



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos, proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-01”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTA:**

**I.B.P. JUAN MARCOS CASTRO TAPIA**

**DIRECTORA:**

**DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA**

**COMITÉ TUTORIAL:**

**DR. RAMÓN FERNANDO GARCÍA DE LA CRUZ**

**COMITÉ TUTORIAL EXTENDIDO:**

**DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ**



**SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., FEBRERO DE 2021**

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, Registro 000519, en el Nivel CONSOLIDADO.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 712702



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



“Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos,  
proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de *Scenedesmus  
acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-01”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

I.B.P. JUAN MARCOS CASTRO TAPIA

SINODALES:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

\_\_\_\_\_

DR. RAMÓN FERNANDO GARCÍA DE LA CRUZ

\_\_\_\_\_

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

\_\_\_\_\_

## Integrantes del Subcomité de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Directora de Tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Químicas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Ramón Fernando García De La Cruz: Comité Tutorial. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. José Francisco Morales Domínguez: Comité Tutorial Extendido. Adscrito al Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags.



Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos, proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-01 por Juan Marcos Castro Tapia se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## Dedicatoria y Agradecimientos

En memoria de mis abuelitos; Sra. María Josefina Ruiz Méndez y Sr. Marcos Tapia Arredondo, que ahora desde el cielo guían a toda la familia Tapia Ruiz.

Ahora brillan las estrellas más hermosas en el cielo.

Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes

Isaac Newton

## Resumen

La biomasa de microalgas puede ser aprovechable en el sector energético, nutricional, farmacéutico y cosmético. Dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, se obtienen diferentes productos de valor agregado como lípidos, proteínas, carbohidratos, ficobiliproteínas, ácidos grasos, vitaminas, antioxidantes, biopolímeros y pigmentos que pueden tener una aplicación potencial en diversas industrias, incluyendo su uso como suplementos nutricionales para la alimentación humana, fuente de  $\beta$ -caroteno, ácidos grasos  $\omega$ -3, biopolímeros de astaxantina, bioplásticos, nutraceuticos, clorofila y carotenoides (luteína, zeaxantina). Los compuestos bioactivos de las microalgas actúan como componentes antivirales, antibacterianos, antipalúdicos, antioxidantes, antimicóticos, antitumorales y antiinflamatorios. Los pigmentos orgánicos naturales como la clorofila, los carotenoides y las ficobiliproteínas están ganando importancia en varias industrias cosméticas, alimentarias y textiles.

En este trabajo se evaluó la producción de lípidos totales, triacilglicéridos, proteína total soluble, clorofila total (clorofila a y b) y carotenoides totales generados por las microalgas *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*, con la adición de ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y ácido acetilsalicílico (AAS) como reguladores de crecimiento exógenos. Los resultados mostraron que las microalgas responden a la aplicación exógena de reguladores de crecimiento de forma dependiente a la concentración. En *S. acutus*, BAP incrementa la proliferación (número de células) y KIN aumenta el contenido de proteína total soluble. Para *C. vulgaris*, AIA aumenta el contenido de clorofila total y ANA incrementa el contenido de clorofila y carotenoides.

Palabras Claves: Auxinas, Citocininas, Clorofila, Carotenoides, Lípidos Totales, Lípidos Neutros, Proteínas.

## Abstract

Microalgae biomass can be used in different sectors such as energy, nutritional, pharmaceutical, and cosmetic. Depending on the species and culture conditions, different value-added products are obtained such as lipids, proteins, carbohydrates, fatty acids, vitamins, antioxidants, biopolymers, and pigments, which can have a potential application in many industries, including their use as nutritional supplements for human nutrition, source of  $\beta$ -carotene, 3-fatty acids, astaxanthin biopolymers, bioplastics, nutraceuticals, chlorophyll, and carotenoids (lutein, zeaxanthin). The bioactive compounds of the microalgae act as antiviral, antibacterial, anti-malarial, antioxidant, anti-fungal, anti-tumor and anti-inflammatory components. Natural organic pigments such as chlorophyll, carotenoids and phycobiliproteins are gaining importance in several cosmetic, food and textile industries.

In this work, we evaluated the production of total lipids, triacylglycerides, total soluble protein, total chlorophyll (chlorophyll a and b) and total carotenoids generated by the microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella vulgaris*, with the addition of indoleacetic acid (AIA), naphthaleneacetic acid (ANA), benzyl aminopurine (BAP), kinetin (KIN) and acetylsalicylic acid (AAS), as exogenous growth regulators. The results showed that microalgae respond to the exogenous application of growth regulators in a concentration-dependent manner. In *S. acutus*, BAP increases proliferation (cell number), and KIN increases the content of total soluble protein. For *C. vulgaris*, AIA increases the content of total chlorophyll and ANA increases the content of chlorophyll and carotenoids.

Keywords: Auxins, Cytokinins, Chlorophyll, Carotenoids, Total Lipids, Neutral Lipids, Proteins

## Índice General

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	ANTECEDENTES .....	4
2.1.	Microalgas .....	4
2.2.	Clasificación .....	5
2.3.	Compuestos bioactivos en microalgas.....	5
2.3.1.	Lípidos .....	6
2.3.1.1.	Biosíntesis de lípidos.....	8
2.3.2.	Proteínas .....	13
2.3.3.	Pigmentos.....	15
2.3.3.1.	Clorofila .....	16
2.3.3.1.1.	Biosíntesis .....	18
2.3.3.2.	Carotenoides .....	19
2.3.3.2.1.	Biosíntesis .....	22
2.4.	Reguladores de Crecimiento.....	24
2.4.1.	Fitohormonas en las microalgas.....	24
2.4.2.	Auxinas .....	25
2.4.3.	Citocininas .....	27
2.4.4.	Ácido acetilsalicílico.....	31
2.4.5.	Efecto endógeno en microalgas .....	31
2.4.5.1.	Respuesta del crecimiento regulada por fitohormonas .....	32
2.4.6.	Efecto de la adición de las fitohormonas en microalgas.....	34
2.4.6.1.	Respuestas fisiológicas de las microalgas a la aplicación de fitohormonas exógenas .....	34
2.5.	Biorrefinería microalgal .....	39
3.	JUSTIFICACIÓN .....	40
4.	HIPÓTESIS .....	40
5.	OBJETIVO GENERAL .....	41
5.1.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
6.1.	Microorganismos, medio de cultivo y sistema de aireación .....	42
6.1.1.	Propagación de <i>S. acutus</i> y <i>C. vulgaris</i> .....	42
6.1.2.	Conteo celular en cámara de Neubauer.....	44
6.2.	Identificación cuantitativa de lípidos totales y triacilglicéridos .....	44
6.2.1.	Cuantificación de Lípidos Totales.....	44
6.2.2.	Cuantificación de Triacilglicéridos .....	45
6.3.	Cuantificación de proteínas.....	47
6.4.	Cuantificación de clorofila a, b y carotenoides .....	48
6.5.	Análisis estadístico.....	49
8.	DISCUSIÓN .....	50
8.1.	Crecimiento Celular.....	50
8.2.	pH.....	54
8.3.	Lípidos.....	57
8.3.1.	Lípidos Totales .....	57
8.3.2.	Lípidos Neutros.....	58
8.4.	Proteína Total Soluble.....	59
8.5.	Pigmentos .....	61



9.	CONCLUSIONES.....	63
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	65

### Índice de Tablas

Tabla 1.	Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia.....	5
Tabla 2.	Composición de los ácidos grasos en microalgas.....	7
Tabla 3	Concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados en los cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus acutus</i> .....	43
Tabla 4	Curva patrón de trioleína .....	47
Tabla 5	Curva patrón de albúmina de suero bovino.....	48

### Índice de Figuras

Fig. 1	Biosíntesis de FA y TAG en las microalgas.....	12
Fig. 2	Representación esquemática de la clorofila a y la clorofila b. ....	17
Fig. 3	Esquema de la biosíntesis de la clorofila a.....	19
Fig. 4	Estructuras de algunos carotenoides .....	21
Fig. 5	Vías de carotenogénesis y enzimas, cuyas funciones están confirmadas, en fotótrofos oxigenados. ....	23
Fig. 6	Estructura del ácido indol-3-acético (AIA) .....	25
Fig. 7	Estructuras de cis-zeatina y trans-zeatina.....	28
Fig. 8	Biorrefinería a base de microalgas .....	39

## 1. INTRODUCCIÓN

La utilización de los recursos biológicos renovables de los organismos vivos para generar alimentos, energía y materiales es una importante estrategia de las bioeconomías. Existe un creciente interés de los consumidores en la utilización de productos naturales obtenidos a partir de microorganismos y organismos vegetales, esto llevara al establecimiento de tecnologías novedosas en la obtención de productos que puedan contribuir a la bioeconomía industrial. Los microorganismos fotosintéticos, especialmente las microalgas, son beneficiosos para producir metabolitos de alta calidad, incluyendo lípidos, proteínas, pigmentos y carbohidratos. Entre estos compuestos bioactivos, los pigmentos orgánicos naturales como la clorofila, los carotenoides y las ficobiliproteínas están ganando importancia en varias industrias cosméticas, alimentarias y textiles (Jacob-Lopes et al., 2020).

El crecimiento de las microalgas depende de diversos factores abióticos y bióticos, entre los que se encuentra la temperatura, pH, fuente de luz, fuente de carbono, composición del medio y el suministro de los nutrientes. Las condiciones del crecimiento de las microalgas afectan la composición de la biomasa, influyendo en la cantidad y calidad de macromoléculas, incluyendo carbohidratos, proteínas y lípidos. Debido a esto, el uso final de la biomasa depende en gran medida de su composición. Para la producción de bioaceites o biocombustibles se buscan microalgas en las que su contenido lipídico sea alto, mientras que para suplementos alimenticios se buscan aquellas en las que la biomasa sea rica en proteínas (Aslam et al., 2020).

Desde una perspectiva histórica, las clorófitas (Chlorophyta) han sido uno de los grupos de microalgas más estudiados en cuanto a la biomitigación del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y la producción de biocombustibles. Entre las especies más prometedoras, *Chlorella* y *Scenedesmus* han sido las más estudiadas; la especie *Chlorella* comprende a microorganismos unicelulares de 2~12 µm que presentan una morfología esférica o elipsoidal, estos microorganismos prosperan en aguas y suelos frescos y marinos. Los análisis filogenéticos moleculares indican que

*Chlorella* es polifilética y desciende de múltiples ancestros. Por otro lado, *Scenedesmus* aparece típicamente como una colonia plana de 4, 8 o 16 células dispuestas linealmente que crecen en aguas dulces y ocasionalmente salobres (Crofcheck et al., 2013).

Se ha incrementado el número de publicaciones que demuestran que las fitohormonas exógenas que son añadidas a los cultivos de microalgas provocan respuestas similares que en las plantas vasculares. Las fitohormonas son una herramienta valiosa en los sistemas agrícolas terrestres para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas, además de mitigar el estrés ambiental. Es necesario estudiar una aplicación similar de las fitohormonas en cultivos de microalgas para aumentar la acumulación de biomasa, el contenido de metabolitos primarios y secundarios y mejorar la tolerancia al estrés que se produce durante el cultivo a escala comercial para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones de la biotecnología (Wendy A Stirk & van Staden, 2020). Las fitohormonas son mensajeros químicos involucrados en un amplio espectro bioquímico de las células vegetales a concentraciones muy bajas. Las fitohormonas son clasificadas en cinco clases: auxinas, ácido abscísico, citocininas, giberelinas y etileno, así como sus precursores y análogos sintetizados (Han et al., 2018).

Una tasa de crecimiento rápido es un criterio importante en el cultivo comercial, ya que genera un alto rendimiento de biomasa en el menor tiempo posible y reduce los costos de cosecha por volumen (Barsanti & Gualtieri, 2018). *Chlorella vulgaris* ha sido empleada como el sistema experimental ideal para dilucidar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de las respuestas de las fitohormonas a nivel celular, ya que tiene un ciclo de crecimiento corto con altas tasas metabólicas y, por lo tanto, responde rápidamente a los tratamientos (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). La hipótesis planteada en este trabajo fue que los reguladores de crecimiento (RC) inducen en las microalgas diversos efectos que repercuten en la biosíntesis y cantidad de metabolitos (bioproductos) que pueden ser de interés comercial en diversas industrias. Para responder a esto, se estableció el objetivo de evaluar la generación de bioproductos en las microalgas *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y

*Chlorella vulgaris* OW-O1 por efecto de diversos reguladores de crecimiento: 2 auxinas (Ácido Indolacético (AIA) y Ácido Naftalenacético (ANA)), 2 citoquininas (Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN)) y el Ácido Acetilsalicílico (AAS). Lo anterior se efectuó obteniendo las cinéticas de crecimiento de los cultivos de *S. acutus* y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de reguladores de crecimiento, en donde se realizó la cuantificación de la acumulación de lípidos totales y triacilglicéridos (lípidos neutros), contenido de proteína total soluble y clorofila y carotenoides totales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares y multicelulares, las cuales pueden ser eucariotas y procariotas, comprenden más de 50,000 especies en la Tierra y pueden prosperar en diversos entornos, según su hábitat se clasifican como algas marinas y de agua dulce (Aslam et al., 2020). Poseen la capacidad de fijar 183,333 kilogramos de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) anualmente, produciendo 100,000 kilogramos de biomasa en el mismo tiempo (Chisti, 2007).

Las microalgas forman parte indispensable en la cadena alimentaria y los ecosistemas acuáticos, son microorganismos fotosintéticos extraordinarios, con numerosas ventajas en comparación con las plantas terrestres, y un gran potencial, en términos de productos de base biológica y aplicaciones derivadas, tales como: la facilidad de cultivo, elevada eficiencia fotosintética, capacidad para crecer en aguas marinas, dulces y residuales, alta velocidad de crecimiento; aunado a esto, pueden proporcionar beneficios ambientales a través de la captura de CO<sub>2</sub> atmosférico y con esto se puede contribuir a mitigar el cambio climático, entre otras aplicaciones (Demirbas & Demirbas, 2011; Sharma et al., 2012; Tejeda-Benítez et al., 2015). Dependiendo de la especie de la microalga, las condiciones de cultivo y por lo tanto las características de la biomasa producida, se obtienen distintos productos de valor agregado. Tanto la producción de biocombustibles como la extracción/formación de productos de valor agregado a partir de microalgas pueden enfrentar varios desafíos en países desarrollados y en desarrollo, incluido el agotamiento de combustibles fósiles, emisiones de CO<sub>2</sub>, cambio climático, escasez de agua, alimentos y demanda de energía renovable. Sin embargo, el uso energético a gran escala a partir de microalgas no es aún factible, y los productos que se pueden obtener a partir de las microalgas representan solo una pequeña parte en los mercados, lo que resulta en productos de alto valor. Además, la producción industrial actual se ha centrado en el uso de productos alimenticios y nutracéuticos, dejando hasta el 70% de la biomasa producida totalmente sin explotar. Para este fin, la viabilidad y sostenibilidad de la tecnología de microalgas

requiere el uso completo y óptimo de todos los compuestos de biomasa disponibles, en términos de un enfoque integrado de biorrefinería (Koutra et al., 2020).

## 2.2. Clasificación

Según Khan et al. (2009), la clasificación de microalgas se realiza en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas doradas (Tabla 1). Esta diversidad muestra un gran potencial de explotación de estos microorganismos para la generación de productos de alto valor agregado y biocombustibles (Chisti, 2008).

Tabla 1. Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia.

Microalga	Especies conocidas (aprox.)	Material almacenado	Hábitat
Diatomeas ( <i>Bacillariophyceae</i> )	100000	Quirsolaminarin (polímero de carbohidratos)	Océanos agua dulce y salobre
Algas verdes ( <i>Chlorophyceae</i> )	8000	Almidón TAGs	Diferentes hábitats
Algas verde-azules ( <i>Cyanophyceae</i> )	200	Almidón TAGs	Diferentes hábitats
Algas doradas ( <i>Chrisophyceae</i> )	1000	TAGs Carbohidratos	Agua dulce

TAGs = Triacilglicéridos. Fuente: (Khan et al., 2009)

## 2.3. Compuestos bioactivos en microalgas

Las microalgas están enriquecidas con diferentes tipos de compuestos activos como las ficobiliproteínas, ácidos grasos, vitaminas, antioxidantes y pigmentos, que

pueden tener una aplicación potencial en muchas industrias, pueden usarse como suplementos nutricionales para la alimentación humana, fuente de  $\beta$ -caroteno, ácidos grasos  $\omega$ -3, biopolímeros de astaxantina, bioplásticos, nutraceuticos, clorofila y carotenoides (luteína, zeaxantina). Los compuestos bioactivos de las microalgas actúan como componentes antivirales, antibacterianos, antipalúdicos, antioxidantes, antimicóticos, antitumorales y antiinflamatorios. Las microalgas también se usan como fuente de pigmentos, tales como la clorofila que también se encuentra presente en las cianobacterias y plantas. *Chlorella sp.* (microalga verde) es una fuente principal para la producción de clorofila, ya que tiene un alto contenido de esta, y al igual que *Chlamydomonas* ha sido ampliamente estudiada para producir pigmentos naturales (Aslam et al., 2020; Ummalyima et al., 2020).

### 2.3.1. Lípidos

Las microalgas contienen una amplia gama de clases de lípidos, como ácidos grasos libres (FFA), glucolípidos, fosfolípidos, acilglicéridos, lipoproteínas y esteroides. Las diferentes clases de lípidos tienen propiedades físicas y químicas diversas, como solubilidad, polaridad y viscosidad. Los lípidos polares de las microalgas se utilizan para formar las membranas celulares e incluyen glucolípidos y fosfolípidos. Por otro lado, los lípidos no polares (lípidos neutros) se usan generalmente como fuente de energía y comprenden FFA y mono, di y triacilglicéridos. Los principales componentes de las moléculas de lípidos polares y no polares son los ácidos grasos de cadena larga, que pueden ser insaturados o saturados (Tabla 2). En general, los lípidos se almacenan en diferentes lugares de la célula y juegan un papel importante ya que tienen funciones celulares específicas. Los cuerpos lipídicos (que contienen principalmente ésteres de esteroides y triacilglicéridos) están rodeados por una monocapa de fosfolípidos y existen en el citoplasma como una forma de almacenamiento de energía (Karim et al., 2020).

Tabla 2. Composición de los ácidos grasos en microalgas.

<i>Símbolo</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Nombre sistemático</i>	<i>Estructura</i>
<b>Ácidos grasos saturados</b>			
12:0	Ácido láurico	Ácido dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20:0	Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22:0	Ácido behénico	Ácido docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24:0	Ácido lignocérico	Ácido tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
<b>Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)</b>			
16:1	Ácido palmitoleico	Ácido 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Ácido oleico	Ácido 9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2	Ácido linoleico	Ácido 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido $\gamma$ -linolénico	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:4	Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-eicosapentanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
20:5	EPA	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH} = \text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24:1	Ácido nervónico	Ácido 15-tetracosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

Modificado de Mir et al., 2020 .



#### 2.3.1.1. Biosíntesis de lípidos

Los ácidos grasos (FA por sus siglas en inglés) son moléculas anfipáticas que consisten en un grupo de ácido carboxílico en un extremo y una cadena hidrocarbonada en el otro, con una longitud y un grado de saturación de la cadena variable entre las diferentes especies de FA. Los glicerofosfolípidos corresponden a los componentes estructurales básicos de las membranas celulares (Li-Beisson et al., 2013). El lípido de almacenamiento fisiológicamente inerte son los triacilglicéridos (TAG), los cuales están formados por tres ácidos grasos unidos mediante enlace éster al glicerol. Las rutas metabólicas de la biosíntesis de FA en macro y microalgas se dedujeron a partir del metabolismo lipídico de *Arabidopsis*. Sin embargo, el metabolismo lipídico de las microalgas difiere del de las plantas al menos en dos aspectos importantes (B. Liu & Benning, 2013). En primer lugar, en las microalgas la vía procariótica plastídica de la síntesis y el almacenamiento de los TAG desempeña un papel más directo, y en segundo lugar, las algas sintetizan glicerofosfolípido con grupos distintivos que no están presentes en las plantas (Lenka et al., 2016).

