

REVISIÓN

β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales)

β -glucans, production and properties in microalgae with emphasis on *Nannochloropsis* genus (Ochrophyta, Eustigmatales)

Diego Espinoza-Gallardo¹, Loretto Contreras-Porcía^{2,3} y Nicole Ehrenfeld^{1*}

¹Centro de Investigación AustralBiotech, Universidad Santo Tomás, Av. Ejército 146, Santiago, Chile. *nicole.ehrenfeld@australbiotech.cl

²Departamento de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andres Bello, República 440, Santiago, Chile

³Center of Applied Ecology & Sustainability (CAPES), Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 340, Santiago, Chile

Abstract.- Microalgae are photosynthetic eukariotic microorganisms capable of producing a wide range of compounds of commercial interest, such as vitamins, antioxidants, omega-3 fatty acids, and immunostimulants like β -glucans. β -glucans are D-glucose polymers linked by β -1,3 and/or β -1,4 bonds, which can present branches of β -1,6 bonds. The most well known in microalgae are the paramylon (in euglenoids) and the chrysolaminarin (in diatoms). In the genus *Nannochloropsis*, (Ochrophyta), the genome and transcriptome sequencing of species has shown that they are also likely to be able to synthesize β -glucans with β -1,3 bonds with β -1,6 side branches. There are few studies about these β -glucans in those species but it is suggested that they are carbon/energy-storage molecules that replace starch and perform similarly to storage lipids such as triacylglycerol (TAG), competing for the same precursor molecules produced by the carbon fixation. The presence of β -glucans, along with characterizing them and confirming their beneficial properties for human health, could grant a high potential to the culture of *Nannochloropsis* with commercial purposes. These cultures have already gained great interest because of their high contents of TAG used to produce biodiesel or eicosapentanoic acid (EPA) to feed rotifers, fish or for nutraceutical purposes in humans. The objective of this review is to describe the properties of β -glucans in microalgae and the potential use of *Nannochloropsis* in the production of these molecules.

Key words: Microalgae, nutraceuticals, β -glucans, *Nannochloropsis*

Resumen.- Las microalgas son microorganismos eucariontes fotosintéticos capaces de producir una amplia gama de compuestos de interés comercial, tales como vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos omega-3 e inmunoestimulantes como los β -glucanos. Los β -glucanos son polímeros de D-glucosa unidos por enlaces β -1,3 o β -1,4 los cuales pueden presentar ramificaciones de enlaces β -1,6. Los más conocidos en microalgas son el paramilón (presente en euglenoides) y la crisolaminarina (presente en diatomeas). En el género *Nannochloropsis*, (Ochrophyta), la secuenciación de los genomas y los transcriptomas de algunas de sus especies ha evidenciado que también serían capaces de sintetizar β -glucanos de enlaces β -1,3 con ramificaciones β -1,6. Si bien, existen pocos estudios con respecto a dichos compuestos en estas especies, se sugiere que corresponderían a moléculas de reserva energética de carbono, que reemplazan el almidón y que presentan un comportamiento similar al de los lípidos de reserva como el triacilglicerol (TAG). Por lo que, pueden competir por las mismas moléculas precursoras derivadas de la fijación de carbono. La presencia de los β -glucanos junto con su caracterización y la validación de sus propiedades beneficiosas para la salud humana, pueden otorgar un potencial interés económico al cultivo de *Nannochloropsis*. Estos cultivos, han adquirido un enorme interés debido a su alto contenido de TAG para la producción de biodiesel o ácido eicosapentanoico (EPA) para la alimentación de rotíferos, peces y humanos con fines nutraceuticos. Esta revisión tiene como finalidad evidenciar las propiedades de los β -glucanos en microalgas y el uso potencial de *Nannochloropsis* en la producción de esas moléculas.

Palabras clave: Microalgas, nutraceuticos, β -glucanos, *Nannochloropsis*

INTRODUCCIÓN

Las algas, son un grupo extremadamente diverso de organismos eucariontes, en su mayoría autotróficas, aunque también pueden ser mixotróficas y heterotróficas (John 1994, van den Hoek *et al.* 1995). Estos organismos pueden abarcar desde

microorganismos unicelulares hasta organismos multicelulares (Bold & Wynne 1985), y se estima que realizan aproximadamente el 50% de la fotosíntesis del planeta (John 1994), siendo organismos fundamentales para la existencia y

mantención de la biosfera. Las microalgas han sido sujeto de gran interés en los últimos 10 años debido a sus altas tasas de crecimiento en condiciones favorables, pudiendo afectar el medio ambiente a través de proliferaciones masivas (*blooms* en inglés, *i.e.*, rápido incremento en la población algal de un sistema acuático; Kim *et al.* 2015) o ser utilizadas para la producción de productos de interés comercial, como biocombustibles, aditivos alimenticios, compuestos nutraceuticos, entre otros (Apt & Behrens 1999). El elevado crecimiento de estos organismos, se sustenta en su alta eficiencia en la fijación de CO₂, utilización de fuentes de carbono orgánicas, nitrógeno y fosfatos inorgánicos y orgánicos, entre otros (Borowitzka 1999). Estos organismos han sido capaces de colonizar diferentes tipos de hábitats, incluyendo todo tipo de ambientes acuáticos, terrestres e inclusive ambientes extremos como el desierto de Atacama (van den Hoek *et al.* 1995, Azua-Bustos & González-Silva 2014).

Dada su alta flexibilidad metabólica, ha sido posible cultivar a nivel mundial microalgas a gran escala mediante fotobiorreactores y en panel (*indoor* u *outdoor*) y piscinas al aire libre del tipo *raceway*. Así, el cultivo de microalgas se propone como una fuente de producción sustentable para una amplia gama de productos bioquímicos, como fármacos, aditivos alimenticios, suplementos alimenticios, alimentación para animales, como también biocombustibles y compuestos nutraceuticos (Borowitzka 1999, Richmond 2000, Adarme-Vega *et al.* 2012, Yen *et al.* 2014).

Los nutraceuticos corresponden a compuestos cuyo consumo se ha relacionado con la prevención y/o el tratamiento de ciertas enfermedades y como complemento de fármacos (Kalra 2003, Valenzuela *et al.* 2014). Chile aún no cuenta con una definición formal sobre nutraceutico ni alimento funcional en la normativa alimentaria vigente (Reglamento Sanitario de los Alimentos), aunque la industria de alimentos utiliza con frecuencia el término alimento funcional para identificar a productos que tienen adicionado mayor cantidad de un componente naturalmente presente en el alimento, o al que se le adiciona uno o más componentes no presentes naturalmente en el producto (Valenzuela *et al.* 2014). Para el caso de algunos de estos compuestos, la evidencia científica sobre los beneficios en la salud humana es tan sólida y reconocida por la comunidad científica internacional, que sus componentes han sido avalados por agencias reguladoras gubernamentales, como el FDA de los Estados Unidos, la Agencia Alimentaria de la Unión Europea o el Ministerio de Salud y Bienestar Social de Japón (Valenzuela *et al.* 2014). Existen alrededor de 470 nutraceuticos y alimentos funcionales comercialmente disponibles con investigaciones que respaldan sus beneficios para la salud, los cuales contaron con un tamaño de mercado global estimado de 142,1 billones de

dólares en el 2011 principalmente en Estados Unidos, Japón y Europa, y un potencial crecimiento a corto plazo. Dichos compuestos pueden ser producidos por microalgas, entre los cuales se puede encontrar las vitaminas A (retinol), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina), C (ácido ascórbico), D, E (tocoferol) y H (biotina). También se reportan altas cantidades de minerales y elementos esenciales como hierro, zinc, yodo, calcio, entre otros (Bishop & Zubeck 2012).

Además, las microalgas son productores de aminoácidos, antioxidantes (como la astaxantina) y ácidos grasos esenciales, como omega 6 (ácido araquidónico) y los ácidos grasos omega-3: ácido alfa linolénico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), que presentan mejor biodisponibilidad y características organolépticas que los provenientes del pescado (Adarme-Vega *et al.* 2012). Además, se ha descrito que estos microorganismos, junto con algunas macroalgas, serían capaces de producir compuestos inmunoestimulantes como los β -glucanos (Bishop & Zubeck 2012).

1. β -GLUCANOS: POTENCIAL COMO NUTRACÉUTICOS Y ORGANISMOS PRODUCTORES

Los β -glucanos son un grupo heterogéneo muy diverso de polisacáridos conformados por monómeros de D-glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos tipo β (Stone & Clarke 1992). Estos polisacáridos pertenecen a un grupo de compuestos fisiológicamente activos denominados modificadores de la respuesta biológica, debido a su capacidad de interactuar con el sistema inmune de vertebrados e incluso invertebrados (Werner 1987, Novak & Vetvicka 2009). La gran diversidad de estas moléculas se debe en parte, a las diferencias en la proporción y disposición de sus enlaces glicosídicos (β -1,3, β -1,4 y β -1,6), donde en la mayoría de los casos se presentan como una cadena principal de longitud variable (enlaces β -1,3 y/o β -1,4) con ramificaciones laterales de cadenas de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 y β -1,6 (Stier *et al.* 2014). Los β -glucanos han sido descritos previamente en bacterias, hongos, levaduras (incluyendo la levadura de cerveza), plantas y algas, donde cumplen un importante rol estructural en la pared celular o de reservorio energético (Brownfield *et al.* 2009, Bulone 2009, Nogami & Ohya 2009).

Existen más de 6000 estudios que han descrito los efectos inmuno-moduladores de β -glucanos, principalmente los de enlaces β -1,3, tales como propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas (Vetvicka & Vetvickova 2010), junto con otros efectos beneficiosos para la salud, como hepatoprotectores,

sanación de heridas, pérdida de peso, propiedades antiabéticas y la disminución del colesterol sanguíneo (Zekovic *et al.* 2005, Vetvicka & Vetvickova 2011). Estas propiedades han sido reportadas tanto en humanos como en animales, incluyendo animales de granja, roedores, peces e invertebrados (Novak & Vetvicka 2009), dando cuenta de su alto potencial de desarrollo y sus múltiples aplicaciones. Esta capacidad de interactuar con el sistema inmune de diversos organismos se relacionaría al reconocimiento e interacción con receptores de membrana de monocitos, neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales, eosinófilos, células epiteliales alveolares, células endoteliales y fibroblastos, entre otros tipos celulares (Brown & Williams 2009). Al menos 4 receptores han sido identificados en mamíferos para el reconocimiento de estas moléculas: lactosilceramida, receptores basurero (*scavengers*), receptor del complemento 3 y dectina-1 (Brown & Williams 2009). Estudios en dectina-1 han demostrado que este sería el principal receptor de 1,3- β -glucanos en leucocitos y que la unidad mínima de reconocimiento es un polisacárido de entre 8 a 11 unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,3 con una sola ramificación (Brown & Williams 2009). Además,

este receptor sería incapaz de interactuar con otras moléculas como el manano o la celulosa.

