



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DE LA
EXPRESIÓN DE GENES EN *SCENEDESMUS OBLIQUUS* BAJO ESTÍMULO
CON FITOHORMONAS Y POR DÉFICIT DE NITRÓGENO**

Tesis que presenta

Hans Christian Correa Aguado

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Roberto Rico Martínez

Aguascalientes, Ags., a 07 de mayo de 2021



M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **HANS CHRISTIAN CORREA AGUADO** con ID 216083 quien realizó el trabajo de tesis titulado “**Evaluación de la producción de lípidos y análisis de la expresión de genes en *Scenedesmus obliquus* bajo estímulo con fitohormonas y por déficit de nitrógeno**”, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“Se Lumen Proferre”
Aguascalientes, Ags., a 11 de mayo de 2021

Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como CO-TUTORA designada del estudiante **HANS CHRISTIAN CORREA AGUADO** con ID 216083 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN SCENEDESMUS OBLIQUUS BAJO ESTÍMULO CON FITOHORMONAS Y POR DÉFICIT DE NITRÓGENO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 10 de mayo de 2021.

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Co-Tutora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante **HANS CHRISTIAN CORREA AGUADO** con ID 216083 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN SCENEDESMUS OBLIQUUS BAJO ESTÍMULO CON FITOHORMONAS Y POR DÉFICIT DE NITRÓGENO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 10 de mayo de 2021.

Dr. Roberto Rico Martínez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



DICTAMEN DE LIBERACION ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 31-may-21

NOMBRE: HANS CHRISTIAN CORREA AGUADO **ID** 69226

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** BITECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA VEGETAL Y ANIMAL

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN SCENEDESMUS OBLIQUUS BAJO ESTÍMULO CON FITOHORMONAS Y POR DÉFICIT DE NITRÓGENO

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

ESTUDIO CON POSIBLE APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI _____
No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DRA. ILIANA ERNESTINA W. DINA RAMÍREZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



ARTICLE

Benzyl Amino Purine and Gibberellic Acid Coupled to Nitrogen-Limited Stress Induce Fatty Acids, Biomass Accumulation, and Gene Expression in *Scenedesmus Obliquus*

Hans Christian Correa-Aguado¹, Gloria Viviana Cerrillo-Rojas¹, Alejandro Rocha-Uribe², Ruth Elena Soria-Guerra² and José Francisco Morales-Domínguez^{1,*}

¹Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, 20131, México

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78210, México

*Corresponding Author: José Francisco Morales-Domínguez. Email: jfmoral@correo.uaa.mx

Received: 13 August 2020 Accepted: 15 October 2020

ABSTRACT

The need for renewable energy sources makes microalgae an essential feedstock for biofuels production. The molecular aspects and the response to nitrogen (N)-limited conditions with a phytohormone stimulus in microalgae have been slightly explored. In this work, *Scenedesmus obliquus* was used as a study model to analyze the effect of benzyl amino purine (BAP) and gibberellic acid (GA) coupled to nitrogen limitation on cell growth, biomass and fatty acids. The selected 10^{-5} M BAP increased the biomass by 1.44-fold, and 10^{-6} M GA by 1.35-fold. The total lipids also increased by 2.8 and 1.11-fold, respectively. The 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA addition to *S. obliquus* cultures at different initial nitrogen percentages (N-0, N-25, and N-50) showed a significant increase in cell growth and biomass productivity compared to the unstimulated cultures. BAP N-0 and GA N-0 produced the highest lipid yields with 55% and 50%, respectively. The lipid profile analysis revealed an increase, particularly in C18:1 and C16:0 fatty acids. Gene expression analysis showed an over-expression of acyl carrying protein (ACP), stearoyl-ACP desaturase (SAD), fatty acid acyl-ACP thioesterase (FATA), and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes, which were mainly induced by nitrogen limitation. Furthermore, BAP and GA produced a significant over-expression on these genes in the N-replete cultures. This study shows that BAP and GA, coupled to N limitation stress, can be used to increase the biomass and lipid production in *S. obliquus* for sustainable biofuels.

KEYWORDS

Biodiesel; gene expression; lipids; microalgae; nitrogen deficiency; phytohormones

1 Introduction

In recent decades, microalgae have attracted attention due to the wide variety of metabolites that they synthesize, since they are of interest for several industrial sectors, for example: in functional foods, nutraceuticals, pharmaceuticals, cosmetics, aquaculture and biofuels [1,2]. For these purposes, the selection of the appropriate strain and growth conditions are critical.

Scenedesmus obliquus is a microalgae with great potential as a feedstock for biodiesel production; it proliferates fast, has high biomass productivity, and contains the most suitable fatty acid profile for biodiesel production [3]. In several species of microalgae, the nutrient limitation, mainly nitrogen (N), has



shown to be a resource capable of modifying the pattern of carbon storage favoring the triacylglycerol (TAG) formation [4]. However, N deficiency slows down cell division and growth; therefore, biodiesel production's cost-benefit is affected [5]. It has been reported that the supplementation of exogenous phytohormones such as abscisic acid (ABA), 6-benzyl amino purine (BAP), gibberellic acid (GA) and indole-acetic acid (IAA), among others, increase the microalgae reproduction, and stimulate the production and accumulation of lipids [6].

Phytohormones are chemical messengers that stimulate and regulate cell growth and division in plants and microalgae [7]. Phytohormone supplementation in microalgae cultures under nitrogen limitation has been used as a strategy to increase biomass and lipid biosynthesis in *Scenedesmus quadricauda* [8] and *Acutodesmus dimorphus* [9]. However, gene expression analyses in lipid biosynthesis and accumulation have been poorly evaluated. For example, some genes involved in fatty acid and TAG syntheses, such as fatty acid acyl-ACP thioesterase (*FATA*) and diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*), were over-expressed in *Neochloris oleabundans* under N-limiting conditions leading to an over-production of fatty acids [10]. In *Haematococcus pluvialis*, the expression for acyl carrying protein (*ACP*), *FATA*, and stearyl-ACP desaturase (*SAD*) genes positively correlated with increases in monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and oleic acid (C18:1), respectively [11]. In another study, over-expression of *ACP*, *DGAT*, and *FATA* genes, induced by N limitation or high salinity conditions, showed a positive correlation with lipid accumulation in *Scenedesmus* spp. [12].

In this work, we selected 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA, and studied their effect on growth, biomass productivity, lipid production, and fatty acid profile, in *S. obliquus* N-limited cultures. Also, the gene expression of four genes involved in the lipid biosynthetic pathway *ACP*, *FATA*, *SAD*, and *DGAT* was assessed.

2 Materials and Methods

S. obliquus (UTEX 3031) was obtained from the algae collection of the University of Texas, USA. Bold's basal medium (BBM) [13] was used to grow the microalgae. The medium was autoclaved at 121°C for 20 min at 15 psi pressure. *S. obliquus* was cultured in 1000 mL flasks with 800 mL of sterile BBM at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 16:8 h light/dark photoperiod, with white light at $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The cultures were aerated (1500 cc/min) using an aquarium air pump to supply CO_2 (0.04%). The flasks were shaken twice a day to avoid cell sedimentation. On day 20, this culture was used to inoculate the batch experiments.

2.1 Screening of BAP and GA Concentrations for Improving Growth, Biomass, and Lipid Production in *S. obliquus*

Both BAP and GA concentrations of 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M were used to obtain the highest cell growth, biomass productivity, and lipid values in *S. obliquus*. BBM standard was used to grow the microalgae. The cultures cell density was adjusted to an absorbance of 0.2 ± 0.01 measured at an optical density (OD) of 750 nm using a UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific™ GENESYS 10S). Cell growth, biomass, and lipids were measured every 48 h during 15 days in biological triplicate. The flasks were incubated, as mentioned above.

2.2 Effect of BAP and GA on Growth, Biomass, and Lipid Content under N-Reduced Conditions

The concentrations of BAP and GA with the best results were 10^{-5} M and 10^{-6} M, respectively. These concentrations were used for the following series of experiments along with different N concentrations: 125 mg L^{-1} , 62.5 mg L^{-1} , and 0 mg L^{-1} (50%, 25%, and 0% of the total N concentration, to the BBM standard). The incubation conditions were applied identically, as above mentioned.

2.3 Growth and Dry Biomass Determination

Cell density (cells mL^{-1}) was determined by counting with a Bright-Line Hemocytometer (Hausser Scientific) using an Olympus CH30 microscope (Nikon Inc.). The biomass in dry weight (DW) was

estimated based on a linear relationship between OD₇₅₀ and biomass g L⁻¹ DW, which was obtained after a multiple data analysis and was calculated using Eq. (1) [14]:

$$\text{Biomass (g L}^{-1}\text{)} = 1.6281 (\text{OD}_{750}) - 0.006 \quad (R^2 = 0.9982) \quad (1)$$

Biomass productivity (P, g L⁻¹ d⁻¹) were calculated from the Eq. (2):

$$P = X_{t_2} - X_{t_1} / t_2 - t_1 \quad (2)$$

where X_{t₂} and X_{t₁} are the dry cell weight concentration (g L⁻¹) at time t₂ and t₁, respectively [15].

2.4 Lipid Quantification and Fatty Acids Analysis

The lipid quantification was performed by the sulpho-phospho-vanillin (SPV) method, according to Park et al. [16] protocol with slight modifications. An aliquot of 0.5 mL of microalgae culture was taken every 48 h. Cells were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 5 min, then washed with deionized water and dried at 100°C until constant weight. The dry biomass was used for the SPV reaction and lipid estimation using a GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). For fatty acids analysis, total lipids were extracted by the Blight-Dyer method [17] from 50 mg of biomass harvested on the 15th day of incubation. The fatty acids were transmethylated to fatty acid methyl esters (FAMES) and analyzed using a Varian CP-3800 gas chromatograph (Varian Inc., Walnut Creek, CA) equipped with a flame ionization detector (FID) using a Stabilwax capillary column (60 m × 0.25 mm internal diameter, 0.25-µm film, Catalog Number 10626, Restek Corp, USA) as previously described by Salas-Montes et al. [18].

2.5 Expression Analysis by qRT-PCR

The *S. obliquus* cells were recovered after 15 days and freeze-dried. Total RNA extraction was done using the commercial E.Z.N.A.[®] Kit (Omega Bio-Tek, USA). For cDNA synthesis, the SuperScript III kit and oligo (dT)₂₀ were used (Invitrogen, USA). The reaction mixture was: 1 µL of oligo (dT)₂₀ (50 µM), 10 mM dNTP's Mix, 1 µg of RNA, 1 µL of SuperScript III, 4 µL of 5 × First-Stand Buffer, and 1 µL DTT (0.1 M). The mixture was incubated at 50°C for 1 h. The cDNA was quantified and diluted to 100 ng cDNA µL⁻¹.

The *S. obliquus* 18S rRNA gene was used as an internal standard. Details of the oligonucleotides and product size of the *DGAT*, *ACP*, *FATA*, *SAD*, and ribosomal genes are described in the Appendix A. Real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a 96-well optical grade plate using a real-time PCR system from Applied Biosystems StepOne[™] (Applied Biosystems, Australia) using Radiant[™] Green Lo-ROX qPCR Kit (Alkali Scientific Inc., USA). The program parameters for amplification were 50°C 2 min, 95°C 2.0 min, 40 cycles of 95°C for 5 s and at 60°C for 1.0 min. Melting curves were generated by a cycle of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 95°C for 30 s. The samples were evaluated in triplicate, and the data were analyzed using Applied Biosystems Step One real-time PCR system software (Applied Biosystems, Mulgrave, AUS). Reference data were obtained from cycles 1 to 40. To normalize the number of transcripts in each sample, the relative abundance of 18S rRNA was also used as the internal standard. Gene expression data were analyzed using the 2^{-ΔΔCt} method [19].

2.6 Statistical Analysis

The measurements of growth kinetics, biomass productivity, and gene expression analysis were conducted in triplicate. The analysis of total lipids and fatty acid profile were performed in duplicate. Data was analyzed using Prism 7 for Windows software, version 7.00 (GraphPad Software, Inc.). Significant differences between treatment means for each variable were compared using an analysis of

Tukey at a 95% confidence level ($p < 0.05$) comparing mean values for a data set using the analysis of variance (ANOVA). All SD (standard deviation) values in the graphs were represented as error bars.

3 Results

3.1 Effect of BAP and GA Concentrations on Cell density, Biomass, and Lipid Production in *S. obliquus*

3.1.1 Analysis of BAP

During the first five days, the cell number in BAP cultures were similar in all four concentrations (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} M). From the seventh to the fifteenth day, the 10^{-5} M BAP had the highest cell number with 20.08×10^6 cells mL^{-1} , equivalent to 1.44-fold compared to control (Fig. 1A).

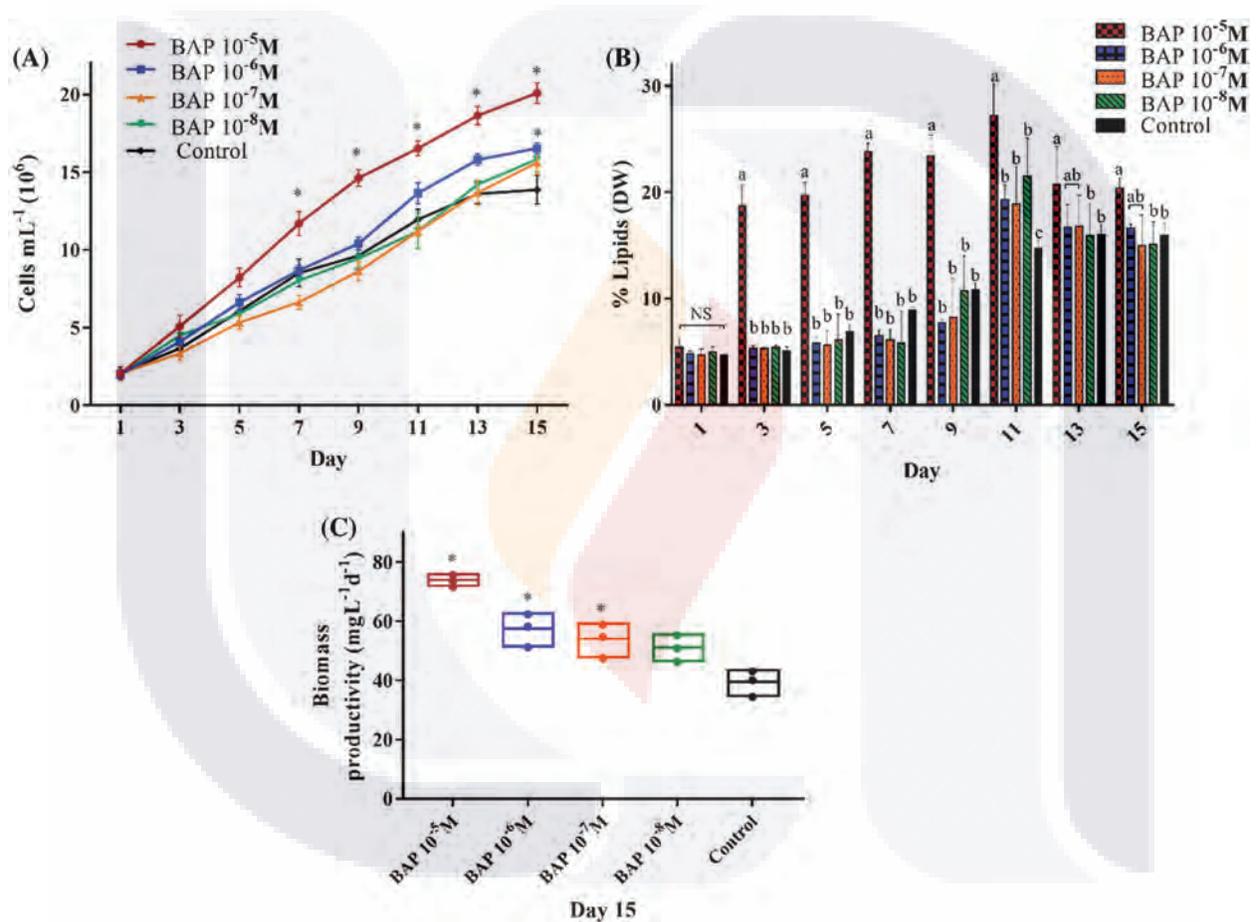


Figure 1: Algal growth rates (A), percentage of lipids (DW) (B), and biomass productivity ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) (C), in BAP-stimulated *S. obliquus* cultures at different concentrations: 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, and 10^{-8} M. The error bars indicate the standard deviation of the mean. * indicate the significant differences ANOVA ($p < 0.05$). Tukey’s multiple comparison test was used when the ANOVA detected significant differences ($p < 0.05$) between each condition. Data with different letters are significantly different. NS = non-significant data

Total lipids were measured as a percent of biomass in DW. In Fig. 1B, 10^{-5} M BAP increased the lipid production on the fifth day by 2.8-fold, and on the eleventh day, 10^{-5} M BAP induced the highest lipid percent with 27% (DW), while in control it was 16% (DW). Furthermore, biomass productivity was significantly higher ($73.52 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) with 10^{-5} M BAP stimulus compared to the other concentrations (Fig. 1C).

3.1.2 Analysis of GA

GA (10^{-6} M) induced the highest cell growth with 16.44×10^6 mL $^{-1}$ cells, improving the cell number by 1.35-fold more than the control (12.15×10^6 cells mL $^{-1}$) (Fig. 2A). On the last day of the experiment (day 15), 10^{-6} M GA produced the highest lipid yield and biomass productivity, with 17.8% (DW) and 59.88 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$, respectively (Figs. 2B and 2C).

These results were used for the following N-limited analyses.

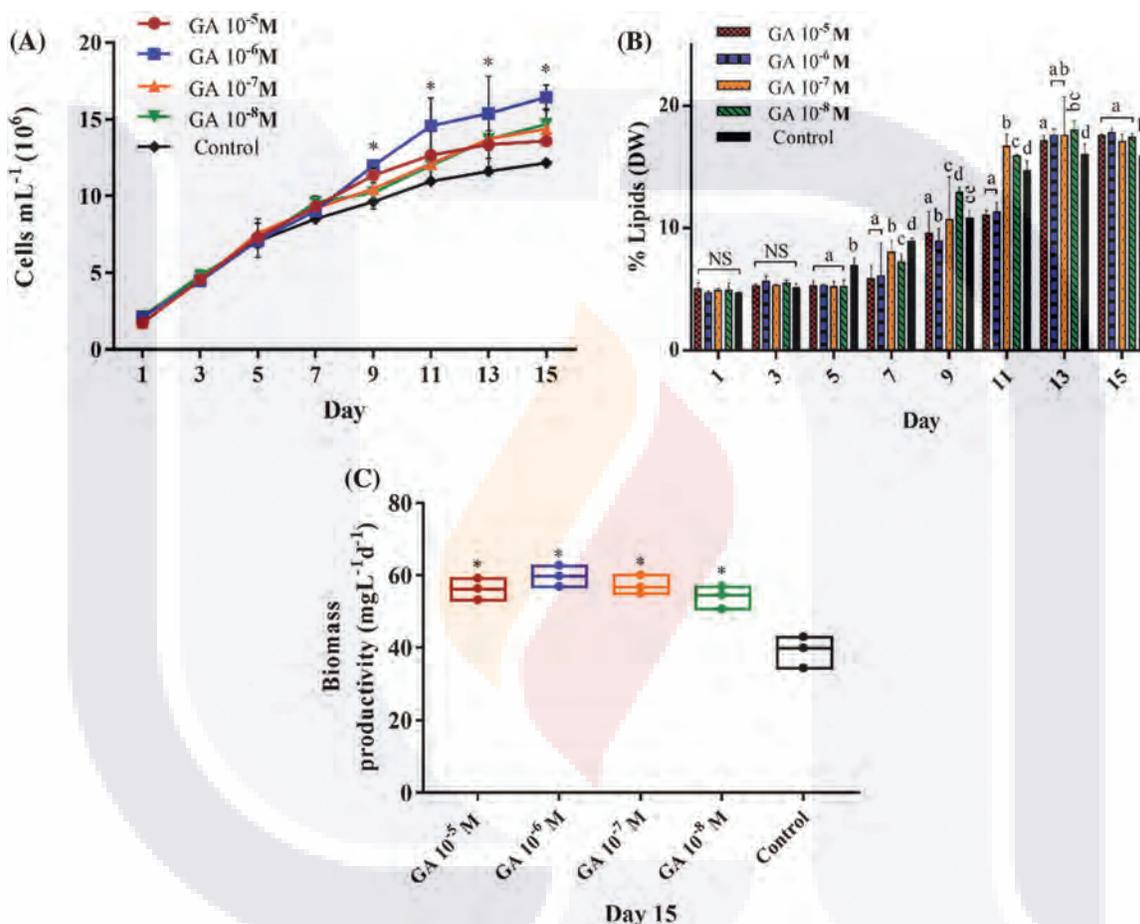


Figure 2: Algal growth rates (A), percentage of lipids (DW) (B), and biomass productivity (mg L $^{-1}$ d $^{-1}$) (C), in GA-stimulated *S. obliquus* cultures at different concentrations: 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, and 10^{-8} M. The error bars indicate the standard deviation of the mean. * indicate the significant differences ANOVA ($p < 0.05$). Tukey's multiple comparison test was used when the ANOVA detected significant differences ($p < 0.05$) between each condition. Data with different letters are significantly different. NS = non-significant data

3.2 Effect of BAP and GA on Cell Density, Biomass and Lipid Production in *S. obliquus* under N-Limited Conditions

In all N-limited and N-replete (controls) assays, 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA increased cell density compared to the non-stimulated cultures. BAP N-100 and GA N-100 had the highest cell number. In N-limited experiments, the most relevant results were in the BAP N-0 and GA N-0 cultures, where cell numbers increased to 6.91×10^6 cells mL $^{-1}$ and 5.19×10^6 cells mL $^{-1}$, respectively (Figs. 3A and 4A),

two-fold as much as the N-0 cultures without stimulus. Biomass productivity increased to 1.80-fold higher than the N-100 control, with $76.16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (DW) in BAP N-100 and $73.53 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (DW) in BAP N-50 (Fig. 3B). For GA treatments, all biomass productivities were higher than non-stimulated ones. GA N-0 had the major difference in biomass productivity, which was $32.00 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (DW), 1.48-fold more than the control (Fig. 4B).

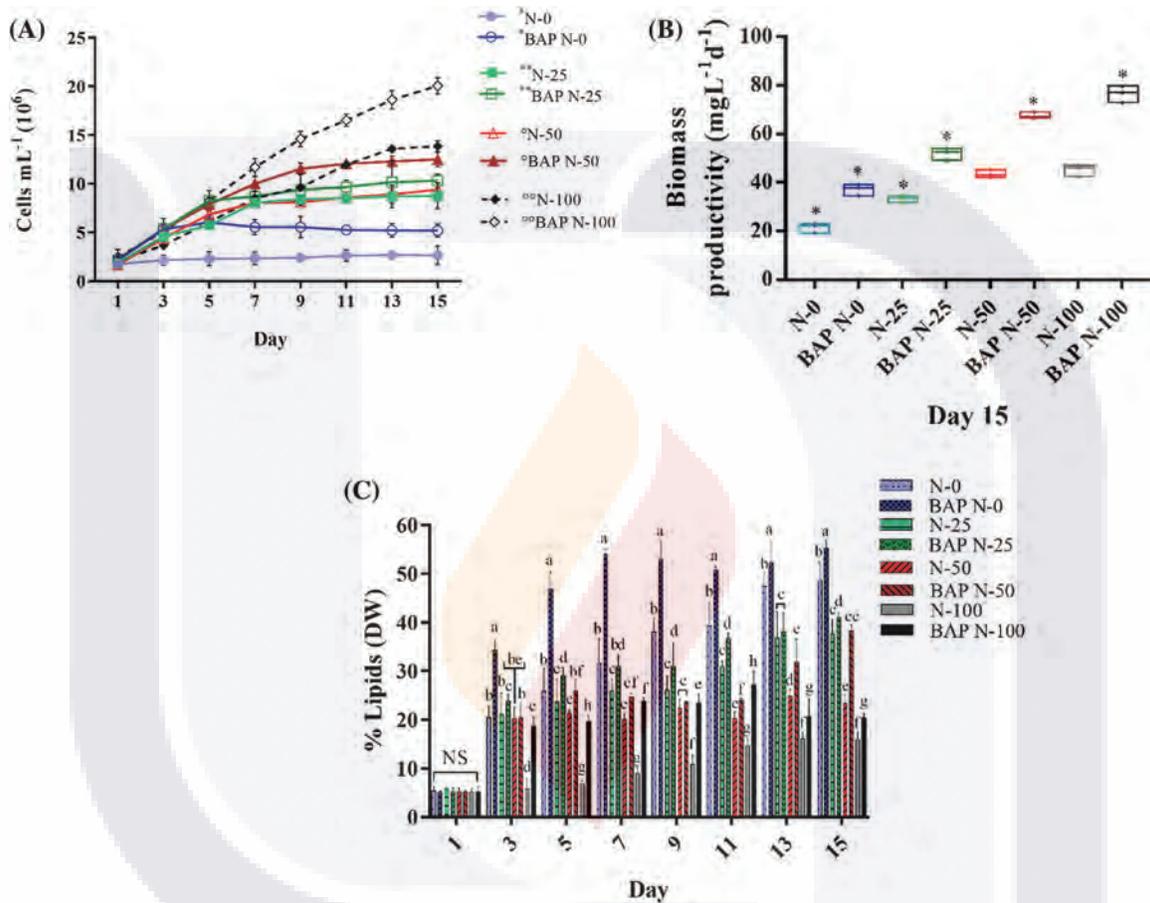


Figure 3: Algal growth rates (A), biomass productivity ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (B), and lipid percentage (DW) (C) of *S. obliquus*. Each chart shows the 10^{-5} M BAP stimulus in *S. obliquus* at different N percentages: 0% (BAP N-0), 25% (BAP N-25), 50% (BAP N-50), 100% (BAP N-100), and without 10^{-5} M BAP stimulus at different N-percentages: 0% (N-0), 25% (N-25), 50% (N-50), 100% (N-100). In growth kinetics chart, *, **, °, and °°, indicate the significant differences in each pair from the third to the fifteenth day. The error bars indicate the standard deviation of the mean. Tukey’s multiple comparison test was used when the ANOVA detected significant differences ($p < 0.05$) between each condition. NS= non-significant data

BAP and GA, coupled to N-limitation, also altered lipid production. BAP N-0 produced the highest lipid yield with 55% (DW) and for GA N-0, it was 50%. At day three, BAP N-0 culture had a significant increase in lipid production from 1.4-1.8-fold compared to the other BAP N-limited experiments, and on day seven, a 6.0-fold increase (53.9% lipid yield DW) compared to N-100 (Fig. 3C).

GA N-100 did not show a significant lipid production difference compared to N-100 without stimulus (Fig. 4C). At the experimental endpoint (day 15), the controls (N-100 without phytohormones) produced a

16% maximum lipid in *S. obliquus* DW. BAP N-0 and GA N-0 exceeded these results by 3.4 and 3.1-fold, respectively (Figs. 3C and 4C).