El acetil-CoA es el precursor de la síntesis de *novo* lípidos en el cloroplasto. Bajo condiciones fotoautotróficas, la eficiencia fotosintética (PE) es crítica para controlar el flujo de esta reacción, ya que el precursor de carbono (acetil-CoA), la energía (ATP) y la potencia reductora (NADH y NADPH) son proporcionados por la fotosíntesis (Fig. 1). La biosíntesis de *novo* de ácidos grasos comienza con la carboxilación del acetil-CoA para formar malonil-CoA catalizada por la acetil-CoA carboxilasa multifuncional (ACCase). En el cloroplasto de las algas, el malonil-CoA se transfiere a la proteína portadora del acilo (ACP) y posteriormente se somete a una serie de reacciones de elongación de la cadena de acilo para formar productos C16 o C18, catalizados por la enzima de ácido graso sintasa (FAS). La elongación de la cadena de FA termina debido a la acción de dos enzimas. En los organismos fotosintéticos, una de ellas es la aciltransferasa de cloroplasto que elimina el grupo acilo del ACP, con lo que el FA reciente se transfiere directamente del ACP al glicerol-3-fosfato (G-3-P). La otra enzima, la acil-ACP-tioesterasa, hidroliza el acil-ACP y libera los FA libres. Los FAs libres se transfieren entonces a la capa externa

del cloroplasto y se reactivan a acil-CoA para formar glicerolípidos (Li-Beisson et al., 2013; Ohlrogge & Browse, 1995).

La vía de Kennedy es la vía principal para la síntesis de TAG en las microalgas y plantas, donde el TAG se produce mediante la transferencia secuencial de grupos acilos desde el acil-CoA a las diferentes posiciones del glicerol-3-fosfato por medio de las aciltransferasas (Li-Beisson et al., 2013).

Aparte de la vía de Kennedy dependiente de acil-CoA, se ha caracterizado en las microalgas una vía de síntesis de TAG independiente de acil-CoA catalizada por fosfolípido:DAG aciltransferasas (PDAT), que produce TAG mediante la transferencia de una fracción de acilo graso de un fosfolípido (PL) a DAG. PDAT es una enzima multifuncional que media la rotación de lípidos de la membrana y la síntesis de TAG en *C. reinhardtii* (Yoon et al., 2012). Se especula que la especificidad del sustrato de la PDAT coevolucionó con la composición de los fosfolípidos de la membrana en varios eucariotas para mantener la función adecuada de la membrana (Li-Beisson et al., 2013). A diferencia de las plantas que tienen múltiples PDAT, *C. reinhardtii* contiene una sola PDAT con actividad lipasa con amplia especificidad de sustrato hacia los lípidos de la membrana y los lípidos neutros *in vitro* (Yoon et al., 2012).

En las microalgas, existe interrelación entre la fotosíntesis y la biosíntesis de TAG y a la biogénesis de gránulos de lípidos (LD por sus siglas en inglés Lipid Droplets). En condiciones de alta luminosidad o de agotamiento de N, el exceso de electrones generados por la fotosíntesis da lugar a una sobre reducción de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos y a la producción de especies reactivas de oxígeno citotóxicas (Hu et al., 2008). La acumulación de TAG desarrollada por el estrés puede actuar como un mecanismo de secuestro de electrones al eliminar los electrones excesivos presentes en el sistema. La comprensión mecánica de este fenómeno se obtuvo mediante la caracterización de un gen que codifica la lipasa de galacto-glicerolípidos, *PGD1* en *Chlamydomonas*. El mutante *pgd1* no era viable cuando estaba sometido a privación de nitrógeno (N) y puede ser rescatado bloqueando el transporte de electrones fotosintéticos (X. Li et al., 2012), lo que

sugiere que la acumulación de TAG protege a las células de las algas del estrés oxidativo. En respuesta a la privación de N, las células de las algas entran en una inactividad celular que se caracteriza por la cesación del crecimiento para conservar la energía y los nutrientes. Estos autores identificaron un gen, *cht7* y su correspondiente proteína (CHT7), que actúa como represor de la inactividad en *C. reinhardtii* (Tsai et al., 2014). El mutante de CHT7 fue incapaz de degradar rápidamente el TAG tras el reabastecimiento de N y se vio afectado por la reversión de la inactividad inducida por la privación de N. Tsai et al. (2014), concluyeron que CHT7 podría ser un objetivo potencial para la ingeniería de microalgas para favorecer una alta acumulación de TAGs sin que se vea comprometida la tasa de crecimiento.

Bajo déficit de N, el principal constituyente de las reservas elevadas de TAG en algunas microalgas (incluyendo *Nannochloropsis gaditana*) consiste en ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Simionato et al., 2013; Tonon et al., 2002). En *N. gaditana*, el aumento de TAG es proporcional a la disminución del contenido en lípidos de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) (Simionato et al., 2013). La distribución del flujo de carbono y la regulación de la vía del TAG bajo estrés no ha sido comprendida del todo en las microalgas. Se ha observado que el déficit de N regula a la baja la expresión de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de LC-PUFA en *Nannochloropsis oceanica* IMET1 (J. Li et al., 2014). Se ha propuesto que durante el déficit de N en etapa temprana de crecimiento, los lípidos de la membrana se convierten posiblemente en TAG (Jia et al., 2015). Además del déficit de N, varios otros factores de estrés, como el pH, la temperatura, la salinidad y limitación de fósforo y carbono, inducen también la acumulación de TAG en las microalgas (Wase et al., 2015). Los experimentos de etiquetado en microalgas demostraron que el TAG actúa como reservorio de PUFAs y puede utilizarse para la formación rápida de lípidos en el cloroplasto (Cohen et al., 2000). Se formula la hipótesis de que al comienzo de las condiciones de estrés los FAs se almacenan transitoriamente como TAG y posteriormente se reciclan para formar lípidos si el estrés es leve. En el caso de

condiciones de estrés graves, el TAG se metabolizaría en sacarosa como parte del mecanismo de adaptación (Cohen et al., 2000).

La biosíntesis de carotenoides puede acoplarse con la síntesis de TAG para eliminar los electrones excesivos o las especies reactivas de oxígeno (Y. Li et al., 2008). En el alga verde *Haematococcus pluvialis*, la mayoría de las moléculas de astaxantina esterificada por ácidos grasos se almacenan en LD ricas en TAG y la síntesis de astaxantina consume alrededor del 10% del oxígeno molecular desarrollado a partir de la fotosíntesis, reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Y. Li et al., 2008). Es probable que la formación de ésteres de astaxantina sea catalizada por los DGAT, que han demostrado desempeñar un papel importante en la carotenogénesis y en la biosíntesis de los ácidos grasos en *H. pluvialis* (Chen et al., 2015). Las LD ricas en carotenoides se distribuyen generalmente hacia el exterior de la célula y son fotoprotectoras de la célula (Hagen et al., 1993). Es evidente que se ha aprendido mucho de los análisis bioquímicos y de genética molecular descritos anteriormente, pero el progreso hacia la comprensión del metabolismo de la FA y de los TAG microalgales podría acelerarse ampliando los enfoques computacionales que ayudan a dar sentido a la gran cantidad de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos de los que se dispone actualmente (Lenka et al., 2016).

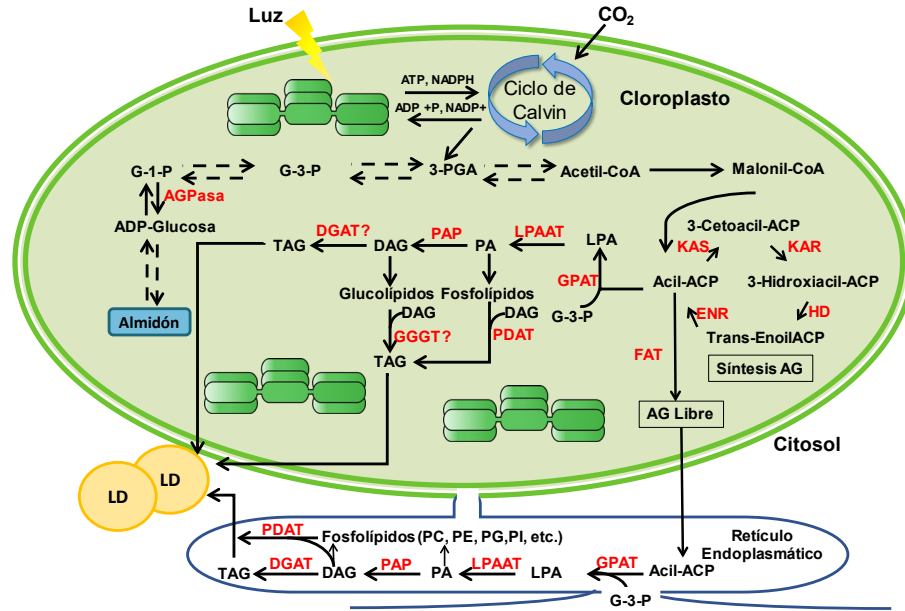


Fig. 1 Biosíntesis de FA y TAG en las microalgas.

La biosíntesis de FA/TAG en microalgas implica una interacción coordinada entre múltiples vías en múltiples compartimentos subcelulares, incluidos el retículo endoplásmico y el cloroplasto. Para la biosíntesis de FA y TAG, la energía (ATP) y el poder reductor (NADH y NADPH) proporcionados por la fotosíntesis impulsan la síntesis de 3-fosfoglicerato (3-PGA) en el ciclo de Calvin. En algunas microalgas, el 3-PGA también puede derivarse del almidón de la molécula de almacenamiento a través de varias reacciones, incluyendo la catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). El 3-PGA se convierte en acetil-CoA (a través de los intermediarios fosfoenolpiruvato y piruvato, no se muestra), que es el precursor de la síntesis de lípidos de *novo* en el cloroplasto. La biosíntesis de FA/TAG comienza con la carboxilación del acetil-CoA para formar malonil-CoA, catalizada por el complejo enzimático acetil-CoA carboxilasa (ACCasa). Las cadenas FA se alargan por la acción de la ACP 3-cetoacilo (proteína portadora de acil), o enzimas KAS. Las cadenas ACP-acetil resultantes pueden entrar en la vía Kennedy de la biosíntesis de los TAG en el cloroplasto. Alternativamente, cuando las reacciones de elongación de los acilos terminan, los ácidos grasos libres son transportados a la membrana exterior del cloroplasto, donde pueden ser reactivados y exportados como acil-CoA, sirviendo como sustrato en la vía de Kennedy localizada en el ER. Los intermediarios y enzimas de la vía Kennedy incluyen el ácido lisofosfatídico (LPA), el ácido fosfatídico (PA), el diacilglicerol (DAG), la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), el ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), la fosfatasa ácida fosfatídica (PAP) y el diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Aparte de la vía Kennedy, una vía independiente de acil-CoA de biosíntesis de TAG catalizada por PDAT (fosfolípido: aciltransferasas de diacilglicerol) produce TAG transfiriendo una fracción de acilo graso de un fosfolípido a DAG. Las flechas rayadas indican reacciones de varios pasos. Los signos de interrogación indican enzimas o reacciones que no se ha establecido que existan en el cloroplasto de las microalgas. Abreviaturas de lípidos de membrana: PC, fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; LD: gránulos de lípidos; ENR, enoil-ACP reductasa; FAT, acetilACP tioesterasa grasa; HD, 3-hidroxiacilACP deshidratasa; KAR, 3-cetoacil-ACP reductasa.

Adaptado de (Lenka et al., 2016)

### 2.3.2. Proteínas

Las microalgas se han identificado como una fuente de proteína alternativa en respuesta al suministro insuficiente de este tipo de macromolécula de fuentes convencionales, como resultado del aumento de la población mundial (Chiong et al., 2016). En microalgas, las proteínas representan entre el 60% - 70% de la biomasa, aunque la composición química de las microalgas varía sustancialmente con las especies, una gran parte de estas tienen un alto contenido proteico y de aminoácidos en comparación con otras fuentes de alimentos, esto proporciona respaldo para las microalgas como una fuente alternativa de proteína de alta calidad (Stack et al., 2020).

Estas moléculas proteicas están presentes en diversos lugares y formas, tales como componentes de la pared celular, enzimas y pigmentos, lípidos o carbohidratos conjugados. Estos incluyen proteínas nativas (particularmente lectinas y ficobiliproteínas), péptidos endógenos (lineales, cíclicos, depsipéptidos o péptidos con uno o más enlaces de amida reemplazados por un enlace éster), aminoácidos libres (taurina, laminina) y aminoácidos similares a la micosporina (Dominguez, 2013).

La microalga ideal debe ser capaz de crecer aun cuando la concentración de biomasa sea ya alta y en diferentes condiciones ambientales, además de producir altas concentraciones de productos de interés (es decir, lípidos, proteínas, entre otros). La composición química de las algas varía de una especie a otra, de una cepa a otra, y de un lote a otro. Para obtener biomasa con un patrón deseado de componentes, se pueden modificar hasta cierto punto las condiciones de cultivo. Aunque existen marcadas diferencias en las composiciones de las clases de microalgas, especies y cepas, la proteína es generalmente el principal componente orgánico, seguido de lípidos y luego por carbohidratos. Debido a las diferentes condiciones de cultivo, como se mencionó anteriormente, no es de extrañar que incluso para la misma cepa se han reportado diferentes composiciones (Matos, 2019).

Las proteínas a base de microalgas están ganando interés como una fuente de proteína alternativa debido a sus proporciones equilibradas de aminoácidos. La mayoría de las microalgas verdes se clasifican como generalmente reconocidas como seguras (GRAS). Esto significa que son seguras para el consumo, y por lo tanto potencialmente una fuente de proteínas terapéuticas para la administración oral con purificación mínima (Mayfield et al., 2007; Specht et al., 2010).

Las microalgas son de importancia comercial debido a su valor estructural, funcional y nutricional y a un mayor rendimiento proteico (4-15 toneladas métricas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) en comparación con las plantas terrestres (0.6-2 toneladas métricas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) (Bleakley & Hayes, 2017). Se utilizan principalmente como alimento para animales, y/o suplemento alimenticio para el consumo humano. Las proteínas de algas también tienen importancia farmacéutica, ya que se sabe que fortalecen el sistema inmunológico, la digestión y los niveles de energía, reducen la fatiga, mejoran las funciones renales, hepáticas y cardiovasculares, y desintoxican los antinutrientes en el cuerpo (Mehta et al., 2018). El alto contenido proteico en varias especies de microalgas (por ejemplo, 55%-70% para *S. platensis* y 42%-55% para *C. vulgaris* en biomasa seca) ha sido una de las principales razones para considerar estos organismos como una fuente de alimento (Matos, 2019).

Los aminoácidos son subunidades que conforman a las proteínas y por lo tanto la calidad nutricional de una proteína está determinada por el contenido, proporción y disponibilidad de estos compuestos orgánicos. Nueve aminoácidos se consideran "esenciales" para los seres humanos y deben adquirirse a través de los alimentos. Debido a su importancia biológica, los aminoácidos son importantes en la nutrición y se utilizan comúnmente en suplementos nutricionales, fertilizantes, y tecnología alimentaria (Becker, 2013; Tibbetts et al., 2016). Según Becker (2013) la composición de aminoácidos de casi todas las algas es comparable con el requisito de la FAO (Organización de la Alimentación y la Agricultura), con deficiencias menores entre los aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína), un hecho que es característico de muchas proteínas vegetales (Matos, 2019). Dependiendo de las especies de hábitat, estación de año y algas, la composición

de las proteínas también puede variar. Normalmente contienen altas cantidades de aminoácidos no esenciales como ácido glutámico y ácido aspártico. En comparación con las plantas terrestres, se han reportado cantidades más altas de metionina, lisina, histidina, triptófano, treonina y cisteína en proteínas de algas (Guedes et al., 2019).

Los péptidos bioactivos generalmente se componen de 2 a 20 residuos de aminoácidos y han recibido mucha atención debido a sus actividades biológicas y beneficios para la salud. Las algas producen una variedad de moléculas bioactivas, que pueden desarrollarse como nutracéuticos y farmacéuticos para la suplementación de nutrición humana y la terapia de enfermedades (Korhonen & Pihlanto, 2006). Como muchas microalgas tienen un alto contenido de proteínas, existe un enorme interés en el uso de estas como fuente de péptidos bioactivos (Samarakoon & Jeon, 2012). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los biopéptidos derivados de microalgas pueden estar involucrados en diversas funciones biológicas, incluyendo antioxidantes, anticancerígeno, antihipertensivo y efectos inmunomoduladores (Fan et al., 2014; Kim et al., 2013; Sheih et al., 2010).

### 2.3.3. Pigmentos

Entre los componentes de la biomasa, los pigmentos han recibido un gran interés biotecnológico e industrial debido a su valor nutricional y farmacéutico. Los pigmentos de microalgas, incluidas las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas, son de vital importancia para la fotosíntesis, el aprovechamiento de la luz y la disipación del exceso de energía, manteniendo la función y la integridad adecuadas de las células de algas. Los pigmentos más conocidos incluyen clorofilas,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, violaxantina, luteína y fucoxantina, los cuales han sido utilizados como colorantes naturales, suplementos nutricionales e ingredientes cosméticos debido a su alta actividad antioxidante (Begum et al., 2016). La acumulación de los pigmentos fotosintéticos depende de varios factores, incluidas las especies de algas utilizadas y varias condiciones ambientales. Por lo general, se observa un aumento en la concentración de clorofila a baja intensidad de luz, como resultado de la adaptación a la limitación de luz. Por el contrario, la reducción



de clorofila se puede observar bajo el agotamiento de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, una tendencia también es observada durante la deficiencia de micronutrientes. La acumulación de pigmentos fotosintéticos accesorios y carotenoides se desencadena por condiciones ambientales desfavorables que incluyen alta intensidad de luz y aumento de temperaturas, así como el estrés osmótico (da Silva Ferreira & Sant'Anna, 2017; Koutra et al., 2020).

#### 2.3.3.1. Clorofila

Los organismos fotosintéticos que evolucionan con el oxígeno contienen clorofila a (Chl a) que participan en las reacciones fotoquímicas del fotosistema I (PSI), y del fotosistema II (PSII). La clorofila a es el principal pigmento fotosintético de estos organismos y su concentración en microalgas está relacionada con la nutrición mineral en los medios de cultivo y la exposición a la luz. En las células sanas, se ha informado que su contenido constituye alrededor del 5% del peso de la biomasa seca en las células de *Chlorella sp.* (Marks, 1966). Las clorofilas se encuentran en orgánulos intracelulares llamados cloroplastos, donde se unen a las proteínas que forman las lamelas del cloroplasto. Son membranas que encierran "sacos" aplanados llamados tilacoides, donde se absorbe la luz durante el proceso de fotosíntesis (Dujardin et al., 1975). El proceso de evolución distribuyó las Chl a, b, c, d y f entre los diversos grupos de microalgas, y su presencia o ausencia es de importancia taxonómica (Ritchie, 2006). La clorofila b está presente en Chlorophyta (algas verdes) y Euglenophyta; la clorofila c está presente en Bacillariophyta, Phaeophyta, Pyrrophyta y Cryptophyta; la clorofila d está presente sólo en Rhodophyta (van den Hoek et al., 1995).

En las algas verdes, tanto Chl a como Chl b tienen funciones en el proceso de fotosíntesis, en las reacciones dependientes de la luz. Mientras que Chl a está presente en el núcleo del complejo antena y en los centros de reacción, y es importante para la recolección de luz y la transferencia de electrones (Larkum, 2016), Chl b se asocia con la antena del PSII (Pocock et al., 2007; Szyszka et al., 2007), principalmente presente en los complejos de antenas periféricas (Green &

Durnford, 1996; La Roche et al., 1996) y además de la recolección de luz actúa en la estabilización de los complejos de antenas periféricas. La proporción Chl a:Chl b suele ser de 3:1 en las algas verdes, pero el contenido de Chl b puede aumentar en las algas verdes adaptadas a la sombra, disminuyendo la proporción a 1.8 - 2.2 (Falkowski & Owens, 1980). La clorofila b es la segunda más abundante entre los pigmentos de clorofila en la naturaleza y se encuentra en el aparato de recolección de luz, con una importante función como pigmento accesorio (Cahoon & Timko, 2003).

En la Fig. 2 se muestra la estructura de la clorofila a (Chl a) y de la clorofila b (Chl b). La clorofila b, que tiene un peso molecular (M.W) de 907 g/mol, difiere de la Chl a (M.W. 839 g/mol). La diferencia entre ambas clorofilas es que Chl a presenta un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en el perímetro del anillo tetrapirrólico, mientras que en Chl b este grupo ha sido oxidado para formar un grupo formol (-CH=O), también conocido como grupo formilo (da Silva & Lombardi, 2020).