Se ha llevado a cabo producción comercial de 1,3- β -glucanos mediante el cultivo de bacterias, levaduras, hongos y plantas. Por ejemplo, el curdlano, un β -glucano lineal de enlaces β -1,3 sin ramificaciones (Fig. 1) es sintetizado por especies de *Agrobacterium* y *Alcaligenes faecalis* bajo condiciones donde el nitrógeno es limitante (Lee *et al.* 1997). Este compuesto es utilizado principalmente como material gelificante para mejorar la textura, la capacidad de retención de agua y la estabilidad térmica de alimentos. Existen varios reportes sobre la actividad biológica de este tipo de β -glucano de origen bacteriano (Kim *et al.* 2003). Por ejemplo, Jagodzinski *et al.* (1994) reportaron que el sulfato de curdlano poseía gran actividad anti-VIH, además de presentar bajos efectos secundarios. Mikio *et al.* (1995) encontraron que un derivado de curdlano, modificado mediante una reacción con glicidol, desarrolló una excelente actividad antiviral con una toxicidad extremadamente baja. Incluso, se ha sugerido que el curdlano podría ser un tratamiento auxiliar potencial contra la malaria (Evans *et al.* 1998).

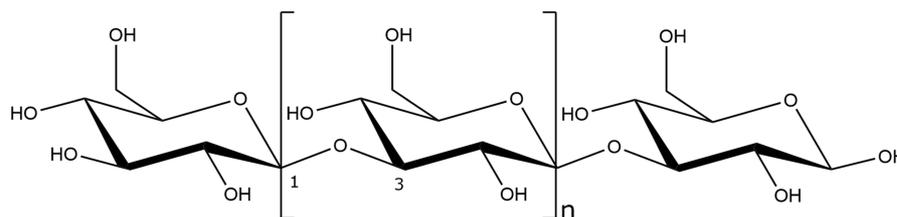


Figura 1. Estructura de 1,3- β -glucano lineal no ramificado como paramilón o curdlano / Structure of not branched lineal 1,3- β -glucan like paramilon or curdlan

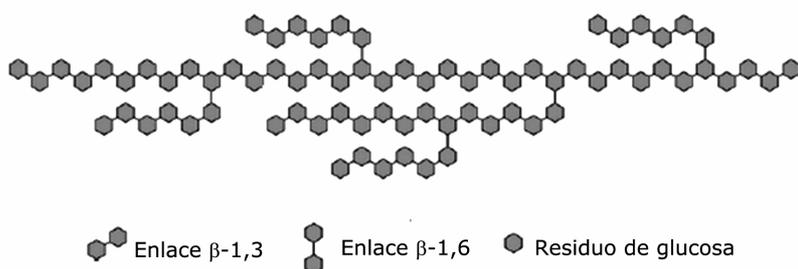


Figura 2. Estructura simplificada del 1,3;1,6- β -glucano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* / Simplified structure of 1,3;1,6- β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.

En hongos los β -glucanos son un componente estructural de la pared celular, donde predominan los 1,3- β -glucanos lineales de alto peso molecular. Están conformados por alrededor de 1500 residuos de glucosa con ramificaciones de cadenas más cortas, que van unidas a la cadena principal por enlaces β -1,6 (Fig. 2). Estos β -glucanos se unen mediante enlaces covalentes a otras moléculas estructurales de la pared, como quitina (mediante enlaces glicosídicos β -1,4) y proteínas, estas últimas unidas a cadenas de 1,6- β -glucano por medio de un anclaje glicosilfosfatidilinositol o a la cadena de 1,3- β -glucano mediante enlaces éster (Kapteyn *et al.* 1999, Nogami & Ohya 2009). En las levaduras, los glucanos son el mayor componente filamentosos de la estructura de la pared celular, donde llegan a formar cerca del 50% del peso seco de la pared de *Saccharomyces cerevisiae* (Nogami & Ohya 2009).

Los β -glucanos de origen fúngico, especialmente los producidos por la levadura de cerveza, han sido ampliamente descritos con efectos inmuno-moduladores (Bohn & BeMiller 1995), encontrándose además múltiples propiedades tales como actividad antitumoral (Chihara *et al.* 1970), actividad anti-fúngica/anti-bacteriana (Onderdonk *et al.* 1992), entre otras. Si bien la mayoría de los estudios realizados en hongos han sido llevados a cabo con β -glucano de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), investigaciones en otras especies han logrado desarrollar algunas drogas anti-cancerígenas en base a β -glucano, tales como Krestin (*Grifola frondosa*) (Nakazato *et al.* 1994, Maehara *et al.* 2012), Lentinan (*Lentinula edodes*) (Zhang *et al.* 2011) y Schizophyllan (*Schizophyllum commune*) (Mansour *et al.* 2012).

En plantas, el tipo más común de β -glucano es la celulosa, formada por cadenas de glucosa de enlaces β -1,4 que no presenta efectos inmunomoduladores (McFarlane *et al.* 2014). Algunos cereales como la avena y la cebada, son capaces de producir β -glucanos no ramificados de enlaces mixtos β -1,3 y β -1,4 (Fig. 3), los cuales han atraído gran interés en investigación debido a su capacidad de interactuar con el sistema inmune de vertebrados (Xia *et al.* 1999, Tada *et al.* 2009), potenciar la acción probiótica de bacterias benéficas (Metzler-Zebeli & Zebeli 2013, Arena *et al.* 2014), inducir posibles

efectos positivos contra el colesterol y la obesidad (Lin *et al.* 2013), así como mejorar el rendimiento al realizar actividad física (Xu *et al.* 2013). Otro tipo de β -glucano que está presente en plantas es la callosa, que presenta 1,3- β -glucano lineal no ramificado formando parte de tejidos de plantas embriofitas en paredes celulares especializadas o en estructuras asociadas a pared en etapas particulares de diferenciación (Stone 2009). También, se encuentra presente como depósitos discretos en la pared celular inducidos por heridas, estrés fisiológico o patológico (Stone 2009).

Las algas son capaces de producir este tipo de moléculas. En macroalgas pardas, por ejemplo, se puede encontrar la laminarina, que es un 1,3;1,6- β -glucano de reserva acumulado al interior de vacuolas (Bulone 2009). A continuación, se describirá en detalle los principales tipos de 1,3- β -glucanos presentes en microalgas y las ventajas productivas de estos organismos.

2. 1,3- β -GLUCANOS EN MICROALGAS

En microalgas, la producción comercial de 1,3- β -glucanos no ha sido desarrollada en extenso. Estos polisacáridos son sintetizados y acumulados como carbohidratos de reserva en las divisiones Ochrophyta, Haptophyta y Euglenophyta, reemplazando al almidón y compitiendo con los lípidos por los mismos precursores provenientes de la fijación de carbono (van den Hoek *et al.* 1995). Los 1,3- β -glucanos en algas son almacenados en vacuolas o como depósitos en el citosol. Además, el hecho de no estar unidos por enlaces covalentes a otros componentes estructurales de la célula, facilita la purificación de estos polisacáridos desde la biomasa. En el caso de *Euglena gracilis* es posible obtener β -glucano con aproximadamente un 98% de pureza (Skov *et al.* 2012). Un factor importante a considerar es el alto valor nutricional de las microalgas, lo que incluye un alto contenido de ácidos grasos esenciales, proteínas, antioxidantes, vitaminas, entre otros nutrientes (Adarme-Vega *et al.* 2012). Este hecho permitiría entregar la biomasa completa como suplemento alimenticio o bien co-extraer otros productos de interés comercial, mejorando la rentabilidad de la producción de estos polisacáridos. Los

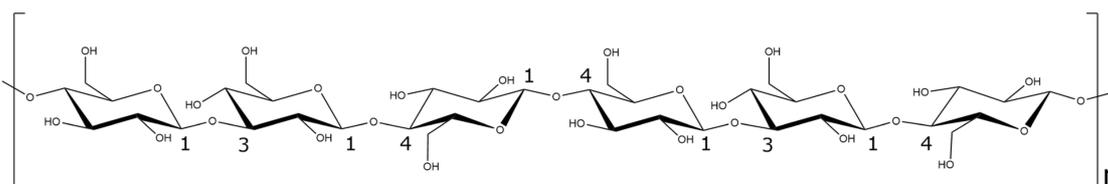


Figura 3. Estructura de 1,3;1,4- β -glucano lineal de enlaces mixtos de la avena y la cebada / Structure of lineal mixed-linkage 1,3;1,4- β -glucan from oat and barley

tipos de β -glucanos que se pueden encontrar en estos organismos varían según cada grupo o especie algal, siendo los principales la crisolaminarina y el paramilón (Usov & Zelinsky 2013).

2.1. CRISOLAMINARINA

La crisolaminarina está conformada por una cadena principal de unidades de D-glucosas unidas por enlaces β -1,3 con ramificaciones de residuos simples de glucosa unidas por enlaces β -1,6 (Fig. 4). Este polisacárido es muy similar a la laminarina presente en algas pardas (Ochrophyta, Phaeophyceae), con la diferencia que la crisolaminarina carece de manitol como residuo terminal en el extremo reductor (Painter 1983). Este polisacárido se ha encontrado presente como carbohidrato de reserva en microalgas de las divisiones Haptophyta y Ochrophyta. Esta última representada por las clases Chrysophyceae (extenso grupo de especies de fitoplancton y algas bentónicas) y la clase Bacillariophyceae (también conocidas como diatomeas) (van den Hoek *et al.* 1995). Se cree que otras clases dentro de la división Ochrophyta, como Dictyochophyceae, Raphidophyceae, Xanthophyceae y Eustigmatophyceae, la cual incluye al género *Nannochloropsis*, también almacenarían 1,3- β -glucanos similares a la crisolaminarina como carbohidratos de reserva (van den Hoek *et al.* 1995).

