



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

INGENIERÍA METABÓLICA DE *Dunaliella salina* PARA LA  
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR AGREGADO  
APLICABLES A LA INDUSTRIA.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**Mónica Bettina Félix Castro**

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2024.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 27 del Mes de noviembre del 2024. se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Ingeniería Metabólica de *Dunaliella salina* para la producción de compuestos de alto valor agregado aplicables a la industria"**

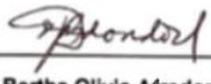
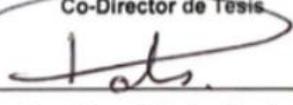
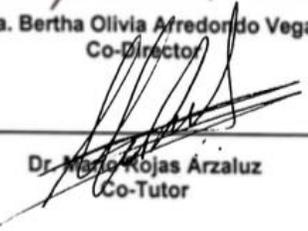
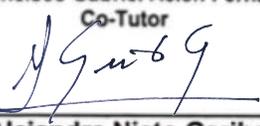
Presentada por el alumno:

**Mónica Bettina Félix Castro**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

 _____ Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro Co-Director de Tesis	 _____ Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega Co-Director
 _____ Dra. Elena Palacios Mechetnov Co-Tutor	 _____ Dr. Mario Rojas Árzaluz Co-Tutor
 _____ Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández Co-Tutor	
 _____ Dra. Alejandra Nieto Garibay, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 04 de diciembre de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Mónica Bettina Félix Castro del Programa de Doctorado en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
Ithenticate
- Filtros utilizados:
- Citas excluidas, bibliografía excluida, Metodología excluida
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

**INGENIERÍA METABÓLICA DE *Dunaliella salina* PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR AGREGADO APLICABLES A LA INDUSTRIA**

INFORME DE ORIGINALIDAD

**16%**

INDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	746 palabras — 4%
2	<a href="http://docslib.org">docslib.org</a> Internet	282 palabras — 2%
3	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Internet	244 palabras — 1%
4	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	240 palabras — 1%
5	<a href="http://eprints.uanl.mx">eprints.uanl.mx</a> Internet	204 palabras — 1%
6	<a href="http://vdocuments.es">vdocuments.es</a> Internet	96 palabras — 1%
7	<a href="http://aprenderly.com">aprenderly.com</a> Internet	74 palabras — < 1%
8	<a href="http://cicese.repositorioinstitucional.mx">cicese.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	46 palabras — < 1%
9	<a href="http://kipdf.com">kipdf.com</a> Internet	41 palabras — < 1%

**Co-directoras de Tesis**

  
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

  
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

**Personal técnico de asesoría en el análisis**

  
M. C. Ana María Talamantes Cota

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.  
Co-Tutora de Tesis

Dr. Mario Rojas Arzaluz  
Universidad Autónoma de Baja California Sur  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández  
Universidad de Almería  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dr. Mario Rojas Arzaluz  
Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández

### **Jurado de Examen**

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega  
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dr. Mario Rojas Arzaluz  
Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández

### **Suplentes**

Dra. Lourdes Morquecho Escamilla  
Dra. Elizabeth Monreal Escalante

## Resumen

*Dunaliella salina* es una microalga verde halotolerante la cual, al cultivarse en condiciones de estrés como deficiencia de nutrientes, elevada intensidad luminosa, temperatura y salinidad, acumula una elevada concentración del pigmento  $\beta$ -caroteno, así como lípidos y carbohidratos, los cuales tienen aplicación en diversas industrias como la alimenticia, cosmética y energética. En este trabajo se evaluaron dos condiciones de cultivo en la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29: una condición control con suficiencia de nitrógeno (1.6 mM  $\text{NaNO}_3$ ), baja intensidad luminosa (150  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja temperatura (25 °C), y una condición de estrés con deficiencia total de nitrógeno, elevada intensidad luminosa (300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y alta temperatura (30 °C) y su efecto en el crecimiento, perfil bioquímico y niveles de expresión relativa de genes relacionados con la síntesis de  $\beta$ -caroteno (fitoeno sintasa PSY, licopeno  $\beta$ -ciclasea LCYb), lípidos (acetil-CoA carboxilasa ACC, acetil-CoA sintetasa ACS) y carbohidratos (glicerol-6-fosfato isomerasa GPI y piruvato quinasa alfa PKa). Los datos fueron tratados estadísticamente mediante un ANOVA bifactorial ( $p < 0.05$ ) para evaluar diferencias entre tratamientos. La condición de estrés provocó en la cepa de *D. salina* CIBA-29 una disminución respecto al control en la concentración celular ( $3.30 \pm 2.98 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ ), en los niveles de clorofila *a* ( $3.14 \pm 0.49 \text{ pg cel}^{-1}$ ), clorofila *b* ( $1.01 \pm 0.14 \text{ pg cel}^{-1}$ ) y violaxantina ( $0.10 \pm 0.01 \text{ pg cel}^{-1}$ ), en el porcentaje de lípidos totales ( $11.31 \pm 0.20\%$ ) y de proteínas totales ( $12.26 \pm 1.48\%$ ), sin embargo, indujo un aumento en la concentración de  $\beta$ -caroteno ( $9.70 \pm 0.97 \text{ pg cel}^{-1}$ ), de carbohidratos totales ( $60.37 \pm 1.55\%$ ), así como en los ácidos grasos 16:0 ( $163.46 \pm 3.61 \text{ mg g}^{-1}$ ), 18:1 $\omega$ 9 ( $131.49 \pm 8.37 \text{ mg g}^{-1}$ ), 18:1 $\omega$ 7 ( $20.19 \pm 0.39 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 18:2 $\omega$ -6 ( $85.68 \pm 2.1 \text{ mg g}^{-1}$ ). En cuanto a los niveles de expresión relativa, se presentó un incremento en la condición de estrés respecto al control para los genes PSY, LCYb y ACS, y una disminución en los genes ACC, GPI y PKa. La condición de estrés evaluada provocó en la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29 un aumento en la síntesis de compuestos de valor agregado como  $\beta$ -caroteno, carbohidratos y ácidos grasos, lo que muestra el potencial biotecnológico de esta cepa y su posible aplicación industrial. Por último, se evaluó en la cepa de *D. salina* BEA 0001 una estrategia de producción de biomasa en cultivo con deficiencia de nitrógeno ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), elevada intensidad luminosa (400  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y acetato de sodio (20 mM) como fuente de carbono orgánico obteniendo un aumento en la actividad fotosintética (Fv/Fm), en la absorbancia a 450, 680 y 750 nm y una disminución en el porcentaje de lípidos ( $7.37 \pm 0.76\%$ ) y proteínas ( $17.66 \pm 0.66\%$ ). Sin embargo, no se observó aumento en la concentración de  $\beta$ -caroteno.

**Palabras clave:** *Dunaliella salina*, composición bioquímica,  $\beta$ -caroteno, luteína, qPCR.

ORCID: 0000-0002-3158-1173

Vo.Bo. Co-Director de Tesis



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

## Summary

*Dunaliella salina* is a green halotolerant microalga which under environmental stress conditions like nutrient deficiency, high light intensity, temperature and salinity can accumulate high levels of the pigment  $\beta$ -carotene, as well as lipids and carbohydrates. These compounds have applications in food, cosmetic and energetic industries. In this study two culture conditions were evaluated in the native strain of *D. salina* CIBA-29 and their effect on the biochemical profile and the expression of genes related to the synthesis of high value compounds: control condition had nitrogen sufficiency (1.6 mM  $\text{NaNO}_3$ ), low light intensity ( $150 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and low temperature (25 °C), and stress condition had total nitrogen deficiency, high light intensity ( $300 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and high temperature (30 °C). Gene expression analysis was evaluated via qPCR for genes related to the synthesis of  $\beta$ -carotene (Phytoene synthase PSY, lycopene  $\beta$ -cyclase LCYb), lipids (acetyl-CoA carboxylase ACC, acetyl-CoA synthetase ACS), and carbohydrates (glycerol-6-phosphate isomerase GPI, pyruvate kinase alpha PKa). An ANOVA was performed to determine significant differences between treatments. In native strain of *D. salina* CIBA-29 stress conditions decreased cell concentration ( $3.30 \pm 2.98 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ ), chlorophyll *a* ( $3.14 \pm 0.49 \text{ pg cel}^{-1}$ ), *b* ( $1.01 \pm 0.14 \text{ pg cel}^{-1}$ ), violaxanthin ( $0.10 \pm 0.01 \text{ pg cel}^{-1}$ ), total lipid percentage ( $11.31 \pm 0.20\%$ ) and proteins ( $12.26 \pm 1.48\%$ ) compared to controls, however, it significantly increased  $\beta$ -carotene concentrations ( $9.70 \pm 0.97 \text{ pg cel}^{-1}$ ) as well as total carbohydrates percentage ( $60.37 \pm 1.55\%$ ) and the concentration of 16:0 ( $163.46 \pm 3.61 \text{ mg g}^{-1}$ ), 18:1 $\omega$ 9 ( $131.49 \pm 8.37 \text{ mg g}^{-1}$ ), 18:1 $\omega$ 7 ( $20.19 \pm 0.39 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 18:2 $\omega$ -6 ( $85.68 \pm 2.1 \text{ mg g}^{-1}$ ) fatty acids. For gene expression analysis, there was upregulation of PSY, LCYb, and ACS, and downregulation of ACC, GPI, and PKa in stress condition compared to control. The stress condition evaluated caused in the native strain of *D. salina* CIBA-29 an increase in the synthesis of added value compounds such as  $\beta$ -carotene, carbohydrates and fatty acids, which shows the biotechnological potential of this strain and its industrial application. Lastly, a biomass production strategy in *D. salina* strain BEA 0001 was established with nitrogen deficiency ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), high light intensity ( $400 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and sodium acetate (20 mM) as organic carbon source with an increase in photosynthetic activity ( $F_v/F_m$ ), in absorbance at 450, 680 and 750 nm, and a decrease in the percentage of total lipids ( $7.37 \pm 0.76\%$ ) and proteins ( $17.66 \pm 0.66\%$ ). However, no increase in  $\beta$ -carotene content was observed.

**Keywords:** *Dunaliella salina*,  $\beta$ -carotene, lutein, qPCR

ORCID: 0000-0002-3158-1173

Vo.Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

**Dedicatoria**

“A Bernardo por su amor incondicional y a Oliver, el hombrecito de mi vida, que soportó las ausencias de mamá como un valiente y la recibió en cada regreso con alegría y sin reproches”

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de doctorado otorgada (No. CVU: 628766).

Al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Laboratorio de Alimento Vivo, Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, Laboratorio de Algas Nocivas, Laboratorio de Análisis Químico del Agua y al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería por su apoyo y permitirme formar parte de sus equipos de trabajo.

A mi comité tutorial, mis co-directoras Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega y Dra. Gracia Gómez Anduro, por su guía, apoyo y consejos. Su calidez humana y excelencia como investigadoras son mi ejemplo por seguir en este camino académico. A mis tutores Dra. Elena Palacios Mechetnov, Dr. Mario Rojas Arzaluz y Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández, cuyo apoyo y consejos no sólo dieron forma a este trabajo, dieron forma a la investigadora que aspiro ser.

A los técnicos de laboratorio, Dr. Julio Hernández González, M. en C. Olivia Arjona López, Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval, I. B. Q. Celina Beltrán Camacho, por compartir sus conocimientos y su apoyo en la realización de esta investigación.

A mis compañeras de doctorado, Ailed, Odette y Maggie, con quienes, a pesar de iniciar en medio de una pandemia, logramos formar vínculos de amistad y apoyo durante esta etapa.

A mi familia y amigos, cuyo apoyo fue crucial durante los años de realización de este proyecto. Y especialmente a mi pequeño gran equipo, Bernardo y Oliver para quienes son todos mis logros.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 <i>Dunaliella salina</i> .....	3
2.2 Producción de compuestos de valor agregado en <i>D. salina</i> .....	4
2.2.1 $\beta$ -caroteno .....	4
2.2.2 Lípidos.....	7
2.2.3 Carbohidratos .....	9
2.3 Aplicación comercial de <i>D. salina</i> .....	11
2.4 Biorrefinería de microalgas .....	12
2.5 Sistemas de cultivo a escala industrial .....	13
<b>3.JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>4.HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>5.OBJETIVOS</b> .....	17
5.1 Objetivo general .....	17
5.2 Objetivos particulares .....	17
<b>6.MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	18
6.1 Material biológico y condiciones de cultivo .....	18
6.2 Concentración celular.....	19
6.3 Consumo de nitrógeno (NO <sub>3</sub> ) .....	20
6.4 Análisis de expresión .....	20
6.4.1 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos .....	20
6.4.2 Extracción de ARN .....	21
6.4.3 Tratamiento con ADNasa.....	22
6.4.4 Síntesis de ADNc.....	22
6.4.5 Curvas de amplificación y eficiencia.....	23
6.4.6 Análisis de expresión mediante qPCR .....	24
6.5 Perfil bioquímico .....	26
6.5.1 Extracción y cuantificación de pigmentos .....	26
6.5.2 Extracción y cuantificación de lípidos totales .....	27
6.5.3 Extracción y cuantificación de ácidos grasos.....	28
6.5.4 Extracción y cuantificación de carbohidratos totales .....	29
6.5.5 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	30
6.6 Estrategia de producción de biomasa .....	30
6.6.1 Determinación de fotosíntesis neta .....	32
6.6.2 Consumo de nitrógeno .....	33
6.6.3 Productividad de biomasa y estado del cultivo.....	34

6.6.4 Perfil bioquímico .....	35
6.7 Análisis estadísticos.....	35
<b>7.RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
7.1 Concentración celular.....	36
7.2 Consumo de nitrógeno (NO <sub>3</sub> ).....	36
7.3 Análisis de expresión .....	37
7.3.1 Diseño de oligonucleótidos .....	37
7.3.2 Curvas de amplificación y eficiencia.....	37
7.3.3 Análisis de expresión mediante qPCR .....	40
7.4 Perfil bioquímico .....	41
7.4.1 Perfil de pigmentos.....	41
7.4.2 Lípidos totales.....	45
7.4.3 Ácidos grasos .....	45
7.4.4 Carbohidratos totales .....	48
7.4.5 Proteínas totales.....	48
7.5 Estrategia de producción de biomasa .....	49
7.5.1 Fotosíntesis neta.....	49
7.5.2 Consumo de nitrógeno .....	50
7.5.3 Productividad de biomasa y estado del cultivo.....	51
7.5.4 Perfil bioquímico.....	54
<b>8.DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>9.CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>10.LITERATURA CITADA.....</b>	<b>67</b>
<b>11.ANEXOS .....</b>	<b>76</b>
Anexo A. Artículo publicado. Synthesis of $\beta$ -carotene in <i>Dunaliella</i> : From genome analysis to metabolic engineering.....	76
Anexo B. Artículo sometido. Carotenoids production in native Mexican strain of <i>Dunaliella salina</i> : A molecular approach.....	86

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ruta metabólica para la síntesis de carotenoides en <i>Dunaliella</i> . <b>PSY</b> (Fitoeno sintasa), <b>PDS</b> (Fitoeno desaturasa), <b>ZDS</b> ( $\zeta$ -caroteno desaturasa), <b>LCY-E</b> (Licopeno $\varepsilon$ -ciclasa), <b>LCY-B</b> (Licopeno $\beta$ -ciclasa), <b>EHY</b> ( $\varepsilon$ -caroteno hidroxilasa), <b>BHY</b> ( $\beta$ -caroteno hidroxilasa), <b>ZEP</b> (zeaxantina epoxidasa). (Modificado de Henríquez et al., 2016). .....	6
<b>Figura 2.</b> Síntesis de ácidos grasos en microalgas simplificada. <b>ACC</b> (Acetil-CoA carboxilasa), <b>ACP</b> (Proteína acarreadora de acil), <b>LACS</b> (Acil-CoA sintetasa de cadena larga), <b>DGAT</b> (Diacilglicerol aciltransferasa), <b>FAS</b> (Sintasa de ácidos grasos), <b>FAT</b> (ACP tioesterasa de ácidos grasos), <b>G3P</b> (glicerato-3-fosfato), <b>GPAT</b> (Glicerol-3-fosfato aciltransferasa), <b>KAS</b> (3-fosfatidilcolina aciltransferasa), <b>PDC</b> (Complejo de piruvato deshidrogenasa), <b>TAG</b> (Triacilglicerol). (Modificado de Bellou et al., 2014). .....	9
<b>Figura 3.</b> Biosíntesis de carbohidratos en microalgas. <b>G3P</b> (gliceraldehido-3-fosfato), <b>RuBP</b> (ribulosa-1,5-bifosfato), <b>3-PGA</b> (fosfoglicerato) (Modificado de Botelho-Moreira et al., 2022 y de Carvalho Silvello et al., 2022). .....	11
<b>Figura 4.</b> Fotobiorreactores del departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería. a) Raceway. b) Fotobioreactor tubular horizontal. c) Capa fina, cascada. Fotografías proporcionadas por M. en C. Sílvia Villaró Cos.....	14
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo de la metodología.....	19
<b>Figura 6.</b> Estrategia de producción de biomasa.....	32
<b>Figura 7.</b> Crecimiento celular en cultivo control y estrés. Barras indican DE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	36
<b>Figura 8.</b> Niveles de expresión relativa en el cultivo de estrés respecto al control. a) Fitoeno sintasa (PSY). b) Licopeno $\beta$ -ciclasa (LCYb). c) Acetil CoA Carboxilasa (ACC). d) Acetil CoA sintetasa (ACS). e) Glicerol 6-fosfato isomerasa (GPI). f) Piruvato quinasa alfa (PKa). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA $p < 0.05$ . .....	41
<b>Figura 9.</b> Contenido de $\beta$ -caroteno en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	42
<b>Figura 10.</b> Contenido de luteína en control y cultivo con estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	42
<b>Figura 11.</b> Contenido de clorofila <i>a</i> en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	43
<b>Figura 12.</b> Contenido de clorofila <i>b</i> en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	44
<b>Figura 13.</b> Contenido de violaxantina en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	44
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de lípidos totales en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	45
<b>Figura 15.</b> Concentración en $\text{mg g}^{-1}$ de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. C (control), E (Estrés). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	46
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de carbohidratos totales respecto al peso seco en cultivo control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ .o.....	48
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de proteínas totales en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . .....	49

<b>Figura 18.</b> Tasa de fotosíntesis neta. ....	50
<b>Figura 19.</b> Consumo de nitrógeno. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. T0 a T7 ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . A partir del T8 a T16 se usó un ANOVA unifactorial $p < 0.05$ . ....	50
<b>Figura 20.</b> Determinación de peso seco en T0 y T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA $p < 0.05$ . ....	51
<b>Figura 21.</b> Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . ....	52
<b>Figura 22.</b> Valores de absorbancia a 450 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . ....	52
<b>Figura 23.</b> Valores de absorbancia a 680 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . ....	53
<b>Figura 24.</b> Valores de absorbancia a 750 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial $p < 0.05$ . ....	53
<b>Figura 25.</b> Porcentaje total en peso seco de lípidos, carbohidratos y proteínas totales en T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA $p < 0.05$ . ....	54
<b>Figura 26.</b> Concentración en $\text{ng mL}^{-1}$ de pigmentos en T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA $p < 0.05$ . ....	56
<b>Figura 27.</b> Estrategia de cultivo para <i>D. salina</i> CIBA-29 en la ciudad de La Paz B. C. S. ....	64
<b>Figura 28.</b> Efecto de la deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura en <i>D. salina</i> CIBA-29. Barras verdes indican cultivo control, rojas cultivo en estrés. Flechas azules indican concentración bioquímica. Flecha punteada roja indica análisis de expresión relativa. ...	65

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Mezcla de reacción para tratamiento con ADNasa.....	22
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción para síntesis de ADNc.....	22
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para síntesis de ADNc.....	23
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para PCR .....	24
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de reacción para qPCR.....	25
<b>Tabla 6.</b> Concentración de nitratos ( $\mu\text{M}$ ) en control y estrés.....	37
<b>Tabla 7.</b> Amplificación, valor de $R^2$ y porcentaje de eficiencia. ....	37
<b>Tabla 8.</b> Evaluación de estructuras secundarias y especificidad. ....	38
<b>Tabla 9.</b> Concentración en $\text{mg g}^{-1}$ de ácidos grasos en control y estrés.....	47
<b>Tabla 10.</b> Perfil de ácidos grasos en $\text{mg g}^{-1}$ de <i>D. salina</i> BEA-0001 B en T16. ....	55

## 1. INTRODUCCIÓN

*Dunaliella salina* es una microalga verde halotolerante, reconocida por su capacidad de sintetizar compuestos de valor agregado como  $\beta$ -caroteno, lípidos y carbohidratos. Estos compuestos son esenciales para la sobrevivencia de esta microalga en los ambientes hipersalinos en los cuales prolifera. Presentan aplicaciones potenciales en diversas industrias como la alimenticia, cosmética y biocombustibles. La acumulación de estos metabolitos está influenciada por estresores ambientales como la intensidad luminosa, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes (Mai et al., 2017; Wu et al., 2017; Molino et al., 2018).

El  $\beta$ -caroteno es un pigmento liposoluble, potente antioxidante y precursor de la vitamina A (retinol). Presenta diversos beneficios a la salud como: protección de la córnea, antienviejamiento, anticáncer, modulación del sistema inmune y prevención de enfermedades cardiovasculares (Chew et al., 2017, Elleuch et al., 2019; Tang et al., 2020). En condiciones de estrés, *D. salina* puede acumular entre el 10 y 14% de su peso seco de  $\beta$ -caroteno (Ramos et al., 2011; Lv et al., 2016). Las vías genéticas y metabólicas involucradas en la biosíntesis de carotenoides han sido reportadas, revelando enzimas clave y mecanismos regulatorios blanco para incrementar su producción (Ye y Jiang, 2008; Xu et al., 2018).

La biomasa de *D. salina* también es una valiosa fuente de lípidos, los cuales se ha reportado sintetiza hasta un 55% de su peso seco en condiciones de hipersalinidad (Wu et al., 2017). Estos compuestos son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son adecuados tanto para la producción de biodiesel como en la fabricación de suplementos (El-Ayouty et al., 2015). Los carbohidratos representan otra clase importante de compuestos producidos por *D. salina* pueden representar hasta el 30% de su peso seco y están involucrados en el mantenimiento de la estructura celular microalgal, en el ajuste osmótico y la homeostasis. Presentan propiedades antitumorales, bioestimulantes y antimicrobianas (Monte et al., 2020; Shetty et al., 2019). Actualmente, la biomasa de *D. salina* se produce de manera industrial como polvo seco, sin ningún procesamiento para la recuperación y purificación de compuestos de valor agregado (Monte et al., 2020).

Comprender cómo influyen los factores ambientales y los mecanismos genéticos en la producción de compuestos de valor agregado en *D. salina*, permitirá optimizar las estrategias de cultivo con enfoque de biorrefinería en favor de incrementar el rendimiento de la biomasa, así como su viabilidad comercial.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* es una especie de microalga verde perteneciente a la familia Dunaliellaceae, Orden: Chlamydomonadales, Clase: Chlorophyceae y Género: *Dunaliella*. La forma de las células es en su mayoría simétricas radialmente, en ocasiones simétrica bilateral, aplanadas, curvas dorsoventrales o ligeramente asimétricas. Tienen una longitud entre 2 a 28  $\mu\text{m}$  y 1 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Las especies del género *Dunaliella* se encuentran generalmente en todos los océanos y aguas interiores continentales, son el productor primario dominante en muchas lagunas y lagos hipersalinos; la distribución global de este género está relacionada a la tolerancia a un amplio rango de parámetros ambientales como salinidad, temperatura e irradiancia (Polle et al., 2020; Woyda-Ploszczyca y Rybak, 2021). Cuando las células son expuestas a altas concentraciones de sal, su morfología cambia de forma de pera a redonda. No cuentan con pared celular rígida, tienen una capa mucilaginosa que contiene glicoproteínas (150 KDa), lo que le permite a la célula variar su tamaño rápidamente ante el estrés salino. La forma vegetativa de las células de *D. salina* presenta dos flagelos de igual longitud, contiene un cloroplasto con un pirenoide central rodeado por almidón, otros organelos típicos son la mancha ocular anterior, núcleo y nucléolo, aparato de Golgi y vacuolas (Ben-Amotz, 2009).

*D. salina* es una de las fuentes más ricas de  $\beta$ -caroteno el cual actúa protegiendo a la célula del efecto dañino de la radiación excesiva, además acumula grandes cantidades de glicerol intracelular (>50% de su peso seco) para contrarrestar la elevada concentración osmótica extracelular en el medio de cultivo. Los lípidos de membrana de *D. salina* compensan la falta de pared celular con la presencia de una membrana celular elástica, mientras que los carbohidratos están involucrados en el ajuste osmótico y actúan como agentes protectores para la homeostasis (solutos osmoprotectores) (Ben-Amotz, 2009; Monte et al., 2020; Shetty et al., 2019).

Explorar la capacidad y productividad de cepas nativas de *D. salina*, así como optimizar las condiciones de cultivo para lograr maximizar la producción de metabolitos de interés biotecnológico, es todo un reto en campo de la ficología aplicada (Araj-Shirvani et al., 2024). Se

han encontrado y descrito alrededor del mundo diversas cepas nativas de *D. salina* las cuales presentan una gran diversidad genética y capacidad de adaptación a diferentes ambientes salinos extremos. Cepas aisladas en India, Chile, México, Australia, Israel, China y Tailandia han presentado características únicas que incrementan su potencial biotecnológico (Preetha et al., 2012; Olmos et al., 2009; Valencia et al., 2018; Wu et al., 2017). El cultivo de cepas nativas presenta múltiples ventajas: se encuentran adaptadas a su ambiente, el cual tiene un papel importante no solo en la estructura y forma de las comunidades microalgales, sino también en la producción de metabolitos, por lo que no serían necesarias adaptaciones para su cultivo al exterior; presentan una mayor tolerancia al estrés ambiental local como cambios en la temperatura y variaciones en la intensidad de la luz (Sharma y Rai, 2011; Bellou et al., 2014); son un recurso disponible, en caso de pérdidas en los cultivos los microorganismos pueden ser nuevamente aislados de su lugar de origen; además, su cultivo al exterior no representa un riesgo para el ecosistema ya que forman parte del mismo.