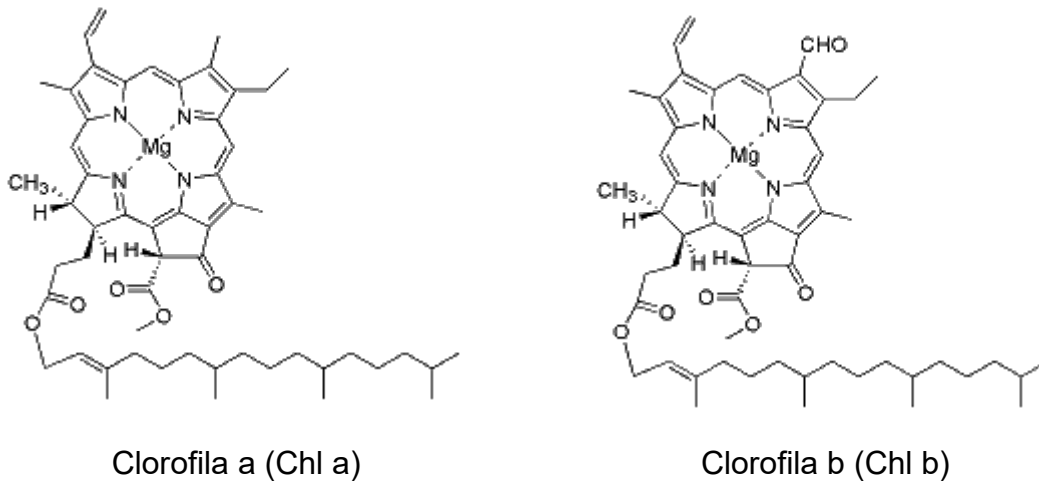


Fig. 2 Representación esquemática de la clorofila a y la clorofila b. En Chl a el grupo lateral en el tercer carbono es un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) mientras que en el Chl b es un grupo aldehído (-CHO).

Adaptado de (da Silva & Lombardi, 2020)

#### 2.3.3.1.1. Biosíntesis

La biosíntesis de la clorofila a en las algas es un proceso complejo que comprende varias reacciones enzimáticas y reducciones estereoespecíficas que producen la clorofila a a partir de la protoclorofila a. La protoclorofila a, se convierte en clorofila a, siendo la reducción enzimática de la protoclorofila a un paso regulador clave en este proceso. La vía de la protoporfirina IX a la clorofila a se presenta en Von Wettstein et al. (1995) y en Cahoon & Timko (2003). En la Fig. 3 se presenta una secuencia general y sintética de los pasos de la biosíntesis de la clorofila a, modificada a partir de Bogorad (1967) (da Silva & Lombardi, 2020).

Se ha documentado la existencia (y coexistencia) de dos estrategias genética y bioquímicamente diferentes para la biosíntesis de la clorofila a que depende de los requerimientos de luz (Gálová et al., 2008). Cuando la reducción enzimática de la protoclorofila a a la clorofila a tiene la luz como cofactor, se dice que la biosíntesis de la clorofila a depende de la luz (da Silva & Lombardi, 2020). Pero, si ocurre en ausencia de luz, se dice que es independiente de la luz. La mayoría de las microalgas y muchos otros organismos fotosintéticos pueden producir su clorofila por ambas vías, en condiciones de luz y de oscuridad (Bogorad & Goodwin, 1976; Porra, 1997; Von Wettstein et al., 1995). Como se presenta en Marks (1966), la protoclorofila a puede reducirse a clorofila a mediante una reacción enzimática (Smith, 1960), que se produce en la oscuridad (como en el caso de *Chlorella sp* (da Silva & Lombardi, 2020).

De acuerdo con Bogorad (1976) en las microalgas del género *Chlorella*, la clorofila a puede ser producida normalmente a través de la protoclorofila a. Según Kirk & Tilney-Bassett(1978) y Armstrong (1998) la reducción de la protoclorofila en ausencia de luz de *la mayoría de las algas se correlaciona con la presencia de los genes chlB, chlL y chlN* (Armstrong, 1998; Gálová et al., 2008; Kirk & Tilney-Bassett, 1978).

Según Rüdiger (2002) la Chl a y Chl b siguen la misma vía biosintética y la diferencia es sólo un paso, la transformación del grupo 7-metilo en el grupo 7-formilo. Los experimentos realizados con C<sup>14</sup> en Chl a y Chl b en *Chlorella pyrenoidosa* y

*Scenedesmus obliquus* por Blass et al. (1959) demostraron que el Chl a puede ser un precursor del Chl b (Blass et al., 1959; Bogorad & Goodwin, 1976; Rüdiger, 2002). En las algas verdes y en las plantas, el ensamblaje del complejo de captación de luz (LHC) requiere la presencia de Chl b. Eggink et al. (2004) demostraron que la transformación del grupo 7-metilo en Chl a al grupo 7-formilo en Chl b es una reacción que utiliza oxígeno molecular y es catalizada por la enzima clorofílica a oxigenasa (CAO). Basándose en la ubicación de la CAO, los autores sugieren que las membranas de la envoltura del cloroplasto son el sitio inicial de la síntesis del Chl b. Algunos años más tarde, Nakagawara et al. (2007) demostraron que una proteasa del cloroplasto (Clp) participa en la regulación de la biosíntesis de la clorofila mediante la desestabilización de la proteína CAO en respuesta a la acumulación de clorofila b (da Silva & Lombardi, 2020; Eggink et al., 2004; Nakagawara et al., 2007).

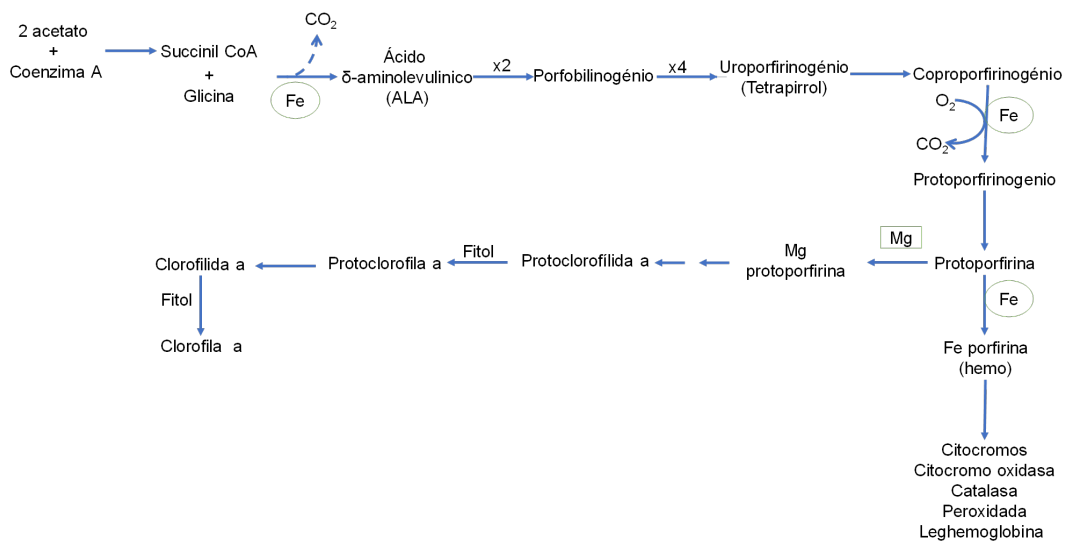


Fig. 3 Esquema de la biosíntesis de la clorofila a.

Modificado y Adaptado de (da Silva & Lombardi, 2020)

### 2.3.3.2. Carotenoides

Los carotenoides actúan durante la fase de luz de la fotosíntesis, son útiles para proteger el aparato fotosintético del exceso de luz, secuestrando las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y radicales libres

suplementarios. La mayor parte de los carotenoides están diseñados para mitigar el oxígeno singulete y atrapar los radicales peroxilo. Tienen acción antiinflamatoria y protección contra la luz ultravioleta debido a su mayor actividad antioxidante (Aslam et al., 2020)

En las algas se encuentran diversos carotenoides. En la Fig. 4 se ilustran las estructuras de algunos ejemplos de los carotenoides importantes de las microalgas fototróficas. Entre ellos, aproximadamente 30 tipos exhiben posibles funciones fotosintéticas, y otros pueden ser intermediarios de la carotenogénesis o carotenoides acumulados. Algunos carotenoides se encuentran sólo en ciertas divisiones o clases de algas; por lo tanto, estos carotenoides y también las clorofilas pueden utilizarse como marcadores quimiotaxonómicos (Shinichi Takaichi, 2020).

Los carotenoides contienen algunos grupos funcionales únicos. El grupo aleno ( $C=C=C$ ) es una estructura única en los compuestos naturales y se encuentra principalmente en los carotenoides (Dembitsky & Maoka, 2007), incluyendo la fucoxantina en las algas cafés y las diatomeas, la 19-aciloxifucoxantina en la haptofita y la dinofita, la peridinina en los dinoflagelados y la 9'-cis neoxantina en las algas verdes y las plantas terrestres. El grupo acetileno ( $C\equiv C$ ) es también una estructura única, y los carotenoides acetilénicos se encuentran sólo en las algas como parte de la composición de la aloxantina, la crocoxantina y la monadoxantina en Cryptophyta, diadinoxantina y la diatoxantina en Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta y Euglenophyta. Los carotenoides acetilados ( $C-O-CO-CH_3$ ) como la fucoxantina, la peridinina y la dinoxantina también se encuentran principalmente en algas como Heterokontophyta, Haptophyta y Dinophyta (Shinichi Takaichi, 2020).

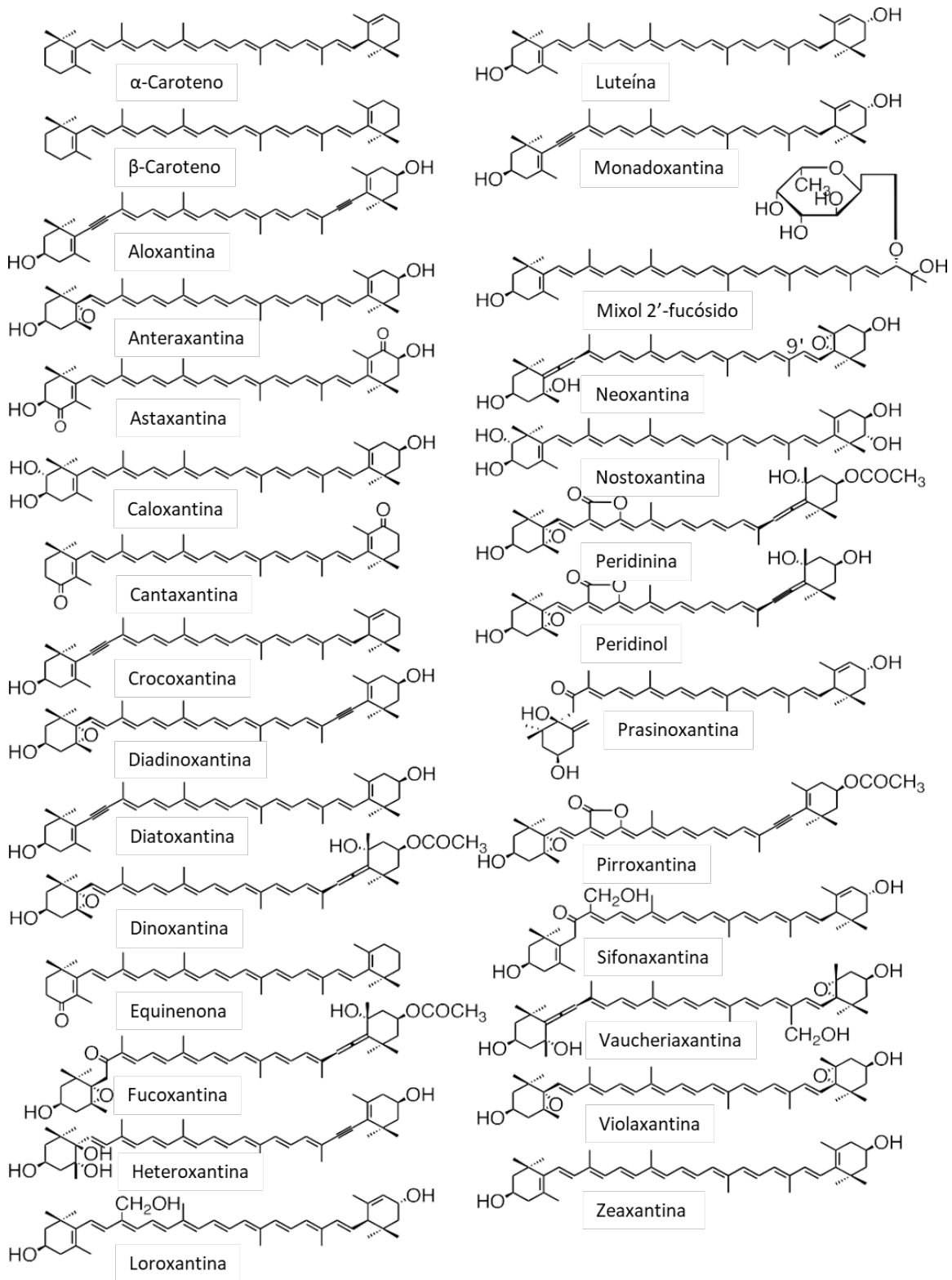


Fig. 4 Estructuras de algunos carotenoides

Adaptado de (Shinichi Takaichi, 2020)

Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta contienen los mismos carotenoides, entre ellos  $\beta$ -caroteno, violaxantina, 9'-cis neoxantina (Shinichi Takaichi & Mirauo, 1998) y luteína, así como clorofila a y b, que se encuentran en las plantas terrestres (Fig. 4). Algunas clases contienen carotenoides adicionales, como la loroxantina, la sifonaxantina y la prasinoxantina, que son derivados de la luteína y son específicos de cada clase (Shinichi Takaichi, 2011).

#### 2.3.3.2.1. Biosíntesis

Las vías de carotenogénesis y las enzimas entre los fotótrofos oxigenados se han investigado principalmente en las cianobacterias (S Takaichi & Mochimaru, 2007) y las plantas terrestres (Liaaen-Jensen, 1998). Especialmente en las plantas terrestres, se estudian detalladamente las vías de carotenogénesis y las características de las enzimas (Fig. 5). Sin embargo, las algas contienen vías comunes para las plantas terrestres y también vías adicionales específicas de las algas, que se han propuesto únicamente sobre la base de las estructuras químicas de los carotenoides (Fig. 5) (Shinichi Takaichi, 2011). Se sugieren algunos genes carotenogénicos comunes en las algas a partir de la homología con otros genes conocidos (Bertrand, 2010; Frommolt et al., 2008), pero la mayoría de los genes y enzimas que participan en las vías específicas de las algas siguen siendo desconocidos (Fig. 5) (Shinichi Takaichi, 2020).

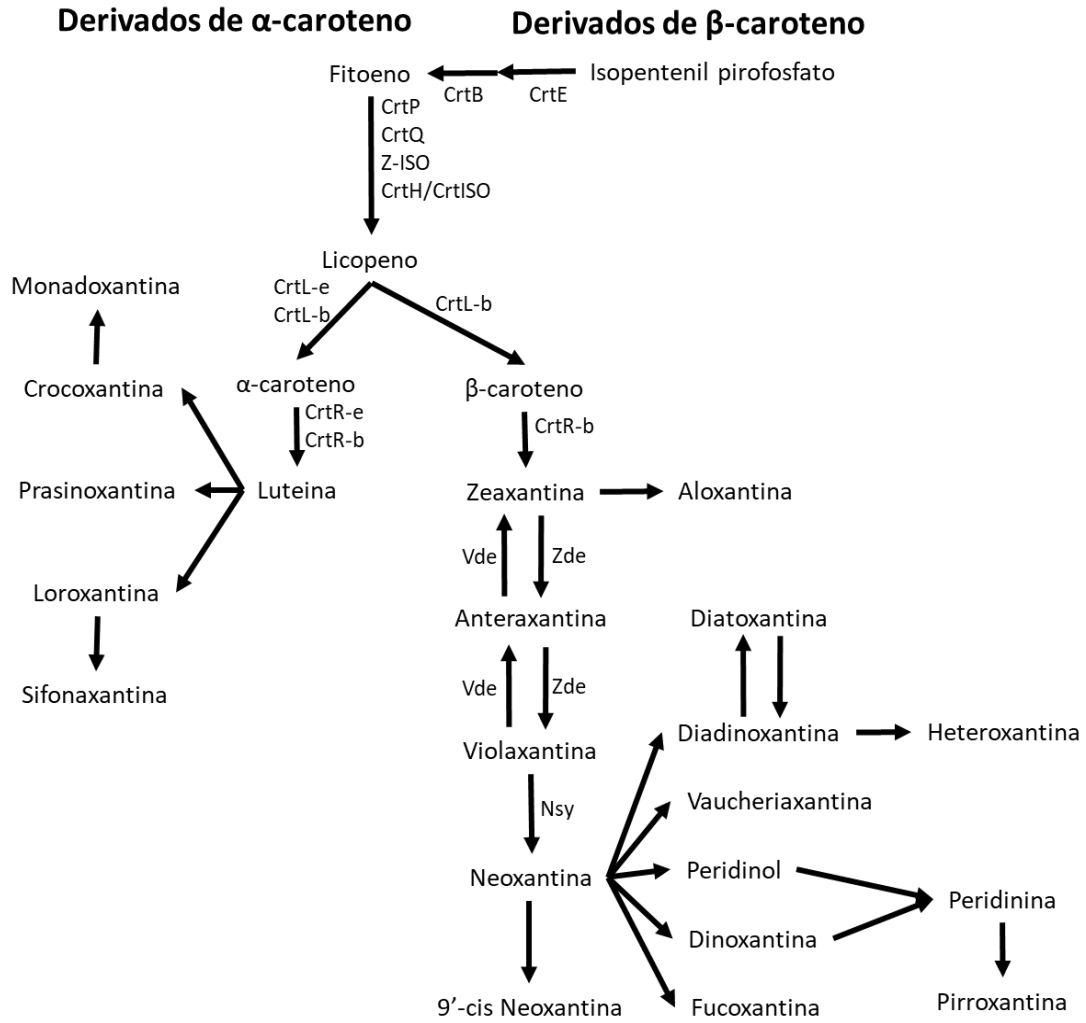


Fig. 5 Vías de carotenogénesis y enzimas, cuyas funciones están confirmadas, en fotótrofos oxigenados.

Adaptado de (Shinichi Takaichi, 2020)



## 2.4. Reguladores de Crecimiento

### 2.4.1. Fitohormonas en las microalgas

Las microalgas verdes se dividen en dos linajes: la clorófita (Chlorophyta), que comprenden la mayoría de las especies, y la estreptofita (Streptophyta), que comprende la carofitas (Charophyta), que dio origen a las plantas terrestres (Leliaert et al., 2012; Umen, 2014). Durante la colonización de las tierras secas, las plantas se encontraron con condiciones ambientales más diversas y extremas, como la desecación, fluctuaciones de temperatura, tensiones osmóticas y radiación ultravioleta (Depuydt & Hardtke, 2011; Leliaert et al., 2012). Se adaptaron con éxito a esas condiciones aumentando su complejidad morfológica y alterando sus ciclos de vida y procesos fisiológicos para mejorar sus mecanismos de tolerancia. Esas respuestas incluyeron innovaciones bioquímicas como la síntesis de diversos metabolitos secundarios como isoprenos y fenólicos, proteínas de choque térmico, mecanismos mejorados de reparación del ADN y el establecimiento de una red de comunicación intracelular en la que participan fitohormonas para percibir y responder a las señales ambientales (Leliaert et al., 2012). Estas adaptaciones a un hábitat terrestre se vincularon con una expansión del genoma y la expresión de los genes (Depuydt & Hardtke, 2011; Leliaert et al., 2012).