En el grupo de las diatomeas se han realizado la mayor cantidad de estudios sobre el metabolismo y la estructura de estos β -glucanos (Chiovitti *et al.* 2004, Myklestad & Granum 2009), encontrándose información sobre las variables que

influyen en su acumulación, degradación, enzimas asociadas a su síntesis, localización dentro de la célula, entre otras. Estos carbohidratos han sido localizados mediante el uso de tinción e inmunolocalización en vacuolas de varias especies como *Pinnularia viridis*, *Phaeodactylum tricorutum* y *Thalassiosira pseudonana* (Waterkeyn & Bienfait 1987). Si bien no existen estudios sobre la actividad inmunoestimulante de la crisolaminarina, estudios en laminarinas han encontrado que éstas poseen la capacidad de modular la función inmune uniéndose a receptores específicos de macrófagos (Sletmoen & Stokke 2008). Se han reportado prometedoras actividades antibacterianas en cerdos (Lynch *et al.* 2010) e inmunoestimulantes en ratas (Rice *et al.* 2005). A su vez, se ha visto que la despolimerización parcial de estos compuestos puede generar oligosacáridos más activos (Miyaniishi *et al.* 2003, Pang *et al.* 2005, Kim *et al.* 2006). Además, se ha determinado que las laminarinas y sus derivados son capaces de estimular las defensas contra patógenos en plantas (Kobayashi *et al.* 1995, Ménard *et al.* 2004) y podrían inhibir la infección del VIH (Katsuraya *et al.* 1994).

2.2. PARAMILÓN

El paramilón es un β -glucano fibrilar lineal (Fig. 4) formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces β -1,3, utilizado como carbohidrato de reserva en la división Euglenophyta (Kreger & Meeuse 1952, Clarke & Stone 1960), la cual está formada por cerca de 40 géneros y unas 1000 especies de organismos unicelulares en su mayoría de agua dulce. El microorganismo productor de esta molécula más estudiado corresponde a la especie *Euglena gracilis*, la cual produce el

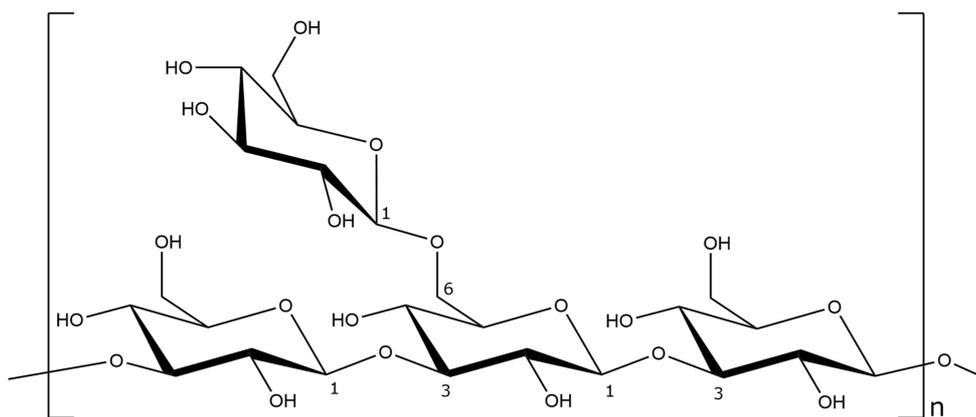


Figura 4. Estructura de 1,3;1,6- β -glucano ramificado como laminarina o crisolaminarina / Structure of side branched 1,3;1,6- β -glucan like laminarin or chrysolaminarin

paramilón como un carbohidrato de reserva intracelular, que se acumula en forma de depósitos insolubles cristalinos. Siendo identificado en un comienzo, como un polisacárido isomérico del almidón (Gottlieb 1850), el paramilón ha atraído gran interés debido a sus propiedades inmunoestimulantes e inmunopotenciadoras (Kondo *et al.* 1992) y por su capacidad de ser fácilmente purificado desde gránulos insolubles, acumulados en grandes cantidades dentro de las células (entre un 40-90%) (Barsanti *et al.* 2001). Se ha reportado que esta sustancia, al ser administrada en forma oral en distintos tipos de organismos, tendría múltiples efectos, como incremento de la resistencia al estrés en *Artemia* sp., incremento de la resistencia al parásito *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha arcoíris, supresión de la lesión atópica de piel similar a dermatitis en ratones, además de otros efectos positivos, tanto en peces como mamíferos (Skov *et al.* 2012).

2.3. OTROS TIPOS DE β -GLUCANOS PRESENTES EN ALGAS

En dinoflagelados (Dinophyceae), las células están rodeadas por una compleja cobertura de celulosa denominada teca y en algunos casos tienen una delgada capa adicional que en especies como *Peridinium cinctum* estaría formada por β -glucanos lineales de enlaces β -1,3 y 1,4 (Nevo & Sharon 1969). Análisis de metilación de los carbohidratos de reserva de 2 especies de *Chlorarachnion* (Chlorarachniophyceae), revelaron la presencia de un β -glucano lineal con enlaces β -1,3 de cadena larga. Mediante inmunolocalización se determinó que este polisacárido era almacenado en vacuolas que encapsulaban el pirenoide (McFadden *et al.* 1997). En algunas microalgas Haptophyta, como en el caso de *Isochrysis galbana* y *Emiliania huxleyi*, se han encontrado también otros tipos de β -glucanos de reserva diferentes a la crisolaminarina, conformados por una cadena principal de glucosas unidas por enlaces β -1,6 con ramificaciones unidas a ésta por enlaces β -1,3 y que presentarían posibles efectos sobre el sistema inmune (Sadovskaya *et al.* 2014).

2.4. GÉNERO *NANNOCHLOROPSIS* Y SUS ATRIBUTOS

El género *Nannochloropsis*, perteneciente a la clase Eustigmatophyceae de la división Ochrophyta, comprendía 6 especies no flageladas de microorganismos fotosintéticos de células ovoides de un tamaño de 2-4 μ m de diámetro, de las cuales 5 correspondían a especies marinas (Guiry & Guiry 2016). Sin embargo, recientemente en el trabajo de Fawley *et al.* (2015) se encontró que dos de estas especies corresponderían a un nuevo género denominado *Microchloropsis*, el cual incluye a las especies *Microchloropsis salina* y *Microchloropsis gaditana*, junto con encontrar una nueva especie dentro del género

Nannochloropsis correspondiente a *Nannochloropsis australis*. Al igual que en otras Ochrophyta, cada célula presenta sólo un cloroplasto con 4 membranas, producto de un segundo evento endosimbiótico. El retículo endoplasmático se encuentra fusionado a la membrana exterior del cloroplasto formando el retículo endoplasmático asociado al cloroplasto, que es continuo a la membrana externa de la envoltura nuclear. Sólo hay un tipo de clorofila presente en las especies de *Nannochloropsis* y *Microchloropsis*, la clorofila *a*, y el principal pigmento accesorio es la violaxantina (van den Hoek *et al.* 1995).

Muchas especies de *Nannochloropsis* presentan un enorme interés debido a su capacidad de acumular una gran cantidad de lípidos como el triacilglicerol (TAG) (utilizado para la síntesis de biocombustibles) y su exitoso cultivo a gran escala usando luz natural, tanto en piscinas abiertas como en sistemas cerrados. Esta producción ha sido lograda por compañías como Solix Biofuels, Aurora Algae, Seambiotic, Hairong Electric Company/Seambiotic y Proviron (Radakovits *et al.* 2012). Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir del cultivo de especies de este género aún no resulta rentable, debido a los altos costos de producción en comparación al combustible fósil (Chisti 2013). Por este motivo, la mayoría de los estudios se han centrado en el metabolismo de lípidos y la optimización de su producción con el fin de solucionar esta problemática. Dentro de los esfuerzos en investigación realizados, se encuentra la secuenciación de los genomas de varias especies y el desarrollo de técnicas de manipulación genética (Radakovits *et al.* 2012, Vieler *et al.* 2012).

Por otra parte, algunas especies de *Nannochloropsis* han sido utilizadas como alimento de rotíferos y peces en acuicultura, debido a su rápido crecimiento y alto contenido de ácidos grasos esenciales necesarios en la dieta de estos organismos (Apt & Behrens 1999), como es el caso del ácido eicosapentanoico (EPA), cuyo contenido varía de un 24 a 28% del contenido total de lípidos dependiendo de la especie y condiciones de cultivo (Hu & Gao 2003, Patil *et al.* 2007, Van Wagenen *et al.* 2012). A esto, se suma un alto contenido de pigmentos y antioxidantes, como clorofila *a*, β -caroteno, violaxantina y vaucherixantina (Macías-Sánchez *et al.* 2005), todos compuestos de alto valor agregado en el mercado. Estas especies son incapaces de sintetizar almidón (van den Hoek *et al.* 1995). Los resultados de la secuenciación de los genomas indica que poseen grupos de genes involucrados en la síntesis de 1,3- β -glucanos (Radakovits *et al.* 2012, Vieler *et al.* 2012, Corteggiani-Carpinelli *et al.* 2014, Wang *et al.* 2014), sugiriendo que el género *Nannochloropsis* (incluidas las especies correspondientes al nuevo género *Microchloropsis*) podría ser capaz de almacenar laminarina o crisolaminarina, al

igual como ocurre en otras Ochrophyta. En el trabajo de Vieler *et al.* (2012), se realizaron preparaciones de residuos insolubles en alcohol a partir de biomasa liofilizada de *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779, las cuales fueron digeridas mediante dos tratamientos enzimáticos, EGII (enzima específica para β -1,4-glucanos) o laminarinasa (específica para β -1,3-glucanos). Se obtuvo que el tratamiento con EGII liberó el 85% de la glucosa contenida en los residuos insolubles en alcohol, mientras que el tratamiento con laminarinasa un 20% (ver Fig. 5). Sin embargo, en ese trabajo no se señala qué porcentaje de la biomasa generada y utilizada para el ensayo corresponde a 1,3- β -glucanos. En la investigación de Jia *et al.* (2015), la cual será descrita en mayor detalle en párrafos posteriores, se sugiere que estos polisacáridos podrían corresponder entre un 5 a un 8% de la biomasa seca de *Nannochloropsis oceanica* IMET1. Respaldo los resultados de las secuenciaciones de los genomas y los experimentos anteriormente mencionados, Arnold *et al.* (2014) describieron la presencia de crisolaminarina en *Nannochloropsis oculata* y *Diacronema lutheri* a través de análisis de NMR- C^{13} (*Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance*) en células vivas, validando a nivel bioquímico la presencia de este polímero en *Nannochloropsis* y en *Pavlova* (Haptophyta). Esta crisolaminarina tendría estructura similar a la encontrada en otras especies, sin embargo nuevos estudios debieran validar su actividad inmunoestimulante y propiedades benéficas en animales y humanos. La presencia de este polímero sumaría valor agregado al cultivo de *Nannochloropsis* con fines comerciales.