## **2.2 Producción de compuestos de valor agregado en *D. salina***

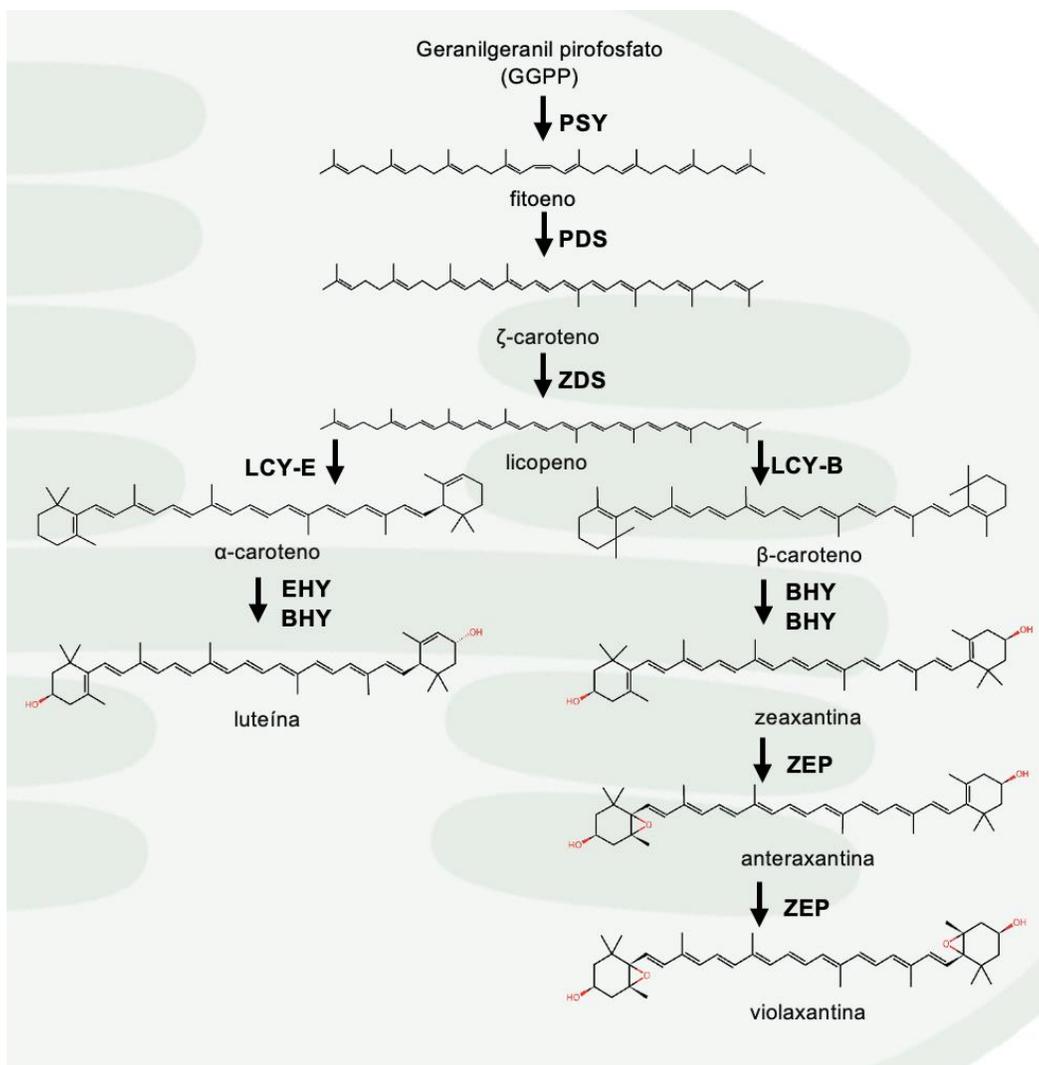
### **2.2.1 $\beta$ -caroteno**

Los carotenoides representan la clase más fascinante, abundante y ampliamente distribuida de pigmentos naturales (Jin y Polle, 2009), son isoprenoides conjugados sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, actúan como fotoprotectores, componentes estructurales integrales de los complejos pigmento-proteína y como pigmentos accesorios cosechadores de luz absorbiendo fotones y transfiriéndoles a las moléculas de clorofila (Jin y Polle, 2009; Harvey y Ben-Amotz, 2020). Existen dos clases principales de carotenoides naturales: los carotenos, que contienen átomos de carbono e hidrógeno ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, fitoeno y licopeno) y xantofilas, que contienen átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en su estructura molecular (Jin y Polle, 2009; Cezare-Gomes et al., 2019).

La biomasa de *D. salina* en condiciones de deficiencia de nitrógeno, elevada salinidad e intensidad luminosa sintetiza hasta el 14% de  $\beta$ -caroteno, el cual se acumula en glóbulos lipídicos en los espacios intratilacoidales en la periferia del cloroplasto (Ramos et al., 2011; Fu et al., 2012; Kim et al., 2023). El  $\beta$ -caroteno es un pigmento liposoluble formado por una cadena larga conjugada

de ocho isoprenos con un centro de simetría y un anillo  $\beta$ -ciclohexano en cada extremo (Elleuch et al., 2019). Es un potente antioxidante el cual se emplea como agente colorante alimenticio, como pro-vitamina A (retinol) en alimento humano y animal, así como aditivo en cosméticos, preparación de multivitamínicos y productos alimenticios saludables (Ye et al., 2008; Ben-Amotz, 2009). La función de los glóbulos de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* es de sombreado protegiendo a la célula contra el daño causado por la elevada intensidad de radiación actuando como protector solar, absorbiendo el exceso de radiación (Ben-Amotz, 2009).

Existen siete enzimas involucradas en la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en los organismos fotosintéticos: geranyl geranyl pirofosfato sintasa (GGPC), fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), 15-cis-zeta-caroteno isomerasa (ZISO), zeta-caroteno desaturasa (ZDS), prolicopeno isomerasa (CRTISO) y licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYb). Dos moléculas de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) son catalizadas por PSY para producir fitoeno de 40 carbonos; el fitoeno es convertido a licopeno por desaturasas e isomerasas, después LCYb cataliza el licopeno en  $\beta$ -caroteno. GGPP y LCYb se considera catalizan pasos clave de la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno (Fig. 1) (Henríquez et al., 2016; Zhu et al., 2020; Barbosa et al., 2023).



**Figura 1.** Ruta metabólica para la síntesis de carotenoides en *Dunaliella*. **PSY** (Fitoeno sintasa), **PDS** (Fitoeno desaturasa), **ZDS** ( $\zeta$ -caroteno desaturasa), **LCY-E** (Licopeno  $\epsilon$ -ciclasa), **LCY-B** (Licopeno  $\beta$ -ciclasa), **EHY** ( $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa), **BHY** ( $\beta$ -caroteno hidroxilasa), **ZEP** (zeaxantina epoxidasa). (Modificado de Henríquez et al., 2016).

Los genes que codifican para GGPS, PSY, PDS y LCYb han sido clonados y caracterizados molecularmente en *D. bardawil*, *D. parva* y *D. salina* (Zhu et al., 2020). Se ha estudiado el efecto de diferentes tipos de estrés ambiental como irradiancia, salinidad, deficiencia de nitrógeno y temperatura en la expresión de genes relacionados con la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *D. salina* (Sánchez-Estudillo et al., 2006, Ramos et al., 2008, Coesel et al., 2008, Zarandi-Miandoab et al., 2015; Elleuch et al., 2019; Zhu et al., 2020), *D. bardawil* (Rabbani et al., 1998; Lao et al., 2014; Liang et al., 2017) y *D. parva* (Shang et al., 2018).

### 2.2.2 Lípidos

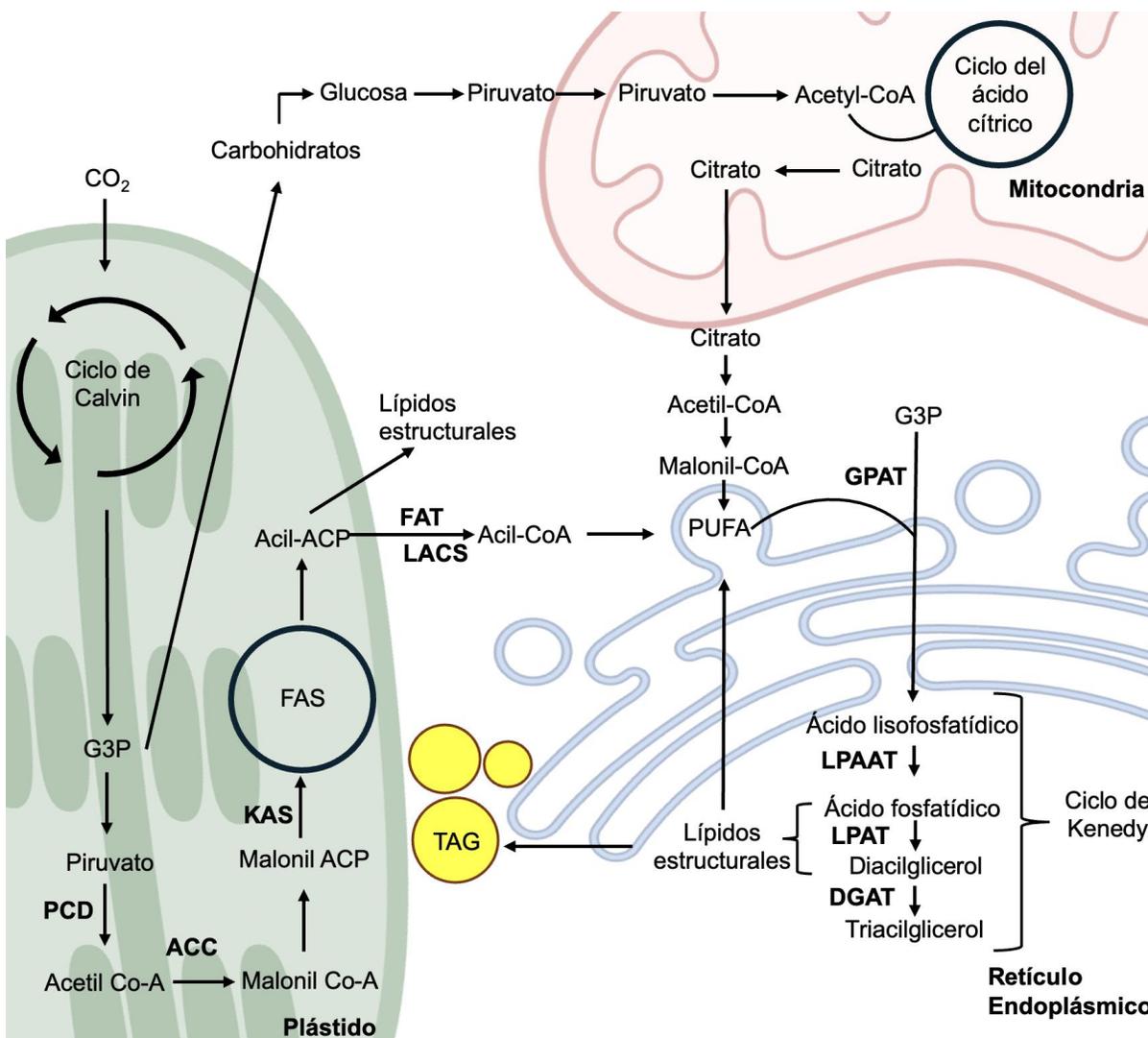
Las microalgas producen una gran variedad de compuestos lipídicos dentro de los cuales los más abundantes y mejor descritos son los glicolípidos. Estos se componen de una estructura de glicerol a la cual se unen uno, dos o más ácidos grasos. Se dividen en dos clases en base a sus funciones: de almacenamiento (triacilgliceroles) y estructurales (lípidos de membrana). Otras funciones de los lípidos es la osmorregulación mediante la síntesis de glicerol que ayuda a mantener la presión de turgencia en ambientes hipersalinos (Araj-Shirvani et al., 2024). Los ácidos grasos son uno de los mayores constituyentes de la biomasa microalgal la cual puede constituir entre el 5 y 60% del peso seco (Morales et al., 2021). La acumulación de lípidos está asociada a la deficiencia de nutrientes, particularmente de nitrógeno, temperatura e irradiancia lo que provoca cambios en el metabolismo hacia la síntesis de lípidos (Bellou et al., 2014; Mai et al., 2017). *D. salina* acumula grandes cantidades de ácidos grasos de los cuales cerca del 50% son mono o poliinsaturados, principalmente ácido palmítico (16:0), alfa linolénico (18:3) y ácido oleico (18:1) (Barbosa et al., 2023).

Se han identificado tres vías para la biosíntesis de lípidos en las microalgas verdes: (i) síntesis *de novo* directamente por la asimilación de CO<sub>2</sub> por medio del ciclo de Calvin, formación de acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa y su asimilación por el ciclo de síntesis de ácidos grasos (FAS); (ii) transferencia de grupo acil de los ácidos grasos a partir de lípidos polares; y (iii) síntesis a partir de la degradación de almidón (Pick y Avidan, 2017; Barbosa et al., 2023) (Fig. 2).

La síntesis de ácidos grasos inicia cuando la enzima acetil-CoA carboxilasa cataliza la carboxilación de acetil-CoA para producir malonil-CoA. Después, la enzima malonil-CoA:ACP transacilasa cataliza la formación de malonil-ACP a partir de malonil-CoA. Posteriormente, el complejo II de sintasas de ácidos grasos (FAS II) sintetiza ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Subsecuentemente, los ácidos grasos 16:0 y 18:0 son transportados al retículo endoplásmico y procesados a triacilgliceroles. En el retículo endoplásmico, acil-CoA y glicerol-3-fosfato son catalizados secuencialmente para generar triacilgliceroles mediante la acción de las enzimas 3-fosfoglicerol aciltransferasa, ácido lisofosfatídico aciltransferasa, ácido fosfatídico fosfatasa y diacilglicerol aciltransferasa, siendo esta última la enzima con la mayor síntesis de triacilgliceroles (Ran et al.,

2019; Shang et al., 2016; Song et al., 2024). La cadena de carbono se extiende por la adición de unidades de 2 carbonos, lo que consume una molécula de ATP y dos de NADPH cada vez que se adicionan 2 carbonos a la cadena. Los ácidos grasos 16:0 y 18:0 son catalizados por desaturasas y elongasas para formar los ácidos grasos poliinsaturados.

La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) es clave en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, su expresión ha sido estudiada en *D. salina* bajo condiciones de elevada salinidad (Gangali et al., 2019; He et al., 2020) y en cultivo adicionado con mioinositol (Talebi et al., 2014; Talebi et al., 2015). La enzima acetil-CoA sintetasa (ACS) sintetiza acetil-CoA a partir de acetato y sus niveles de expresión han sido reportados en cultivo con deficiencia de nitrógeno, elevada salinidad e irradiancia (Avidan y Pick, 2015; Liang et al., 2017).



**Figura 2.** Síntesis de ácidos grasos en microalgas simplificada. **ACC** (Acetil-CoA carboxilasa), **ACP** (Proteína acarreadora de acil), **LACS** (Acil-CoA sintetasa de cadena larga), **DGAT** (Diacilglicerol aciltransferasa), **FAS** (Sintasa de ácidos grasos), **FAT** (ACP tioesterasa de ácidos grasos), **G3P** (glicerato-3-fosfato), **GPAT** (Glicerol-3-fosfato aciltransferasa), **KAS** (3-fosfatidilcolina aciltransferasa), **PDC** (Complejo de piruvato deshidrogenasa), **TAG** (Triacilglicerol). (Modificado de Bellou et al., 2014).

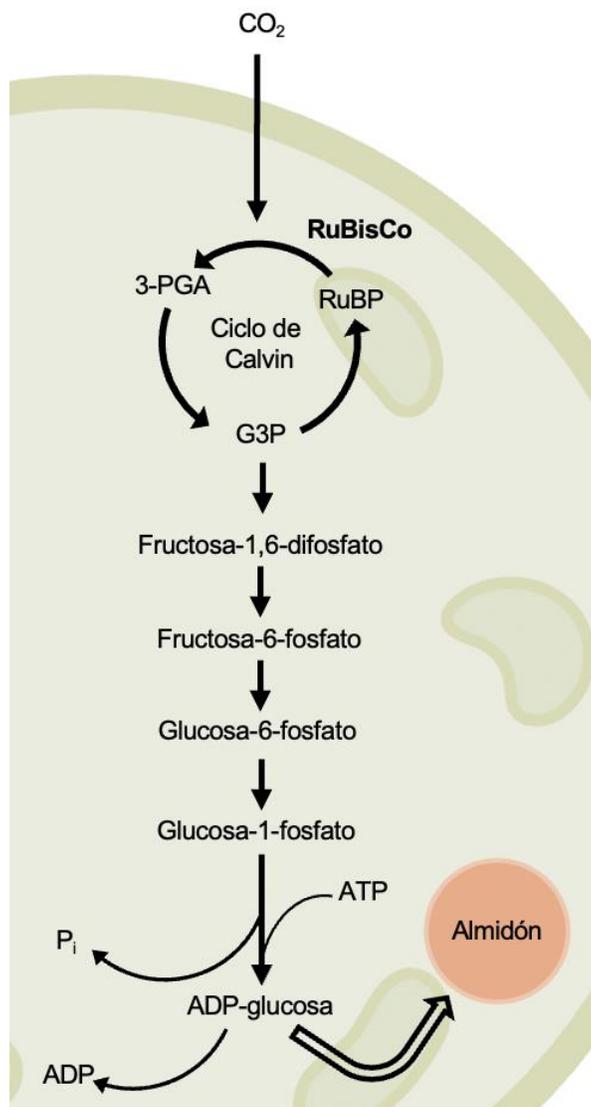
### 2.2.3 Carbohidratos

En las microalgas, el 15-60% de la biomasa son carbohidratos que se encuentran principalmente en forma de almidón (en los plástidos), celulosa, glucógeno, polisacáridos (en la pared celular), y agar (Shahid et al., 2020). Presentan diversas funciones incluyendo almacenamiento de energía, osmorregulación e integridad estructural (Chhandama et al., 2023), proveen la energía necesaria para el metabolismo de las microalgas y además les permiten sobrevivir temporalmente en la oscuridad cuando es necesario (Singh et al., 2016; Andreeva et al., 2021). El contenido de

carbohidratos puede estar influenciado por las condiciones de cultivo, como salinidad y concentración de nutrientes (Tan et al., 2016). Disminuir o incrementar la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo se considera una estrategia sencilla y de bajo costo para la producción de biomasa microalgal rica en carbohidratos (Andreeva et al., 2021). Los carbohidratos pueden emplearse para la producción de biohidrógeno, bioetanol y biobutanol por su alta concentración de azúcares fermentables y baja concentración de hemicelulosa (Shahid et al., 2020).

En las microalgas, los carbohidratos son un producto directo de la fijación del CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin durante la fotosíntesis (Shahid et al., 2020). El ciclo de Calvin tiene tres fases básicas para la producción de carbohidratos: fijación, reducción y regeneración. En la primera etapa el CO<sub>2</sub> es añadido a un azúcar de cinco carbonos (ribulosa 1,5-bifosfato) en una reacción catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCo), formando dos moléculas de tres carbonos (fosfoglicerato), el cual posteriormente es convertido a dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato. Una de las moléculas de gliceraldehido-3-fosfato continua en el ciclo de Calvin, mientras que la otra es empleada como sustrato para formar carbohidratos (sacarosa). La fracción de gliceraldehido-3-fosfato que no se emplea inmediatamente como fuente de energía es convertido a almidón en el estroma del cloroplasto, primero es reducido a fructosa-6-fosfato e isomerizado a glucosa-6-fosfato por la enzima fosfoglucosa isomerasa. (Fig. 3). (Ran et al., 2019; Botelho-Moreira et al., 2022; de Carvalho Silvello et al., 2022; Chhandama et al., 2023).

En el transcriptoma de *D. salina* en respuesta a estrés hipersalino se ha reportado un aumento en la regulación de glicerol-6-fosfato isomerasa (GPI) y piruvato quinasa alfa (PKa) las cuales están involucradas en el metabolismo de carbohidratos (He et al., 2020).



**Figura 3.** Biosíntesis de carbohidratos en microalgas. **G3P** (gliceraldehido-3-fosfato), **RuBP** (ribulosa-1,5-bisfosfato), **3-PGA** (fosfoglicerato) (Modificado de Botelho-Moreira et al., 2022 y de Carvalho Silvello et al., 2022).

### 2.3 Aplicación comercial de *D. salina*

La explotación comercial de *D. salina* comenzó en la década de 1980 en Australia, Israel y Estados Unidos, actualmente el mercado global de  $\beta$ -caroteno se espera alcance los 618.94 millones de dólares a finales de 2026 (Silva et al., 2020). Algunas de las empresas líderes en el cultivo de *D. salina* se localizan en España (Algalimento SL), India (Seagrass Tech Private Limited) y Australia (Plankton Australia Pty Ltd). La tendencia en aumento de las preferencias del consumidor hacia los productos naturales ha incrementado la demanda de  $\beta$ -caroteno derivado de *D. salina* (Joseph et al., 2022). Una de las ventajas de este pigmento microalgal es que presenta isómeros *all-trans*

y *9-cis*, lo que le confiere una mayor biodisponibilidad, mejor capacidad antioxidante y efectos fisiológicos a diferencia del  $\beta$ -caroteno obtenido mediante síntesis química el cual solo puede obtenerse en su forma *all trans* y no posee las mismas propiedades benéficas para la salud ya que el enlace *trans* es menos reactivo en comparación con el enlace *cis* (Levin et al., 1994; del Campo et al., 2007; Novoveská et al., 2019).

El  $\beta$ -caroteno es empleado como colorante y suplemento nutricional en la industria alimenticia, por sus propiedades protectoras en la piel en la industria cosmética, como anti-inflamatorio y anticáncer en la industria farmacéutica y como alimento vivo en la acuicultura (Mohammady et al., 2007; El-Baz et al., 2019).

Otros pigmentos presentes en la biomasa de *D. salina* como la luteína son empleados también como antioxidantes, colorantes alimenticios y nutracéuticos en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica (Xie et al., 2021). La biomasa de *D. salina* también presenta un importante contenido de lípidos, los cuales pueden ser empleados en la producción de biocombustibles como el biodiesel (Liu et al., 2013) mientras que su perfil de ácidos grasos la convierte en una fuente valiosa para la fabricación de nutraceúticos y alimentos funcionales con efectos benéficos antiinflamatorios y para la prevención de enfermedades cardiovasculares, además, presentan niveles menores de contaminantes (p. ej. Metilmercurio, dioxinas y bifenilos policlorados) en comparación con los aceites de pescado (Yaakob et al., 2014; Barkia et al., 2019). Por último, los carbohidratos producidos por *D. salina* son principalmente polisacáridos, los cuales pueden emplearse en diversas industrias incluyendo biocombustibles, alimento y farmacéuticos. Los carbohidratos pueden convertirse a bioetanol, biobutanol y biohidrógeno mediante procesos de fermentación (Dolganyuk et al., 2020; Araj-Shirvani et al., 2024).

## **2.4 Biorrefinería de microalgas**

Las biorrefinerías son instalaciones que integran procesos de conversión de biomasa de forma sustentable para producir diferentes productos como biocombustible, energía y compuestos de alto valor agregado (Francavilla et al., 2015; Chew et al., 2017; Bhalamurugan et al., 2018; Vyas et al., 2022). Su concepto es similar al de refinería de petróleo, pero la principal diferencia radica en los materiales y la tecnología empleada. Las microalgas se consideran candidatas potenciales

para los procesos de biorrefinería ya que son capaces de producir diversos productos como pigmentos, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y antioxidantes (Chew et al., 2017).

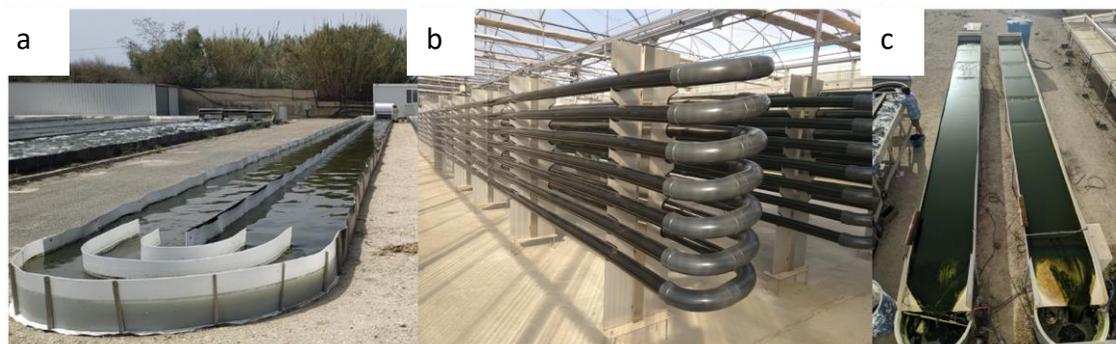
El enfoque de biorrefinería empleando la biomasa de *D. salina* es prometedor ya que se puede emplear de manera sustentable esta microalga para la obtención de compuestos con alto valor agregado. Se han reportado simulaciones de biorrefinerías para la recuperación de  $\beta$ -caroteno empleando extracción con fluidos supercríticos ( $scCO_2$ ) y solventes, procesando la biomasa restante mediante digestión anaerobia para la producción de biogás y biofertilizantes (Espada et al., 2020); la obtención de fracciones de carotenoides, glicerol, lípidos polares y proteínas empleando solventes orgánicos y nanofiltración (Monte et al., 2020); y la extracción de  $\beta$ -caroteno empleando solventes orgánicos y filtración de membrana, para un posterior fraccionamiento de los carotenoides, y producción de fertilizantes a partir de los residuos de biomasa (Thomassen et al., 2018).