El desarrollo de las técnicas moleculares ha dado lugar a una vasta acumulación de datos genómicos con un número cada vez mayor de estudios que dilucidan el origen de los genes de las plantas terrestres. Esos estudios sugieren que muchos de los rasgos morfológicos, citológicos, bioquímicos y fisiológicos asociados a las plantas terrestres estaban presentes en las algas ancestrales, de modo que estaban preadaptadas a la colonización de la tierra (Leliaert et al., 2012; Umen, 2014). Con respecto a las fitohormonas, se han identificado en algunas Chlorophyta y Streptophyta algunos genes, receptores y enzimas que participan en la biosíntesis y las vías de señalización de diversas clases de fitohormonas, lo que sugiere que en las microalgas pueden darse vías metabólicas similares a las de las plantas vasculares (Alsenani et al., 2019; De Smet et al., 2011; Frébort et al., 2011; Hanada et al., 2011; Leliaert et al., 2012; Lu et al., 2014; Lu & Xu, 2015; Nambara & Marion-Poll, 2005; Umen, 2014)

#### 2.4.2. Auxinas

Las auxinas son fitohormonas que tienen funciones en la división y expansión celular para facilitar el crecimiento de las células vegetales, tienen efectos directos sobre la mitosis, la transición de las células de la latencia al estado activo, estimulan la respiración y la tolerancia a factores ambientales adversos e influye positivamente en los procesos biosintéticos. La composición y las concentraciones de auxinas varían fisiológicamente con las especies, las diferentes fases de crecimiento y las condiciones de cultivo. Las auxinas también funcionan como una molécula de señal que participa en la red de defensa de la planta contra los estrés biótico y abiótico (Čarná et al., 2014; Han et al., 2018). Las sustancias dominantes de las auxinas en las microalgas son el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido indol-3-butanoico (IBA). El AIA (Fig. 6) se sintetiza en cloroplastos, y además forma conjugados con glucosa, oligosacáridos, ácido aspártico, ácidos nucleicos y proteínas. Las auxinas desempeñan un papel versátil en el crecimiento y metabolismo de las microalgas, e incluso concentraciones muy pequeñas de auxinas pueden estimular el crecimiento, la producción de biomasa y la biosíntesis de biomoléculas valiosas (Han et al., 2018).

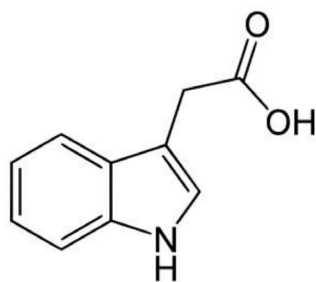


Fig. 6 Estructura del ácido indol-3-acético (AIA)

(Han et al., 2018)

Existen varias vías para la biosíntesis del ácido indol-3-acético (AIA) biológicamente activo en las plantas vasculares. Estos incluyen una vía independiente del triptófano y cuatro vías dependientes del triptófano (denominadas así por los metabolitos intermedios), las cuales son, vía de la indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPA), triptamina (TRA) e indol-3-acetaldoxima (IAOx). Otros metabolitos

intermedios son el indol-3-acetonitrilo (IAN) y el indol-3-acetaldehído, que forman parte de las vías de la IAOx y la IPA, respectivamente. Las vías IAM e IPA son las principales rutas de la biosíntesis de la AIA en las plantas vasculares (Mano & Nemoto, 2012). Las auxinas endógenas están presentes en las microalgas. Se identificaron los precursores triptófano (TRP) y antranilato en *Chlorella minutissima*, lo que indica que las vías dependientes del TRP son posibles en las microalgas (W A Stirk et al., 2014). En siete cepas de *Chlorella* y 24 diversas especies de microalgas aisladas, se detectó la presencia de AIA y IAM siendo AIA presente en concentraciones más elevadas en la mayoría de las cepas (Jirásková et al., 2009; Wendy A Stirk et al., 2013). El AIA y la IAM (en concentraciones más altas que la AIA) también se identificaron en *C. minutissima* junto con TRA (W A Stirk et al., 2014).

La secuenciación de ARN utilizada para caracterizar los cambios transcripcionales en respuesta al tratamiento con AIA en *Chlorella sp.* sugiere que las vías TRA, IAOx, IAM y IAN son posibles rutas biosintéticas en las microalgas (Alsenani et al., 2019). Se han identificado en las microalgas genes que codifican para las enzimas asociadas a las vías TRA e IAN (Kiseleva et al., 2012). Basados en los reportes de los perfiles de auxinas para las microalgas, se puede especular que el AIA se sintetiza por la vía de la IAM, así como posiblemente por la vía del TRA (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

El exceso de AIA libre puede ser inhibidor. En las plantas vasculares, el exceso de AIA se convierte en conjugados de almacenamiento al combinarse con azúcares para formar ésteres-AIA y con aminoácidos para formar amidas-AIA. La desactivación se realiza mediante la oxidación del anillo indólico para formar ácido oxindol-3-acético (oxAIA) o mediante la conjugación para formar indol-3-acetilaspártato (AIA-Asp) e indol-3-acetilglutamato (AIA-Glu) (Ludwig-Müller, 2011). Las plantas no vasculares tienen menos conjugados de AIA, formando predominantemente conjugados de amida en comparación con las plantas vasculares que sintetizan tanto conjugados de amida como de éster (Ester Szein et al., 1999; Szein et al., 1995). En el 2017 se reportó un artículo en donde se seleccionaron 20 especies de cianobacterias y microalgas en representación de los

principales linajes, en las cuales fueron detectados en grandes concentraciones el AIA junto con el catabolito primario oxAIA, por otro lado el conjugado AIA-Asp fue detectado en concentraciones muy bajas (Žižková et al., 2017). También se detectaron oxAIA y bajos niveles de AIA-Asp en *C. minutissima* (W A Stirk et al., 2014). La adición del radiomarcado [<sup>3</sup>H]AIA en *Stigeoclonium helveticum*, *Chlorella vulgaris*, *Microthamnion kuetzingianum* y *Scenedesmus obliquus*, se metabolizó gradualmente en las células y el medio, de modo que después de 6 horas se detectaron AIA-Asp, AIA-glucosyl ester (AIA-GE) y 8 metabolitos no identificados. En comparación, el ácido [<sup>3</sup>H]naftaleno acético (ANA) y el ácido [<sup>3</sup>H]2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) no se metabolizaron, lo que sugiere que las microalgas no pudieron sintetizar estos compuestos (Žižková et al., 2017). Así pues, la homeostasis de las auxinas en las microalgas parece menos compleja que en las plantas vasculares con niveles de AIA regulados por tasas de biosíntesis y oxidación de novo. También hay diferencias en comparación con las plantas vasculares con metabolitos no identificados asociados a la biosíntesis detectada en las microalgas (Wendy A Stirk & van Staden, 2020; Žižková et al., 2017).

#### 2.4.3. Citocininas

Las citocininas naturales son derivados nitrogenados de la base púrica adenina. Se clasifican por sus cadenas laterales como isoprenoides o aromáticas. Hay cuatro grupos de citocininas isoprenoides, las cuales son, trans-zeatina (tZ), cis-zeatina (cZ) (Fig.7), dihidrozeatina (DHZ) e isopenteniladenina (iP). Los dos grupos de citocininas aromáticas son la benciladenina (BA) y sus formas hidroxiladas, las topolinas. Las citocininas desempeñan un papel integral en la regulación del ciclo celular, promoviendo la división celular. También intervienen en muchos procesos fisiológicos de las plantas vasculares (Sakakibara, 2006).

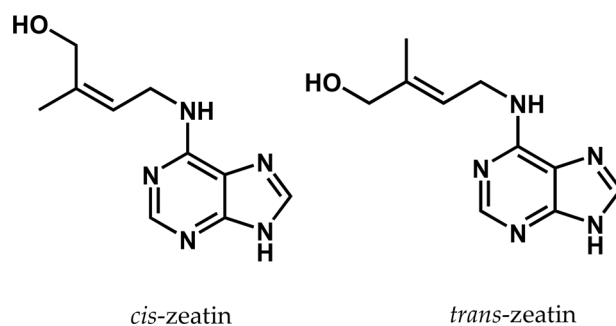


Fig. 7 Estructuras de *cis*-zeatina y *trans*-zeatina

(Han et al., 2018)

Las citocininas se sintetizan en las plantas vasculares desde el pirofosfato de dimetilalilo hasta los ribótidos (nucleótidos), los precursores inmediatos de la citocinina, por dos vías de activación, que son, la vía del mevalonato (MVA) y la vía del metil-eritritol-fosfato (MEP). Estas reacciones son catalizadas por las isopenteniltransferasas. Los ribótidos se convierten en sus correspondientes bases libres, que son las formas más activas biológicamente. Los ribótidos y las bases libres se someten a una inactivación transitoria por glicosilación para formar O-glucósidos que tienen una actividad biológica débil. La pérdida de actividad biológica se produce por medio de reacciones catabólicas a los N-glucósidos (N3-, N7- y N9-glucósidos). Esta pérdida de actividad es reversible o irreversible dependiendo de la especie vegetal y del tipo específico de citocinina (Hoyerová & Hošek, 2020). Las citocininas también son desactivadas irreversiblemente por la enzima citocinina oxidasa/deshidrogenasa (CKX) por la ruptura de la cadena lateral de N6 (Frébort et al., 2011; Sakakibara, 2006). Los niveles de citocininas activas están regulados por el equilibrio de estas reacciones. Además, la degradación del ARNt es una fuente de citocininas de tipo cZ (Frébort et al., 2011).

Auer (1997) pudo discernir patrones en la conjugación de las citocininas en algas, musgos y helechos, estos produjeron bases libres de iP y Z y sus conjugados de ribótidos mientras que las gimnospermas y angiospermas tenían un complemento de citocininas más complejo que incluía citocininas de tipo DHZ, O- y N-glucósidos y citocininas aromáticas (Wendy A Stirk & van Staden, 2020). En estudios recientes

con microalgas se identificaron 19 citocininas en 24 microalgas taxonómicamente diversas siendo los derivados de cZ las principales citocininas presentes, seguidos por los derivados de iP, concentraciones moderadas de derivados de tZ y bajas cantidades de derivados de DHZ. Los ribótidos eran la forma dominante de citocinina con cantidades moderadas de bases libres y conjugados de O-glucósido más bajos y sólo un N9-glucósido (trans-zeatin-9-glucósido; tZ9G) detectado en concentraciones muy bajas en nueve especies (Wendy A Stirk et al., 2013). En siete cepas de *Chlorella* en crecimiento estacionario, el total de derivados iP se produjo en concentraciones más altas que los derivados cZ y se detectaron cantidades muy bajas de tZ (Jirásková et al., 2009). En nueve cepas de microalgas en crecimiento estacionario, las citocininas de tipo iP y cZ predominaron con cantidades menores de citocininas de tipo tZ y cantidades muy bajas de citocininas de tipo DHZ. También estaban presentes citocininas aromáticas (BA y topolinas) (Ördög et al., 2004). En 20 cepas seleccionadas por su representación de los principales linajes taxonómicos en las cianobacterias y microalgas, estaban presentes los mismos perfiles, siendo ricos en bases libres y ribótidos, bajos en O-glucósidos y N-glucósidos. Los tipos cis-Z y los derivados 2-(metiltio)etilamina fueron los mayores contribuyentes al conjunto de citocininas, principalmente debido a las citocininas unidas al ARNt, lo que sugiere que la degradación del ARNt es una fuente esencial de citocininas en las microalgas. La DHZ estaba presente en las cantidades más bajas (Žižková et al., 2017).

La adición de radiomarcado [ $^3\text{H}$ ]tZ a *Chroococcus minutus* (Cianobacteria), *Chlorococcum elbense*, *Klebsormidium flaccidum* y *S. obliquus* se metabolizó rápidamente en 1 hora, después de 4 horas se detectaron productos de degradación (adenina y adenosina), así como nucleótidos (mono, di y trifosfato de adenosina), DHZ y ribósido de dihidrozeatina (DHZR) tanto en las células como en los medios. A las 24 horas, había una conversión casi completa de [ $^3\text{H}$ ]tZ en todas las especies excepto en el *K. flaccidum*, con una alta concentración de un metabolito desconocido (Žižková et al., 2017). La conversión a adenina y adenosina planteó la cuestión de la posible actividad de CKX. Sin embargo, no se detectó actividad de CKX en las 8 especies analizadas (Žižková et al., 2017). La CKX degrada

preferentemente las bases libres y los ribótidos, siendo los O-glucósidos menos susceptibles (Frébort et al., 2011). La detección de altas concentraciones de metabolitos desconocidos en estas microalgas indica la posibilidad de un proceso de degradación desconocido.

Trans-Z e iP se consideraban las formas de citocinina predominantes en las plantas vasculares, pero con técnicas analíticas mejoradas se encontró con frecuencia que la cZ es la forma dominante, y a menudo representa más del 50% del conjunto total de citocininas. Inicialmente se pensó que las formas cis-Z tenían poca actividad biológica, pero estudios recientes han demostrado que los derivados de la cZ tienen una actividad débil y es muy probable que funcionen para mantener niveles mínimos de citocininas en respuesta a las condiciones de limitación del crecimiento (Gajdošová et al., 2011). Las altas concentraciones de cZ se cuantifican rutinariamente en las microalgas. Se ha formulado la hipótesis de que su función es un medio de desactivación o reducción de la actividad biológica, cumpliendo parcialmente el papel de los N-glucósidos que no están presentes en las microalgas (Kiseleva et al., 2012; Žižková et al., 2017).

Sobre la base de los perfiles de citocininas, parece que existe una red simplificada de citocininas en las microalgas en comparación con las plantas vasculares, donde los niveles de citocininas activas están regulados principalmente por la biosíntesis de *novo*, con poca glucosilación a las formas de almacenamiento, mínima desactivación a los N-glucósidos y ninguna degradación por CKX. La degradación del ARNt es también una fuente probable de citocininas en las microalgas (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

El tipo cZ es la citocinina predominante en las microalgas, se han identificado concentraciones bajas de tZ y concentraciones más bajas de citocininas de tipo DHZ. Se ha encontrado que las citocininas juegan un papel clave en los procesos biológicos de las microalgas, incluida la inducción de la división celular, la estimulación de los procesos de crecimiento y el aumento de la actividad fotosintética. En condiciones adversas, las citocininas de microalgas tienen un efecto protector sobre las actividades fisiológicas, especialmente la fotosíntesis (Han et al., 2018).

#### 2.4.4. Ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico es sintetizado a partir del ácido salicílico; el ácido salicílico (SA) es un miembro de una clase de moléculas pequeñas llamadas fenólicas en plantas que se definieron como un anillo aromático sustituido por un grupo hidroxilo o su derivado (Czerpak et al., 2002). SA actúa como una molécula de señal para la inducción de mecanismos de defensa contra el estrés biótico y abiótico en las plantas vasculares. La acumulación de SA es inducida por estrés biótico y abiótico como la radiación UV, metales tóxicos, estrés por calor y frío, estrés osmótico y salino e infección de patógenos. El SA es crucial para la regulación de las respuestas al estrés, ya que mejora la capacidad antioxidante al activar las enzimas antioxidantes e inducir los genes responsables de los mecanismos de protección. El SA es un compuesto fenólico derivado de la vía shikimato-fenilpropanoide. La fenilalanina se convierte en ácido cinámico, éste se hidroxila para formar ácido o-cumárico con una mayor oxidación de la cadena lateral o bien se oxida para formar ácido benzoico que luego se hidroxila más. Una tercera ruta biosintética es a través del ácido clorhídrico y el ácido isocorísmico (Horváth et al., 2007). En las microalgas, la síntesis de ácido fenólico se limita a la vía del shikimato, que sólo produce fenilalanina y tirosina como precursores y, por lo tanto, es la vía probable para la síntesis de SA en las microalgas (Wendy A Stirk & van Staden, 2020). SA estimula el contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila a y b y carotenoides totales; además de inhibir la biosíntesis de etileno (Czerpak et al., 2002).

#### 2.4.5. Efecto endógeno en microalgas

Si bien las microalgas son unicelulares o tienen una morfología multicelular menos compleja, poseen diversos procesos fisiológicos similares a los de las plantas vasculares que necesitan ser coordinados a nivel celular y molecular. También responden a las fluctuaciones ambientales y han desarrollado mecanismos de defensa para sobrevivir a distintos tipos de estrés abiótico y biótico (Yoshida et al., 2003). La presencia de fitohormonas biológicamente activas, sus precursores e intermediarios biosintéticos y conjugados, sugiere que las fitohormonas tienen un papel activo en las microalgas en lugar de ser simplemente productos secundarios



de otros procesos metabólicos sin relevancia funcional (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

#### 2.4.5.1. Respuesta del crecimiento regulada por fitohormonas

Los niveles de fitohormonas endógenas fluctúan con las etapas de crecimiento y del ciclo de vida de las microalgas, lo que demuestra que determinadas fitohormonas regulan el ciclo celular y, por consiguiente, las tasas de crecimiento.

El contenido de fitohormonas endógenas se comparó con las tasas de crecimiento de 24 especies de microalgas de diversas familias de la Chlorophyta (17 Chlorophyceae, 5 Trebouxiophyceae y 1 Ulvophyceae) y una especie de la Charophyceae. Las tasas de crecimiento se basaron en la acumulación de biomasa en el día 4. Las especies que crecieron más rápido tenían generalmente un mayor contenido de auxina en comparación con las especies de crecimiento más lento. Las concentraciones de auxina eran de 2 a 4 veces más altas que las de citocinina. Si bien había poca correlación entre el contenido total de citocinina y la acumulación de biomasa, las especies con mayores proporciones de bases libres generalmente tenían una mayor acumulación de biomasa. Esto sugiere que las auxinas y las citocininas pueden desempeñar un papel en la división celular y el crecimiento de las microalgas (Wendy A Stirk et al., 2013).

Se monitorearon los cambios en los perfiles de la citocinina y la auxina en *S. obliquus* a lo largo de su ciclo de crecimiento. El total de citocininas libres fue más alto en los cultivos de crecimiento activo y disminuyó después, de manera que, en la fase estacionaria, hubo una disminución 9 veces mayor. En comparación, los niveles de auxina aumentaron con la edad del cultivo y el AIA alcanzó concentraciones máximas en el día 13, junto con el oxAIA. Los aminoácidos conjugados AIA-Asp y oxAIA-GE sólo se detectaron en las fases de crecimiento exponencial y lineal y el ácido fenilacético (PAA) fue alto durante todo el experimento. Estos resultados mostraron la clara implicación de las citocininas y las auxinas en el ciclo celular (Žižková et al., 2017).

La luz es una importante variable externa que interactúa con las fitohormonas para regular el ciclo celular. En los cultivos sincronizados de *C. minutissima*, las células

se dividieron durante el período de oscuridad y aumentaron de tamaño durante el período de luz en el período de seguimiento de 48 h. Los niveles de auxina, citocinina y ABA (aunque muy bajos) en estos cultivos aumentaron con el tiempo, en contraste con el contenido de giberelina y brasinoesteroides los cuales disminuyeron con el tiempo. Los cultivos mantenidos en oscuridad continua, con la adición de glucosa como fuente de carbono perdieron su sincronización, pero siguieron dividiéndose a lo largo de un periodo posterior de 48 h. La tendencia del contenido de fitohormonas fue similar a los cultivos sincronizados en crecimiento activo. En comparación, los cultivos que se mantuvieron en oscuridad continua durante 48 h no crecieron. El contenido de auxina y citocinina se mantuvo bajo durante todo el período experimental. El contenido de giberelina y de brasinoesteroides sólo disminuyó ligeramente con el tiempo, de modo que al final del período de 48 h, las concentraciones eran más altas que en los cultivos de crecimiento activo. El contenido de ABA aumentó bruscamente en estos cultivos. La comparación de los cambios en los niveles de fitohormonas en las células en crecimiento activo frente a las que no se dividen sugiere que las auxinas, las citocininas y las giberelinas están implicadas en el ciclo celular, ya que los niveles sólo cambiaron/fluctuaron más en los cultivos en crecimiento activo, mientras que las giberelinas están implicadas principalmente en la elongación celular. Los brasinoesteroides participan probablemente en otros procesos fisiológicos y el ABA funciona como hormona del estrés (W A Stirk et al., 2014).

En un cultivo sincronizado de *C. minutissima* y *Chlorella sp.*, las concentraciones de citocininas eran bajas durante el período oscuro y aumentaban durante el período de luz con los ribótidos, tales como, el ribósido de cis-zeatina-5- monofosfato (cZRMP) que sólo se detectaba durante el período de luz. Los cultivos mantenidos en la oscuridad continua no sufrieron división celular y los niveles de citocinina permanecieron bajos. Las mediciones de las tasas de biosíntesis de *novo* en *C. minutissima* utilizando deuterio mostraron que las tasas de biosíntesis más altas se producían durante el período de luz para la isopenteniladenosina (iPR)>iP>cZ, mientras que el ribósido de cis-zeatina (cZR) tenía la tasa de biosíntesis más baja y

la síntesis máxima se producía durante el período de oscuridad (Wendy A Stirk et al., 2011).

La biosíntesis de la citocinina se activó durante el período oscuro en la cianobacteria *Nostoc sp.*, lo que provocó un aumento de los niveles de citocinina durante el período de luz. La luz también influyó en la expresión de algunos genes asociados con la transducción de señales (Frébortová et al., 2017).