3. VARIABLES DE CULTIVO QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE 1,3- β -GLUCANOS

En microalgas, factores ambientales como el tipo de luz e intensidad lumínica, temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH y salinidad, han sido descritos como los más influyentes sobre la composición de las células en los cultivos (Richmond & Hu 2013). Se han realizado diversas investigaciones que se refieren a la influencia de estos factores, con la finalidad de mejorar la producción de metabolitos de interés como antioxidantes, carotenoides, pigmentos, lípidos, carbohidratos, entre otros. En cuanto a la acumulación de moléculas de reserva como lípidos y carbohidratos, los factores descritos con mayor influencia son la intensidad lumínica y la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y carbono, este último ya sea inorgánico u orgánico.

3.1. INTENSIDAD LUMÍNICA

El aumento de la intensidad lumínica y la falta de nutrientes como nitrógeno y fosfato, conlleva a un aumento en el contenido celular de bioproductos fotosintéticos de reserva como lípidos

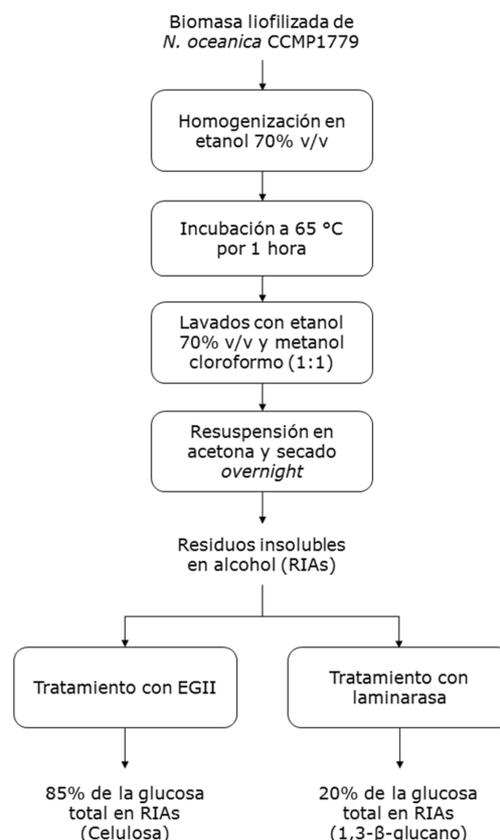


Figura 5. Esquema de la metodología y resultados del ensayo de digestión enzimática realizado por Vieler *et al.* (2012) en residuos insolubles en alcohol (RIAs) de *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 / Methodology and results diagram of the enzymatic digestion assay conducted by Vieler *et al.* (2012) on alcohol-insoluble residues (AIRs) from *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779

(TAG) y carbohidratos (almidón y 1,3- β -glucanos), siendo este un mecanismo adaptativo de sobrevivencia frente a condiciones adversas (Harwood & Guschina 2009). Se ha descrito en varias clases de microalgas que la intensidad lumínica es proporcional al contenido de lípidos totales, es decir, a mayor intensidad lumínica, mayor es el contenido de éstos. Sin embargo, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo que incluye EPA, es inversamente proporcional a la intensidad lumínica de los cultivos. Sukenik *et al.* (1987) demostraron que las células de *Nannochloropsis* presentaban altos niveles de EPA bajo condiciones de limitación lumínica, mientras que en condiciones de alta intensidad lumínica predominan las especies de ácidos grasos 16:0 y 16:1, los cuales están presentes principalmente como triacilglicerol formando cuerpos lipídicos en el citosol (Hu *et al.* 2008). Se ha determinado que un aumento de la intensidad lumínica, aumenta el contenido de

polisacáridos a nivel celular en varias especies (Richmond & Hu 2013). En *Chlorella vulgaris*, por ejemplo, un aumento de la intensidad lumínica de 215 a 330 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ generó un incremento en el contenido de almidón desde un 8,5 a un 40% (Brányiková *et al.* 2011). En diatomeas, la crisolaminarina (1,3;1,6- β -glucano) es sintetizada durante el día y degradada durante la noche (Vårum & Myklestad 1984, Granum *et al.* 2001). Bajo una alta intensidad lumínica y ausencia de nitrógeno en el medio, la crisolaminarina llega a formar cerca del 85% del carbono orgánico de la célula en *Skeletonema costatum* (Granum *et al.* 2001). Resultados similares se obtuvieron en *Odontella obtusa*, donde una intensidad lumínica de 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ otorga un contenido en crisolaminarina de casi el doble en porcentaje de biomasa seca de este polisacárido en comparación a una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Xia *et al.* 2014). A pesar que cambios en la intensidad lumínica generan resultados significativos a nivel productivo, este factor es casi imposible de controlar en cultivos a gran escala al aire libre (Millán-Oropeza *et al.* 2015). Además, se han reportado efectos de fotoinhibición, principalmente del fotosistema II, en sistemas de cultivo al aire libre debido a la excesiva intensidad lumínica proveniente a mediodía del sol, lo cual inhibe el crecimiento y productividad de biomasa (Murata *et al.* 2007).

3.2. DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO EN EL MEDIO

Otro factor de importancia es la disponibilidad de nutrientes en el medio, el cual es el factor más conveniente y documentado con la finalidad de ser controlado. Uno de los nutrientes más influyente sobre la composición celular es el nitrógeno y se ha descrito que al agotarse éste en el medio de cultivo de varias especies de microalgas, como *Chaetoceros muelleri*, *Lobosphaera incisa*, *Ettlia oleoabundans* y *Chlamydomonas reinhardtii*, se observan incrementos significativos en el contenido de lípidos a nivel celular, especialmente triacilglicerol, como también un aumento en el contenido de carbohidratos totales (Dong *et al.* 2013). Algunas especies son capaces de acumular entre un 40-63% de su peso seco en contenido de lípidos totales en medios con bajas concentraciones de nitrógeno (Illman *et al.* 2000). En cuanto a carbohidratos de reserva, en *Chlorella vulgaris* la ausencia de nitrógeno aumenta el contenido de almidón hasta un 55% de su peso en biomasa seca (Brányiková *et al.* 2011). En diatomeas ocurre algo similar, donde la falta de nitrógeno conlleva a un aumento significativo en la acumulación de crisolaminarina, llegando a valores cercanos al 70-80% del carbono orgánico total de las células en especies como *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros pseudocurvisetus* (Vårum & Myklestad 1984, Granum *et al.* 2001, Myklestad & Granum 2009). Contrariamente, cuando el nitrógeno es abundante, la crisolaminarina es degradada para apoyar la síntesis proteica (Myklestad & Granum 2009).

En el caso de *Nannochloropsis*, el nitrógeno es uno de los factores más estudiados con el fin de optimizar el contenido lipídico de las células, donde ha sido reportado que su agotamiento provoca un aumento significativo en el contenido de ácidos grasos saturados, como TAG (Dong *et al.* 2013), llegando a niveles de entre un 60-70% de lípidos totales de su biomasa seca. En cuanto a carbohidratos, se cuenta con escasos estudios respecto de lo que ocurre a nivel celular. La mayoría de las investigaciones solo han cuantificado el contenido de carbohidratos totales en respuesta frente a algunas condiciones de cultivo. En el trabajo de Jia *et al.* (2015), el contenido de carbohidratos totales en *Nannochloropsis oceanica* aumentó de un 5,8 a un 17,9% de su biomasa seca durante los primeros 4 días luego del agotamiento abrupto del nitrógeno en el medio, para posteriormente aumentar a un 19,1% al día 14. En este mismo trabajo, se evidenció que el contenido de 1,3- β -glucanos, expresado como glucosa polimérica y sugerida como laminarina por los autores, aumentó de un 1,63 a un 7,87% al día 8, luego del estrés por ausencia de nitrógeno, para finalmente decaer a un 6,28% al día 14.

3.3. DISPONIBILIDAD DE CARBONO INORGÁNICO

Si bien la estrategia de limitación de nitrógeno logra aumentar significativamente el contenido de lípidos y carbohidratos de interés a nivel celular en las microalgas, ésta involucra también una disminución de la división celular, lo que conlleva una baja productividad de biomasa durante este proceso. A esto, se suma que, uno de los principales problemas del cultivo de microalgas con fines comerciales son las bajas concentraciones de biomasa obtenidas fotoautotórficamente, debido principalmente a un ineficiente uso de la energía lumínica del sol en los sistemas de cultivo actuales. Una de las estrategias propuestas para compensar esta problemática es la de suministrar carbono inorgánico adicional, ya sea en la forma de bicarbonato (NaHCO_3) o dióxido de carbono gaseoso (CO_2). Se ha observado que la adición de estos compuestos carbonados no solo promueve la producción de biomasa, sino que también la de lípidos y carbohidratos, junto con mejorar la asimilación del nitrógeno (Chiu *et al.* 2009, Lin *et al.* 2012). Así mismo, el crecimiento específico de las microalgas puede aumentar hasta tres veces al utilizar un suministro de CO_2 de 2-5% en la aireación (Chiu *et al.* 2009). En *Nannochloropsis*, una concentración de CO_2 de 2% en la aireación de los cultivos ha otorgado los mejores resultados en cuanto a productividad de biomasa y lípidos, mientras que sobre un 5% se observa una inhibición del crecimiento (Chiu *et al.* 2009, Hanson *et al.* 2014, Yangüez *et al.* 2015). Hsueh *et al.* (2009) observaron en *N. oculata* una acumulación de carbohidratos totales de un 29% de su biomasa seca, al suministrar CO_2 al 5% en la aireación, mientras que al utilizar un 8% de CO_2 se obtuvo un

37% de carbohidratos totales. Esto sugiere que el contenido de carbohidratos, al igual que el de lípidos, se relaciona proporcionalmente con el suministro de CO₂. No existen reportes en cuanto a la relación del contenido de 1,3-β-glucanos y el suministro de carbono inorgánico en estas especies, aunque el aumento de carbohidratos totales sugiere que podría deberse en parte al aumento de estos polisacáridos de reserva a nivel celular. Las emisiones de CO₂ son unas de las principales causantes del efecto invernadero en el planeta. Este gas es producido como desecho tanto en procesos industriales, procesos de generación de energía (como termoeléctricas), fermentaciones de vino, cerveza, entre otros, y es liberado a la atmósfera siendo parte de los factores que generan hoy en día el calentamiento global (Hofmann *et al.* 2006). Estas emisiones podrían ser utilizadas para suministrar CO₂ a cultivos de microalgas, como *Nannochloropsis*, con el fin de mejorar la productividad de lípidos de interés o 1,3-β-glucanos, disminuyendo así la emisión de éstas al medio ambiente, conllevando a un beneficio ambiental.

