiadas e investigadas como fuente abundante de proteína de bajo costo para consumo humano. Recientemente el cultivo de microalgas para la obtención de productos biotecnológicos de alto valor comercial o de interés humano ha tomado una mayor importancia y su estudio se ha expandido a diferentes países en el mundo. El número de estudios para la producción de estos compuestos aumenta de manera acelerada gracias a la gran variedad de bienes que se pueden obtener del cultivo de estos **microorganismos, como son: antioxidantes, β -carotenos, pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos ω -3 y ω -6, triglicéridos, vitaminas y biomasa con capacidad de ser usada como producto a granel para la fabricación de otros bienes (fármacos, cosméticos, nutracéuticos, alimentos funcionales, biocombustibles).** Esto ha llevado al desarrollo de procesos a escala industrial para la obtención de estos productos, la mayoría basados en cultivos fototróficos, usando CO₂ como fuente de carbono.

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos fotoautótrofos, tanto procariontes (cianobacterias) como eucariontes (algas verdes, diatomeas, cafés y rojas). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en ambientes acuáticos y subaéreos (expuestos a la atmósfera y no sumergidos, i.e. superficie del agua y del suelo). Presentan una amplia tolerancia a condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes

(Barsanti & Gualtieri, 2006). Son los organismos responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono del planeta (Garibay et al., 2009).

Si bien, las algas son consideradas, por definición, organismos fotoautótrofos, también existen microalgas heterotróficas, i.e. crecen bajo obscuridad y utilizan fuentes de carbono externas, y que debido a que son poco conocidas, no han sido ampliamente estudiadas. Los cultivos de algas de manera heterotrófica dependen del tipo de cepa a usar y las condiciones de crecimiento, y el uso de la fuente de carbono está sujeto a la presencia de sistemas de transporte a través de la membrana y de procesos enzimáticos involucrados en el metabolismo central del carbono. Recientemente, el uso de cultivos heterotróficos sobre los fototróficos ha ganado interés debido a que presenta ventajas y mejoras para la obtención de productos de alto valor y de interés humano. Entre las principales ventajas que presentan los cultivos heterotróficos se encuentran: la eliminación de requerimientos de luz; incrementos significativos en velocidades de crecimiento y la cantidad de biomasa obtenida o DCW (por sus siglas en inglés, dry cell weight); un uso relativamente fácil de los biorreactores y la capacidad de tener cultivos axénicos; se obtienen altos niveles de densidad celular, reduciendo costos en la cosecha celular; y se pueden implementar estrategias como los cultivos alimentados con los que es posible controlar la velocidad de crecimiento.

No obstante, una de las principales desventajas que presentan los cultivos heterotróficos ante los fototróficos es que consumen O_2 y producen CO_2 , lo que lleva a un aumento en la producción de gases de efecto invernadero. Además, el uso de fuentes de carbono externas

representa un costo adicional, que es alto en comparación con el uso de un flujo continuo de dióxido de carbono. Por ejemplo, la glucosa obtenida a partir de almidón vegetal tiene un costo aproximado de 0.6 dólares americanos por kg, mientras que si este monosacárido es sustituido por dióxido de carbono proveniente de efluentes de gases industriales se reduce la emisión de este gas a la atmósfera. Sin embargo existen otras opciones mas económicas que se pueden usar como fuente de carbono como son: la sacarosa excedente de ingenios cañeros, glicerol como subproducto de la fabricación de biodiesel y azúcares (pentosas y hexosas) obtenidos de la hidrólisis de residuos agroindustriales.

1.1.1. Clasificación:

Dada la gran diversidad de las microalgas en la actualidad no se cuenta con una clasificación taxonómica universalmente aceptada. Sin embargo, se pueden clasificar de acuerdo a su pigmentación, morfología, ciclo de vida y estructura celular; en microalgas procariontes (cianobacterias) y eucariontes que a su vez poseen una y 7 divisiones respectivamente (Tabla 1); o bien de acuerdo con sus características nutricionales: Heterótrofas obligadas, fototótrofas obligadas, fotoheterótrofas y mixótrofas (Tabla 2) (Barsanti & Gualtieri, 2006; Toledo-Cervantes, 2014)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las microalgas

Dominio	División	Nombre común
Prokaryota	Cyanophyta	Algas verde-azuladas
Eukaryota	Chlorophyta	Algas verdes
	Cryptophyta	Criptomonas
	Dinophyta	Dinoflagelados
	Euglenophyta	Euglénidos
	Haptophyta	Cocolitóforos
	Heterokontophyta	Algas doradas Algas verde-amarillas Diatomeas Algas cafés
	Rhodophyta	Algas rojas

Tabla 2. Clasificación de microalgas de acuerdo a su metabolismo

Clasificación	Características	Fuente de carbono	Condiciones de luz
Heterótrofas obligadas	Capaces de crecer y dividirse metabolizando nutrientes externos	Orgánica (glucosa, glicerol, acetato, etc.)	Obscuridad
Fotoautótrofas obligadas	Sus necesidades metabólicas dependen estrictamente de la fotosíntesis.	Inorgánica (CO ₂)	Iluminación
Fotoheterótrofas	Usan compuestos orgánicos externos para proliferar pero sólo en condiciones iluminadas	Orgánica	Iluminación
Mixótrofas	Pueden crecer de igual manera como fotoautótrofas o como heterótrofas	Orgánica y/o inorgánica	Obscuridad e iluminación

1.1.2. Composición bioquímica

La composición bioquímica de las microalgas no es un factor constante; depende de la especie y de las condiciones ambientales. Factores como son la temperatura, salinidad, iluminación, pH, contenido mineral, disponibilidad de CO₂, densidad de población, fase de crecimiento y estado fisiológico, pueden modificar en gran medida la composición bioquímica. Debido a que las microalgas deben de adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales, producen una gran variedad de metabolitos secundarios (biológicamente activos), con estructuras no encontradas en otros organismos. Al establecer condiciones de crecimiento específicas se podría maximizar la producción de las biomoléculas de interés (Batista et al., 2013).

Las microalgas están compuestas principalmente por:

Proteínas: La composición de proteínas en las microalgas varía de acuerdo a las condiciones ambientales y la especie, se estima del 30% al 65% (p/p) en peso seco (Batista et al., 2013). Sin embargo, no se cuenta con una aproximación exacta del contenido de proteínas, ya que los estudios llevados a cabo basan sus estimaciones en el contenido total de nitrógeno. Estas aproximaciones conllevan un error ya que además de las proteínas los ácidos nucleicos, aminos, glucosaminas y constituyentes de su pared celular están compuestos por nitrógeno. Es preciso determinar de manera experimental el contenido proteico en microalgas y evaluar su valor nutricional, para sugerir su uso en alimentación humana y de animales (Toledo-Cervantes, 2014).

Carbohidratos: Los carbohidratos en las microalgas se encuentran en forma de monosacáridos (glucosa, galactosa, manosa, ribosa, disacáridos) o de polisacáridos (almidón, celulosa, hemicelulosa). Se usan principalmente como fuente de energía aunque también fungen como compuestos de almacenamiento, protección y estructura celular (Toledo-Cervantes, 2014).

Pigmentos: las microalgas utilizan diferentes pigmentos para la absorción de luz y para la protección ante la radiación solar. Los carotenos y sus derivados, como el β -caroteno y la astaxantina, se acumulan en grandes cantidades en algunas especies de algas. Estos compuestos se utilizan como colorantes de alimentos y antioxidantes. La concentración de estos compuestos varía entre 0.1-0.2% en peso seco (Lee, 2004; Yuan et al., 2011). La clorofila es otro colorante producido por las microalgas, representa aproximadamente 4% de su peso seco, y se utiliza como pigmento alimenticio y para el tratamiento de úlceras gástricas gracias a sus propiedades quelantes. Otros pigmentos de importancia considerable son la ficobiliproteínas, que se utilizan como marcadores fluorescentes en diagnósticos clínicos.

Lípidos: Estas biomoléculas son constituyentes en todo tipo de organismos. Se encuentran como principal componente de las membranas celulares, sustancias de reserva y como fuente de energía. Aunque el tipo de lípidos varía entre especies, las microalgas producen en general lípidos no polares (sin carga) como los triacilglicéridos y ácidos grasos libres, y lípidos polares, principalmente glicéridos en los que uno o dos de sus ácidos grasos han sido sustituidos por un grupo polar (fosfolípidos y glicolípidos). Los lípidos pueden representar desde

el 5 hasta el 70% del peso seco de microalgas oleaginosas (Kovar et al., 2014; Toledo-Cervantes, 2014)

1.1.3. Aplicaciones de las microalgas

Las microalgas han sido utilizadas por el humano como alimento, remedios y fertilizantes por cientos de años. En México y en Chad los pueblos aztecas y kanembu, respectivamente, cultivaban el alga verde-azulada, *Spirulina*, en lagos (Texcoco y Chad) para su consumo como fuente importante de proteína (Barsanti & Gualtieri, 2006). Sin embargo no fue hasta los años cincuentas y sesentas cuando en Alemania se comenzaron a utilizar comercialmente como fuente de proteína económica. En la actualidad numerosos productos como carotenoides, enzimas específicas, ácidos grasos, péptidos, polímeros, o esteroides con actividades antioxidantes, catalíticas, de almacenaje de energía, pigmentación, o toxicidad son producidos por microalgas (Tabla 3) (Kovar et al., 2014).

Tabla 3. Resumen de algunos productos de alto valor sintetizados con microalgas y su uso. Modificada de Borowitzka, 2013

Producto	Microalga	Uso
Carotenoides		
β-caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	Pigmento (alimenticio), provitamínico A, antioxidante.
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i>	Pigmento (acuicultura), antioxidante.
Luteína	<i>Scenedesmus</i> spp., y otras algas verdes	Pigmento (acuicultura, alimenticio, aves de corral)
Ficobilinas (ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina)	Cyanobacterias, Rhodophyta, Cryophyta, Glaucophyta	Pigmento natural (e.g. cosméticos, y alimenticio), conjugados fluorescentes (diagnóstico), antioxidante.
Lípidos		
Ácido araquidónico	<i>Parietochloris incisa</i>	Suplemento alimenticio.
Ácido eicosapentaenóico	<i>Nannochloropsis</i> spp., <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Suplemento alimenticio.
Ácido docosahexaenóico	<i>Crypthecodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium</i> spp.	Suplemento alimenticio.