Esto demuestra que las fitohormonas están intrínsecamente implicadas en la regulación del ciclo celular de las microalgas y que sus tasas de biosíntesis están influenciadas por una clave ambiental, tal como, la luz. Estos conocimientos podrían aplicarse para estimular la división celular y mejorar la acumulación de biomasa en el cultivo de microalgas como forma de asegurar que el cultivo masivo de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones sea más sostenible desde el punto de vista económico (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

#### 2.4.6. Efecto de la adición de las fitohormonas en microalgas

##### 2.4.6.1. Respuestas fisiológicas de las microalgas a la aplicación de fitohormonas exógenas

Se ha incrementado el número de publicaciones que demuestran que las fitohormonas exógenas que son añadidas a los cultivos de microalgas provocan respuestas similares que en las plantas vasculares. Las fitohormonas son una herramienta valiosa en los sistemas agrícolas terrestres para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas y para mitigar el estrés ambiental. Es necesario estudiar una aplicación similar de las fitohormonas para aumentar la acumulación de biomasa, el contenido de metabolitos primarios y secundarios y mejorar la tolerancia al estrés que se produce durante el cultivo a escala comercial para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones de la biotecnología (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

Una tasa de crecimiento rápido es un criterio importante en el cultivo comercial, ya que genera un alto rendimiento de biomasa en el menor tiempo posible y reduce los costos de cosecha por volumen (Barsanti & Gualtieri, 2018). *C. vulgaris* ha sido

empleada como el sistema experimental ideal para dilucidar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de las respuestas de las fitohormonas a nivel celular, ya que tiene un ciclo de crecimiento corto con altas tasas metabólicas y, por lo tanto, responde rápidamente a los tratamientos. Los cultivos pueden sincronizarse y las condiciones de cultivo pueden manipularse fácilmente para estudiar respuestas ambientales específicas (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014).

Se han realizado diversos experimentos empleando *C. vulgaris*, con los cuales se ha observado que:

- La aplicación exógena de auxinas influyó en el crecimiento de manera dosis dependiente, siendo que las concentraciones más altas suprimen la división celular. Las auxinas naturales eran las más activas biológicamente (AIA>ácido indol-3-butírico (IBA)>PAA). ANA, una auxina sintética, tuvo la menor actividad. Las auxinas también aumentaron el contenido de metabolitos primarios (proteínas solubles, clorofila, carotenoides y monosacáridos) y de los metabolitos antioxidantes (ascorbato y glutatión), aumentaron la actividad de las enzimas antioxidantes como la superoxidasa dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el ascorbato dismutasa (APX). Esto se relacionó con una disminución de la peroxidación de los lípidos (concentración de malondialdehído (MDA)) y la peroxidación de hidrógeno (contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014).
- La adición de citocininas (difenilurea (DPU)>Z>kinetina>BA) estimuló el crecimiento (número de células) de manera dependiente de la dosis, siendo que la concentración de 10<sup>-3</sup> M inhibía el crecimiento y el óptimo entre 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-6</sup> M dependiendo de la citocinina. La aplicación de citocinina influyó tanto en el metabolismo del carbono como en el del nitrógeno. La estimulación de la actividad del hidroxipiruvato dependiente de la nicotinamida adenina dinucleorida (NADH) que participa en el metabolismo del carbono dio lugar a un aumento del contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoide), glicolato y monosacáridos. La estimulación de la actividad del glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH, que desempeña un papel fundamental en la asimilación del nitrógeno y la biosíntesis de los aminoácidos, indujo un

aumento del contenido de ARN, proteínas solubles y polipéptidos (Piotrowska & Czerpak, 2009).

- El ácido acetilsalicílico afecta los cultivos de manera dosis-dependiente, aumentando el número de células, el peso seco y el contenido de metabolitos primarios como la clorofila, los carotenoides, los monosacáridos, la proteína soluble, el ADN y el ARN (Czerpak et al., 2002).

Estos resultados muestran que las diversas fitohormonas desempeñan un papel integral en la regulación del crecimiento a corto plazo, así como en la influencia de diversos procesos metabólicos y en la mejora de los mecanismos asociados al estrés oxidativo en *C. vulgaris*, las fitohormonas también son eficaces reguladores del crecimiento de otras especies de microalgas (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

Al igual que en las plantas vasculares, los niveles de fitohormonas en las microalgas están regulados por una interacción hormonal con ejemplos de relaciones sinérgicas y antagónicas entre los tratamientos con fitohormonas. Los efectos de las fitohormonas exógenas pueden ser controlados por mecanismos de homeostasis que implican la biosíntesis, la conjugación y la degradación (Lu et al., 2014), así como mecanismos de retroalimentación positiva y negativa en los que los genes de biosíntesis y desactivación pueden ser regulados en respuesta a la fitohormona exógena (Yamaguchi, 2008).

Se han empleado combinaciones de fitohormonas para conocer su influencia en los cultivos de las microalgas, tal es el caso de las citocininas y los brasinoesteroides exógenos que estimularon el crecimiento y el contenido de metabolitos (proteínas solubles, clorofilas y monosacáridos) en *C. vulgaris* de forma dosis-dependiente, siendo tZ y BL las formas más activas (tZ>kinetina>DPU y BL>24-epiBL>homoBL>CS>24-epiCS>homoCS). La co-aplicación de citocininas y brasinoesteroides tuvo un efecto sinérgico, siendo la combinación más efectiva BL+tZ. Las citocininas exógenas también aumentaron la acumulación de brasinoesteroides endógenos, incluyendo BL y CS e intermedios tanto de las vías C6 tempranas (6-deoxoTE, 6-deoxo-3-dehydroTE, 6-deoxoCS) como de las vías C6 tardías (TE, TY) (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2014). La aplicación exógena de

AIA estimuló los niveles de brasinoesteroides endógenos en *C. vulgaris* (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013) y los brasinoesteroides exógenos mejoraron el contenido de AIA, ABA y las citocininas en *C. vulgaris* (Bajguz, 2009, 2011; Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2014). En *Acutodesmus obliquus*, las auxinas (AIA<IBA<PAA) y las citocininas (tZ>Kin>DPU) mejoraron la acumulación de biomasa. Las citocininas aumentaron el número de células y las auxinas el tamaño. Las proteínas y los ácidos grasos aumentaron con ambos tratamientos y el contenido de monosacáridos disminuyó. El contenido de clorofila, caroteno y xantofila aumentó con las citocininas siendo más eficaces que las auxinas (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2018).

Se observaron efectos sinérgicos en *C. sorokiniana*, en el cual todos los tratamientos con fitohormonas aumentaron la acumulación de biomasa y el contenido de clorofila, siendo las auxinas (ANA e IBA) las más eficaces, seguidas de las citocininas y el GA<sub>3</sub> el menos eficiente. La aplicación conjunta de diferentes auxinas no mostró diferencias en la respuesta en comparación con las aplicaciones individuales de auxinas. La aplicación conjunta de dos fitohormonas (ANA+GA<sub>3</sub>; ANA+tZ) aumentó el crecimiento y el contenido de clorofila, siendo el mayor efecto aditivo una combinación de auxina, citocinina y giberelina (ANA+GA<sub>3</sub>+tZ). El contenido de proteínas y lípidos no se vio afectado por ninguno de los tratamientos con fitohormonas (Hunt et al., 2010). Del mismo modo, la aplicación de diversas combinaciones de Z, GA<sub>3</sub> y AIA, generó estrés en *A. obliquus* lo que provocó un aumento en la acumulación de biomasa, el contenido en lípidos, proteínas y carbohidratos, mejorando la actividad fotosintética, siendo la zeatinina la más influyente y el AIA el menos influyente (Renuka et al., 2018).

Los efectos antagónicos de los tratamientos con fitohormonas combinadas también se producen en las microalgas. Las citocininas y el ABA tuvieron una respuesta antagónica en *N. oceanica* deficiente en nitrógeno (N). Las citocininas exógenas (BA) estimularon la progresión del ciclo celular mientras que el ABA exógeno reprimió el crecimiento y aumentó la regulación de las respuestas al estrés (mejora la eficiencia fotosintética) en condiciones de deficiencia de N y de manera similar cuando se expone a una alta intensidad de luz. El perfil temporal de la actividad

transcripcional y el contenido de metabolitos mostró que la biosíntesis de la citocinina se reprimía en condiciones de deficiencia de N y la biosíntesis de ABA se incrementaba. Siendo que las citocininas funcionan como antagonistas del ABA tanto a nivel transcripcional como metabólico, de manera similar a las plantas vasculares y desempeñan un papel clave en las respuestas al estrés (Lu et al., 2014).

Estos ejemplos muestran que las fitohormonas exógenas tienen el potencial de aumentar la productividad de las microalgas. Provocan múltiples respuestas fisiológicas, influyendo en el crecimiento y en el contenido de metabolitos primarios y alterando diversas vías metabólicas. Cada tipo de fitohormona induce una cascada de señalización que provoca una serie de respuestas específicas que dependerá de la especie de microalga, la concentración de la fitohormona utilizada y a las condiciones de cultivo. Además, el cruce hormonal (hormonal crosstalk) modifica aún más las respuestas al interactuar con las fitohormonas endógenas. Las condiciones de los cultivos se encuentran en un estado de cambio constante, por ejemplo, el agotamiento gradual de los nutrientes, los cambios en el pH y el aumento del agotamiento de la luz a medida que los cultivos aumentan en la densidad celular. La aplicación de fitohormonas relacionadas con el estrés puede permitir que las células de las microalgas se adapten a estas condiciones cambiantes de los cultivos y, por lo tanto, mantengan una mayor tasa de división y expansión celular en una gama más amplia de condiciones de cultivo no óptimas y durante períodos de tiempo más largos, lo que da lugar a una mayor acumulación de biomasa (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

Un componente integral del cultivo en gran escala es la producción de suficiente inóculo de microalgas para iniciar los cultivos en masa. Esta ampliación suele hacerse mediante cultivos semicontinuos o mediante incrementos graduales, por ejemplo, de 10 mL a 100 mL a 1 L, etc., hasta que se produzca suficiente inóculo. Esto lleva mucho tiempo y conlleva un mayor riesgo de contaminación (Borowitzka & Vonshak, 2017). El tratamiento con fitohormonas podría potencialmente aumentar las tasas de crecimiento en cada etapa, disminuyendo así el tiempo y los riesgos que se toman para producir el inóculo (Wendy A Stirk & van Staden, 2020).

## 2.5. Biorrefinería microalgal

El objetivo de una biorrefinería sostenible de microalgas se puede lograr mediante la extracción de bioproductos. Durante el crecimiento de las microalgas, junto con las macromoléculas, algunos otros metabolitos también se producen en cantidad traza, llamados bioproductos o co-productos. Entre los co-productos generados se pueden mencionar a los polisacáridos, quitina, fucoidan, agar, carragenano, alginato, terpenoides, tocoferoles, florotanino,  $\beta$ -carotenoides, ficobiliproteínas y ácidos grasos poliinsaturados. Estos co-productos se consideran materias primas valiosas para las industrias bioenergética, médica, farmacéutica, cosmética y bioquímica. Con lo anterior, la biorrefinería a base de algas (Fig. 8) es la integración de la producción de biomasa en conjunto con la producción de diferentes moléculas de importancia industrial para equilibrar la sostenibilidad de las industrias microalgales. El procesamiento de la biomasa depende en gran medida del uso final y la calidad del producto a obtener, puede incluir varias etapas de recolección, secado, disrupción celular, extracción, fraccionamiento y pasos de purificación (Aslam et al., 2020; Koutra et al., 2020; Ummalyma et al., 2020).

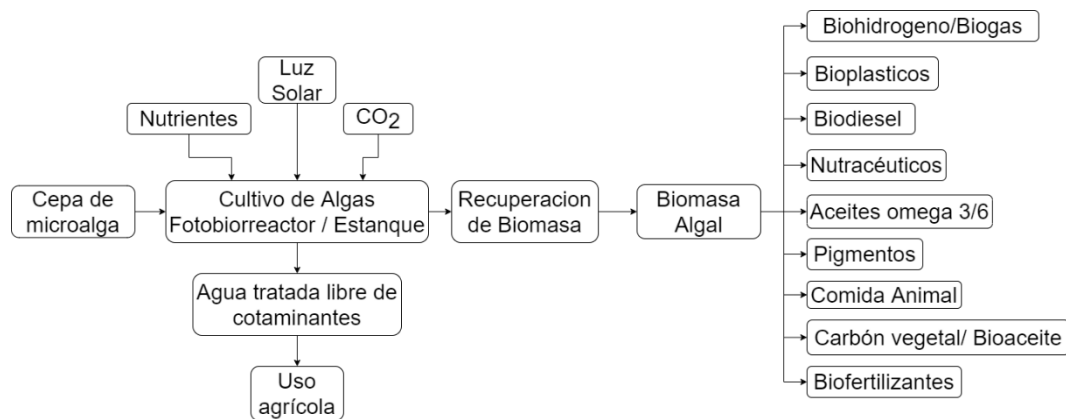


Fig. 8 Biorrefinería a base de microalgas

Adaptado de Ummalyma et al., 2020



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los bioproductos derivados de las microalgas *S. acutus* UTEX-72 y *C. vulgaris* OW-01 tales como lípidos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, azúcares, ácidos nucleicos, vitaminas, clorofilas y carotenoides pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, en la producción de biocombustibles, nutraceúticos, suplementos alimenticios, entre otros. A la fecha, existe escasa información sobre el uso de reguladores de crecimiento en los cultivos de microalgas y su atribución en la acumulación de bioproductos de alto valor agregado.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea inducir la mayor acumulación de lípidos totales y neutros (triacilglicéridos), proteína total soluble, clorofila y carotenoides en las microalgas *S. acutus* y *C. vulgaris* utilizando los reguladores de crecimiento: ácido indolacético, ácido naftalenacético, bencilaminopurina, kinetina y ácido acetilsalicílico.

Los resultados de esta investigación permitirán la obtención de bioproductos para establecer condiciones óptimas de crecimiento para las microalgas empleadas y obtener un proceso económicamente viable mediante el uso de reguladores de crecimiento.

### 4. HIPÓTESIS

Los reguladores de crecimiento inducen en las microalgas diversos efectos que repercuten en la biosíntesis y cantidad de metabolitos (bioproductos) que pueden ser de interés comercial en diversos tipos de industrias.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la obtención de bioproductos en las microalgas *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-O1 por efecto del uso de reguladores de crecimiento.

### 5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Mantenimiento y propagación de *S. acutus* y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de reguladores de crecimiento en medio basal Bold líquido.
- b) Obtener las cinéticas de crecimiento de los cultivos de *S. acutus* y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de reguladores de crecimiento.
- c) Cuantificar la acumulación de lípidos totales y triacilglicéridos.
- d) Determinar el contenido de proteínas totales.
- e) Evaluar el contenido de clorofila y carotenoides totales.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Microorganismos, medio de cultivo y sistema de aireación

Las microalgas *Scenedesmus acutus* UTEX 72 y *Chlorella vulgaris* OW-O1 fueron donadas por el Dr. Roberto Rico Martínez, profesor-investigador titular C en el Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El medio de cultivo empleado en las dos especies de microalgas fue el medio Basal Bold (NaNO<sub>3</sub> 2.94 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 mM, NaCl 0.43 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.43 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.29 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.17 mM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.307 μM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 7.28 μM, MoO<sub>3</sub> 4.93 μM, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6.29 μM, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.68 μM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 18.50 mM, EDTA 17.10 mM, KOH 55.30 mM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.179 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (conc.) 1 mL) (CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa)).

El suministro de carbono, en forma de CO<sub>2</sub>, se realizó mediante un sistema de aireación (difusión de aire) el cual fue diseñado a base de mangueras de PVC flexible transparente de 2 mm de radio conectadas a una bomba de aire de 2.2 L/min; el flujo de aire en los experimentos fue controlado mediante válvulas reguladoras de flujo de ¼ de pulgada.

#### 6.1.1. Propagación de *S. acutus* y *C. vulgaris*

Para la propagación de las cepas se prepararon pre-inóculos en 200 mL de medio basal bold de cada una de las microalgas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron inoculados a partir de una asada de biomasa proveniente de cultivo sólido. Los pre-inóculos se mantuvieron a una temperatura de 25 °C con agitación continua y fotoperiodos de 16 h luz/8 h de oscuridad hasta que se obtuvo una densidad óptica (DO) de 0.2, esta lectura se realizó mediante el espectrómetro GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA) a una longitud de onda de 750 nm. Una vez alcanzada la OD<sub>750nm</sub>=0.2, para la realización de los experimentos fueron necesarios 6.4 litros de cada microalga para los cuales fueron utilizados matraces Erlenmeyer de 1 Litro; 7 matraces para cada microalga fueron inoculados con la biomasa de los pre-inóculos y se mantuvieron a temperatura de 25°C con agitación continua y fotoperiodos de 16 h luz/8 h de oscuridad hasta que se obtuvo OD<sub>750nm</sub>=0.2.

Posteriormente, fueron colocados 200 mL del cultivo de cada microalga en matraces de 250 mL en ausencia y presencia de distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento de acuerdo con lo establecido en la Tabla 3, fueron utilizadas tres diferentes concentraciones de los siguientes reguladores de crecimiento:

2 auxinas: Ácido Indolacético (AIA), Ácido Naftalenacético (ANA), 2 citoquininas: Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN) y el Ácido Acetilsalicílico (AAS), los cuales fueron preparados a partir de soluciones patrón de 1 mg/mL.

Tabla 3 Concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados en los cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

Regulador de Crecimiento	Concentraciones [mg L <sup>-1</sup> ]			Concentraciones [μM]		
	1	5	10	5.71	28.54	57.08
AIA	1	5	10	5.71	28.54	57.08
ANA	1	5	10	5.37	26.85	53.70
BAP	0.01	0.5	1	0.04	2.22	4.44
KIN	0.1	0.5	1	0.46	2.32	4.65
AAS	0.1	0.5	1	0.56	2.78	5.55

Ácido Acetilsalicílico (AAS), Ácido Naftalenacético (ANA), Bencilaminopurina (BAP), Ácido Indolacético (AIA), Kinetina (KIN).

Las concentraciones que se utilizaron en el tratamiento de los cultivos se describen en la Tabla 3, estas concentraciones fueron seleccionadas en base a los resultados reportados por Lin et al. (2018). Los cultivos sin regulador de crecimiento fueron utilizados como controles.

Los tratamientos de los reguladores de crecimiento en las 2 microalgas se llevaron a cabo de acuerdo con un diseño completamente al azar para eliminar el efecto de las variaciones en la ejecución de los experimentos.

Los cultivos se mantuvieron a temperatura de 25°C con fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad y aireación constante para suministrar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y mantener homogéneo el sistema. Cada 24 horas se tomaron 3 muestras de 1 mL hasta que los cultivos llegaron a la fase estacionaria; las muestras obtenidas se utilizaron para el registro de la densidad óptica, conteo celular, análisis de lípidos neutros, cuantificación de proteínas, clorofila a y b y carotenoides, posteriormente la biomasa se recuperó mediante centrifugación a 4500 rpm por 20 min, los

sobrenadantes se descartaron y la biomasa se secó a 70 °C en una estufa de secado. Una vez registrado el peso seco, se almacenó para la cuantificación de lípidos totales.

#### 6.1.2. Conteo celular en cámara de Neubauer

Para el conteo celular se utilizó la cámara de Neubauer o hematocitómetro que posee una subdivisión de nueve cuadrantes para el conteo de células.

La concentración celular se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$C = \left[ \frac{N}{4 \times 10^{-6}} \right] \cdot \text{dil}$$

En donde:

**C** = células/mL, **N** = promedio de células presentes en los 5 cuadros, **4x10<sup>-6</sup>**= corresponde al volumen de la muestra expresado en cm<sup>3</sup> (mL) sobre el área de los cuadros pequeños la cual equivale a 0.004 mm<sup>3</sup> (0.004 μL) (0.2 x 0.2 x 0.1), **dil** = factor de dilución (Arredondo-Vega & Voltolina 2007).