3.4. MIXOTROFÍA Y HETEROTROFÍA

Otra de las soluciones propuestas para mejorar la productividad de las microalgas, es el uso de condiciones de cultivo mixotróficas o heterotróficas, adicionando fuentes de carbono orgánicas al medio, donde el alga no solo se sustenta de la fotosíntesis para obtener su energía, sino que también de la degradación de moléculas orgánicas (Cerón-García *et al.* 2005). El uso de condiciones mixotróficas mejora la producción de biomasa, además de alterar la composición bioquímica de las células, aumentando la acumulación de compuestos de interés como lípidos y carbohidratos (Xu *et al.* 2004a, b; Cerón-García *et al.* 2005, 2013; Wan *et al.* 2011, Hanson *et al.* 2014).

Nannochloropsis es capaz de crecer de manera mixotrófica en presencia de fuentes de carbono orgánicas como glucosa y glicerol, mientras que la adición de etanol y acetato no presentan efectos positivos o incluso inhiben el crecimiento (Hu & Gao 2003, Xu *et al.* 2004 a, b; Wan *et al.* 2011). Se ha descrito que el cultivo mixotrófico con glucosa, logra aumentar la producción de biomasa hasta en un 40%, como también el contenido de lípidos y carbohidratos totales. Algunas de estas fuentes de carbono orgánicas son subproductos industriales, como es el caso del glicerol, que llega a representar el 10% de los productos generados en la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales dentro de la producción de biocombustibles (da Silva *et al.* 2009). El exceso de producción de glicerol puede convertirse en un gran problema al no poder ser liberado directamente al medio ambiente, requiriendo procesos complejos de eliminación y aumentando los costos de producción. Una solución es acoplar a este proceso productivo un cultivo de microalgas capaces de asimilar el

glicerol residual generado, incorporando esta molécula a su metabolismo y convirtiéndola en biomasa u otras moléculas de interés comercial, como triacilglicerol o ácidos grasos omega 3 (da Silva *et al.* 2009). En *Phaeodactylum tricornutum* por ejemplo, se aumentó 13 veces la productividad de EPA al suministrar el medio de cultivo periódicamente con glicerol 0,1 M y con urea 0,1 M, obteniendo una productividad de 43,13 mg L⁻¹. En *Nannochloropsis oculata*, se observó en la producción de biomasa un aumento de 2,5 veces, al utilizar una concentración de glicerol de 3 g L⁻¹ al día 9 de cultivo en comparación al control y, un aumento de 3,6 y 2 veces en la productividad de biomasa y contenido de lípidos, respectivamente, al utilizar una concentración de 2 g L⁻¹ de glicerol (Gupta *et al.* 2016). En general, los reportes del efecto de la mixotrofia o heterotrofia sobre el contenido de carbohidratos de reserva como el almidón o 1,3-β-glucanos son escasos. En *Euglena gracilis*, se ha reportado un incremento en la acumulación de paramilón tanto en condiciones de cultivo mixotróficas como heterotróficas (Briand & Calvayrac 1980, Kiss *et al.* 1986).

4. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL METABOLISMO DE 1,3-β-GLUCANOS

La mayoría de los eventos moleculares que ocurren durante la biosíntesis de 1,3-β-glucanos en microalgas aún no están del todo claros y estudios al respecto son escasos. El organismo donde existe mayor conocimiento al respecto es la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y la síntesis de callosa en plantas (Brownfield *et al.* 2009). En microalgas los organismos con mayor información al respecto son *Euglena gracilis* y algunas diatomeas (Bulone 2009).

La biosíntesis de β-glucanos en general considera varias etapas (Fig. 6). En levaduras, ésta comienza con la síntesis de un iniciador de la polimerización o *primer*, el cual es una pequeña cadena de glucosas unidas por enlaces β-1,3. El *primer* es transferido a una β-glucano sintasa asociada a membrana, la cual cataliza la transferencia de unidades glucosídicas desde un azúcar donador activado a un aceptor (Bulone 2009). Este azúcar donador correspondería a la UDP-glucosa, la cual es formada a partir de la glucosa-1-fosfato proveniente de la ruta de la glicólisis/gluconeogénesis y UTP mediante la acción de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (Shematek *et al.* 1980, Shematek & Cabib 1980). Lo mismo ha sido sugerido para *Euglena gracilis* y diatomeas (Goldemberg & Marechal 1963, Marechal & Goldemberg 1964, Roessler 1987). El mecanismo de síntesis de los *primers* no ha sido identificado hasta el momento y mucho menos si éstos son estrictamente necesarios en el proceso. Tampoco se sabe cómo la polimerización es detenida. Sin embargo, se cree que el mecanismo sería bastante similar a lo que ocurre con los

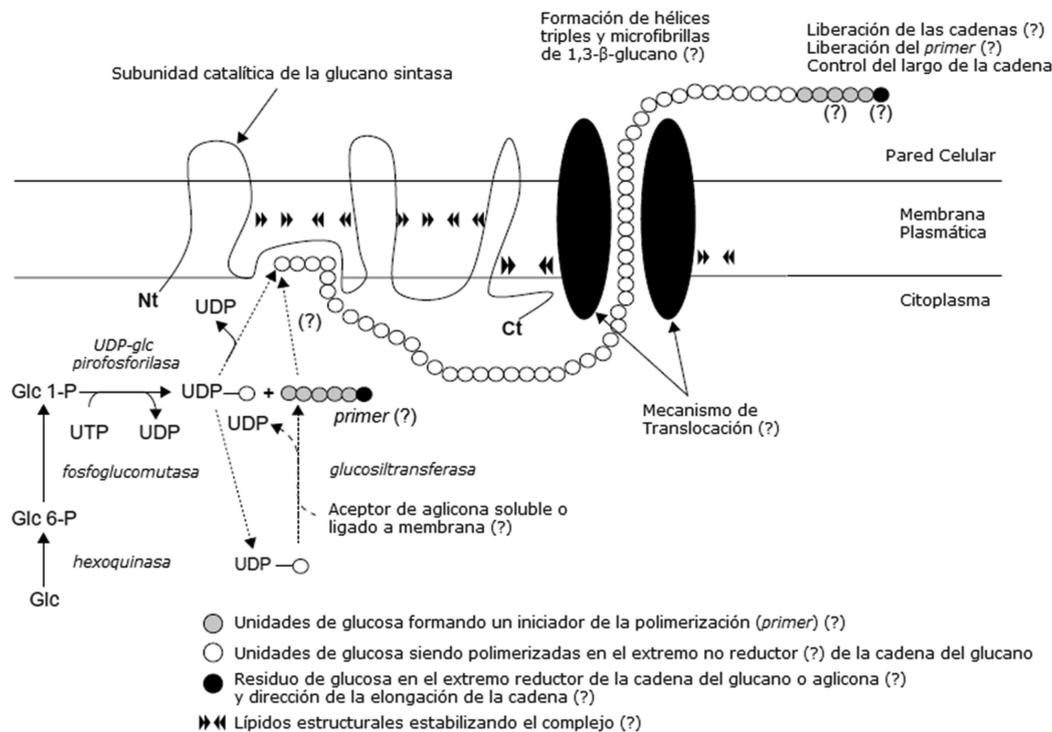


Figura 6. Modelo hipotético de la biosíntesis de 1,3-β-glucanos lineales en levadura de cerveza. El símbolo (?) se refiere a aspectos de la biosíntesis que permanecen sin ser aclarados; Glc: glucosa; UDP: Uridina difosfato; UTP: Uridina trifosfato; P: fosfato; Nt: N-terminal; Ct: C-terminal. Adaptado de Bulone (2009) / Hypothetical model for the biosynthesis of linear 1,3-β-glucans from yeast. (?) Refers to aspects that remain to be clarified; Glc: glucose; UDP: Uridine diphosphate; UTP: Uridine Triphosphate; P: phosphate; Nt: N-terminal; Ct: C-terminal. Adapted from Bulone (2009)

α-1,4-glucanos, donde la síntesis de glicógeno o almidón requiere de un *primer* de glicoproteína y las ramificaciones se realizarían mediante el reordenamiento de la cadena del polisacárido a través de la acción de una transglucosilasa (Stoddart 1984).

Se sugiere que la 1,3-β-glucano sintasa cuenta con al menos dos subunidades: una subunidad catalítica ligada a membrana y una subunidad reguladora de unión a GTP (Szanişzlo *et al.* 1985, Kang & Cabib 1986, Mol *et al.* 1994). Estudios en *Saccharomyces cerevisiae* definieron que esta enzima corresponde a una proteína de 200 kDa y la determinación de la secuencia aminoacídica junto con el posterior clonamiento permitió la identificación de dos genes con una alta homología (88% de identidad; Nogami & Ohya 2009). Estos genes, *FKS1* y *FKS2* codifican para proteínas de 1876 y 1895 aminoácidos, respectivamente, con 16 dominios transmembrana (Nogami & Ohya 2009). La evidencia existente indica que estos genes codificarían para la subunidad catalítica de la 1,3-β-glucano sintasa, perteneciente a la familia glicosil transferasa 48 (GT48).

En el caso de la proteína *FKS1* constaría de una estructura de 4 dominios funcionales: una cola citosólica N-terminal ~400 aminoácidos involucrada en la actividad 1,3-β-glucano sintasa, una región de seis dominios transmembrana, formada por ~300 aminoácidos requerida para la correcta localización de sitios de crecimiento polarizados, una región catalítica putativa de ~600 aminoácidos y un C-terminal de 10 dominios transmembrana involucrada en la localización de la proteína a la superficie celular de ~600 aminoácidos (Dijkgraaf *et al.* 2002). Estos resultados permitieron la identificación posterior en plantas de una familia de genes denominada como *Glucan Synthase-Like* (GSL), también pertenecientes a la familia GT48, posiblemente involucrados en la síntesis de callosa (Brownfield *et al.* 2009). En cuanto a la subunidad reguladora de unión a GTP de la 1,3-β-glucano sintasa, la evidencia en levadura indica que corresponde a una GTPasa tipo Rho, familia de pequeñas proteínas G (20 kDa), relacionadas con señalización y codificadas por el gen *RHO1* (Drzonova *et al.* 1996, Qadota *et al.* 1996) la cual regularía la actividad de la 1,3-β-glucano sintasa mediante diversos mecanismos. Con respecto a la ruta

de biosíntesis de las uniones β -1,6, la enzima que cataliza la síntesis de éstas no ha sido identificada (Nogami & Ohya 2009). Se han encontrado los genes *KRE6* y *SKN1* los cuales codifican para un par de proteínas homologas del aparato de Golgi muy similares a la familia 16 glicosido hidrolasas y cuya ausencia genera la disminución casi por completo de las ramificaciones β -1,6 en levadura. Sin embargo, la evidencia existente no es concluyente (Montijn *et al.* 1999).