Varios de estos productos de alto valor se encuentran bien establecidos en los mercados y existen claras oportunidades para nuevos productos en desarrollo. Sin embargo, la entrada de los mismos a un mayor número de mercados depende de:

- Que posean una calidad mejor y más reproducible que los productos provenientes de otras fuentes (plantas)
- Que se encuentren productos con nueva bioactividad
- Del tamaño del mercado potencial
- Del costo del producto
- Del tiempo de aceptación de éstos por los clientes (Borowitzka, 2013; Kovar et al., 2014).

1.1.4. Microalgas heterótrofas

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual organismos fotosintéticos como las algas fijan el dióxido de carbono para su crecimiento y el metabolismo celular (Figura 1). Sin embargo se han encontrado microalgas en ambientes donde la radiación solar alcanza niveles incapaces de mantener el metabolismo fotoautótrofo. En regiones polares se han encontrado especies atrapadas en capas de hielo (Palmisano et al., 1985; Tuchman, Schollett, Steven, & Geddes, 2006), enterrados en sedimentos (Tuchman et al., 2006; Wasmund, 1987), o debajo de la sombra de poblaciones densas de otros tipos de biomasa que no permiten el paso de la luz (Johnson et al., 1997; Tuchman et al., 2006). Cuando las microalgas habitan en ambientes con niveles limitados de irradiación solar y no son capaces de adquirir movilidad para absorber luz (Johnson et al., 1997; Tuchman et al., 2006), pueden entrar en un estado de latencia o recurrir al

metabolismo heterotrófico como alternativas de supervivencia y/o reproducción (Tuchman et al., 2006; Zhang et al., 2003). Muchas de las algas encontradas en ambientes carentes de luz son capaces de metabolizar heterotróficamente diversas fuentes de carbono (Neilson & Lewin, 1974; Tuchman et al., 2006).

Aunque las microalgas se consideran organismos fotoautótrofos, se

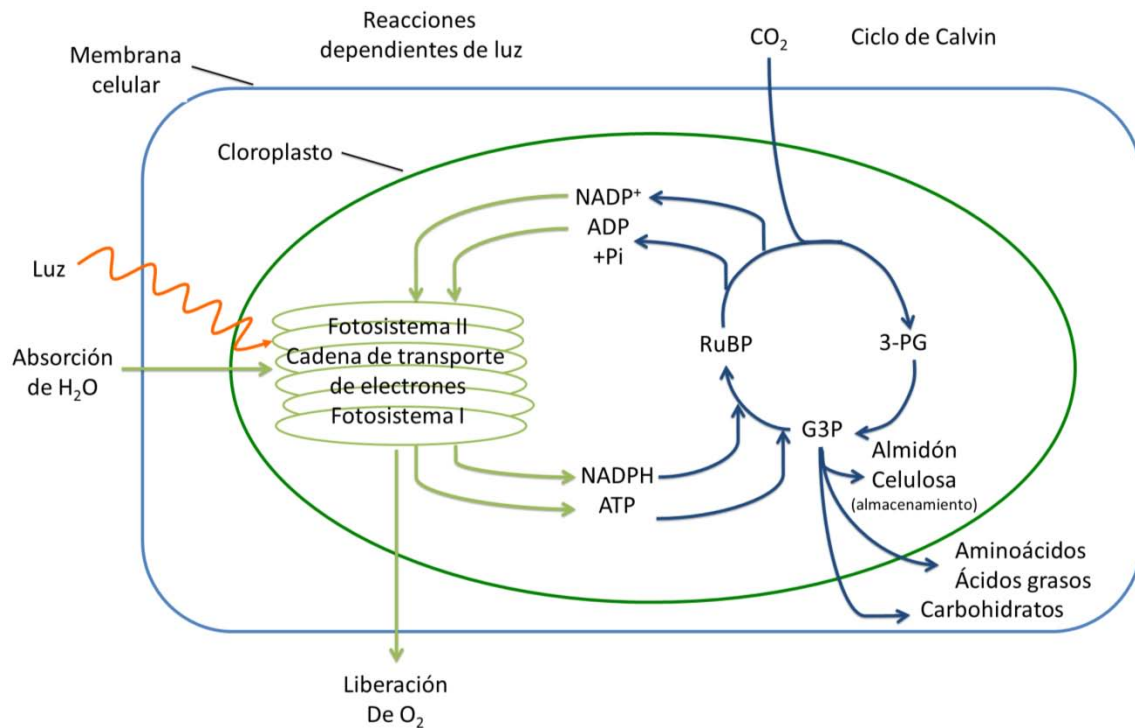


Figura 1. Esquema general del metabolismo de las microalgas fotoautótrofas obligadas. *Metabolitos:* **3-PG** 3-fosfoglicerato, **G3P** gliceraldehído 3-fosfato, **RuBP** Ribulosa1,5-bisfosfato.

han encontrado algunas especies viviendo en ambientes donde el metabolismo autótrofo no es viable. El cultivo heterotrófico, es decir crecimiento y propagación celular empleando fuentes de carbono externas bajo condiciones de oscuridad, puede ser utilizado para estudiar aspectos metabólicos que no están estrictamente relacionados con el crecimiento fotoautotrófico de las microalgas, así como para entender y determinar bajo que condiciones es posible

favorecer la obtención de productos de alto valor y de interés para los seres humanos.

Como ya se mencionó con anterioridad, el uso de las microalgas heterotróficas para la obtención de productos interés comercial se ha visto limitado, por la falta de estudios relacionados con el metabolismo de estos microorganismos. Llevando a una gran limitación en cuanto al desarrollo de procesos eficientes que aprovechen todos los beneficios que conlleva el cultivo heterotrófico de las microalgas. Es por esto que es de gran importancia llevar a cabo investigaciones integrales que permitan conocer de manera global a estos microorganismos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica de los aspectos metabólicos de las microalgas cultivadas bajo condiciones heterotróficas.

2.2. Objetivos particulares

- Comparar el metabolismo fotoautotrófico y heterotrófico de las microalgas.
- Discutir las aplicaciones y ventajas del cultivo heterotrófico de las microalgas
- Determinar los aspectos más importantes del cultivo heterotrófico de las microalgas.
- Describir el metabolismo heterotrófico de las microalgas (transportadores y vías metabólicas).

3. Microalgas fotoautótrofas obligadas

En general las microalgas se consideran organismos fotoautótrofos, es decir, la energía que usan para su crecimiento y desarrollo proviene de la fotosíntesis (Figura 1) (Zaslavskaja et al., 2001). Sin embargo algunas especies de microalgas son capaces de crecer en ambientes oscuros de manera heterótrfica. En dichas condiciones estos microorganismos **poseen un "metabolismo oscuro" que, en esencia, es similar al metabolismo no fotosintético de otros microorganismos como las levaduras, aunque dependiendo del género y especie de microalga, presentan muchas peculiaridades, ya que, como se presenta en los siguientes capítulos, acumulan diferentes tipos de macromoléculas o metabolitos.** Las fuentes de carbono usadas por las microalgas creciendo en condiciones oscuras son transformadas a intermediarios de carbono en las principales vías metabólicas, sustituyendo moléculas producidas durante la fotosíntesis (Chen & Chen, 2006; Lewin, 1962). La deficiencia que presentan algunas microalgas en cuanto a los mecanismos necesarios para catabolizar sustratos como son los azúcares y otras fuentes de carbono orgánicas, es considerada como una de las razones por la cuál estos microorganismos son principalmente fotoautótrficos (Chen & Chen, 2006; Lewin, 1962; Zhang et al., 1998). A la fecha, se han descrito relativamente pocas microalgas capaces de crecer estrictamente en condiciones heterótrficas. Empleando técnicas de ingeniería genética, ha sido posible demostrar que microalgas incapaces de crecer en condiciones heterótrficas carecen de alguna característica (enzima o transportador) específica que les permita catabolizar fuentes de carbono para el crecimiento heterótrfico. Por ejemplo, *Phaeodactylum tricorutum* es una microalga fotoautótrfica que después de ser clonada con cualquiera de los genes, *glut1* ó *hup1*, que codifican para un

transportador de glucosa, fue capaz de crecer en condiciones heterotróficas (Zaslavskaja et al., 2001). Se ha propuesto que la ausencia de una reacción enzimática en el metabolismo central del carbono (glucólisis, vía de las pentosas o ciclo de Krebs) es la causa de un crecimiento fotoautotrófico obligado (Chen & Chen, 2006; Wood et al., 2004). En varias microalgas fotoautótrofas el ciclo de Krebs está incompleto debido a la ausencia de la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (Benedict, 1978; Chen & Chen, 2006). En estos casos, se ha propuesto que el ciclo de Krebs se usa primordialmente con propósitos biosintéticos al canalizar carbono a las vías biosintéticas centrales, disminuyendo los niveles de poder reductor (NADH o FADH) que sería canalizado a la cadena respiratoria para la producción de ATP (Chen & Chen, 2006; Wood et al., 2004).

En la Tabla 4 se presentan una comparación entre los cultivos fotoautótrofos y los heterótrofos, resaltando sus principales ventajas y desventajas.

Tabla 4. Comparación del uso de microalgas heterotróficas y fotoautotróficas en la producción de compuestos de interés humano. Adaptado de Morales-Sánchez et al., 2013.

	Microlagas fotoautotróficas	Microalgas heterotróficas
Cultivo	Existe un gran número de especies que pueden cultivarse fotoautotróficamente.	Se eliminan requisitos de luz y limitaciones del paso de luz al aumentar la densidad celular.
	Los sistemas abiertos son sencillos en cuanto a diseño y tienen un bajo costo de inversión	Biorreactores son fáciles de mantener y operar, además de poder ser operados en condiciones axénicas.
	Crecen en agua no potable y tierras no arables, y si el diseño es el adecuado, no desplazan espacios destinados para la producción de alimentos.	Técnicas, como el lote alimentado (administración a diferentes tiempos de una cantidad elevada de fuente de carbono) incrementan densidad celular, reduciendo costos de extracción de biomasa e incrementando la misma hasta en dos ordenes de magnitud.
Metabolismo	Estas microalgas fijan CO ₂ y producen O ₂ , reduciendo costos y emisiones de carbono a la atmósfera.	Fuentes de carbono poseen alta densidad energética en comparación con el CO ₂ .
	Se puede utilizar CO ₂ proveniente de gases de combustión previamente tratados.	Debido al uso de O ₂ y generación de CO ₂ se usa aire del ambiente en lugar de gases de combustión previamente tratados.
	Utilizan medios simples con sales, un flujo continuo de CO ₂ y luz.	Se utilizan los mismos medios de cultivo que en los fotoautótrofos adicionando una fuente de carbono.
Producción	Los metabolitos inducidos por la luz son eficientemente producidos.	Incrementan significativamente masa celular, tasa de crecimiento y productividades de proteínas, lípidos y otros metabolitos de importancia económica.