### 6.2. Identificación cuantitativa de lípidos totales y triacilglicéridos

#### 6.2.1. Cuantificación de Lípidos Totales

Para la cuantificación total de lípidos se utilizaron las muestras de biomasa seca y se registró su peso, posterior a esto, se añadió 10 mL de metanol absoluto y se incubó por 1 hora a 70°C, después se centrifugaron a 4600 rpm durante 10 minutos para remover el sobrenadante que contiene la clorofila, este proceso se repitió hasta que la presencia de clorofila fue nula. Al residuo obtenido de biomasa libre de clorofila se añadieron 5 mL de agua destilada y se homogenizó por vortex, se llevó a cabo la sonicación de las muestras a una amplitud de 60% por 5 segundos y se dejó reposar 5 segundos en hielo, repitiendo esto 4 veces. Posteriormente se agregaron 10 mL de cloroformo-metanol (2:1; v:v) y se dejó reposar por 24 horas, posterior a esto, se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y fueron añadidos 5 mL de NaCl 0.9% (w/w) para crear un sistema bifásico, del cual se recuperó la fase inferior después de ser centrifugado a 4500 rpm durante 20 minutos ya que esta fase contenía los lípidos totales. Por último, se

dejó en incubación a 70°C hasta la evaporación de los restos de solventes para llevar a cabo el registro mediante gravimetría de los pesos obtenidos para cada experimento.

#### 6.2.2. Cuantificación de Triacilglicéridos

Para el análisis del contenido de triacilglicéridos (lípidos neutros), se emplearon las muestras obtenidas durante la cinética de crecimiento, siguiendo el procedimiento descrito por Bertozzini et al. (2011), el cual consistió en centrifugar las muestras durante 20 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente, el residuo de la biomasa se resuspendió en 1 mL de medio Bold para eliminar contaminación que pudiera estar presente durante el crecimiento celular. De cada una de las muestras se tomaron 200  $\mu$ L, los cuales se depositaron en los pozos de una placa de fondo oscuro y se realizó una primera lectura de fluorescencia utilizando el filtro óptico Verde (525nm de Excitación y 580–640nm de Emisión) del módulo de fluorescencia del equipo GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Después de registrar la lectura, se añadieron 5  $\mu$ L de rojo Nilo (2.5  $\mu$ g/mL en isopropanol) y se dejó reposar por 5 minutos antes de realizar una nueva lectura. Posteriormente se restó el valor de fluorescencia obtenida después de añadir la solución de rojo Nilo al valor obtenido de fluorescencia que emitían las muestras de cultivo por sí mismas, de esta manera se obtuvo la fluorescencia de los lípidos neutros presentes en las muestras. El rojo Nilo es un colorante fluorescente ampliamente utilizado para la cuantificación de lípidos neutros en microalgas, en este trabajo se utilizó el colorante rojo Nilo de la marca Sigma-Aldrich con número de catálogo 72485, el cual fue disuelto en isopropanol y preparado a una concentración de 0.5 mg/mL, del cual posteriormente se realizó una dilución de 2.5  $\mu$ g/mL que fue utilizada para la determinación de los lípidos neutros en las muestras.

Halim & Webley (2015)., han propuesto que el mecanismo de acción del rojo Nilo se realiza en 5 etapas: Etapa 1 (disolución del colorante rojo del Nilo en el disolvente portador). Debido a que el colorante rojo del Nilo es de naturaleza hidrófoba, es necesario disolverlo en un solvente portador polar para facilitar la permeación

celular. Etapa 2 (difusión del complejo colorante-solvente en la célula). El disolvente portador interactuará con los componentes polares tanto de la pared celular como de la membrana celular. Esta interacción permitirá que el complejo colorante-solvente se difunda a través de la estructura de la pared/membrana celular y penetre en la célula. Etapa 3 (transferencia del colorante rojo del Nilo al cuerpo lipídico). El complejo colorante-solvente se difundirá en la célula para encontrar el cuerpo lipídico. Etapa 4 (interacción del colorante rojo del Nilo con el cuerpo lipídico). El colorante se unirá al glóbulo lipídico para formar un complejo teñido-lipídico. Como resultado de esta interacción, el complejo es capaz de absorber fotones azul-verde (490-530 nm), alcanzar un estado excitado, y emitir fotones de menor nivel de energía entre 560 y 635 nm (amarillo y rojo). Cuanto más fuerte es la interacción entre el colorante y el lípido, más intensa es la fluorescencia resultante. La fuerza de la interacción colorante/lípido es una función directa de la cantidad de lípido, la relación entre el colorante rojo nilo y el lípido (o la concentración de tinte rojo del Nilo), y el tiempo de postincubación. Etapa 5 (difusión del disolvente portador fuera de la célula). El disolvente portador residual difunde de la célula al medio circundante (Halim & Webley, 2015).

Posteriormente y haciendo uso de una curva estándar de trioleína se interpoló el resultado de fluorescencia obtenido para conocer la concentración de lípidos neutros en los distintos puntos de la cinética de crecimiento, este proceso se realizó por duplicado biológico y triplicado técnico (Bertozzini et al., 2011).

Para la elaboración de la curva estándar de trioleína en medio Bold, en todos los puntos de la curva se añadieron 180  $\mu$ L de medio Bold y dado que la concentración final de trioleína es diferente en cada punto de la curva, los volúmenes de estándar de trioleína cambiarán en cada punto, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La trioleína es un triacilglicérido (TAG) utilizado como patrón lipídico. Se utilizó trioleína (1,2,3-Tri (cis-9-octadecenoil) glicerol) de la marca Sigma-Aldrich con número de catálogo T7140, el cual fue disuelto en isopropanol y preparado a una concentración de 10 mg/mL.

Tabla 4 Curva patrón de trioleína

Concentración [mg/L]	Medio Bold [ $\mu$ L]	Isopropanol [ $\mu$ L]	Trioleína [ $\mu$ L]
0	180	20	0
3	180	19.4	0.6
5	180	19	1
8	180	18.4	1.6
10	180	18	2
20	180	16	4

### 6.3. Cuantificación de proteínas

De la biomasa húmeda obtenida en la sección 6.1.1 se realizó la eliminación de la clorofila utilizando las siguientes soluciones: acetona, acetona-metanol (3:1; v/v), acetona-metanol (1:1; v/v), acetona-metanol (1:3; v/v) y metanol, se añadieron 1 mL de cada solución por separado, posteriormente se resuspendió por vortex y se centrifugo a 1000 rpm, el sobrenadante fue descartado y se añadió la solución siguiente de acuerdo al orden anteriormente descrito, cada lavado con las soluciones se realizó 3 veces; por último, se dejó secar la biomasa hasta la evaporación total de metanol (la biomasa adquirió una coloración amarilla o blanca).

Para la extracción de la fracción total soluble de proteínas, la biomasa clarificada obtenida se resuspendió en 200  $\mu$ L de Buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 40 mM, 0.1% Tween), se sónico a una amplitud de 30% por 5 segundos y se dejó reposar por 5 segundos en hielo, este procedimiento se repitió cinco veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min, posteriormente, la fracción soluble (sobrenadante) obtenida de cada muestra se utilizó para cuantificar las proteínas por el método de Bradford. En una microplaca se añadieron 5  $\mu$ L de cada muestra y se completó con agua a un volumen de 50  $\mu$ L y se añadieron 50  $\mu$ L del reactivo de Bradford, se protegió la placa con papel aluminio y se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 minutos, y fue registrada la absorbancia a 600 nm. Las lecturas obtenidas fueron interpoladas en una curva estándar de BSA (albúmina de suero bovino) (Bradford, 1976).



La curva patrón de BSA fue elaborada conforme al protocolo indicado por Bio-Rad, el cual consistió en realizar diluciones del stock de BSA de 1 mg/mL como se indica en la Tabla 5. En una microplaca, se utilizaron 8 pozos en los cuales fueron añadidos 100  $\mu$ L del reactivo de Bradford y 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones, se mezclaron y se protegió de la luz esperando 3 minutos para posteriormente registrar la absorbancia a 600 nm; a partir de las lecturas obtenidas se generó la curva estándar de BSA. Esto se realizó por triplicado.

Tabla 5 Curva patrón de albúmina de suero bovino

<b>Tubo</b>	<b>[Proteína]</b>	<b>BSA</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>
<b>[#]</b>	<b>[<math>\mu</math>g/mL]</b>	<b>[<math>\mu</math>L]</b>	<b>[<math>\mu</math>L]</b>
1	25	12.5	487.5
2	20	20	980
3	15	7.5	492.5
4	10	500 $\mu$ L Tubo 2	
5	5	500 $\mu$ L Tubo 4	
6	2.5	500 $\mu$ L Tubo 5	500
7	1.25	500 $\mu$ L Tubo 6	
8	0	-	

#### 6.4. Cuantificación de clorofila a, b y carotenoides

Para la cuantificación de los pigmentos, se utilizaron las muestras obtenidas durante la cinética de crecimiento de la sección 6.1.1, estas fueron centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de agua desionizada, la biomasa fue resuspendida y se volvió a realizar la centrifugación y la separación del sobrenadante, a la biomasa se añadió 1.5 mL de metanol y se homogenizó, posteriormente se calentó a 60°C durante 10 minutos, las muestras se

refrigeraron durante 24 horas. Después del tiempo de reposo en frío, se centrifugaron por 5 minutos a 10000 rpm, el sobrenadante se recuperó y se leyeron las absorbancias de clorofila total (a +b) y carotenoides totales en el espectrofotómetro de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Ecuaciones para determinar la concentración de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), clorofila total ( $C_{a+b}$ ) y carotenoides totales ( $C_{x+c}$ )

$$C_a = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$C_b = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$C_{a+b} = 1.44 A_{665.2} + 24.93 A_{652.4}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96 C_b) / 221$$

Las concentraciones de pigmento obtenidas al insertar los valores de absorbancia medidos son microgramos por mililitro de solución de extracto vegetal (Lichtenthaler, 1987).

## 6.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA  $p < 0.05$ ) utilizando la prueba de Dunnett para detectar diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento y acumulación celular, el contenido de lípidos (totales y neutros), proteína total soluble, pigmentos (clorofila total y carotenoides) en las microalgas *S. acutus* UTEX-72 y *C. vulgaris* OW-01 con las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento respecto al control.

## 8. DISCUSIÓN

De-Bashan et al. (2008) han reportado que *Chlorella* y *Scenedesmus* son microalgas de agua dulce comúnmente utilizadas para una variedad de aplicaciones industriales, incluso en plantas de aguas residuales. Estos organismos son altamente eficientes para reducir los materiales orgánicos, como la demanda química de oxígeno. Las condiciones de cultivo para el crecimiento y desarrollo de las microalgas son determinantes para la obtención final de biomasa para su empleo en la producción de biodiesel y productos de alto valor que incluyen carotenoides, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (De-Bashan et al., 2008; Lin et al., 2018; J. Liu et al., 2016).

Salama et al. (2014), indican que las diferencias en los niveles de síntesis de bioproductos de interés que se pueden obtener a partir de los cultivos de microalgas en presencia de reguladores de crecimiento pueden ser atribuidos a las diferentes condiciones de cultivo (tales como la concentración de fitohormonas, tamaño del inóculo, ciclo de luz, volumen de trabajo, punto final experimental, medio para el cultivo y cinética de crecimiento, entre otros) empleados en la estrategia experimental de los estudios.

### 8.1. Crecimiento Celular

Hasta el momento de la realización de esta tesis, no se encuentran reportes en la literatura del uso de reguladores de crecimiento de manera exógena en la microalga *Scenedesmus acutus* por lo que no se puede comparar directamente con lo obtenido en esta investigación. Sin embargo, existen registros del uso de la microalga *Scenedesmus obliquus*. Salama et al. (2014), evaluaron a la microalga *S. obliquus* cultivada en medio Bold y en presencia de AIA en concentraciones de  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M y  $10^{-8}$  M. A la concentración de  $10^{-5}$  M se obtuvo el máximo desarrollo con  $17.7 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ , mejorando el crecimiento por 1.9 veces en comparación con el control  $\left(9.5 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}\right)$  (Salama et al., 2014).

Sin embargo, en nuestros experimentos para *S. acutus* en presencia de AIA, a pesar de que se utiliza el mismo medio de cultivo que el empleado para *S. obliquus* en el estudio realizado por Salama et al. (2014), se obtuvo un aumento mínimo en la proliferación celular al finalizar la cinética de crecimiento, siendo que no fue estadísticamente significativo respecto al control, las concentraciones evaluadas fueron de  $5.71 \times 10^{-6}$  M,  $2.854 \times 10^{-5}$  M y  $5.708 \times 10^{-5}$  M obteniendo como proliferación celular al finalizar la cinética de crecimiento  $1.25 \times 10^7 \pm 3.16 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ ,  $1.25 \times 10^7 \pm 2.11 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$  y  $1.09 \times 10^7 \pm 8.95 \times 10^5 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$  respectivamente, también se observó que una de las diferencias fue el tiempo en el que se desarrollaron los cultivos siendo que Salama et al. (2014) terminaron sus cinéticas de crecimiento después de 6 días, mientras que en este trabajo el rango de duración de las cinéticas de crecimiento fue de 34 a 53 días, con lo cual se tiene otro factor que afecta el comportamiento de las microalgas, aunado a que no se tratan de la misma especie de *Scenedesmus*.

Por otra parte, existe un mayor número de reportes en la literatura evaluando a *C. vulgaris* en presencia de reguladores de crecimiento en comparación con *S. acutus*, debido a que *C. vulgaris* ha sido empleada como el sistema experimental ideal para dilucidar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de las respuestas de las fitohormonas a nivel celular, ya que tiene un ciclo de crecimiento corto con altas tasas metabólicas y, por lo tanto, responde rápidamente a los tratamientos.

Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz (2014), evaluaron el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (SAG211-12) en el medio Knop modificado y adicionaron diferentes concentraciones de AIA, PAA (Ácido Fenilacético, por sus siglas en inglés), IBA (Ácido Indolbutírico) y ANA, en sus resultados observaron una respuesta a la aplicación de estos reguladores de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, el crecimiento de las microalgas se suprimió en presencia de todas las auxinas a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . El efecto estimulante de las fitohormonas en el crecimiento de algas se observó en el siguiente orden: 0.1  $\mu\text{M}$  AIA > 0.1  $\mu\text{M}$  IBA > 1  $\mu\text{M}$  PAA > 1  $\mu\text{M}$  ANA.

Al comparar nuestros resultados en el desarrollo de *C. vulgaris* con los obtenidos por Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz (2014), se observa que la principal diferencia que se encuentra entre ambos es el medio de cultivo en el cual se desarrollaron las microalgas, siendo que los medios Knop modificado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  4.24 mM,  $\text{KNO}_3$  2.5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.84 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.045 mM,  $\text{NaFeEDTA}$  10 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0.025  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.125  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoCl}_2$  0.025  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KI}$  1.25  $\mu\text{M}$  (Drzewiecka et al., 2014)) y el medio Basal Bold ( $\text{NaNO}_3$  2.94 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 mM,  $\text{NaCl}$  0.43 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.43 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.29 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.17 mM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.36  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MoO}_3$  0.26  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.31  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.084  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1846 M,  $\text{EDTA}$  8.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KOH}$  0.5525 M,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc.) 1 mL (CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), n.d.)), presentan algunos elementos similares en su composición para el desarrollo de las microalgas, pero difieren en la concentración de los elementos, lo cual provoca que la biodisponibilidad sea diferente en los dos medios de cultivos comparados, también se observa que difieren en algunos otros elementos como lo son el yoduro de potasio en el medio Knop modificado el cual induce un incremento en la acumulación de biomasa y sustancias poliméricas extracelulares (Zheng et al., 2005) lo cual influye en la obtención de los resultados, al comprar las concentraciones de auxinas empleadas por Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz (2014) y en este trabajo se observa que la inhibición en el crecimiento causada al aplicar 1 y 10 mg/L de AIA siendo 5.71  $\mu\text{M}$  y 57.08  $\mu\text{M}$  respectivamente puede deberse a que se están empleando concentraciones muy altas en comparación con la concentración óptima de 0.1  $\mu\text{M}$  AIA, sin embargo también se debe de considerar que el medio de cultivo influye en el crecimiento de la microalga debido a todos los nutrientes que se encuentran disponibles en cada uno de los medios empleados y en el caso de 0.1 mg/L de ANA siendo 5.37  $\mu\text{M}$  inhibe el crecimiento de *C. vulgaris*, ya que es 5 veces mayor a la concentración en la que estimula a *C. vulgaris* Beijerinck en presencia de 1  $\mu\text{M}$  ANA, observando que la cepa de *C. vulgaris* no es la misma que la empleada en este trabajo, las concentraciones que se emplearon fueron basadas en los resultados obtenidos por Lin et al. (2018).

Piotrowska & Czerpak (2009), evaluaron la microalga *Chlorella vulgaris* en medio mineral de cultivo modificado de Knop con la adición de citocininas, las cuales fueron; bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), trans-zeatina (Z) y 1,3-Difenilurea (DPU), observando que el crecimiento celular se estimuló de manera dependiente de la dosis. La concentración de  $10^{-3}$  M inhibía el crecimiento y el crecimiento óptimo se obtenía entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M dependiendo de la citocinina. Para la determinación de las concentraciones óptimas de BAP, KIN, Z y DPU para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, se aplicaron citoquininas disueltas en 0.1 M de NaOH a 8 concentraciones de  $10^{-3}$  M a  $10^{-10}$  M (día 0). La densidad inicial de la suspensión de algas (día 0) fue de  $20 \times 10^5$  células por mililitro. Estos experimentos preliminares mostraron que DPU a  $10^{-6}$  M, KIN y BAP a  $10^{-7}$  M y Z a  $10^{-8}$  M eran los más efectivos en la inducción del crecimiento del cultivo. Debido a que el número de células por mililitro alcanzaba el máximo. Por lo tanto,  $10^{-8}$  M de Z,  $10^{-7}$  M de BAP y KIN, así como  $10^{-6}$  M de DPU se utilizaron en los siguientes experimentos. Los datos indicaron que las citocininas a  $10^{-10}$  M no tuvieron casi ningún efecto en el crecimiento de las algas al mostrar el mismo comportamiento que el control.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que al emplear  $0.04 \mu\text{M}$  de BAP no genera diferencia significativa respecto al cultivo control, mientras que las concentraciones de  $2.22$  y  $4.44 \mu\text{M}$  de BAP en los cultivos de *C. vulgaris* inhiben la proliferación celular siendo estas concentraciones  $22.2$  y  $44.4$  veces mayores a la utilizada por Piotrowska & Czerpak (2009) para obtener un crecimiento óptimo. En el caso de KIN al emplear las concentraciones de  $0.46 \mu\text{M}$ ,  $2.32 \mu\text{M}$  y  $4.65 \mu\text{M}$  inhiben el crecimiento en un rango del  $20\%$  al  $51\%$  en comparación con el cultivo control, al realizar la comparación con la concentración óptima de crecimiento descrita por Piotrowska & Czerpak (2009) se observa que las concentraciones empleadas de KIN en este trabajo fueron  $4.6$ ,  $23.2$  y  $26.5$  veces mayores respectivamente a  $10^{-7}$  M de KIN, lo que podría ser un factor clave en la inhibición del desarrollo de nuestros cultivos.

Czerpak et al. (2002) evaluaron la influencia del ácido salicílico (SA) en cultivos de *Chlorella vulgaris*, utilizando concentraciones de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M. De acuerdo con

sus resultados, el efecto estimulante del SA sobre el número de células de *C. vulgaris* se dió a la concentración de  $10^{-4}$  M. Los datos indican que el rango de concentraciones  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M de SA produce un aumento del número de células de *C. vulgaris*. La actividad más baja de la SA se mostró en su concentración de  $10^{-6}$  M con lo cual se concluyó que el SA afecta a los cultivos de manera dosis-dependiente.

Al comparar las concentraciones empleadas por Czerpak et al. (2002) y las empleadas en este trabajo, siendo  $0.56 \mu\text{M}$ ,  $2.78 \mu\text{M}$  y  $5.55 \mu\text{M}$  de AAS en las cuales se obtuvieron una proliferación celular al final de la cinética de  $3.34 \times 10^7 \pm 5.11 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ ,  $4.04 \times 10^7 \pm 9.53 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$  y  $3.32 \times 10^7 \pm 7.24 \times 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$  respectivamente, se observó que existe una disminución de 180, 36 y 18 veces respecto a la concentración a la cual se encontró la mayor estimulación ( $10^{-4}$  M) en el trabajo de Czerpak et al. (2002), siendo que las concentraciones empleadas en este trabajo no tienen diferencia significativa respecto al control ( $3.97 \times 10^7 \pm 8.30 \times 10^5 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ ) ya que no se registró estimulación por parte del AAS.

## 8.2. pH

Salama et al. (2014), reportan que la actividad fotosintética de las microalgas consume carbono (por ejemplo,  $\text{HCO}_3$ ) que conduce a la acumulación de iones hidroxilo en la fase acuosa y el aumento del pH de la solución. En su estudio, el crecimiento de microalgas en todas las condiciones experimentales aumentó el pH de la solución durante el tiempo de cultivo y la tendencia del pH con concentraciones crecientes de AIA fue consistente con sus respectivas tasas de crecimiento. Al final de los experimentos para *S. obliquus*, el pH fue de 9.6 a  $10^{-5}$  M de AIA en comparación con el control (7.5).