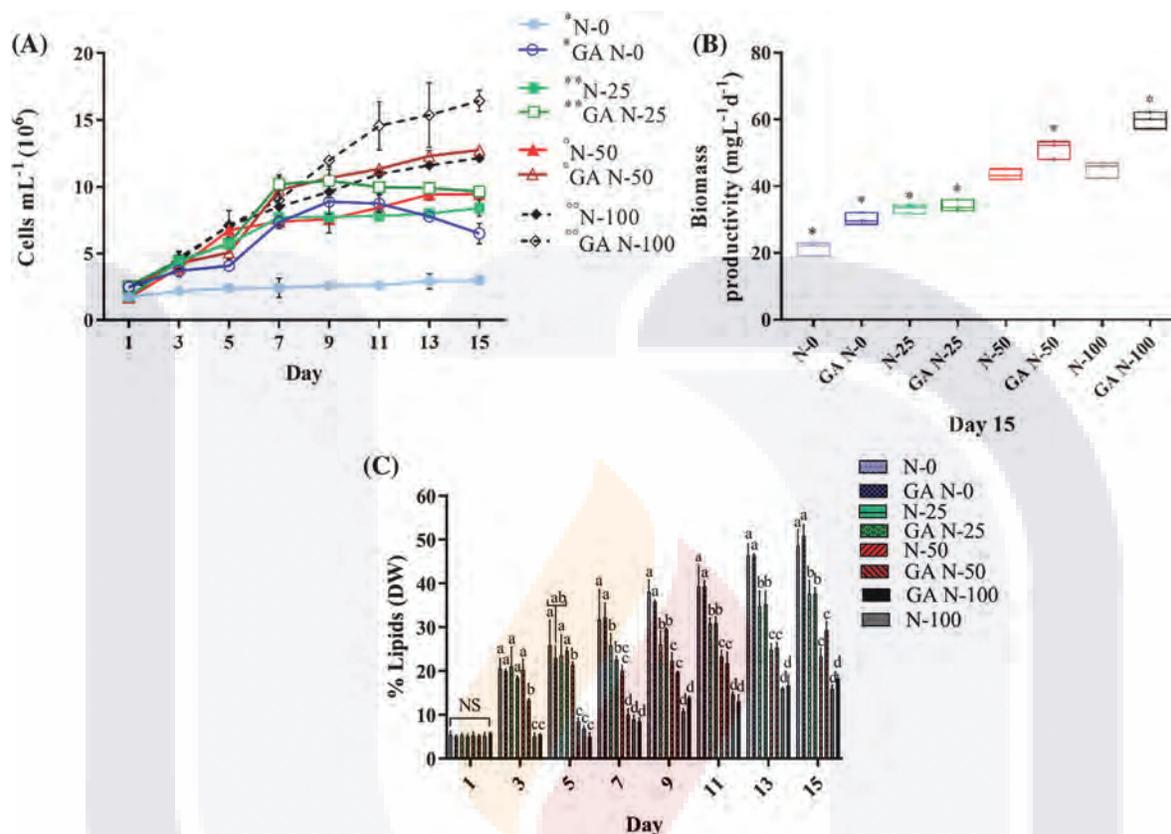


Figure 4: Algal growth rates (A), biomass productivity ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) (B), and lipid percentage (DW) (C) of *S. obliquus*. Each chart shows the 10^{-6} M GA stimulus in *S. obliquus* at different N percentages: 0% (GA N-0), 25% (GA N-25), 50% (GA N-50), 100% (GA N-100), and without 10^{-6} M GA stimulus at different N-percentages: 0% (N-0), 25% (N-25), 50% (N-50), 100% (N-100). In growth kinetics chart, *, **, °, and °°, indicate the significant differences in each pair from the third to the fifteenth day. The error bars indicate the standard deviation of the mean. Tukey's multiple comparison test was used when the ANOVA detected significant differences ($p < 0.05$) between each condition. NS= non-significant data

3.3 Effect of BAP and GA on the Fatty Acid Profile of *S. obliquus* under N-limited Conditions

The methylated fatty acids profiles induced by 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA under N-limited conditions are shown in Tab. 1. BAP N-0 had the most significant increase in C18:1 (41.12%), and BAP N-100, the highest palmitic acid C16:0 (22.58%) accumulation. The saturated fatty acid (SFA) composition decreased to 21.41% with BAP N-0 treatment. In GA N-0 experiments, C18:1 was the predominant fatty acid with 39.21%, and at GA N-100, the highest increase was for palmitic acid (C16:0) with 37.31%. The BAP stimulus and higher N deficiency stress degree increased MUFAs and PUFAs percentages. The GA stimulus, along with increased N limitation in *S. obliquus*, led to a decrease in SFAs compared to the GA N-100 control. Also, MUFAs values increased in a manner dependent on N limitation. Treatment with GA N-0 produced the maximum accumulation of MUFAs with 43.07%, 1.68-fold more than the control. In GA N-100, the SFAs composition was the highest at 53.70%, while it was 29.35% in control N-100 without stimulus.

Table 1: Fatty acid profiles (percentage of total fatty acids) of *S. obliquus* grown under phytohormones and N-limited conditions

Fatty acids	Controls (% N)				BAP (% N)				GA (% N)			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
C14:0	0.2 ± 0.02 ^a	0.4 ± 0.52 ^a	0.27 ± 0.06 ^a	0.8 ± 0.04 ^a	2.09 ± 0.57 ^a	0.39 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.07 ^a	0.4 ± 0.54 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.05 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	0.76 ± 0.13 ^a
C16:0	16.74 ± 0.02 ^a	19.18 ± 1.72 ^a	16.07 ± 1.01 ^a	14.92 ± 1.71 ^{ab}	12.65 ± 0.93 ^{ab}	15.91 ± 4.01 ^a	22.29 ± 2.49 ^c	22.58 ± 1.09 ^c	14.69 ± 0.72 ^{ab}	22.3 ± 0.6 ^c	33.8 ± 0.36 ^d	37.31 ± 1.06 ^e
C16:1	4.01 ± 0.64 ^a	4.03 ± 0.69 ^a	4.6 ± 0.28 ^a	2.45 ± 0.33 ^a	3.81 ± 0.19 ^a	2.52 ± 0.19 ^a	3.37 ± 0.20 ^a	2.51 ± 0.22 ^a	3.87 ± 0.26 ^a	3.99 ± 0.25 ^a	3.59 ± 0.66 ^a	4.12 ± 0.15 ^a
C16:2	1.93 ± 0.91 ^a	1.52 ± 0.38 ^a	1.97 ± 1.05 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	1.93 ± 0.4 ^a	1.8 ± 0.58 ^a	1.37 ± 0.2 ^a	1.11 ± 0.06 ^a	1.57 ± 0.09 ^a	1.61 ± 0.12 ^a	1.47 ± 0.01 ^a	1.08 ± 0.24 ^a
C16:3	1.54 ± 0.19 ^a	1.3 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.08 ^{ac}	3.18 ± 0.11 ^b	0.4 ± 0.25 ^c	1.55 ± 0.29 ^a	2.46 ± 0.55 ^b	0.77 ± 0.30 ^{ce}	0.3 ± 0.04 ^c	1.13 ± 0.44 ^a	0.92 ± 0.07 ^{ac}	0.76 ± 0.16 ^{ce}
C18:0	5.16 ± 0.07 ^a	5.69 ± 0.85 ^a	2.03 ± 1.72 ^b	2.32 ± 1.81 ^b	3.43 ± 0.01 ^b	10.08 ± 0.86 ^c	6.78 ± 0.03 ^d	3.05 ± 0.02 ^b	4.36 ± 0.12 ^b	4.0 ± 0.34 ^b	4.7 ± 0.02 ^b	4.08 ± 0.26 ^b
C18:1	37.66 ± 0.80 ^a	29.02 ± 4.10 ^b	31.33 ± 0.97 ^c	21.66 ± 0.74 ^d	41.12 ± 0.63 ^e	30.03 ± 3.03 ^e	26.92 ± 1.25 ^f	25.01 ± 0.79 ^{bf}	39.21 ± 0.47 ^e	26.95 ± 1.51 ^{bf}	16.72 ± 1.09 ^g	9.31 ± 0.32 ^h
C18:2 n6	16.1 ± 0.1 ^a	14.79 ± 1.69 ^a	21.82 ± 0.53 ^b	14.43 ± 1.8 ^{ac}	16.95 ± 0.37 ^{ad}	15.68 ± 0.63 ^a	16.74 ± 0.69 ^a	16.78 ± 0.48 ^{ad}	16.84 ± 0.35 ^{ad}	17.24 ± 0.79 ^{ad}	15.90 ± 0.02 ^a	15.35 ± 0.21 ^c
C18:3	13.28 ± 0.33 ^a	19.28 ± 2.11 ^b	16.16 ± 1.06 ^a	27.66 ± 0.6 ^c	14.39 ± 0.3 ^a	17.57 ± 1.65 ^{bc}	16.98 ± 3.86 ^{ac}	20.98 ± 0.11 ^d	15.52 ± 0.5 ^a	16.11 ± 0.97 ^a	14.33 ± 0.15 ^a	15.68 ± 0.77 ^a
C20:0	3.43 ± 0.98 ^a	4.8 ± 1.25 ^a	4.88 ± 0.27 ^a	11.28 ± 1.25 ^b	3.23 ± 0.5 ^{ac}	4.46 ± 1.59 ^a	2.69 ± 0.45 ^c	6.8 ± 0.34 ^d	3.42 ± 0.5 ^a	5.88 ± 0.13 ^d	8.23 ± 0.1 ^e	11.55 ± 0.01 ^b
SFA	25.92 ± 0.92^a	25.1 ± 1.52^a	18.36 ± 1.06^b	29.38 ± 1.04^c	21.41 ± 0.57^b	30.84 ± 0.50^d	32.15 ± 0.77^d	32.83 ± 0.54^d	22.68 ± 0.22^b	32.58 ± 0.55^d	47.04 ± 0.61^e	53.7 ± 1.13^f
MUFA	41.67 ± 1.02^a	33.05 ± 1.72^{bc}	35.93 ± 1.01^b	24.11 ± 0.71^d	44.92 ± 0.93^a	32.55 ± 0.79^c	30.29 ± 1.49^c	27.52 ± 1.09^d	43.07 ± 0.72^a	30.94 ± 0.6^c	20.3 ± 0.96^e	13.43 ± 1.06^f
PUFA	32.4 ± 2.04^a	41.85 ± 0.89^b	45.71 ± 0.98^c	46.52 ± 0.63^c	33.67 ± 1.49^a	36.61 ± 0.69^d	37.55 ± 0.8^{de}	39.65 ± 0.22^e	34.25 ± 0.26^{ad}	36.48 ± 0.75^d	32.65 ± 0.66^a	32.87 ± 1.15^a

BAP: benzyl amino purine and GA: gibberellic acid. C12:0, lauric acid; C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1 palmitoleic acid; C18:1, oleic acid; C18:2 n6, linoleic acid; C18:3, linolenic acid; C20:0, arachidic acid, SFA: saturated fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acid; and PUFA: polyunsaturated fatty acid. Values are presented as mean ± standard error (n = 2). Different letters within the same row for each fatty acid indicate values are significantly different at 95% confidence level according to Tukey's test.

3.4 Effect of BAP and GA in *S. obliquus* under N-Limited Conditions on the Expression of *ACP*, *FATA*, *SAD*, and *DGAT*

All N-limited treatments, with and without 10⁻⁵ M BAP, induced an over-expression in the four genes analyzed (Figs. 5A–5D). Over-expression was N-concentration dependent, with significant differences ($p \leq 0.05$) in *ACP*, *DGAT*, and *FATA* genes. The BAP N-0 treatment showed a higher expression of *ACP* with a 1.26-fold increase compared with the N-0 control, and a 3.5-fold increment compared to the non-stimulated N-100 control (Fig. 5A). *FATA* expression was the most pronounced with a 4.0-fold increase in the BAP N-0 and N-0 BAP-less treatments. *FATA* expression levels were 2.0-fold higher in BAP N-100 compared to the N-100 experiment (Fig. 5B). In *SAD*, the BAP N-limited treatments induced a gene expression increment of up 2.3-fold compared to N-100 control (Fig. 5C). *DGAT* expression in BAP N-limited cultures was not significantly different from the N-limited controls; nonetheless, N-100 BAP increased 1.7-fold and N-0 BAP 2.2-fold *DGAT* expression with respect to the N-replete control (Fig. 5D).

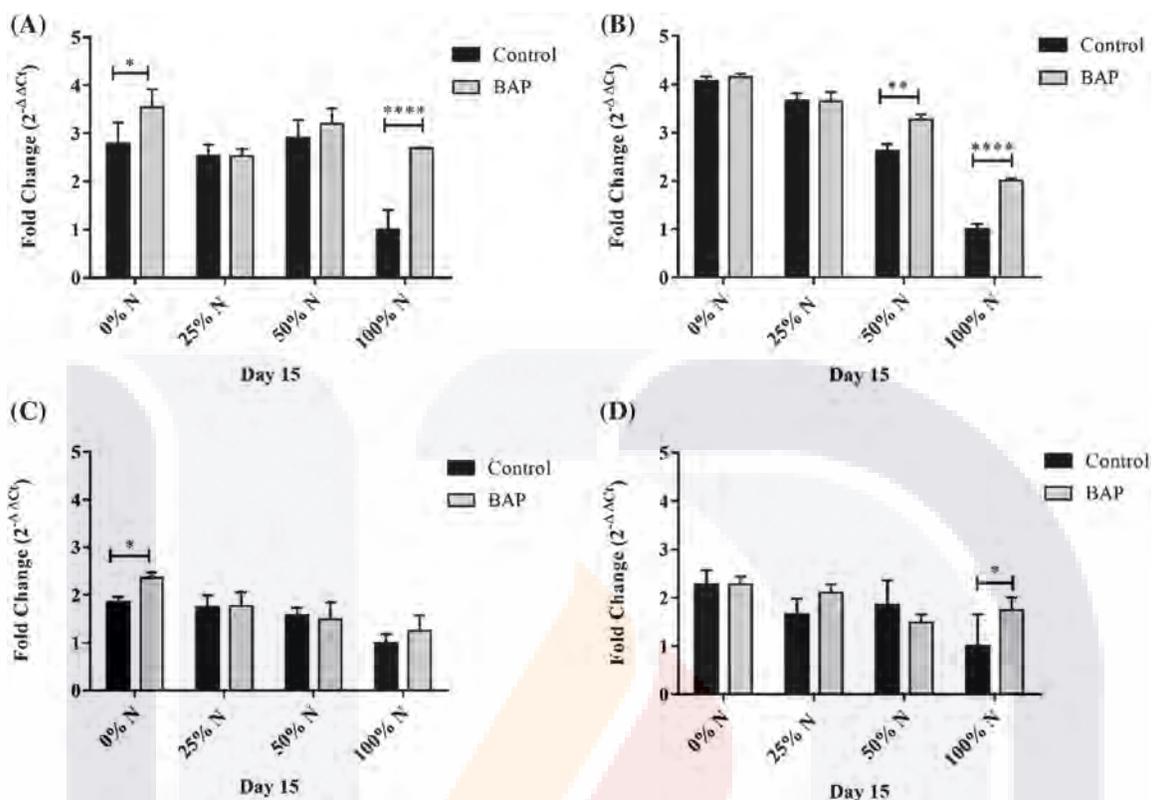


Figure 5: Relative expression of (A) *ACP*, (B) *FATA*, (C) *SAD*, and (D) *DGAT* in *S. obliquus*. The relative expression levels of *S. obliquus* genes are represented; the black bars represent the expression at different N-percentages: 0%, 25%, 50%, and 100%, without BAP supplementation and the grey bars represent the gene expression at the same N-percentages: 0%, 25%, 50%, and 100%, with 10^{-5} M BAP supplementation. The analysis by qRT-PCR was normalized with the constitutive gene 18S-ribosomal. The error bars represent one standard deviation. Data with * are significantly different, by the Tukey's test $p < 0.05$

The *ACP*, *DGAT*, and *FATA* expressions in the GA N-100 cultures increased by 3.3, 2.0, and 2.1-folds, respectively, compared to N-100 treatment. The *ACP* and *DGAT* over-expression in N-limited (N-0, N-25, and N-50) treatments were slightly higher than the GA N-limited experiments (Figs. 6A and 6B). *SAD* expression levels in GA-induced cultures were not significantly higher ($p \leq 0.05$) than N-limited tests without stimulus. Although, there was a 2.0-fold *SAD* expression increase in the total N-absence compared to the N-100 trial (Fig. 6C). *FATA* expression in N-limited and unstimulated GA treatments were higher than those with GA-added, increased expression by 4.1-fold with N-0, 2.9 with N-25, and 2.65-fold with N-50, compared with N-100 (Fig. 6D).

4 Discussion

Recently, phytohormone supplementation has been used to improve microalgae growth, division, and metabolite production [20]. However, the biochemical effects of phytohormones on various microalgae species are not entirely established. There is little knowledge about the functional role of BAP and GA in *S. obliquus* physiology under N-limited stress conditions. Therefore, our research aims to determine the usefulness of these chemical regulators for their potential use in the biotechnology field.

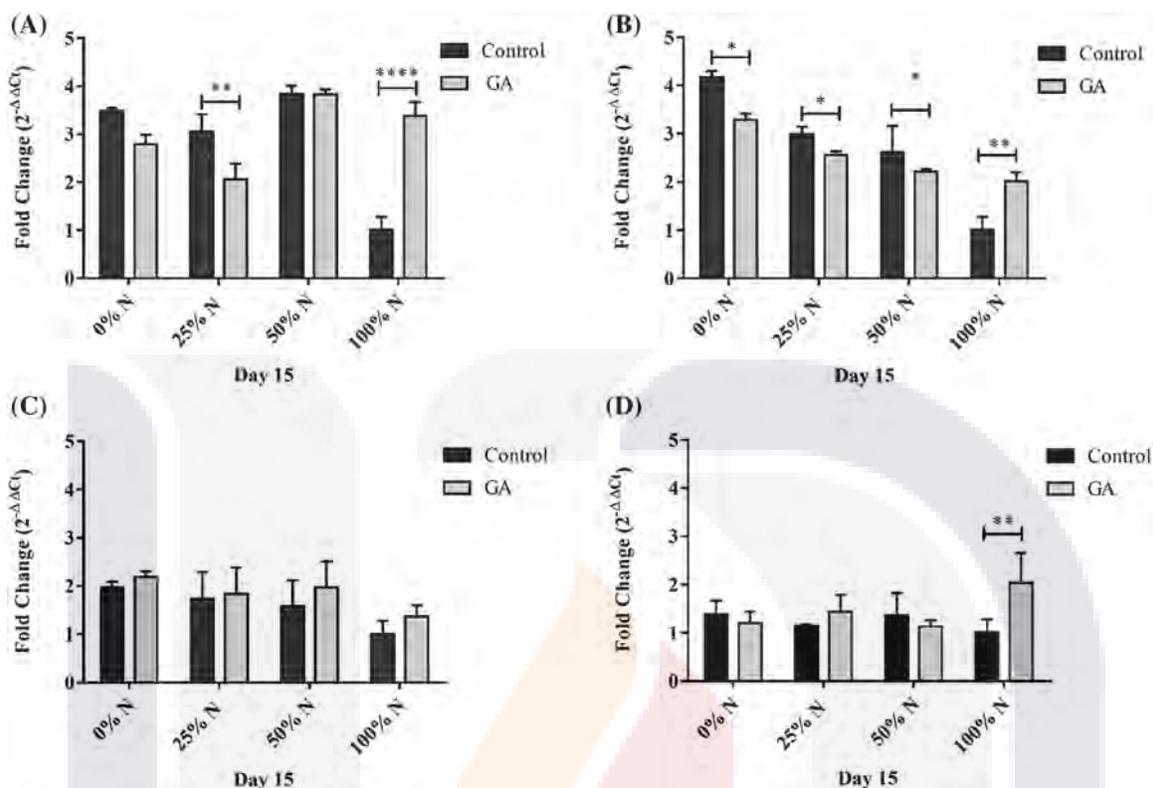


Figure 6: Relative expression of (A) *ACP*, (B) *FATA*, (C) *SAD*, and (D) *DGAT* in *S. obliquus*. The relative expression levels of *S. obliquus* genes are represented; the black bars represent the expression at different N-percentages: 0%, 25%, 50%, and 100%, without GA supplementation and the grey bars represent the gene expression at the same N-percentages: 0%, 25%, 50%, and 100%, with 10^{-6} M GA supplementation. The analysis by qRT-PCR was normalized with the constitutive gene 18S-ribosomal. The error bars represent one standard deviation. Data with * are significantly different, by the Tukey's test $p < 0.05$

4.1 Cell Density, Biomass Productivity and Lipids Induced by BAP and GA

The physiological effects of cytokinins and gibberellins in microalgae are similar to those exerted on plants. When these hormones were applied exogenously to some microalgae strains, cell growth, biomass, and photosynthetic pigments increased [21].

S. obliquus lipid yield increased significantly on the fifth day of the experiment by 2.85-fold (19.70% DW) (Fig. 1B). Similarly, Czerpak et al. [22], observed a biomass increase and in the α - and β -carotene production in *Chlorella pyreïnosa* as BAP concentration increased. In *C. pyreïnosa*, BAP increased biomass, and the production of α -linoleic acid had an increment by 3.03-fold [23]. *S. obliquus* contains 12%–14% of lipids DW [24]; compared to these results, 10^{-5} M BAP application increased lipid yield to 27% DW. According to Yu et al. [25], BAP could change the carbon metabolic flow towards fatty acid synthesis. On the other hand, 10^{-6} M GA generated the highest biomass productivity with $59.88 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, while the cell number was 1.35-fold more elevated than the control (Figs. 2A and 2C). GA has several applications in the agro-industrial sector because of its multifunctional activity as it induces plant growth, stimulates seed germination, intervenes in cell elongation, and responds to abiotic stress [26]. Du et al. [27] observed an increase in biomass concentration in *C. pyreïnosa* cultures stimulated with 10 and 20 mg L^{-1} GA. In another report, the exogenous addition of 10^{-7} – 10^{-6} M GA increased cell number and photosynthetic pigments under stress conditions by heavy metals such as cadmium and lead [28]. Unlike

BAP, GA did not show a significant increase in lipid synthesis (Fig. 2B). This behavior was described in *Chlamydomonas reinhardtii* [29] and *Chlorella vulgaris* [30].

4.2 Cell Density, Biomass Productivity and Total Lipids Induced with BAP and GA under N-Limited Conditions

N limitation is the most widely used strategy to induce higher accumulation of neutral lipids in microalgae, since it stimulates the hydrolysis of phospholipids, increases the intracellular fatty acid fraction of acyl-Coenzyme-A (acyl-CoA) and activates diacylglycerol acyltransferase (DGAT), which in turn catalyzes the conversion of acyl-CoA to triacylglycerol (TAG) [31]. However, it simultaneously induces rapid protein biodegradation and a dramatic decrease in cell growth and biomass productivity [32]. The phytohormone application in N-limited microalgae cultures has resulted in high lipid and biomass productivity in *Acutodesmus obliquus* [33] and *Graesiella emersonii* NC-M1, and *Chlorophyta* sp. NC-M5 [34]. To our knowledge, this is the first report where BAP and GA are used with nitrogen limitation to stimulate lipid production and prevent a drastic drop in cell density. We found that N limitation in *S. obliquus* supplemented with 10^{-5} M BAP significantly improved the biomass productivity 1.65-1.92-fold compared with the N-limited trials without BAP. It also significantly increased lipid yield (up to 1.8-fold) compared to N-reduced assays without BAP (Figs. 3A–3C). There is evidence that cytokinins confer increased resistance to abiotic stress in plants, promote photosynthesis, stimulate protein synthesis in chloroplasts, and regulate carbon and nitrogen metabolism [35]. The increase in lipids content in the N absence/limitation is attributed to a redistribution of carbon from carbohydrate biosynthesis to lipid synthesis [36], and an increase in the activity of ATP synthetase, calmodulin, and cyclic electron flow in photosystem I [37].

On the other hand, when 10^{-6} M GA was added to the N-limited *S. obliquus* cultures, cell density was significantly higher from 1.14 to 2.17-fold than the untreated cultures (Fig. 4A). The effect of GA on lipid production was not as pronounced as in the case of BAP, probably because of the carbon flow directed towards carbohydrate synthesis to maintain cell growth in the face of N deficiency [38]. However, the N limitation stress induced a significant lipid increase compared to the N-replete controls (Fig. 4B). There are few known about the role of the phytohormones in microalgae metabolism under abiotic stress; however, an expected mechanism for stress regulation and lipid biosynthesis involves cellular responses such as over-expression of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase gene (*RBCL*), improved photosynthetic and chlorophyll efficiency, and increased production of antioxidases and antioxidants [39].

4.3 *S. obliquus* Fatty Acid Profile Stimulated with BAP and GA under N-Limited Conditions

The *S. obliquus* fatty acids profile was modified under the BAP N-limited conditions (Tab. 1). N-0 BAP had a considerable impact on the relative abundance of MUFAs, particularly C18:1, with a 19% increase, a 7.97% decrease in SFA, and 12.85% decrease in PUFAs, compared to the N-100 treatment without BAP stimulus. These results are relevant because high oleic acid percentages and lower amounts of PUFAs increase the oxidative biodiesel stability and significantly reduce the nitrogen oxides (NOx) generation [40]. In agreement with our results, *S. obliquus* also had an increase in C18:1 by subjecting to N-depleted conditions [41]. BAP supplementation in *Scenedesmus* sp. LX1 caused an increase in MUFAs, and as the BAP dose increased, PUFAs decreased [42]. For the GA effect in *S. obliquus*, we found that the most abundant fatty acids were C16:0, C18:0, and C18:1. Similar results were obtained by Jusoh et al. [30] in *C. vulgaris*.

The relative abundance of SFAs in *S. obliquus* N-limited, decreased with increasing nutritional stress, while the MUFAs composition became more abundant with increasing N deficiency. These data are consistent with those of Zhao et al. [36] in *Monoraphidium* sp. and Renuka et al. [33] in *A. obliquus*. An oil with a high proportion of MUFAs and SFAs is critical for improving biodiesel quality since properties

such as viscosity, cetane number, and iodine value are optimized [43]. The results suggest that it is possible to use BAP or GA to induce *S. obliquus* oil enrichment selectively with SFAs or MUFAs.

4.4 Gene Expression Analysis

N limitation stress in microalgae or exogenous phytohormone application increase the gene-expression in the fatty acid biosynthetic pathway [44,45]. However, few studies have evaluated the expression of genes involved in lipid synthesis under phytohormone stimulus and N limitation.

In this study, three genes from the fatty acid biosynthesis in microalgae were selected: the *ACP*, *SAD* and *FATA*, and *DGAT*, which are involved in TAG synthesis. Acyl-carrying protein (ACP) is essential for the *de novo* synthesis of fatty acids, it is responsible for binding and transporting the acyl chains to enzymes involved in the condensation, reduction and dehydration cycles in fatty acid (FA) biosynthesis [46]. *ACP* over-expression was obtained in all BAP and GA treatments N-limited. *ACP* expression level increased 3.5-fold with BAP N-0 and 3.8-fold with GA N-50, both compared to their N-100 controls without stimulus (Figs. 5A and 6A). Similarly, Sharma et al. [12], showed in *Scenedesmus dimorphus* and *S. quadricauda* that *ACP* expression increases by 3.0 and 9.0-fold, respectively, under N-limited (2.5 mM) conditions. In contrast, BAP did not affect *ACP* regulation in *Botryococcus braunii*; however, with GA (15 mg L⁻¹), *ACP* was over-expressed by up to 6.5-fold [47].

Of all the genes analyzed, *FATA* expression was the most pronounced (increased up to 4.0-fold). *FATA* primary function is to produce free fatty acids by hydrolyzing oleoyl-ACP substrates, mainly C18:1-ACP [48]. The over-expression of some thioesterase genes under N deficiency conditions increased fatty acid production by regulating the feedback rate of fatty acid biosynthesis [49]. In this study, we found that the higher the N deficiency, the higher the *FATA* over-expression. BAP and GA induced *FATA* over-expression; however, N limitation was the main factor that triggered gene-expression (Fig. 5B). This behavior is related to *S. dimorphus* and *S. quadricauda* results, where *FATA* was over-expressed under N-limited conditions by 1.5 and 7.0-folds, respectively [12].

The *FATA* expression with GA N-100 was 2.0- fold higher than its N-100 control (Fig. 6B). It was reported that GA stimulates esterase activity in *C. pyrenoidosa* [50]. The results are consistent with those of Sivaramakrishnan and Incharoensakdi [51], where *FATA* expression increased by 1.8-fold in *Chorella* sp. In the case of BAP N-100 treatment, it also produced a 2.0-fold increase in *FATA* expression. Similarly, in *C. pyrenoidosa*, BAP increased by 2.0-fold *FATA* expression, while in *B. braunii*, the addition of BAP increased *FATA* expression by 63.50-fold [27].