4. Cultivo heterotrófico de microalgas

Cuando se analiza la capacidad de las microalgas para crecer heterotróficamente se evalúa si poseen las siguientes características fisiológicas: (a) habilidad para duplicarse y metabolizar las diversas fuentes de carbono en ausencia de luz; (b) habilidad para crecer en medios de cultivo fáciles de esterilizar; (c) adaptación eficiente a los cambios que se presenten en su entorno; (d) ser resistente al estrés hidrodinámico que se genera en los biorreactores de tanque agitado mezcladores, bombas, centrifugas y filtros, entre otros (Chen, 1996; Chen & Chen, 2006; Mojtaba et al., 2011; Morales-Sánchez et al., 2013); y (e) ser capaces de metabolizar fuentes de carbono orgánicas, e.g. piruvato, acetato, lactato, etanol, ácidos grasos saturados, glicolato, glicerol, azúcares de 6 carbonos (e.g. glucosa y fructosa), monosacáridos de 5 carbonos (e.g. xilosa y arabinosa), disacáridos (e.g. lactosa, sacarosa y celobiosa) y aminoácidos (Neilson & Lewin, 1974; Tuchman et al., 2006).

Bajo condiciones heterotróficas, varias cepas de microalgas han sido estudiadas por su capacidad de generar grandes cantidades de DCW (Tabla 5) y lípidos, principalmente ácidos grasos (Tabla 6), o para la obtención de altos niveles de productos químicos de alto valor (Tabla 7). Estas algas incluyen a *Galderia sulphuraria* estudiada para obtención de biomasa; *Chlorella protothecoides* y *Neochloris oleoabundans* estudiadas para la producción de lípidos; *Nitzschia laevis* investigada para la producción de ácido eicosapentaenóico (EPA, por sus siglas en inglés, eicosapentaenoic acid); y *Cryptothecodinium cohnii* usada para la producción de ácido docosahexaenóico (DHA, por sus siglas en inglés, docosahexaenoic acid), entre otras (Cheng et al.,

2009; de Swaaf et al., 2001; Graverholt & Eriksen, 2007; Morales-Sánchez et al., 2013; Wen & Chen, 2001). En fecha reciente se patentaron una serie de nuevos métodos para la producción de hidrocarburos a través del cultivo heterotrófico de *Botryococcus braunii* (Número de patente de EUA 8278090; Im et al., 2012). En la Tabla 7 se presenta un resumen de estos estudios.

Adicionalmente, se han realizado estudios para la obtención de nutrientes a partir de sustratos complejos. Los cuales deben de ser pre-tratados para generar fuentes de carbono o nitrógeno asimilables, de esta manera las microalgas los utilizan para su reproducción y generación de compuestos de interés. A continuación se describen trabajos recientes reportados en esta área.

Chlorella vulgaris y *Scenedesmus obliquus* se cultivaron en condiciones heterotróficas para la producción de biomasa con alto contenido proteico; la fuente de carbono se preparó, por hidrólisis enzimática de salvado de trigo. Se utilizaron enzimas lignocelulolíticas, provenientes de *Pleurotus ostreatus* o de *Trichoderma viride*, produciendo azúcares reducidos y solubles en una concentración relativamente alta (El-Sheekh et al., 2012). Pleissner et al. (2013) estudiaron el uso de los hidrolizados de desperdicios de comida, como una fuente de nutrientes para el crecimiento heterotrófico de *Schizochytrium mangrovei* y *Chlorella pyrenoidosa*. En este trabajo se obtuvo una concentración de biomasa de 10-20 g_{DCW}/L con alto contenido de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos grasos saturados y poliinsaturados.

En un estudio realizado por Ryu et al. (2013), usando hidrolizados de levadura cervecera como el medio de crecimiento para el cultivo de la microalga *Aurantiochytrium sp.* KRS101, que es rica en DHA, se alcanzó una productividad de 6.69 g_{DCW}/L/día (Tabla 7). Cabe resaltar

que estos resultados fueron obtenidos usando sólo el hidrolizado de levaduras, sin necesidad de nutrientes adicionales, comprobando que los requerimientos nutricionales de esta microalga fueron satisfechos totalmente con el extracto. De forma relevante, la adición de glicerol (fuente de carbono de bajo costo, subproducto de la producción de biodiesel) como fuente de carbono suplementaria incrementó el título de biomasa a 31.8 g_{DCW}/L.

El cultivo heterotrófico con varias microalgas se ha aplicado en el tratamiento de aguas de desperdicio urbano y doméstico. Como ejemplo, Prathima et al. (2012) estudiaron el efecto de nutrientes, como el nitrógeno, fósforo, carbono y potasio, producción de biomasa y acumulación de lípidos. Durante la fase de crecimiento se logró obtener una concentración de biomasa de 1.69 g_{DCW}/L. Durante una fase posterior de inanición de nitrógeno y fosfato, se promovió la acumulación de lípidos, con una remoción eficiente y simultánea de nitrógeno (54.2%) y fósforo (32.8%).

Tabla 5. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la producción de biomasa

Especie de microalga	Fuente de carbono	Referencia
<i>Chlorella kessleri</i>	Glucosa	Tanner, 2000
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Hidrolizado de desperdicio de alimento	Pleissner et al., 2013
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Galactosa, fructosa, fucosa, arabinosa, ribosa, sacarosa, mio-inositol, glicerol	Barbier et al., 2005; Schilling & Oesterhelt, 2007
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>¹	Glucosa	Zaslavskaja et al., 2001
<i>Schyzochytrium mangrovei</i>	Hidrolizado de desperdicio de alimento	Pleissner et al., 2013
<i>Volvox carteri</i>¹	Glucosa y glucosamina	Hallmann & Sumper, 1996
<i>Aurantiochytrium sp. KRS101</i>¹	Glucosa, hidrolizado de levadura cervecera	Hong et al., 2013; Ryu et al., 2013

¹ Microalgas modificadas genéticamente, transformadas con transportadores de glucosa

Tabla 6. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la producción de lípidos.

Especie de microalga	Fuente de carbono	Referencia
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa	Xiong et al., 2008
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolizado de alcachofa de Jerusalén	Cheng et al., 2009
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolizado de almidón de yuca	Wei et al., 2009
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolizado de almidón de yuca	Lu et al., 2010
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolizado de melaza	Yan et al., 2011
<i>Chlorella protothecoides</i>	Jugo dulce de sorgo	Gao et al., 2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	Acetato y glicerol	Liang et al., 2009; Syrett et al., 1963
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Glucosa	Morales-Sánchez et al., 2014
<i>Schyzochytrium limacinum</i> SR21	Glicerol crudo, jugo dulce de sorgo	Chi et al., 2007

Tabla 7. Resumen de las cepas de microalgas estudiadas en condiciones heterótrofas para la obtención de productos de interés humano e industrial.

Especie de microalga	Producto	Fuente de carbono	Referencia
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina	Glucosa	Ip & Chen, 2005a, 2005b; Sun et al., 2008
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Acetato	Kobayashi et al., 1997
<i>Aurantiochytrium limacinum mh0186</i>	DHA	Glucosa	Nagano et al., 2009
<i>Aurantiochytrium sp. KRS101</i>	DHS	Glucosa	Ryu et al. 2013
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	DHA	Glucosa, etanol, ácido acético y jarabe de algarrobo	de Swaaf et al., 2003; de Swaaf et al., 2003; Mendes et al., 2007
<i>Nitzschia laevis</i>	EPA	Glucosa	Wen et al., 2002; Wen & Chen, 2001; Wen & Chen, 2002
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Ficocianina	Glucosa	Graverholt & Eriksen, 2007
<i>Botryococcus braunii</i>	Hidrocarbonos	Glucosa, manosa, galactosa, fructosa, glicerol y combinaciones	Im et al., 2012
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>¹	Hidrógeno	Glucosa	Doebbe et al., 2007
<i>Chlorella protothecoides</i>	Luteína	Glucosa	Shi et al., 2000; Shi et al., 2002
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína	Glucosa	Wu et al., 2007
<i>Chlorella vulgaris</i>	Proteína	Hidrolizado de salvado de trigo	El-Sheekh et al. 2012
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Proteína	Hidrolizado de salvado de trigo	El-Sheekh et al. 2012

5. Aspectos metabólicos de las microalgas heterotróficas

5.1. Sistemas de transporte de las fuentes de carbono

La membrana citoplasmática es la barrera primaria de permeabilidad entre las células de microalgas y su ambiente. Tiene la habilidad de controlar el movimiento de la mayoría, si no es que de todos, los nutrientes a través de varios sistemas de transporte. La presencia y funcionalidad de estos sistemas son cruciales para establecer si el organismo es capaz o no de resistir y sobrevivir en condiciones ambientales dinámicas y frecuentemente hostiles (Konings, 2006). En algunos casos se ha encontrado que la característica de algunas microalgas de ser fotoautótrofas obligadas se debe a la ausencia de una absorción eficiente o de un mecanismo de transporte para carbohidratos, y que cuando logra la expresión de un transportador eficiente, las células son capaces de crecer heterotróficamente (Chen & Chen, 2006; Doebbe et al., 2007).

El mecanismo de absorción HUP1 (proteína de transporte de hexosas 1, por sus siglas en inglés: Hexose Uptake Protein), del alga verde *Chlorella kessleri* fue el primero de su tipo en ser caracterizado. Esta especie de microalga tiene un sistema de transporte activo de glucosa inducible, que permite una eficiente absorción de glucosa por medio de la síntesis de proteína unida a la membrana (Lee, 2004). Cuando se usa glucosa como inductor, tan sólo se requiere de 15 min para promover la síntesis de la proteína transportadora de glucosa, la cual funciona mediante un proceso dependiente de energía (Figura 2) (Haass & Tanner, 1974). La proteína de transporte que presenta *C. vulgaris* tiene un peso aproximado de 30-40 kDa (Sauer, 1986).

Conforme se introduce glucosa, el potencial de membrana se despolariza debido a la absorción de un protón en una estequiometria de 1:1 (Komor & Tanner, 1978). En estudios recientes se demuestra la habilidad de la microalga *N. oleoabundans* de crecer en condiciones estrictamente heterotróficas usando glucosa como única fuente de carbono. Bajo estas condiciones, la absorción de glucosa depende de una fuerza motriz-protón, indicando que la hexosa es transportada a través de un sistema simportador (Figura 2) (Morales-Sánchez et al., 2013).