En microalgas, las mayores limitaciones en dilucidar los mecanismos moleculares de biosíntesis de β -glucanos han sido la ausencia de los genomas secuenciados de estos organismos, junto con la dificultad de la preparación de transformantes estables y delección de genes. Actualmente, se cuenta con la publicación de los genomas de los Oomycetes *Phytophthora sojae*, *Phytophthora ramorum* y *Phytophthora infestans* (Tyler *et al.* 2006), las diatomeas *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust *et al.* 2004) y *Phaeodactylum tricorutum* (Kroth *et al.* 2008) sumado a la publicación de los genomas de varias especies de *Nannochloropsis* (Wang *et al.* 2014). Análisis en dichos genomas han permitido la identificación de varios genes similares a los que codifican para las subunidades catalíticas putativas de la 1,3- β -glucano sintasa de plantas (denominadas como callosa sintasas), levaduras y hongos. Otros genes importantes involucrados en las rutas metabólicas de 1,3- β -glucanos también han sido identificados. Tal es el caso de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, endo y exo-1,3- β -glucanasas y algunos similares al gen *KRE6* y *SKN1* mencionados anteriormente en levadura como involucrados en generar las ramificaciones β -1,6 (Armbrust *et al.* 2004, Tyler *et al.* 2006, Kroth *et al.* 2008, Wang *et al.* 2014). Curiosamente, en el oomycete *P. infestans* uno de estos genes similares a *KRE6* se encuentra fusionado a uno de los genes que codifican para una 1,3- β -glucano sintasa (Tyler *et al.* 2006). Finalmente cabe señalar, que la información sobre la regulación de todos estos genes involucrados en el metabolismo de 1,3- β -glucanos es escasa. Los resultados de los transcriptomas en condición de estrés por ausencia de nitrógeno en el medio de *Microchloropsis gaditana*, *Nannochloropsis oceanica* y *Nannochloropsis oculata* reveló que tanto el gen de la 1,3- β -glucano sintasa y los de la UDP-glucosa pirofosforilasa son sobre expresados bajo estas condiciones, lo que se coincide con el aumento de 1,3- β -glucano a nivel celular observado por Jia *et al.* (2015). También se reportó el aumento de los genes involucrados en su degradación, como endo y exo-1,3- β -glucanasas, lo que sugiere que estos polisacáridos serían una reserva de carbono temprana, siendo el TAG la reserva de carbono a largo plazo preferida por estas especies. En el trabajo de Jia *et al.* (2015) se presenta el análisis mediante qRT-PCR ('*quantitative real-time reverse transcription-PCR*', por sus

siglas en inglés) de genes del metabolismo 1,3- β -glucano, en el cual se reportó que el estrés por ausencia de nitrógeno provocó un aumento en los niveles de transcrito de genes putativos para las enzimas fosfoglucomutasa (de 0,05 a 0,5 aproximadamente) y UDP-glucosa pirofosforilasa (de 0,035 a 0,6 aproximadamente) durante los primeros 3 días. Por otra parte, un leve aumento en los niveles de transcrito de 1,3- β -glucano sintasa (de 0,4 a 1) se registró durante este mismo periodo junto con un marcado aumento al día 8 de tratamiento (a valores de \sim 2,0). Otro gen, al cual los autores denominaron β -1,3-glucosil transferasa, presentó un marcado aumento en sus niveles de transcrito al día 1 y 8 del tratamiento (de \sim 0,2 a 0,6). En este contexto, la disminución de los niveles de expresión de estos genes, respaldaría la hipótesis que los 1,3- β -glucanos serían una reserva de carbono temprana en la célula algal.

DISCUSIÓN

Una de las principales metas que se propone a través del cultivo de microalgas, es el poder lograr la producción sustentable y económicamente rentable de la biomasa. En una primera etapa, se evaluó la utilización de esta biomasa en la producción de biocombustibles capaces de remplazar los combustibles fósiles. A la fecha, no se ha podido lograr la producción a gran escala de combustibles a partir de microalgas, debido a los altos costos de producción asociados al cultivo de estos organismos y al bajo valor agregado de los combustibles generados, lo que ha hecho imposible su rentabilidad económica (Chisti 2013). Por otro lado, la producción de compuestos de alto valor agregado, como los nutracéuticos, está ganando cada vez más terreno con productos como la astaxantina, luteína, ácidos grasos omega 3, entre otros, los cuales presentan una demanda creciente y alto valor en el mercado (Bishop & Zubeck 2012). *Nannochloropsis* es uno de los géneros que ha sido considerado como candidato para la producción de biodiesel (Radakovits *et al.* 2012). En el trabajo de Jia *et al.* (2015), se obtuvo que *Nannochloropsis oceanica* IMET1 acumula entre un 5-8% de 1,3- β -glucano. Los autores plantean este tipo de carbohidratos como un subproducto no deseado cuyo carbono utilizado en su síntesis podría ser redireccionado mediante ingeniería metabólica con el fin de aumentar el contenido de TAG para la síntesis de biodiesel. Sin embargo, estos carbohidratos, debido a sus propiedades benéficas sobre la salud humana y animal, podrían ser un valioso subproducto de alto valor agregado, ayudando a solventar los altos costos productivos en estas especies. Para esto, son requeridos nuevos estudios enfocados en las condiciones que influyen en su acumulación junto con la caracterización molecular del polisacárido y la validación de los efectos inmunomoduladores u otras propiedades, así como también, la determinación del

remanente de estas moléculas luego de realizados los procesos de extracción de lípidos, tal como se hace con otros componentes celulares de interés como proteínas.

Tanto diatomeas como *Euglena gracilis* cuentan con abundantes estudios sobre 1,3- β -glucanos y sus propiedades (Bulone 2009), pero su cultivo presenta mayores dificultades que por ej. las especies de *Nannochloropsis* las que cuentan con cultivo y producción estables a gran escala (Radakovits *et al.* 2012). Además, 6 de las 7 especies de *Nannochloropsis* y *Microchloropsis* corresponden a microorganismos marinos (Guiry & Guiry 2016), lo que permite la utilización de agua de mar, recurso prácticamente ilimitado, sin competir con la cada vez más escasa agua dulce, lo cual no es posible en el caso de *Euglena*.

CONCLUSIÓN

En base a los antecedentes recopilados, se puede afirmar que el género *Nannochloropsis* (incluyendo las especies descritas recientemente como *Microchloropsis*) presenta un gran potencial para la producción sustentable de nutraceuticos como los 1,3- β -glucanos. No obstante, se requieren mayores estudios con respecto a estas moléculas tales como caracterización, métodos eficientes de extracción y análisis de las rutas metabólicas involucradas en su producción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló gracias al financiamiento del Proyecto FIA PYT 2016-0339 y FONDECYT 11090234 a NE. Se agradece a los tres revisores anónimos designados por la Revista de Biología Marina y Oceanografía que contribuyeron a la mejora de este manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Adarme-Vega TC, DKY Lim, M Timmins, F Vernen, Y Li & PM Schenk 2012.** Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories* 11(1): 96. <doi: 10.1186/1475-2859-11-96>
- Apt KE & PW Behrens. 1999.** Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology* 35: 215-226.
- Arena MP, G Caggianiello, D Fiocco, P Russo, M Torelli, G Spano & V Capozzi. 2014.** Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International Journal of Molecular Science* 15(2): 3025-3039.
- Armbrust EV, JA Berges, C Bowler, BR Green, D Martinez, NH Putnam, SG Zhou, AE Allen, KE Apt, M Bechner, MA Brzezinski, BK Chaal, A Chiovitti, AK Davis, MS Demarest, JC Detter, T Glavina, D Goodstein, MZ Hadi, U Hellsten, M Hildebrand, BD Jenkins, J Jurka, VV Kapitonov, N Kroger, WWY Lau, TW Lane, FW Larimer, JC Lippmeier, S Lucas, M Medina, A Montsant, M Obornik, MS Parker, B Palenik, GJ Pazour, PM Richardson, TA Rynearson, MA Saito, DC Schwartz, K Thamtrakoln, K Valentin, A Vardi, FP Wilkerson & DS Rokhsar. 2004.** The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306(5693): 79-86.
- Arnold AA, B Genard, F Zito, R Tremblay, DE Warschawski & I Marcotte. 2014.** Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848(1-B): 369-377.
- Azua-Bustos A & C González-Silva. 2014.** Biotechnological applications derived from microorganisms of the Atacama Desert. *BioMed Research International* 2014, Article ID 909312. <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/909312>>
- Barsanti L, R Vismara, V Passarelli & P Gualtieri. 2001.** Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology* 13: 59-65.
- Bishop WM & HM Zubeck. 2012.** Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Nutrition and Food Science* 2:147. <doi:10.4172/2155-9600.1000147>.
- Bohn JA & JN BeMiller. 1995.** (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28(1): 3-14.
- Bold HC & MJ Wynne. 1985.** Introduction to the algae structure and reproduction, 270 pp. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Borowitzka MA. 1999.** Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology* 35: 313-321.
- Brányiková I, B Maršálková, J Doucha, T Brányik, K Bišová, V Zachleder & M Vítová. 2011.** Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 766-776.
- Briand J & R Calvayrac. 1980.** Paramylon synthesis in heterotrophic and photoheterotrophic *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology* 16: 234-239.
- Brown GD & DL Williams. 2009.** (1,3)- β -Glucans in innate immunity: Mammalian systems. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1 \rightarrow 3- β -glucans and related polysaccharides*, pp. 587-627. Elsevier, Burlington.
- Brownfield L, M Doblin, GB Fincher & A Bacic. 2009.** Biochemical and molecular properties of biosynthetic enzymes for (1,3)- β -Glucans in Embryophytes, Chlorophytes and Rhodophytes. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1 \rightarrow 3- β -Glucans and related polysaccharides*, pp. 283-326. Elsevier, Burlington.