## **2.5 Sistemas de cultivo a escala industrial**

Los sistemas de cultivo microalga se clasifican en dos: abiertos (estanques sin agitación, raceways, estanques circulares, capa fina en cascada) y cerrados (fotobiorreactores tubulares, columnas de burbujeo, panel plano, bolsas de plástico). Los reactores tipo raceways consisten en canales poco profundos (20-40 cm) de forma ovalada que forman un circuito cerrado adicionado con paletas motorizadas que permiten una continua circulación y mezclado del medio para evitar la sedimentación (Fig. 4a). Se caracterizan por su directa exposición a las condiciones ambientales, por lo que es difícil controlar la luz, temperatura y evaporación; están expuestos a la contaminación por bacterias y otros microorganismos y tienen un bajo porcentaje de  $CO_2$  que limita la transferencia de energía. Los nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono pueden ser parcialmente controlados. Son económicos en términos de construcción y mantenimiento, sin embargo, los costos de cosecha pueden ser elevados. Se recomiendan para el cultivo de microalgas resistentes a los cambios en las condiciones ambientales. Su productividad es baja ( $\sim 10 \text{ g}_{\text{peso seco}} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). El sistema de cultivo en capa fina consiste en una superficie inclinada por donde circula una delgada capa de cultivo microalgal. Esta configuración permite una mayor penetración de la luz y mejoramiento del intercambio gaseoso. Presentan una mayor

productividad de biomasa, sin embargo, el sistema de recirculación en cascada puede dañar a las células provocando pérdidas (Fig. 4b).

Los fotobiorreactores tubulares horizontales consisten en una estructura transparente tubular por donde circula el cultivo microalgal desde un reservorio central con ayuda de una bomba, empleando luz artificial o luz solar directa. Estos sistemas permiten un mejor control del proceso, las condiciones de cultivo son reproducibles, tienen un bajo riesgo de contaminación, una baja pérdida de CO<sub>2</sub>, la evaporación es menor, menor costo en el procesamiento de cultivo y pueden instalarse en un área menor en comparación con los sistemas abiertos. Sin embargo, son más difíciles de limpiar, el material de construcción puede disminuir parcialmente la entrada de luz, el sistema debe desgasificarse efectivamente por la acumulación de oxígeno; además el costo de construcción y operación es mayor en comparación con los reactores abiertos. (del Campo et al., 2007; Masojídek et al., 2015; de Carvalho Silvello et al 2022; Razzak et al., 2024; Zhang et al., 2024) (Fig. 4c).



**Figura 4.** Fotobiorreactores del departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería. a) Raceway. b) Fotobioreactor tubular horizontal. c) Capa fina, cascada. Fotografías proporcionadas por M. en C. Sílvia Villaró Cos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Científica: Estudiar los mecanismos moleculares relacionados en la adaptación a estrés en la microalga *Dunaliella salina*, ayudará a comprender los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en los mismos.

Tecnológico: Conocer los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de la microalga, implicados en la producción de metabolitos de interés, permitirá diseñar estrategias de ingeniería metabólica para la regulación de la producción de compuestos con valor agregado aplicables a la industria.

Ambiental: La biotecnología microalgal es una oportunidad para rediseñar las prácticas industriales actuales, implementando enfoques más sustentables, ayudando a la mitigación de los gases de efecto invernadero.

Social: Proponer nuevas fuentes de generación de empleo a través de la aplicación del concepto de biorrefinería microalgal como parte de la industria de la transformación de productos aplicables a la industria.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el estrés por deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura inducen un aumento en la expresión de genes involucrados en la síntesis de  $\beta$ -caroteno, lípidos y carbohidratos a lo largo del cultivo en la microalga nativa *D. salina* CIBA-29, entonces se obtendrá un aumento en la concentración de dichos compuestos. Lo anterior, nos permitirá diseñar estrategias sustentables de bajo costo para la producción de biomasa, así como recuperar compuestos de valor agregado de una especie nativa que sean aplicables a la industria.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura en la expresión de genes involucrados en la síntesis y concentración de  $\beta$ -caroteno, lípidos y carbohidratos a lo largo del cultivo en la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29. Con base a ello diseñar una estrategia de producción de biomasa y recuperación de compuestos de valor agregado aplicables a la industria.

### 5.2 Objetivos particulares

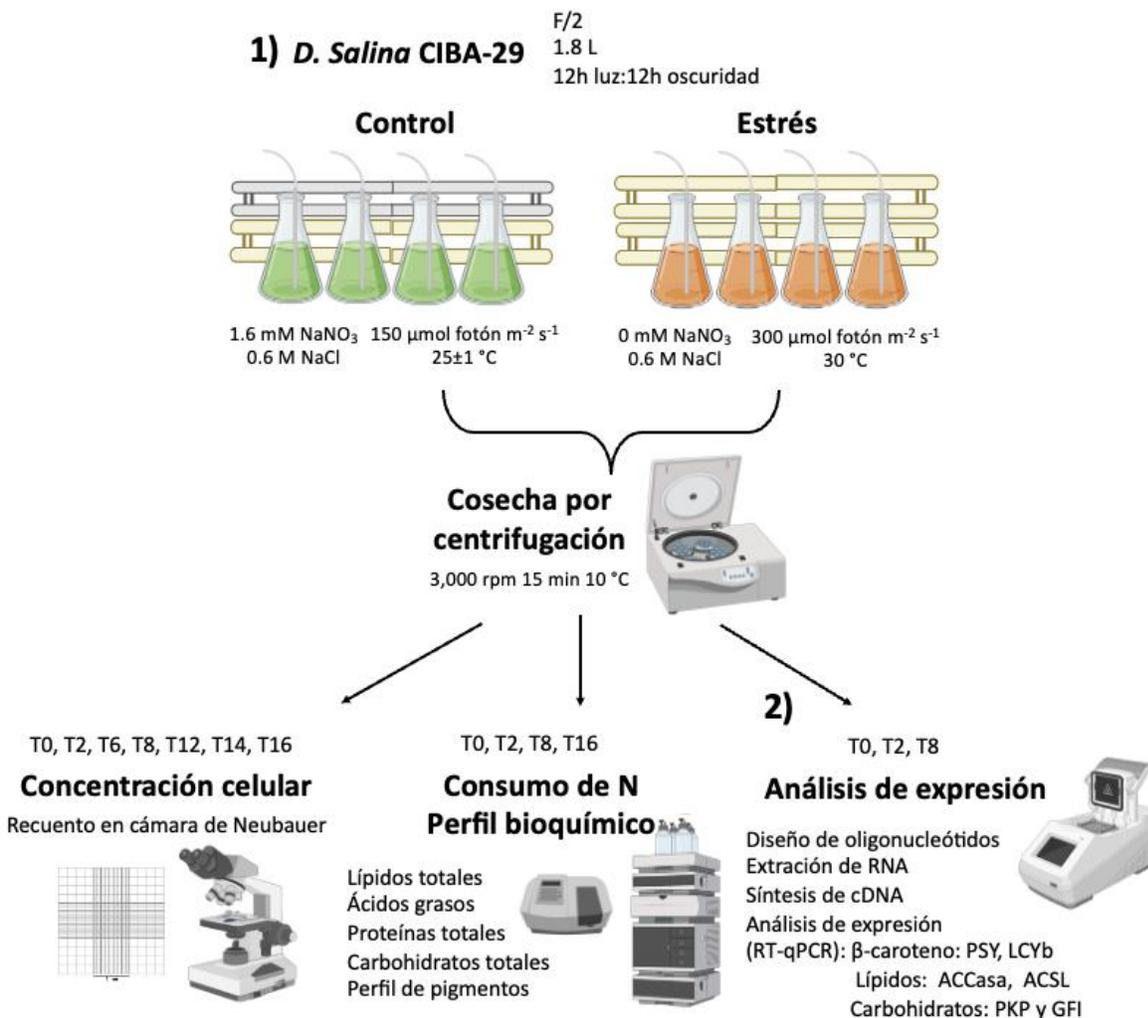
1. Evaluar la expresión de genes involucrados en la síntesis de  $\beta$ -caroteno, lípidos y carbohidratos a lo largo del cultivo en *D. salina* CIBA-29 en respuesta a deficiencia de nitrógeno, elevada temperatura e intensidad luminosa.
2. Cuantificar la concentración celular de  $\beta$ -caroteno, lípidos y carbohidratos a lo largo del cultivo en *D. salina* CIBA-29 en respuesta a deficiencia de nitrógeno, elevada temperatura e intensidad luminosa.
3. Diseñar una estrategia de producción de biomasa y recuperación de compuestos de valor agregado aplicables a la industria en *D. salina* con enfoque de biorrefinería.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa de *D. salina* CIBA-29 fue colectada el 12 noviembre del 2014 del vaso de cristalización número 33 (N27°53.831' W114°01.937') de la empresa Exportadora de Sal (ESSA), en Guerrero Negro, Baja California Sur, México por la Dra. Bertha Olivia Arredondo-Vega. La cepa fue identificada molecularmente por el Dr. Tomas Cárdenas y Dr. Carlos Eliud Angulo-Valadez utilizando el marcador molecular 18s, y posteriormente depositada en el cepario del CIBNOR.

Se realizaron cultivos por cuadruplicado (n=4) en matraces Erlenmeyer a un volumen final de 1.8 L empleando medio F/2 de Guillard y Ryther (1962), un fotoperiodo luz:oscuridad 12:12h, temperatura de  $25\pm 1$  °C y pH 7.8. Se realizó el escalamiento de biomasa de la microalga *D. salina* en condiciones control con suficiencia de nitrógeno (1.6 mM NaNO<sub>3</sub>), salinidad de 0.6 M NaCl, intensidad luminosa de 150  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de  $25\pm 1$  °C durante 5 días. Transcurridos los 5 días, la biomasa fue centrifugada a 2,215 x g durante 10 min a 10 °C, descartando el sobrenadante y se lavó con agua de mar estéril para la eliminar el nitrógeno del medio de cultivo. Esta biomasa se utilizó para realizar los cultivos en condiciones control y estrés. Para los cultivos en estrés, se mantuvieron en deficiencia total de nitrógeno, intensidad luminosa de 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de  $30\pm 1$  °C. Se tomaron muestras cada segundo día desde el día 0 al 16 de cultivo para determinar la concentración celular, a los días 0, 2, 8 y 16 para determinar el consumo de nitrógeno y el perfil bioquímico. Para los análisis de expresión se tomaron muestras a los días 0, 2 y 8 (Fig. 5).



**Figura 5.** Diagrama de flujo de la metodología.

## 6.2 Concentración celular

La determinación de la concentración celular se realizó mediante recuento celular con cámara de Neubauer siguiendo el protocolo por Arredondo-Vega (2017). A partir de 1 mL de muestra de cultivo homogenizado el cual fue empleado para cargar la cámara de Neubauer, se realizó el recuento de células dentro de los cuadrantes correspondientes y se calculó la concentración celular de acuerdo con la ecuación:

$$c = N \times 10^4 \times dil \quad (1)$$

Donde:

C= cel mL<sup>-1</sup>

N= promedio de células en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL)

10<sup>4</sup>= factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL

dil= factor de dilución

Para la determinación de la concentración celular, tanto para el cultivo control como para el cultivo de estrés, se realizaron muestreos cada segundo día desde el día 0 a 16 de cultivo.

### **6.3 Consumo de nitrógeno (NO<sub>3</sub>)**

El consumo de nitrógeno se determinó mediante la cuantificación de nitrato, en el Laboratorio de Análisis Químico del Agua (LAN01) del CIBNOR. El procedimiento para nitratos disueltos en aguas se especifica en MPT-LANI01-05. A partir de un volumen determinado de sobrenadante, se realizó la reducción del ion nitrato a nitrito, dicha solución se hace fluir a través de una columna que contiene cadmio recubierto con cobre coloidal y se mide la absorbancia a 540 nm para su posterior cuantificación.

### **6.4 Análisis de expresión**

#### **6.4.1 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos**

Para el diseño de oligonucleótidos específicos se seleccionaron 8 genes: fitoeno sintasa (PSY), licopeno β-ciclase (LCYb), acetil CoA-carboxilasa (ACCase), acetil CoA-sintetasa (ACS2), piruvato quinasa (PKA) y glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI); así como 4 genes normalizadores: α-tubulina (αT), β-tubulina (βT), actina (AC) y ARNr18S (18S). Se realizó la búsqueda de secuencias de los genes seleccionados en la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), a partir de la secuencia CDS se realizó el diseño de oligonucleótidos empleando el programa Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron evaluadas para determinar la formación de estructuras secundarias de tipo horquillas, homodímeros y heterodímeros empleando los programas OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), tomando en cuenta los siguientes criterios: un valor de ΔG (kcal/mol) no mayor a -10 kcal/mol.

Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados respecto a la secuencia blanco se realizaron alineamientos con la herramienta en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), empleando como información de entrada las secuencias 3' y 5' de cada uno de los oligonucleótidos diseñados, contra el genoma de *D. salina*. Una vez que se evaluaron las propiedades de los oligonucleótidos diseñados, estos fueron sintetizados en la compañía T4OLIGO (Irapuato, Gto.). Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua milliQ de acuerdo con el volumen sugerido por el fabricante para obtener una concentración de 100 mM y se realizaron alícuotas de trabajo a una concentración de 10 mM.

#### **6.4.2 Extracción de ARN**

Para la extracción de ARN se empleó el método de TRIzol. A 1-1.5 mL de biomasa cosechada se agregó 1 mL del reactivo TRIzol e inmediatamente las muestras fueron resguardadas a -80 °C para conservar la integridad de los ácidos nucleicos hasta su procesamiento. Una vez que se tuvieron listas todas las muestras, estas fueron descongeladas en hielo y se centrifugaron durante 5 min a 12,000 g a 4-10°C (Thermo Scientific, HERAEUS Pico 17) y se transfirió el sobrenadante claro en un tubo nuevo. Las muestras se incubaron durante 5 min para permitir la completa disociación de complejos núcleo-proteicos. Para la lisis celular, se añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de reactivo TRIzol empleado en la lisis, se mezcló completamente por agitación y se incubaron las muestras durante 2-3 min. Después, las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 12,000 g a 4°C y se transfirió la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo nuevo evitando transferir la interfase.

Para la precipitación del ARN se añadieron 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa por cada mL de TRIzol empleado en la lisis, se incubaron las muestras durante 10 min a 4°C y se centrifugaron durante 10 min a 12,000 g a 4°C. Se desechó el sobrenadante con la micropipeta, se resuspendió el pellet en 1 mL de etanol 75% por cada mL de TRIzol empleado en la lisis y se mezcló la muestra manualmente. Nuevamente se centrifugaron las muestras durante 5 min a 7,500 g a 4°C, se desechó el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar el pellet de ARN durante 5-10 min sobre un papel absorbente. Por último, se resuspendió el pellet en 30 µl de agua libre de ARNasas, se incubaron en termobloque a 55-60°C durante 10-15 min (Benchmark Multi-therm) para almacenaron a -80°C.

### 6.4.3 Tratamiento con ADNasa

Previo a la síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó un tratamiento con DNAsa para eliminar contaminación por ADN en las muestras de ARN empleando la DNAsa I de Invitrogen, para lo cual se realizó una preparación del ARN experimental (1 µg/reacción), Buffer 10X DNAsa (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl), DNAsa I (1 unidad/µl) y agua DEPC a un volumen final de 10 µl (Tabla 1) Las muestras fueron incubadas en termociclador a temperatura ambiente (25°C) durante 15 min y, para inactivar la enzima, se adicionó 1µl de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C durante 10 min.

**Tabla 1.** Mezcla de reacción para tratamiento con ADNasa.

Reactivo	Volumen
Buffer 10X para DNAsa I	1µl
RNA experimental	(1 µg/reacción)
DNAsa I (1 µ/µl)	1 µl
Agua DEPC	X
Volumen final	10 µl

### 6.4.4 Síntesis de ADNc

A partir de las muestras de ARN tratadas con DNAsa se realizó la síntesis de ADNc empleando el kit de Promega ImProm-II™ Reverse Transcription System. Las muestras de ARN fueron descongeladas en hielo y se realizaron preparaciones del ARN experimental (1 µg/reacción), oligonucleótido de DNAc y agua libre nucleasas a un volumen final de 5 µl por reacción (Tabla 2).

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para síntesis de ADNc.

Reactivo	Volumen
RNA experimental (1 µg/reacción)	5 µl
Oligo(dT) (0.5 µg/reacción)	1µl
Agua libre de nucleasas	X
Volumen final	5 µl

Las muestras fueron colocadas en un termo bloque precalentado a 70°C durante 5 min. Inmediatamente después se colocaron los tubos en agua helada durante 5 min y luego fueron centrifugadas durante 10 s en una microcentrífuga manteniéndose en hielo mientras se realizaban las preparaciones de reacción de retro transcripción (RT). Se realizaron mezclas de agua libre de nucleasas, buffer de reacción ImProm-II 5x, MgCl<sub>2</sub>, (1.5-8.0 mM), dNTPs (0.5 mM) y enzima transcriptasa reversa ImProm-II a un volumen final de 15 µl (Tabla 3), la mezcla se agitó mediante vortex y se mantuvo en hielo.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para síntesis de ADNc.

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas (volumen final de 15 µl)	Xµl
Buffer de reacción ImProm-II 5x	4.0µl
MgCl <sub>2</sub> (Concentración final 1.5-8.0mM)	1-2-6.5µl
dNTPs (Concentración final 0.5mM)	1µl
Inhibidor de ribonucleasa	20u
Transcriptasa reversa ImProm-II	1.0µl
Volumen final	15.0µl

Se separaron alícuotas de 15 µl de la mezcla de RT y se añadieron 5 µl de la mezcla de ARN experimental y oligonucleótidos de ADNc. Se colocaron los tubos a 25°C durante 5 min para permitir el alineamiento, para la etapa de extensión se incubaron los tubos a 42°C durante 1 h, por último, se incubaron a 70°C durante 15 min para la inactivación de la enzima. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C.

#### 6.4.5 Curvas de amplificación y eficiencia

Para determinar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados se realizaron curvas de amplificación para los genes  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ Tub) (gen normalizador) así como para los genes de interés fitoeno sintasa (PSY), licopeno  $\beta$ -ciclasa (LYCb), acetil CoA carboxilasa (ACC), acetil CoA sintetasa (ACS), pirivato kinasa  $\alpha$  (PKA) y glicerol-6-fosfato isomerasa (GPI).

Las curvas de amplificación se realizaron por triplicado mediante qPCR empleando el producto de PCR (Tabla 4) purificado (QIAquick PCR purification Kit, QIAGEN) y diluido a una concentración de  $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , a partir del cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 a 1:1,000,000. Los valores promedio de Ct fueron graficados, se calculó la pendiente de la recta y empleando el valor de  $R^2$  obtenido se realizó el cálculo de la eficiencia empleando calculador de eficiencia para qPCR de Thermofisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>).

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para PCR.

Reactivo	Volumen
Buffer	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (Concentración final 1.5-8.0mM)	2.0 $\mu\text{l}$
dNTPs (Concentración final 0.5mM)	0.5 $\mu\text{l}$
Oligonucleótido Forward	1.0 $\mu\text{l}$
Oligonucleótido Reverse	1.0 $\mu\text{l}$
Taq polimerasa	0.125 $\mu\text{l}$
Agua libre de nucleasas (volumen final de 15 $\mu\text{l}$ )	X $\mu\text{l}$
Volumen final	15.0 $\mu\text{l}$

#### 6.4.6 Análisis de expresión mediante qPCR

Para los análisis de expresión mediante qPCR se empleó el kit SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> supermix de Bio-Rad. Primeramente, todos los reactivos fueron descongelados a temperatura ambiente y se realizaron preparaciones con el reactivo SsoFast EvaGreen supermix (1X), oligonucleótido específico 3' (400 nM), oligonucleótido específico 5' (400 nM), agua DEPC y el ADNc experimental a un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Las muestras fueron incubadas en termociclador RotorGene 6000 de LabScience, las condiciones del programa se encuentran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de reacción para qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	# ciclos
Activación de enzima	95°C	30 s	1
Desnaturalización	95°C	5 s	30-40
Alineamiento/extensión	55-60°C	10 s	
Curva de disociación	65-95°C	10 s/ciclo	1

Los cálculos de expresión relativa se realizaron empleando el método de Pfaffl, donde la relación de expresión relativa se calcula a partir de las eficiencias de PCR tiempo real y la desviación del punto de cruce de una muestra desconocida frente a un control (Pfaffl et al., 2001). A partir de los valores calculados de eficiencia se realizó una conversión del porcentaje dividiendo el porcentaje entre 100 y sumando 1 (Ecuación 2).

$$\begin{aligned} & \textit{Eficiencia de oligonucleótidos convertida} \\ & = \left( \frac{\textit{Eficiencia de oligonucleótido (\%)}}{100} \right) + 1 \end{aligned} \quad (2)$$

Se calculó el promedio de los valores de Ct de las réplicas técnicas, el promedio de los valores de Ct de la condición control tanto para los genes normalizadores ( $\alpha$ -tubulina) como de los genes de interés y el valor de  $\Delta$ Ct por separado para cada gen en cada muestra (Ecuación 3).

$$\Delta\text{Ct} = \text{'Promedio del control'} - \text{'Ct promedio'} \quad (3)$$

Una vez que se obtuvieron los valores de  $\Delta$ Ct para los genes de interés en todas las muestras y los valores de eficiencias de los oligonucleótidos se calculó el radio de expresión génica empleando la ecuación de Pfaffl (Ecuación 4).

$$\textit{Radio de expresión génica} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta\text{Ct}_{GOI}}}{(E_{HKG})^{\Delta\text{Ct}_{HKG}}} \quad (4)$$

Donde:

$E_{GOI}$ = Eficiencia del gen de interés

$\Delta Ct_{GOI}$ = Valor de delta Ct del gen de interés

$E_{HKG}$ = Eficiencia del gen normalizador

$\Delta Ct_{HKG}$ = Valor de delta Ct del gen normalizador

## 6.5 Perfil bioquímico

### 6.5.1 Extracción y cuantificación de pigmentos

Para la extracción y cuantificación de pigmentos se empleó el método de Strickland y Parsons (1972). Se tomaron 45 mL de cultivo en tubos cónicos de plástico y se centrifugaron a 2,200 g durante 10 min a 10 °C, desechando el sobrenadante por decantación. Se transfirió la pastilla celular en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca, el tubo fue cubierto con papel aluminio para evitar fotooxidación. Se agregó 3 mL de acetona 100% (grado HPLC) y se agitó con vortex. Posteriormente se sonicó en baño con hielo durante 5 min. Las muestras fueron incubadas a 4 °C durante la noche (12 a 16 h) para permitir una completa extracción de los pigmentos. Una vez concluida la incubación nuevamente se sonicó en baño con hielo durante 5 min. Se centrifugaron a 2,200 g durante 10 min a 15°C, se separó el extracto de pigmentos con una pipeta Pasteur limpia, se colocó en otro tubo limpio y protegido de la luz, y se transfirieron 500  $\mu$ L de extracto total de pigmentos a un vial ámbar sellándose con un tapón de rosca.

El equipo utilizado fue el HPLC1200 Agilent con detector de diodos (DAD). La columna utilizada fue Zorbax C8 SB (5  $\mu$ m x 150 mm de diámetro externo x 4.6 mm de espesor). Las condiciones de operación del equipo fueron: tiempo de corrida: 18.5 min, tiempo de parado: 1.5 min, flujo: 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , longitud de onda del detector DAD 440 nm, presión máxima de la bomba: 300 bar, volumen de inyección: 10  $\mu$ L. El método de separación fue: min 0: solución A: 75 % (metanol-acetato de amonio 1 N, 70:30 v/v), solución B: 25 % (metanol); min 1: solución A: 50 %, solución B: 50 %; min 15: solución A: 0 %, solución B: 100 %; min 18: solución A: 0 %, solución B: 100 %; y min 18.5: solución A: 75 %, solución B: 25 %. La identificación de los pigmentos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de la mezcla de estándares de la curva de calibración, así como comparando los espectros de absorción de cada uno de los pigmentos de la mezcla con respecto

a los de las muestras. La concentración de los pigmentos se calculó integrando el área bajo la curva, la cual es directamente proporcional a la concentración de los estándares. Para calcular la concentración se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Pigmento} &= (A_m * FC) * (V_E / V_I) / P && [\text{ng mg}^{-1}] \\ \text{Pigmento} &= (A_m * FC) * (V_E / V_I) / V && [\text{ng mL}^{-1}] \end{aligned} \quad (5)$$

Donde:

Pigmento = clorofilas y/o carotenos.

$A_m$  = área del pico de la muestra ( $\text{mAU} \cdot \text{s}^{-1}$ )

FC = factor de corrección de cada estándar

$V_E$  = volumen de acetona utilizado para la extracción ( $\mu\text{L}$ )

$V_I$  = volumen de muestra inyectado ( $\mu\text{L}$ )

P = peso de la muestra (mg)

V = volumen de la muestra filtrada o centrifugada (mL)

### 6.5.2 Extracción y cuantificación de lípidos totales

La determinación de lípidos totales se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ ) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas.