En contraste con lo reportado por Salama et al. (2014), en este trabajo se observó que el pH en presencia de AIA en los cultivos de *S. acutus* disminuye al finalizar las cinéticas, siendo que a  $1 \text{ mg/L}$  y  $5 \text{ mg/L}$  de AIA el pH disminuyó  $11.77\%$  y  $22.55\%$  respectivamente, los cuales son significativamente menores al pH del cultivo control, mientras que al aplicar  $10 \text{ mg/L}$  de AIA el pH no presenta diferencia significativa respecto al control. La disminución del pH afectó en gran medida el desarrollo de

los cultivos al verse disminuida la proliferación celular, siendo que las tres concentraciones de AIA no inducen diferencias significativas respecto al control. El contenido de lípidos totales y la productividad lipídica se vieron inhibidas en un rango de 49% al 79% y 78% al 84% respectivamente al compararlos con el cultivo control, mientras que el contenido de lípidos neutros y el contenido de proteína total soluble se mantuvieron similares al registrado en el cultivo control, siendo que la aplicación de AIA en diferentes concentraciones inhiben entre 57% al 108% los pigmentos clorofila total y carotenoides, lo cual compromete el desarrollo y acumulación de bioproductos de la microalga.

Yu et al. (2017) evaluaron el pH en el cultivo de *Scenedesmus sp.* SDEC-8 y *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 en medio BG11 en respuesta a la hormona ANA, observado que en *Scenedesmus sp.* SDEC-8 y *C. sorokiniana* SDEC-18 el valor final del pH se mantuvo en aproximadamente 9, mientras que el pH en los cultivos control fue de 11, los autores consideraron dos razones para la disminución; la primera es que las fitohormonas promueven la acumulación de metabolitos en la fase de oscuridad y la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub>. La segunda es que las fitohormonas mejoran la permeabilidad de la membrana de las células, lo que lleva a la excreción de H<sup>+</sup> superfluos desde el interior de las células hasta el exterior. Por lo que, la fijación de CO<sub>2</sub> está influenciada por el suplemento de fitohormonas, debido a sus efectos positivos sobre la fotosíntesis, que conduce al cambio de pH. Existe una bomba de H<sup>+</sup> en la capa externa de la membrana celular de plantas y algas. Las fitohormonas se unen con los receptores después del reconocimiento y la aceptación por parte de la célula, y luego estimulan la actividad de la bomba de protones (H<sup>+</sup>) a través de vías de transducción de señal en la célula. La bomba de protones activada transfiere el H<sup>+</sup> a la pared celular, lo que hace que la pared celular se desestabilice y el pH en el sustrato circundante disminuya. El carbono inorgánico existe en el cultivo de algas en tres formas: CO<sub>2</sub> libre, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, los cuales son controlados por el pH. Cuando el pH es entre 6 y 9, el carbono inorgánico existe principalmente en forma de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que es la forma principal utilizada por las células de algas. Debido a lo anterior, ellos establecieron que el pH óptimo para el crecimiento normal de algas es de aproximadamente 9. En la misma publicación se



observó que el pH de las dos algas evaluadas sin reguladores de crecimiento alcanzó un pH de 11, lo que conduce a una auto inhibición. La excreción de protones inducida por auxina rompe el equilibrio entre  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , aumentando el  $\text{HCO}_3^-$  y las concentraciones de  $\text{CO}_2$  libre que son fáciles de asimilar para las microalgas. Por lo tanto, el suplemento con fitohormonas ajusta el pH para estabilizarlo en un nivel adecuado para el crecimiento de algas.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó que el cultivo control de *S. acutus* presenta un pH al final de la cinética de  $9.73 \pm 0.10$ , el cual es mayor significativamente respecto al pH registrado en los cultivos en presencia de las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados, existiendo la posibilidad de una inhibición en el crecimiento y acumulación de metabolitos debido a que el pH disminuye ejerciendo un estrés adicional al ejercido por los reguladores de crecimiento, los cuales desencadenan que los cultivos de microalgas no acumulen los metabolitos de interés ya que entra en un estado de supervivencia.

Contrario a lo observado para *S. acutus*, en *C. vulgaris* se observó que el pH al finalizar la cinética de crecimiento del cultivo control fue de  $7.23 \pm 0.12$ , el cual es significativamente menor en la mayoría de los experimentos realizados empleando tres concentraciones de reguladores de crecimiento, lo cual afectó en gran medida el desarrollo de las microalgas y la acumulación de los metabolitos de interés, al igual que se observó en *S. acutus* a lo largo de las diferentes cuantificaciones, siendo la excepción el empleo de las auxinas AIA y ANA ya que el empleo de estos reguladores en cultivos de *C. vulgaris* aumentó de manera significativa el contenido de clorofila y carotenoides totales.

Es importante mencionar que en la mayoría de los resultados descritos en este trabajo sobre la producción de biomoléculas de interés biotecnológico, se registra una alta desviación estándar lo que indica que, al trabajar con microalgas, los duplicados biológicos no siempre se comportan de la misma manera a pesar de que se trata de mantener todas las condiciones de cultivo de acuerdo a lo planeado en la estrategia/diseño experimental. Estos resultados pueden estar relacionados con

el efecto de las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos y con algunas condiciones experimentales que no fueron controladas como es la concentración de CO<sub>2</sub> suministrado como fuente de carbón, además de la regulación del pH durante la cinética de crecimiento, por lo que para futuros trabajos se deben tomar en cuenta los diversos factores que puedan influir como un estrés adicional al que se está evaluando, para realizar un diseño de experimentos más crítico para obtener mayor información sobre como los factores afectan al desarrollo de las microalgas tratando de que el sistema en el que se trabajen los experimentos se acerque más a un sistema cerrado.

### 8.3. Lípidos

#### 8.3.1. Lípidos Totales

Lin et al. (2018), evaluaron la adición de reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP), ácido salicílico (SA) y ácido naftalenacético (ANA) en cultivos de *Chlorella vulgaris* FACHB-9 en medio BG11 en distintas concentraciones. Después de 15 días de crecimiento se encontró un mayor contenido de lípidos en comparación con el control para las concentraciones de 0.05 y 1 mg/L de BAP, 5 mg/L de ANA y 0.01 y 1 mg/L de SA, estos incrementos no son dependientes de la dosis.

Contrariamente a lo publicado por Lin et al. (2018), en nuestros resultados no detectamos aumentos significativos respecto al control en ninguno de los reguladores empleados en la microalga *C. vulgaris*, siendo 3 reguladores de crecimiento similares a los evaluados por Lin et al. (2008), al igual que la microalga, pero difiriendo en la cepa evaluada (FACHB-9 y OW-01), el medio de cultivo empleado (BG11 y Basal Bold) y el tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria en las cinéticas de crecimiento y en donde se realizaron las cuantificaciones de los metabolitos de interés biotecnológico, por lo que esto influye en que obtengamos resultados distintos en ambos estudios, siendo que Lin et al. (2018) evaluaron el contenido de lípidos totales después de 15 días de cultivo y en este trabajo se evaluaron una vez que llegaron a fase estacionaria y antes de que comenzara la fase de muerte los cuales se encontraban en un rango de 16 a 39 días.

Lin et al. (2018), evaluaron la productividad de lípidos de la biomasa de *C. vulgaris* en respuesta a los tratamientos de regulador de crecimiento después de 15 días de cultivo. Se observaron aumentos en la productividad de lípidos debido a la aplicación de 1 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) ( $7.61 \pm 0.63 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), y 50 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) ( $7.08 \pm 0.38 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) en comparación con los controles ( $4.79 \pm 0.80 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). En este trabajo, no se pudo encontrar un aumento significativo respecto al control en la productividad de lípidos para SA.

Contrariamente a lo encontrado por Lin et al. (2018), en nuestros resultados no encontramos aumentos significativos respecto al control en ninguno de los reguladores empleados en los cultivos de *C. vulgaris*, siendo que el empleo de AIA inhibe la productividad lipídica en rango del 78% al 84%, ANA del 65% al 78%, BAP 66% al 82%, KIN del 70% al 76% y AAS del 69% al 75%, todas estas inhibiciones fueron significativas respecto al cultivo control.

### 8.3.2. Lípidos Neutros

En nuestros resultados observamos que existe una relación entre el porcentaje de lípidos totales y neutros, al ser estos últimos una fracción de los lípidos totales es consistente que se observe un comportamiento similar para ambas microalgas, sin embargo es necesario mejorar algunos factores en la técnica de cuantificación de lípidos neutros, como lo son el solvente utilizado para generar la curva patrón y en cual se encuentra disuelto la trioleína, la concentración del colorante rojo nilo para que no se obtenga una saturación en la tinción de las microalgas y que esto pueda alterar la cuantificación de los lípidos neutros.

Otro factor que se puede cambiar o complementar es el uso de otro patrón lipídico además de la trioleína para tener más información que nos ayude a decidir cuales tratamientos con reguladores de crecimiento o algún otro estrés que se induzca en las microalgas son los mejores para continuar con los trabajos, esto se debe de mejorar y estandarizar para cada tipo de microalga y medio de cultivo empleado para así optimizar el proceso y el resultado de la cuantificación y disminuir las desviaciones estándar que se obtuvieron en el presente trabajo siguiendo el procedimiento descrito por Bertozzini et al. (2011), obteniendo así una curva patrón

que nos indique la cantidad de lípidos neutros (triacilglicéridos) que se pueden obtener a partir de los lípidos totales ya que esto permitirá elegir los mejores resultados para realizar los perfiles lipídicos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

Con el empleo de la cuantificación de lípidos neutros pudiera reducirse el gasto económico que representa la cuantificación de lípidos mediante la cromatografía de gases para la obtención del perfil lipídico, ya que con un estudio preliminar (lípidos neutros) se descartan aquellas muestras que no serían viables analizar, obteniendo así mejores resultados que puedan ser útiles para futuros trabajos.

El empleo del colorante rojo nilo y la cuantificación de triacilglicéridos mediante el uso de la curva patrón de trioleína no ha sido reportada hasta el momento en microalgas con tratamientos con reguladores de crecimiento, con este trabajo se establece un antecedente del uso esta técnica como una herramienta previa para conocer aquellas condiciones de cultivo y estrés que pueden ser útiles para la producción de biodiesel y otros productos de origen lipídico y su posterior análisis por cromatografía de gases para detectar el perfil lipídico.

#### 8.4. Proteína Total Soluble

Salama et al. (2014), mencionan que los carbohidratos y las proteínas son los principales contribuyentes a la composición celular de las microalgas que se ven afectadas por diversos factores ambientales como la luz, el agotamiento del nitrógeno, la salinidad, el pH y la temperatura y en este caso a la presencia exógena de fitohormonas. En los resultados obtenidos para *S. obliquus* se observó que el contenido de proteínas decrece de 34% a 25% cuando se incrementa la concentración de AIA ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  M) al compararse con el control (32%). También observaron que el contenido de proteínas disminuye a altas concentraciones de AIA ( $10^{-5}$ – $10^{-6}$  M). Esto puede ser atribuido por ejemplo a diferentes efectos metabólicos de las fitohormonas en las microalgas (Salama et al., 2017).

Al comparar nuestros resultados, observamos que al aplicar las concentraciones de 1 mg/L de AIA, 5 mg/L de AIA y 10 mg/L de AIA, no se observó diferencia significativa respecto al control.

Lin et al. (2018), evaluaron el contenido de proteínas en *C. vulgaris* en respuesta a los tratamientos con los reguladores de crecimiento después de 15 días de cultivo, observando que los reguladores de crecimiento no afectan el contenido proteico en las células de *C. vulgaris*, a excepción de SA el cual produjo un incremento en el contenido de proteínas al ser añadido en una concentración de 10 mg/L ( $39.76 \pm 5.56$  mg/g de biomasa seca) al ser comparado con el control ( $24.42 \pm 3.46$  mg/g de biomasa seca).

En comparación con lo encontrado por Lin et al. (2008), nosotros obtuvimos una inhibición significativa respecto al control en la mayoría de las concentraciones evaluadas, siendo 1 mg/L de AIA (11%), 5 mg/L de AIA (13%), ANA inhibe en un rango del 8% al 11%, 0.01 mg/L de BAP (11%), 1 mg/L de KIN (7%) y el AAS inhibe en un rango del 10% al 11%. Mientras que las concentraciones de 10 mg/L de AIA, 0.5 mg/L de BAP, 1 mg/L de BAP, 0.1 mg/L de KIN y 0.5 mg/L de KIN, no muestran diferencias significativas respecto al control.

Czerpak et al. (2002) evaluaron el contenido de proteínas en las células de *C. vulgaris*, observando que el SA estimula en el rango de concentraciones de  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M, alcanzando el máximo al octavo día de cultivo. En *C. vulgaris* la producción de proteínas fue estimulada a la concentración  $10^{-4}$  M, después de 12 días en 160% con referencia al control. El tratamiento con SA, en el rango de concentraciones  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M, se caracterizó por la disminución de la producción de proteína (32-72%) con relación al control.

En comparación con lo obtenido por Czerpak et al. (2002) nuestros resultados mostraron una disminución en la producción de proteínas en presencia de AAS el cual inhibió en un rango del 10% al 11% respecto al control y las concentraciones empleadas en este trabajo fueron  $5.6 \times 10^{-7}$  M,  $2.78 \times 10^{-6}$  M y  $5.55 \times 10^{-6}$  M las cuales son más bajas que las empleadas por Czerpak et al. (2002), aunado con la diferencia en los medios de cultivo empleados, siendo el medio Knop modificado por Czerpak et al. (2002) y Basal Bold empleado en este trabajo.

## 8.5. Pigmentos

Lin et al. (2018) reportaron que el contenido total de carotenoides en las células de *C. vulgaris* aumentó en los tratamientos de reguladores de crecimiento usados en su estudio, sin embargo los aumentos no fueron dependientes de la dosis. En el caso de los tratamientos con 6-bencilaminopurina (BAP), se encontraron aumentos significativos en el contenido total de carotenoides en todas las concentraciones empleadas (0.01 mg/L a 5 mg/L) obteniendo un aumento significativo en el rango del 18.83% al 116.88% en comparación con el cultivo control ( $1.54 \pm 0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ ). También obtuvieron aumentos significativos en el contenido total de carotenoides debido a los tratamientos de 15 mg/L de ANA ( $2.55 \pm 0.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ ) y 20 mg/L de ANA ( $2.30 \pm 0.35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ ) y 20 mg/L de SA ( $2.00 \pm 0.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ ), en comparación con el control ( $1.54 \pm 0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$ ).

En contraste con lo reportado por Lin et al. (2018), en nuestros cultivos al emplear las concentraciones de 0.01, 0.5 y 1 mg/L de BAP, no existió diferencia significativa respecto al control en el contenido de carotenoides. En el caso de 5 mg/L de ANA se observó un aumento significativo del 23% respecto al control. Para 0.1 mg/L de AAS el resultado mostró una inhibición significativa del 26% en el contenido de carotenoides totales respecto al cultivo control.

Czerpak et al. (2002) reportaron que el SA muestra influencia estimulante sobre el contenido de clorofila a y b, y de carotenoides totales en las células de *C. vulgaris*, sin tener en cuenta la concentración o el tiempo de cultivo. Las células de *C. vulgaris* tratadas con SA en el rango de concentración  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M después de 12 días de crecimiento, mostraron la estimulación del contenido de clorofila a en un rango de 128-150% y de clorofila b dentro del rango de 136-170% con respecto al control (100%). El SA, a la concentración  $10^{-4}$  M, aumenta el contenido total de carotenoides en un 133-157%, en comparación con el control entre 4 y 8 días de cultivo.

Contrario a lo reportado por Czerpak et al. (2002), en este trabajo no se observó un aumento significativo respecto al control en presencia de AAS en los cultivos de *C. vulgaris* una vez que estos llegaron al final de la cinética de crecimiento, en presencia de 0.1 mg/L de AAS ( $6.94 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g/mL}$  para clorofila total y  $1.39 \pm 0.15$

µg/mL para carotenoides totales) se registró una disminución respecto al control tanto en el contenido de clorofila total como en el contenido de carotenoides totales, esto puede atribuirse al tiempo de duración de las cinéticas ya que el crecimiento en presencia de 0.1, 0.5 y 1 mg/L de AAS requirió de un tiempo de 39, 37 y 32 días respectivamente, en comparación con la cinética control de *C. vulgaris* que tuvo una duración de 24 días, siendo que estos tiempos fueron mayores a los empleados por Czerpak et al. (2002) ya que realizaron la cuantificación de los pigmentos de interés a los 12 días de cultivo.

Yu et al. (2017), observaron que la adición de ANA en los cultivos de *Scenedesmus* sp. SDEC-8 y *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 no influye en la captura de luz y en la transferencia de energía para la cadena de transporte de electrones que aparece en las reacciones de luz. Se ha demostrado que el efecto de las fitohormonas en la fotosíntesis en las algas es principalmente en las reacciones independientes de luz. Por lo tanto, el suplemento de hormonas fortalece el Ciclo de Calvin durante la fotosíntesis y promueve la capacidad de las células para la fijación de carbono, proporcionando más carbono para la biosíntesis de lípidos (Yu et al., 2017).

Contrario a lo reportado por Yu et al. (2017), en la microalga *S. acutus* UTEX-72 se observó que la adición de 10 mg/L de AIA inhibe en 57% la acumulación de clorofila total, mientras que en *C. vulgaris* OW-01 se observó que la aplicación de 1 mg/L de AIA, 5 y 10 mg/L de ANA indujeron un aumento del 53%, 46% y 39% el contenido de clorofila total respecto al cultivo control

## 9. CONCLUSIONES

- El cultivo control de *C. vulgaris* tuvo una proliferación celular 3.79 veces mayor en comparación con *S. acutus* en condiciones control.
- El cultivo de *S. acutus* en presencia de 0.5 mg/L de BAP fue el único que presentó un aumento significativo del 29% en la proliferación celular respecto al cultivo control.
- La presencia de 0.5 mg/L de KIN en cultivo de *C. vulgaris* provocó una inhibición del 51% respecto al control, siendo la mayor inhibición registrada para los cultivos de *C. vulgaris*.
- La acumulación de lípidos totales para ambas microalgas en condiciones control fue similar, siendo 50%  $\pm$  5% de lípidos totales para *S. acutus* y 44%  $\pm$  1% de lípidos totales para *C. vulgaris*.
- En los cultivos de ambas microalgas expuestos a los reguladores de crecimiento existió una inhibición significativa de los lípidos totales respecto al control, siendo que las concentraciones de 5 mg/L de AIA y 1 mg/L de BAP inhiben en 79% y 73% el contenido de lípidos totales en *S. acutus* y *C. vulgaris* respectivamente al compararlos con los cultivos control, siendo que las mismas concentraciones de los reguladores de crecimiento inhiban en 84% y 86% la productividad lipídica en *S. acutus* y *C. vulgaris* respectivamente siendo las mayores inhibiciones registradas para cada microalga.
- Respecto a los lípidos neutros se observó que el cultivo control de *S. acutus* presentó al finalizar la cinética de crecimiento una acumulación menor al 41.73% respecto a *C. vulgaris*.
- En empleo de reguladores de crecimiento para ambas microalgas provocó una inhibición en la acumulación de lípidos neutros en la mayoría de los experimentos realizados, siendo 1 mg/L de AAS en *S. acutus* y 0.5 mg/L de KIN en *C. vulgaris* las concentraciones que presentaron ella mayor inhibición del 83% y 90% respectivamente para las dos microalgas evaluadas.
- La acumulación de proteína total soluble en el cultivo control de *S. acutus* fue 10.08% menor a la registrada en el cultivo control de *C. vulgaris*.