The oleic chains synthesis are primarily due to the action of *SAD*. After stearyl-ACP (C18:0-ACP) is formed, *SAD* converts it to C18:1-ACP by introducing a double bond at the Δ^9 position, then being transported out of the chloroplast [52]. The N limitation coupled to BAP or GA stimulus resulted in over-expression of *SAD* by 1.33-2.35-fold (Figs. 5C and 6C). Similarly, in *S. dimorphus* SD12 and SD16, the N-deficit stress increased the *SAD* expression by 1.0 and 1.5, respectively [12]. Although *SAD* expression increases were not as pronounced, *S. obliquus* oil had a considerable enrichment in C18:1 (Tab. 1). The same behavior was obtained in *B. braunii* [53]. The BAP and GA effect on *SAD* overexpression was similar to that of N-limited and non-stimulated controls. Like our results, GA also did not increase *SAD* expression in *C. pyrenoidosa* [27]. The *SAD* expression had a significant increase with BAP N-0 treatment (Fig. 5C). This result suggests that oleic acid accumulation can be induced since *SAD* has shown a positive correlation with C18:1 [11]. *DGTA* exhibited an over-expression in BAP N-100 and GA N-100 trials, compared to the non-supplemented N-100 controls (Figs. 5D and 6D). BAP N-0 increased the *DGAT* expression by 2.0-fold, although, there were no significant differences with its N-0 control (Fig. 6D). *DGTA* has been positively correlated with lipid accumulation since it is the enzyme that catalyzes the last step for TAG biosynthesis [54]. In this work, as the N limitation incremented, the fatty

acids C16:0 and C18:1 increased (Tab. 1). It has been seen that *DGAT* favors the addition of the C16:0 or C18:1 chains to the sn-3 position of diacylglycerols (DAG) [55]. In comparison with our results, other microalgae species have shown a similar increase in N-deficit induced *DGAT* expression, for example, in *S. dimorphus* SD12, and *S. quadricauda* SQ19, *DGAT* increased 1.5, and 2.0-fold, respectively [12]. In *Graesiella emersonii*, *DGAT* expression increased 3.17-fold when a mixture of IAA and kinetin were applied under N-limited conditions [34].

Currently, the mechanism of action by which phytohormones alter or regulate the expression levels of genes involved in microalgae lipid metabolism is not entirely elucidated. However, BAP and GA can control the metabolic flow towards fatty acid synthesis, promote glycolysis, interferes in the mevalonate pathway, and direct the carbon flow to pyruvate and acetyl-Co synthesis [25,56].

5 Conclusion

Optimal concentrations of 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA increased cell growth and biomass productivity in *S. obliquus*. GA did not affect the total lipid production, and BAP increased the lipids to 27%. Exogenous 10^{-5} M BAP and 10^{-6} M GA supplementation along with nitrogen-starvation produced a lipid yield of 55% and 50% yield, respectively, and maintained the microalgal growth. The proportions of fatty acid compositions were also affected, leading to high values of C16:0 and C18:1, which are indispensable for biodiesel's good quality. The *ACP*, *SAD*, *FATA*, and *DGAT* expressions were up-regulated mainly by the increment of the N-limited conditions.

This study generated relevant information to increase cell growth, biomass, and lipid yield in *S. obliquus*, which has excellent potential as a raw material for biodiesel production due to the quality of its oil and the capacity to accumulate high quantities of oil. It also provides data on the regulation of some key genes in lipid synthesis, which can be considered in metabolic engineering strategies to optimize lipid productivity in microalgae for sustainable biofuels.

Acknowledgement: We thank Dr. Roberto Rico for reviewing the English in the manuscript. JFMD and HCCA gratefully acknowledge to Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) for support. HCCA specially thanks to Comité Técnico para el Otorgamiento de Becas, Estudio, Apoyos Económicos y Licencias con Goce de Sueldo of Instituto Politécnico Nacional (COTEBAL-IPN) for financial support.

Funding Statement: The authors received no specific funding for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

References

1. Jha, D., Jain, V., Sharma, B., Kant, A., Garlapati, V. K. (2017). Microalgae-based pharmaceuticals and nutraceuticals: An emerging field with immense market potential. *ChemBioEng Reviews*, 4(4), 257–272. DOI 10.1002/cben.201600023.
2. Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A. et al. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 893–913. DOI 10.1016/j.rser.2017.05.199.
3. Patnaik, R., Mallick, N. (2015). Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass as feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: An integrated paradigm for microalgal biorefinery. *Algal Research*, 12, 328–336. DOI 10.1016/j.algal.2015.09.009.
4. Fakhry, E. M., El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56(1), 111. DOI 10.1186/s40529-015-0085-7.

5. Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S. et al. (2017). A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19(3), 637–668. DOI 10.1007/s10098-016-1309-6.
6. Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., Yan, Y. (2018). Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. *Fermentation*, 4(2), 25. DOI 10.3390/fermentation4020025.
7. Lu, Y., Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in Plant Science*, 20(5), 273–282. DOI 10.1016/j.tplants.2015.01.006.
8. Sulochana, S. B., Arumugam, M. (2016). Influence of abscisic acid on growth, biomass and lipid yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresource Technology*, 213, 198–203. DOI 10.1016/j.biortech.2016.02.078.
9. Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 294. DOI 10.1186/s13068-017-0747-7.
10. Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B. Z., Hsin, C., Peccia, J. (2012). Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 74. DOI 10.1186/1754-6834-5-74.
11. Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L. et al. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 18. DOI 10.1186/1754-6834-5-18.
12. Sharma, T., Gour, R. S., Kant, A., Chauhan, R. S. (2015). Lipid content in *Scenedesmus* species correlates with multiple genes of fatty acid and triacylglycerol biosynthetic pathways. *Algal Research*, 12, 341–349. DOI 10.1016/j.algal.2015.09.006.
13. Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. London: Elsevier Academic Press.
14. George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C. et al. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367–374. DOI 10.1016/j.biortech.2014.08.086.
15. Babu, A. G., Wu, X., Kabra, A. N., Kim, D. P. (2017). Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. *Algal Research*, 23, 178–185. DOI 10.1016/j.algal.2017.02.004.
16. Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *ALGAE*, 31(4), 391–401. DOI 10.4490/algae.2016.31.12.7.
17. Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. DOI 10.1139/o59-099.
18. Salas-Montantes, C. J., González-Ortega, O., Ochoa-Alfaro, A. E., Camarena-Rangel, R., Paz-Maldonado, L. M. T. et al. (2018). Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1721–1733. DOI 10.1007/s10811-018-1393-6.
19. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
20. Yu, X., Chen, L., Zhang, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Frontiers in Microbiology*, 6, 56.
21. Romanenko, K. O., Kosakovskaya, I. V., Romanenko, P. O. (2016). Phytohormones of microalgae: Biological role and involvement in the regulation of physiological processes. *International Journal on Algae*, 18(2), 179–201. DOI 10.1615/InterJAlgae.v18.i2.70.
22. Czerpak, R., Bajguz, A. (2014). Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenoids, with differential effects on xanthophylls in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66(1), 41–46. DOI 10.5586/asbp.1997.006.

23. Kokkiligadda, S., Pandey, B., Ronda, S. R. (2017). Effect of plant growth regulators on production of alpha-linolenic acid from microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Sādhanā*, *42*(10), 1821–1824.
24. Wu, X., Ruan, R., Du, Z., Liu, Y. (2012). Current status and prospects of biodiesel production from microalgae. *Energies*, *5*(8), 2667–2682. DOI 10.3390/en5082667.
25. Yu, X. J., Sun, J., Zheng, J. Y., Sun, Y. Q., Wang, Z. (2016). Metabolomics analysis reveals 6-benzylaminopurine as a stimulator for improving lipid and DHA accumulation of *Aurantiochytrium* sp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *91*(4), 1199–1207. DOI 10.1002/jctb.4869.
26. Camara, M. C., Vandenbergh, L. P., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C. et al. (2018). Current advances in gibberellic acid (GA3) production, patented technologies and potential applications. *Planta*, *248*(5), 1049–1062. DOI 10.1007/s00425-018-2959-x.
27. Du, H., Ahmed, F., Lin, B., Li, Z., Huang, Y. et al. (2017). The effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* ZF strain. *Energies*, *10*(11), 1696. DOI 10.3390/en10111696.
28. Falkowska, M., Pietryczuk, A., Piotrowska, A., Bajguz, A., Grygoruk, A. et al. (2011). The effect of gibberellic acid (GA3) on growth, metal biosorption and metabolism of the green algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck exposed to cadmium and lead stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, *20*(1), 53–59.
29. Park, W. K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C. W., Choi, Y. E. et al. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(5), 1128–1142. DOI 10.1007/s12010-013-0386-9.
30. Jusoh, M., Loh, S. H., Aziz, A., San Cha, T. (2019). Gibberellin promotes cell growth and induces changes in fatty acid biosynthesis and upregulates fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* UMT-M1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *188*(2), 450–459. DOI 10.1007/s12010-018-02937-4.
31. Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5494–5500. DOI 10.1016/j.biortech.2010.02.016.
32. Juneja, A., Ceballos, R. M., Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, *6*(9), 4607–4638. DOI 10.3390/en6094607.
33. Renuka, N., Guldhe, A., Singh, P., Bux, F. (2018). Combined effect of exogenous phytohormones on biomass and lipid production in *Acutodesmus obliquus* under nitrogen limitation. *Energy Conversion and Management*, *168*, 522–528. DOI 10.1016/j.enconman.2018.05.029.
34. Mandal, M. K., Chanu, N. K., Chaurasia, N. (2020). Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: A potential approach for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *297*, 122439. DOI 10.1016/j.biortech.2019.122439.
35. Wu, X., He, J., Chen, J., Yang, S., Zha, D. (2014). Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of eggplant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. *Protoplasma*, *251*(1), 169–176. DOI 10.1007/s00709-013-0535-6.
36. Zhao, Y., Li, D., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T. et al. (2018). Melatonin enhances lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions via a multi-level mechanism. *Bioresource Technology*, *259*, 46–53. DOI 10.1016/j.biortech.2018.03.014.
37. Chen, H., Hu, J., Qiao, Y., Chen, W., Rong, J. et al. (2015). Ca²⁺-regulated cyclic electron flow supplies ATP for nitrogen starvation-induced lipid biosynthesis in green alga. *Scientific Reports*, *5*(1), 294. DOI 10.1038/srep15117.
38. Ikarán, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S. (2015). The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*, *10*, 134–144. DOI 10.1016/j.algal.2015.04.023.
39. Zhao, Y., Wang, H. P., Han, B., Yu, X. (2019). Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: A review. *Bioresource Technology*, *274*, 549–556. DOI 10.1016/j.biortech.2018.12.030.

40. Tat, M. E., Wang, P. S., Van Gerpen, J. H., Clemente, T. E. (2007). Exhaust emissions from an engine fueled with biodiesel from high-oleic soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(9), 865–869. DOI 10.1007/s11746-007-1109-6.
41. Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143, 1–9. DOI 10.1016/j.biortech.2013.05.105.
42. Dao, G. H., Wang, X. X., Zhang, T. Y., Wu, G. X., Zhan, X. M. et al. (2019). Enhanced biomass production and fatty acid accumulation in *Scenedesmus* sp. LX1 treated with 6-benzylaminopurine. *Algal Research*, 44, 101714. DOI 10.1016/j.algal.2019.101714.
43. Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 143–169. DOI 10.1016/j.rser.2011.07.143.
44. Banerjee, A., Maiti, S. K., Guria, C., Banerjee, C. (2017). Metabolic pathways for lipid synthesis under nitrogen stress in *Chlamydomonas* and *Nannochloropsis*. *Biotechnology Letters*, 39(1), 1–11. DOI 10.1007/s10529-016-2216-y.
45. Norlina, R., Norashikin, M. N., Loh, S. H., Aziz, A., San Cha, T. (2020). Exogenous abscisic acid supplementation at early stationary growth phase triggers changes in the regulation of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* UMT-M1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(4), 1653–1669. DOI 10.1007/s12010-020-03312-y.
46. Chan, D. I., Vogel, H. J. (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal*, 430(1), 1–19. DOI 10.1042/BJ20100462.
47. Du, H., Ren, J., Li, Z., Zhang, H., Wang, K. et al. (2020). *Plant Growth Regulators Affect Biomass, Protein, Carotenoid, and Lipid Production in Botryococcus Braunii*. *Aquaculture International*, 28, 1319–1340.
48. Salas, J. J., Ohlrogge, J. B. (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403(1), 25–34. DOI 10.1016/S0003-9861(02)00017-6.
49. Lu, X., Vora, H., Khosla, C. (2008). Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. *Metabolic Engineering*, 10(6), 333–339. DOI 10.1016/j.ymben.2008.08.006.
50. Du, K., Tao, H., Wen, X., Geng, Y., Li, Y. (2015). Enhanced growth and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* by plant growth regulator GA3. *Fresenius Environment Bulletin*, 24, 3414–3419.
51. Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A. (2020). Plant hormone induced enrichment of *Chlorella* sp. omega-3 fatty acids. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1902. DOI 10.1186/s13068-019-1647-9.
52. Zhao, N., Zhang, Y., Li, Q., Li, R., Xia, X. et al. (2015). Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 9–16. DOI 10.1016/j.plaphy.2014.12.009.
53. Choi, G. G., Kim, B. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2011). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1031–1037. DOI 10.1007/s10811-010-9636-1.
54. Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W., Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 17. DOI 10.1186/1754-6834-7-17.
55. Li, R., Yu, K., Hildebrand, D. F. (2010). *DGAT1*, *DGAT2* and *PDAT* expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 45(2), 145–157. DOI 10.1007/s11745-010-3385-4.
56. Yu, X. J., Sun, J., Sun, Y. Q., Zheng, J. Y., Wang, Z. (2016). Metabolomics analysis of phytohormone gibberellin improving lipid and DHA accumulation in *Aurantiochytrium* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 258–268. DOI 10.1016/j.bej.2016.05.002.

Appendix

Appendix A: qRT-PCR primers used for *S. Obliquus* gene expressions analysis

Gene	Primer	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Annealing T (°C)
<i>ACP</i>	Forward	5'- AGAAGATCGAGCCGGCAAA -3'	350	55
	Reverse	5'- CTTCTGTTTGTCTGTGCTGCA -3'		
<i>FATA</i>	Forward	5'- ATGCCGGACATGGACCACCTA -3'	200	62
	Reverse	5'- GCACCTGGGTGACCATCAACA -3'		
<i>SAD</i>	Forward	5'- TGCTGAAGCCGGTGGACAA -3'	450	55
	Reverse	5'- GATGAGGTTCTGGATGGTTAC -3'		
<i>*DGAT</i>	Forward	5'- AGAAGATCGAGCCGGCAAA -3'	500	55
	Reverse	5'- CTTCTGTTTGTCTGTGCTGCA -3'		
<i>18s rRNA</i>	Forward	5'- ATATCTTCACGAAGCGCATG -3'	200	58
	Reverse	5'- TGTACTCATTCCAATTACCAG -3'		

* [12]

AGRADECIMIENTOS

Al **COTEBAL-IPN** por la LCSG otorgada, a la **UPIIZ-IPN** y su personal, por las facilidades concedidas, y por el acceso para trabajar dentro de sus instalaciones durante la última etapa del doctorado.

Al Departamento de química del **Centro de Ciencias Básicas de la UAA**, por permitirme llevar a cabo el trabajo doctoral con las mayores facilidades posibles.

A mis tutores el Dr. José Francisco Morales Domínguez y la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por la asesoría brindada en este trabajo, por su confianza y apoyo.

A los miembros de mi comité Tutoral:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra y Dr. Roberto Rico Martínez por sus sugerencias y recomendaciones para mejorar la calidad de este trabajo

A mis compañeros de laboratorio y colaboradores en este trabajo Dras., Mtras., Dres., y Mtros.: Vivi, Ana, Cristina, Mariana, Vivian, Gaby, Olga, Caro, A. Rocha, Charly, Mario Arzate., Aldo, Isaac, David, Mario M. y Juan Pablo por su ayuda, amistad y por las reuniones “académicas” realizadas en favor de la investigación.

A la **Coordinación del Doctorado** y al **Departamento de Apoyo al Posgrado** por su ayuda.

DEDICATORIAS

A Dios y a mi Familia:

A mi esposa Vivi, mis hijos Chris y Nicole: por su amor, paciencia y apoyo en las buenas, malas y peores.

A mis Papás por su apoyo incondicional.

A ti †hermano. Descansa en paz.



ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	10
2.	MARCO TEÓRICO.....	14
2.1	Microalgas oleaginosas.....	14
2.2	Lípidos en microalgas	17
2.2.1	Ácidos grasos	18
2.2.2	Lípidos Neutros.....	20
2.2.3	Lípidos Polares	21
2.3	Biosíntesis de lípidos en microalgas.....	22
2.3.1	Acumulación de lípidos bajo limitación de N.....	23
2.3.2	Acumulación de lípidos por estímulo con fitohormonas	25
2.3.3	Acumulación de lípidos bajo deficiencia de N acoplada a un estímulo con fitohormonas	28
2.3.4	Expresión de genes involucrados en la biosíntesis y almacenamiento de lípidos	29
2.4	Expresión de genes con limitación de N.....	30
2.4.1	Expresión de genes bajo deficiencia de N acoplada a un estímulo con fitohormonas	31
2.5	Extracción de lípidos en microalgas	32
2.5.1	Extracción asistida con irradiación infrarroja (EAIR).....	34
2.5.2	Optimización por metodología de superficies de respuesta.....	36
2.6	Aplicaciones de lípidos de microalgas.....	38
2.6.1	Cosméticos	39
2.6.2	Alimentos funcionales	40
2.6.3	Salud Humana	41
2.6.4	Biocombustibles: biodiesel	42
2.7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	43
3.	JUSTIFICACIÓN	46
4.	OBJETIVO GENERAL.....	48
4.1	Objetivos particulares.....	48
5.	HIPÓTESIS.....	49
6.	METODOLOGÍA.....	50
6.1	Cultivo de <i>S. obliquus</i>	50

6.2	Cinética de crecimiento de <i>S. obliquus</i>	50
6.3	Crecimiento de <i>S. obliquus</i> con estímulo de BAP y AG a 10^{-5} - 10^{-8} M.....	51
6.4	Efecto de BAP y AG sobre el crecimiento y el contenido de lípidos con limitación de N.....	51
6.5	Cuantificación de lípidos de <i>S. obliquus</i>	51
6.5.1	Método de la Sulfofosfovainillina.....	51
6.5.2	Caracterización de los ácidos grasos de <i>S. obliquus</i> por cromatografía de gases (CG)-FID.....	52
6.6	Análisis de expresión.....	52
6.6.1	Extracción de ADN.....	52
6.6.2	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	53
6.6.3	Diseño de oligonucleótidos.....	54
6.6.4	Análisis de expresión mediante PCRq.....	54
6.7	Análisis estadístico.....	55
6.8	Extracción de lípidos.....	56
6.8.1	Métodos de extracción de Folch y de Bligh-Dyer.....	56
6.8.2	Método de extracción Soxhlet.....	57
6.8.3	Extracción asistida por irradiación infrarroja (EAIR).....	57
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
7.1	Cultivo y tasa de crecimiento de <i>S. obliquus</i>	59
7.2	Reacción de la sulfofosfovainillina: curva de calibración para determinar lípidos totales.....	61
7.3	Determinación de lípidos totales en <i>S. obliquus</i>	63
7.4	Determinación de las concentraciones de BAP y AG para mejorar la tasa de crecimiento, biomasa y la producción de lípidos en <i>S. obliquus</i>	64
7.4.1	Bencilaminopurina.....	64
7.4.2	Ácido giberélico.....	68
7.5	Efecto de BAP y AG en la densidad celular, la biomasa y la producción de lípidos en <i>S. obliquus</i> en condiciones de limitación de N.....	70
7.6	Efecto de BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M bajo condiciones de limitación de N en el perfil de ácidos grasos de <i>S. obliquus</i>	74
7.7	Análisis de expresión de genes por qRT-PCR.....	76
7.7.1	Extracción de ADN y diseño de oligonucleótidos.....	76
7.7.2	Amplificación de los genes de interés.....	78
7.7.3	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	78

7.8 Análisis de expresión de genes por qRT-PCR en *S. obliquus* bajo condiciones de limitación de N y estímulo con fitohormonas 79

7.9 Extracción asistida con irradiación infrarroja (EAIR) 90

7.9.1 Extracción Soxhlet, Folch y Bligh-Dyer 92

7.9.2 Efecto del disolvente 95

7.9.3 Optimización de la EAIR con metodología de superficie de respuesta 98

8. CONCLUSIONES 105

9. REFERENCIAS 107



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productividad de biomasa, contenido lipídico y productividad lipídica en diversas cepas de microalgas 15

Tabla 2. Contenido y productividades lipídicas en diversas especies de microalgas 16

Tabla 3. Contenido de lípidos totales de algunas especies de microalgas. 16

Tabla 4. Producción de aceite en microalgas con otras materias primas 17

Tabla 5. Inducción en la producción de lípidos en microalgas bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno. 24

Tabla 6. Efecto de fitohormonas sobre la biomasa y lípidos bajo estrés por deficiencia de N en diversas especies de microalgas 29

Tabla 7. Métodos para mejorar la extracción de lípidos de microalgas..... 33

Tabla 8. Uso potencial de derivados lipídicos de microalgas en cosméticos. 39

Tabla 9. Contenido de vitaminas en microalgas comparadas con otras fuentes..... 41

Tabla 10. Cantidad de aceite producido por diversas materias primas 42

Tabla 11. Metabolitos importantes en *Scenedesmus* spp y aplicaciones..... 44

Tabla 12. Iniciadores utilizados para el análisis de expresión genéticas de *S. obliquus* por qRT-PCR. 54

Tabla 13. Factores y niveles del diseño experimental para la optimización de la EAIR en la extracción de lípidos totales en *S. Obliquus*. 56

Tabla 14. Mezcla de disolventes a diferentes proporciones para extracción de lípidos . 57

Tabla 15. Cantidad de biomasa de *Scenedesmus* en otros estudios..... 60

Tabla 16. Producción de biomasa de *S. obliquus* control en MBB..... 63

Tabla 17. Porcentaje de rendimiento de lípidos totales en *S. obliquus*. 64

Tabla 18. Perfil de ácidos grasos de *S. obliquus* bajo estímulo de fitohormonas y en condiciones de N-limitado. 75

Tabla 19. Diseño central compuesto factorial completo de las variables estudiadas. 99

Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta 100

Tabla 21. Coeficientes de regresión del modelo de segundo orden predicho para el % de lípidos totales por EAIR. 100

Tabla 22. Validación del modelo teórico contra el valor experimental en la optimización de la EAIR..... 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de microalgas reportadas como oleaginosas	14
Figura 2. Esquema general de la estructura química de tres ácidos grasos saturados comunes en microalgas.	19
Figura 3. Esquema de las estructuras químicas de algunos ácidos grasos insaturados de importancia biológica.....	20
Figura 4. Esquema simplificado de la biosíntesis de lípidos en células verdes fotosintéticas.	22
Figura 5. Estructuras químicas representativas de algunas fitohormonas.	27
Figura 6. Acciones básicas en el diseño por metodología de superficie de respuesta...	36
Figura 7. Diseño factorial de tres niveles.....	37
Figura 8. Gráficas de un modelo cuadrático de superficie de respuesta para la optimización de dos variables.	38
Figura 9. Proceso de transesterificación de un aceite a biodiesel.....	42
Figura 10. Células de <i>Scenedesmus obliquus</i>	44
Figura 11. Equipo para la extracción de lípidos asistida con irradiación infrarroja.	58
Figura 12. Cultivos de <i>S. obliquus</i> en medio MMB.	59
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>S. obliquus</i>	59
Figura 14. Reacción con la SFV.....	61
Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de lípidos.....	62
Figura 16. Curva de calibración de biomasa de <i>S. obliquus</i> contra la D.O. ₇₅₀	62
Figura 17. Tasa de crecimiento, porcentaje de lípidos en biomasa y productividad de biomasa en <i>S. obliquus</i> estimulados con BAP.....	66
Figura 18. Activación del ciclo celular mitótico por acción de citoquininas.....	66
Figura 19. Tasa de crecimiento, porcentaje de lípidos en biomasa y productividad de biomasa en <i>S. obliquus</i> estimulados con AG.....	69
Figura 20. Tasa de crecimiento, productividad de la biomasa, y porcentaje de lípidos en <i>S. obliquus</i> a diferentes porcentajes de N con estímulo de BAP.	72
Figura 21. Tasa de crecimiento, productividad de la biomasa, y porcentaje de lípidos en <i>S. obliquus</i> a diferentes porcentajes de N con estímulo de AG	73
Figura 22. Réplicas de ADN genómico de <i>S. obliquus</i>	77
Figura 23. Amplificación de los genes de interés en ADN de <i>S. obliquus</i>	78
Figura 24. Expresión relativa de <i>ACP</i> , <i>FATA</i> , <i>SAD</i> y <i>DGAT</i> en <i>S. obliquus</i> a diferentes porcentajes de N con BAP.	80
Figura 25. Expresión relativa de <i>ACP</i> , <i>FATA</i> , <i>SAD</i> y <i>DGAT</i> en <i>S. obliquus</i> a diferentes porcentajes de N con AG.	80

Figura 26. Modelo estructural de la acil ACP3 de la mupirocina..... 81

Figura 27. Organización estructural de los dominios de la EAGS..... 82

Figura 28. Modelos estructurales de la tioesterasa acil-ACP de girasol..... 84

Figura 29. Dímero de la Δ^9 -desaturasa..... 85

Figura 30. complejo Δ^9 -desaturasa..... 86

Figura 31. Modelo estructural de tDGAT. 88

Figura 32. Modo de regulación de BAP en células de *Aurantiochytrium* sp. 89

Figura 33. Extracción de lípidos de *S. obliquus* con solventes. 90

Figura 34. Porcentaje de rendimiento de lípidos obtenidos con la EAIR..... 91

Figura 35. Porcentaje de rendimiento de lípidos con extracción Soxhlet. 92

Figura 36. Comparación del rendimiento de lípidos totales por diferentes métodos de extracción..... 93

Figura 37. Diagrama del mecanismo propuesto para la extracción de lípidos por solventes en microalgas..... 96

Figura 38. Gráficas del efecto del tiempo de extracción (X_1), composición del disolvente (X_2) y relación disolvente-biomasa (X_3) sobre el porcentaje de extracción de lípidos totales en *S. obliquus*. 102

ACRÓNIMOS

ABA	ácido abscísico
ACP	proteína portadora de acilo
AG	ácido giberélico
AG N-0	ácido giberélico y nitrógeno al 0%
AG N-25	ácido giberélico y nitrógeno al 25%
AG N-50	ácido giberélico y nitrógeno al 50%
AG N-100	ácido giberélico y nitrógeno al 100%
AGMI	ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados
AGS	ácidos grasos saturados
AIA	ácido indol acético
BAP	bencilaminopurina
BAP N-0	bencilaminopurina y nitrógeno al 0%
BAP N-25	bencilaminopurina y nitrógeno al 25%
BAP N-50	bencilaminopurina y nitrógeno al 50%
BAP N-100	bencilaminopurina y nitrógeno al 100%
CoA	coenzima A
DAG	diacilglicerol
DGAT	diacilglicerol aciltransferasa
DTT	ditiotreitól
FATA	ácido graso acil-ACP tioesterasa
FH	fitohormonas
GAs	giberelinas
MEAG	metil estéres de ácidos grasos
RBCL	ribulosa bisfosfato carboxylasa subunidad larga
SAD	estearoil-ACP desaturasa
SFV	sulfofosfovainillina
TAGs	triacilgliceroles

RESUMEN

La necesidad de fuentes de energía y alimentos, hace de las microalgas muy importantes a nivel industrial ya que pueden ser una solución sostenible para la demanda global de insumos. La bioquímica y los aspectos moleculares de microalgas en respuesta a una limitación de nitrógeno (N) acoplada a un estímulo con fitohormonas han sido poco exploradas. Primero, analizamos el efecto de dos fitohormonas junto con una limitación de N sobre cuatro factores: densidad celular, biomasa, acumulación de lípidos y expresión génica en *Scenedesmus obliquus*. Se evaluaron concentraciones de 10^{-5} - 10^{-8} M de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG) y se seleccionaron las de mejor respuesta. BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M aumentaron la biomasa en 1.44 y 1.35 veces; y los lípidos en 2.8 y 1.11 veces, respectivamente. El efecto de BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M acoplados a una deficiencia de N (N-0, N-25 y N-50) incrementaron significativamente la respuesta de los cuatro factores evaluados. BAP N-0 y AG N-0 produjeron rendimientos de lípidos de 55% y 50%, respectivamente (controles 16%). El perfil lipídico mostró un incremento en los ácidos grasos C18:1 y C16:0. Los análisis de expresión de *ACP*, *SAD*, *FATA* y *DGAT*, revelaron una sobreexpresión (2.0-4.0 veces), principalmente en ausencia de N. En la segunda parte de este trabajo, probamos diversas mezclas de disolventes menos tóxicos, aplicamos y optimizamos la extracción asistida con irradiación infrarroja (EAIR) para incrementar la obtención de lípidos. Demostramos que, este proceso de extracción “verde”, generó los rendimientos más altos (24.2%) en comparación con las extracciones de Folch, Bligh-Dyer y Soxhlet (4-22%). Aquí proveemos información valiosa para potenciar la producción y obtención de aceite de *S. obliquus*, relevante a nivel industrial.