Para la extracción de lípidos totales se utilizó el protocolo propuesto por Bligh y Dyer (1959). A partir de 5 mg de biomasa liofilizada (Labconco, Free zone 1) de cada cultivo, se realizó la extracción con 3 mL de la mezcla de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0.6) y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del antioxidante Butil hidroxitolueno (BHT) preparada a una concentración de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  en  $\text{CHCl}_3$ . La mezcla se sonicó 20 min en baño de agua con hielo. Las muestras se incubaron a 4°C protegidos de la luz durante 36h para asegurar la extracción completa de los lípidos. Transcurrido el tiempo se sonicó (VWR Ultrasonic Cleaner, 97043-984) nuevamente en frío durante 15 min y se centrifugó a 2,215 x g durante 15 min a 10°C (Sorvall Legend RT D37520). El extracto cloroformo: lípidos se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo.

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). A partir de los lípidos totales extraídos se tomó una alícuota (calculada con base en la concentración media de la curva de calibración) y se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso. Después, se añadieron 2 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se selló el tubo con papel aluminio y se cerró con la tapa. La mezcla se calentó a  $200^\circ C$  durante 15 min (Terlab, TE-H35D). Se sacaron las muestras y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente, se colocaron en un baño con agua con hielo por 5 min. Enfriada la muestra, se agregaron 3 mL de agua destilada y se mezcló con vortex, verificando que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 375 nm (Hach, DR5000). El equipo se calibró con un blanco de  $H_2SO_4$  que se trató de igual manera que las muestras. Previamente se realizó la curva de calibración utilizando tripalmitina como estándar en un rango de concentración de 30 a  $180 \mu g mL^{-1}$ . De la curva de calibración se obtuvo la ecuación en donde la pendiente (m) de la curva corresponde al factor de corrección que se utilizó en los cálculos. Los datos se expresaron en porcentaje con respecto al peso seco. La determinación de lípidos totales se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ( $CHCl_3:CH_3OH:H_2O$ ) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas.

### **6.5.3 Extracción y cuantificación de ácidos grasos**

Para la extracción de los ácidos grasos se empleó una mezcla de solventes con ácido clorhídrico:metanol ( $HCl:CH_3OH$ ) y se transformaron por una reacción de transesterificación a metil-ésteres, en la cual un mol de triglicérido es desplazado por tres moles de otro alcohol (metanol) en condiciones ácidas (Sato y Murata, 1988).

A partir de los lípidos extraídos anteriormente, colocados en un tubo de tapón de rosca, se sometieron a la reacción de metanólisis (o derivatización) en el cual se adicionó 2.5 mL de la mezcla de  $HCl:CH_3OH$  (5:95 v/v) a  $85^\circ C$  durante 2.5h. Pasado el tiempo, se sacaron las muestras, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los metil-ésteres obtenidos de la reacción se extrajeron con 1.5 mL de hexano (grado HPLC) con ayuda de una pipeta Pasteur limpia, se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo. La mezcla se lavó una segunda vez con 1.5 mL de hexano (grado HPLC), nuevamente se separó la fase superior y se colocó en el tubo anterior. Se

concentraron los ácidos grasos con nitrógeno gaseoso y se resuspendió en 1 mL de hexano (grado HPLC). Con el fin de eliminar humedad del extracto de ácidos grasos-metil esterificados, a la muestra se le agrega una pizca de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. 500  $\mu\text{L}$  de ácidos grasos se colocaron en viales ámbar cerrado con tapón, y se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el equipo de cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de flama (GC-FID) (Agilent Technologies 6890N).

Para la separación y cuantificación de los ácidos grasos en el GC-FID se utilizó una columna capilar DB-23 (50%-Cianopropil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud x 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película x 0.25 mm de diámetro interno, utilizando helio alta pureza como gas acarreador a un flujo de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ , una rampa de temperatura de 110–220  $^{\circ}\text{C}$ . La identificación de los ácidos grasos se realizó comparando el tiempo de retención de la muestra con los estándares (Sigma T6543) y la cuantificación con base al estándar interno C23:0 (ácido tricosanóico) (Arjona et al., 2008).

#### **6.5.4 Extracción y cuantificación de carbohidratos totales**

La determinación de carbohidratos totales se realizó empleando el método de Dubois et al. 1956 el cual se basa en la cuantificación de las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tienen un grupo reductor libre o potencialmente libre. Este método no mide glucosamina ni galactosamina, pero incluyen pentosas y metil-pentosas. A partir de 5 mg de biomasa liofilizada los cuales fueron colocados en un tubo de ensayo con tapón de rosca, se añadieron 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y se hidrolizaron a 100 $^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se retiraron los tubos del baño y se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Se centrifugaron a 2,200  $g$  durante 15 min a 10 $^{\circ}\text{C}$  y se separó el extracto ácido con una pipeta Pasteur limpia. Se tomó un volumen de extracto ácido completando a 1 mL de volumen final con el mismo ácido sulfúrico 1 M, se agregó 1 mL de fenol al 5 %, se mezcló y se dejó reposar durante 40 min. Transcurrido el tiempo, se añadió lentamente 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se leyó la absorbancia a 485 nm, calibrando el espectrofotómetro con un blanco que se preparó de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.0 M. La concentración de carbohidratos totales en la muestra se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración realizada con glucosa anhidra en un rango de concentración de 0–150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados fueron expresados en % con respecto al peso seco.

### 6.5.5 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Como complemento al análisis bioquímico se realizó la extracción y cuantificación de proteínas totales. La extracción y cuantificación de proteínas se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin- Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico: FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre.

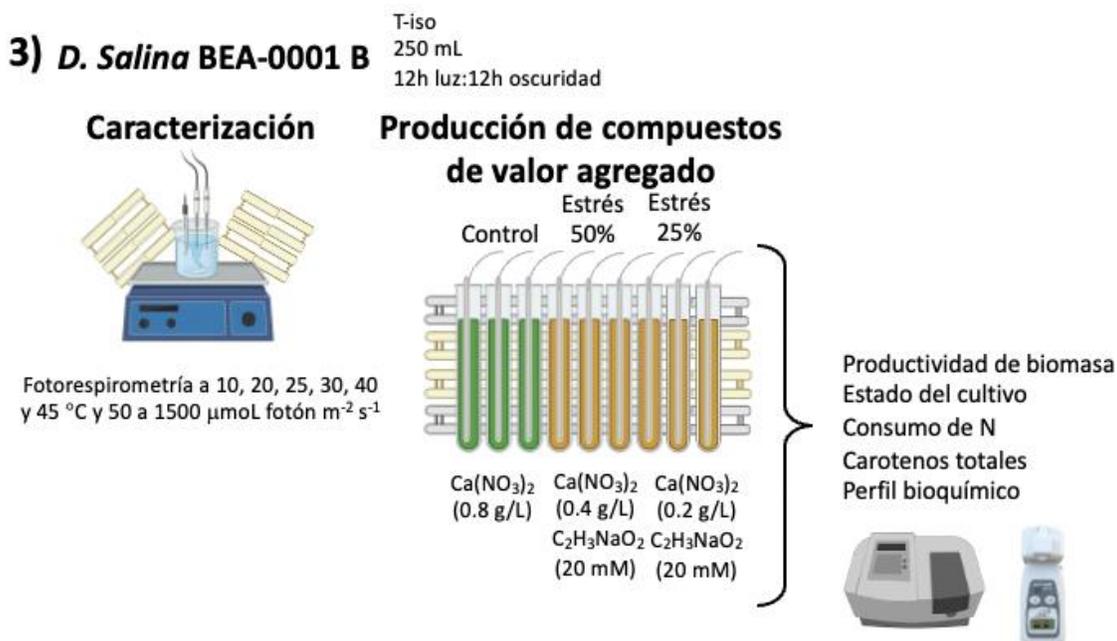
Se pesaron en tubos de vidrio con tapón de rosca, 5 mg de cada una de las muestras liofilizadas. Las muestras se hidrolizaron con 5 mL de NaOH 0.1 N a 100°C por 60 min. Transcurrido el tiempo, los tubos se retiraron y se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se centrifugó a 1200 g durante 15 min a 10°C, recuperando el extracto alcalino en otro tubo limpio. Del extracto alcalino, se utilizó un volumen previamente calculado y se completó a 1 mL con NaOH 0.1 N. Las muestras se agitaron en vortex para su homogenización.

Se preparó la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % (p/v) en NaOH 0.1N. Se preparó también la mezcla de 1:1 de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 0.5% y tartrato de sodio y potasio al 1%. Se agregaron 5 mL de la mezcla de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % en NaOH 0.1 N + CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 0.5 % y tartrato de sodio y potasio al 1 % en una proporción de 50:1 al extracto alcalino. Se mezcló en vortex y se dejó reposar 20 min. Después se agregó 500 µL de la solución 1:1 de Folin: H<sub>2</sub>O destilada, se agitó en vortex y se dejó reposar en oscuridad durante 40 min. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 nm calibrando el equipo con un blanco preparado usando el mismo tratamiento que el de las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1N en lugar de muestra. La cuantificación de proteínas totales en las muestras se realizó a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración que se elaboró previamente utilizando BSA (por sus siglas en inglés: albúmina de suero de bovino) en un rango de concentración de 0–150 µg mL<sup>-1</sup>. Los resultados fueron expresados en % con respecto al peso seco.

### 6.6 Estrategia de producción de biomasa

Como parte de uno de los objetivos de la tesis, se realizó una estancia en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, España. Para la estrategia de producción de biomasa se trabajó con la cepa de *D. salina* BEA-0001 B con la cual se evaluó a nivel laboratorio (250 mL) el crecimiento y perfil bioquímico en cultivo control y estrés.

*D. salina* BEA-0001 B fue cultivada en medio T-iso, el cual es un medio de cultivo de bajo costo a base de fertilizantes agrícolas elaborado con agua de mar estéril adicionada con  $K_2HPO_4$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $Ca(NO_3)_2$  ( $0.8 \text{ g L}^{-1}$ ),  $MgSO_4$  ( $0.35 \text{ g L}^{-1}$ ), Karentol® ( $0.03 \text{ g L}^{-1}$ ). Para la caracterización de la cepa de *D. salina* BEA-0001 B se realizaron ensayos de fotorespirometría con los cuales se determinó la tasa de fotosíntesis neta ( $P \text{ O}_2$  total). Para evaluar la producción de  $\beta$ -caroteno se realizaron cultivos en el sistema de columnas de burbujeo a un volumen final de 250 mL, con un fotoperiodo de luz: oscuridad de 12:12h y una intensidad luminosa de  $400 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se evaluaron tres tratamientos: (i) control ( $n=3$ ) con todos los nutrientes del medio T-iso, (ii) estrés 50% ( $n=3$ ) con la mitad de la concentración de  $Ca(NO_3)_2$ , ( $0.4 \text{ g/L}$ ) y (iii) estrés 25% ( $n=3$ ) con una cuarta parte de la concentración de  $Ca(NO_3)_2$ . ( $0.2 \text{ g/L}$ ). El consumo de nitrógeno fue monitoreado a lo largo del cultivo y una vez que se observó el consumo total en los cultivos de estrés 50% y de estrés 25% se adicionó acetato de sodio ( $20 \text{ mM}$ ) como fuente de carbono orgánico para evaluar su efecto en la carotenogénesis. Se tomaron muestras a los días 0, 2, 8 y 16 de cultivo para determinar el estado del cultivo y la concentración de carotenos totales. El peso seco se determinó al inicio ( $T_0$ ) y final del cultivo ( $T_{16}$ ). Al final del cultivo ( $T_{16}$ ) la biomasa se cosechó por centrifugación (Sigma Laborzentrifugen GmbH) a  $2,200 \text{ g}$  durante  $10 \text{ min}$  a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  y se liofilizó para su posterior análisis bioquímico (Fig. 6).



**Figura 6.** Estrategia de producción de biomasa.

### 6.6.1 Determinación de fotosíntesis neta

Para la caracterización se determinó la tasa de fotosíntesis neta mediante ensayos de fotorespirometría. La técnica se basa en medir la producción y consumo de oxígeno durante ciclos de luz y de oscuridad. El equipo de fotorespirometría diseñado por Ippoliti et al. 2016 consiste en un vaso de precipitado encamisado con agitación constante acoplado a un sensor de oxígeno disuelto (Crison 5002), pH (Crison 5343), temperatura (pt-100) y de irradiancia (QSL-1000) con dos lámparas LED (Osram 80 W) a cada lado del vaso, todo dentro de una estructura sellada para evitar la entrada de iluminación exterior. El sistema mide en tiempo real los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto, irradiancia y pH mediante el software DaqFactory.

En el vaso de precipitado se colocaron 60 mL de cultivo de *D. salina* a una concentración de 0.4 g L<sup>-1</sup> el cual se mantuvo a una temperatura y agitación constante. Se realizó la exposición a ciclos de luz: oscuridad con una duración de 4 min. Para cada ciclo de luz: oscuridad se evaluaron diferentes intensidades luminosas: 50, 200, 350, 600, 800, 1200 y 1500  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se realizaron 6 ensayos a diferentes temperaturas: 10, 20, 25, 30, 40 y 45 °C.

Para calcular la tasa de fotosíntesis neta (NPR) es necesario determinar la tasa de producción de oxígeno (OPR) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR). La OPR se calculó a partir de la pendiente de la concentración de oxígeno disuelto en el ciclo de luz dividido entre la concentración de biomasa (Ecuación 6).

$$OPR (mg O_2 \times g^{-1} \times h^{-1}) = \frac{1}{C_b} \times \frac{dX_{O_2}}{dt} \quad (6)$$

Donde:

$C_b$  = concentración de biomasa de *D. salina*

$X_{(O_2)}$  = concentración de oxígeno disuelto ( $mg O_2 L^{-1}$ )

La OCR se determinó a partir del cálculo de la pendiente de la concentración de oxígeno disuelto en el ciclo de oscuridad dividido entre la concentración de biomasa (Ecuación 7).

$$OCR (mg O_2 \times g^{-1} \times h^{-1}) = - \frac{1}{C_b} \times \frac{dX_{O_2}}{dt} \quad (7)$$

Donde:

$C_b$  = concentración de biomasa de *D. salina*

$dX_{O_2}$  = concentración de oxígeno disuelto ( $mg O_2 L^{-1}$ )

La NPR se determinó como la diferencia entre OPR y OCR (Ecuación 8).

$$NPR = OPR - OCR \quad (8)$$

### 6.6.2 Consumo de nitrógeno

El consumo de nitrógeno se calculó mediante métodos espectrofotométricos descritos previamente por Morales-Amaral et al., 2015. Para la determinación de nitrógeno se mezcló 0.5 mL de sobrenadante de cultivo con 2.5 mL de HCl (37%) y se aforó a 50 mL con agua destilada. Se midió absorbancia a 220 y 275 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Fisher

Scientific). El blanco se realizó empleando agua destilada. La concentración de nitratos se calculó empleando la ecuación 9. Se realizó una curva de calibración con  $\text{KNO}_3$  con concentraciones de 0 a  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

$$(\text{Abs}_{220} - 2 \cdot \text{Abs}_{275}) \cdot P \cdot \text{PM N} / \text{PM NO}_3 \quad (9)$$

Donde:

P = Valor de pendiente de curva de calibración con  $\text{KNO}_3$

PM N = Peso atómico del nitrógeno

PM  $\text{NO}_3$  = Peso molecular del nitrato

### 6.6.3 Productividad de biomasa y estado del cultivo

Para obtener la productividad de la biomasa se determinó la concentración de biomasa en T0 y T16, la cual se calculó mediante el peso seco. Para ello se filtró una muestra de cultivo empleando un embudo Büchner con filtros de  $1 \mu\text{m}$ , previamente secados durante 24 h a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , y un matraz Kitasato acoplado a una bomba de vacío. La biomasa filtrada se lavó con formato de amonio (3%) a un volumen doble de la cantidad del volumen filtrado. Los filtros se secaron en un horno durante 24 h a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . El peso seco se determinó como la diferencia en el peso del filtro con biomasa seca y el peso inicial del filtro dividido entre el volumen filtrado (Ecuación 10).

$$PST = \frac{PSFM - PSF}{VF} \quad (10)$$

Donde:

PST = Peso seco total.

PSFM = Peso del filtro con muestra.

PSF = Peso del filtro sin muestra

VF = Volumen de muestra filtrado ( $\text{m L}^{-1}$ )

El estado del cultivo se evaluó utilizando un fluorómetro AquaPen AP 100 (Photon System Instruments) el cual determina la eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ). Se

tomaron muestras diariamente de cultivo las cuales se incubaron en oscuridad durante 15 min, transcurrido el tiempo se realizó la lectura en el fluorómetro. Además, se realizaron mediciones por espectrofotometría a 450, 680 y 750 nm para determinar carotenos totales, clorofila  $\alpha$  y monitorear el crecimiento algal empleando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific).

#### **6.6.4 Perfil bioquímico**

Los análisis bioquímicos para la determinación de pigmentos, lípidos, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos se realizaron empleando la biomasa liofilizada siguiendo las metodologías previamente descritas en la sección 6.5.

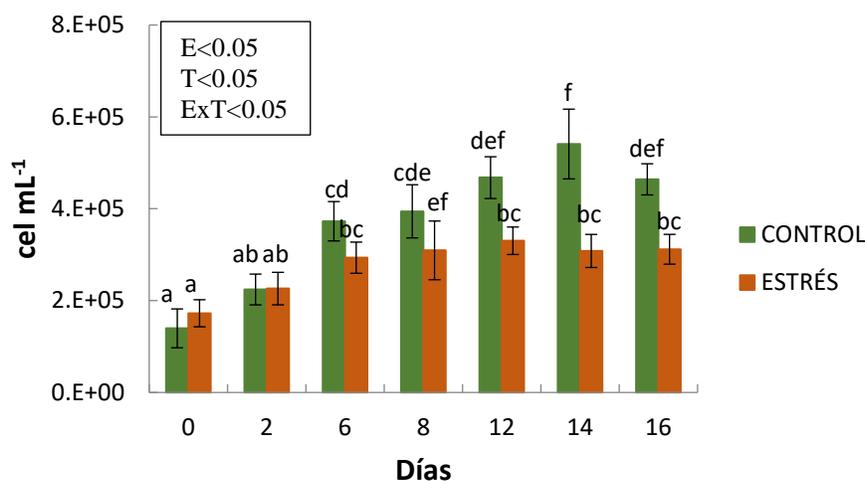
#### **6.7 Análisis estadísticos**

Para los análisis de crecimiento celular, análisis de expresión, perfil bioquímico y estado del cultivo se evaluaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos mediante un ANOVA bifactorial con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Para los análisis de expresión, peso seco y perfil bioquímico (*D. salina* BEA-0001 B) se realizó una prueba de ANOVA de una vía con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Las pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa Statistica 8.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Concentración celular

A partir de los valores obtenidos de la concentración celular se realizaron curvas de crecimiento en las cuales se encontraron diferencias significativas entre el cultivo control y estrés, así como a lo largo del cultivo. La concentración en el cultivo control aumentó significativamente a partir de T6 respecto a T0 alcanzando una concentración máxima de  $5.40 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> en T14, mientras que para el cultivo de estrés hubo un aumento en la concentración en T6 y T8 respecto a T0 sin ningún aumento significativo en el resto de los días de cultivo alcanzando una concentración máxima de  $3.30 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> en T12 (Fig. 7).



**Figura 7.** Crecimiento celular en cultivo control y estrés. Barras indican DE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

### 7.2 Consumo de nitrógeno (NO<sub>3</sub>)

La concentración de nitratos presentó una disminución significativa entre el cultivo control y de estrés, así como a lo largo del cultivo control. En el cultivo control la concentración en T0 fue de  $1827.5 \pm 63.68$   $\mu$ M la cual disminuyó significativamente hasta  $497.0 \pm 64.65$   $\mu$ M en T16. En el cultivo de estrés la concentración de nitratos promedio fue de  $1.7$   $\mu$ M a lo largo del cultivo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración de nitratos ( $\mu\text{M}$ ) en control y estrés.

Tiempo	Control	Estrés
T0	1827.5 $\pm$ 63.68 <sup>e</sup>	1.7 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
T2	1680.0 $\pm$ 36.51 <sup>d</sup>	1.7 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
T8	1166.7 $\pm$ 17.55 <sup>c</sup>	1.7 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
T16	497.0 $\pm$ 64.65 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>

T0, T2, T8 y T16 indican día de cultivo.  $\pm$  representa EE. Letras indican diferencias significativas: ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

### 7.3 Análisis de expresión

#### 7.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados fueron evaluados para determinar la formación de estructuras secundarias y la especificidad respecto a la secuencia blanco para los genes de interés y el gen normalizador (Tabla 6).

#### 7.3.2 Curvas de amplificación y eficiencia

Para los genes de interés PSY, LYCb, ACC, ACS, GPI, PKa y el gen empleado como normalizador  $\alpha\text{T}$  se determinó la amplificación, valor de  $R^2$  y el porcentaje de eficiencia (Tabla 7).

**Tabla 7.** Amplificación, valor de  $R^2$  y porcentaje de eficiencia.

Gen	Amplificación	$R^2$	Eficiencia (%)
Fitoeno sintasa (PSY)	1.78	0.9983	78.21
Licopeno $\beta$ -ciclase (LYCb)	1.97	0.9826	97.55
Acetil CoA Carboxilasa (ACC)	2.06	0.8346	106.51
Acetil CoA Sintetasa (ACS)	2.07	0.9333	107.56
Glicerol-6-fosfato isomerasa (GPI)	1.93	0.9868	101.17
Piruvato quinasa alfa (PKa)	1.94	0.7343	94.15
Alfa tubulina ( $\alpha\text{T}$ )	2.03	0.8851	103.40

**Tabla 8.** Evaluación de estructuras secundarias y especificidad.

Gen	Secuencia	Exón-exón	Primer3plus		Estructuras secundarias				Primer-BLAST	
			Product size(bp)	Tm (°C)	GC (%)	HAIRPIN Tm(°C)	HAIRPIN ( $\Delta G$ kcal/mol)	SELF-DIMER ( $\Delta G$ kcal/mol)		HETERO-DIMER ( $\Delta G$ kcal/mol)
DsaLCYb	F- AGTGGCTGGGTATCAAGGTG	si	106	64.3	55	8 productos: -47.5 y -9.5	8 productos: 0.8 y 1.76	10 productos: -3.14 y -1.47	20 productos: -8.16 y -1.34	2 subproductos: 106 bp (mRNA) 1505 bp (genómico)
	R- CCTCCAATGCCAAGGACACG	no		70.2	60	3 productos: 22.2 y 28	3 productos: -0.2 y 0.19	8 productos: -4.67 y -1.47		
DsaPSY	F- CAGCCTCCTCTTCCTCCTCT	no	82	64.4	60	3 productos: -48.1 y -22	3 productos: 1.4 y 2.7	7 productos: -3.14 y -1.6	4 productos: -3.55 y -1.94	2 productos 82 pb ( <i>d. bardawil</i> )
	R- CTACTCCTGATGCCGCAAAAT	no		64.4	50	8 productos: -3.1 y -45.9	8 productos: 1.48 y 2.44	10 productos: -5.09 y -0.96		
DsaACC	F- GAGGCACCTTTCAAGCAGAG	no	80	64.4	55	1 producto: 32.1	1 producto: -0.52	10 productos: -4.67 y -1.57	17 productos: -6.24 y -1.34	1 resultado: 80 bp (mRNA)
	R- CGCACCTTCTCCTCAGTGTT	si		64.8	55	2 productos: 22.5 y 31	2 productos: -0.57 y 0.18	8 productos: -3.61 y -1.34		
DsaACS	F- CATGGGTCACATCTATCTGACG	si	73	64.7	50	3 productos: 21.3 y 31.4	3 productos: -0.62 y 0.25	13 productos: -5.38 y -1.34	15 productos: -5.99 y -0.96	1 resultado: 73 bp (mRNA)
	R- GTACACCTTCAAAGACCACGCT	no		64.6	50	1 producto: 26.7	1 producto: -0.11	9 productos: -3.65 y -1.34		
DsaPKA	F- ATGGACTCCCAGGGCTACTT	si	97	65.5	50	4 productos: 18 y 31.1	4 productos: -0.42 y 0.41	14 productos: -5.19 y -0.96	17 productos: -5.12 y -0.96	1 resultado: 97 bp (mRNA)
	R- GACAGTGAAGGCGATGATGA	no		65.9	55	2 productos: 45.1 y 50.5	2 productos: -2.3 y -1.39	14 productos: -7.55 y -1.6		
DsaGPI	F- CTTCACCACTGCTGAGACCA	no	100	64.6	55	1 producto: -4.4	1 producto: 1.87	6 productos - 3.61 y -1.47	20 productos: -6.6 y -1.34	1 resultado: 100 bp (mRNA)
	R- TCCTTCACCAGCTTCAGGTT	si		64.2	50	1 producto: 24.8	1 producto: 0.01	8 productos: -7.05 y -1.47		