- La adición de 0.1 mg/L de KIN a cultivo de *S. acutus* aumento un 7% la proteína total soluble el cual es significativo con respecto al cultivo control.
- En los cultivos de *C. vulgaris* tratados con AIA, ANA, BAP, KIN y AAS en la mayoría presentan una inhibición en el contenido de proteína total soluble del 7% al 13%, siendo que 5 mg/L de AIA provoca la mayor inhibición del 13% en comparación con el control.
- El cultivo control de *S. acutus* registró un incremento de 25.48% en el contenido de clorofila total y del 9.14% en el contenido de carotenoides totales en comparación con el cultivo control de *C. vulgaris*.
- La adición de 10 mg/L de AIA en cultivos de *S. acutus* induce la inhibición del 57% en la biosíntesis de clorofila con relación al cultivo control, en cuanto al contenido de carotenoides se observa que al aplicar 1 mg/L de AIA se inhibe un 108% en comparación con el cultivo control.
- Al aplicar de 1 mg/L de AIA en cultivo de *C. vulgaris* indujo la mayor acumulación de clorofila siendo 53% mayor que la obtenida en el cultivo control.
- El empleo de 0.1 mg/L de AAS en cultivo de *C. vulgaris* inhibió en 25% la acumulación de clorofila respecto al control.
- El uso 5 mg/L de ANA en cultivo de *C. vulgaris* indujo un aumento significativo del 23% en el contenido de carotenoides totales, mientras que 1 mg/L de ANA inhibió en 53% el contenido de carotenoides totales respecto al control.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alsenani, F., Wass, T. J., Ma, R., Eltanahy, E., Netzel, M. E., & Schenk, P. M. (2019). Transcriptome-wide analysis of *Chlorella* reveals auxin-induced carotenogenesis pathway in green microalgae. *Algal Research*, 37, 320–335. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.002>
- Armstrong, G. A. (1998). Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 43(2), 87–100. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00063-3)
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. In *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (Issue Marzo, pp. 17–27). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.
- Aslam, A., Fazal, T., Zaman, Q. uz, Shan, A., Rehman, F., Iqbal, J., Rashid, N., & Ur Rehman, M. S. (2020). Biorefinery of Microalgae for Nonfuel Products. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 197–209). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00013-8>
- Auer, C. A. (1997). Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regulation*, 23(1), 17–32. <https://doi.org/10.1023/A:1005998307340>
- Bajguz, A. (2009). Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in *Chlorella vulgaris* subjected to short-term heat stress. *Journal of Plant Physiology*, 166(8), 882–886. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.10.004>
- Bajguz, A. (2011). Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 406–416. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9551-0>
- Bajguz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2013). Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology et Biochemistry*, 71, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.003>
- Bajguz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2014). Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.009>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.001>
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 461–503). <https://doi.org/doi:10.1002/9781118567166.ch25>
- Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*, 87(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>
- Bertrand, M. (2010). Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 89–102. <https://doi.org/10.1007/s1120-010-9589-x>
- Blass, U., Anderson, J. M., & Calvin, M. (1959). Biosynthesis and Possible Functional

- Relationships Among the Carotenoids; and Between Chlorophyll a and Chlorophyll b. *Plant Physiology*, 34(3), 329 LP – 333. <https://doi.org/10.1104/pp.34.3.329>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 6(5), 33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Bogorad, L., & Goodwin, T. W. (1976). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 1, 64–148.
- Borowitzka, M. A., & Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, 52(4), 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cahoon, A. B., & Timko, M. P. (2003). Biochemistry and Regulation of Chlorophyll Biosynthesis BT - *Photosynthesis in Algae* (A. W. D. Larkum, S. E. Douglas, & J. A. Raven (eds.); pp. 95–131). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_6)
- Čarná, M., Repka, V., Skůpa, P., & Šturdík, E. (2014). Auxins in defense strategies. *Biologia*, 69(10), 1255–1263. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0431-3>
- Castro Tapia, J. M. (2018). Efecto de La Temperatura En La Acumulación de Lípidos En Tres Especies de Microalgas Verdes. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa). (n.d.). *Bold's Basal Medium (BB)*. Dunstaffnage Marine Laboratory. Retrieved June 20, 2017, <https://www.ccap.ac.uk/media/documents/BB.pdf>
- Chen, G., Wang, B., Han, D., Sommerfeld, M., Lu, Y., Chen, F., & Hu, Q. (2015). Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 81(1), 95–107. <https://doi.org/10.1111/tpj.12713>
- Chiong, T., Acquah, C., Lau, S. Y., Khor, E. H., & Danquah, M. K. (2016). Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00012-4>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 26, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., & Bigogno, C. (2000). The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochemical Society Transactions*, 28(6), 740–743. <https://doi.org/10.1042/bst0280740>
- Crofcheck, C., Shea, A., Montross, M., Crocker, M., & Andrews, R. (2013). Influence of flue gas components on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Transactions of the ASABE*, 56(6), 1421–1429. <https://doi.org/10.13031/trans.56.10094>
- Czepak, R., Bajguz, A., Gromek, M., Kozłowska, G., & Nowak, I. (2002). Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(1), 45. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0020-x>
- da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- da Silva, J. C., & Lombardi, A. T. (2020). Chlorophylls in Microalgae: Occurrence, Distribution and Biosynthesis BT - *Pigments from Microalgae Handbook* (E. Jacob-

- Lopes, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (eds.); pp. 1–18). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_1)
- De-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *azospirillum spp.* in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, 44(4), 938–947. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00533.x>
- De Smet, I., Voß, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R. E., Swarup, R., Kerr, I., Hodgman, C., Bock, R., Bennett, M., Jürgens, G., & Beeckman, T. (2011). Unraveling the Evolution of Auxin Signaling. *Plant Physiology*, 155(1), 209 LP – 221. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168161>
- Dembitsky, V. M., & Maoka, T. (2007). Allenic and cumulenenic lipids. *Progress in Lipid Research*, 46(6), 328–375. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.07.001>
- Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52(1), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
- Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011). Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation. *Current Biology*, 21(9), R365–R373. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>
- Dominguez, H. (2013). Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-512-1.50026-6>.
- Drzewiecka, K., Mleczek, M., Gasecka, M., Magdziak, Z., Goliński, P., & Chadzinikolau, T. (2014). Copper phytoextraction with *Salix purpurea x viminalis* under various Ca/Mg ratios. Part 2. Effect on organic acid, phenolics and salicylic acid contents. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(4), 903–913. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1469-5>
- Dujardin, E., Laszlo, P., & Sacks, D. (1975). The chlorophylls. An experiment in bio-inorganic chemistry. *Journal of Chemical Education*, 52(11), 742. <https://doi.org/10.1021/ed052p742>
- Eggink, L. L., LoBrutto, R., Brune, D. C., Brusslan, J., Yamasato, A., Tanaka, A., & Hooper, J. K. (2004). Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide a oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biology*, 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-5>
- Ester Sztein, A., Cohen, J. D., de la Fuente, I. G., & Cooke, T. J. (1999). Auxin metabolism in mosses and liverworts. *American Journal of Botany*, 86(11), 1544–1555.
- Falkowski, P. G., & Owens, T. G. (1980). Light-Shade Adaptation : TWO STRATEGIES IN MARINE PHYTOPLANKTON. *Plant Physiology*, 66(4), 592–595. <https://doi.org/10.1104/pp.66.4.592>
- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., & Zhang, X. (2014). Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9211–9222. <https://doi.org/10.1021/jf502420h>
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Frébortová, J., Plíhal, O., Florová, V., Kokáš, F., Kubiasová, K., Greplová, M., Šimura, J., Novák, O., & Frébort, I. (2017). Light influences cytokinin biosynthesis and sensing in *Nostoc* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 53(3), 703–714. <https://doi.org/10.1111/jpy.12538>
- Frommolt, R., Werner, S., Paulsen, H., Goss, R., Wilhelm, C., Zauner, S., Maier, U. G., Grossman, A. R., Bhattacharya, D., & Lohr, M. (2008). Ancient Recruitment by Chromists of Green Algal Genes Encoding Enzymes for Carotenoid Biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(12), 2653–2667. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn206>

- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M., & Motyka, V. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2827–2840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq457>
- Gálová, E., Šalgovičová, I., Demko, V., Mikulová, K., Ševčovičová, A., Slováková, L., Kyselá, V., & Hudák, J. (2008). A short overview of chlorophyll biosynthesis in algae. *Biologia*, 63(6), 947–951. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0147-3>
- Green, B. R., & Durnford, D. G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 685–714. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.685>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2019). Chapter 16 - Algal spent biomass—A pool of applications. A. Pandey, J.-S. Chang, C. R. Soccol, D.-J. Lee, & Y. B. T.-B. A. (Second E. Chisti (Eds.)), *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 397–433). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00016-0>
- Hagen, C., Braune, W., & Greulich, F. (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales) IV. Protection from photodynamic damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 20(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80145-Y](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80145-Y)
- Halim, R., & Webley, P. A. (2015). Nile Red Staining for Oil Determination in Microalgal Cells: A New Insight through Statistical Modelling. *International Journal of Chemical Engineering*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/695061>
- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., & Yan, Y. (2018). Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *Fermentation*, 4(2), 25. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020025>
- Hanada, K., Hase, T., Toyoda, T., Shinozaki, K., & Okamoto, M. (2011). Origin and evolution of genes related to ABA metabolism and its signaling pathways. *Journal of Plant Research*, 124(4), 455–465. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0431-0>
- Horváth, E., Szalai, G., & Janda, T. (2007). Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 290–300. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9017-4>
- Hoyerová, K., & Hošek, P. (2020). New Insights Into the Metabolism and Role of Cytokinin N-Glucosides in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11, p. 741). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00741>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Hunt, R. W., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., & Das, K. C. (2010). Effect of Biochemical Stimulants on Biomass Productivity and Metabolite Content of the Microalga, *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(8), 2400–2414. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9012-2>
- Jacob-Lopes, E., Queiroz, M. I., & Zepka, L. Q. (2020). Pigments from Microalgae Handbook. In *Pigments from Microalgae Handbook*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2>
- Jia, J., Han, D., Gerken, H. G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., & Xu, J. (2015). Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research*, 7, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.005>
- Jirásková, D., Poulíčková, A., Novák, O., Sedláková, K., Hradecká, V., & Strnad, M. (2009).

- High-Throughput Screening Technology For Monitoring Phytohormone Production In Microalgae. *Journal of Phycology*, 45(1), 108–118. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00615.x>
- Karim, A., Islam, M. A., Khalid, Z. Bin, Faizal, C. K. M., Khan, M. M. R., & Yousuf, A. (2020). Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 129–147). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00009-6>
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., & Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0155-0>
- Kim, J. H., Lim, J. I., & Park, H.-K. (2013). Porous chitosan-based adhesive patch filled with poly(L-3,4-dihydroxyphenylalanine) as a transdermal drug-delivery system. *Journal of Porous Materials*, 20(1), 177–182. <https://doi.org/10.1007/s10934-012-9587-9>
- Kirk, J. T. O., & Tilney-Bassett, R. A. E. (1978). *The Plastids, Their Chemistry, Structure, Growth, and Inheritance*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. <https://doi.org/10.1126/science.157.3793.1163>
- Kiseleva, A. A., Tarachovskaya, E. R., & Shishova, M. F. (2012). Biosynthesis of phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(5), 595–610. <https://doi.org/10.1134/S1021443712050081>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Koutra, E., Tsafarakidou, P., Sakarika, M., & Kornaros, M. (2020). Microalgal Biorefinery. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 163–185). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00011-4>
- La Roche, J., Van Der Staay, G. W. M., Partensky, F., Ducret, A., Aebersold, R., Li, R., Golden, S. S., Hiller, R. G., Wrench, P. M., Larkum, A. W. D., & Green, B. R. (1996). Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15244–15248. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15244>
- Larkum, A. W. (2016). Photosynthesis and Light Harvesting in Algae BT - *The Physiology of Microalgae* (M. A. Borowitzka, J. Beardall, & J. A. Raven (eds.); pp. 67–87). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_3)
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lenka, S. K., Carbonaro, N., Park, R., Miller, S. M., Thorpe, I., & Li, Y. (2016). Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1046–1063. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.004>
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., ... Ohlrogge, J. (2013). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book*, 11, e0161–e0161. <https://doi.org/10.1199/tab.0161>
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., Hu, Q., & Xu, J. (2014). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *The Plant Cell*, 26(4), 1645 LP – 1665. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., Kuo, M.-H., &

- Benning, C. (2012). A Galactoglycerolipid Lipase Is Required for Triacylglycerol Accumulation and Survival Following Nitrogen Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(11), 4670 LP – 4686. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105106>
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., & Hu, Q. (2008). Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 165(17), 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
- Liaaen-Jensen, S. (1998). Biosynthesis and Metabolism. *Carotenoids in Food Chain*; Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., Eds, 359–371.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y., Cui, M., Yin, Y., Li, B., Wang, M., Meng, C., & Gao, Z. (2018). Plant growth regulators promote lipid and carotenoid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1549–1561. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1350-9>
- Liu, B., & Benning, C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.008>
- Liu, J., Qiu, W., & Song, Y. (2016). Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Research*, 18, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.027>
- Lu, Y., Tarkowská, D., Turečková, V., Luo, T., Xin, Y., Li, J., Wang, Q., Jiao, N., Strnad, M., & Xu, J. (2014). Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. *The Plant Journal*, 80(1), 52–68. <https://doi.org/10.1111/tpj.12615>
- Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in Plant Science*, 20(5), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Marks, G. S. (1966). The biosynthesis of heme and chlorophyll. *The Botanical Review*, 32(1), 56–94. <https://doi.org/10.1007/BF02858585>
- Matos, Â. P. (2019). Microalgae as a Potential Source of Proteins. In *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816695-6.00003-9>
- Mayfield, S. P., Manuell, A. L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., & Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Mehta, P., Singh, D., Saxena, R., Rani, R., Gupta, R. P., Puri, S. K., & Mathur, A. S. (2018). High-Value Coproducts from Algae—An Innovative Way to Deal with Advance Algal Industry BT - *Waste to Wealth* (R. R. Singhanian, R. A. Agarwal, R. P. Kumar, & R. K. Sukumaran (eds.); pp. 343–363). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_15)
- Mir, Y., Brakez, Z., Alem, Y. El, & Bazzi, L. (2020). Investigation of lipid production and fatty

- acid composition in some native microalgae from Agadir region in Morocco. *19*(10), 754–762. <https://doi.org/10.5897/AJB2020.17230>
- Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2007). Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *49*(5), 800–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02996.x>
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
- Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, *7*(7), 957 LP – 970. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.957>
- Ördög, V., Stirk, W. A., Van Staden, J., Novák, O., & Strnad, M. (2004). Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *Journal of Phycology*, *40*(1), 88–95. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03046.x>
- Piotrowska-Niczyporuk, A., & Bajguz, A. (2014). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation*, *73*(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7>
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Kotowska, U., Bralska, M., & Talarek-Karwel, M. (2018). Growth, Metabolite Profile, Oxidative Status, and Phytohormone Levels in the Green Alga *Acutodesmus obliquus* Exposed to Exogenous Auxins and Cytokinins. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*(4), 1159–1174. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9816-9>
- Piotrowska, A., & Czerpak, R. (2009). Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*(3), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0267-y>
- Pocock, T. H., Koziak, A., Rosso, D., Falk, S., & Hüner, N. P. A. (2007). *Chlamydomonas raudensis* (UWO 241), Chlorophyceae, exhibits the capacity for rapid D1 repair in response to chronic photoinhibition at low temperature. *Journal of Phycology*, *43*(5), 924–936. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00380.x>
- Porra, R. J. (1997). Recent Progress in Porphyrin and Chlorophyll Biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, *65*(3), 492–516. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08596.x>
- Renuka, N., Guldhe, A., Singh, P., & Bux, F. (2018). Combined effect of exogenous phytohormones on biomass and lipid production in *Acutodesmus obliquus* under nitrogen limitation. *Energy Conversion and Management*, *168*, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.05.029>
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, *89*(1), 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Rüdiger, W. (2002). Biosynthesis of chlorophyll b and the chlorophyll cycle. *Photosynthesis Research*, *74*(2), 187–193. <https://doi.org/10.1023/A:1020959610952>
- Sakakibara, H. (2006). CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Salama, E. S., Jeon, B. H., Chang, S. W., Lee, S. hun, Roh, H. S., Yang, I. S., Kurade, M. B., El-Dalatony, M. M., Kim, D. H., Kim, K. H., & Kim, S. (2017). Interactive effect of indole-3-acetic acid and diethyl aminoethyl hexanoate on the growth and fatty acid content of some microalgae for biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, *168*, 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.057>



- Salama, E. S., Kabra, A. N., Ji, M. K., Kim, J. R., Min, B., & Jeon, B. H. (2014). Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresource Technology*, 172, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.002>
- Samarakoon, K., & Jeon, Y.-J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Research International*, 48(2), 948–960. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.013>
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532–1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Sheih, I.-C., Fang, T. J., Wu, T.-K., & Lin, P.-H. (2010). Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1202–1207. <https://doi.org/10.1021/jf903089m>
- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., & Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 665–676. <https://doi.org/10.1128/EC.00363-12>
- Smith, J. H. C. (1960). Protochlorophyll transformations. *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems*. Academic Press, New York, 257–277.
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., & Mayfield, S. (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32(10), 1373–1383. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>
- Stack, J., Le Gouic, A. V, & FitzGerald, R. J. (2020). Bioactive Proteins and Peptides from Microalgae. In *Encyclopedia of Marine Biotechnology* (pp. 1443–1474). <https://doi.org/doi:10.1002/9781119143802.ch61>
- Stirk, W A, Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Turečková, V., Strnad, M., Ördög, V., & van Staden, J. (2014). Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.005>
- Stirk, Wendy A, Ördög, V., Novák, O., Ročík, J., Strnad, M., Bálint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *Journal of Phycology*, 49(3), 459–467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Stirk, Wendy A, & van Staden, J. (2020). Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 44(August), 107612. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107612>
- Stirk, Wendy A, van Staden, J., Novák, O., Doležal, K., Strnad, M., Dobrev, P. I., Sipos, G., Ördög, V., & Bálint, P. (2011). Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle. *Journal of Phycology*, 47(2), 291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00952.x>
- Sztein, A. E., Cohen, J. D., Slovin, J. P., & Cooke, T. J. (1995). Auxin Metabolism in Representative Land Plants. *American Journal of Botany*, 82(12), 1514–1521. <https://doi.org/10.2307/2446179>
- Szyszkka, B., Ivanov, A. G., & Hüner, N. P. A. (2007). Psychrophily is associated with differential energy partitioning, photosystem stoichiometry and polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas raudensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(6), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.12.001>
- Takaichi, S., & Mochimaru, M. (2007). Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(19–20), 2607–2619. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7190-z>
- Takaichi, Shinichi. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>

- Takaichi, Shinichi. (2020). Carotenoids in Phototrophic Microalgae: Distributions and Biosynthesis BT - *Pigments from Microalgae Handbook* (E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (eds.); pp. 19–41). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_2)
- Takaichi, Shinichi, & Mirauro, M. (1998). Distribution and geometric isomerism of neoxanthin in oxygenic phototrophs: 9'-cis, a sole molecular form. *Plant and Cell Physiology*, 39(9), 968–977. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029461>
- Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. 24(39), 43–54. <https://doi.org/10.19053/01211129.3550>
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2016). Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3575–3585. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0863-y>
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., & Graham, I. A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1), 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00201-7)
- Tsai, C.-H., Warakanont, J., Takeuchi, T., Sears, B. B., Moellering, E. R., & Benning, C. (2014). The protein Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44), 15833 LP – 15838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414567111>
- Umen, J. G. (2014). Green Algae and the Origins of Multicellularity in the Plant Kingdom. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(11), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016170>
- Ummalyma, S. B., Sahoo, D., & Pandey, A. (2020). Microalgal Biorefineries for Industrial Products. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 187–195). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00012-6>
- van den Hoek, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: an introduction to phycology.*: Cambridge University Press, Cambridge. 1995, pp. xiv 623. ISBN: 0 521 30419 9. <https://doi.org/10.1017/S096702629621100X>
- Von Wettstein, D., Gough, S., & Kannangara, C. G. (1995). Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7), 1039–1057. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1039>
- Wase, N., Tu, B., Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2015). Phenotypic screening identifies Brefeldin A/Ascotoxin as an inducer of lipid storage in the algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 11, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.002>
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Is a Multifunctional Enzyme Involved in Membrane Lipid Turnover and Degradation While Synthesizing Triacylglycerol in the Unicellular Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(9), 3708 LP – 3724. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100701>
- Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K., & Miyamoto, K. (2003). Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, 26(3), 451–457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00976.x>
- Yu, Z., Song, M., Pei, H., Jiang, L., Hou, Q., Nie, C., & Zhang, L. (2017). The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae. *Bioresource Technology*, 239, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.120>

- Zheng, W., Chen, C., Wang, Y., Bao, K., Wang, X., & Chu, C. (2005). Effects of potassium iodide on the growth and metabolite accumulation of two planktonic diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 17(4), 355–362. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-8005-y>
- Žižková, E., Kubeš, M., Dobrev, P. I., Přibyl, P., Šimura, J., Zahajská, L., Drábková, L. Z., Novák, O., & Motyka, V. (2017). Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. *Annals of Botany*, 119(1), 151–166. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw194>