Palabras clave: *Scenedesmus obliquus*, Fitohormonas, Depleción de nitrógeno, Lípidos, Ácidos grasos, Expresión de genes, Extracción asistida por irradiación infrarroja, Metodología de superficie de respuesta.

ABSTRACT

The need for energy and food sources makes microalgae very important at the industrial level as they can be a sustainable solution to the global demand for inputs. The biochemistry and molecular aspects of microalgae in response to nitrogen (N) limitation coupled to a phytohormone stimulus have been little explored. First, we analyzed the effect of two phytohormones coupled with N limitation on four factors: cell density, biomass, lipid accumulation, and gene expression in *Scenedesmus obliquus*. Concentrations of 10^{-5} - 10^{-8} M benzyl amino purine (BAP) and gibberellic acid (GA) were evaluated, and those with the best response were selected. BAP 10^{-5} M and AG 10^{-6} M increased biomass by 1.44 and 1.35-fold, and lipids by 2.8 and 1.11-fold. The effect of BAP 10^{-5} M and AG 10^{-6} M coupled to N deficiency (N-0, N-25, and N-50) significantly increased the response of the four factors evaluated. BAP N-0 and AG N-0 produced 55% and 50% lipid yields, respectively (controls 16%). The lipid profile showed an increase in C18:1 and C16:0 fatty acids. Gene expression analysis of *ACP*, *SAD*, *FATA* and *DGAT*, revealed an overexpression (2.0-4.0-fold), mainly in the absence of N. In the second part of this work, we tested different mixtures of less toxic solvents, we applied, and optimized the infrared irradiation assisted extraction (IRAE) to increase lipid extracts. We demonstrated that this "green" extraction process generated the highest yields (24.2%) compared to Folch, Bligh-Dyer, and Soxhlet extractions (4-22%). Here, we provide valuable information to enhance the production and obtainment of industrially relevant *S. obliquus* oil.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*, Phytohormones, Nitrogen-limited, Lipids, Fatty acids, Gene expression, Infrared irradiation assisted extraction, Response surface methodology.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda global de energía y alimentos supera los recursos actualmente disponibles, y conforme el crecimiento poblacional continúe, será imperativo el desarrollo de recursos renovables y ambientalmente amigables. En las últimas décadas, las microalgas han llamado la atención en diversos sectores industriales debido a la gran variedad de metabolitos que sintetizan, por ejemplo: en alimentos funcionales, nutracéuticos, productos farmacéuticos, cosméticos, acuicultura y en los biocombustibles (Pulz y Gross 2004; Pienkos y Darzins 2009).

Las microalgas son procariontas (como las cianobacterias) o eucariotas (como las algas verdes) de tamaño microscópico, se les considera los organismos más primitivos y dominantes del planeta con capacidad de realizar la fotosíntesis. Su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas, sin embargo, por su estructura celular simple y al estar sumergidas en ambientes acuáticos, son más eficientes que las plantas al convertir la energía solar en biomasa ya que obtienen de manera más asequible nutrientes como dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) (Brown y Zeiller 1993).

Como materia prima, las microalgas tienen considerables ventajas sobre las plantas; se pueden cultivar fácilmente en lagunas poco profundas, en estanques en tierras marginales o en estanques cerrados; además, crecen con rapidez y tienen ciclos de cosecha breves, lo que garantiza una alta productividad y un abastecimiento constante de materia prima. Su alta eficiencia fotosintética y fácil cultivo, conducen a altas tasas de consumo de CO_2 , y esto se traduce en un aminoramiento en los niveles de CO_2 de origen antropogénico, en el uso de tierras no cultivables y en la reducción de la producción de desechos (Zhou et al., 2017).

Durante los últimos años, en todo el mundo se han establecido diversas industrias (MiAlgae, Algama, Cyanotech Corporation, Cellana, Shamash, SimrisAlg, etc.) para el cultivo y cosecha de microalgas con el fin de elaborar productos ecológicos de valor agregado como: a) ácidos grasos omega-3, proteínas ricas en aminoácidos, minerales y antioxidantes (industria alimentaria), b) medicinas, proteínas recombinantes, vacunas (industria farmacéutica), c) pigmentos y proteínas (cosmética), d) fertilizantes orgánicos (en agricultura) y e) lípidos y carbohidratos para producir biogás, biodiesel y bioetanol (Schenk et al., 2008).

Las microalgas oleaginosas tienen un gran potencial para convertirse en un futuro corto, en la principal fuente de biodiesel en el mundo, esto es porque cada especie de

microalga produce diferentes cantidades de lípidos que van desde un 30 a un 40%, sin embargo, la principal limitación para su comercialización como materia prima para biocombustibles, es el alto costo de producción de las enormes cantidades de biomasa requeridas para la obtención del biodiesel, el cual tiene en el mercado un precio relativamente bajo. No obstante, se ha reportado que a través de cambios químicos y/o físicos, el metabolismo de estos microorganismos puede ser manipulado para incrementar la proporción de lípidos hasta en un 85% (Brown et al., 1993).

Está bien descrito que la composición lipídica en microalgas es afectada significativamente por la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno (N), hierro (Fe), fósforo (P), magnesio (Mg), azufre (S) y silicio (Si) debido a su participación en el mecanismo celular, fotosíntesis, división celular, respiración, transporte intracelular, síntesis de proteínas, etc. Por ejemplo, bajo condiciones limitadas de N, la división celular disminuye, pero la actividad biosintética de lípidos se mantiene e incluso aumenta en algunas especies de algas bajo ciertas condiciones de luz y concentraciones de CO₂. No obstante, esto promueve la conversión de ácidos grasos a triacilglicéridos (TAGs) como un mecanismo de defensa bajo condiciones de estrés nutritivo. Desafortunadamente, aunque la producción de lípidos en microalgas bajo estrés nutritivo sea alta, la producción de biomasa es tan baja que el costo-beneficio en la producción de biocombustibles con esta estrategia sigue siendo impráctico (Gao et al., 2013; Chen et al., 2018).

Un procedimiento que se ha utilizado para manipular el metabolismo de las microalgas y estimular su división celular es la aplicación de fitohormonas. Las fitohormonas son una clase de pequeñas moléculas que actúan como mensajeros químicos para coordinar diversas actividades celulares en plantas; sin embargo, existe poca evidencia de su presencia y su función en microalgas, ya que la mayoría de la información se deriva o es inferida a partir del efecto fisiológico que ejercen en las plantas. Las fitohormonas más importantes en plantas son las auxinas como el ácido indol acético (AIA), el ácido abscísico (ABA), los brasinosteroides (BRs), las giberelinas (GAs), citocininas y el etileno. En microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus* sp., se ha reportado que algunos de estos reguladores de crecimiento y sus análogos tienen un efecto estimulante en crecimiento y división celular, además en la producción de metabolitos (por ej. carotenoides, lípidos, carbohidratos y proteínas (Zhu et al., 2016).

Desde la década de 1970, se han buscado combustibles alternativos para la industria moderna, para el transporte y para los sistemas agrícolas, que satisfagan la demanda creciente de los mismos, que sean renovables, menos contaminantes y más económicos (Benemann 1978).

Recientemente, la suplementación de fitohormonas acoplada a una deficiencia de nitrógeno se ha utilizado como una estrategia para incrementar simultáneamente la biomasa y la acumulación de lípidos en microalgas (Guldhe et al., 2019). Esta novedosa estrategia ha conseguido resultados muy prometedores en cuanto a la mancuerna de productividad tan deseablemente buscada: lípidos/biomasa.

Otra estrategia utilizada para aumentar la acumulación de lípidos en microalgas es la ingeniería metabólica. Los avances recientes en la decodificación del genoma de varias especies de microalgas y la identificación de genes clave implicados en las vías de síntesis de lípidos hacen de la ingeniería genética y metabólica una herramienta sugerente para mejorar la acumulación de lípidos en las microalgas. Aunque, los principales retos para las microalgas modificadas genéticamente son su poca viabilidad a largo plazo y la evaluación del riesgo ambiental que se generarían en los sistemas de cultivo abierto (Sun et al., 2019).

Estudios sobre la expresión de genes responsables de la biosíntesis y almacenamiento de lípidos ha sido poco estudiado. Algunos genes que juegan un papel clave en la regulación de la síntesis de ácidos grasos y de TAGs, son: el ácido graso acil-ACP tioesterasa (*FATA*) y diacilglicerol aciltransferasa (*DGAT*), estearoil ACP desaturasa (*SAD*) y el gen para la proteína acarreadora de acilo (*ACP*). La expresión de estos genes ha sido correlacionada positivamente con el aumento de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y del ácido oleico (C18:1n9). Además, la sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico puede ser inducida por la deficiencia de N, lo que ha desembocado en una mayor acumulación de lípidos en microalgas (Sharma et al., 2015). Estos genes pueden considerarse como candidatos viables para diseñar y evaluar nuevas estrategias de mejoramiento de cepas mediante ingeniería metabólica con el fin de utilizar comercialmente microalgas para la producción de biodiesel.

El género *Scenedesmus* es una de las materias primas más prominentes para la producción de biocombustibles. Es una microalga de fácil cultivo, crece rápido (aún en aguas residuales), tiene una eficiente fijación de CO₂, produce cantidades altas de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

biomasa en poco tiempo y tiene un contenido de lípidos que va de 12 a 55%. *S. obliquus* presenta un perfil de ácidos grasos adecuado para la producción biodiesel, por lo que es el candidato ideal por evaluar con el fin de encontrar una materia prima apta de proveer fuentes de energía más limpias y suficientes (Mandal et al., 2009; Abomohra et al., 2013).

La extracción de los lípidos procedentes de biomasa de microalgas es un paso clave para su uso posterior en la industria, sin embargo, el principal impedimento para acceder a los lípidos es la difícil liberación y extracción del interior celular debido a la fuerte pared celular que poseen estos microorganismos. Durante la extracción lipídica, la biomasa de la microalga se expone a una continua elución con solventes (polares y no polares) lo que produce que los lípidos se separen de la matriz celular y posteriormente, éstos sean aislados del disolvente. Estudios de valoración de ciclo de vida indican que la extracción de aceite consume el 90% de la energía, lo que significa que se necesita una mejora ecológica y económica en el proceso. A nivel industrial, no existe una rutina ideal para la extracción de lípidos en microalgas, por lo que la eficiencia en la extracción, su costo y gasto energético, siguen siendo un gran reto. Este proceso ha sido sujeto a diversos estudios de optimización como: a) extracción con mezclas de solventes orgánicos, b) extracción con solventes orgánicos asistida con ultrasonido, c) extracción con solventes orgánicos asistida con microondas y, d) extracción con fluidos supercríticos, sin embargo, aún es necesario desarrollar nuevos procedimientos para mejorar el rendimiento de extracción de lípidos en microalgas (Al Hattab et al., 2015; Jez et al., 2017).

En este trabajo, se evaluó la producción de lípidos, el perfil lipídico y la expresión de cuatro genes involucrados en el metabolismo lipídico como son: *ACP*, *DGAT*, *FATA* y *SAD* y en respuesta al estímulo de dos fitohormonas: a) ácido giberélico (AG) y b) 6-bencilaminopurina (BAP) en cultivos con déficit de N, en *S. obliquus* como modelo de estudio. Además, se analizó la extracción de lípidos con solventes orgánicos asistida con irradiación infrarroja (EAIR) como una novedosa estrategia para mejorar el rendimiento de extracción del aceite.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Microalgas oleaginosas

Diversas especies de microalgas como: *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis sp.*, *Neochloris oleabundans*, *Scenedesmus obliquus*, etc. (Figura 1) han sido evaluadas como fuentes de materia prima para la industria nutraceútica y la de biocombustibles con el fin de seleccionar la especie con el mayor potencial en cantidad y calidad de aceite (Slocombe et al., 2017). Las microalgas contienen un porcentaje de aceite entre el 20 y el 50%; sin embargo, mayores rendimientos pueden ser alcanzados (Zhu et al., 2016).

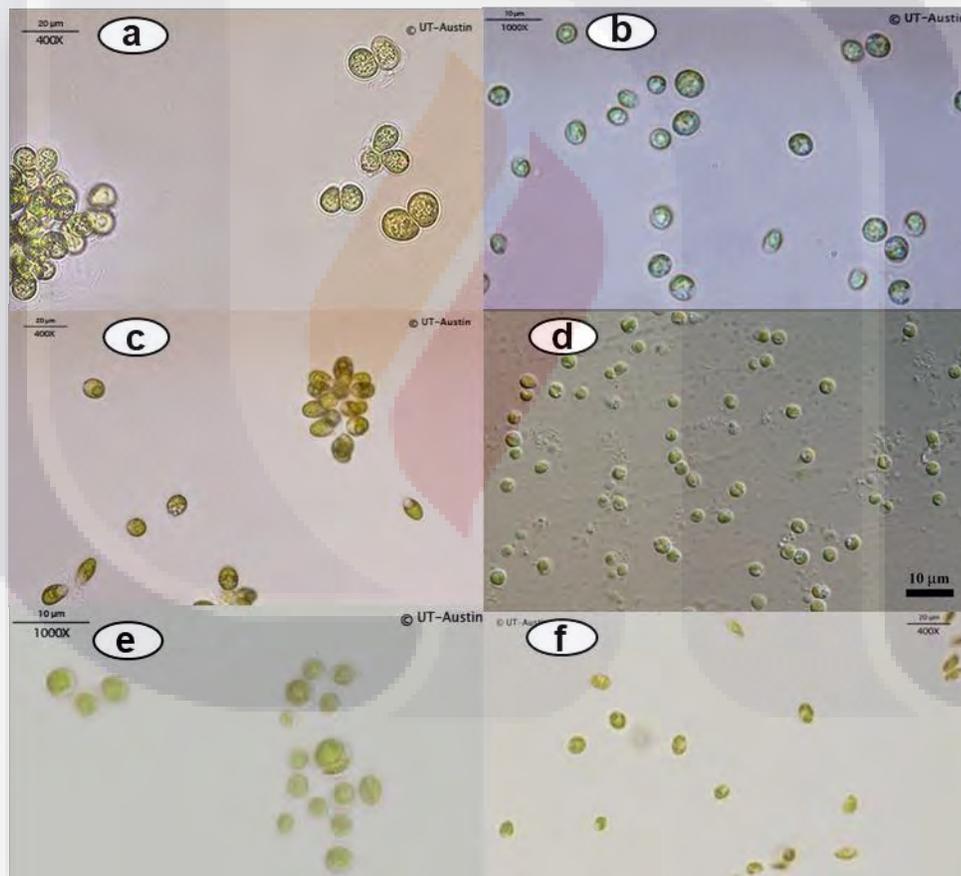


Figura 1. Especies de microalgas reportadas como oleaginosas: a) *Botryococcus braunii*; b) *Chlorella vulgaris*; c) *Dunaliella*; d) *Nannochloropsis sp.*, e) *Neochloris oleabundans* y, f) *Scenedesmus obliquus*. Imágenes tomadas y modificadas de “UTEX culture collection of algae,” 2020.

Rodolfi et al. (2009), reportaron cinco géneros de microalgas predominantes para la producción de lípidos como son: *Nannochloropsis*, *Pavlova*, *Chlorococcum*, *Scenedesmus* y *Chlorella*. Los porcentajes más altos van de un 48.2 hasta un 61% de productividad de lípidos ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) para *Nannochloropsis*, seguida de *Pavlova* con 49.4-50.2 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, *Scenedesmus* con 35.1-53.9 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, *Chlorococcum* 53.7 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ y finalmente, *Chlorella* con una acumulación de lípidos que va de 36.8-44.7 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Tabla 1).

Tabla 1. Productividad de biomasa, contenido lipídico y productividad lipídica en diversas cepas de microalgas

Microalga	Productividad de Biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Contenido de Lípidos (% Biomasa)	Productividad de Lípidos ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
Cepas Marinas			
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34	0.30	14.7	43.4
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M35	0.28	12.9	36.4
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M26	0.21	29.6	61.0
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M28	0.17	35.7	60.9
<i>Nannochloropsis</i> CS 246	0.17	29.2	49.7
<i>Pavlova salina</i> CS 49	0.16	30.9	49.4
<i>Pavlova lutheri</i> CS 182	0.14	35.5	50.2
Cepas de agua dulce			
<i>Scenedesmus</i> sp. DM	0.26	0.26	53.9
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM-212	0.23	19.3	44.7
<i>Chlorella</i> sp. F&M-M48	0.23	18.7	42.1
<i>Scenedesmus</i> sp. F&M-M19	0.21	0.21	40.8
<i>Chlorella vulgaris</i> sp. F&M-M49	0.20	18.4	36.9
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.19	18.4	35.1
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11b	0.17	19.2	32.6

Tabla basada y modificada de Rodolfi et al. (2009).

Posteriormente, se reportaron más de 20 especies de microalgas con alto contenido lipídico (Mata et al., 2010), entre las cuales destacan: *Chlorella*, *Nannochloropsis sp.*, y *S. obliquus* (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido y productividades lipídicas en diversas especies de microalgas

Especies de microalgas marinas y de agua dulce	Contenido de Lípidos (% biomasa en peso seco)	Productividad de Lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Productividad volumétrica de Biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0-75.0	-	0.02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0	0.036-0.041
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	1214	2.00-7.70
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7	0.23-1.47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0	0.02-0.20
<i>Chlorella sp.</i>	10.0-48.0	42.1	0.02-2.5
<i>Chlorella</i>	18.0-57.0	18.7	-
<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	116.0	0.22-0.34
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7-71.0	-	0.12
<i>Dunaliella sp.</i>	17.5-67.0	33.5	-
<i>Nannochloris sp.</i>	20.0-56.0	60.9-76.5	0.17-0.51
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7-29.7	84.0-142.0	0.37-0.48
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0-53.0	37.6-90.0	0.17-1.43
<i>Neochloris oleabundans</i>	29.0-65.0	90.0-134.0	-
<i>Nitzschia sp.</i>	16.0-47.0	-	-
<i>S. obliquus</i>	11.0-55.0	-	0.19
<i>S. quadricauda</i>	1.9-18.4	35.1	0.19
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1	40.8-53.9	0.03-0.26
<i>Skeletonema sp.</i>	13.3-31.8	27.3	0.09
<i>Spirulina platensis</i>	4.0-16.6	-	0.06-4.3
<i>Spirulina maxima</i>	4.0-9.0	-	0.21-0.25
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5-23.0	27.0-36.4	0.12-0.32

Tabla basada y modificada de Mata et al. (2010).

Ma et al. (2016), establecieron diversas especies de microalgas como altamente productoras de lípidos (Tabla 3). *Nannochloropsis spp.* y *Neochloris oleabundans* contienen la mayor concentración de lípidos totales en biomasa seca. Cabe destacar, que se reporta a *S. obliquus* con un porcentaje bajo en contenido lipídico (12-14%); sin embargo, es conocido, que esta especie contiene un alto contenido en lípidos saturados, lo cual, hace de esta especie muy importante en el ámbito de la producción de biocombustibles (Kirian et al., 2014).

Tabla 3. Contenido de lípidos totales de algunas especies de microalgas.

Especies de microalgas	Contenido total de Lípidos (% en peso seco celular)	Contenido de lípidos neutros (% de lípidos totales)
<i>Nannochloropsis</i>	37-60	23-58
<i>Isochrysis</i>	25-33	80
<i>Dunaliella salina</i>	23	30
<i>Haemotococcus pluvialis</i>	16-35	50-59
<i>Neochloris oleabundis</i>	2-47	23-73
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	-
<i>Spirulina platensis</i>	7.6-8.2	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14	-

Tabla traducida de Ma et al. (2016).

2.2 Lípidos en microalgas

Las microalgas como las plantas producen y almacenan lípidos. Los lípidos de membrana (glucoglicéridos, fosfoglicéridos y lípidos de betaína) y los de almacenamiento (en forma de TAGs) son los más abundantes en las microalgas. También contienen pequeñas cantidades de otras clases de lípidos como los terpenoides, esfingolípidos, esteroides y pigmentos, todos ellos presentes en diferentes porcentajes dependiendo de la especie de microalga (Nakamura et al., 2016).

Debido a la urgente necesidad de utilizar fuentes alternativas y renovables de energía, el interés en la obtención de lípidos a partir de microalgas ha ido en aumento a través de los años. En términos de uso de suelo, eficiencia en la producción y cantidad de aceite en biomasa seca, las microalgas generan más aceite que cualquier otra semilla actualmente en uso (Mubarak et al., 2015) (Tabla 4). Diversas especies de microalgas pueden inducirse para acumular cantidades mayores de lípidos modificando las condiciones de cultivo como temperatura de incubación, composición química del medio de cultivo, intensidad de irradiación y ciclos de luz/oscuridad, etc. De esta manera, se han reportado porcentajes de producción de aceite de hasta el 75% respecto a la biomasa seca (Fan et al., 2014; Chen et al., 2017).

Tabla 4. Comparación de la producción de aceite en microalgas con otras materias primas.

Planta	Contenido de aceite en semilla (% de aceite en biomasa)	Rendimiento de aceite (L aceite/ha anual)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	44	172

Cáñamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363
Frijol de soya (<i>Glycine max</i> L.)	18	636
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974
Girasol (<i>Heliantus annuus</i> L.)	40	1070
Ricino (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307
Aceite de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366
Microalgas (contenido bajo de aceite)	30	58,700
Microalgas (contenido medio de aceite)	50	97,800
Microalgas (contenido alto de aceite)	70	136,900

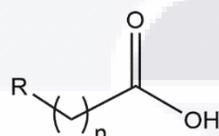
Tabla traducida de Mubarak et al. (2015).

Los lípidos son ácidos grasos y sus derivados, además de sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con estos compuestos. De acuerdo su solubilidad en disolventes orgánicos e insolubilidad en agua, son clasificados en polares y no polares. Se dividen generalmente en tres tipos: a) ácidos grasos b) lípidos neutros y c) lípidos polares (“A Lipid Primer - the Diversity of Natural Lipids,” 2020).

2.2.1 Ácidos grasos

Diversos autores han evaluado la composición de los ácidos grasos en microalgas (Breuer et al., 2013; Yang et al., 2017; Banskota et al., 2019). Los ácidos grasos son cadenas largas alifáticas de carbono de diferente longitud (Figura 2), grado de insaturación y estructura (Guschina y Harwood 2006). Los ácidos grasos sin dobles enlaces se les llama ácidos grasos saturados (AGS), los que tienen un doble enlace se llaman ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), los que tienen dos son di-insaturados (AGDI), con tres son tri-insaturados (AGTI), y los de más de tres insaturaciones son ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). En microalgas, a diferencia de las plantas, los ácidos grasos insaturados son los más comunes. Los ácidos grasos poliinsaturados de

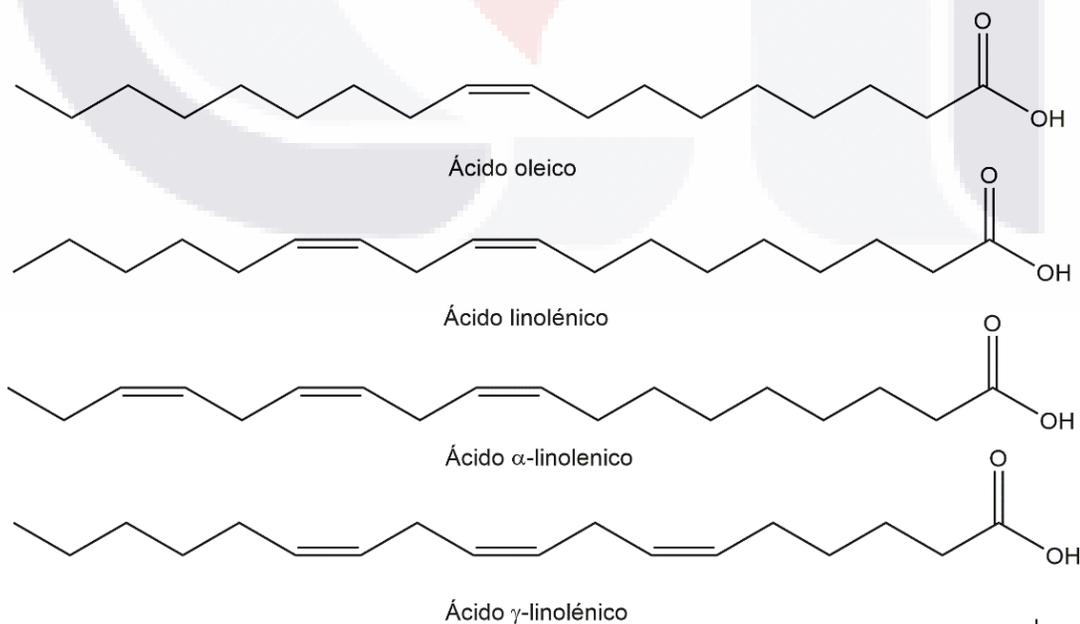
cadena larga (AGPI-CL) con cadenas de C20 y C22, y hasta seis dobles enlaces son abundantes en cierta *phyla*. La composición de los ácidos grasos en microalgas varía drásticamente entre los diferentes grupos filogenéticos (Khozin-Goldberg et al., 2011; Lang et al., 2011). Por ejemplo, en cianobacterias los ácidos saturados C16 y C18, y los insaturados, linoleico (AL, 18:2^{Δ9,12}), α-linolénico (ALA, 18:3^{Δ9,12,15}) y γ-linolénico (GLA, 18:3^{Δ6,9,12}) son los más comunes. En las diatomeas (Bacillariophyta y Eustigmatophyta) los C14:0, C16:0 y C16:1 *n*-7 son los más abundantes, mientras que, en las Chlorophytas, los ácidos grasos mayoritarios son C16:0 y C18:1 *n*-9 (Cohen et al., 1995).



R= cadena alifática
 n = 13: ácido mirístico
 15: ácido palmítico
 17: ácido esteárico

Figura 2. Esquema general de la estructura química de tres ácidos grasos saturados comunes en microalgas: ácido mirístico C14:0, ácido palmítico C16:0 y ácido esteárico C18:0. Imagen elaborada por Hans C. Correa en ChemDraw Professional 17.0.