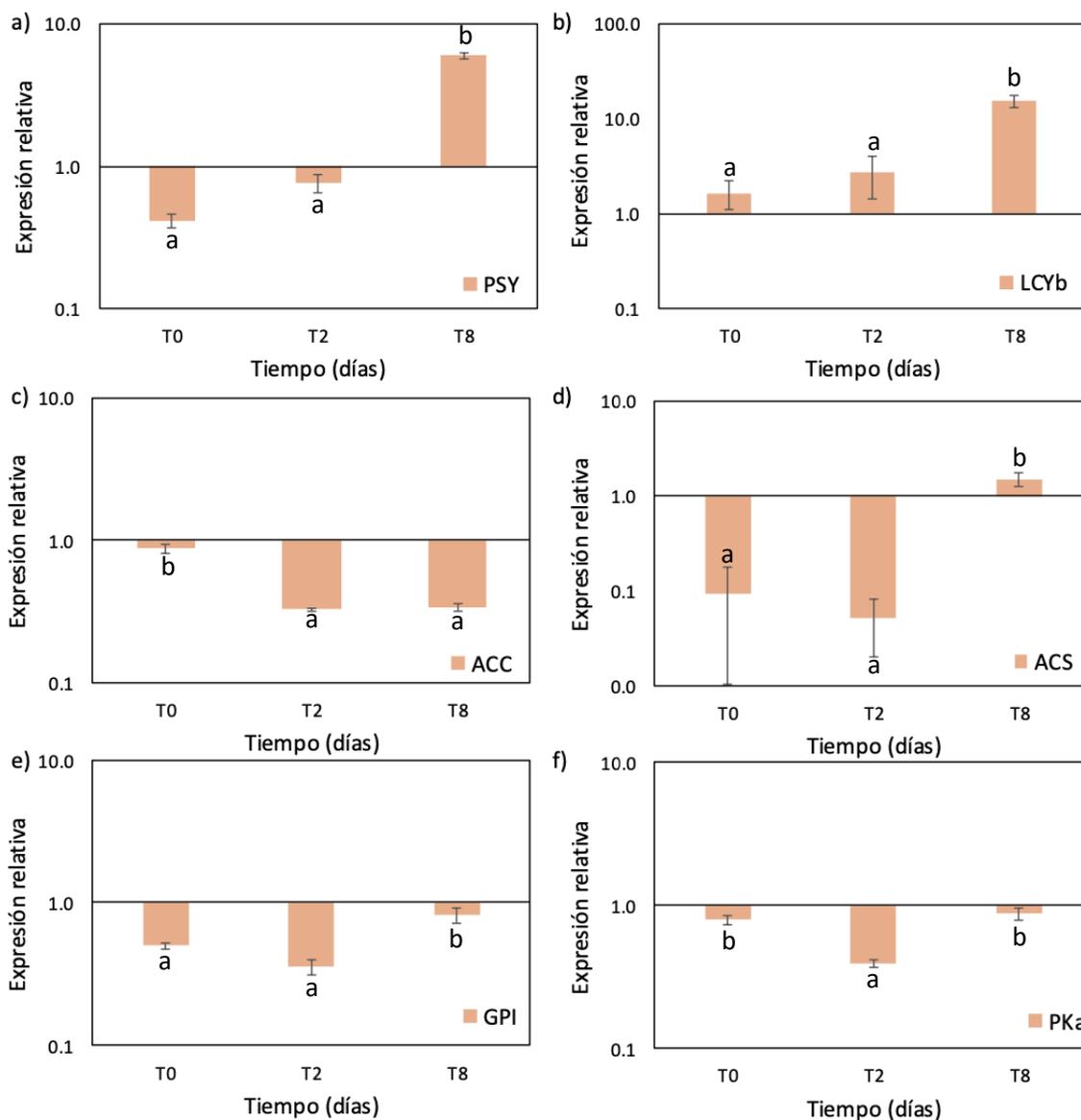
---

Dsa $\alpha$ T	F-CTGCTGGAGCACACTGATGT	no	95	64.8	55	5 productos: 29.7 y 42.8	5 productos: -1.5 y -0.58	14 productos: -6.69 y -1.34	15 productos: -6.31 y -1.34	1 resultado: 95 bp (mRNA)
	R-GTGTAGGTGGGACGCTCAAT	si		64.3	55	2 productos: 14.1 y 31	2 productos: -0.39 y 0.6	10 productos: -3.61 y -0.96		

---

### 7.3.3 Análisis de expresión mediante qPCR

En cuanto a los niveles de expresión relativa se encontraron diferencias significativas a lo largo del cultivo de estrés en todos los genes analizados. Para los genes relacionados con la síntesis de  $\beta$ -caroteno PSY y LCYb se encontró un aumento significativo en T8 de  $6.01 \pm 0.31$  y  $15.39 \pm 2.04$  veces mayor expresión, respectivamente (Fig. 8a y 8b). Los genes relacionados con la síntesis de lípidos presentaron una disminución en sus niveles de expresión, excepto el gen ACS. Para ACC se encontró disminución en los niveles de expresión en todos los tiempos evaluados (Fig. 8c), mientras que ACS tuvo una disminución en T0 y T2 y un aumento en los niveles de expresión de  $1.49 \pm 0.25$  veces en T8 (Fig. 8d). Los genes relacionados con la síntesis de carbohidratos presentaron una disminución en los niveles de expresión. GPI presentó una disminución a lo largo del cultivo con valores de  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.35 \pm 0.04$  y  $0.81 \pm 0.10$  veces menor expresión (Fig. 8e) así mismo para PKa con valores de  $0.78 \pm 0.06$ ,  $0.39 \pm 0.03$  y  $0.87 \pm 0.08$  veces menor expresión (Fig. 8f).



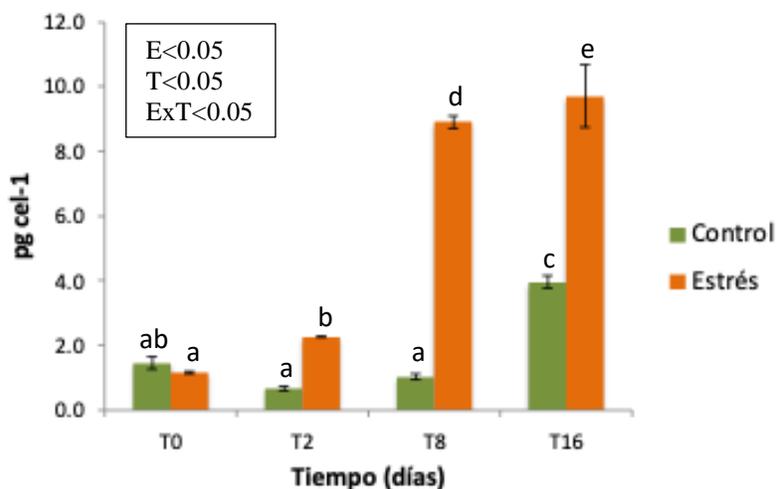
**Figura 8.** Niveles de expresión relativa en el cultivo de estrés respecto al control. a) Fitoeno sintasa (PSY). b) Licopeno  $\beta$ -ciclasa (LCYb). c) Acetil CoA Carboxilasa (ACC). d) Acetil CoA sintetasa (ACS). e) Glicerol 6-fosfato isomerasa (GPI). f) Piruvato quinasa alfa (PKa). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA  $p < 0.05$ .

## 7.4 Perfil bioquímico

### 7.4.1 Perfil de pigmentos

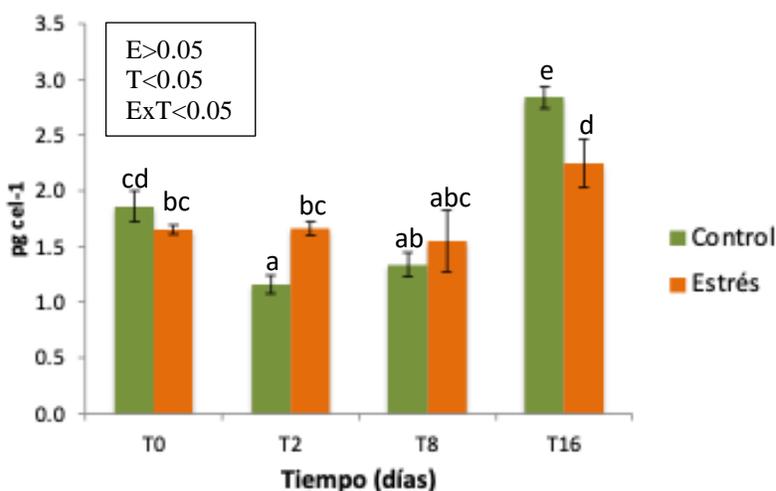
La concentración de  $\beta$ -caroteno presentó un aumento significativo en el cultivo de estrés respecto al control a partir de T2 y hasta el final del cultivo. A lo largo del cultivo control se encontró un aumento significativo respecto a T0 en T16 ( $3.96 \pm 0.31 \text{ pg cel}^{-1}$ ), mientras que en el cultivo de

estrés se encontró un aumento significativo respecto a T0 en T2 ( $2.26 \pm 0.04$  pg cel<sup>-1</sup>), T8 ( $8.90 \pm 0.35$  pg cel<sup>-1</sup>) y T16 ( $9.70 \pm 1.19$  pg cel<sup>-1</sup>) (Fig. 9).



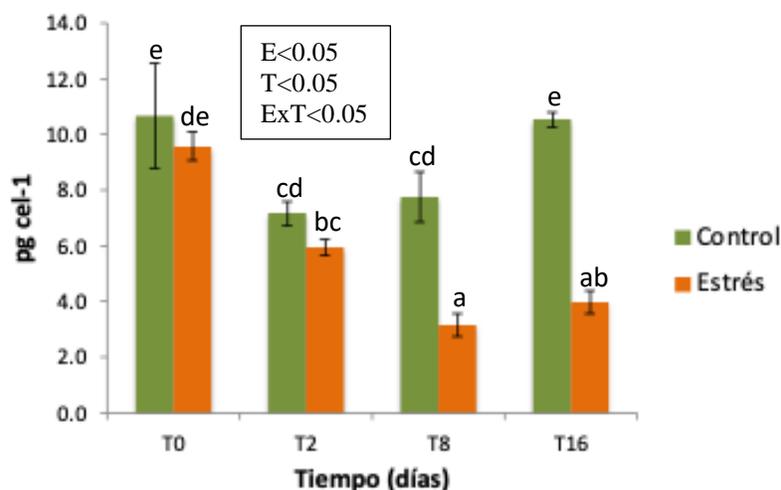
**Figura 9.** Contenido de  $\beta$ -caroteno en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

En cuanto a la concentración de luteína se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en T2 y T16. En T2 hubo un aumento significativo en el cultivo de estrés ( $1.66 \pm 0.09$  pg cel<sup>-1</sup>) mientras que en T16 el aumento se presentó en el cultivo control ( $2.83 \pm 0.10$  pg cel<sup>-1</sup>) (Fig. 10).



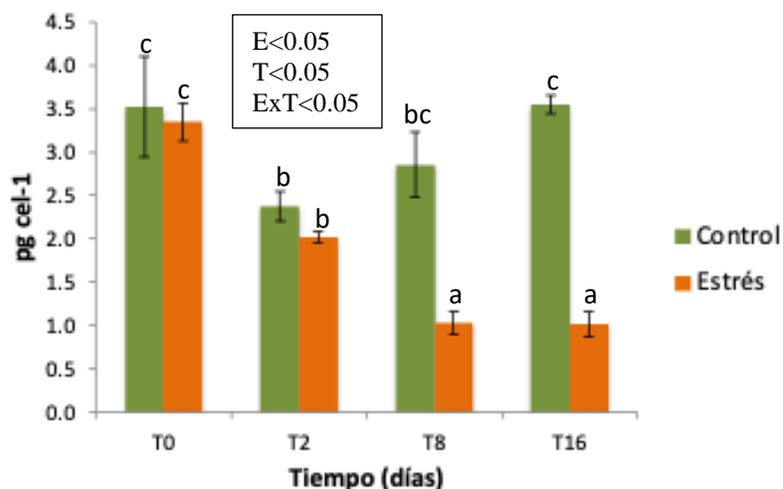
**Figura 10.** Contenido de luteína en control y cultivo con estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

La concentración de clorofila *a* disminuyó significativamente en el cultivo de estrés respecto al control en T8 y T16. En el cultivo control la concentración de clorofila *a* disminuyó significativamente respecto a T0 en T2 ( $7.16 \pm 0.43$  pg cel<sup>-1</sup>) e incrementó en T8 ( $10.53 \pm 0.28$  pg cel<sup>-1</sup>), mientras que en el cultivo de estrés la concentración disminuyó significativamente respecto a T0 en T2 ( $5.95 \pm 0.28$  pg cel<sup>-1</sup>), T8 ( $3.14 \pm 0.40$  pg cel<sup>-1</sup>) y T16 ( $3.96 \pm 0.42$  pg cel<sup>-1</sup>) (Fig. 11).



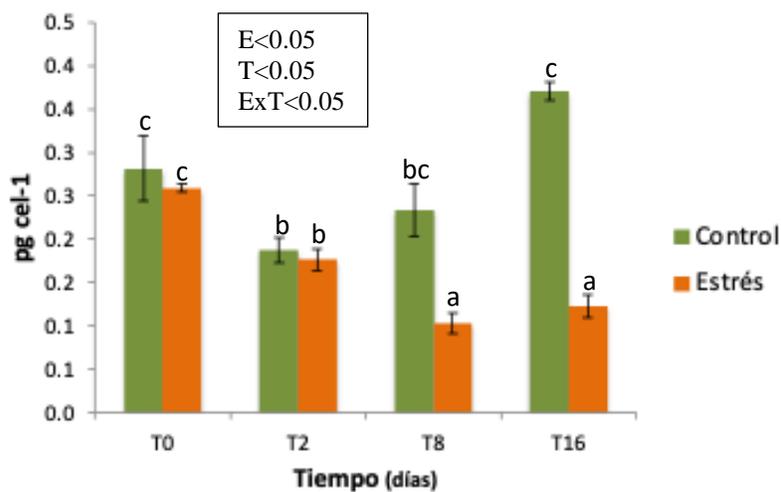
**Figura 11.** Contenido de clorofila *a* en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

De igual forma, la concentración de clorofila *b* disminuyó significativamente en el cultivo de estrés respecto al control en T8 y T16. En el cultivo control la concentración de clorofila *b* disminuyó significativamente respecto a T0 en T2 ( $2.37 \pm 0.17$  pg cel<sup>-1</sup>), mientras que en el cultivo de estrés hubo una disminución significativa respecto a T0 en T2 ( $2.01 \pm 0.06$  pg cel<sup>-1</sup>), T8 ( $1.02 \pm 0.13$  pg cel<sup>-1</sup>) y T16 ( $1.01 \pm 0.14$  pg cel<sup>-1</sup>) (Fig. 12).



**Figura 12.** Contenido de clorofila *b* en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

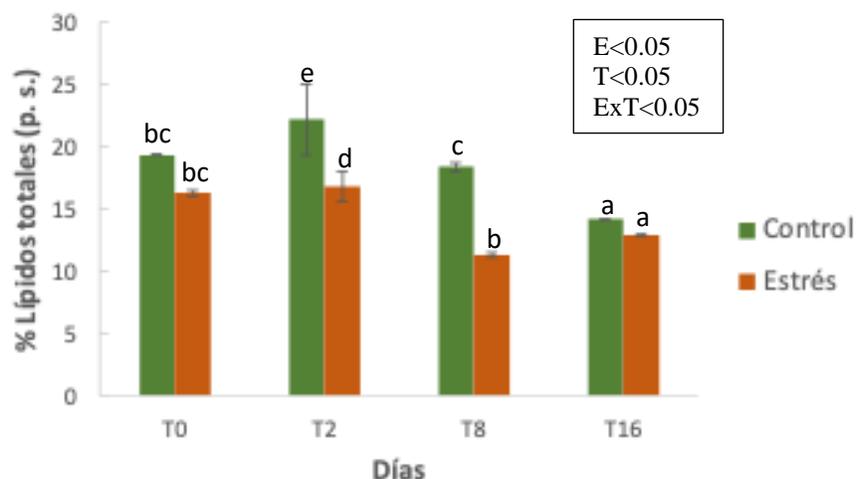
Por último, la concentración de violaxantina fue significativamente mayor en el cultivo control en T8 y T16. En el cultivo control hubo un aumento significativo respecto a T0 en T16 ( $0.37 \pm 0.01$  pg cel<sup>-1</sup>), mientras que en el cultivo de estrés hubo una significativa disminución respecto a T0 en T2 ( $0.17 \pm 0.01$  pg cel<sup>-1</sup>), T8 ( $0.10 \pm 0.01$  pg cel<sup>-1</sup>) y T16 ( $0.12 \pm 0.01$  pg cel<sup>-1</sup>) (Fig. 13).



**Figura 13.** Contenido de violaxantina en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

### 7.4.2 Lípidos totales

En el porcentaje de lípidos totales se observó un aumento en el cultivo control respecto al estrés en T2 y T8. A lo largo del cultivo control y estrés la concentración de lípidos totales incrementó significativamente respecto a T0 en T2 y disminuyó en T8 y T16 (Fig. 14).

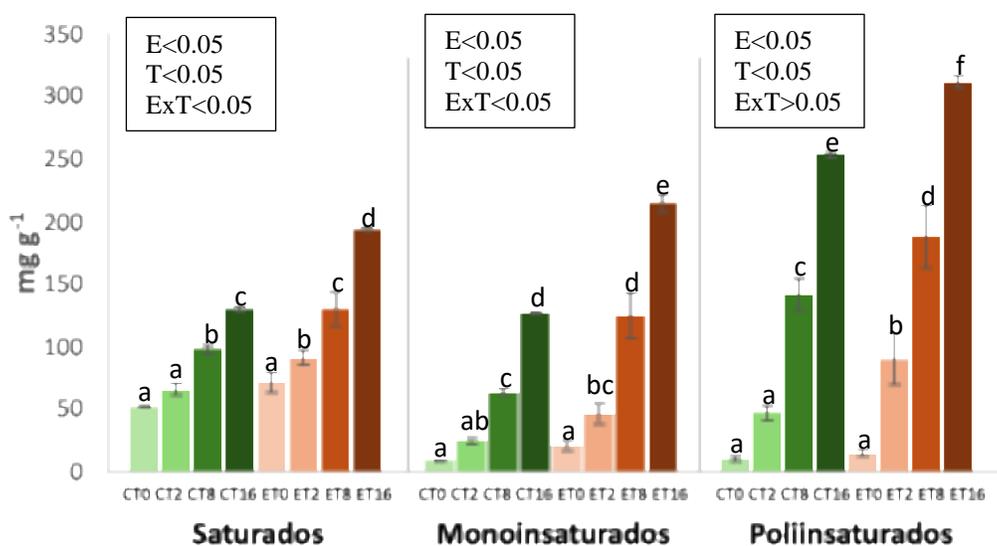


**Figura 14.** Porcentaje de lípidos totales en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

### 7.4.3 Ácidos grasos

Para el análisis del perfil de ácidos grasos se calculó el total de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Se encontró un aumento significativo en el cultivo de estrés para los ácidos grasos saturados y poliinsaturados a partir de T2 y en los monoinsaturados a partir de T8 (Fig. 15). Dentro de los ácidos grasos saturados se observó una mayor concentración del ácido graso 16:0, el cual presentó un aumento significativo en el cultivo de estrés en T2, T8 y T16. A lo largo del cultivo control hubo un aumento significativo de 16:0 respecto a T0 a partir de T8, mientras que en el cultivo de estrés hubo un aumento significativo respecto a T0 a partir de T2. Para los ácidos grasos monoinsaturados se encontró una mayor concentración de 17:1 $\omega$ 8, 18:1 $\omega$ 9 y 18:1 $\omega$ 7. La concentración de 17:1 $\omega$ 8 incrementó significativamente a lo largo del cultivo control y estrés, sin embargo, la concentración fue significativamente menor en el cultivo de estrés en T16. Para el 18:1 $\omega$ 9 se encontró un aumento significativo en el cultivo de estrés respecto al control en T8 y T16. La concentración de 18:1 $\omega$ 9 incrementó significativamente en el cultivo control en T16 y en el cultivo de estrés a partir de T8. La concentración de 18:1 $\omega$ 7 incrementó

significativamente en el cultivo control y estrés a partir de T2. Finalmente, para los ácidos grasos poliinsaturados se encontró una mayor concentración de 18:2 $\omega$ -6 y 18:3 $\omega$ 3. La concentración de 18:2 $\omega$ -6 fue significativamente mayor en el cultivo de estrés a partir de T2. En el cultivo control la concentración de 18:2 $\omega$ -6 incrementó significativamente en T8 y T16 respecto a T0 mientras que para el cultivo de estrés la concentración aumentó a partir de T2 (Tabla 9).



**Figura 15.** Concentración en mg g<sup>-1</sup> de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. C (control), E (Estrés). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial p<0.05.

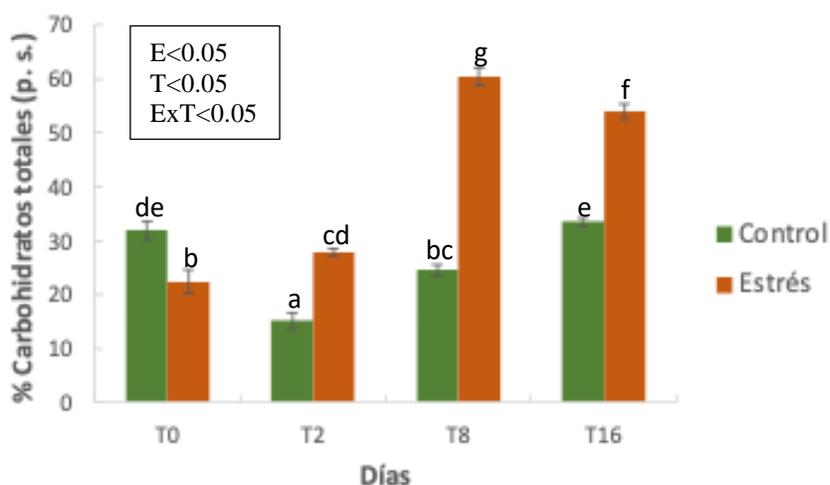
**Tabla 9.** Concentración en mg g<sup>-1</sup> de ácidos grasos en control y estrés.

	CT0	CT2	CT8	CT16	ET0	ET2	ET8	ET16
13:0	1.46±0.17 <sup>a</sup>	2.6±0.34 <sup>b</sup>	4.4±0.22 <sup>c</sup>	5.83±0.53 <sup>d</sup>	2.65±0.36 <sup>b</sup>	2.73±0.42 <sup>b</sup>	2.87±0.16 <sup>b</sup>	2.52±0.2 <sup>b</sup>
14:0	1.49±0.09 <sup>a</sup>	1.73±0.14 <sup>ab</sup>	2.43±0.24 <sup>cd</sup>	4.22±0.14 <sup>e</sup>	2.03±0.14 <sup>bc</sup>	2.08±0.11 <sup>bc</sup>	2.65±0.22 <sup>d</sup>	4.1±0.16 <sup>e</sup>
16:0	31.09±1.12 <sup>a</sup>	41.86±2.71 <sup>a</sup>	61.01±2.96 <sup>b</sup>	99.57±2.03 <sup>c</sup>	43.13±1.44 <sup>a</sup>	58.28±3.62 <sup>b</sup>	95.92±11.38 <sup>c</sup>	163.46±3.61 <sup>d</sup>
17:0	0.55±0.02 <sup>b</sup>	0.46±0.01 <sup>ab</sup>	0.57±0.09 <sup>b</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	0.49±0.12 <sup>ab</sup>	0.5±0.03 <sup>ab</sup>	0.46±0.05 <sup>ab</sup>	0.46±0.06 <sup>ab</sup>
18:0	1.31±0.04 <sup>a</sup>	1.35±0.09 <sup>a</sup>	3.87±2.21 <sup>ab</sup>	3.51±0.18 <sup>ab</sup>	1.47±0.01 <sup>a</sup>	2.66±0.14 <sup>ab</sup>	4.72±0.52 <sup>b</sup>	1.81±0.2 <sup>a</sup>
20:0	0.57±0.03 <sup>a</sup>	0.61±0.05 <sup>a</sup>	1.2±0.15 <sup>ab</sup>	2.42±0.06 <sup>c</sup>	0.77±0.03 <sup>a</sup>	1.51±0.16 <sup>b</sup>	3±0.48 <sup>c</sup>	5.1±0.3 <sup>d</sup>
22:0	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.05 <sup>bc</sup>	0.92±0.07 <sup>d</sup>	0.35±0.03 <sup>ab</sup>	0.61±0.08 <sup>c</sup>	1.39±0.14 <sup>e</sup>	2.17±0.07 <sup>f</sup>
26:0	16.27±0.37 <sup>bc</sup>	12.59±0.95 <sup>ab</sup>	23.01±1.18 <sup>d</sup>	11.82±1.29 <sup>ab</sup>	14.37±0.93 <sup>ab</sup>	21.07±2.15 <sup>cd</sup>	16.26±0.3 <sup>bc</sup>	10.67±3.13 <sup>a</sup>
14:1ω8	0.84±0.08 <sup>a</sup>	1.08±0.16 <sup>a</sup>	2.27±0.02 <sup>b</sup>	4.36±0.32 <sup>c</sup>	1.2±0.05 <sup>a</sup>	1.2±0.19 <sup>a</sup>	2.79±0.42 <sup>b</sup>	6.61±0.68 <sup>d</sup>
15:1ω8	1.69±0.18 <sup>a</sup>	3.37±0.36 <sup>b</sup>	5.18±0.16 <sup>c</sup>	6.15±0.26 <sup>d</sup>	3.05±0.22 <sup>b</sup>	3.15±0.36 <sup>b</sup>	3.24±0.17 <sup>b</sup>	3.2±0.1 <sup>b</sup>
16:1ω9	0.44±0.09 <sup>a</sup>	0.83±0.05 <sup>ab</sup>	1.46±0.23 <sup>c</sup>	2.93±0.15 <sup>e</sup>	0.86±0.1 <sup>ab</sup>	1.16±0.07 <sup>bc</sup>	2.3±0.31 <sup>d</sup>	2.83±0.23 <sup>de</sup>
16:1ω7	2.71±0.17 <sup>a</sup>	5.71±0.33 <sup>bcd</sup>	6.81±0.12 <sup>d</sup>	6.07±0.09 <sup>cd</sup>	4.61±0.3 <sup>b</sup>	4.82±0.48 <sup>b</sup>	5.02±0.57 <sup>bc</sup>	6.05±0.4 <sup>cd</sup>
17:1ω8	0.7±0.13 <sup>a</sup>	6.34±1.04 <sup>ab</sup>	27.06±3.25 <sup>c</sup>	56.71±0.61 <sup>e</sup>	6.21±2.68 <sup>ab</sup>	11.93±4.09 <sup>b</sup>	24.55±3.83 <sup>c</sup>	35.91±1.65 <sup>d</sup>
18:1ω9	0.55±0.18 <sup>a</sup>	3.24±0.38 <sup>a</sup>	12.39±1.22 <sup>a</sup>	35.52±1.46 <sup>b</sup>	1.9±0.63 <sup>a</sup>	16.77±2.69 <sup>a</sup>	70.2±12.46 <sup>c</sup>	131.49±8.37 <sup>d</sup>
18:1ω7	0.25±0.09 <sup>a</sup>	2.00±0.21 <sup>b</sup>	5.31±0.39 <sup>c</sup>	12.6±0.15 <sup>e</sup>	0.05±0.01 <sup>a</sup>	3.99±0.76 <sup>c</sup>	8.29±1.1 <sup>d</sup>	20.19±0.39 <sup>f</sup>
20:1ω9	0.47±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.06 <sup>a</sup>	0.58±0.07 <sup>ab</sup>	0.88±0.03 <sup>ab</sup>	0.62±0.1 <sup>ab</sup>	0.96±0.19 <sup>b</sup>	1.56±0.21 <sup>c</sup>	2.76±0.19 <sup>d</sup>
18:2ω6t	0.29±0.11 <sup>a</sup>	0.71±0.03 <sup>ab</sup>	1.45±0.08 <sup>ab</sup>	2.72±0.07 <sup>b</sup>	5.23±1.81 <sup>c</sup>	1.21±0.18 <sup>ab</sup>	0.41±0.11 <sup>a</sup>	7.49±0.25 <sup>d</sup>
18:2ω6	0.65±0.22 <sup>a</sup>	4.61±0.57 <sup>a</sup>	17.55±1.14 <sup>b</sup>	31.74±0.61 <sup>c</sup>	0.12±0.02 <sup>a</sup>	14.65±3.42 <sup>b</sup>	44.59±6.36 <sup>d</sup>	85.68±2.1 <sup>e</sup>
18:3ω6	0.34±0.08 <sup>a</sup>	1.93±0.24 <sup>ab</sup>	6.76±0.76 <sup>c</sup>	17.39±0.38 <sup>e</sup>	1.92±0.63 <sup>ab</sup>	3.84±1.07 <sup>b</sup>	9.59±1.59 <sup>d</sup>	17.2±1.1 <sup>e</sup>
18:3ω3	3.17±1.13 <sup>a</sup>	33.8±4.55 <sup>b</sup>	108.94±10.25 <sup>c</sup>	195.86±2.15 <sup>d</sup>	0.03±0.01 <sup>a</sup>	57.39±15.35 <sup>b</sup>	122.3±17.16 <sup>c</sup>	190.38±5.82 <sup>d</sup>