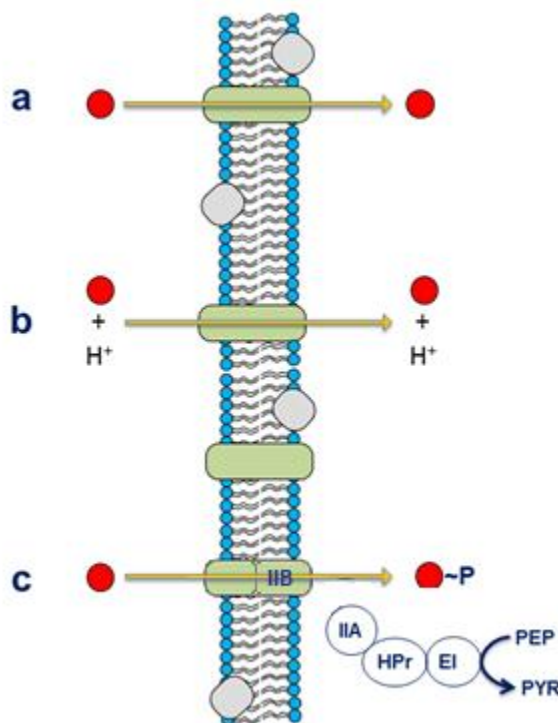


Figura 2. Tipos y clases de transportadores de solutos. Difusión pasiva mediada por canales y poros (a). Simportadores de soluto- H^+ mediado por acarreadores (b). Permeasas translocadoras del sistema de la fosfotransferasa (c).

Cyanidiaceae, una familia de microalgas rojas unicelulares acidófilas que ha sido evolutivamente conservada, está descrita como el miembro más antiguo del linaje de algas rojas y se cree que es altamente probable que en el proceso de evolución hayan estado involucradas en los orígenes de la endosimbiosis secundaria (Schilling & Oesterhelt, 2007; Yoon et al., 2004; Yoon et al., 2002). De acuerdo

con la actual clasificación taxonómica, existen tres géneros en la familia Cyanidiaceae: *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* (Albertano et al., 2000; Ciniglia et al., 2004; Schilling & Oesterhelt, 2007; Yoon et al., 2004). Estas microalgas se encuentran ampliamente distribuidas y crecen en valores de pH desde 0.05 hasta 3 y a temperaturas menores a los 56 °C. Además son altamente sensibles a la desecación, razón por la cual las células crecen en orificios de rocas y corales y por lo tanto están sujetas a una limitación de luz severa, promoviendo de esta manera un crecimiento heterotrófico (Gross et al, 1998; Gross & Oesterhelt, 1999; Schilling & Oesterhelt, 2007).

Por otro lado, *G. sulphuraria* puede sobrevivir a largos periodos de limitación de luz al metabolizar al menos 27 azúcares diferentes o polioles, incluyendo disacáridos, hexosas, pentosas, desoxiazúcares, hexitoles, pentioles, tetrioles y tioles, así como aminoácidos y algunos ácidos orgánicos (Gross & Schnarrenberger, 1995; Rigano et al., 1977; Rigano et al, 1976; Schilling & Oesterhelt, 2007). Se ha encontrado que *Galdieria* ha desarrollado la maquinaria enzimática necesaria y un sistema de absorción único, que le permiten usar esta enorme variedad de moléculas. Las enzimas utilizadas para metabolizar estas moléculas se expresan constitutivamente en esta especie (Oesterhelt et al., 1999). Mediante estudios *in vivo* con células intactas de *Galdieria* se han identificado al menos 14 diferentes transportadores de azúcares y polioles, los cuales presentan una dependencia pronunciada al pH y algunos que pueden transportar varios sustratos (Schilling & Oesterhelt, 2007). Se ha propuesto un mecanismo de transporte tipo protón simportador como la razón de la dependencia del pH en el transporte de azúcares en *G. sulphuraria*.

Algunos proyectos con *G. sulphuraria* y la microalga fotoautótrofa obligada *Cyanidioschyzon merolae* han permitido identificar transportadores de azúcar putativos codificados por los genomas de estas algas. Al comparar los genomas de dos especies de la familia Cyanidiaceae fisiológicamente disímiles, se han encontrado diferencias sorprendentemente mínimas entre ellas. Una de estas diferencias es el gran número de transportadores putativos de azúcar, aproximadamente 28, codificados en *G. sulphuraria* (Barbier et al., 2005). Varios genes que codifican para simportadores de protones se encontraron en el genoma de *Galdieria*; incluyendo cuatro para galactosa, cuatro para fructosa y uno para arabinosa. Además, varios protón-simportadores de sacarosa potenciales también se identificaron en el genoma de esta alga. Adicionalmente, se han identificado varios marcadores de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés: Expressed Sequence Tags) y secuencias que codifican para al menos 8 simportadores de sodio/mioinositol putativos. En los estudios llevados a cabo por Schilling & Oesterhelt (2007) se demostró la existencia de dos transportadores en *G. sulphuraria*, uno con una estructura conservada que consiste de 12 dominios transmembranales que contienen una hélice citosólica (estructura predicha de 6 + 6) y otro con 9 dominios transmembranales con una hélice citosólica entre el tercer y cuarto dominio hidrofóbico (estructura predicha de 3 + 6). Se ha especulado que los transportadores con 9 dominios transmembranales, SPT2 y SPT4, han evolucionado de un simportador activo de monosacáridos/protones que probablemente poseía 12 dominios transmembranales de mayor tamaño. Todas las proteínas GsSPT encontradas, son funcionales para transportar azúcares y tienen una especificidad de sustrato baja y altamente redundante, lo que difiere de los transportadores altamente específicos en plantas

(Schilling & Oesterhelt, 2007).

Estos sistemas de transporte parecen estar regulados por niveles de irradiación en la mayoría de las especies de algas. En *Cyclotella cryptica* la fotosíntesis es activada cuando los niveles de irradiación son suficientemente altos, mientras que la absorción de glucosa prevalece en ambientes oscuros. Sin embargo, y de forma relevante no todas las especies de microalgas están sujetas a la fotoinhibición del metabolismo heterótrofo (Tuchman et al., 2006).

5.2. Vías metabólicas

El consumo y asimilación de fuentes de carbono, incluyendo acetato, glucosa, lactato y glicerol, requiere de varios sistemas enzimáticos para el transporte, activación por fosforilación, metabolismo anabólico y catabólico, para la generación de intermediarios metabólicos requeridos en la síntesis de macromoléculas y para la generación de energía a través de fosforilación a nivel de sustrato y/o respiración (Van Baalam & Pulish, 1973).

Activación de la fuente de carbono: La activación de carbohidratos generalmente ocurre a través de reacciones catalizadas por cinasas, las cuales han sido encontradas en *Chlorella* y *Euglena* (Figura 3). Varias cianobacterianas usan una piridin-deshidrogenasa dependiente de nucleótido, responsable del metabolismo inicial de glucosa libre (no fosforilada) (Van Baalam & Pulish, 1973). Por otro lado, el glicerol es fosforilado usando ATP. El glicerolfosfato es posteriormente oxidado a gliceraldehído 3-fosfato (Figura 3). Este tipo de metabolismo del glicerol es particular de las microalgas, ya que en células vegetales el glicerol se metaboliza vía una gliclerol cinasa, la L-glicerol-3-fosfato NAD⁺ oxidoreductasa y una triosa-fosfato isomerasa, resultado en la