Las microalgas son fuentes naturales de AGPI-CL (Figura 3), los cuales son importantes fisiológicamente como componentes de membrana y precursores de eicosanoides biológicamente activos (Wang et al., 2018; Zárate et al., 2020).



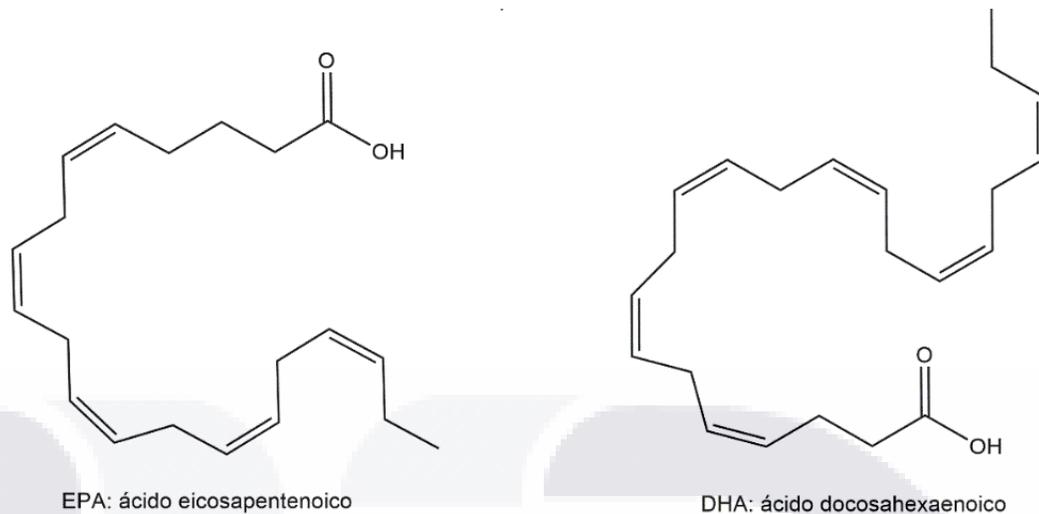


Figura 3. Esquema de las estructuras químicas de algunos ácidos grasos insaturados de importancia biológica: ácido oleico C18:1^{Δ9}, ácido linoleico C18:2^{Δ9,12}, ácido α-linolénico C18:3^{Δ9,12,15}, ácido γ-linolénico C18:3^{Δ6,9,12}, ácido eicosapentaenoico C20:5^{Δ5,8,11,14,17} y ácido docosahexaenoico C22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}. Imagen elaborada por Hans C. Correa en ChemDraw Professional 17.0.

2.2.2 Lípidos Neutros

Los lípidos neutros predominantes en microalgas son los acilglicéridos como los TAGs, seguido de DAG, monoacilglicerol (MAG), ácidos grasos libres, esteroides y ésteres de esteroides. Los TAGs no tienen un papel estructural si no que es una forma de almacenamiento de carbono y de energía en las células (Leblond et al., 2000). En microalgas se depositan en cuerpos lipídicos en el citoplasma de las algas principalmente como reserva energética, sin embargo, existe evidencia de que las gotas de lípidos funcionan como organelos dinámicos, además de participar también en diversas reacciones metabólicas, en el tráfico y en la comunicación inter-organelar, y en respuesta al daño oxidativo por estrés abiótico (Goodman, 2009; Chokshi et al., 2017). El DAG es un precursor para la síntesis de galactolípidos y sulfolípidos importantes en la fotosíntesis.

Las microalgas también producen pigmentos como carotenoides, ficobilinas y clorofila (Gramma et al., 2016), estos compuestos naturales tienen un rol importante en el metabolismo fotosintético. Además, tienen actividades biológicas como antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, antiinflamatorios e inmunomoduladores (Konícková et al., 2014, Wu et al., 2016). Los carotenoides pueden considerarse como lípidos neutros, son moléculas hidrofóbicas y están presentes en membranas y estructuras celulares lipofílicas. Desempeñan dos papeles clave en la fotosíntesis: a) absorben la luz en

regiones del espectro visible, en las que la clorofila no absorbe eficientemente; b) protegen los sistemas fotosintéticos. Los principales carotenoides en microalgas son: el β -caroteno, la luteína, violaxantina y la zeaxantina, éstos forman parte del aparato fotosintético; y la astaxantina, cantaxantina y quinenona desempeñan una función protectora en respuesta a diversos factores ambientales adversos (von Alvensleben and Heimann, 2018).

2.2.3 Lípidos Polares

Son moléculas anfífilas, es decir, poseen un extremo hidrofílico y uno hidrofóbico. Ejemplos de estas moléculas son los fosfolípidos, esfingolípidos y galactolípidos que constituyen la membrana y la pared celular de todos los organismos vivos.

Los galactolípidos como el monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y el digalactosil diacilglicerol (DGDG) son lípidos estructurales predominantes en microalgas, están presentes en los tilacoides, y forman parte de los complejos fotosintéticos y cloroplastos (Kobayashi et al., 2013). La composición ácido-grasa del MGDG es altamente insaturada en los AGPIs C18 y AGPI-CL, lo cual provee de una mayor fluidez y curvatura a la membrana del tilacoide en las células de microalgas, lo que les ayuda a soportar diferentes condiciones ambientales (Sato y Moriyama 2007). Otro lípido polar aniónico abundante en los tilacoides de cianobacterias, algas y plantas es el sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG). El ácido palmítico (C16:0) es su mayor componente (60 %), seguido de los AGPIs C18 y C20 (Abida et al., 2015). La función principal del SQDG se ha detectado en microalgas bajo condiciones limitadas de azufre (S), dónde es fuente de S para la síntesis de proteínas (Sugimoto et al., 2007).

Los principales fosfolípidos presentes en células fotosintéticas, particularmente en membranas extra plastídicas, son la fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), el fosfatidilglicerol (FG), y el fosfatidilinositol (FI). FC se produce en la capa exterior de la membrana del cloroplasto, al menos en las células de las algas verdes. El FI juega un papel importante en la señalización de lípidos y la transducción de señales (Harwood 1998). FG es el único presente en cianobacterias y en las membranas de los tilacoides, aunque también se le encuentra en otras membranas plastídicas como en las del RE y mitocondrias (Dörmann 2005). FG es indispensable en mantener la fotosíntesis, principalmente a bajas temperaturas, además, también puede ser utilizado en la síntesis

de difosfatidilglicerol (cardiolipina) (Bogos et al., 2010). Existen otros tipos de lípidos polares como los lípidos de la betaína, los cuales no se abordarán en este trabajo.

2.3 Biosíntesis de lípidos en microalgas

La biosíntesis de lípidos en microalgas es compleja, sin embargo, en la Figura 4, se presenta un enfoque simplificado de este proceso.

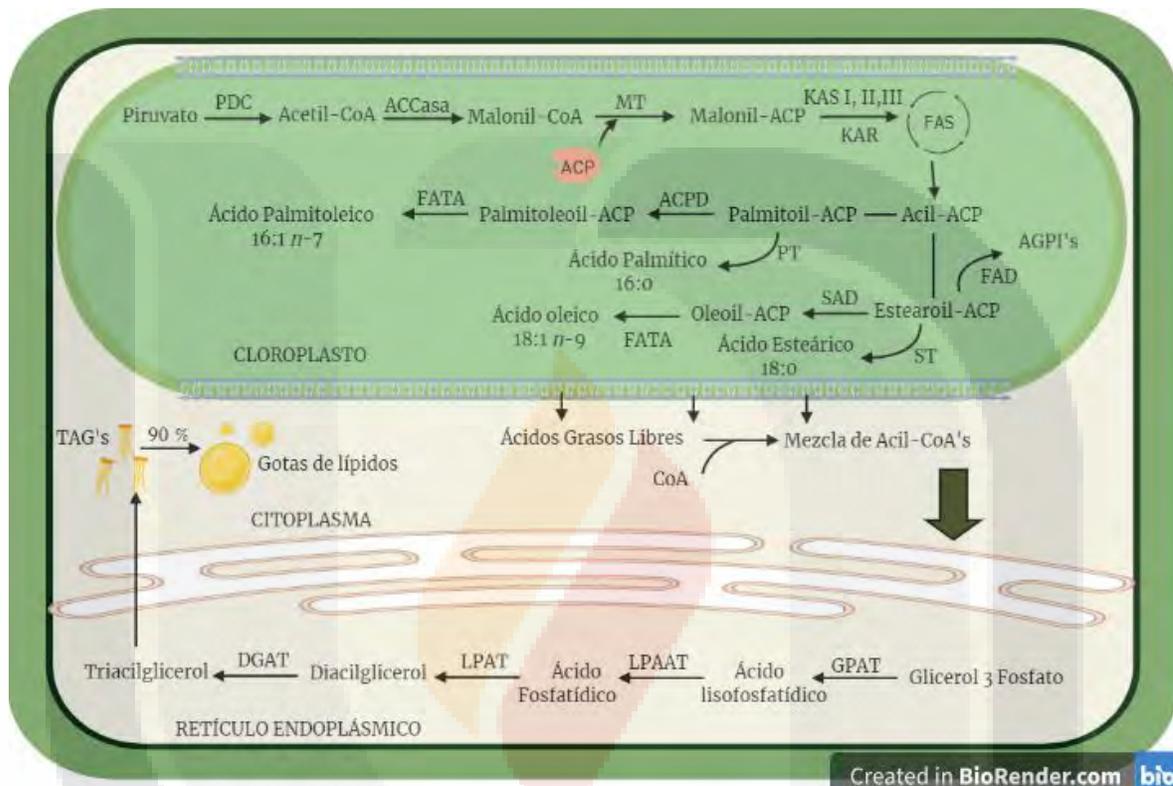


Figura 4. Esquema simplificado de la biosíntesis de lípidos en células verdes fotosintéticas. Abreviaciones: PDC complejo piruvato deshidrogenasa, ACCasa acetil Co-A carboxilasa, MT malonil transferasa, ACP proteína acarreadora de acilo, KAS cetoacil ACP sintasa, FAS ácido graso sintasa, ACPD palmitoil desaturasa, FATA ácido graso acil-ACP tioesterasa, FAD ácido graso desaturasa, SAD estearoil ACP desaturasa, GPAT glicerol-3-fosfato aciltransferasa, LPAAT ácido lisofosfatídico aciltransferasa, LPAT lisofosfatidil aciltransferasa, DGAT diacilglicerol aciltransferasa, PT palmitoil tioesterasa, ST estearoil tioesterasa, TAGs triacilgliceroles. Imagen elaborada por Hans C. Correa en Biorender.com.

En la figura 4, se observan una serie de reacciones de síntesis de lípidos que pueden ser perturbadas bajo diferentes condiciones de cultivo. En la biosíntesis de ácidos grasos se provee de grupos acilo para la construcción de lípidos de membrana como los glucosil glicéridos, fosfoglicéridos y TAGs. Esto ocurre en el cloroplasto y se requiere de carbono (C) en forma de acetil-CoA, adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida dinucleótido

reducida (NADPH). El ATP y la NADPH obtenidos a partir de reacciones fotosintéticas, son utilizados para la generación de biomasa para regenerar adenosín difosfato (ADP) y nicotinamida dinucleótido oxidada (NADP⁺) como moléculasceptoras de electrones y así, continuar la fotosíntesis en condiciones favorables de crecimiento, por el contrario, bajo condiciones limitadas de nutrientes, se genera una reducción drástica de NADP⁺ debido a una reducción en la proliferación y crecimiento celular. En tales circunstancias, el NADPH es consumido en la biosíntesis de ácidos grasos y es posible regenerar NADP⁺ y proteger el desarrollo celular perpetuando el proceso de fotosíntesis (Hu et al., 2008).

La síntesis de ácidos grasos inicia en el estroma por medio de la acetil Co-A carboxilasa (ACCase), que cataliza la conversión de la acetil Co-A a malonil Co-A, posteriormente por un proceso de elongación de la cadena de carbonos, se obtienen cadenas de acil-ACP saturados de 16 o 18 carbonos. Los C16 o C18 son oxidados por la estearoil ACP desaturasa (SAD) para formar ácidos grasos insaturados y finalmente, aún dentro de la envoltura del cloroplasto, la síntesis termina con la liberación de los acil-ACP's saturados e insaturados mediante la acción de la acil-ACP tioesterasa (FATA). Los ácidos grasos libres (AGL) son reesterificados en el citoplasma a acil-CoA y utilizados en compartimentos extra plastídicos para la síntesis de glicerolípidos o diacilglicerol (DAG).

En el retículo endoplásmico, la biosíntesis de triacilglicerol se da por la vía de Kennedy, ésta inicia con la acil Co-A que es añadida secuencialmente a diferentes posiciones del glicerol-3-fosfato (G3P). Las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) catalizan la transferencia de acilos a la G3P, la lisofosfatidil aciltransferasa (LPAT) produce diacilglicerol y por último, la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) utiliza una molécula de acil Co-A como donador de grupo acilo para generar TAGs. Finalmente, los TAGs (90%) y algunos lípidos polares (5%) se almacenan en estructuras subcelulares hidrofóbicas, llamadas gotas de lípidos u oleosomas, implicadas en numerosos procesos celulares como la homeostasis lipídica, la señalización, el tráfico y la comunicación intercelular (Goold et al., 2015).

2.3.1 Acumulación de lípidos bajo limitación de N

Las microalgas subsisten en condiciones ambientales extremas ya que son capaces de alterar su patrón metabólico para adaptarse a diversos entornos. Macronutrientes como N, P, y S son componentes esenciales para un correcto funcionamiento del mecanismo celular, por ejemplo, el N influye en la producción y

metabolismo de lípidos, además, es un constituyente primordial en la organización celular y en catalizadores enzimáticos del metabolismo primario (Borowitzka et al., 2016). Se encuentra también en aminoácidos, nucleótidos (ADP/ATP y NAD(P)⁺/NAD(P)H), vitaminas, en clorofilas y cromóforos de ficobilinas, en sustancias de crecimiento endógenas como el ácido indol acético (AIA) y citoquininas (CQs), así como en el glutatión, implicado en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Forma del 1%-10% de la biomasa total de las microalgas, y puede ser utilizado en forma de nitratos (NO₃⁻), nitritos (NO₂⁻), amonio (NH₄⁺) o como nitrógeno molecular (N₂) (Costa et al., 2001, Andrews et al., 2013).

El N desempeña un papel importante en los mecanismos de respuesta a los cambios de condiciones ambientales, tanto abiótico como biótico. Estas respuestas incluyen la producción de osmolitos que contienen N como la glicina-betaína y la prolina, la síntesis de metalotioneínas y fitoquelatinas, y en la protección contra los rayos UV en compuestos tipo micospolina (Kageyama et al., 2017).

La limitación de N conduce a una depleción en la división celular, sin embargo, la actividad biosintética de lípidos se mantiene e inclusive aumenta en algunas especies (Tabla 5) (Gao et al., 2013), esto es porque conforme el crecimiento y división celular de las microalgas disminuye, la síntesis de compuestos de membrana ya no son requeridos y se promueve la conversión de ácidos grasos a TAGs como producto de almacenamiento de carbono y energía en respuesta a las condiciones de estrés (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). Además, en la membrana del tilacoide se activa la acil hidrolasa y se estimula la hidrólisis de fosfolípidos; que en conjunto aumenta la fracción intracelular de ácidos grasos de acil-CoA. Esta deficiencia en nitrógeno también activa la diacilglicerol aciltransferasa, que cataliza la conversión de la acil-CoA a TAGs (Xin et al., 2010).

Tabla 5. Inducción en la producción de lípidos en microalgas bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno.

Especie/cepa de microalga	Estrés nutritivo	Alteración en el perfil lipídico
<i>C. vulgaris</i>	Limitación de nitrógeno	Incremento en lípidos totales de 16.41% y de TAGs
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Limitación de nitrógeno	Aumento de lípidos totales en 15.31%
<i>Phaeodactylum tricosnutum</i>	Limitación de nitrógeno	Nivel de TAGs aumentados de 69 a 75%
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Limitación de nitrógeno	Incremento en lípidos totales

<i>Nannochloropsis salina</i>	Limitación de nitrógeno	Incremento en lípidos y TAGs por encima de 56.1 y 15.1% en peso seco, respectivamente
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Limitación de nitrógeno	Mejora en la acumulación de lípidos
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Limitación de nitrógeno	Incremento en la producción de lípidos y productividad arriba de 49.7% en peso seco y 41.5 mg L ⁻¹ d ⁻¹
<i>Chlorella zofingjensis</i>	Limitación de nitrógeno	Aumento en la producción de lípidos y productividad hasta 54.5% en peso seco y 22.3 mg L ⁻¹ d ⁻¹

Tabla modificada de Ravindran et al. (2017).

2.3.2 Acumulación de lípidos por estímulo con fitohormonas

La limitación de N, ha mostrado ser un recurso eficaz para modificar el patrón de almacenamiento de carbono favoreciendo la síntesis de lípidos, principalmente de TAGs (Fakhry y El Maghraby 2015). Sin embargo, esta condición disminuye la división y el crecimiento celular, lo que genera bajas productividades de biomasa y por lo tanto de lípidos, limitando su aplicación a nivel industrial (Kamalanathan et al., 2016).

Fitohormonas (FH) como las auxinas, el ácido abscísico (ABA), CQs y GAs, han sido encontradas de manera endógena en diversas cepas de microalgas (Figura 4). Las fitohormonas son moléculas de señalización producidas por las plantas que controlan una amplia gama de procesos de crecimiento y desarrollo a bajas concentraciones. También regulan procesos de reproducción, estimulan respuestas de defensa, diferenciación, desarrollo y formación de flores, semillas y hojas, división celular o germinación de semilla (Han et al., 2018).

La función de las fitohormonas endógenas en microalgas aún permanece incierta, ya que la mayoría de ellas, se han inferido a partir de los efectos fisiológicos en plantas; sin embargo, existe evidencia de los posibles roles que ejercen estas moléculas. Por ejemplo, el ABA tiene una función de tolerancia a estrés (salino, osmótico, oxidativo y nutritivo) en cianobacterias y microalgas eucariotas (Maršálek et al., 1992; Yoshida et al., 2004). Las auxinas, como el AIA, tienen un papel regulador y proveen tolerancia a estrés salino y a temperaturas extremas. Las CQs intervienen en el ciclo celular y régimen de luz en *Nannochloropsis oceánica* y *Chlorella* sp. (Stirk et al., 2011; 2014). Diversas GAs

han sido detectadas en diversas especies de microalgas, su principal efecto es sobre la división y el crecimiento (elongación) celular (Romanenko et al., 2016).

Es por esto, que la suplementación de fitohormonas es una estrategia recientemente utilizada para regular la biosíntesis de metabolitos de interés con el fin de aumentar la biomasa y mejorar la producción de metabolitos. Auxinas como el AIA han sido aplicadas de manera exógena y se han observado resultados prometedores, por ejemplo, en *C. vulgaris* se mejoró la síntesis de pigmentos, proteínas y monosacáridos (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2014), en *Dunaliella salina* (Mousavi et al., 2016) se incrementó el crecimiento y la producción de β -caroteno, en *S. obliquus* aumentó el crecimiento, los ácidos grasos, proteínas y carbohidratos (Salama et al., 2014). CQs como zeatina y kinetina, también se han probado en diversas microalgas, en general se observaron aumentos en el crecimiento, división celular, biomasa, lípidos y carbohidratos en cultivos de *C. vulgaris*, *Acutodesmus obliquus* y *Gracilaria caudata* (Piotrowska et al., 2009; Souza et al., 2016; Renuka et al., 2017).

La utilización de otra citoquinina, 6-bencilaminopurina (BAP) para estimular un incremento en la producción de biomasa y/o de lípidos en microalgas está poco documentada; sin embargo, existen ciertos reportes en dónde utilizan BAP para estos fines. En el primero, Czerpak et al. (1997) evaluaron el efecto de esta fitohormona en *Chlorella pyrenoidosa* sobre carotenos y xantofilas a tres concentraciones, 1×10^{-4} , 5×10^{-5} y 1×10^{-6} M. Los pigmentos se incrementaron con la concentración más alta de BAP. En otro trabajo, Yu et al. (2016) realizaron un análisis metabolómico de *Aurantiochytrium* sp., en dónde identificaron 71 metabolitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y observaron un aumento en la producción de lípidos y de ácido docosahexaenoico (DHA) al suplementar BAP ($3-5 \text{ mg L}^{-1}$). En *C. pyrenoidosa* ZF (Du et al., 2017) evaluaron concentraciones de BAP de 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 1.000 y 5.000 mg L^{-1} , en las que el BAP 1.000 mg L^{-1} indujo las mayores densidades celulares y aumentos de la producción de lípidos.

Las GAs (Figura 5) también han sido utilizadas con el fin de incrementar la capacidad metabólica de las microalgas. Por ejemplo, bajo la influencia de la giberelina GA_3 (10^{-5} M), células de *C. vulgaris* incrementaron la bioacumulación y bioconcentración de plomo (Pb) y cadmio (Cd) presentes en el medio en función de la dosis y la exposición. Además, esta fitohormona protegió a *C. vulgaris* contra el estrés por Pb y Cd ante una serie de concentraciones de 10^{-7} - 10^{-6} M, e indujo un aumento en el número de células,

proteínas, pigmentos fotosintéticos y contenido de monosacáridos (Falkowska et al., 2011). De igual forma, el efecto individual y combinado de la giberelina GA₃ y la kinetina fueron evaluados en la acumulación de lípidos, estas condiciones aumentaron la producción lípidos con 61.5% en peso seco (PS) celular comparado con el control (35.5%) en *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201 (Udayan et al., 2018).

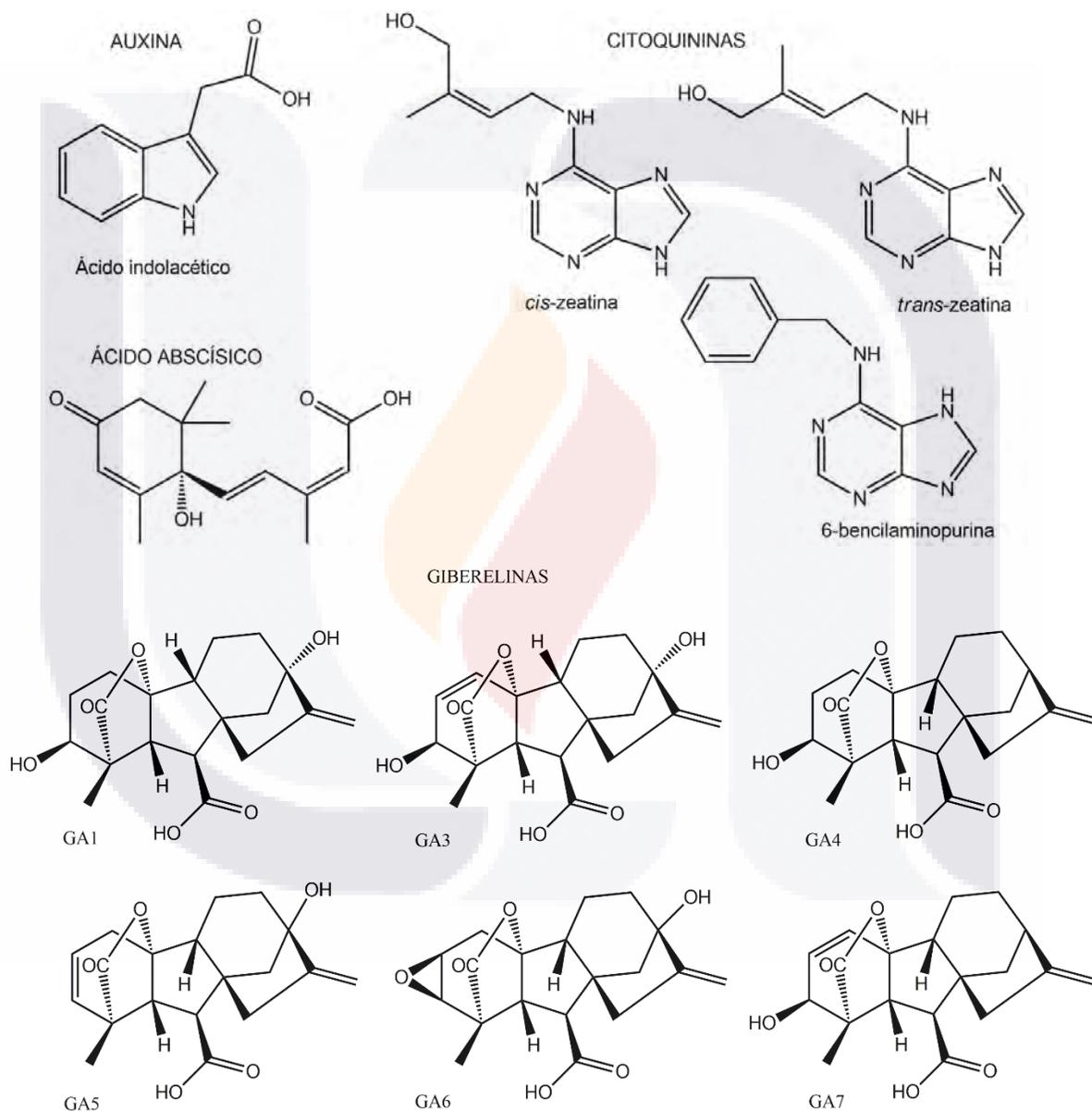


Figura 5. Estructuras químicas representativas de algunas fitohormonas. Esquema modificado de Romanenko et al. (2016).

El uso exógeno de FH parece ser prometedor para estimular el ciclo celular de microalgas, sin embargo, se ha observado que, en especies pertenecientes a diferentes divisiones de algas, diferentes concentraciones de FH pueden tener efectos estimulantes, inhibidores o incluso nulos sobre el crecimiento microalgal (Romanenko et al., 2016). Debido a esto, un mayor conocimiento de la fisiología y bioquímica de las microalgas generaría nuevas rutas de investigación para cultivar microalgas con fines comerciales. En un futuro a corto plazo, las fitohormonas podrían ser utilizadas con éxito en la producción a gran escala de microalgas, no obstante, es esencial una comprensión más profunda de su comportamiento y efectos en el metabolismo y homeostasis de las microalgas.

2.3.3 Acumulación de lípidos bajo deficiencia de N acoplada a un estímulo con fitohormonas

Recientemente, la suplementación de fitohormonas en cultivos de microalgas bajo una deficiencia de nitrógeno se ha utilizado como una estrategia para incrementar simultáneamente la biomasa y la biosíntesis de lípidos (Guldhe et al., 2019). Algunos estudios bajo estas condiciones han reportado incrementos en el crecimiento, biomasa o producción lípidos. Por ejemplo, en *Scenedesmus* SDEC-8 y *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 se determinó que la privación de N, en combinación con fitohormonas como el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) mantuvo la producción de biomasa y se aumentó en casi tres veces la productividad de lípidos respecto al control (Yu et al., 2018). De igual forma, Babu et al. (2017) investigaron la acción de fitohormonas como el AIA (10^{-5} M) y el hexanoato de dimetilaminoetilo (DA-6) (10^{-9} M), sobre *C. sorokiniana* bajo limitación de N. Encontraron que la administración de dosis mínimas estas fitohormonas AIA (10^{-5} M) y DA-6 (10^{-9} M) junto con el 50% de N, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a biomasa y producción de lípidos. Además, observaron que se favoreció la producción de ácidos grasos saturados (AGS), lo que es determinante para tener buena calidad de biodiesel.