C (Control), E (Estrés). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial p<0.05

#### 7.4.4 Carbohidratos totales

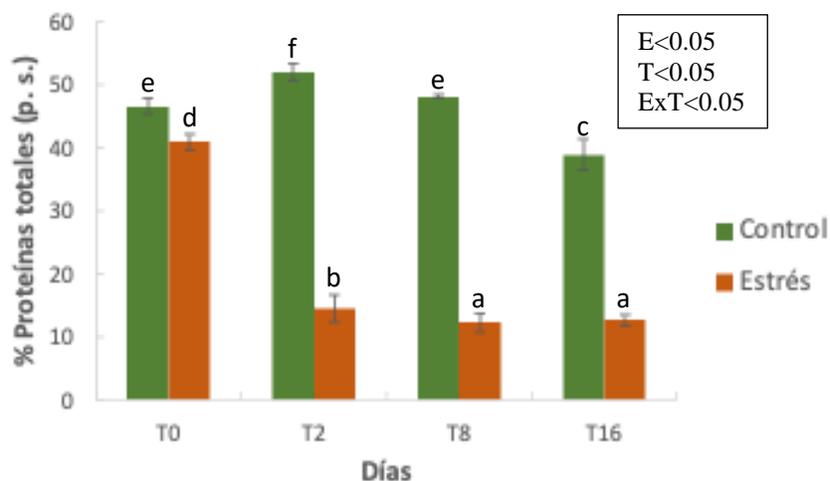
En cuanto a los carbohidratos totales se observó un aumento significativo en la condición de estrés respecto al control en T2, T8 y T16. A lo largo del cultivo control la concentración de carbohidratos totales disminuyó significativamente respecto a T0 en T2 ( $1.15 \pm 2.69 \text{ pg cel}^{-1}$ ) y T8 ( $24.53 \pm 1.80 \text{ pg cel}^{-1}$ ), en el cultivo de estrés la concentración aumentó significativamente en T2 ( $27.80 \pm 1.23 \text{ pg cel}^{-1}$ ), T8 ( $60.37 \pm 2.69 \text{ pg cel}^{-1}$ ) y T16 ( $53.91 \pm 2.44 \text{ pg cel}^{-1}$ ) (Fig. 16).



**Figura 16.** Porcentaje de carbohidratos totales respecto al peso seco en cultivo control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

#### 7.4.5 Proteínas totales

El porcentaje de proteínas totales disminuyó significativamente en el cultivo de estrés respecto al control en todos los tiempos evaluados. A lo largo del cultivo control hubo un aumento significativo respecto a T0 en T2 ( $52.00 \pm 2.45 \text{ pg cel}^{-1}$ ) y una significativa disminución en T16 ( $38.89 \pm 4.22 \text{ pg cel}^{-1}$ ), mientras que en el cultivo de estrés hubo una significativa disminución a partir de T2 (Fig. 17).

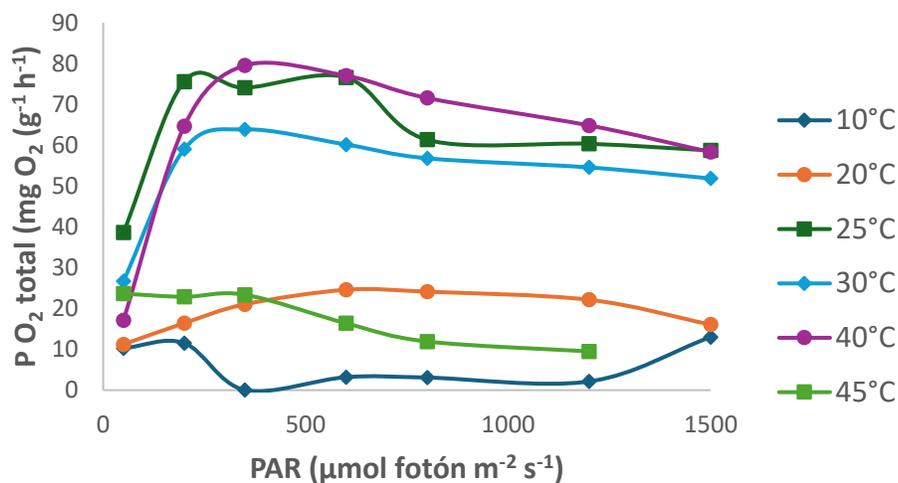


**Figura 17.** Porcentaje de proteínas totales en control y estrés. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

## 7.5 Estrategia de producción de biomasa

### 7.5.1 Fotosíntesis neta

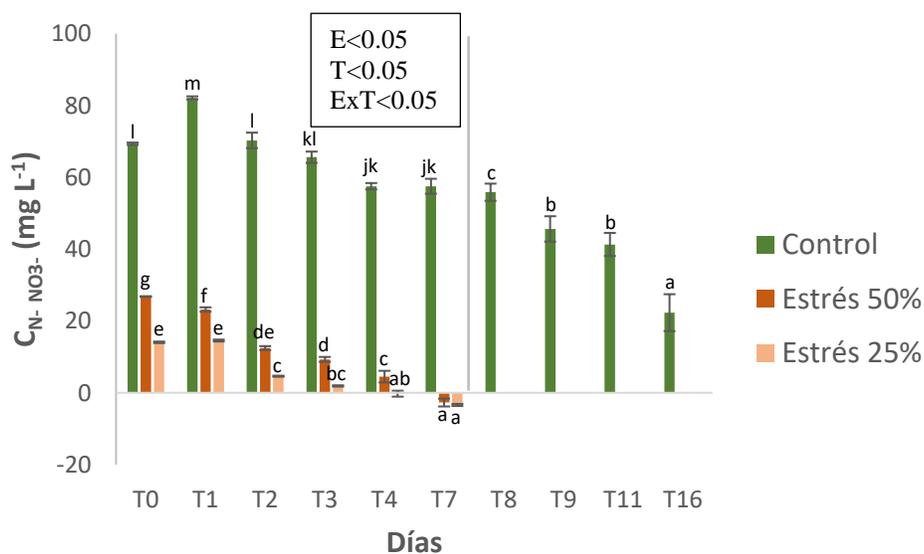
La tasa de fotosíntesis neta más baja se registró a las temperaturas de 10, 20 y 45°C. A 10°C la tasa de fotosíntesis fue de  $0.03 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a 20°C fue de  $11.21 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; y a 45°C de  $9.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $1200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los valores más altos de fotosíntesis se obtuvieron en las temperaturas de 25, 30 y 40°C. A 25°C la tasa de fotosíntesis fue de  $76.57 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $600 \text{ fotón } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; a 30°C fue de  $63.88 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; y a 40°C fue de  $79.52 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una intensidad luminosa de  $350 \text{ fotón } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 18).



**Figura 18.** Tasa de fotosíntesis neta.

### 7.5.2 Consumo de nitrógeno

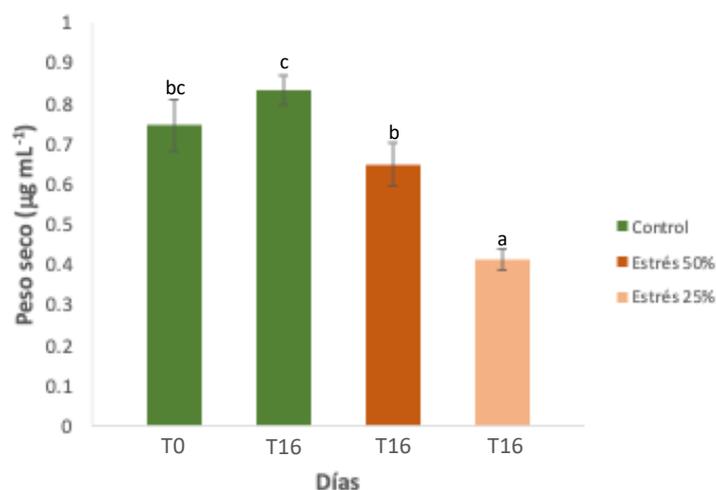
El consumo de nitrógeno fue monitoreado a lo largo del cultivo, de T0 a T7 se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo y entre los tratamientos, observándose una significativa disminución en la concentración de nitrógeno en los cultivos de estrés, de T8 a T16 se encontró una disminución significativa a lo largo del cultivo control (Fig. 19).



**Figura 19.** Consumo de nitrógeno. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. T0 a T7 ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ . A partir del T8 a T16 se usó un ANOVA unifactorial  $p < 0.05$ .

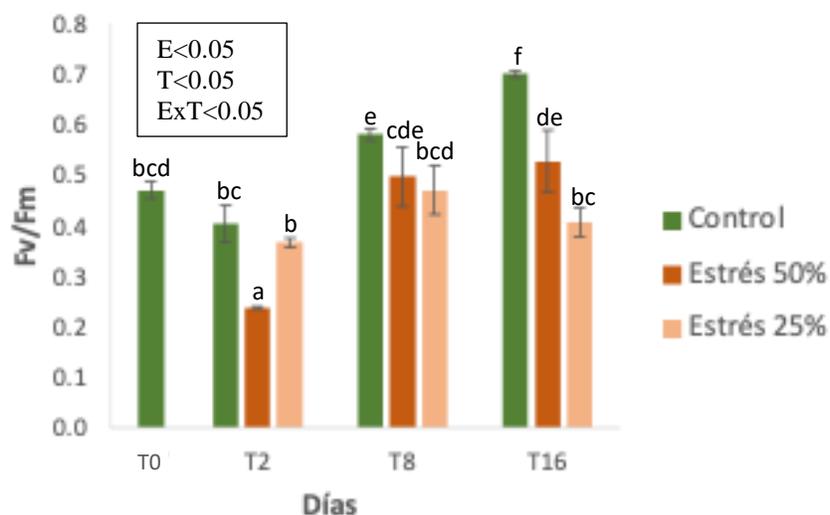
### 7.5.3 Productividad de biomasa y estado del cultivo

En la determinación de peso seco se observó un aumento en el cultivo control entre T0 y T16, sin embargo, este no fue estadísticamente significativo; para los cultivos de estrés 50% y 25% se tuvo una significativa disminución en el peso seco en T16 respecto a T0 (Fig. 20).



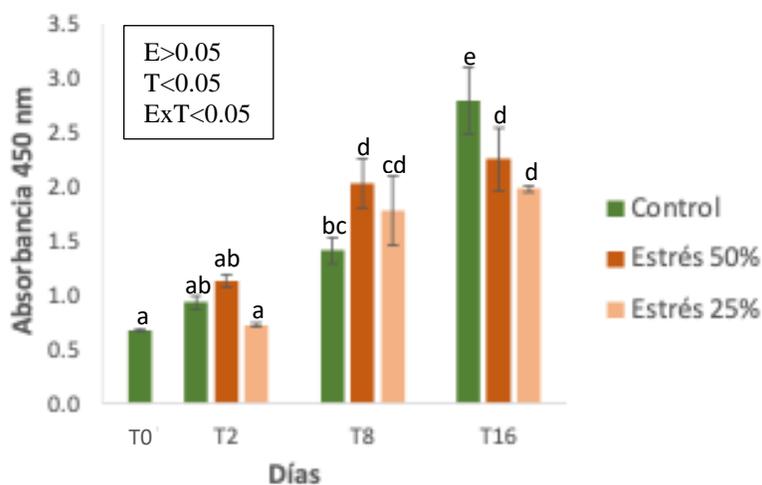
**Figura 20.** Determinación de peso seco en T0 y T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA  $p < 0.05$ .

La eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ) presentó cambios significativos a lo largo del cultivo y entre los tratamientos evaluados. En el cultivo control se observó un aumento significativo en T8 y 16, en el cultivo de estrés 50% se presentó una significativa disminución en T2 seguido de un aumento en T8 y T16, mientras que en el cultivo de estrés 25% no se encontraron diferencias significativas a lo largo del cultivo (Fig. 21).



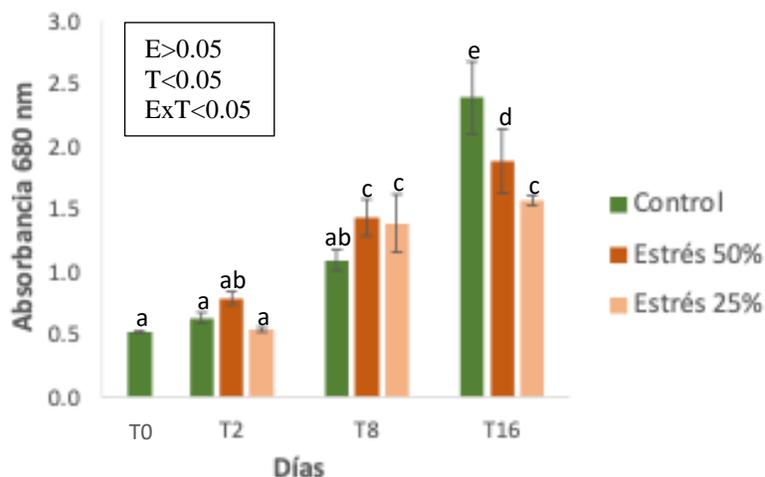
**Figura 21.** Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ). Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

Para la lectura a 450 nm se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En el cultivo control se observó un aumento significativo en T16, en el cultivo de estrés 50% hubo un aumento significativo a partir de T8, mientras que en el cultivo de estrés 25% se presentó un aumento significativo en T8 (Fig. 22).



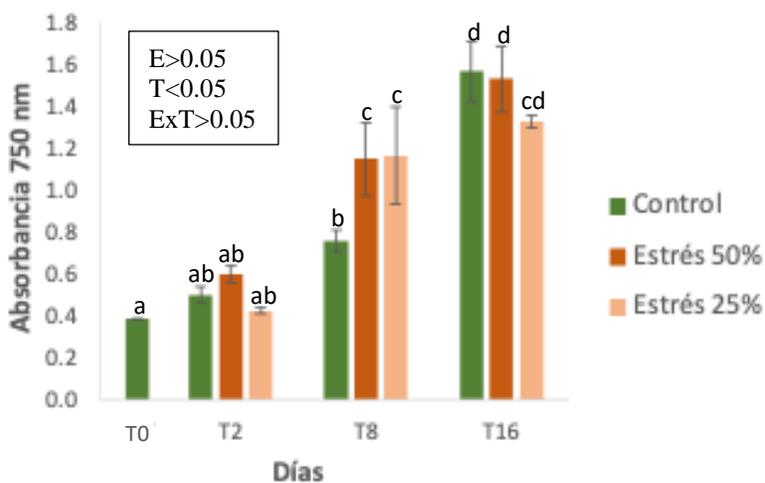
**Figura 22.** Valores de absorbancia a 450 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

La absorbancia a 680 nm presentó diferencias significativas en los tratamientos. Para el cultivo control se observó un aumento significativo en T16, para el cultivo de estrés 50% hubo un aumento significativo en T8 y T16, mientras que para el cultivo de estrés 25% se presentó un aumento significativo en T8 (Fig. 23).



**Figura 23.** Valores de absorbancia a 680 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

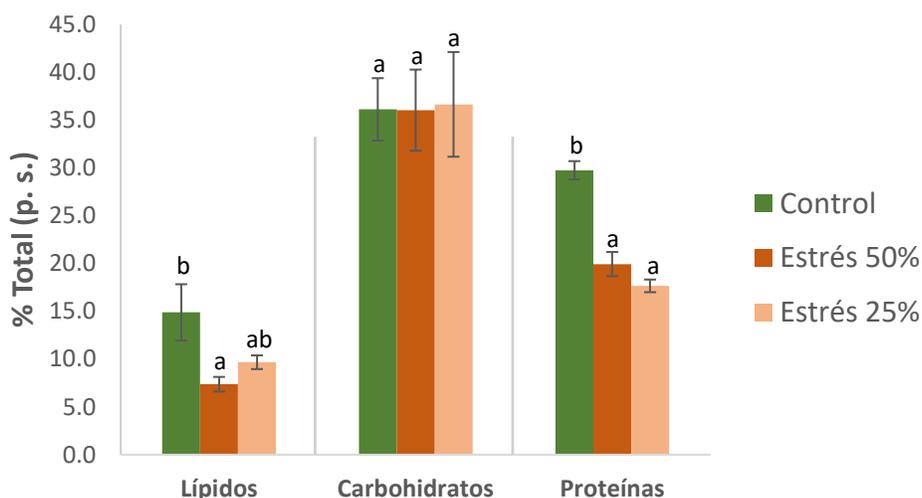
En cuanto a la absorbancia de 750 nm, se encontró un aumento significativo entre los tratamientos. En el cultivo control y estrés 50% hubo un aumento en T8 y T16, mientras que en el cultivo de estrés 25% se encontró un aumento en T8 (Fig. 24).



**Figura 24.** Valores de absorbancia a 750 nm. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA bifactorial  $p < 0.05$ .

### 7.5.4 Perfil bioquímico

En el análisis de lípidos, carbohidratos y proteínas totales se encontró una disminución significativa en el porcentaje de lípidos y proteínas en los tratamientos de estrés, mientras que para los carbohidratos no se encontraron diferencias entre los tratamientos. La concentración de lípidos (Fig. 25).



**Figura 25.** Porcentaje total en peso seco de lípidos, carbohidratos y proteínas totales en T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA  $p < 0.05$ .

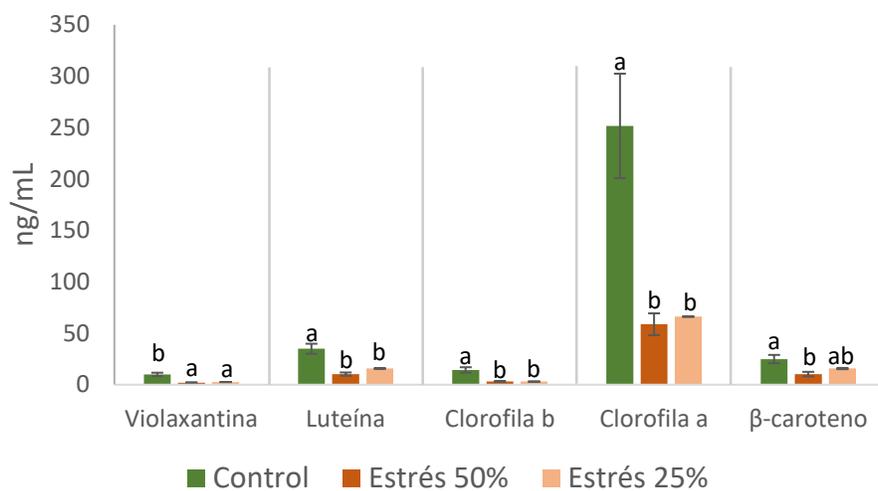
En el perfil de ácidos grasos se analizó la concentración de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en los cultivos control, estrés 50% y estrés 25%. Dentro de los ácidos grasos saturados se encontró una mayor concentración de 16:0, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Para los ácidos grasos monoinsaturados se encontró una mayor concentración de 17:1 $\omega$ 8 y 18:1 $\omega$ 9, donde 18:1 $\omega$ -9 tuvo un aumento significativo en los tratamientos de estrés. Por último, para los ácidos grasos poliinsaturados se encontraron en mayor concentración el 18:2 $\omega$ 6 y el 18:3 $\omega$ 3 para los cuales se obtuvo una significativa disminución en el 18:3 $\omega$ 3 para los tratamientos de estrés respecto al control (Tabla 10).

**Tabla 10.** Perfil de ácidos grasos en mg g<sup>-1</sup> de *D. salina* BEA-0001 B en T16.

	Control	Estrés 50%	Estrés 25%
13:0	1.70±0.46 <sup>b</sup>	0.61±0.15 <sup>a</sup>	0.41±0.02 <sup>a</sup>
14:0	0.39±0.05 <sup>a</sup>	0.53±0.09 <sup>a</sup>	0.35±0.06 <sup>a</sup>
16:0	16.95±4.44 <sup>a</sup>	19.46±0.93 <sup>a</sup>	15.80±1.77 <sup>a</sup>
17:0	0.15±0.05 <sup>a</sup>	0.20±0.05 <sup>a</sup>	0.20±0.08 <sup>a</sup>
18:0	2.03±1.07 <sup>a</sup>	1.83±0.06 <sup>a</sup>	2.00±0.46 <sup>a</sup>
20:0	1.96±0.42 <sup>a</sup>	1.86±0.21 <sup>a</sup>	1.58±0.17 <sup>a</sup>
22:0	1.97±0.38 <sup>a</sup>	2.05±0.26 <sup>a</sup>	1.95±0.24 <sup>a</sup>
14:1ω8	2.25±0.58 <sup>a</sup>	1.54±0.50 <sup>a</sup>	1.32±0.19 <sup>a</sup>
15:1ω8	0.04±0.01 <sup>a</sup>	0.04±0.02 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>a</sup>
16:1ω9	0.39±0.13 <sup>a</sup>	0.72±0.06 <sup>a</sup>	0.62±0.11 <sup>a</sup>
16:1ω7	1.93±0.48 <sup>a</sup>	1.37±0.16 <sup>a</sup>	1.24±0.38 <sup>a</sup>
17:1ω8	14.21±3.66 <sup>a</sup>	7.79±1.90 <sup>a</sup>	6.26±0.47 <sup>a</sup>
18:1ω9	6.51±1.55 <sup>a</sup>	16.12±0.65 <sup>b</sup>	14.12±1.88 <sup>b</sup>
18:1ω7	1.36±0.30 <sup>a</sup>	2.52±0.50 <sup>a</sup>	1.96±0.70 <sup>a</sup>
20:1ω9	0.20±0.06 <sup>a</sup>	0.34±0.03 <sup>b</sup>	0.30±0.01 <sup>ab</sup>
18:2ω6t	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.02 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>a</sup>
18:2ω6	8.96±1.76 <sup>a</sup>	13.41±1.17 <sup>a</sup>	11.00±1.22 <sup>a</sup>
18:3ω6	0.07±0.04 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.05 <sup>a</sup>
18:3ω3	72.58±5.73 <sup>b</sup>	36.11±6.65 <sup>a</sup>	28.23±2.09 <sup>a</sup>

Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA p<0.05.

En cuanto al perfil de pigmentos, se encontró una significativa disminución de todos los pigmentos evaluados en los tratamientos de estrés. La clorofila *a* fue el pigmento que presentó una mayor concentración tanto en cultivo control, como en los tratamientos de estrés, aunque en estos últimos la concentración disminuyó significativamente. La concentración de β-caroteno disminuyó significativamente respecto al control en el tratamiento de estrés 50%, mientras que en el cultivo de estrés 25% no se encontraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 26).



**Figura 26.** Concentración en  $\text{ng mL}^{-1}$  de pigmentos en T16. Barras indican EE. Letras indican diferencias significativas. ANOVA  $p < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

La deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura provocaron en la cepa nativa *D. salina* CIBA-29 una disminución en la concentración celular, así como cambios en su metabolismo dirigiéndolo hacia la síntesis y acumulación de  $\beta$ -caroteno además de una disminución en la concentración de clorofilas y violaxantina. Dichas condiciones de estrés estimularon un aumento en la concentración de carbohidratos, una disminución en el porcentaje de proteínas y lípidos totales y cambios en el perfil de ácidos grasos. A nivel genético, la condición de estrés ocasionó un aumento en los niveles de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno y lípidos (Fig. 27).