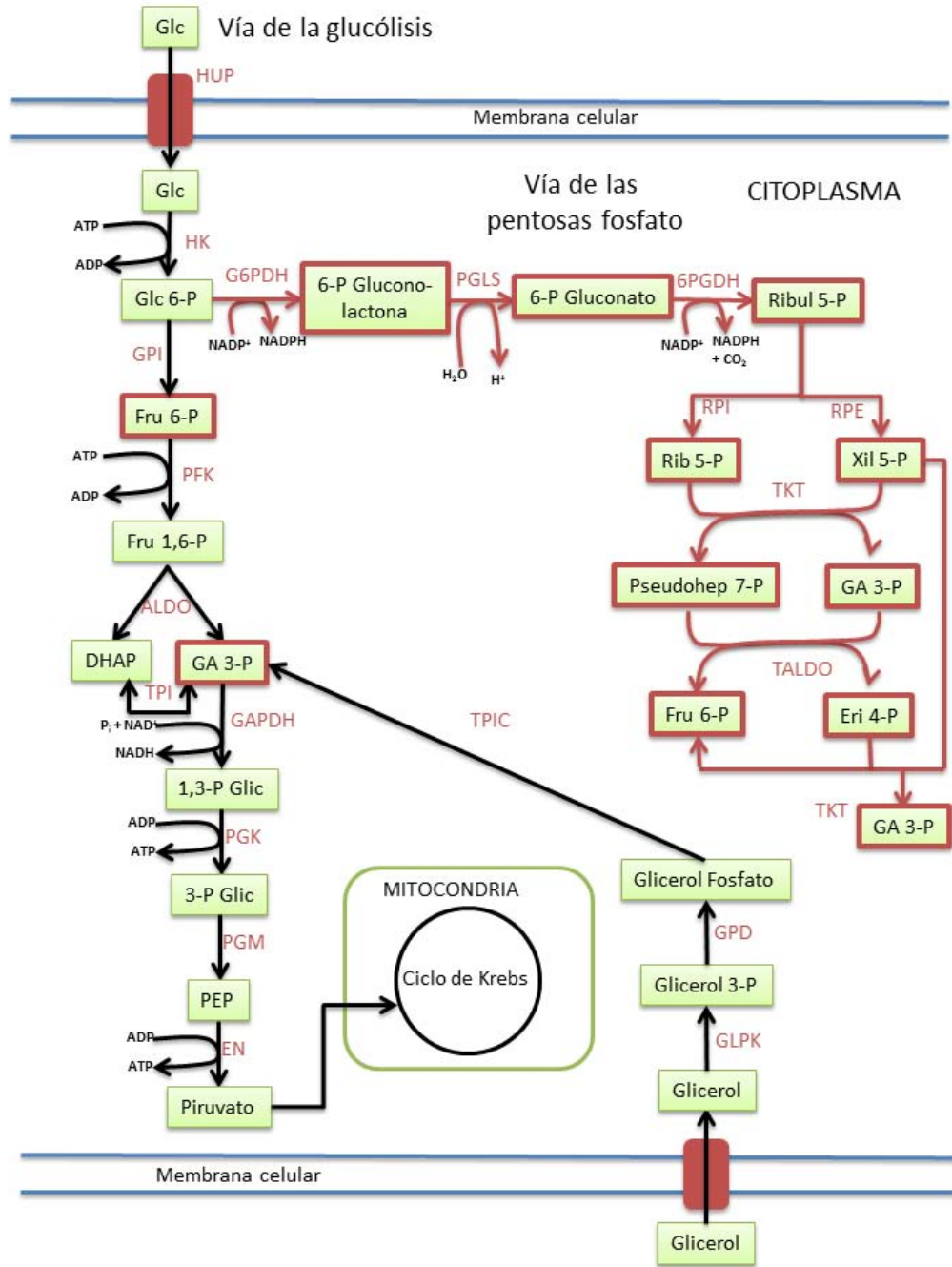


Figura 3. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el citoplasma de las microalgas heterotróficas. *Enzimas* HUP sistemas simportadores Hexosa/H⁺, HK hexocinasa, GPI glucosa 6-fosfato isomerasa, PFK fosfofructocinasa, ALDO aldolasa, TPI triosa fosfato isomerasa, GAPDH gliceraldeído fosfato deshidrogenasa, PGK fosfoglicerato cinasa, PGM fosfoglicerato mutasa, EN enolasa, G6PDH glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, PGLS 6-fosfogluconolactonasa, 6PGDH 6-fosfogluconato deshidrogenasa, RPI ribulosa 5-fosfato isomerasa, RPE ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa, TKT transacetolasa, TALDO transaldolasa, GLPK glicerol cinasa, GPD glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, TPIC triosa fosfato isomerasa. *Metabolitos* Glc glucosa, Fru fructosa, GA3-P gliceraldehído 3-fosfato, Glic glicerato, PEP fosfoenolpiruvato, Ribul ribulosa, Rib ribosa, Pseudohep pseudoheptulosa, Eri eritrosa. (Perez-García et al., 2011).

producción de gliceraldehído 3-fosfato y glicerato (Perez-Garcia, Escalante, De-Bashan, & Bashan, 2011). En el caso de ácidos orgánicos, el metabolismo del lactato comienza al reducirlo a piruvato por una D-lactato deshidrogenasa unida a NAD^+ (Gruber, Frederick, & Tolbert, 1974). En el caso del acetato, la asimilación inicia con la acetilación de la coenzima A por la acetil-coenzima A sintasa, produciendo acetil-coenzima A con el uso de una molécula de ATP (Figura 4) (Perez-Garcia et al., 2011).

Vías centrales del metabolismo de carbono: Después de que la glucosa, o cualquier otro carbohidrato relacionado, es transportado y fosforilado, éstos son metabolizados a través de las vías oxidativas de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés, pentose phosphate pathway) y la de la glucólisis (Figura 3) (Morales-Sánchez et al., 2013; Perez-Garcia et al., 2011). La PPP es de gran importancia ya que la mayoría de las enzimas encontradas en esta vía también participan en el ciclo de Calvin (Figura 3 y 5). Esto puede implicar que las vías para el metabolismo del carbono citoplasmático y fijación fotosintética del CO_2 están reguladas por controles comunes. De manera interesante, se ha encontrado que los cloroplastos se mantienen activos durante el almacenamiento de carbohidratos en la obscuridad (Van Baalam & Pulish, 1973).

En condiciones heterotróficas, las microalgas también generan una elevada cantidad de materiales de reserva, como respuesta a condiciones de estrés y probablemente como una estrategia de supervivencia. Por ejemplo, en un estudio realizado por Tanner (2000) se reportó que del total de la D-glucosa marcada radiactivamente y consumida por *C. kessleri*, sólo el 1% de la radiactividad se detectó como D-glucosa libre; aproximadamente 85% de la D-glucosa

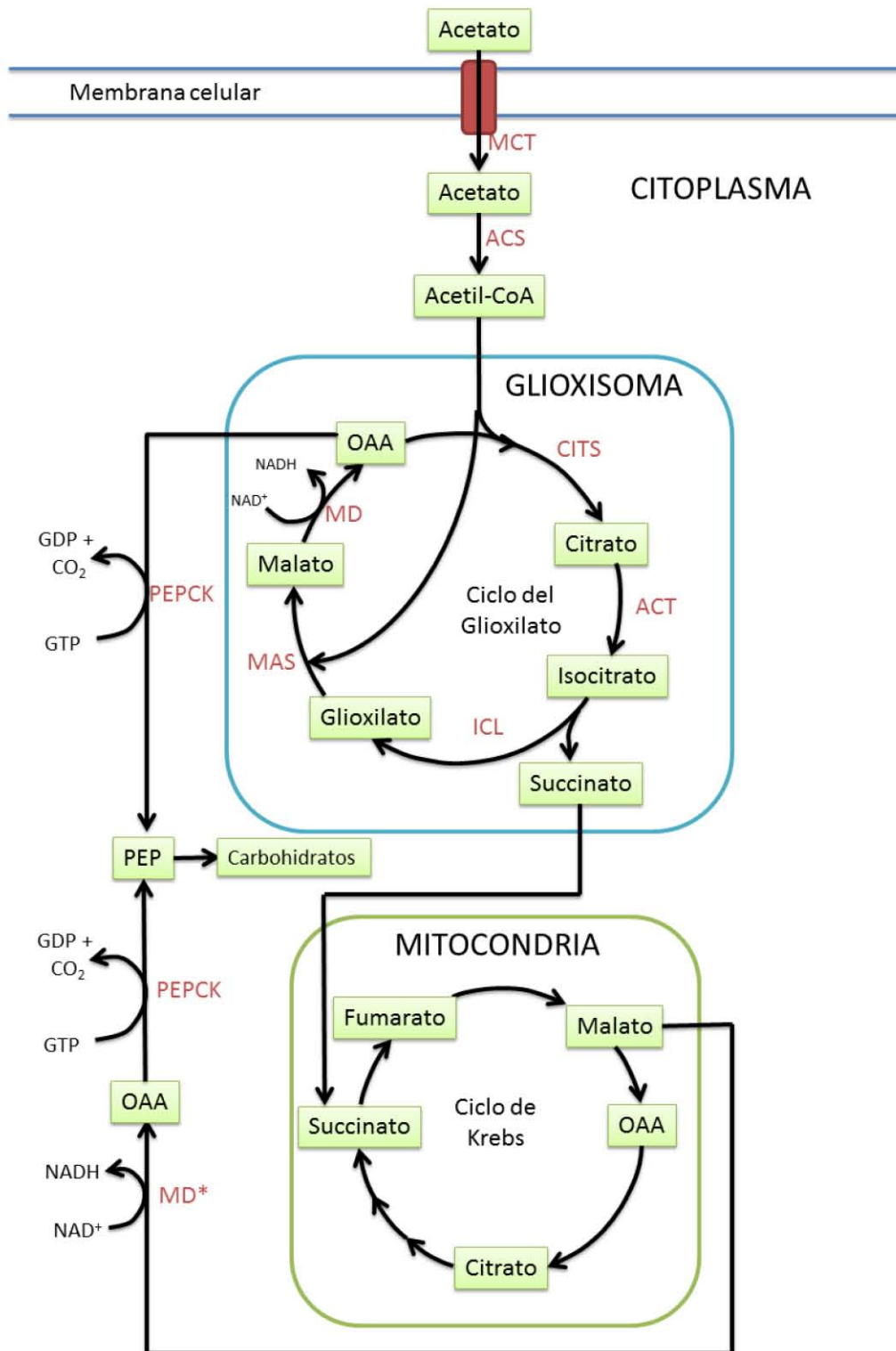


Figura 4. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el glioxisoma de las microalgas heterotróficas. *Enzimas* MCT transportador de ácidos monocarboxílicos/H⁺, ACS acetil-CoA sintasa, CITS citrato sintasa, ACT aconitasa, ICL isocitrato liasa, MAS malato sintasa, MD malato deshidrogenasa, MD* malato deshidrogenasa citoplasmática, PEPCK fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. *Metabolitos* PEP fosfoenolpiruvato, OAA oxaloacetato. (Perez-García et al., 2011).

consumida se encontró en forma de oligosacáridos, principalmente como sacarosa (51% de la glucosa total incorporada) y polisacáridos, principalmente almidón (30%), y el resto (aproximadamente el 15%) fue liberada como dióxido de carbono. Recientemente, se demostró que algunas microalgas oleaginosas, como *N. oleoabundans*, cuando son cultivadas bajo condiciones de suficiencia de nutrientes, tienen la capacidad de distribuir la glucosa en proteína (43.7% m/m), carbohidratos (30.9% m/m) y lípidos (24% m/m). Sin embargo, cuando es cultivada bajo condiciones de limitación de nitrógeno incrementa la acumulación de materiales de reserva, como lípidos y carbohidratos a niveles cercanos al 80% del peso seco de la microalga (Morales-Sánchez et al., 2014). La PPP y glucólisis son funcionales en el citoplasma de las células de microalgas; sin embargo, dependiendo de las condiciones (presencia de luz y glucosa), la PPP tiene probablemente una tasa metabólica más alta, es decir que la cantidad de carbono y la velocidad a la cual éste es metabolizado son mayores que en otras vías (Perez-García et al., 2011)