No son abundantes las investigaciones sobre la suplementación de fitohormonas en microalgas bajo una deficiencia o limitación de nitrógeno, sin embargo, algunos ejemplos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de fitohormonas sobre la biomasa y lípidos bajo estrés por deficiencia de N en diversas especies de microalgas

Microalga Cepa/especie	Fitohormona	Efecto sobre *B/L comparado con el control	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AIA, AG	Nd, +	Park et al. (2013)
	Kinetina	+, =	
	1-triacontanol	+, =	
	ABA	+, =	
<i>S. obliquus</i>	ABA	+, =	Sulochana y Arumugam (2016)
<i>A. obliquus</i>	Kinetina	+, =	Renuka et al. (2017).
	Zeatina	+, =	
<i>Monoraphidium sp.</i>	Melatonina	+, +	Zhao et al. (2018)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácido fúlvico	+, +	Ding et al. (2018)
	Melatonina	=, +	

*B/L: biomasa/lípidos. Ácido indolacético (AIA), ácido giberélico (AG), ácido abscísico (ABA). Tabla modificad de Zhao et al. (2019)

El estrés por deficiencia de N, aunque provee una base para aumentar la acumulación de lípidos en microalgas, siempre causa efectos negativos en el número de células. La aplicación de este tipo de estrés abiótico acoplado con un estímulo de fitohormonas, puede incrementar la producción de lípidos y simultáneamente mantener la división y crecimiento celular (tabla 6). Esta estrategia abre una nueva ventana de posibilidades para poder afrontar los retos que impiden la comercialización del aceite de microalgas como materia prima para la industria, principalmente la de biocombustibles.

2.3.4 Expresión de genes involucrados en la biosíntesis y almacenamiento de lípidos

Si bien se han logrado importantes progresos en la comprensión del metabolismo de los lípidos en plantas, la regulación molecular de los lípidos en las microalgas sigue sin esclarecerse. En consecuencia, el entendimiento de la bioquímica de los lípidos en microalgas requiere una atención especial para comprender el metabolismo y regulación de los lípidos. Diversos estudios han investigado el rol de algunos genes que codifican a las enzimas que regulan la biosíntesis de ácidos grasos en microalgas (Wagner et al., 2010; Khozin-Goldberg y Cohen 2011; Liu et al., 2013).

ACP, *SAD* y *FATA* son genes importantes en la síntesis de ácidos grasos. *ACP* es un cofactor importante en la síntesis de ácidos grasos ya que desplaza a la CoA de la

malonil CoA para poder continuar con las etapas de elongación de la cadena de acilo (Mindrebo et al., 2020). SAD desempeña un rol fundamental en la proporción de los ácidos grasos insaturados (AGI) y cataliza el primer paso de desaturación que conduce al ácido oleico, este puede desaturarse a los ácidos linoleico y α -linolénico (Liu et al., 2012). FATA está asociada con la biosíntesis de ácidos grasos de *novo*, tiene un papel relevante en la terminación de la elongación de la cadena de ácidos grasos mediante la hidrólisis del enlace de tioéster que une las cadenas de acilo a una proteína portadora de acilo formando finalmente ácidos grasos libres y ACP (Peng et al., 2020). La DGAT es clave en la biosíntesis de TAGs y por ello, una de las más estudiada en plantas, y aunque en microalgas su estudio sigue en desarrollo, parece tener gran importancia. La DGAT es la enzima primaria en la síntesis de *novo* de TAGs en todos los organismos, participa transfiriendo los Acil-CoAs en la vía de Kennedy. Hay dos isoformas no homólogas conocidas como DGAT1 y DGAT2, que catalizan la misma reacción, pero no comparten ninguna secuencia o similitud estructural. También se conoce de la existencia de un DGAT citosólico tipo 3 pero su función en la biosíntesis de los TAGs aún no es clara (Chen et al., 2012).

2.4 Expresión de genes con limitación de N

Reportes sobre el transcriptoma, incluyendo la sobre expresión de genes y técnicas de silenciamiento, han sido aplicados para entender el papel de genes de microalgas en la biosíntesis/asimilación de ácidos grasos (Yu et al., 2011; Klaitong et al., 2017; Sirikhachornkit et al., 2018). Estudios han mostrado, que en genes que participan en la asimilación de lípidos, existe un cambio metabólico en la fase temprana de la acumulación de lípidos bajo condiciones de estrés, principalmente en limitación de N. Otras investigaciones se han realizado bajo condiciones de estrés nutritivo en microalgas con el fin de aumentar la producción de lípidos (Choi et al., 2011; Ikarán et al., 2015)

Algunos genes como *FATA* y *DGAT* fueron sobre expresados en *Neochloris oleabundans* bajo condiciones de limitación de N conduciendo al incremento de ácidos grasos (Rismani-yazdi et al., 2012). En *Haematococcus pluvialis*, la expresión de los genes *ACP*, *FATA* y *SAD* correlacionó positivamente con el aumento de AGMI, AGPI, y del ácido oleico (C18:1n9), respectivamente (Lei et al., 2012). En otro estudio, la sobre expresión de *ACP*, *DGAT* y *FATA* inducida por la deficiencia de N o por una alta salinidad, también mostró una correlación positiva con la acumulación de lípidos en *Scenedesmus*

spp. (Sharma et al., 2015). Por lo anterior, consideramos que estos genes deben de estudiarse en diversas especies de microalgas ya que son posibles candidatos para diseñar y evaluar nuevas estrategias de mejoramiento de cepas mediante ingeniería metabólica con el fin de utilizar comercialmente microalgas para la producción de biodiesel.

2.4.1 Expresión de genes bajo deficiencia de N acoplada a un estímulo con fitohormonas

Como se ha mencionado, el estrés nutritivo inhibe la división celular, disminuye la biomasa y aumenta la acumulación de lípidos, mientras que las fitohormonas pueden mantener el crecimiento celular, promover la síntesis de algunos metabolitos y proveen a las células microalgales de cierta resistencia al estrés. Por esto, la aplicación simultánea de estas dos estrategias en cultivos de microalgas, y el estudio de la expresión de genes involucrados en estas respuestas, puede proporcionar información relevante para inducir considerables mejoras en cuanto a la producción de lípidos y de biomasa. Actualmente, la aplicación de un estrés por deficiencia de N junto con un estímulo por fitohormonas para lograr mayor desarrollo celular y una regulación en la síntesis de lípidos en microalgas, sigue siendo ocasionalmente utilizada.

Babu et al. (2017), analizaron en *C. sorokiniana* el efecto de AIA y dietil aminoetil hexonato (DA-6) en la producción de biomasa, lípidos y expresión génica, bajo una limitación de N. En este estudio, la suplementación de AIA (10^{-5} M) o DA-6 (10^{-9} M), generó substanciales incrementos en biomasa, con un 22% y 43% y aumentos del 49% y 84% de en la productividad de lípidos, comparados con el control. Además, los niveles intracelulares de *RuBisCO* y *ACCasa* fueron considerablemente aumentados por estas fitohormonas bajo la limitación de N. Otro estudio similar, fue llevado a cabo también en la microalga *C. sorokiniana*, en donde, bajo limitación de N, se utilizaron diferentes fitohormonas como AIA, AG y kinetina con el fin de incrementar la biomasa y el contenido de lípidos. La mayor productividad de biomasa de $146.07 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y la mayor expresión relativa del gen *rbcL* se observó en el tratamiento con IAA (7.5 mg L^{-1}). Sin embargo, la adición de kinetina (10 mg L^{-1}) mostró el mayor incremento en la acumulación de lípidos, con 35,85%, y una mayor expresión génica de *accD* en comparación con otros tratamientos.

Mandal et al. (2019), utilizaron la combinación de fitohormonas como AIA y kinetina en cultivos de *Graesiella emersonii* NC-M1 bajo limitación de N y observaron un aumento en 2.3 y 2.5 veces en la biomasa y lípidos, respectivamente. Asimismo, de una reducción en el daño oxidativo causado por la deficiencia de N y un aumento en el contenido de AGMI. Respecto a la expresión de genes, hubo incrementos en los niveles de expresión de *GPAT* y *DGAT* en 5.2 y 3.17 veces, respectivamente.

Así pues, la combinación de estas dos estrategias y el estudio de la expresión génica, ha mostrado ser un recurso capaz de proveernos con más información para favorecer la formación de lípidos y el crecimiento celular, sin embargo, sigue siendo un área poco estudiada. Los efectos bioquímicos y moleculares de otras fitohormonas en diversas especies de microalgas bajo deficiencia de N, aún no están bien establecidos, por lo que es un área de oportunidad para seguir investigando.

2.5 Extracción de lípidos en microalgas

La extracción de los lípidos procedentes de la biomasa microalgal para su uso posterior en la industria, es un paso clave debido a la posible contaminación del aceite con otros componentes celulares. Sin embargo, debido a la presencia de fuertes paredes celulares en las microalgas, los procedimientos y la eficacia de extracción no han sido completamente establecidos. De hecho, en la literatura sobre la extracción de ácidos grasos o lípidos totales en microalgas no existe un método estándar (Al Hattab et al., 2015).

Tradicionalmente, la extracción de lípidos a partir de microalgas se lleva a cabo mediante las técnicas de Folch et al. (1957) o la de Bligh y Dyer (1959). Folch et al. (1957), desarrollaron un método simple para la extracción de lípidos totales a partir de tejidos animales. Sin embargo, la eficiencia del método depende de las sales minerales presentes en el extracto crudo y en el uso de grandes cantidades de solventes (cloroformo y metanol). Por otro lado, Bligh y Dyer (1959) desarrollaron un método rápido para determinar los lípidos presentes en tejido congelado de pescado. Este método se aplica a tejidos con un 80% de humedad, y su eficiencia depende de las proporciones de los solventes (cloroformo, metanol y agua) de acuerdo al contenido de humedad del tejido. Esta técnica, es la más citada, y la más utilizada como punto de referencia para comparar diversos métodos de extracción de lípidos por solvente. No obstante, el cloroformo y (CHCl_3) el metanol (MeOH) son tóxicos e inflamables, y a nivel industrial se generan

grandes cantidades de desechos, lo que conlleva a un deterioro de la salud y del medio ambiente. Es por esto que: a) mejorar el rendimiento, b) disminuir costos y, c) hacer de la extracción de lípidos en microalgas, un proceso más “verde”, son algunos de los retos más importantes a superar en la actualidad (de Souza et al., 2019; Imbimbo et al., 2020).

Del proceso de extracción depende el rendimiento total de aceite obtenido a partir de microalgas, es por esto que ha sido sujeto a numerosos estudios, desde la adición de disolventes y la posterior incubación (Ackman et al. 1968), molienda y homogeneización (Ben-Amotz et al., 1985), agitación (Cartens et al. 1996), homogeneización (Ben-Amotz et al. 1996), hasta de estudios de optimización con microondas (MO), ultrasonido (US), etc. (Tabla 7). Además, basado en un estudio de valoración de ciclo de vida, la extracción de aceite consume el 90% de la energía, y es contaminante en el caso de uso de solventes peligrosos, por lo que es imperativo una mejora ecológica y económica de este proceso (Jez et al., 2017).

Tabla 7. Técnicas y procesos para la mejora en la extracción de lípidos de microalgas.

Técnicas de intensificación del proceso	Ventajas	Desventajas
Extracción asistida por microondas	<ul style="list-style-type: none"> - Más económico - Ambientalmente amigable - Tiempo de extracción reducido - Reducción en uso de solventes - Mejora en rendimiento de extracción 	<ul style="list-style-type: none"> - Filtración o centrifugación es necesaria para remover el residuo sólido - La eficiencia del microondas es baja cuando el compuesto objetivo o el solvente no son polares o volátiles - Fácil de escalar, pero no estandarizada a nivel comercial
Extracción asistida por ultrasonido	<ul style="list-style-type: none"> - Bajos tiempos de extracción - Reducción en uso de solventes - Liberación del contenido celular mejorada debido a una mayor penetración de solvente 	<ul style="list-style-type: none"> - Consumo alto de energía - Difícil de escalar - Poca calidad en el producto debido al daño durante el proceso
Extracción asistida por enzimas	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido y altamente específico - No tóxico - Rompimiento específico de compuestos objetivo 	<ul style="list-style-type: none"> - La eficiencia del método depende de la composición lipídica, tipo y etapa de la microalga - Costoso

Extracción asistida por surfactantes	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la extracción en biomasa húmeda - No se requiere equipamiento especial - Biodegradable - No tóxico 	- Eficiencia del método depende de la etapa de crecimiento de la microalga y de la estructura del surfactante
Extracción (con solventes, MO u US) de lípidos a partir de biomasa húmeda	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la extracción en biomasa húmeda - Ahorra energía - Bajo uso de solventes 	- La calidad de los lípidos puede no ser de tanta calidad como la de microalga seca
Extracción simultánea y transesterificación de lípidos	<ul style="list-style-type: none"> - Más económico - Permite sintetizar MEAGs en un sólo paso - Ahorra energía en secado y extracción - Reduce tiempo y solventes - Productos fácil de separar 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios de las variables a nivel comercial son necesarios - MEAGs pueden no ser de tan buena calidad como los de biomasa seca

Tabla modificada de Ranjith Kumar et al. (2015).

La biomasa de las microalgas puede ser utilizada para producir un gran número de productos de valor agregado como biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrógeno, alimentos para peces, suplementos alimenticios para humanos y productos para el cuidado de la piel (Merz et al., 2017; Odjadjare et al., 2017). Sin embargo, para que se puedan cumplir estas expectativas, se requiere de un crecimiento y recuperación de biomasa altos, y principalmente, de una extracción de aceite más eficiente, asequible y ambientalmente amigable.

2.5.1 Extracción asistida con irradiación infrarroja (EAIR)

Con el fin de disminuir las necesidades energéticas, y con una visión hacia la extracción de aceite de microalgas con un enfoque “verde”, se han investigado nuevas metodologías para reducir al mínimo el tiempo de extracción, mejorar el rendimiento del producto y evitar subproductos no deseados. Estas son: el uso de líquidos supercríticos (LSC), líquidos iónicos (LI), solventes ambientalmente más amigables, surfactantes (Al Hattab et al., 2015; Kumar et al., 2017; Wu et al.2017), y las denominadas formas de energía no clásicas como la sonicación y las MO (Lee et al., 2020). Sin embargo, existe otra forma de energía que no ha sido evaluada en la extracción de metabolitos en microalgas, esta es la irradiación infrarroja (IR).

La IR es la parte del espectro electromagnético ubicada entre las regiones visible y de microondas. Esta región se divide en tres zonas: la porción limitada entre 14290 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} ($0.7\text{-}2.5\text{ }\mu\text{m}$), conocida como infrarrojo cercano o de onda corta (IRC), la región media o infrarrojo medio (IRM) entre 4000 cm^{-1} y 666 cm^{-1} ($2.5\text{-}15.0\text{ }\mu\text{m}$); y el infrarrojo de onda larga, también conocido como infrarrojo lejano (IRL) con una región de que va $700\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ($14.3\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$) (Silverstein et al., 2014). La energía infrarroja se dispersa del filamento de la lámpara a las superficies del disolvente en contacto con una muestra, este absorberá la energía fácilmente y se calentará. Por lo que, la irradiación infrarroja es una forma directa de calentamiento. Además del efecto de calor, la irradiación infrarroja genera cambios en la matriz y en el analito a extraer. Una molécula orgánica absorbe la IR y la convierte en energía de rotación molecular a una frecuencia de 100 cm^{-1} , a frecuencias absorbidas de $10,000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ la molécula dispersará la energía en forma de vibración. La emisión de un espectro continuo sobre moléculas orgánicas, excita a las moléculas del disolvente, esto hará que haya un mayor flujo y capacidad de arrastre de los lípidos (Silverstein et al 2014).

Recientemente, la IR ha despertado gran interés en el área de la química verde, esto es por la alta eficacia de calentamiento asociada con la línea de visión entre la fuente y el producto (Escobedo et al., 2016). Por esta razón, ha sido utilizada para favorecer la extracción de metabolitos en plantas. Por ejemplo, Chen et al. (2010) emplearon la IR para extraer los compuestos activos de cuatro ácidos fenólicos y cuatro diterpenoides, de la planta *Radix Salviae miltiorrhizae*. Li et al. (2015), evaluaron el efecto de la EAIR junto con un líquido iónico, hidróxido de tetrabutilfosfonio (TBPH), para extraer salidrósido a partir de *Rhodiola crenulata* con resultados prometedores. Y en 2018, se determinó el potencial antidiabético de extractos de *Prunus armeniaca*, en dónde se compararon la eficiencia de los extractos obtenidos por IR y por un método de extracción convencional, logrando mejoras en el primer método (Raafat et al. 2018).

El uso de EAIR tiene las ventajas de una alta permeabilidad, un funcionamiento sencillo, un bajo consumo de energía y un rápido calentamiento (Neetoo et al., 2014). Además, permite seleccionar y utilizar recursos renovables (como microalgas), utilizar disolventes alternativos y menos contaminantes, reducir el consumo de energía, favorecer los procesos seguros, robustos, controlados, y aspirar a un extracto no desnaturalizado y biodegradable (Vicente y Castro, 2007). Estas características cumplen con cinco de los seis principios establecidos para una extracción verde (Chemat et al., 2012), y pueden

lograr incrementar la eficiencia del proceso de extracción de los lípidos de microalgas en comparación con las técnicas convencionales, como la extracción Soxhlet (ES), Folch o Bligh-Dyer.

2.5.2 Optimización por metodología de superficies de respuesta

En diversos casos, cuando se realiza un experimento es necesario determinar las mejores condiciones de operabilidad de un proceso para optimizar la respuesta de una o más variables. El término “optimización” se refiere a la mejora del rendimiento de un sistema, un proceso o producto (metabolitos o lípidos) para obtener el máximo beneficio de él (Bezerra et al., 2008). Para lograr esto, se pueden aplicar técnicas estadísticas que permitan desplazarse de la región experimental inicial, a otras regiones más amplias o para detallar la región experimental previa (Figura 6). La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadísticas que permiten optimizar un experimento, ya que reduce significativamente el número de experimentos, estudia un gran número de parámetros y considera los efectos de interacción entre todas las variables involucradas en el proceso (Momeni et al., 2018).

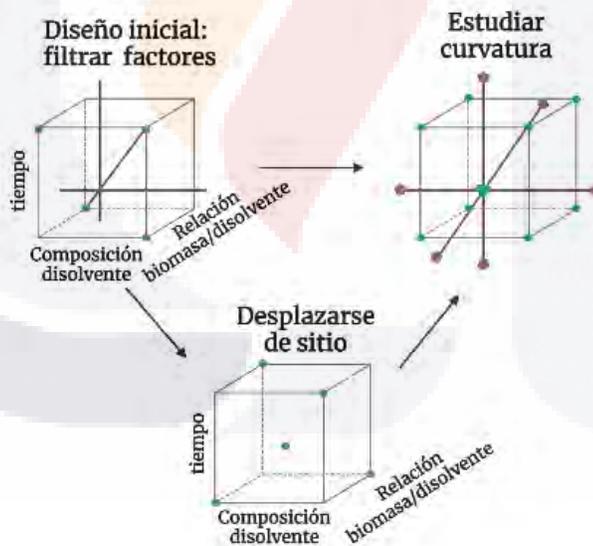


Figura 6. Acciones básicas en el diseño por metodología de superficie de respuesta. Figura creada en Biorender.com. Adaptada de Pulido et al. (2008).

Tradicionalmente, la mejora de la extracción de lípidos en microalgas se ha llevado a cabo mediante el control de la influencia de un factor a la vez a una respuesta experimental. Esto se ha hecho modificando un solo parámetro, mientras que los demás

se mantienen constantes (Halim et al., 2017). Esta técnica de “optimización” se denomina una variable a la vez. Sin embargo, este tipo de diseños no representa los efectos completos de un parámetro sobre la respuesta y no considera los efectos interactivos entre las demás variables involucradas (Amdoun et al., 2021). Hasta este punto, la información obtenida mediante el diseño de una variable a la vez, nos da información acerca de las mejores condiciones o la mejor combinación de niveles de los factores analizados. En contraste, el punto óptimo, nos proporciona la mejor combinación posible en toda la región de operabilidad (Gutiérrez et al., 2008).

Antes de utilizar la MSR, se tiene que definir un diseño experimental que nos oriente sobre los ensayos que se llevarán a cabo en una región experimental. Para esto, se puede utilizar un diseño de primer orden, el cual se vale de matrices experimentales cuando el conjunto de datos no presenta curvatura. Las superficies generadas por los modelos lineales pueden utilizarse para indicar la dirección en la que debe desplazarse el diseño original para alcanzar las condiciones óptimas. Sin embargo, cuando los datos no pueden describirse mediante funciones lineales, un diseño factorial de tres niveles (Figura 7) como el diseño central compuesto (DCC), puede aplicarse con el fin de aproximarse a una función de una respuesta (Whitcomb y Anderson, 2004).

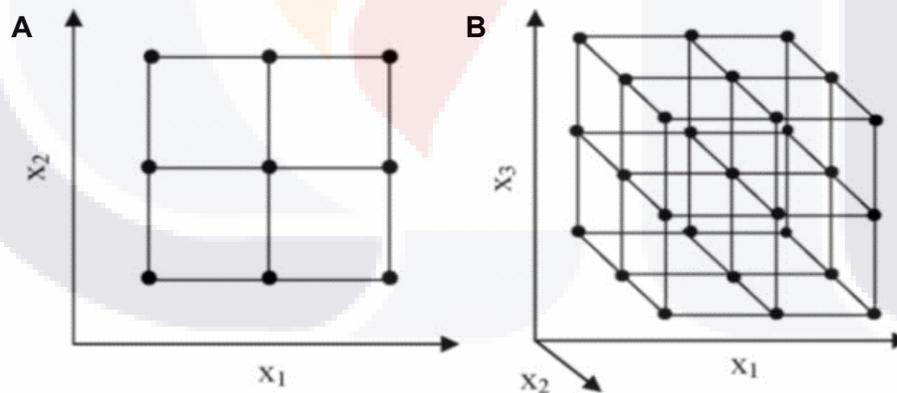


Figura 7. Diseños factoriales de tres niveles para la optimización de: A) dos, B) tres variables. Adaptada de Bezerra et al. (2008).

El DCC es un modelo cuadrático en dónde la mejor respuesta generada, se visualiza como un máximo, un mínimo o como una figura similar al de una silla de montar (Figura 8).

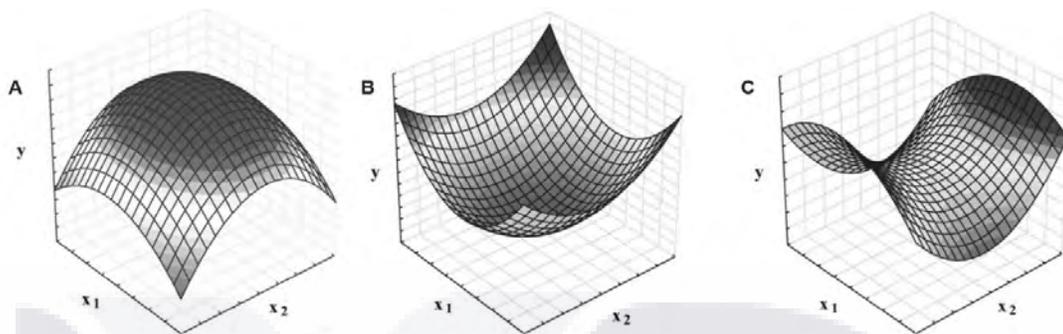


Figura 8. Gráficas de un modelo cuadrático de superficie de respuesta para la optimización de dos variables: A) Punto máximo dentro de la región experimental, B) Punto mínimo, C) Silla de montar. Tomada y adaptada de Bezerra et al. (2008).

El DCC se puede construir a partir de un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} agregando puntos sobre los ejes y al centro. Es uno de los diseños más importantes y utilizados por su gran flexibilidad, ya que se puede construir a partir de diseños más simples, lo que permite optimizar el gasto de los recursos. No hay necesidad de iniciar de cero, ya que se pueden utilizar los datos obtenidos previamente para construir un diseño más complejo (Gutiérrez et al., 2008).

Este diseño ha sido aplicado para optimizar la producción de biomasa y de lípidos en microalgas, por ejemplo, Kiran et al. (2016) estudiaron la temperatura, la concentración de nitrato y fosfato y sus interacciones, y obtuvieron incrementos en la productividad de biomasa ($47.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y cantidad de lípidos (109.5 mg L^{-1}) después de la optimización. En otro estudio, evaluaron la aplicación del DCC para optimizar la extracción de lípidos en *S. obliquus* mediante la extracción asistida con ultrasonido. Este reporte reveló que con el uso de disolventes como hexano e isopronaol junto con el ultrasonido, se pueden extraer lípidos de esta microalga con un rendimiento de 14.30; al aplicar la MSR con un DCC lograron incrementar el rendimiento hasta 26.35% (Ido et al., 2018).

2.6 Aplicaciones de lípidos de microalgas

La amplia diversidad de productos sintetizados por microalgas a partir de distintas vías metabólicas provee fuentes de ácidos grasos, esteroides, carotenoides, polisacáridos, lectinas, aminoácidos, compuestos halogenados, policétidos, toxinas, agar-agar, ácido algínico y carrageninas (Priyadarshani et al., 2012). Particularmente,

estas células fotosintéticas producen en abundancia lípidos de acilo e isoprenoides, esto es importante a nivel industrial ya que pueden ser una solución sostenible para la demanda global actual de insumos.

Se ha reportado que el aceite de microalgas contiene antioxidantes, clorofilas y carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, triglicéridos, y vitaminas, que tienen gran potencial o ya se utilizan comercialmente en diferentes sectores industriales, por ejemplo, en la cosmética, alimentos funcionales, salud humana, biocombustibles, etc. (Borowitzka, et al., 1995; Pulz y Gross 2004; Mišurcová et al., 2011).

2.6.1 Cosméticos

Los pigmentos de las microalgas son frecuentemente utilizados en cosméticos como antioxidantes (Tabla 8). Algunas especies de microalgas como *Arthrospira* y *Chlorella* se han establecido en el mercado del cuidado de la piel (Stolz y Obermayer, 2005). Los lípidos neutros se utilizan principalmente en productos de cuidado de la cara y la piel en general como cremas antienvjecimiento, refrescantes o productos de cuidado regenerantes, emolientes y como antiirritantes en exfoliaciones (Mourelle et al., 2017).

Los ácidos grasos de microalgas intervienen en la pérdida de agua transepidérmica y en la restauración de la barrera de permeabilidad (Servel et al., 1994). Tominaga et al., en 2012, encontraron que la astaxantina, tiene la propiedad de renovar la condición de la piel ya que desvaneció algunas arrugas de la piel (patas de gallo), disminuyó el tamaño de manchas de la piel debidas a la edad, mejoró la elasticidad y textura de la piel. En productos para la protección solar y productos para el cuidado del cabello. Las especies típicas que se utilizan para los cosméticos son *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Ascophyllum nodosum*, *Alaria esculenta*, *Spirulina platensis*, *N. oculata*, *C. vulgaris* y *D. salina*.

Tabla 8. Uso potencial de derivados lipídicos de microalgas en cosméticos.

Molécula bioactiva	Microalga	Uso potencial en cosméticos	Referencia
β -caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	Antioxidantes	Hamed, (2016)
Asthaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioxidantes y protector solar	Hamed, (2016) Koller et al. (2014)

Licopeno	<i>Anabaena vaginicola</i>	Antioxidante Antienviejecimiento Pantalla solar	Singh et al. (2012) Hashtroudi et al., (2013) Koller et al. (2014)
Extractos de microalgas	<i>Chlorella vulgaris</i>	Reparador de colágeno	Morelli et al. (2004)
	<i>Scenedesmus vacuolatus,</i> <i>Phaeodactylum Tricornutum</i> y <i>Chlorella kessleri</i>	Antioxidantes	Sabatini et al. (2009)

Tabla modificada de Mourelle et al. (2017)

2.6.2 Alimentos funcionales

Las microalgas tienen numerosos compuestos lipoides que están presentes actualmente en nutracéuticos, por ejemplo, vitaminas: A (retinol), D, y E (tocoferol). Sin olvidar también a los ácidos araquidónico (AA) ($\omega 6$), docosaheptaenoico (ADH) ($\omega 3$) y eicosapentaenoico (AEP) (Ryckebosch 2012, Bishop y Zubeck 2012). También son una fuente cuantiosa de vitaminas B1, B2, C y E; nicotinato; biotina; ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, y minerales como yodo (I), potasio (K), hierro (Fe), magnesio (Mg), y calcio (Ca) (Becker et al., 2004). Los carotenoides como el α - y β -carotenos, licopeno, β -criptoxantina, zeaxantina y luteína tienen aplicaciones comerciales como colorantes naturales para alimentos (Pulz y Gross 2004).