En cuanto a los niveles de expresión, la condición de estrés evaluada incrementó los niveles de expresión de los genes fitoeno sintasa (PSY) y licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYb) los cuales tienen un papel vital en la ruta biosintética de carotenoides, contribuyendo a la producción de  $\beta$ -caroteno en *D. salina* (Yuan et al., 2005; Zhu et al., 2008). En este estudio, los niveles de expresión para el gen PSY fueron 6 veces mayor en T8 en el cultivo de estrés respecto al control. En *D. salina* Sánchez-Estudillo et al. (2006) reportan expresión constante del gen PSY en cultivo con suficiencia y deficiencia de nitrógeno, mientras que Coesel et al. (2008) obtuvieron un aumento de 22 veces en los niveles de ARNm en cultivo en deficiencia nutrientes en combinación con estrés salino (NaCl 18%), al igual que Zhu et al. (2020) observaron un aumento de la expresión de 1 a 1.5 veces en deficiencia de nitrógeno y elevada salinidad ( $180 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) y 1.5 a 2 veces en elevada intensidad luminosa ( $1000 \text{ lux}$ ). Sin embargo, se ha reportado para *D. salina* disminución en los niveles de expresión de PSY en cultivo con elevada salinidad ( $3\text{M NaCl}$ ), elevada intensidad luminosa ( $1000 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y elevada temperatura ( $34 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Zarandi-Miandoab et al., 2015), en *D. bardawil* se ha reportado disminución de la expresión de PSY en cultivo con elevada intensidad luminosa ( $690 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Rabbani et al., 1998). Los niveles de expresión para el gen LCYb presentaron un aumento de 2.73 veces en T2 y 15.39 veces mayor expresión en T8 en el cultivo de estrés respecto al control. Se ha reportado para *D. salina* un aumento en los niveles de transcritos de ARNm de LCYb en cultivo bajo elevada salinidad (18% NaCl) y deficiencia de nutrientes (Ramos et al., 2008) y un aumento de 10 veces en los transcritos de ARNm en condiciones de elevada salinidad ( $2\text{M NaCl}$ ), elevada intensidad luminosa ( $540 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

<sup>1</sup>) y deficiencia de nitrógeno (Elleuch et al., 2019). En cuanto a los niveles de expresión relativa, Zhu et al. (2020) reportan aumento de 1 a 1.5 veces bajo deficiencia de nitrógeno y elevada salinidad (180 g L<sup>-1</sup> NaCl) y >2 veces bajo elevada intensidad luminosa (1000 lux), Lan et al. (2022) reportan aumento de 5, 2, 3.5 y 4.4 veces en diferentes cepas de *D. salina* con sobre expresión del gen LCYb, así como aumento de 2.2 y 5.50 veces en cultivo con luz blanca y luz roja. En *D. bardawil* se ha reportado aumento de 5 veces mayor expresión de LCYb en condiciones de elevada salinidad (3M NaCl), 9 veces al incrementar la salinidad (4.5M NaCl) (Lao et al., 2014) y 10 veces mayor expresión en cultivo con elevada salinidad (4M NaCl) (Liang et al., 2017).

Los niveles de expresión de los genes relacionados con la síntesis de lípidos acetil-CoA carboxilasa (ACC) disminuyeron en el cultivo de estrés respecto al control en todos los tiempos evaluados, mientras que los niveles de acetil CoA sintetasa (ACS) incrementaron 1.49 veces en T8. Para ACC se ha reportado en *D. salina* un aumento de 2.6 veces mayor expresión en cultivo con elevada salinidad (100 g L<sup>-1</sup> NaCl) (Gangali et al., 2019), sin embargo, He et al. (2020) reportan disminución en la expresión en cultivo con elevada salinidad (2.5M NaCl) y temperatura de 20 °C, y en *Dunaliella* sp. Talebi et al. (2015) reportan disminución de la expresión de ACC en cultivo con mioinositol. Hasta el momento no se han encontrado reportes sobre los niveles de expresión de ACS en *D. salina*. Liang et al. (2017) reportan en *D. tertiolecta* un aumento de 3 veces mayor expresión de ACS en cultivo con deficiencia de nitrógeno y 1.5 veces en cultivo con elevada salinidad (1.5M NaCl) y Avida y Pick (2015) reportan en *D. tertiolecta* disminución en los niveles de expresión en cultivo con deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa (400 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y temperatura de 24 °C.

Los genes evaluados que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de carbohidratos glicerol-6-fosfato-isomerasa (GPI) y piruvato quinasa alfa, presentaron una disminución en los niveles de expresión en todos los tiempos evaluados. He et al. (2020) reportan en *D. salina* disminución en los niveles de expresión de GPI y aumento de 1.5 veces mayor expresión de PKa en cultivo con elevada salinidad (2.5M NaCl) y temperatura de 20 °C.

Los pigmentos como clorofilas, β-caroteno, violaxantina y licopeno son componentes esenciales que contribuyen a la coloración, fotosíntesis y respuesta a estrés en *D. salina* (Silva et al., 2020,

Xu et al., 2018). El contenido de clorofilas ha sido empleado como un indicador del estrés fisiológico (Chantzistrountsiou et al., 2023). Se ha reportado que el contenido de clorofilas disminuye en cultivo con deficiencia de nitrógeno (Lv et al., 2016; Mirshekari et al., 2019, Mojaat et al., 2008), mientras que la concentración de carotenoides aumenta (Saha et al., 2018; Kim et al., 2013) lo cual se observó en la condición de estrés evaluada donde se obtuvo un aumento en la síntesis de  $\beta$ -caroteno y una disminución en la concentración de clorofila *a* y *b*. Se ha reportado en *D. salina* concentraciones de  $\beta$ -caroteno de 0.6 pg cel<sup>-1</sup> bajo deficiencia de nitrato, intensidad luminosa de 80, 100 y 150  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 21 °C (Vorst et al., 1995); 4.43 pg cel<sup>-1</sup> en cultivo mixotrófico adicionado con glicerol (12.5 mM), salinidad de 3M (NaCl) e intensidad luminosa de 50  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Capa-Robles, et al., 2021); 5 pg cel<sup>-1</sup> en cultivo con agua de mar (0.6M NaCl), irradiancia de 60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 25°C (Jesus et al., 2010); 6.38 pg cel<sup>-1</sup> en medio con 2.5M NaCl, irradiancia de 50  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 25 °C (Orset y Young, 2000); 8.2 pg cel<sup>-1</sup> en cultivo con deficiencia de nitrógeno, salinidad de 3M NaCl, intensidad luminosa de 110  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 35 °C (Pisal y Lele, 2005). La luteína está involucrada tanto en protección contra estrés en la mitocondria como en su biogénesis, tiene un papel en la reducción del desarrollo y progreso de la degeneración macular asociada a la edad, así como propiedades anticancerígenas (Jin y Melis, 2003; Fu et al., 2014; Xu et al., 2018). La acumulación de luteína también se ha reportado tiene una correlación con el contenido de clorofila *a* y *b* en *D. salina* sugiriendo que la acumulación de luteína es regulada de la misma manera que la síntesis de clorofilas (Fu et al., 2014), lo cual se observó en el cultivo control, donde el contenido de luteína disminuyó en T2 e incrementó en T16, al igual que la concentración de clorofila *a* y *b*. Sin embargo, para la condición de estrés evaluada, la concentración de luteína incrementó en T16, mientras que la concentración de clorofilas disminuyó indicando que la condición de estrés evaluada estimula la síntesis de luteína a pesar de la disminución en las clorofilas. Xu et al. (2018) reportaron para *D. salina* UTEX2538 una concentración de luteína de 1.5 pg cel<sup>-1</sup> en cultivo con intensidad luminosa de 1000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Hernández-Acevedo et al. (2022) reportan una concentración de luteína de 2.03 pg cel<sup>-1</sup> en cultivo con elevada salinidad (35 UPS) y una concentración de nitrógeno de 150 g L<sup>-1</sup>. Por último, la violaxantina disminuyó en el cultivo de estrés. Cuando las algas verdes están expuestas a una irradiancia mayor a la necesaria para realizar los procesos de fotosíntesis el cloroplasto experimenta una des-epoxidación de la violaxantina para formar anteraxantina y

subsecuentemente zeaxantina, resultando en la acumulación de zeaxantina en los tilacoides del cloroplasto (Jin et al., 2003a; Jin et al., 2003b), lo que puede explicar la disminución en la concentración de violaxantina encontrada en el presente trabajo.

La concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos en las microalgas es afectada por factores ambientales como la intensidad luminosa, salinidad y disponibilidad de nutrientes (Khatoon et al., 2017). El porcentaje de lípidos totales tuvo una concentración máxima en el cultivo control de 22.19% en T2, mientras que en el cultivo de estrés fue de 16.86% en T2. Weldy y Huesemann (2007) reportaron en *D. salina* una concentración de lípidos de 44% en cultivo con concentración de nitrógeno de 2-20 mM, elevada intensidad luminosa ( $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura de 28 °C. Almutairi (2020) obtuvo un 22.85% de lípidos en cultivo con deficiencia de nitrógeno y fósforo, una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 25 °C. El-Baky et al. (2014) reportaron un 40.65% de lípidos en cultivo con suplementación de  $\text{CO}_2$  (12%), salinidad de 8% NaCl, intensidad luminosa de  $200 \text{ W m}^{-2}$  y temperatura de 27 °C. Yuan et al. (2019) reportaron un 43.8% de lípidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno. En *D. tertiolecta* se ha reportado un porcentaje de lípidos de 4.5-5.5% en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Tan et al., 2016). En cuanto a los carbohidratos, la condición de estrés provocó un aumento de 60.37% en T8. Se ha reportado para *D. salina* un contenido de carbohidratos de 25% en cultivo con intensidad luminosa de  $86 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 20 °C (Pavón-Suriano et al., 2018) y 50.6% en cultivo adicionado con 10%  $\text{CO}_2$  y elevada intensidad luminosa ( $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Yuan et al., 2019) En *D. tertiolecta* se ha reportado un 59.4% de carbohidratos en cultivo con 0 UPS de salinidad e intensidad luminosa de  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rizwan et al., 2020). Por otro lado, el porcentaje de proteínas en el cultivo de estrés disminuyó a 12% respecto al control, debido a la deficiencia de nitrógeno, elemento esencial en la biosíntesis de aminoácidos, mientras que en el cultivo control el porcentaje de proteínas alcanzó sus valores más altos al día 2 de cultivo con 52%. Se ha reportado para *D. salina* un 57% de proteínas (Becker, 2007), 45% en cultivo con intensidad luminosa de  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en cultivo con luz roja (Sui y Harvey, 2021) y 81% en cultivo con elevada salinidad (2M NaCl) y pH de 7.5 (Sui et al., 2019). A pesar de que se ha reportado que el contenido de lípidos en *D. salina* puede incrementar bajo diferentes condiciones de estrés con la formación de glóbulos lipídicos para la acumulación de carotenoides en el cloroplasto (Mai et al., 2017), el contenido de lípidos en el presente trabajo disminuyó en la

condición de estrés evaluada. Diversos estudios han demostrado que el carbono microalgal se distribuye hacia compuestos ricos en energía en condiciones de estrés, por lo que hay una competencia entre la síntesis de lípidos y de almidón; el estrés por deficiencia de nitrógeno provoca una reducción en el contenido de proteínas, incrementando la producción de compuestos ricos en energía como lípidos y almidón, de los cuales el almidón es el primero en ser sintetizado como reserva de energía y posteriormente los lípidos son producidos como mecanismo de energía a largo plazo (Siaut et al., 2011; Ho et al., 2012) lo cual puede explicar el comportamiento observado en la condición de estrés evaluada en el presente trabajo donde se tuvo una disminución en el porcentaje de proteínas así como en los lípidos totales mientras que hubo un aumento significativo en el contenido de carbohidratos totales.

En condiciones de estrés abiótico, *D. salina* es capaz de cambiar no solo el contenido total de ácidos grasos, sino también la composición de estos (Ramos et al., 2011). Comprender las características morfológicas y la composición de ácidos grasos del complejo lipídico de *D. salina* es esencial para elucidar su metabolismo lipídico y las potenciales aplicaciones en la producción de biocombustibles (Dolganyuk et al., 2020). En este estudio, se presentó un aumento significativo en la concentración de los ácidos grasos 16:0, 18:1 $\omega$ 9, 18:1 $\omega$ 7 y 18:2 $\omega$ 6 y disminución para 17:1 $\omega$ 8. Además, el ácido graso 18:3 $\omega$ 3, se encontró en mayor concentración tanto en cultivo control como estrés, el cual está relacionado con los galactolípidos de las membranas tilacoidales (Lamers et al., 2010). Se ha reportado en *D. salina* grandes cantidades de ácidos grasos de los cuales cerca del 50% son ácidos grasos mono y poliinsaturados principalmente 16:0, 18:3 y 18:1 (Cakmak et al., 2014). Lamers et al. (2012) reportaron la presencia de los ácidos grasos 16:0 a 16:4 y 18:0 a 18:3 en *D. salina* bajo deficiencia de nitrógeno, donde el contenido de 16:1, 16:3, 16:4 y 18:3 disminuye conforme a la deficiencia de nitrógeno, mientras que 16:0, 16:2, 18:0, 18:1 y 18:2 aumentan. En cultivo con alta intensidad luminosa (1,400  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se reporta un aumento en la concentración de 16:0, 18:1 y 18:2, y una disminución de 18:3 y 16:4 (Lamers et al. 2010). La correlación entre el aumento de 18:1 y la concentración de  $\beta$ -caroteno puede deberse a que la sobreproducción de  $\beta$ -caroteno es incentivada por la formación de glóbulos lipídicos, los cuales secuestran y transportan el  $\beta$ -caroteno fuera del cloroplasto para evitar la inhibición de su síntesis por acumulación (Lamers et al., 2010).

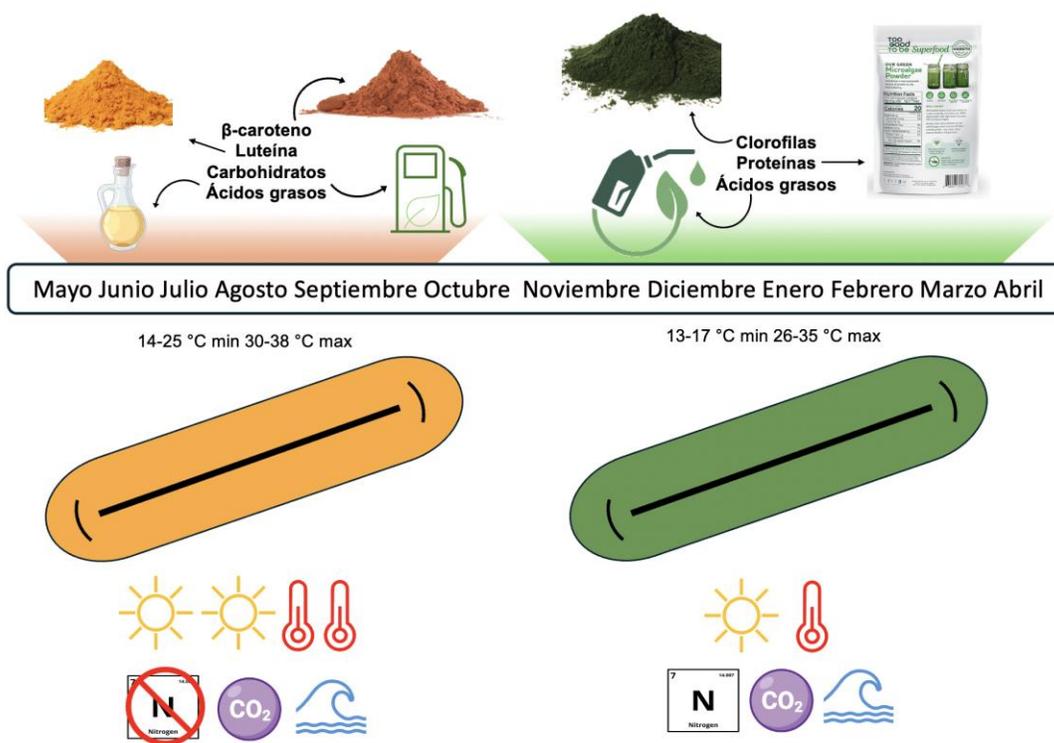
La estrategia de producción de biomasa empleando la cepa *D. salina* BEA-0001 cultivada en deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y la adición de acetato de sodio (20 mM) como fuente de carbono orgánico provocó una disminución en el peso seco, un aumento en la actividad fotosintética (Fv/Fm), así como un aumento en la medición por absorbancia de carotenoides (450 nm), clorofilas (680 nm) y crecimiento algal (750 nm). Sin embargo, en el perfil de pigmentos no se observó incremento en la concentración de  $\beta$ -caroteno a pesar de que la condición de estrés provocó una disminución en la clorofila *a* y *b*. En cuanto a la concentración bioquímica se observó una disminución en el porcentaje de lípidos totales y un aumento en la concentración de carbohidratos, mientras que para las proteínas se tuvo una disminución en las condiciones de estrés evaluadas aun cuando en el monitoreo de la concentración de nitrógeno se observó una deficiencia a partir de T7, lo que puede indicar que el estrés evaluado no se suficiente para provocar una reducción en las proteínas para redirigir sus componentes hacia la acumulación de carbohidratos y proteínas como se observó para la cepa CIBA-29. Para los ácidos grasos se observó un aumento en la concentración de 18:1 $\omega$ 9 y disminución del 18:3 $\omega$ 3. Se ha reportado que la adición de acetato de sodio en cultivos de *D. salina* provoca cambios en los niveles de diversos compuestos como el  $\beta$ -caroteno, luteína y en los ácidos grasos, empero las condiciones de estrés evaluadas no indujeron la carotenogénesis en la cepa de *D. salina* BEA-0001 mostrando que no todas las cepas de *D. salina* responden de la misma manera al estrés. Mojaat et al., (2008) reportan un valor máximo de  $\beta$ -caroteno (70 pg cel<sup>-1</sup>) en cultivo adicionado con acetato de sodio (67.5 mM) y FeSO<sub>4</sub> (450  $\mu$ M). Bredda et al. (2019) reportaron el efecto del acetato de sodio (0 o 2 g L<sup>-1</sup>) en el cultivo de *D. salina* y la productividad de los lípidos, para los cuales se encontró una concentración de 10.37% de 16:0, 2.27% de 18:3 y una elevada cantidad de 18:1 (27.48%). Bredda et al. (2019) encontraron para *D. salina* en cultivos mixotrófico adicionado con acetato de sodio un contenido lipídico de 50.89% con una mayor concentración de 18:1 $\omega$ 9 (36.52%) y 16:0 (18.31%). Srinivasan et al. (2015) reportan el efecto de bicarbonato de sodio (0-200 mM) como fuente de carbono inorgánico en cultivos de *D. salina* donde se observó una disminución de clorofila *a* y *b* (4.12 y 1.85  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y un aumento en la concentración de  $\beta$ -caroteno (180  $\mu$ g 100 mg<sup>-1</sup>).

México cuenta con diferentes climas, cuencas, vegetación y topografía que permiten el desarrollo de una gran diversidad algal (Pérez-Bravo et al., 2019). Los climas ideales para el cultivo de

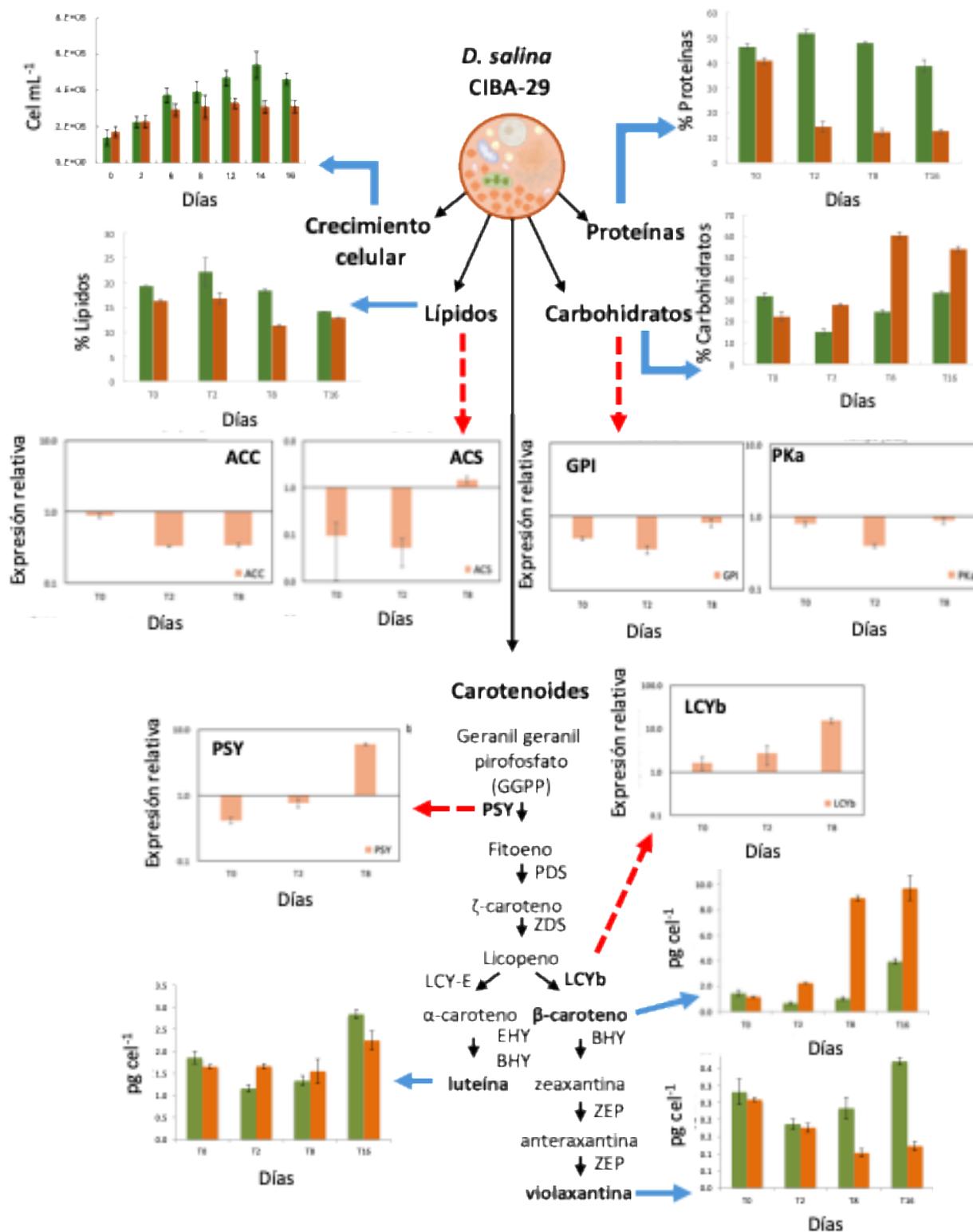
microalgas son tropicales y secas con baja variación de temperatura durante el año (Speranza et al., 2015), México, por su latitud recibe una alta irradiancia solar anual y presenta temperaturas media altas (Manzoni-Maroneze et al., 2021). A partir de modelos de sistemas de información geográfica se ha determinado que el 26.88% del territorio de México presenta áreas con elevado potencial para el cultivo de microalgas, donde destacan los estados de Jalisco, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Lozano-García et al., 2019), sin embargo, determinar la presencia de microalgas nativas en una región específica es indicativo de la supervivencia de esta y de su adaptación a las condiciones ambientales, mostrando el potencial de ser cultivada en su región de origen (Pérez-Bravo et al., 2019).

En México el cultivo de microalgas se ha enfocado a especies como *Spirulina* y *Chlorella* donde se han creado empresas para la elaboración de suplementos alimenticios a base de estas microalgas en los estados de Nuevo León (Biolets S.A. de C.V.) y Jalisco (Biomex) (Martínez-Angulo y Ramírez-Mérida, 2017). Hasta el día de hoy sólo se ha encontrado una empresa de producción de *D. salina* para la elaboración de cosméticos localizada en el estado de Nuevo León (ALIS Biotecnología). En el estado de Baja California Sur, predomina el clima muy seco (92%), con bajas precipitaciones anuales (<200 mm), la temperatura media anual es de 18 a 22°C, con máximas en promedio de 35°C en los meses de julio y agosto y mínimas en promedio de 9°C en el mes de enero (INEGI, 2001). Cuenta una posición geográfica que permite la disponibilidad al agua de mar, así como disponibilidad del recurso de la cepa de *D. salina* CIBA-29, cuyo cultivo, al ser un organismo nativo, no representa un riesgo ecológico para la región.

Una estrategia anual de cultivo con enfoque de biorrefinería empleando la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29 en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, considerando los cambios en las temperaturas, podría establecerse para los meses con temperaturas más bajas de noviembre a abril (min. 13-17°C máx. 26-35°C) en condiciones similares a las evaluadas para el cultivo control del presente trabajo con la recuperación de compuestos de valor agregado como clorofilas, proteínas y ácidos grasos, mientras que para los meses con temperaturas más elevadas de mayo a octubre (min. 14-25°C máx. 30-38°C) en condiciones de cultivo de estrés para la recuperación de  $\beta$ -caroteno, luteína, carbohidratos y ácidos grasos (Fig. 28).



**Figura 27.** Estrategia de cultivo para *D. salina* CIBA-29 en la ciudad de La Paz B. C. S.



**Figura 28.** Efecto de la deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura en *D. salina* CIBA-29. Barras verdes indican cultivo control, rojas cultivo en estrés. Flechas azules indican concentración bioquímica. Flecha punteada roja indica análisis de expresión relativa.

## 9. CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo de deficiencia de nitrógeno, elevada intensidad luminosa y temperatura provocaron en la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29 la síntesis de compuestos de valor agregado como  $\beta$ -caroteno, carbohidratos y ácidos grasos.