Membrana Celular

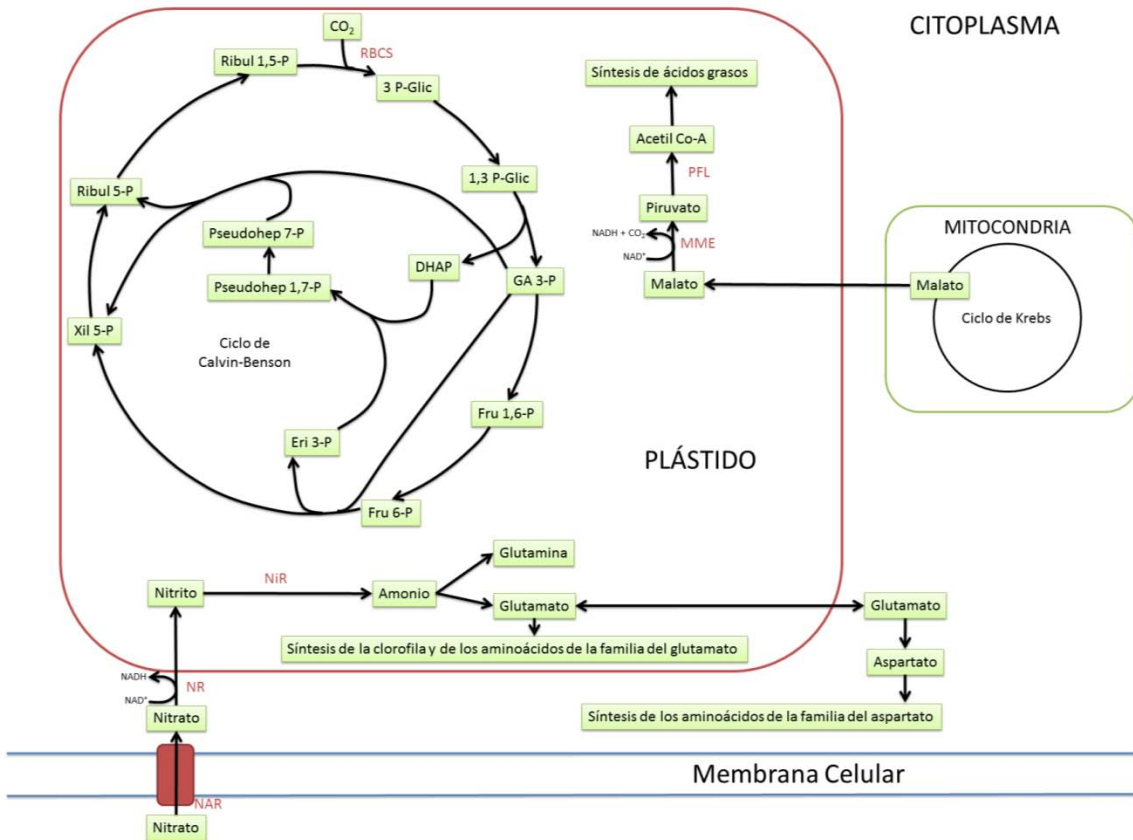


Figura 5. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en el plástido de las microalgas heterotróficas. *Enzimas* NAR proteínas transportadoras de nitrato/nitrito, NR nitrato reductasa, NiR nitrito reductasa, RBCS ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, PFL piruvato formato liasa, MME malato deshidrogenasa. *Metabolitos* Fru fructosa, GA3-P gliceraldehído 3-fosfato, DHAP dihidroxiacetona fosfato, Glic glicerato, Ribul ribulosa, Pseudohep pseudoheptulosa, Eri eritrosa. (Perez-García et al., 2011).

El acetato (unido a la coenzima A) es oxidado en el ciclo del glioxilato (produciendo malato en los glioxisomas) y en el ciclo de Krebs para proveer de esqueletos de carbono, y de energía en la forma de ATP y moléculas reductoras (NADH) en la mitocondria (Perez-García et al., 2011) (Figura 4 y 6). Es pertinente citar que el ciclo del glioxilato requiere de dos enzimas especiales, además de las encontradas en el ciclo de Krebs: la malato sintasa y la isocitrato liasa. Syrett et al. (1963) describieron por primera vez la presencia del ciclo del glioxilato

en *C. vulgaris*. Dichos investigadores encontraron que cuando esta microalga crece heterotróficamente con acetato, las actividades de las enzimas del ciclo del glioxilato incrementan de manera considerable. En cambio, las actividades de la citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (del ciclo de Krebs; Figura 6) presentan niveles similares a aquellos encontrados en células autotróficas (Syrett et al., 1963).

El glicerol es convertido a gliceraldehído 3-fosfato, que forma piruvato por medio de la vía de glucólisis (Figura 3); el piruvato posteriormente es catabolizado a través del ciclo de Krebs (Figura 6). El gliceraldehído 3-fosfato puede originarse también a partir de la reducción del 3-fosfoglicerato, un intermediario fundamental en el ciclo de Calvin-Benson (Figura 5) (Perez-García et al., 2011).

Los requerimientos de oxígeno durante el crecimiento oscuro de las microalgas indican la participación de un ciclo mitocondrial parecido al de Krebs, un sistema transportador de electrones y una oxidasa similar a aquellas presentes en plantas y células eucariotas (Van Baalam & Pulish, 1973). Algunas especies como *C. pyrenoidosa* y *S. obliquus*, mantienen actividades metabólicas del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa similares a las que presentan cuando crecen en ambientes iluminados, indicando que estas vías casi no son afectadas por los niveles de luz en estas microalgas (Figura 6) (Hong & Lee, 2007; Marsh et al., 1965; Perez-García et al., 2011; Van Baalam & Pulish, 1973; Yang et al., 2000). Hace cuatro décadas, Hiyama et al. (1969) describieron que algunas microalgas eucariotas

poseen citocromos del tipo *b*, *c* y *a*, que son importantes en la mediación de la transferencia de electrones de nucleótidos reducidos de piridina al oxígeno (Hiyama et al., 1969; Van Baalam & Pulish, 1973).

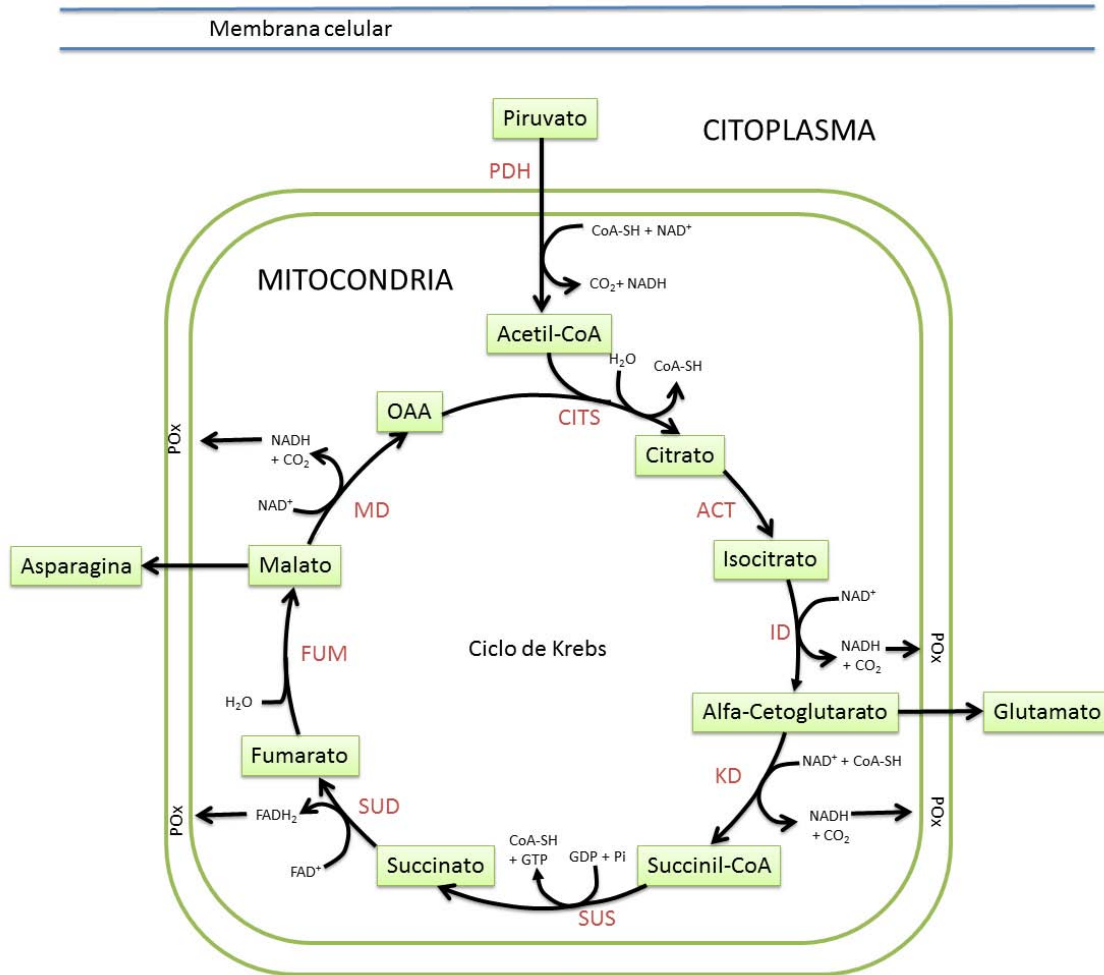


Figura 6. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en la mitocondria de las microalgas heterotróficas. *POx* fosforilación oxidativa. *Enzimas* *PDH* piruvato deshidrogenasa, *CITS* citrato sintasa, *ACT* aconitasa, *ID* isocitrato deshidrogenasa, *KD* α -cetoglutarato deshidrogenasa, *SUS* succinil-CoA sintasa, *SUC* succinil-CoA deshidrogenasa, *FUM* fumarasa, *MD* malato deshidrogenasa. *Metabolitos* *OAA* oxaloacetato. (Perez-Garcia et al., 2011).

En la Figura 7 se puede apreciar un esquema compilado, donde se presentan las conexiones de las vías mostradas en las Figuras 3, 4, 5 y 6. Resultando en un panorama general del metabolismo de las

microalgas heterótrofas y que permite una comprensión global del mismo.

5.3. Ingeniería genética de cepas de algas

Aunque las metodologías para la biotecnología y transformación de microalgas se encuentran parcialmente desarrolladas, el uso de estas herramientas para la obtención de biocatalizadores enfocados a la producción de metabolitos de alto valor y proteínas heterólogas con fines farmacéuticos ha mostrado gran potencial y por lo tanto ha llamado la atención de muchos investigadores y compañías (Radakovits et al., 2010). Este interés ha llevado a que en la última década se haya obtenido un aumento en el conocimiento de la genómica de las microalgas (Radakovits et al., 2010) y en el número de secuencias genómicas completas entre las que se encuentran: el alga roja *Cyanidioschyzon merolae* (Nozaki et al., 2007), las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004) y *Phaeodactylum tricorutum* (Bowler et al., 2008) y las algas verdes unicelulares *Ostreococcus tauri* (Derelle et al., 2006), *Ostreococcus lucimarinus* (Palenik et al., 2007), *Chlorella variabilis* NC64A (Blanc et al., 2010) y *Volvox carteri* (Prochnik, 2010). Adicionalmente, se han establecido varios sistemas de transformación genética en algas verdes, por ejemplo *Chlamydomonas reinhardtii* y *V. carteri* (Walker et al., 2005).