El β -caroteno es un poderoso antioxidante y debido a que su coloración varía desde el rojo hasta el amarillo, se ha utilizado para dar el color amarillo a la margarina y al queso, así como para realzar el color de la carne de pescados y la yema de los huevos. También se utiliza como colorante en frituras, mantequilla para palomitas de maíz, en imitaciones de lácteos, gelatinas, dulces, etc. Además, mejora la salud y la fertilidad del ganado alimentado con cereales (Gordon et al., 1983). Una de las principales ventajas del uso de carotenoides en la industria alimentaria es que tienen un impacto positivo en la salud humana (Higuera-Ciapara et al., 2006; Tang et al., 2011). Por ejemplo, la espirulina que es rica en carotenoides se suministró a niños de 1 a 6 años y se observaron mejoras significativas en el contenido de hemoglobina, la proteína del suero, y los niveles de retinol sérico (Thinakar et al., 1999). La *Chlorella* contiene grandes cantidades de folato, vitamina B12 y Fe, lo que ayuda a mejorar la anemia y trastornos hipertensivos (Fallah, et al., 2018). *Dunaliella* es rica en carotenos mixtos (α -caroteno, trans -caroteno, 9-cis β -caroteno, 9-15-dicis β -caroteno, 15-cis β -caroteno y licopeno) y xantofilas

(zeaxantina, luteína, α y β -cryptoxantina, violaxantina). Estos carotenos pueden proteger células contra el estrés oxidativo y fotooxidativo (Murthy et al., 2005). *Scenedesmus* también es una especie rica en compuestos bioactivos (principalmente de vitaminas y pigmentos) que están siendo utilizados en la industria de los alimentos y que son comparables aquellos presentes en los vegetales (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido de vitaminas en microalgas comparadas con otras fuentes y con la ingesta diaria recomendada (IDR) (valores en mg Kg⁻¹ de biomasa seca).

Fuente	Vitamina						Niacina	Ácido pantoténico
	A	B1	B2	B6	B12	E		
IDR (mg d ⁻¹)	1.7	1.5	2.0	2.5	0.005	30.0	18.0	8.0
Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	130.0	0.9	1.8	1.8	-	-	5.5	2.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	7.1	16.5	21.0	-	112.0	4.0	-
<i>S. platensis</i>	840	44.0	37.0	3.0	7.0	120.0	-	13.0
<i>C. pyrenoidosa</i>	480.0	10.0	36.0	23.0	-	-	240.0	20.0
<i>S. quadricauda</i>	554.0	11.5	27.0	-	1.1	-	10.8.0	46.0

Tabla modificada de Schenk et al. (2008).

2.6.3 Salud Humana

Los ácidos grasos de microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *D. salina* y *Aphanizomenon flos-aquae* son excelentes para el cuidado de la salud, son anticancerígenos (Jayappriyan et al., 2013; Konícková et al., 2014), tienen actividad antioxidante, antiviral y antibacterianas (Liu et al 2011; Halperin et al., 2003; Kumar et al., 2011), participan en procesos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Abdel-Daim et al., 2015; Wu et al., 2016), además, se han observado efectos positivos contra la hiperlipidemia, daño por radiación, diabetes, intoxicación por metales pesados y/o toxicidad inducida por químicos, en reacciones alérgicas, y anemia (Kuriakose et al., 2008; Joventino et al 2012; Vo et al., 2012; Eid et al., 2016; Matos et al., 2017; Abdelhafez et al., 2019).

Se ha encontrado que extractos lipídicos de *S. obliquus* tienen actividades antimicrobianas, citotóxicas (Marrez et al., 2019); y actividad anticancerígena contra las líneas celulares MCF7 de la mama humana, HePG2 hepática, HCT116 del colon y contra la del adenocarcinoma cervical humano HeLa (Abd El Baky et al., 2014; Silambarasan et al., 2014).

2.6.4 Biocombustibles: biodiesel

El biodiesel (Figura 9) se define como los ésteres monoalquílicos de aceites vegetales o de grasas animales de acuerdo con la Norma Americana de Biodiesel ASTM D6751 (Moser et al., 2011). Además de servir como combustible para el transporte, el biodiésel también es atractivo como combustible para calefacción. Las ventajas del biodiésel sobre el petrodiesel son: a) es derivado de recursos renovables; b) miscible con el diésel convencional a cualquier proporción de mezcla; c) tiene un balance energético positivo; d) es biodegradable; d) baja emisión de óxidos de nitrógeno (NOx); e) contenido escaso o nulo de azufre y compuestos aromáticos, etc.

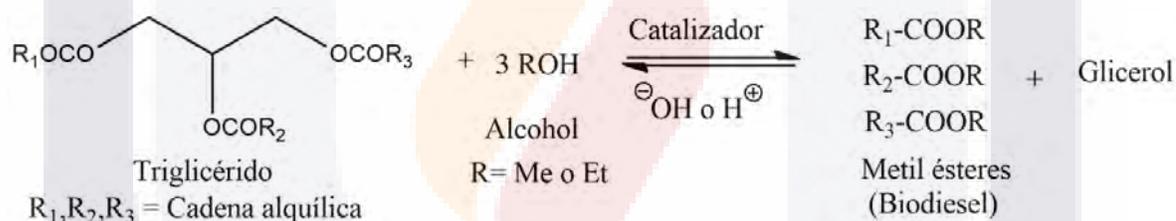


Figura 9. Proceso de transesterificación de un aceite (triglicéridos) a biodiesel. Elaborada por Hans Correa en ChemDraw Professional 17.0.

La producción de biodiesel a partir de microalgas ofrece diversas ventajas, por ejemplo: a) alta eficiencia fotosintética (elevada tasa de crecimiento); b) menor demanda de agua en comparación que la de los cultivos vegetales; c) se mitiga el CO₂ atmosférico; d) superficies de cultivo inferiores y uso de tierra no arable (Demirbas et al., 2010). El aceite de microalgas parece ser el único con el potencial para desplazar al diésel convencional. A diferencia de otros cultivos oleaginosos, las microalgas crecen extremadamente rápido y muchas son ricas en aceite (Tabla 10).

Tabla 10. Cantidad de aceite producido por diversas materias primas

Materia prima	Litros/hectárea/año
Ricino	484-1,307
Girasol	98-1,070
Palma	3,226-6,000
Semilla de soya	56-636
Microalgas	58,700-136,900

Tabla modificada de Gouveia et al. (2017).

Sin embargo, para que las algas se conviertan una plataforma viable económicamente para sustituir al petróleo, hay una serie de inconvenientes a considerar, desde cómo y dónde cultivar estas algas, hasta la mejora de la extracción del aceite y el procesamiento del combustible. Los principales desafíos por vencer incluyen el aislamiento de las cepas, la obtención y utilización de nutrientes, la gestión de la producción, cosecha, el desarrollo del coproducto, la extracción del aceite y transformación a combustible, su refinado y la utilización de biomasa residual (Hannon et al., 2010).

Otro punto clave es la selección de especies, ya que se deben de tener en cuenta características como el tiempo de producción y rendimiento adecuados de biomasa, lípidos y pigmentos. Las especies ideales, también deben de tener una biomasa fácilmente separable del medio de cultivo, adaptarse a condiciones de cultivo de bajo costo y debe ser resistente a organismos invasores.

Así pues, el cultivo de microalgas para la producción de biodiesel implica no sólo la selección y producción de especies, la evaluación de los tipos y la cantidad de lípidos, sino también el mercado potencial para los coproductos.

2.7 *Scenedesmus obliquus*

Los miembros del género *Scenedesmus* spp. se han convertido en el principal modelo de estudio en diversos campos de la limnología (Figura 10). Se han utilizado como organismos estándar en áreas de la investigación acuática, en la tecnología y manejo del agua (Putri et al., 2015; Huang et al., 2018); y como fuente de alimento en experimentos con zooplancton herbívoro (Liady et al., 2015).

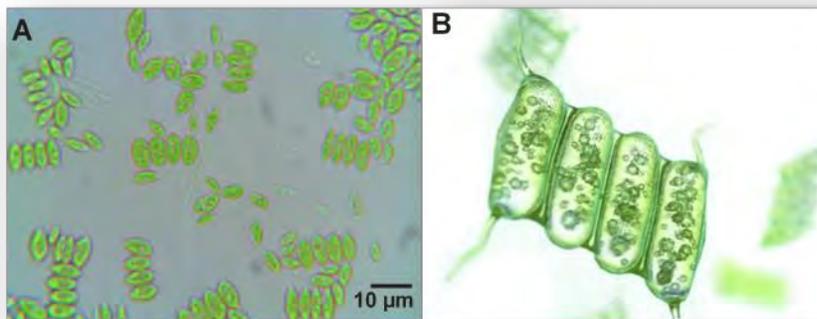


Figura 10. Células de *Scenedesmus obliquus*. Imagen A tomada de Liao, Y. 2014. Imagen B tomada de “Algotherrm Cosmétique Marine”, 2020.

Scenedesmus spp., también ha sido utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas debido a su alto contenido nutricional y bioactividad (Tabla 11). Es por esto, que la determinación cuantitativa de la composición bioquímica celular de las algas, principalmente, en su composición de pigmentos y ácidos grasos es muy importante.

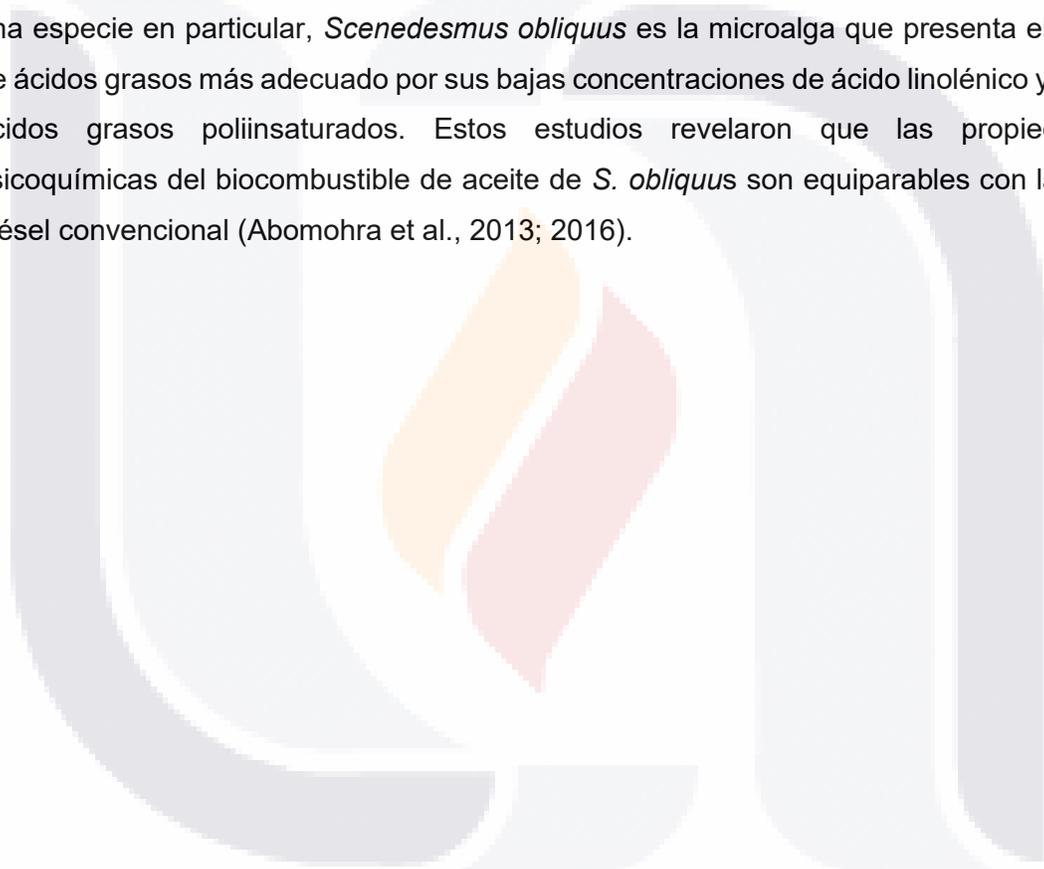
Tabla 11. Metabolitos importantes encontrados en *Scenedesmus* spp y sus aplicaciones

Molécula bioactiva	Aplicaciones	Referencia
Vitaminas B, C, E	Alimentos-salud, Aditivo para alimentos, Farmacéuticos	Limón et al. (2015); Becker (2004)
Luteína	Nutrición animal, Farmacéuticos	Chen et al. (2019); Skjanes et al. (2013)
Astaxantina	Acuicultura, Cosméticos, nutrición humana, medicamento	Jouni y Makhoul (2012); Gouveia et al. (2008).
β -caroteno	Medicamento, Colorante de alimentos	Guedes et al. (2013); Indira y Biswajit (2012);
Clorofila a, b, c	Cosméticos, Colorantes de alimentos, Farmacéuticos	Chacón-Lee y Gonzalez-Marino (2010).
Aminoácidos	Alimento	Abomohra et al. (2016); Pandian et al. (2012); Mahale et al. (2013)
Ácidos grasos saturados e insaturados	Biodiesel, Farmacéuticos, nutrición humana, acuicultura	

Scenedesmus obliquus ha mostrado ser una especie con gran potencial para acumular lípidos. Mandal et al. (2009), lograron potenciar la síntesis de lípidos de S.

obliquus al cultivarlo en un medio previamente suplementado con glucosa en conjunto con una serie optimizada de concentraciones de nitrato, fosfato y tiosulfato de sodio en una segunda fase. También se ha logrado incrementar la producción de lípidos en esta microalga utilizando medio mixotrófico (dextrosa, acetato de sodio, citrato y bicarbonato, glicerol y cisteína), de manera que se sugiere utilizar medios mixotróficos sobre los autotróficos para obtener mayores cantidades de lípidos sin comprometer la producción de biomasa (Patnaik et al., 2015).

Otros reportes previos sugieren que, si el propósito es el de producir biodiesel de una especie en particular, *Scenedesmus obliquus* es la microalga que presenta el perfil de ácidos grasos más adecuado por sus bajas concentraciones de ácido linolénico y otros ácidos grasos poliinsaturados. Estos estudios revelaron que las propiedades fisicoquímicas del biocombustible de aceite de *S. obliquus* son equiparables con las del diésel convencional (Abomohra et al., 2013; 2016).



3. JUSTIFICACIÓN

La economía global requiere de nuevas fuentes de alimentos, y de energía. La demanda de energía para el transporte, iluminación, producción de plásticos y fertilizantes, junto con el constante incremento de la población incrementan día a día el uso de los combustibles fósiles. La energía solar es renovable, mientras que todas las demás fuentes de energía, incluidas las de origen fósil y nuclear, tienen una cantidad limitada de producción y son agotables. Un método eficiente para capturar energía solar es mediante la actividad fotosintética de microalgas para producir biomasa (materia prima renovable para la producción de alimentos, combustibles y productos químicos) a través de estrategias apropiadas. Los costos asociados con la cosecha y el transporte de microalgas son relativamente bajos, en comparación con los de otros materiales de biomasa como árboles, cultivos, etc. En virtud de sus tamaños relativamente pequeños, las microalgas se pueden tratar químicamente de manera fácil, se pueden cultivar en condiciones más simples o “duras” en comparación con la producción de cultivos convencionales, no compiten por tierras de cultivo, y, además, son capaces de fijar CO_2 en la atmósfera lo que facilita la reducción de los niveles atmosféricos de este gas, que ahora se considera un problema global.

A pesar de las numerosas ventajas que ofrecen las microalgas en la generación de fuentes de energía y de alimentos, sigue siendo un reto el alto costo que presenta su producción debido al alto costo energético y de disolventes necesarios en la extracción de metabolitos, la necesidad de reactores, de fuentes puras de carbono (CO_2), de temperaturas óptimas de cultivo, etc. Debido a lo anterior, nuevas estrategias de producción y extracción de metabolitos y, principalmente de aceite de microalgas se tienen que explorar para superar los desafíos y lograr los máximos resultados posibles en términos de rendimiento, sostenibilidad y rentabilidad. Estas estrategias involucran el estudio de la eficiencia en la extracción (disminución del costo y gasto energético), además de una combinación de factores de estrés (temperatura, pH, intensidad y tiempo de irradiación, etc.), y la adición de fitohormonas. Adicionalmente, el análisis de expresión genética es una herramienta muy importante para el estudio de microalgas ya que revelan los genes funcionales implicados en la biosíntesis y acumulación de lípidos; este conocimiento puede aprovecharse para mejorar la aplicación de técnicas moleculares en ingeniería metabólica y genética.

Por todo lo descrito, en este trabajo se propuso evaluar la expresión de genes y la capacidad de producción de ácidos grasos en *Scenedesmus obliquus* bajo condiciones de estrés nutritivo acoplado a un estímulo con fitohormonas; así como estudiar, comparar y optimizar la técnica de extracción de lípidos bajo irradiación infrarroja. Todo lo anterior, con el fin de incrementar la producción y extracción de lípidos, con un proceso ambientalmente amigable; por un consumo energético y de insumos disminuidos.



4. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción de ácidos grasos en *S. obliquus* en respuesta a ácido giberélico (AG) y bencil amino purina (BAP) bajo déficit de nitrógeno, analizar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lípidos; evaluar y optimizar la técnica de extracción de lípidos por irradiación infrarroja con metodología de superficie de respuesta.

4.1 Objetivos particulares

- 4.1.1 Evaluar las cinéticas de crecimiento, la producción de lípidos y de biomasa en cultivos de *S. obliquus* con los reguladores de crecimiento AG y BAP a diferentes concentraciones (10^{-5} M- 10^{-8} M).
- 4.1.2 Evaluar las cinéticas de crecimiento, la producción de lípidos y de biomasa en cultivos de *S. obliquus* a diferentes porcentajes de nitrógeno (0%, 25% y 50%) tratados con AG y con BAP.
- 4.1.3 Cuantificar y caracterizar los ácidos grasos de *S. obliquus* en respuesta a AG y BAP bajo déficit de nitrógeno.
- 4.1.4 Analizar la expresión de genes de *S. obliquus* para la esteroil ACP desaturasa (SAD), la ácido graso ACP tioesterasa (FATA), la diacil glicerol acil transferasa (DGAT) y para la proteína acarreadora de acilo (ACP) en respuesta al estímulo con AG y BAP por déficit de N.
- 4.1.5 Evaluar, comparar y optimizar la extracción de lípidos totales de *S. obliquus* con solventes asistida con irradiación infrarroja (EAIR) metodología de superficie de respuesta (MSR).

5. HIPÓTESIS

La adición de fitohormonas como AG y BAP estimulará la producción de biomasa en *S. obliquus*, esta condición junto con un estrés por déficit de N, generará un incremento biosintético de ácidos grasos en la microalga y, por lo tanto, la sobre expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico. Además, la implementación y optimización de la irradiación infrarroja en la extracción de lípidos totales en *S. obliquus*, mejorará el porcentaje de obtención de los mismos.



6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo de *S. obliquus*

S. obliquus (UTEX 3031) se obtuvo de la colección de algas de la Universidad de Texas E.U.A. Bajo condiciones estériles, en recipientes de vidrio de 1 L (triplicado), se agregaron 15 mL de cultivo denso de *S. obliquus* hasta llegar a una densidad óptica de 0.20 ± 0.01 , medida en un espectrofotómetro Uv-vis (Thermo Scientific Genesys 10s) a 750 nm ($D.O_{.750}$). Se adicionaron 850 mL de medio Basal Bold (MBB) estéril (Andersen, 2005) y se ajustó el pH a 8. Los recipientes se taparon y a través de las tapas se introdujo un tubo de vidrio estéril conectado, por medio de una manguera, a una bomba de aire a un flujo de 1500 cc/min. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, bajo fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8 h con lámparas de luz blanca-fría fluorescente (OSRAM 096/850) a una intensidad $76 \text{ } \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ durante 15 días continuos.

6.2 Cinética de crecimiento de *S. obliquus*

Se determinaron las cinéticas de crecimiento por conteo celular directo de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 1 mL en cada uno de los ensayos y se determinó la concentración celular (C) en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer. Se observaron las muestras (10 μL) en un microscopio óptico (Olympus CH30 LF 100) con un aumento de 40X cada 48 h por 15 días. Se determinó el promedio (en cada uno de los triplicados) de la concentración celular (células/mL) de acuerdo a la ecuación 1:

$$C = [(N / 4) / 10^{-6}] \times \text{factor de dilución} \quad \text{ec. 1}$$

Donde N = promedio de células presentes en los 5 cuadros pequeños del cuadro central del hematocitómetro.

Se estimó la biomasa cada 48 h hasta el día 15 por medición de la densidad óptica de los cultivos a 750 nm. Los valores de la $D.O_{.750}$ se convirtieron a biomasa (g L^{-1}), basados en una relación lineal entre la $D.O_{.750}$ y biomasa (g L^{-1}), la cual se obtuvo después de un análisis de datos múltiple y fue calculado por la ecuación 2 (George et al., 2014):

$$\text{Biomasa} = 1.6281 (OD_{750}) - 0.006 (R^2=0.9982) \quad \text{ec. 2}$$

La productividad de biomasa (P, $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) fue calculada mediante la ecuación 3:

$$P = X_{t_2} - X_{t_1} / t_2 - t_1 \quad \text{ec. 3}$$

donde X_{t_2} y X_{t_1} son la concentración de peso de células secas (g L^{-1}) en el tiempo t_2 y t_1 , respectivamente (Babu et al., 2017).

A los 15 días los cultivos fueron decantados y centrifugados a 10,000 rpm por 10 min. La biomasa obtenida se lavó con agua destilada (3 veces con 5 mL), se congeló ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) y se liofilizó. Se determinó el peso de la biomasa liofilizada gravimétricamente.

6.3 Crecimiento de *S. obliquus* con estímulo de BAP y AG a 10^{-5} - 10^{-8} M

Se reactivó un cultivo de esta microalga inoculando un matraz Erlenmeyer de 1L con 800 mL de MBB a una D.O.₇₅₀ inicial de 0.2 ± 0.01 . Los matraces se incubaron a una temperatura de $22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ y se aplicaron ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h con lámparas de luz blanca-fría fluorescente (OSRAM 096/850) a una intensidad $76\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ durante 20 días continuos. Se tomaron alícuotas de este cultivo y enseguida, en matraces Erlenmeyer de 1 L (triplicado), de la biomasa inmediatamente obtenida de cultivos previamente cosechados en la parte final de la fase exponencial, se inocularon, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, en 800 mL de medio MBB fresco y se suministraron diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M) de BAP y AG. Se evaluaron las cinéticas de crecimiento por el método descrito anteriormente.

6.4 Efecto de BAP y AG sobre el crecimiento y el contenido de lípidos con limitación de N

Las concentraciones seleccionadas de BAP y AG que arrojaron los mejores resultados fueron 10^{-5} M y 10^{-6} M, respectivamente. Estas concentraciones fueron aplicadas para la siguiente serie de experimentos con diferentes concentraciones de N: 125 mg L^{-1} , 62.5 mg L^{-1} y 0 mg L^{-1} (o 50%, 25% y 0% de la concentración total de N, respecto a la concentración inicial estándar del MBB). Las condiciones de crecimiento se aplicaron de manera idéntica, como ya se mencionó anteriormente.

6.5 Cuantificación de lípidos de *S. obliquus*

6.5.1 Método de la Sulfofosfovainillina

La cuantificación de lípidos en cultivos de *S. obliquus* estimulados con BAP y AG con y sin estrés nutritivo, se realizó de acuerdo al protocolo de Park et al. (2016) con ligeras modificaciones. La fosfovainillina se preparó disolviendo 0.6 g de vainillina en 10 mL de etanol (EtOH) absoluto y 90 mL de agua destilada. Enseguida, se agregó a la

solución 400 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado y se guardó la mezcla en frasco ámbar en oscuridad.

En tubos Pyrex de 15 mL, se adicionó una cantidad conocida de biomasa de la microalga, se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentó la mezcla a 100 °C por 10 min, luego se enfrió a t.a. por 5 min y se agregaron 5 mL de reactivo de sulfofosfovainilina; la muestra se incubó a 37 °C por 15 min con agitación ocasional. Finalmente, se leyó la absorbancia a 530 nm. Se obtuvieron las curvas de calibración utilizando como estándar aceite de canola comercial. Las determinaciones de lípidos se realizaron cada 48 h para por 15 días.

6.5.2 Caracterización de los ácidos grasos de *S. obliquus* por cromatografía de gases (CG)-FID

Para el análisis de ácidos grasos, los lípidos totales se extrajeron mediante el método Bligh-Dyer con 50 mg de biomasa recuperada al día 15 de cultivo. Los ácidos grasos se transestificaron a metil ésteres de ácidos grasos (MEAGs) como lo describe Salas-Montantes et al. (2018). Las muestras se analizaron con un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian Inc., Walnut Creek, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) utilizando una columna capilar Stabilwax (60 m x 0.25 mm de diámetro interno, película de 0.25- μ m, Número de Catálogo 10626, Restek Corp, USA). La temperatura del horno se programó de 150 a 200 °C a una velocidad de 10 °C min^{-1} y se mantuvo a esta temperatura durante 1 min; después, la temperatura se elevó a 250 °C a 3 °C min^{-1} y se mantuvo durante 1 min. Se utilizó hidrógeno como gas acarreador a una tasa de flujo de 2 mL min^{-1} . La temperatura del inyector se fijó en 250 °C (flujo dividido 50:50) y la temperatura del detector fue de 300 °C. Los FAME se identificaron comparando sus tiempos de retención con una mezcla MEAGs estándar conocida (mezcla con 37 componentes, número de catálogo SIGMA 47885-U, Supelco, USA). Para el perfil de ácidos grasos, el porcentaje de cada ácido graso particular con respecto a la fracción de ácidos grasos totales se calculó según el método AOCS Ce 1-602.

6.6 Análisis de expresión

6.6.1 Extracción de ADN

En la extracción de ADN, se tomó 0.1 g de muestra liofilizada de *S. obliquus* y se colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL. Luego se agregó: buffer de lisis (en proporción

1:1 y preparado con SDS 10%, NaCl 5M, TrisCl 1mM, EDTA 0.5 M) y 250 μ L de NaCl 1.4 M. La muestra se mezcló por inversión y se colocó 10 min en hielo. Luego se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm y la fase superior fue colocada en un tubo nuevo al cuál se le agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y enseguida se agitó manualmente hasta homogenizar. Enseguida se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm, la fase superior se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol y 1/9 V/V de acetato de sodio 3 M. Enseguida se mezcló la muestra por inversión y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Para colectar el ADN en la base del tubo, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se eliminó con una pipeta. El ADN se lavó dos veces con etanol al 70% y la pastilla se dejó secar al aire. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 30 μ L de agua estéril.

6.6.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se colocaron 0.05 g de muestra iofilizada por cada tubo Eppendorf® de 1.5 mL y se agregaron 500 μ L de PureLink® Plant RNA Reagent, la mezcla se agitó con vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Enseguida los tubos fueron centrifugados a 11, 500 rpm durante 2 min y la fase superior se recuperó en tubos nuevos con 300 μ L de cloroformo. Luego los tubos fueron centrifugados a 11,500 rpm durante 10 min a 4 °C y la fase superior fue recuperada en tubos nuevos. Enseguida se agregó a cada tubo isopropanol (1:1) y luego se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 11,500 rpm durante 10 min a 4 °C y la pastilla de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 75%. El ARN obtenido fue diluido en 20 μ L de agua estéril.