La cepa nativa de *D. salina* CIBA-29 cuenta con características genéticas y bioquímicas únicas las cuales le confieren un gran potencial biotecnológico y aplicación industrial. Los resultados de los análisis de expresión dan pauta de posibles blancos de ingeniería genética y metabólica para el mejoramiento de la producción de compuestos con alto valor agregado como es la concentración de lípidos totales.

Las condiciones de estrés evaluadas en la cepa nativa de *D. salina* CIBA-29 pueden ser replicadas en cultivos a escala industrial al exterior, los cuales podrían realizarse en la región de Baja California Sur, lugar de origen de la cepa, ya que cuenta con las condiciones ambientales ideales para el cultivo de esta microalga, además de que su cultivo no impondría ningún riesgo ecológico al ser un organismo nativo.

Una estrategia de cultivo con enfoque de biorrefinería tomando en cuenta las condiciones ambientales anuales de la región de Baja California Sur podría realizarse en dos fases: cultivo en condiciones control con la recuperación de clorofilas, lípidos y proteínas, y cultivo en condiciones de estrés con la recuperación de  $\beta$ -caroteno, carbohidratos y ácidos grasos (Fig. 28).

## 10. LITERATURA CITADA

- Almutairi AW. (2020). Effects of nitrogen and phosphorus limitations on fatty acid methyl esters and fuel properties of *Dunaliella salina*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 32296–303. doi: 10.1007/s11356-020-08531-8.
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Сухих, С., Dolganyuk, V., Michaud, P. y Иванова, С. (2021). Influence of carbohydrate additives on the growth rate of microalgae biomass with an increased carbohydrate content. *Marine Drugs*, 19(7): 381. doi: 10.3390/md19070381.
- Araj-Shirvani, M., Honarvar, M., Jahadi, M. y Mizani, M. (2024). Biochemical profile of *Dunaliella* isolates from different regions of Iran with a focus on pharmaceutical and nutraceutical potential applications. *Food Science & Nutrition*, 12(7): 4914–4926. doi: 10.1002/fsn3.4137.
- Avidan, O., y Pick, U. (2015). Acetyl-CoA synthetase is activated as part of the PDH-bypass in the oleaginous green alga *Chlorella desiccata*. *Journal of Experimental Botany*, 66(22): 7287–7298. doi: 10.1093/jxb/erv424.
- Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C. y Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1): 99–120. doi: 10.1080/26388081.2023.2222318.
- Barkia, I., Saari, N. y Manning, S. R. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs*, 17(5): 1-29. doi: 10.3390/md17050304.
- Becker, E.W. (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25:207-210. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F. y Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>.
- Ben-Amotz, A. (2009). Bioactive compounds: glycerol production, carotenoid production, fatty acids production. In: *The alga Dunaliella, biodiversity, physiology, genomics and biotechnology*. CRC Press. Enfield, USA. pp 189–208.
- Bhalamurugan, G. L., Valerie, O. y Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23(3): 229-241. doi: 10.4491/eer.2017.220.
- Bredda, E. H., Rós, P. C. M. D., Pedro, G. A., Castro, H. F. d. y Silva, M. B. (2019). *Nannochloropsis gaditana* and *Dunaliella salina* as feedstock for biodiesel production: lipid production and biofuel quality. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 1-10. doi: 10.9734/jabb/2018/v20i330075.
- Cakmak, Y. S., Kaya, M. y Asan-Ozusaglam, M. (2014). Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *Excli Journal*, 13: 679–690. doi:10.17877/DE290R-6669.
- Capa-Robles, W., García-Mendoza, E. y Paniagua-Michel, J. J. (2021). Enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by induced mixotrophy in *Dunaliella salina* across a combined strategy of glycerol, salinity, and light. *Metabolites*, 11(12): 866. doi: 10.3390/metabo11120866.
- Del Campo, J. A., García-González, M. y Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6): 1163–1174. doi: 10.1007/s00253-007-0844-9.
- Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K. y de Carvalho, J. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial

- application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188: 602–634. doi: 10.1007/s12010-018-02945-4.
- Chantzistrountsiou, X., Ntzouvaras, A., Papadaki, S., Tsirigoti, A., Tzovenis, I. y Economou-Amilli, A. (2023). Carotenogenic activity of two hypersaline greek *Dunaliella salina* strains under nitrogen deprivation and salinity stress. *Water*, 15(2):241. doi: 10.3390/w15020241.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J. y Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229: 53–62. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006.
- Chhandama, M. V. L., Ruatpuia, J. V. L., Ao, S., Chetia, A. C., Satyan, K. B. y Rokhum, S. L. (2023). Microalgae as a sustainable feedstock for biodiesel and other production industries: Prospects and challenges. *Energy Nexus*, 12: 100255. doi: 10.1016/j.nexus.2023.100255.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. y Varela, J. C. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10(5): 602–611. doi: 10.1007/s10126-008-9100-2.
- de Carvalho Silvello, M. A., Severo Gonçalves, I., Patrícia Held Azambuja, S., Silva Costa, S., Garcia Pereira Silva, P., Oliveira Santos, L. y Goldbeck, R. (2022). Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresource Technology*, 344(Pt B): 126304. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126304.
- Dolganyuk, V., Andreeva, A., Budenkova, E., Сухих, С., Babich, O., Иванова, С. y Ulrikh, E. (2020). Study of morphological features and determination of the fatty acid composition of the microalgae lipid complex. *Biomolecules*, 10(11): 1571. doi: 10.3390/biom10111571.
- Jin, E. y Polle, J. (2009). Carotenoid biosynthesis in *Dunaliella* (Chlorophyta). In: *The alga Dunaliella biodiversity, physiology, genomics and biotechnology*. CRC Press, Enfield, USA. PP 146-172.
- El-Ayouty, Y., EL-Shimy, A., Mustafa, M. y Said, A. (2015). Biodiesel production with high quality from *Dunaliella salina* under optimization factors according to ASTM. *Journal of Scientific Research in Science*, 32(1), 43-57. doi: 10.21608/jsrs.2015.18355.
- El-Baky, H. H., El-Baroty, G. S. y Bouaid, A. (2014). Lipid Induction in *Dunaliella salina* culture aerated with various levels CO<sub>2</sub> and its biodiesel production. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 5(3): 1000223. doi: 10.4172/2155-9546.1000223.
- El-Baz, F. K., Hussein, R. A., Saleh, D. O. y Abdel Jaleel, G. A. R. (2019). Zeaxanthin isolated from *Dunaliella salina* microalgae ameliorates age associated cardiac dysfunction in rats through stimulation of retinoid receptors. *Marine Drugs*, 17(5): 290. doi: 10.3390/md17050290.
- Elleuch F., Hlima H. B., Barkallah M., Baril P., Abdelkafi S., Pichon C. y Fendri I. (2019). Carotenoids overproduction in *Dunaliella* sp. transcriptional changes and new insights through lycopene  $\beta$  cyclase regulation. *Applied Sciences*, 9(24): 1-20. doi: 10.3390/app9245389.
- Espada, J.J., Pérez-Antolín, D., Vicente, G., Bautista, L.F., Morales, V. y Rodríguez, R. (2020). Environmental and techno-economic evaluation of  $\beta$  -carotene production from *Dunaliella salina*. A biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14: 43-54. doi: 10.1002/bbb.2012.
- Francavilla, M., Manara, P., Kamaterou, P., Monteleone, M. y Zabaniotou, A. (2015). Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins and pyrolysis of residue. *Bioresource Technology*, 184: 305–313. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.147.

- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjolfsson, G., Andrésón, Ó. S., Pálsson, B. Ø. y Brynjólfsson, S. (2012). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6): 2395-2403. doi: 10.1007/s00253-012-4502-5.
- Fu, W., Paglia, G., Magnúsdóttir, M., Steinaradóttir, E. A., Guðmundsson, S., Pálsson, B. Ø. y Brynjólfsson, S. (2014). Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 3. doi: 10.1186/1475-2859-13-3.
- Gangali, S., Shahriari, F. A. y Ahmadzadeh, H. (2019). Gene expression analysis in *Dunaliella salina* under salt stress. *Journal of Phycological Research*, 3(1): 287-300. doi: 10.29252/jpr.3.1.287.
- Harvey, P. J. y Ben-Amotz, A. (2020). Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis  $\beta$ -carotene production. *Algal Research*, 50: 102002. doi: 10.1016/j.algal.2020.102002.
- He, Q., Lin, Y., Tan, H., Zhou, Y., Wen, Y., Gan, J., Li, R. y Zhang, Q. (2020). Transcriptomic profiles of *Dunaliella salina* in response to hypersaline stress. *BMC Genomics*, 21(1): 1-17. doi: 10.1186/s12864-020-6507-2.
- Ho, S. H., Chen, C. Y. y Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113: 244–252. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.133.
- Henríquez V., Escobar C., Galarza J., Gimpel J. (2016). Carotenoids in microalgae. In: *Stange carotenoids in nature. Subcellular biochemistry*. Springer, Cham. pp 219-237.
- Hernández-Acevedo, H. E., Flores-Ramos, L., Villamón-Cifuentes, F., Ruiz-Soto, A. y Aguilar-Samanamud, C. P. (2022). Characterization and production potential of carotenes in Peruvian strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(3): 765–780. doi: 10.1111/jwas.12859.
- INEGI. Síntesis de información geográfica del estado de Baja California Sur. (2001). Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/2104/702825223854/702825223854\\_4.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/2104/702825223854/702825223854_4.pdf)
- Ippoliti, D., Gómez, C., del Mar Morales-Amaral, M., Pistrocci, R., Fernández-Sevilla, J.M. y Acién, F.G. (2016). Modeling of photosynthesis and respiration rate for *Isochrysis galbana* (T-iso) and its influence on the production of this strain. *Bioresource Technology*, 203: 71-79. doi: 10.1016/j.biortech.2015.12.050.
- Jesus, S. S. y Filho, R. M. (2010). Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4): 279-283. doi: 10.3844/ajbbsp.2010.279.283.
- Jin, E. S. y Melis, A. (2003). Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 331–337. doi: 10.1007/BF02949276.
- Jin, E., Feth, B. y Melis, A. (2003). A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1): 115–124. doi: 10.1002/bit.10459.
- Jin, E., Yokthongwattana, K., Polle, J. E. y Melis, A. (2003). Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 132(1): 352–364. doi:10.1104/pp.102.019620.
- Joseph, S., Ramadoss, D. y Chellandi, M. (2022). Photoinhibition and  $\beta$ -carotene production from *Dunaliella* sp. isolated from salt pans of Goa. *Biomass Conversion and Biorefinery*, doi: 10.1007/s13399-022-03327-x.

- Khatoon, H., Haris, N., Banerjee, S., Rahman, N. A., Begum, H., Mian, S., Abol-Munafi, A. B. y Endut, A. (2017). Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella* sp. isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environmental Protection*, 112(Part B): 280-287. doi: 10.1016/j.psep.2017.04.010.
- Kim, M., Kim, J., Lee, S., Khanh, N., Li, Z., Polle, J. E. W. y Jin, E. (2023). Deciphering the  $\beta$ -carotene hyperaccumulation in *Dunaliella* by the comprehensive analysis of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* under high light conditions. *Plant, Cell & Environment*, 47(1): 213-229. doi: 10.1111/pce.14724.
- Lamers P. P., Janssen M., De Vos R. C., Bino R. J. y Wijffels RH. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162(1):21-7. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.018.
- Lamers, P. P., Laak, C. C. v. d., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., Vos, R. C. H. d. y Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4): 638-648. doi: 10.1002/bit.22725.
- Levin, G. y Mokady, S. (1994). Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans  $\beta$ -carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1): 77–82. doi: 10.1016/0891-5849(94)90009-4.
- Liang, M. H., Qv, X. Y., Chen, H., Wang, Q. y Jiang, J. G. (2017). Effects of salt concentrations and nitrogen and phosphorus starvations on neutral lipid contents in the green microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Agrocultural and Food Chemistry*, 65(15):3190-3197. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00552.
- Liu, L., Yang, H., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G. y Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4: 212–223. doi:10.4161/bioe.24761.
- Lozano-Garcia, D. F., Cuellar-Bermudez, S. P., Rio- Hinojosa, E., Betancourt, F., Aleman-Nava, G. S. y Parra-Saldivar, R. (2019). Potential land microalgae cultivation in Mexico: From food production to biofuels. *Algal Research*, 39:101459. doi: 10.1016/j.algal.2019.101459
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., y Jia, S. (2016). Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation. *PloS One*, 11(3): 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0152226.
- Mai, T., Nguyen, P., Vo, T., Huynh, H., Tran, S., Nim, T. y Bui, P. (2017). Accumulation of lipid in *Dunaliella salina* under nutrient starvation condition. *American Journal of Food and Nutrition*, 5(2): 58-61. doi: 10.12691/ajfn-5-2-2.
- Manzoni-Maroneze, M., Montenegro-Herrera, C. A. y Jiménez, A. M. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica. *BioTecnología*, 25(5): 11-34.
- Martínez-Angulo, L. D. y Ramírez-Mérida, L. G. (2017). Estado actual de las empresas productoras de microalgas destinadas a alimentos y suplementos alimenticios en América Latina. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(2):130-147.
- Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J.R., Kopecký, J. (2015). Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: flat panels and sloping cascades. In: *Algal Biorefineries*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_7).
- Mirshekari, M., Einali, A. y Valizadeh, J. (2019). Metabolic changes and activity pattern of antioxidant enzymes induced by salicylic acid treatment in green microalga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *The Journal of Applied Phycology*, 31: 1709–1719. doi: 10.1007/s10811-018-1715-8.

- Mohammady, N. G. E. y Fathy, A. A. (2007). Humic acid mitigates viability reduction, lipids and fatty acids of *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis salina* grown under nickel stress. *International Journal of Botany*, 3(1): 64-70. doi: 10.3923/ijb.2007.64.70.
- Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A. y Legrand, J. (2008). Effect of organic carbon sources and Fe<sup>2+</sup> ions on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochemical Engineering Journal*, 39:177-184. doi: 10.1016/j.bej.2007.09.009.
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J. y Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11): 2436. doi: 10.3390/ijerph15112436.
- Monte, J., Ribeiro, C., Parreira, C., Costa, L., Brive, L., Casal, S., Brazinha, C. y Crespo, J. G. (2020). Biorefinery of *Dunaliella salina*: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol. *Bioresource Technology*, 297: 122509. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122509.
- Morales, M., Aflalo, C. y Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*, 150: 106108. doi:10.1016/j.biombioe.2021.106108.
- Moreira, J. B., Vaz, B. D. S., Cardias, B. B., Cruz, C. G., Almeida, A. C. A. D., Costa, J. A. V. y Morais, M. G. D. (2022). Microalgae polysaccharides: An alternative source for food production and sustainable agriculture. *Polysaccharides*, 3(2):441-457. doi: 10.3390/polysaccharides3020027.
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V. y Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*, 17(11): 1-21. doi: 10.3390/md17110640.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. y Contreras, R. (2009). DNA fingerprinting differentiation between beta-carotene hyperproducer strains of *Dunaliella* from around the world. *Saline Systems*, 5: 5. doi: 10.1186/1746-1448-5-5.
- Orset, S. C. y Young, A. J. (2000). Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis beta, beta-carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). *Plant Physiology*, 122(2): 609–618. doi: 10.1104/pp.122.2.609.
- Pavón-Suriano, S. G., Ortega-Clemente, L. A., Curiel-Ramírez, S., Jiménez-García, M. I., Pérez-Legaspi, I. A. y Robledo-Narváez, P. N. (2018). Evaluation of colour temperatures in the cultivation of *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis oculata* in the production of lipids and carbohydrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:21332–40. doi: 10.1007/s11356-017-9764-0.
- Pérez-Bravo, S. G., Mendoza-Martínez, A. M., Castañeda-Chávez, M. R. y Aguilera-Vázquez, L. (2019). Bioenergía a partir de microalgas en México. *Revista de Energías Renovables*, 3(8):23-34. doi: 10.35429/JRE.2019.8.3.23.34
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002-2007. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pick, U. y Avidan, O. (2017). Triacylglycerol is produced from starch and polar lipids in the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Experimental Botany*, 68: 4939–4950. doi:10.1093/jxb/erx280.
- Pisal, D. S. y Lele S. S. (2005). Carotenoid production from microalga *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4:476–483.
- Polle, J. E. W., Calhoun, S., McKie-Krisberg, Z., Prochnik, S., Neofotis, P., Yim, W. C., Hathwaik, L. T., Jenkins, J., Molina, H., Bunkenborg, J., Grigoriev, I. V., Barry, K., Schmutz, J., Jin, E.,

- Cushman, J. C. y Magnusson, J. K. (2020). Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity. *Algal Research*, 50: 1-13. doi: 10.1016/j.algal.2020.101990.
- Preetha, K., John, L., Subin, C. S. y Vijayan, K. K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1): 27. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-27>.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J., Huguene, P. y Kleinig, H. (1998). Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 116(4): 1239–1248. doi: 10.1104/pp.116.4.1239.
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin E. y Varela, J. C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1): 3-20. doi: 10.4490/algae.2011.26.1.003.
- Ramos, A., Coesel, S., Marques, A., Rodrigues, M., Baumgartner, A., Noronha, J., Rauter, A., Brenig, B. y Varela, J. (2008). Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* Lcy-beta gene encoding a functional lycopene beta-cyclase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5): 819–828. doi: 10.1007/s00253-008-1492-4.
- Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., Zhang, Y. y Lan, X. (2019). Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*, 291: 121894. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121894.
- Razzak, S. A., Bahar, K., Islam, K. M. O., Haniffa, A. K., Faruque, M. O., Hossain, S. M. Z. y Hossain, M. M. (2024). Microalgae cultivation in photobioreactors: sustainable solutions for a greener future. *Green Chemical Engineering*, 5(4):418-439. doi: 10.1016/j.gce.2023.10.004.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A. y Lee, K. (2020). Influence of salinity and nitrogen in dark on *Dunaliella tertiolecta's* lipid and carbohydrate productivity. *Biofuels*, 2020: 1–7. doi: 10.1080/17597269.2020.1762275.
- Saha, S. K., Kazipet, N. y Murray, P. (2018). The carotenogenic *Dunaliella salina* CCAP 19/20 produces enhanced levels of carotenoid under specific nutrients limitation. *BioMed Research International*, 2018: 1-18. doi: 10.1155/2018/7532897.
- Sánchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D. y Narváez-Zapata, J. A. (2006). Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, 28(11): 787–791. doi: 10.1007/s10529-006-9001-2.
- Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M. y Mehmood, M.A. (2020). Microalgal carbohydrates and proteins: synthesis, extraction, applications, and challenges. In: *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-15-0169-2\_14.
- Shang, C., Bi, G., Yuan, Z., Wang, Z., Alam, M. A. y Xie, J. (2016). Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*. *Algal Research*, 13: 318-326. doi: 10.1016/j.algal.2015.12.012.
- Shang, C., Wang, W., Zhu, S., Wang, Z., Qin, L., Alam, M. A., Xie, J. y Yuan, Z. (2018). The responses of two genes encoding phytoene synthase (Psy) and phytoene desaturase (Pds) to nitrogen limitation and salinity up-shock with special emphasis on carotenogenesis in *Dunaliella parva*. *Algal Research*, 32: 1-10. doi: 10.1016/j.algal.2018.03.002.
- Sharma, N. K. y Rai, A. K. (2011). Biodiversity and biogeography of microalgae: Progress and pitfalls. *Environmental Reviews*, 19: 1–15. doi: 10.1139/a10-020.
- Shetty, P., Gitau, M. M. y Maróti, G. (2019). Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. *Cells*, 8(12): 1-16. doi: 10.3390/cells8121657.

- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y. y Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11(7):1-1. doi: 10.1186/1472-6750-11-7.
- Silva, S. C., Ferreira, I. C., Dias, M. M. y Barreiro, M. F. (2020). Microalgae-derived pigments: a 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules*, 25(15): 3406. doi: 10.3390/molecules25153406.
- Singh, P., Baranwal, M. y Reddy, S. M. (2016). Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical Biology*, 54(10): 2269-2275. doi: 10.3109/13880209.2016.1153660.
- Song, Y., Wang, F., Chen, L. y Zhang, W. (2024). Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae: recent progress and perspectives. *Marine Drugs*, 22(5): 216. doi: 10.3390/md22050216.
- Speranza, L. G., Ingram, A. y Leeke, G. A. (2015). Assessment of algae biodiesel viability based in the area requirement in the European Union, United States and Brazil. *Renewable Energy*, 78: 406-417. doi: 10.1016/j.renene.2014.12.059.
- Srinivasan, R., Kumar, V. A., Kumar, D., Nachimuthu, R., Babu, S. y Gothandam, K. M. (2015). Effect of dissolved inorganic carbon on  $\beta$ -carotene and fatty acid production in *Dunaliella sp.* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6): 2895-2906. doi: 10.1007/s12010-014-1461-6.
- Sui, Y. y Harvey, P. J. (2021). Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina*. *Foods*, 10(5): 1018. doi: 10.3390/foods10051018.
- Sui, Y., Muys, M., Vermeir, P., D'Adamo, S. y Vlaeminck, S.E. (2019). Light regime and growth phase affect the microalgal production of protein quantity and quality with *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, 275: 145-152. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.046.
- Talebi, A. F., Tohidfar, M., Bagheri, A., Lyon, S. R., Salehi-Ashtiani, K. y Tabatabaei, M. (2014). Manipulation of carbon flux into fatty acid biosynthesis pathway in *Dunaliella salina* using AccD and ME genes to enhance lipid content and to improve produced biodiesel quality. *Biofuel Research Journal*, 1(3): 91-97. doi: 10.18331/BRJ2015.1.3.6.
- Talebi, A. F., Tohidfar, M., Mousavi Derazmahalleh, S. M., Sulaiman, A., Baharuddin, A. S. y Tabatabaei, M. (2015). biochemical modulation of lipid pathway in microalgae *Dunaliella sp.* for biodiesel production. *BioMed Research International*, 2018: 2-12. doi: 10.1155/2015/597198.
- Tan, K. W., Lin, H., Shen, H. y Lee, Y. K. (2016). Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*. *Scientific Reports*, 6: 37235. doi: 10.1038/srep37235.
- Tang, D., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H. y Show, P. L. (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource Technology*, 304: 1-20. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122997.
- Thomassen, G., Van Dael, M. y Van Passel, S. (2018). The potential of microalgae biorefineries in Belgium and India: An environmental techno-economic assessment. *Bioresource Technology*, 267: 271-280. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.037.
- Valencia, R., Giffard-Mena, I., Cruz-López, R., García-Mendoza, E. y Stephano-Hornedo, J. L. (2018). Characterization of a new *Dunaliella salina* strain isolated from San Quintin, Baja California (Mexico) producer of lipids, pigments and micronutrients. *CICIMAR Oceanides*, 33(2): 1-11. doi: 10.37543/oceanides.v33i2.212.

- Vorst, P. (1995). *Production of carotene with chemostat cultures of Dunaliella*. Academic dissertation for doctoral degree. University of Amsterdam. The Netherlands.
- Vyas, S., Patel, A., Nabil Risse, E., Krikigianni, E., Rova, U., Christakopoulos, P. y Matsakas, L. (2022). Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 359: 127494. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127494.
- Weldy C, y Huesemann M. (2007). Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *Journal of Undergraduate Research*, 2007: 115–22.
- Woyda-Ploszczyca, A. M. y Rybak, A. S. (2021). How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*, 60: 1-10. doi: 10.1016/j.algal.2021.102474.
- Wu, Z., Dejtsakdi, W., Kermanee, P., Ma, C., Arirob, W., Sathasivam, R. y Juntawong, N. (2017). Outdoor cultivation of *Dunaliella salina* ku 11 using brine and saline lake water with raceway ponds in northeastern Thailand. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(6): 938-943. doi: 10.1002/bab.1537.
- Xie, Y., Xiong, X. y Chen, S. (2021). Challenges and potential in increasing lutein content in microalgae. *Microorganisms*, 9(5): 1068. doi: 10.3390/microorganisms9051068.
- Xu, Y., Ibrahim, I. M., Wosu, C. I., Ben-Amotz, A. y Harvey, P. J. (2018). Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural  $\beta$ -carotene production. *Biology*, 7(1): 1-18. doi: 10.3390/biology7010014.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. y Takriff, M. S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, 21(1): 6. doi: 10.1186/2241-5793-21-6.
- Ye, Z. W., Jiang, J. G. y Wu, G. H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26: 352–360. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.03.004
- Yuan, Y., Li, X. y Zhao, Q. (2019). Enhancing growth and lipid productivity in *Dunaliella salina* under high light intensity and nitrogen limited conditions. *Bioresource Technology Reports*, 7: 100211. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100211.
- Yuan, Y., Zhu, Y., Jiang, J. y Song, D. J. (2005). Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular chlorophyte, *Dunaliella salina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): 1466-1469. doi: 10.1021/jf048358s.
- Zarandi-Miandoab, L., Hejazi, M. A., Bagherieh-Najjar, M. B. y Chaparzadeh, N. (2015). Light intensity effects on some molecular and biochemical characteristics of *Dunaliella salina*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5(2): 1311- 1321. doi: 10.30495/IJPP.2015.539659.
- Zhang, Q., Guan, Y., Zhang, Z., Dong, S., Yuan, T., Ruan, Z. y Chen, M. (2024). Sustainable microalgae cultivation: A comprehensive review of open and enclosed systems for biofuel and high value compound production. *E3S Web Conferences*, 577(2024): 01008. doi: 10.1051/e3sconf/202457701008.
- Zhu, Q. L., Zheng, J. L. y Liu, J. (2020). Transcription activation of  $\beta$ -carotene biosynthetic genes at the initial stage of stresses as an indicator of the increased  $\beta$ -carotene accumulation in isolated *Dunaliella salina* strain GY-H13. *Aquatic Toxicology*, 222: 1-10. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105472.

Zhu, Y. H., Jiang, J. G. y Chen, Q. (2008). Characterization of cDNA of lycopene beta-cyclase responsible for a high level of beta-carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(3): 285–292. doi: 10.1139/o08-012.