Como se indicó con anterioridad, se ha encontrado que algunas microalgas son fotoheterótrofas obligadas debido a la ausencia de sistemas efectivos de transporte de sustratos indispensables en

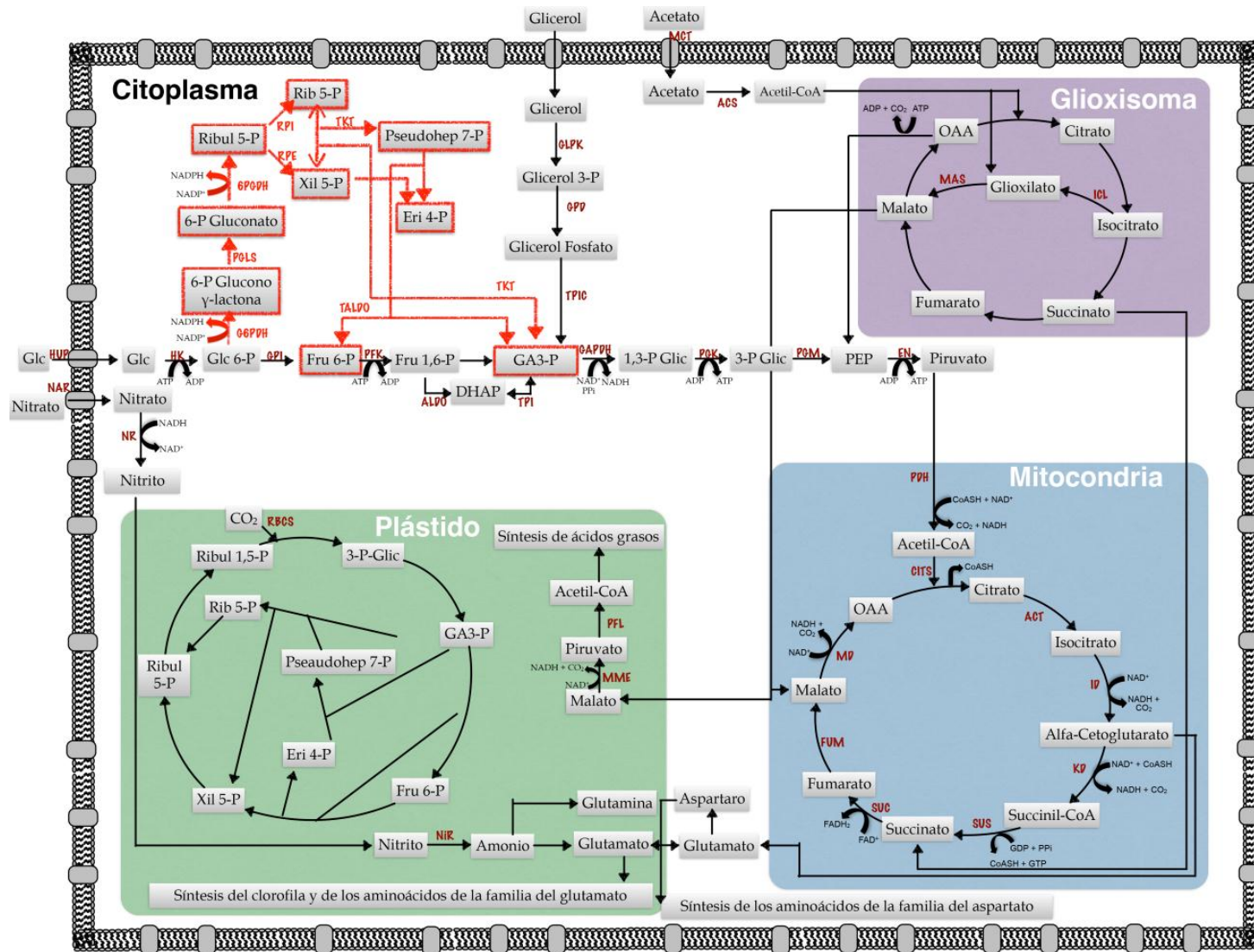


Figura 7. Panorama general de las vías metabólicas que se han demostrado como existentes en las microalgas heterotróficas (Descripción en la página siguiente).

Figura 7. Descripción: *Enzimas HUP* sistemas simportadores Hexosa/H⁺, *HK* hexocinasa, *GPI* glucosa 6-fosfato isomerasa, *PFK* fosfofructocinasa, *ALDO* aldolasa, *TPI* triosa fosfato isomerasa, *GAPDH* gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, *PGK* fosfoglicerato cinasa, *PGM* fosfoglicerato mutasa, *EN* enolasa, *G6PDH* glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, *PGLS* 6-fosfogluconolactonasa, *6PGDH* fosfogluconato deshidrogenasa, *RPI* ribulosa 5-fosfato isomerasa, *RPE* ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa, *TKT* transacetolasa, *TALDO* transaldolasa, *NAR* proteínas transportadoras de nitrato/nitrito, *NR* nitrato reductasa, *NiR* nitrito reductasa, *RBCS* ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, *PFL* piruvato formato liasa, *MME* malato deshidrogenasa (descarboxilante, NADP⁺), *PDH* piruvato deshidrogenasa, *CITS* citrato sintasa, *ACT* aconitasa, *ID* isocitrato deshidrogenasa, *KD* α-cetoglutarato deshidrogenasa, *SUS* succinil-CoA sintasa, *SUC* succinil-CoA deshidrogenasa, *FUM* fumarasa, *AGPAT* acilglicerolfosfato aciltransferasa, *PAP* ácido fosfatídico fosfohidrolasa, *MD* malato deshidrogenasa, *GLPK* glicerol cinasa, *GPD* glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, *TPIC* triosa fosfato isomerasa, *MCT* transportador de ácidos monocarboxílicos/H⁺, *ACS* acetil-CoA sintasa, *MAS* malato sintasa, *ICL* isocitrato liasa. *Metabolitos Glc* glucosa, *Fru* fructosa, *GA3-P* gliceraldehído 3-fosfato, *Glic* glicerato, *PEP* fosfoenolpiruvato, *Pir* piruvato, *Ribul* ribulosa, *Rib* ribosa, *Pseudohep* pseudoheptulosa, *Eri* eritrosa, *Nit* nitrito, *OAA* oxaloacetato.

ausencia de iluminación, en particular para transporte de azúcares (Chen & Chen, 2006). La ingeniería genética ha permitido que algunos fotoheterótrofos obligados previamente incapaces de crecer con monosacáridos, como la glucosa, ahora puedan crecer de manera heterótrofa a través de la introducción de transportadores específicos.

V. carteri se ha transformado con el gene que codifica para el simportador de hexosa/H⁺, *hup1* de *Chlorella*; el crecimiento heterótrofo de esta microlaga modificada se verificó al probar la asimilación de glucosa y glucosamina marcadas con ¹⁴C (Hallmann & Sumper, 1996), logrando obtener la primer alga verde en ser genéticamente transformada. Metodologías de ingeniería genética similares han sido usadas en *C. reinhardtii* (Doebbe et al., 2007) y la diatomea *P. tricornutum* (Zaslavskaja et al., 2001), obteniéndose en ambos casos, cambios metabólicos apreciables debido a la presencia de un solo gen adicional (Rosenberg et al., 2008). También, transformantes de *Dunaliella salina* creciendo de manera heterótrofa fueron identificadas cuando el gen *glut1*, que codifica para un

transportador de glucosa (Zaslavskaja et al., 2001), se expresó usando tanto promotores de expresión constitutiva e inducibles (Chen et al., 2009). Recientemente, el gen que codifica para una desaturasa de ácidos grasos $\Delta 12$ de *Mortierella alpina*, se expresó exitosamente en *Aurantiochytrium* sp. KRS101, una microalga oleaginosa heterótrofa, logrando una catálisis de ácido oléico a linoléico detectada en las células recombinantes (Hong et al., 2013).

6. Conclusiones

Se ha demostrado que el cultivo heterotrófico de microalgas presenta un gran potencial y ha sido utilizado en cultivos de escala industrial para la obtención de DHA y recientemente para la producción de alimento acuícola y ganadero, así como ácidos grasos para aplicaciones cosméticas y usos en lubricantes industriales especializados, y en biocombustibles para la aviación (www.solazyme.com). Esto ha dado lugar a nuevos conocimientos y desarrollo de tecnología en esta área de estudio. Se propone que es relevante centrar futuras investigaciones en la comprensión de los mecanismos de la fotoautotrofia obligada, lo cual permitirá modificar cepas de microalgas para desarrollar otros procesos. Adicionalmente, desde un punto de vista fisiológico y metabólico, la búsqueda de cepas en diferentes ambientes (Jia, Liu, Daroch, Geng, & Cheng, 2014) y el desarrollo de herramientas de ingeniería metabólica y molecular, llevarán a descubrir un mayor número de microalgas capaces de crecer en condiciones estrictamente heterótrofas y de fuentes de carbono. La ingeniería de vías metabólicas ha demostrado ser una herramienta efectiva para la conversión de diferentes microalgas fotoautótrofas, como *P. tricomutum*, *V. carteri* y *C. reinhardtii*, a un

metabolismo heterotrófico; haciendo de estos organismos una alternativa importante para la biotecnología.

Los genomas de las cepas de microalgas que son investigadas actualmente para el cultivo heterotrófico y la producción de metabolitos de alto valor y de interés comercial no han sido secuenciados. Las cepas que han sido secuenciadas no cuentan con genomas completamente anotados. Por lo tanto, el uso de herramientas modernas biotecnológicas, la secuenciación y los **estudios "ómicos"** se proponen para llevar a cabo análisis que incluyan todas las reacciones metabólicas (Figura 7) y los niveles de expresión de genes y proteínas involucradas en las diferentes redes del metabolismo celular. Esto con el objetivo de conocer las vías metabólicas utilizadas por microalgas, definir las interacciones entre éstas, para finalmente elucidar y poder manipular las vías mediante las cuales se pueden obtener productos de interés comercial.

7. Bibliografía

- Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G., & Pollio, A. (2000). The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: and update. *Hydrobiologia*, **433**, 137-143.
- Armbrust, E., Berges, J., Bowler, C., Green, B., Martinez, D., Putnam, N., Zhou, S., Allen, A., Apt, K., Bechner, M., et al. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudomona*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, **306**, 79-86.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M., Halgren, R., Wilkerson, C., & Garavito, R. (2005). Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbo. *Plant Physiology*, **137**, 460-174.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology* (First Edit.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, **2**, 164-173.
- Benedict, C. (1978). Nature of obligate photoautotrophy. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **29**, 67-93.
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Panglilian, J., Polle, J., et al. (2010). The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to

photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell*, **22**, 2943-2955.

Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, **25**, 743-756.

Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R. P., et al. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, **456**, 239-44.

Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, **14**, 412-426.

Chen, G., & Chen, F. (2006). Growing phototrophics cells without light. *Biotechnology Letters*, **28**, 607-616.