- Bulone V. 2009.** Biosynthetic enzymes for (1,3)- β -glucans and (1,3;1,6)- β -glucans in protozoans and chromistans: Biochemical characterization and molecular biology. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). Chemistry, biochemistry, and biology of 1 \rightarrow 3- β -glucans and related polysaccharides, pp. 233-258. Elsevier, Burlington.
- Cerón-García MC, A Sánchez-Mirón, JM Fernández-Sevilla, E Molina-Grima & F García-Camacho. 2005.** Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry* 40: 297-305.
- Cerón-García MC, JM Fernández-Sevilla, A Sánchez-Mirón, F García-Camacho, A Contreras-Gómez & E Molina-Grima. 2013.** Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes. *Bioresources Technology* 147: 569-576.
- Chihara G, J Hamuro, Y Maeda, Y Arai & F Fukuoka. 1970.** Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature* 225: 943-944.
- Chiovitti A, P Molino, SA Crawford, R Teng, T Spurck & R Wetherbee. 2004.** The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *European Journal of Phycology* 39: 117-128.
- Chisti Y. 2013.** Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167: 201-214.
- Chiu SY, CY Kao, MT Tsai, SC Ong, CH Chen & CS Lin. 2009.** Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresources Technology* 100(2): 833-838.
- Clarke AE & BA Stone. 1960.** Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 44: 161-163.
- Corteggiani-Carpinelli E, A Telatin, N Vitulo, C Forcato, M D'Angelo, R Schiavon, A Vezzi, GM Giacometti, T Morosinotto & G Valle. 2014.** Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. *Molecular Plant* 7: 323-335.
- da Silva GP, M Mack & J Contiero. 2009.** Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27: 30-39.
- Dijkgraaf GJ, M Abe, Y Ohya & H Bussey. 2002.** Mutations in Fks1p affect the cell wall content of β -1,3- and β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 671-690.
- Dong HP, E Williams, DZ Wang, ZX Xie, RC Hsia, A Jenck, R Halden, J Li, F Chen & AR Place. 2013.** Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to Long-Term Nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiology* 162: 1110-1126.
- Drgonova J, T Drgon, K Tanaka, R Kollar, GC Chen, RA Ford, CS Chan, Y Takai & E Cabib. 1996.** Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272(5259): 277-279.
- Evans SG, D Morrison, Y Kaneko & I Havlik. 1998.** The effect of curdlan sulfate on development *in vitro* of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 87-89.
- Fawley MW, I Jameson & KP Fawley. 2015.** The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia* 54: 545-552.
- Goldemberg SH & LR Marechal. 1963.** Biosynthesis of paramylon in *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 71: 743-744.
- Gottlieb J. 1850.** Über eine neue, mit Stärkmehl isomere Substanz. *Annalen der Chemie und Pharmacie* 75: 51-61.
- Granum E, S Kirkvold & SM Mykkestad. 2001.** Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242: 83-94.
- Guiry MD & GM Guiry. 2016.** AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <<http://www.algaebase.org>>
- Gupta PL, HJ Choi & S Lee. 2016.** Enhanced nutrient removal from municipal wastewater assisted by mixotrophic microalgal cultivation using glycerol. *Environmental Science and Pollution Research International* 23: 10114-10123.
- Hanson DT, AM Collins, HD Jones, J Roesgen, S Lopez-Nieves & JA Timlin. 2014.** On-line stable isotope gas exchange reveals an inducible but leaky carbon concentrating mechanism in *Nannochloropsis salina*. *Photosynthesis Research* 121: 311-322.
- Harwood JL & IA Guschina. 2009.** The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91: 679-684.
- Hofmann DJ, JH Butler, EJ Dlugokencky, JW Elkins, K Masarie, SA Montzka & P Tans. 2006.** The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: Introduction of the Annual Greenhouse Gas Index. *Tellus Series B* 58: 614-619.
- Hsueh HT, WJ Li, HH Chen & H Chu. 2009.** Carbon fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: 33-39.
- Hu H & K Gao. 2003.** Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters* 25: 421-425.
- Hu Q, M Sommerfeld, E Jarvis, M Ghirardi, M Posewitz, M Seibert & A Darzins. 2008.** Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54: 621-639.

- Illman AM, AH Scragg & SW Shales. 2000.** Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 631-635.
- Jagodzinski PP, R Wiaderkiewicz, G Kurzawski, M Kloczewiak, H Nakashima, E Hyjek, N Yamamoto, T Uryu, Y Kaneko, MR Posner & D Kozbor. 1994.** Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection *in vitro*. *Virology* 202: 735-745.
- Jia J, D Han, HG Gerken, Y Li, M Sommerfeld, Q Hu & J Xua. 2015.** Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research* 7: 66-77.
- John DM. 1994.** Biodiversity and conservation: an algal perspective. *The Phycologist* 38: 3-15.
- Kalra EK. 2003.** Nutraceutical -definition and introduction. *AAPS PharmSci* 5(3): 27-28.
- Kang MS & E Cabib. 1986.** Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1→3)-β-D-glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 5808-5812.
- Kapteyn JC, H Van Den Ende & FM Klis. 1999.** The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 373-383.
- Katsuraya K, N Ikushima, N Takahashi, T Shoji, H Nakashima, N Yamamoto, T Yoshida & T Uru. 1994.** Synthesis of sulfated alkyl malto- and laminara-oligosaccharides with potent inhibitory effects on AIDS virus infection. *Carbohydrate Research* 260: 51-61.
- Kim, JK, S Kottuparambil, SH Moh, TK Lee, YJ Kim, JS Rhee, EM Choi, BH Kim, YJ Yu, C Yarish & T Han. 2015.** Potential applications of nuisance microalgae blooms. *Journal of Applied Phycology* 27: 1223-1234.
- Kim KH, YW Kim, HB Kim, BJ Lee & DS Lee. 2006.** Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnology Letters* 28: 439-446.
- Kim MK, KE Ryua, WA Choi, YH Rhee & IY Lee. 2003.** Enhanced production of (1→3)-β-D-Glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species. *Biochemical Engineering Journal* 16: 163-168.
- Kiss JZ, AC Vasconcelos & RE Triemer. 1986.** Paramylon synthesis and chloroplast structure associated with nutrient levels in *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology* 22: 327-333.
- Kobayashi A, A Tai & K Kawazu. 1995.** Structural elucidation of an elicitor-active oligosaccharide, LN-3, prepared from algal laminaran. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 14: 819-832.
- Kondo Y, A Kato, H Hojo, S Nozoe, M Takeuchi & K Ochi. 1992.** Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a β-(1→3)-D-Glucan from *Euglena gracilis*. *Journal of Pharmacobiodynamics* 15: 617-621.
- Kreger DR & NJD Meeuse. 1952.** X-ray of *Euglena*-paramylon, of the acid-insoluble glucan of yeast cell walls and of laminarin. *Biochimica et Biophysica Acta* 9: 699-700.
- Kroth PG, A Chiovitti, A Gruber, V Martin-Jezequel, T Mock, MS Parker, MS Stanley, A Kaplan, L Caron, T Weber, U Maheswari, EV Armbrust & C Bowler. 2008.** A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS ONE* 3: e1426 <doi: 10.1371/journal.pone.0001426>
- Lee IY, WT Seo, GJ Kim, MK Kim, CS Park & YH Park. 1997.** Production of curdlan using sucrose and sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18: 255-259.
- Lin N, Y Li, L Tang, J Shi & Y Chen. 2013.** *In vivo* effect of oat cereal β-glucan on metabolic indexes and satiety-related hormones in diet-induced obesity C57-B1 mice. *Molecular Nutrition Food Research* 57: 1291-1294.
- Lin Q, N Gu, G Li, J Lin, L Huang & L Tan. 2012.** Effects of inorganic carbon concentration on carbon formation, nitrate utilization, biomass and oil accumulation of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Bioresource Technology* 111: 353-359.
- Lynch MB, T Sweeney, JJ Callan, JT O'Sullivan & JV O'Doherty. 2010.** The effect of dietary *Laminaria*-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 430-437.
- Macías-Sánchez MD, C Mantell, M Rodríguez, E Martínez de la Ossa, LM Lubián & O Montero. 2005.** Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* 66: 245-251.
- Maehara Y, S Tsujitani, H Saeki, E Oki, K Yoshinaga, Y Emi, M Morita, S Kohnoe, Y Kakeji, T Yano & H Baba. 2012.** Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN®): review of development and future perspectives. *Surgery Today* 42: 8-28.
- Mansour A, A Daba, N Baddour, M El-Saadani & E Aleem. 2012.** Schizophyllan inhibits the development of mammary and hepatic carcinomas induced by 7,12 dimethylbenz(α) anthracene and decreases cell proliferation: comparison with tamoxifen. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138: 1579-1596.
- Marechal LR & SH Goldemberg. 1964.** Uridine diphosphate glucose-β-(1,3)-glucan β-3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry* 239: 3163-3167.
- McFadden GI, PR Gilson & IM Sims. 1997.** Preliminary characterization of carbohydrate stores from

chlorarachniophytes (Division: Chlorarachniophyta). Phycological Research 45: 145-151.