Chen, T., Liu, H., Lü, P., & Xue, L. (2009). Construction of *Dunaliella salina* heterotrophic expression vectors and identification of heterotrophically transformed algal strains. *Chinese Journal of Biotechnology*, **25**, 392-398.

Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., & Wu, Q. (2009). Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Society of Chemical Industry*, **84**, 777-781.

Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., & Chen, S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 1537-1545.

- Ciniglia, C., Yoon, H., Pollio, A., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). Hidden biodiversity of the extremophilic *Cyanidiales* red algae. *Molecular Ecology*, **13**, 1827-1838.
- de Swaaf, M. E., Grobben, G. J., Eggink, G., de Rijk, T., Meer van der, P., & Sijtsma, L. (2001). Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptothecodinium cohnii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 395-400.
- de Swaaf, M. E., Pronk, J. T., & Sijtsma, L. (2003). Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii* on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**, 40-43.
- de Swaaf, M. E., Sijtsma, L., & Pronk, J. (2003). High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 666-672.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A. Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., Cooke, R., et al. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11647-52.
- Doebbe, A., Rupprecht, J., Beckmann, J., Mussnug, J. H., Hallmann, A., Hankamer, B., & Kruse, O. (2007). Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. *Journal of Biotechnology*, **131**, 27-33.

- El-Sheekh, M. M., Bedaiwy, M. Y., Osman, M. E., & Ismail, M. M. (2012). Mixotrophic and heterotrophic growth of some microalgae using extract of fungal-treated wheat bran. *International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, **1**, 12.
- Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y., & Wu, Q. (2010). Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy*, **87**, 756-761.
- Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, **13**, 38-66.
- Graverholt, O. S., & Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high cell-density fed-batch and continuous flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 69-75.
- Gross, W., Küver, J., Tischendorf, G., Bouchaala, N., & Büsch, W. (1998). Cryptoendolithic growth of the red alga *Galdieria sulphuraria* in volcanic areas. *European Journal of Phycology*, **33**, 25-31.
- Gross, W., & Oesterhelt, C. (1999). Ecophysiological studies on the red alga *Galdieria sulphuraria* isolated from South-West Iceland. *Plant Biology*, **1**, 694-700.
- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 633-638.

- Gruber, P. J., Frederick, S. E., & Tolbert, N. E. (1974). Enzymes related to lactate metabolism in green algae and lower land plants. *Plant Physiology*, **53**, 167-170.
- Haass, D., & Tanner, W. (1974). Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. Characteristics of induction and turnover. *Plant Physiology*, **53**, 14-20.
- Hallmann, A., & Sumper, M. (1996). The *Chlorella* hexose/H⁺ symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 669-73.
- Hiyama, T., Nishimura, M., & Chance, B. (1969). Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Photosynthetic and respiratory cytochrome systems of the pale green mutant. *Plant Physiology*, **44**, 527-534.
- Hong, S. J., & Lee, C. E. (2007). Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **12**, 165-173.
- Hong, W. K., Heo, S. Y., Oh, B. R., Kim, C. H., Sohn, J. H., Yang, J. W., Kondo, A., Seo, J. W. (2013). A transgene expression system for the marine microalgae *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using a mutant allele of the gene encoding ribosomal protein L44 as a selectable transformation marker for cycloheximide resistance. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**, 1191-1197.
- Im, C. S., Vincent, D., Regentin, R., & Coragliotti, A. (2012). Heterotrophic cultivation of hydrocarbon-producing microalga. United States Patent 8778090 B1.

- Ip, P.-F., & Chen, F. (2005a). Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochemistry*, **40**, 3491-3496.
- Ip, P.-F., & Chen, F. (2005b). Peroxynitrite and nitryl chloride enhance astaxanthin production by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochemistry*, **40**, 3595-3599.
- Jia, Z., Liu, Y., Daroch, M., Geng, S., & Cheng, J. J. (2014). Screening, growth medium optimisation and heterotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**, 1667-1679.
- Johnson, R., Tuchman, N., & Peterson, C. (1997). Changes in the vertical microdistribution of diatoms within a developing periphyton mat. *Journal of the North American Benthological Society*, **16**, 503-519.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., & Tsuji, Y. (1997). Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*, **19**, 507-509.
- Komor, E., & Tanner, W. (1974). The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*. pH-Dependent change in K_m values and translocation constants of the uptake system. *European Journal of Biochemistry*, **44**, 219-223.
- Konings, W. (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**, 325-342.

- Kovar, K., Pribyl, P., & Wyss, M. (2014). Microalgae Grown under Heterotrophic and Mixotrophic Conditions. En H. Meyer & D. Schmidhalter (Eds.), *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells* (Primera Edic., pp. 164-184). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Lee, Y. K. (2004). Algal nutrition-heterotrophic carbon nutrition. En A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 116-124). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Lewin, R. A. (1962). *Physiology and Biochemistry of Algae* (Primera Edic.). New York: Academic Press.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, **31**, 1043-1049.
- Lu, Y., Ding, Y., & Wu, Q. (2011). Simultaneous saccharification of cassava starch and fermentation of algae for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, **23**, 115-121.
- Marsh, H. V., Galmiche, J. M., & Gibbs, M. (1965). Effect of light on the tricarboxylic acid cycle in *Scenedesmus*. *Plant Physiology*, **40**, 1013-1022.
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., Lopes da Silva, T., & Reis, A. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 1209-1215. d

- Mojtaba, A., Mohd, S., Rosfarizan, M., Raha, A., & Arbakariya, B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, **53**, 187-195.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Caro-Bermúdez, M. A., & Martínez, A. (2014). Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Research*, **5**, 61-69.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J., & Martínez, A. (2013). Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology Biofuels*, **6**, 100.
- Nagano, N., Taoka, Y., Honda, D., & Hayashi, M. (2009). Optimization of culture conditions for growth and docosahexaenoic acid production by a marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium limacinum* mh0186. *Journal of Oleo Science*, **58**, 623-628.
- Neilson, A. H., & Lewin, R. A. (1974). The uptake and utilization of organic carbon by algae; an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*, **13**, 227-264.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., et al. (2007). A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the host-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biology*, **5**, 28-36.

- Oesterhelt, C., Schnarrenberger, C., & Gross, W. (1999). Characterization of a sugar/polyol-uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *European Journal of Phycology*, **34**, 271-277.
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., et al. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(18), 7705-7710.
- Palmisano, A., SooHoo, J., White, D., Mith, G., Staton, G., & Burckle, L. (1985). Shade adapted benthic diatoms beneath Antarctica sea ice. *Journal of Phycology*, **21**, 664-667.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, **45**, 11-36.
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Lin, C. S. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, **137**, 139-146.
- Prathima, D. M., Venkata, S. G., & Venkata, M. S. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, **43**, 276-283.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., & Posewitz, M. C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, **9**, 486-501.

- Rigano, C., Aliotta, G., Rigano, V., Fuggi, A., & Vona, V. (1977). Heterotrophic growth patterns in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. A possible role for threonine dehydrase. *Archives of Microbiology*, **113**, 191-196.
- Rigano, C., Fuggi, A., Rigano, V., & Aliotta, G. (1976). Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Archives of Microbiology*, **107**, 133-138.
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**, 430-6.
- Ryu, B. G., Kim, K., Kim, J., Han, J. I., & Yang, J. W. (2013). Use of organic waste from the brewery industry for high-density cultivation of the docosahexaenoic acid-rich microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Bioresource technology*, **129**, 351-359.
- Sauer, N. (1986). Hexose-transport deficient mutants of *Chlorella vulgaris*: Lack of transport activity correlates with absence of inducible proteins. *Planta*, **168**, 139-144.
- Schilling, S., & Oesterhelt, C. (2007). Structurally reduced monosaccharide transporters in an evolutionarily conserved red alga. *Biochemical Journal*, **406**, 325-331.
- Shi, X. M., Zhang, X., & Chen, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 312-318.

- Shi, X. M., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress*, **18**, 723-727.
- Sun, N., Wang, Y., Li, Y. T., Huang, J. C., & Chen, F. (2008). Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, **43**, 1288-1292.
- Syrett, P. J., Merrett, M. J., & Bocks, S. M. (1963). Enzymes of the glyoxylate cycle in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, **14**, 249-264.
- Tanner, W. (2000). *Chlorella* hexose/H⁺-symporters. *International Review of Cytology*, **200**, 101-141.
- Toledo-Cervantes, A. (2014). *Estudio de la acumulación de lípidos en una microalga aislada de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Tuchman, N. C., Schollett, M. A., Steven, T. R., & Geddes, P. (2006). Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. *Hydrobiologia*, **1**, 167-177.
- Van Baalam, C., & Pulish, W. (1973). Heterotrophic growth of the microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, **2**, 229-254.
- Walker, T. L., Collet, C., & Purton, S. (2005). Algal transgenics in the genomic era. *Journal of Phycology*, **41**, 1077-1093.

- Wasmund, N. (1987). Live algae in deep sediment layers. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, **4**, 589-597.
- Wei, A., Zhang, X., Wei, D., Chen, G., Wu, Q., & Yang, S. T. (2009). Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**, 1383-1389.
- Wen, Z., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochemistry*, **37**, 1447-1453.
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2001). A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 316-322.
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2002). Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: physiological study and process optimization. *Biotechnology progress*, **18**, 21-28.
- Wood, A. P., Aurikko, J. P., & Kelly, D. P. (2004). A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy? *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 335-352.
- Wu, Z. Y., Shi, C. L., & Shi, X. M. (2007). Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 1233-1238.

Solazyme. www.solazyme.com. Recuperado 7 de febrero de 2015

Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**, 29-36.

Yan, D., Lu, Y., Chen, Y. F., & Wu, Q. (2011). Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresource Technology*, **102**, 6487-93.

Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microbial cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **6**, 87-102.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **21**, 809-818.

Yoon, H. S., Hackett, J. D., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2002). The single, ancient origin of chromist plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **99**, 15507-15512.

Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K., & Wang, J. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*, **55**, 150-165.

- Zaslavskaja, L., Lippmeier, J., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossman, A., & Apt, K. (2001). Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, **292**, 2073-2075.
- Zhang, C., Jeanjean, R., & Joset, F. (1998). Obligate phototrophy in cyanobacteria: more than a lack of sugar transport. *FEMS Microbiology Letters*, **161**, 285-292.
- Zhang, Q., Gradinger, R., & Zhou, Q. (2003). Competition within the marine microalgae over the polar dark period in the Greenland Sea of high Arctic. *Acta Oceanologica Sinica*, **22**, 233-242.