- McFarlane HE, A Döring & S Persson. 2014.** The cell biology of cellulose synthesis. Annual Review of Plant Biology 65: 69-94.
- Ménard R, S Alban, P De Ruffray, F Jamois, G Franz, B Frigit, JC Yvin & S Kauffmann. 2004.** β -1,3 Glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 3020-3032.
- Metzler-Zebeli BU & Q Zebeli. 2013.** Cereal β -glucan alters nutrient digestibility and microbial activity in the intestinal tract of pigs, and lower manure ammonia emission: A meta-analysis. Journal of Animal Science 91: 3188-3199.
- Mikio K, O Yoshiro, O Hiroto, K Yoshikazu, I Hiroshi, M Hisashi & K Takeshi. 1995.** Water soluble β -(1,3)-Glucan derivative and antiviral agent containing the derivative. Japan Patent 07228601.
- Millán-Oropeza A, LG Torres-Bustillos & L Fernández-Linares. 2015.** Simultaneous effect of nitrate (NO_3^-) concentration, carbon dioxide (CO_2) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. Biofuel Research Journal 2(1): 215-221.
- Miyaniishi N, Y Iwamoto, E Watanabe & T Oda. 2003.** Induction of TNF- β production from human peripheral blood monocytes with β -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1. Journal of Bioscience and Bioengineering 95: 192-195.
- Mol PC, HM Park, JT Mullins & E Cabib. 1994.** A GTP-binding protein regulates the activity of (1 \rightarrow 3)- β -Glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. Journal of Biological Chemistry 269: 31267-31274.
- Montijn R, E Vink, W Müller, A Verkleij, H Van Den Ende, B Henrissat & F Klis. 1999.** Localization of synthesis of β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 181: 7414-7420.
- Murata N, S Takahashi, Y Nishiyama & SI Allakhverdiev. 2007.** Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 1767(6): 414-421.
- Myklestad SM & E Granum. 2009.** Biology of (1,3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromists. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). Chemistry, biochemistry, and biology of 1 \rightarrow 3- β -Glucans and related polysaccharides, pp. 353-385. Elsevier, Burlington.
- Nakazato H, A Koike, S Saji, N Ogawa, J Sakamoto, H Nakazato, A Koike, S Saji, N Ogawa & J Sakamoto. 1994.** Efficacy of immunotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. The Lancet 343: 1122-1126.
- Nevo Z & N Sharon. 1969.** The cell wall of *Peridinium westii*, a non-cellulosic glucan. Biochimica et Biophysica Acta 173: 161-175.
- Nogami S & Y Ohya. 2009.** Biosynthetic enzymes for (1-3)- β -glucans, (1-3;1-6)- β -glucans from yeasts: Biochemical properties and molecular biology. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). Chemistry, biochemistry, and biology of 1 \rightarrow 3 β -Glucans and related polysaccharides, pp. 259-282. Elsevier, Burlington.
- Novak M & V Vetvicka. 2009.** Glucans as biological response modifiers. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 9: 67-75.
- Onderdonk AB, RL Cisneros, P Hinkson & G Ostroff. 1992.** Anti-infective effect of poly- β 1-6-glucotriaryl- β 1-3-glucopyranose glucan *in vivo*. Infection and Immunity 60: 1642-1647.
- Painter TJ. 1983.** Algal polysaccharides. In: Aspinall GO (ed). The polysaccharides 2: 195-285. Academic Press, Oxford.
- Pang Z, K Otaka, T Maoka, K Hidaka, S Ishijima, M Oda & M Ohnishi. 2005.** Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 69: 553-558.
- Patil V, T Källqvist, E Olsen, G Vogt & HR Gislerød. 2007.** Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquaculture International 15: 1-9.
- Qadota H, CP Python, SB Inoue, M Arisawa, Y Anraku, Y Zheng, T Watanabe, DE Levin & Y Ohya. 1996.** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -Glucan synthase. Science 272: 279-281.
- Radakovits R, RE Jinkerson, SI Fuerstenberg, H Tae, RE Settlege, JL Boore & MC Posewitz. 2012.** Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. Nature Communications 3: 686. <doi:10.1038/ncomms1688>
- Rice PJ, EL Adams, T Ozment-Skelton, AJ Gonzalez, MP Goldman, BE Lockhart, LA Barker, KF Breuel, WK Deponti, JH Kalbfleisch, HE Ensley, GD Brown, S Gordon & DL Williams. 2005.** Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 314: 1079-1086.
- Richmond A. 2000.** Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. Journal of Applied Phycology 12: 441-451.
- Richmond A & Q Hu. 2013.** Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology, 736 pp. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Roessler PG. 1987.** UDPglucose pyrophosphorylase activity in the diatom *Cyclotella cryptica*: pathway of chrysolaminarin biosynthesis. Journal of Phycology 23: 494-498.

- Sadovskaya I, A Souissi, S Souissi, T Grard, P Lencel, CM Greene, S Duin, PS Dmitrenok, AO Chizhov, AS Shashkov & AI Usov. 2014. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-β-d-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers* 111: 139-148.
- Sforza E, R Cipriani, T Morosinotto, A Bertuccio & GM Giacometti. 2012. Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology* 104: 523-529.
- Shematek EM & E Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of β-(1→3)-Glucan synthetase by ATP and GTP. *Journal of Biological Chemistry* 255: 895-902.
- Shematek EM, JA Braatz & E Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of β-(1→3)-Glucan synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 255: 888-894.
- Skov J, PW Kania, L Holten-Andersen, B Fouz & K Buchmann. 2012. Immunomodulatory effects of dietary β-1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology* 33: 111-120.
- Sletmoen M & BT Stokke. 2008. Higher order structure of (1,3)-β-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers* 89: 310-321.
- Stier H, V Ebbeskotte & J Gruenwald. 2014. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal* 13(1): 1-17.
- Stoddart RW. 1984. The biosynthesis of polysaccharides, 354 pp. Croom Helm. Beckenham.
- Stone BA. 2009. Chemistry of β-glucans. In: Bacic A, GB Fincher & BA Stone (eds). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1→3-β-Glucans and related polysaccharides*, pp. 5-46. Elsevier, Burlington.
- Stone BA & AE Clarke. 1992. *Chemistry and biology of (1→3)-β-Glucans*, 803 pp. La Trobe University Press, Victoria.
- Sukenik A, J Bennett & P Falkowski. 1987. Lightsaturated photosynthesis - limitation by electron transport or carbon fixation. *Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics* 891: 205-215.
- Szaniszlo PJ, MS Kang & E Cabib. 1985. Stimulation of β-(1→3)-Glucan synthetase of various fungi by nucleoside triphosphates: generalized regulatory mechanism for cell wall biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 161: 1188-1194.
- Tada R, F Ikeda, K Aoki, M Yoshikawa, Y Kato, Y Adachi, A Tanioka, K Ishibashi, K Tsubaki & N Ohno. 2009. Barley-derived β-D-glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated pathway. *Immunology Letters* 123: 144-148.
- Tyler BM, S Tripathy, XM Zhang, P Dehal, RHY Jiang, A Aerts, FD Arredondo, L Baxter, D Bensasson, JL Beynon, J Chapman, CMB Damasceno, AE Dorrance, DL Dou, AW Dickerman, IL Dubchak, M Garbelotto, M Gijzen, SG Gordon, F Govers, NJ Grunwald, W Huang, KL Ivors, RW Jones, S Kamoun, K Krampis, KH Lamour, MK Lee, WH McDonald, M Medina, HJG Meijer, EK Nordberg, DJ Maclean, MD Ospina-Giraldo, PF Morris, V Phuntumart, NH Putnam, S Rash, JKC Rose, Y Sakihama, AA Salamov, A Savidor, CF Scheuring, BM Smith, BWS Sobral, A Terry, TA Torto-Alalibo, J Win, ZY Xu, HB Zhang, IV Grigoriev, DS Rokhsar & JL Boore. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313(5791): 1261-1266.
- Usov AI & ND Zelinsky. 2013. Chemical structures of algal polysaccharides. In: Dominguez H (ed). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*, pp. 23-86. Woodhead Publishing Limited, Sawston.
- Valenzuela A, R Valenzuela, J Sanhueza & G Morales. 2014. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición* 41(2): 198-204.
- Van den Hoek C, DC Mann & HM Jahns. 1995. *Algae: An introduction to phycology*, 627 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Wageningen J, TW Miller, S Hobbs, P Hook, B Crowe & M Huesemann. 2012. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies* 5(3): 731-740.
- Varum KM & S Myklestad. 1984. Effects of light, salinity and nutrient limitation on the production of β-1,3-D-glucan and exo-D-glucanase activity in *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 83: 13-25.
- Vetvicka V & J Vetvickova. 2010. Beta 1,3-glucan: silver bullet or hot air? *Open Glycoscience* 3: 1-6.
- Vetvicka V & J Vetvickova. 2011. β(1→3)-D-glucan affects adipogenesis, wound healing and inflammation. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 11: 169-175.
- Vieler A, G Wu, C-H Tsai, B Bullard, AJ Cornish, C Harvey, I-B Reza, C Thornburg, R Achawanantakun, CJ Buehl, MS Campbell, D Cavalier, KL Childs, TJ Clark, R Deshpande, E Erickson, AA Ferguson, W Handee, Q Kong, X Li, B Liu, S Lundback, C Peng, RL Roston, Sanjaya, JP Simpson, A TerBush, J Warakanont, S Zäuner, EM Farre, EL Hegg, N Jiang, MH Kuo, Y Lu, KK Niyogi, J Ohlrogge, KW Osteryoung, Y Shachar-Hill, BB Sears, Y Sun, H Takahashi, M Yandell, SH Shiu & C Benning. 2012. Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS GeneT* 8(11): e1003064.
- Wan M, P Liu, J Xia, JN Rosenberg, GA Oyler, MJ Betenbaugh, Z Nie & G Qiu. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 835-844.

- Wang D, K Ning, J Li, J Hu, D Han, H Wang, X Zeng, X Jing, Q Zhou, X Su, X Chang, A Wang, W Wang, J Jia, L Wei, Y Xin, Y Qiao, R Huang, J Chen, B Han, K Yoon, RT Hill, Y Zohar, F Chen, Q Hu & J Xu. 2014.** *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits. PLoS GeneT 10(1): e1004094. <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004094>>
- Waterkeyn L & A Bienfait. 1987.** Localisation et role des β -1,3-glucanes (callose et chrysolaminarine) dans le genre *Pinnularia* (Diatomées). La Cellule 74: 198-226.
- Werner GH. 1987.** Prospective views on unexplored pathways of immunostimulation. In: Azuma I & G Jolles (eds). Immunostimulants: Now and tomorrow, pp. 207-215. Japan Scientific Societies Press, Tokyo / Springer Verlag, Berlin.
- Xia S, B Gao, A Li, J Xiong, Z Ao & C Zhang. 2014.** Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. Marine Drugs 12(9): 4883-4897.
- Xia Y, V Vetvicka, J Yan, M Hanikyrova, T Mayadas & GD Ross. 1999.** The β -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. Journal of Immunology 162: 2281-2290.
- Xu C, J Lv, YM Lo, SW Cui, X Hu & M Fan. 2013.** Effects of oat β -glucan on endurance exercise and its anti-fatigue properties in trained rats. Carbohydrate Polymers 92(2): 1159-1165.
- Xu F, Z Cai, W Cong & F Ouyang. 2004a.** Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. Biotechnology Letters 26: 1319-1322.
- Xu F, HH Hu, W Cong, ZL Cai & F Ouyang. 2004b.** Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. Biotechnology Letters 26: 51-53.
- Yangüez K, C Lovazzano, L Contreras-Porcía & N Ehrenfeld. 2015.** Response to oxidative stress induced by high light and carbon dioxide (CO₂) in the biodiesel producer model *Nannochloropsis salina* (Ochrophyta, Eustigmatales). Revista de Biología Marina y Oceanografía 50 S1: 163-175.
- Yen HW, IC Hu, CY Chen & JS Chang. 2014.** Design of photobioreactors for algal cultivation. In: Pandey A, L Duu-Jong, Y Chisti & CR Soccol (eds). Biofuels from algae, pp. 23-45. Elsevier, Burlington.
- Zekovic DB, S Kwiatkowski, MM Vrvic, D Jakovljevic & CA Moran. 2005.** Natural and modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in health promotion and disease alleviation. Critical Reviews in Biotechnology 25: 205-230.
- Zhang Y, S Li, X Wang, L Zhang & PC Cheung. 2011.** Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. Food Hydrocolloids 25: 196-206.

Recibido el 14 de junio de 2016 y aceptado el 18 de noviembre de 2016

Editor Asociado: Pilar Muñoz M.