La primera hebra de ADNc fue sintetizada a partir de 1 μ g de ARN total con 1 μ L de oligo d(T) (Invitrogen) y 1 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM llevando el volumen total de la mezcla a 10 μ L con agua estéril. Esta mezcla fue incubada a 65 °C por 5 min e inmediatamente colocada en hielo. Enseguida se agregaron 2 μ L de buffer de síntesis 5X, 4 μ L de MgCl₂, 2 μ L de DTT 0.1 M, 1 μ L de RNase OUT y 1 μ L de RT SuperScript (Invitrogen). La solución fue incubada a 50 °C por 50 min y enseguida a 85 °C por 5 min y luego se colocó en hielo y se agregó 1 μ L de RNase H. La reacción concluyó incubando la solución a 37 °C por 20 min. El cADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso en el análisis de expresión por RT-PCR.

6.6.3 Diseño de oligonucleótidos

Para la amplificación de cada uno de los genes de interés, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el programa DNAMAN, a partir de secuencias reportadas en el NCBI (Tabla 13). Para el diseño, se consideró un contenido de GC de 40 a 60%, 19 a 24 pb de longitud, diferencias de T_m entre ambos oligonucleótidos no mayores a 2 °C. Además, se evitó en lo posible la complementariedad entre los 2 o 3 nucleótidos del extremo 3' así como también la formación de horquillas y dímeros continuos y discontinuos. También se utilizaron oligonucleótidos reportados en la literatura únicamente para el gen *DGAT*. Estos iniciadores fueron probados en ADN de *S. obliquus* hasta encontrar las condiciones óptimas de amplificación de cada gen. Luego se procedió a la amplificación del ARNm.

6.6.4 Análisis de expresión mediante PCRq

El gen 18S rRNA de *S. obliquus* se utilizó como estándar interno. Los pares de oligonucleótidos de los genes seleccionados se enumeran en la tabla 12. La PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizó en una placa de grado óptico de 96 pocillos utilizando un sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystems StepOne™ (Applied Biosystems, Australia) utilizando SYBR Green de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La solución de reacción de 20 µL de PCR en tiempo real estaba compuesta de 10 µL de reactivo SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 100 ng de ADNc y 0.5 pmol de oligonucleótidos directos e inversos específicos de genes.

Los parámetros del programa para la amplificación fueron 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 s y a 60°C durante 1 min. Las curvas de fusión se generaron mediante un ciclo de 95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min y 95°C durante 30 s. Las muestras se evaluaron por triplicado y los datos se analizaron utilizando el software del sistema de PCR en tiempo real Step One de Applied Biosystems (Applied Biosystems). Los datos de referencia se obtuvieron de los ciclos 1 a 40. Para normalizar la cantidad de transcripciones en cada muestra, la abundancia relativa de 18S rRNA también se utilizó como el estándar interno. Los datos de expresión génica se analizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et al., 2001).

Tabla 12. Iniciadores utilizados para el análisis de expresión genéticas de *S. obliquus* por qRT-PCR.

Gen	Secuencias iniciadores (5'-3')	Amplicon tamaño (bp)	Alineamiento T (°C)
<i>ACP</i>	5'- AGAAGATCGAGCCGGCAAA -3' 5'- CTTCTGTTTGTCTGTGCTGCA -3'	350	55
<i>FATA</i>	5'- ATGCCGGACATGGACCACCTA -3' 5'- GCACCTGGGTGACCATCAACA -3'	200	62
<i>SAD</i>	5'- TGCTGAAGCCGGTGGACAA -3' 5'- GATGAGGTTCTGGATGGTTAC -3'	450	55
* <i>DGAT</i>	5'- AGAAGATCGAGCCGGCAAA -3' 5'- CTTCTGTTTGTCTGTGCTGCA -3'	500	55
<i>18s rRNA</i>	5'- ATATCTTCACGAAGCGCATG -3' 5'- TGTACTCATTCCAATTACCAG -3'	200	58

*Sharma et al. (2015).

6.7 Análisis estadístico

Las mediciones de la cinética de crecimiento, la productividad de biomasa y el análisis de la expresión de genes se realizaron por triplicado. El análisis de lípidos totales y del perfil ácidos grasos se realizaron por duplicado. Los datos se analizaron utilizando el software Prisma 7 para Windows, versión 7.00 (GraphPad Software, Inc.). Se compararon las diferencias significativas entre las medias de tratamiento para cada variable utilizando un análisis de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), comparando los valores medios para un conjunto de datos mediante el análisis de varianza (ANOVA). Todos los valores SD (desviación estándar) de los gráficos se representaron como barras de error.

En el caso de la optimización de la EAIR por MSR, el diseño experimental se orientó en el rendimiento (%) de los lípidos totales, definiendo tres factores para el análisis: tiempo de extracción, relación masa/volumen de disolvente y proporción de la mezcla de disolventes. Se estableció un diseño central compuesto (DCC) factorial completo 2^3 (Tabla 13), y los datos obtenidos se analizaron con el software Design-Expert® v11 para Windows (STAT-EASE®).

Tabla 13. Factores y niveles del diseño experimental para la optimización de la EAIR en el rendimiento de lípidos totales en *S. Obliquus*.

Variables	Rangos y niveles		
	-1	0	+1
Tiempo	20	35	50
Relación (m/v)	50	100	150
Proporción de disolventes	0.5	0.875	1.25

El modelo se ajustó a una ecuación polinomial de segundo orden según la ecuación 4:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{ec. 4}$$

Donde X_1, X_2, \dots, X_k son las variables independientes codificadas que influyen en la respuesta de Y ; $\beta_0, \beta_i (i = 1, 2, \dots, k), \beta_{ii} (i = 1, 2, \dots, k)$ and $\beta_{ij} (i = 1, 2, \dots, k)$, son los coeficientes de regresión para los términos de intercepción, lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente; k es el número de variables.

La calidad del ajuste del modelo se evaluó mediante los coeficientes de determinación (R^2) y por un ANOVA. Se construyeron gráficos de superficies de respuesta y de contorno utilizando la ecuación polinómica cuadrática ajustada.

6.8 Extracción de lípidos

6.8.1 Métodos de extracción de Folch y de Bligh-Dyer

En tubos Falcon de 50 mL, se pesaron (por separado) 0.2 g en peso seco de biomasa de *S. obliquus* y se adicionaron 10 mL de una mezcla de cloroformo (CHCl_3):metanol (MeOH) en proporción 2:1 v/v (Folch, 1957) y, una mezcla de CHCl_3 :MeOH:H₂O destilada en proporción 2:2:1.8 v/v/v (Bligh-Dyer, 1959). Los tubos se agitaron en vórtex por 10 min. Las fases acuosas y orgánicas se apartaron en embudos de separación. Las fases orgánicas se evaporaron a 40 °C bajo presión reducida en rotavapor.

6.8.2 Método de extracción Soxhlet

Se agregaron 0.2 g de biomasa liofilizada de microalga a un cartucho de celulosa, esta se colocó dentro de la cámara de extracción del equipo Soxhlet. Los lípidos se extrajeron por 3 horas a reflujo (1 gotas por segundo) con 150 mL de la mezcla de solventes de acuerdo a la Tabla 12.

6.8.3 Extracción asistida por irradiación infrarroja

Se agregaron 0.20 ± 0.001 g de biomasa liofilizada de *S. obliquus* a un matraz de fondo redondo de 250 mL acoplado a un condensador, con 10 mL (masa/volumen disolvente 1:50) de la mezcla de solventes como: acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (CH_2Cl_2), etanol (EtOH), Hexano (Hex), isopropanol (isPrOH) y MeOH (Tabla 12). Los lípidos se extrajeron bajo irradiación infrarroja con una lámpara de 250 W colocada a 2 cm de distancia de la solución por 10 min (Figura 11).

Tabla 14. Mezcla de disolventes a diferentes proporciones para extracción de lípidos

Método	Disolventes			Tiempo (min)	
	Mezcla	Proporción			
Folch	$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$	2:1		10	
Bligh y Dyer	$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$	2:2:1.8			
Soxhlet	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$	1:2	2:1	3:2	180
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$	1:2	2:1	3:2	
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{isPrOH}$	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:MeOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:EtOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:isPrOH	1:2	2:1	3:2	
EAIR	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$	1:2	2:1	3:2	10
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$	1:2	2:1	3:2	
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{isPrOH}$	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:MeOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:EtOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:isPrOH	1:2	2:1	3:2	

La cantidad de aceite extraído se determinó gravimétricamente midiendo el peso del residuo. El rendimiento de extracción (% p/p) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (5):

$$\text{Rendimiento de extracción de aceite} = \frac{\text{Peso del aceite extraído (g)}}{\text{Peso biomasa liofilizada (g)}} (100) \quad \text{ec. 5}$$

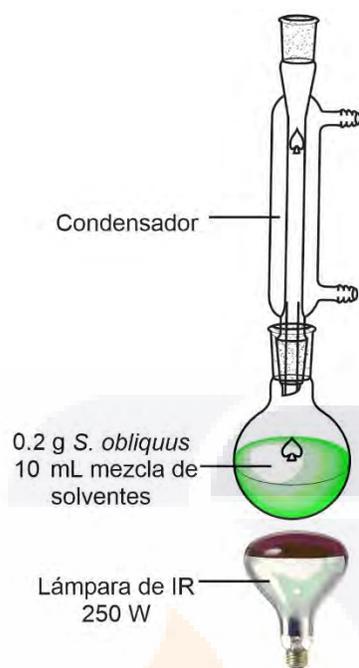


Figura 11. Equipo para la extracción de lípidos asistida con irradiación infrarroja.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cultivo y tasa de crecimiento de *S. obliquus*

Se realizó la evaluación de la tasa de crecimiento de *S. obliquus* en medio MMB, y se determinó el día en el cual inició la fase estacionaria temprana. Esta determinación se hizo por medio de una cinética de crecimiento. En la figura 12, se observan imágenes de los biorreactores con el cultivo de *S. obliquus* por triplicado.



Figura 12. Cultivos de *S. obliquus* en medio MMB.

La cinética de crecimiento obtenida se muestra en la figura 13. Los resultados indican una fase de exponencial del día 2 al 13. En el día 15 se muestra el inicio de la fase estacionaria. El número de células en este día fue de 13.86×10^6 cél. mL⁻¹.

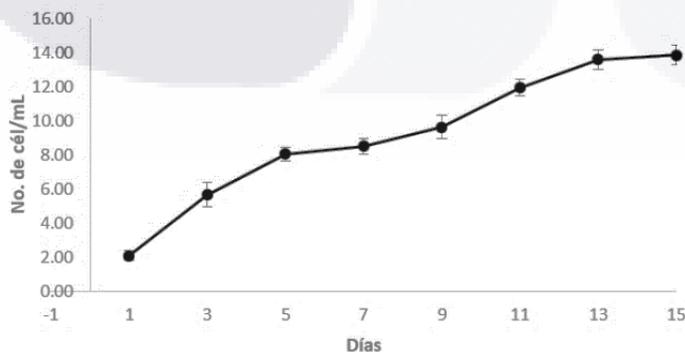


Figura 13. Cinética de crecimiento de *S. obliquus*. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n=3$).

La biomasa producida para estos cultivos con un volumen de 800 mL de medio fue de 0.81 g L⁻¹. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores, en donde obtuvieron cantidades desde 0.63-4.92 g L⁻¹ (Tabla 15). La intensidad de la luz, indispensable para la fotosíntesis, la temperatura requerida para que las algas se desarrollen, el medio de cultivo (nutrientes) y la composición del agua (incluyendo la salinidad), el pH entre 7-9, la aireación/requerimientos de CO₂, y los ciclos de luz/oscuridad, son los factores más importantes que determinan la tasa de crecimiento en microalgas. La manipulación de uno o varios de estos factores, han mejorado la tasa de crecimiento, cantidad de biomasa y de metabolitos en diversas especies de microalgas (Xin et al., 2011; Ramanna et al., 2017).

Tabla 15. Cantidad de biomasa de *Scenedesmus* en otros estudios.

Biomasa (g L ⁻¹)	Cosecha (d)	Fotoperiodo (h) (L/O)	Intensidad luz (μmol/m ² s)	T (°C)	CO ₂ (%)	Referencia
1.15	17	14/10	143	20 ± 1	4.0	Álvarez-Díaz (2015)
1.68-4.92	8	24/0	200	25	98/2 aire/CO ₂	Feng et al. (2014)
2.0-8.0	8	24/0	200-1500	20-35	Suficiente	Breuer et al. (2013)
0.63-1.80	13	12/12	-	30 ± 1	5	Welter et al. (2013)
0.81	15	16/8	76	22 ± 2	0.04	Este estudio

Aunque las condiciones de cultivo son muy diferentes entre cada estudio, nuestros resultados, generaron una cantidad considerable de biomasa (0.81 g L⁻¹), sin utilizar ningún tipo de estímulo o condiciones especiales. En comparación con Álvarez-Díaz et al. (2015), ellos utilizaron aguas residuales bajo diferentes condiciones luz, y varias concentraciones de CO₂ y salinidad, ellos lograron una producción máxima de biomasa de 1.15 g L⁻¹. Otro ejemplo es el de Welter et al. (2013), en dónde evaluaron las condiciones nutrimentales mínimas para el desarrollo de *S. dimorphus* y lograron disminuir las cantidades de metales traza, vitaminas, nitratos, cloruros y fosfatos sin aparente afectación en la biomasa de la microalga.

En nuestro caso, utilizamos las condiciones nutrimentales estándar de cultivo, sólo como un parámetro de referencia para observar el comportamiento de *S. obliquus* y

determinar la tasa de crecimiento y la fase estacionaria temprana para posteriores experimentos.

7.2 Reacción de la sulfofosfovainillina: curva de calibración para determinar lípidos totales

La cuantificación de lípidos totales en *S. obliquus* se llevó a cabo por el método de la sulfofosfovainillina (SFV) con algunas modificaciones (Park et al., 2016). Primero, se obtuvo una curva de calibración al preparar una solución madre de aceite de canola comercial en cloroformo a una concentración de 1 mg/mL; a partir de esta solución, se hicieron las diluciones correspondientes para obtener las siguientes concentraciones (μg) de aceite: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 160 y 200. (Figura 14).



Figura 14. Reacción con la SFV. Color desarrollado en la curva de calibración con 5-200 μg de aceite de canola.

La figura 15, muestra un ajuste lineal con una R^2 de 0.9968, para la determinación de lípidos en aceite de canola.

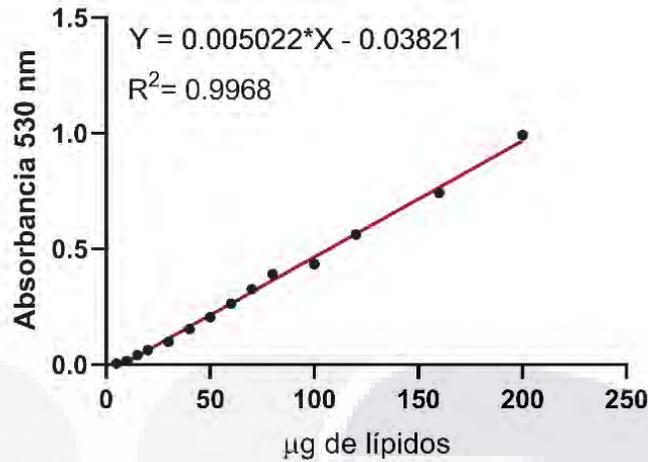


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de lípidos en aceite de canola ($n=2$).

También se realizó una curva de calibración para poder valorar la cantidad de lípidos, en un volumen de cultivo dado, por mg de biomasa seca de *S. obliquus*, se realizó una curva de calibración de cantidad de biomasa en peso seco contra densidad óptica a 750 nm (DO_{750}). Mediante un análisis múltiple de datos se obtuvieron los resultados de la curva de calibración de biomasa de *S. obliquus* contra $D.O._{750}$ (Figura 16).

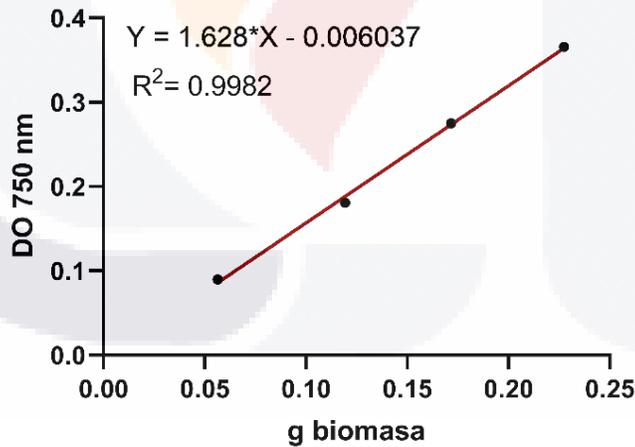


Figura 16. Curva de calibración de la biomasa en peso seco de *S. obliquus* contra la $D.O._{750}$ ($n=2$).

Éste gráfico se utilizó para encontrar la cantidad de biomasa seca en cualquier volumen de cultivo de microalga, con cierto valor de DO_{750} . Los datos anteriores nos permitieron establecer el porcentaje de lípidos totales en las muestras de *S. obliquus*.

Actualmente, los métodos de detección más utilizados para la determinación de los lípidos en microalgas incluyen métodos gravimétricos, cromatografía de gases y tinción fluorescente lipofílica para espectrofotometría cuantitativa. El método gravimétrico para la determinación del contenido de lípidos consiste en la extracción asistida por disolventes, generalmente con disolventes orgánicos o clorados como hexano o cloroformo de una cantidad conocida de biomasa seca. El peso exacto del extracto lipídico se toma después de la evaporación del disolvente de extracción con el fin de obtener el porcentaje de lípidos. Las principales desventajas del método gravimétrico es que necesita una cantidad relativamente grande de muestra y requiere de procesos de extracción y secado, los cuales consumen tiempo y energía (Chen et al., 2018). Otros métodos como la cromatografía de gases (CG) o la cromatografía líquida de alta presión (CLAP), requieren menos cantidad de muestra en comparación con los métodos gravimétricos y pueden proporcionarnos datos precisos sobre la composición de los lípidos. Sin embargo, se requiere de una preparación exhaustiva de la muestra, se debe prevenir la oxidación de los lípidos y, se debe asegurar una conversión de los lípidos (derivatización) mayor al 90% (Tang et al., 2013). Este proceso, además de clorofila extrae lípidos neutros, lo que puede resultar en una sobre cuantificación de los lípidos totales. La aplicación de la reacción SFV para la detección lípidos en microalgas, provee grandes ventajas sobre las técnicas mencionadas. Este método requiere de una pequeña cantidad de biomasa en los órdenes de miligramos o menos, no requiere pasos de secado y extracción, además, es mucho más simple y rápida en comparación con cualquier otra técnica existente (Anschau et al., 2017).

7.3 Determinación de lípidos totales en *S. obliquus*.

Primero, se determinó la biomasa en las muestras de los cultivos control (Tabla 16). Para esto, se leyó la D.O.₇₅₀ cada 48 h en los cultivos y se interpolaron los datos correspondientes con la curva de calibración (Figura 16) mostrada en la sección anterior.

Tabla 16. Producción de biomasa de *S. obliquus* control en MBB

Día	D.O. ₇₅₀	Biomasa (g/L)
1	0.2005	0.13
3	0.28	0.18
5	0.47	0.29
7	0.561	0.44

9	0.735	0.56
11	1.0815	0.67
13	1.22	0.78
15	1.475	0.81

El porcentaje de lípidos totales en los cultivos controles se muestra en la tabla 17. En el día 13, se obtuvo el porcentaje máximo de lípidos producidos con un 15.92% de rendimiento. Bajo distintas condiciones de cultivo (nutrientes, ciclos de luz, intensidad de luz, estrés abiótico, estímulos etc.), se han reportado porcentajes desde 11% hasta 55% de rendimiento en lípidos totales en *Scenedesmus obliquus* (Mata et al., 2010). Nuestros resultados están por encima del porcentaje mínimo reportado, y por debajo del máximo, esto es debido a que en estos ensayos no se utilizó ningún tipo de estrés o estímulo en los cultivos.

Tabla 17. Por ciento de rendimiento de lípidos totales en cultivos control de *S. obliquus*.

Día	Biomasa (g L ⁻¹)	Lípidos Totales (%)
1	0.13	4.69
3	0.18	5.15
5	0.29	6.47
7	0.44	13.33
9	0.56	14.17
11	0.67	15.10
13	0.78	15.92
15	0.81	15.66

7.4 Determinación de las concentraciones de BAP y AG para mejorar la tasa de crecimiento, biomasa y la producción de lípidos en *S. obliquus*

7.4.1 Bencilaminopurina

Recientemente, las fitohormonas han sido aplicadas en microalgas para aumentar el crecimiento y la producción de metabolitos (Yu et al., 2015). Sin embargo, los efectos bioquímicos de las fitohormonas en diversas especies de microalgas aún no están bien establecidos. En este trabajo, se aplicaron diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M) de BAP a cultivos de *S. obliquus* con el fin de conocer cuál de éstas genera una mayor cantidad de biomasa y de lípidos. En la figura 17A, el número de células en los cultivos con BAP fue similar en las cuatro concentraciones durante los primeros cinco días. A partir del séptimo y hasta el quinceavo día, la concentración de 10^{-5} M tuvo el

mayor número de células con 20.08×10^6 cél mL⁻¹ lo que equivale a 1.44 veces más que el control

BAP ha sido poco utilizado como regulador de crecimiento en microorganismos, sin embargo, en un reporte en el cuál estudiaron el efecto de BAP sobre la producción de carotenos en *Chlorella pyrenoidosa* sp., se demostró que a mayor concentración de BAP y con 20 días de cultivo, causó un aumento en el crecimiento de la microalga de 1.85-1.90 veces en comparación con el control. Las concentraciones utilizadas fueron de 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M y 1×10^{-5} M, siendo la primera la que obtuvo los mejores resultados (Czerpack et al., 1997). Esto es congruente con nuestros resultados ya que conforme se aumentó la concentración de BAP, el número de células de *S. obliquus* también se aumentó, siendo la concentración de 1×10^{-5} M la que produjo mejores resultados (Figura 17A). Además, la productividad de biomasa también fue significativamente más alta a 10^{-5} M, con $73.52 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figura 17C). La cantidad de lípidos totales en *S. obliquus* se midió como % de peso seco (PS) de biomasa.

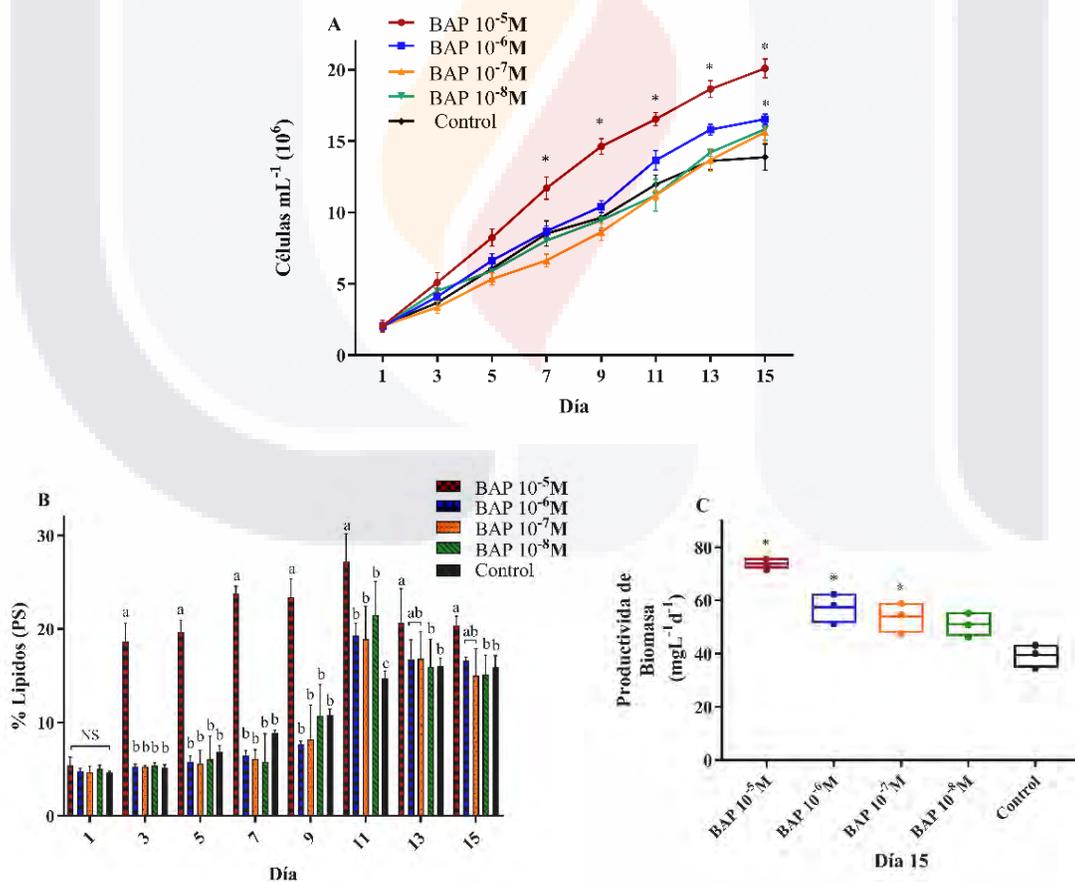


Figura 17. Tasa de crecimiento (A), porcentaje de lípidos en biomasa (PS) (B), y productividad de la biomasa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) (C), en cultivos de *S. obliquus* estimulados por BAP a diferentes concentraciones: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$). La prueba de comparación múltiple de Tukey se utilizó cuando el ANOVA detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada condición. Los datos con letras diferentes son significativamente diferentes. NS = datos no significativos.

BAP pertenece al grupo de las citoquininas, por lo que estos incrementos en contraste con los del control, se deben a que induce división celular, estimula los procesos de crecimiento y aumenta la actividad fotosintética (Romanenko et al., 2016).

Se desconoce el mecanismo por el cual las citoquininas regulan el ciclo celular en microalgas. Sin embargo, diversos procesos metabólicos son similares en plantas y microalgas. El efecto de las CQs en las plantas es regular la transición G1/S mediante la actividad de la CDKA y por asociación con ciclinas de tipo D (CYCD). El complejo CDKA/CYCD favorece la entrada en la fase S mediante la fosforilación de la proteína RBR, lo que neutraliza su inhibición por los factores de transcripción E2F (Figura 18). Las citoquininas inducen la expresión de los tres genes CYCD3 haciendo entrar a la célula en fase de crecimiento G1 (Schaller et al., 2014), y en consecuencia existe un estímulo en la división celular.

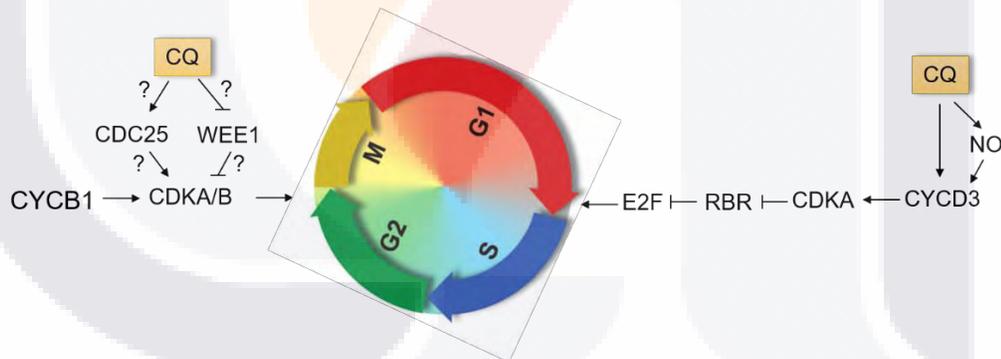


Figura 18. Activación del ciclo celular mitótico por acción de citoquininas. Descripción de dos mecanismos potenciales para la activación del ciclo celular mediado por citoquininas en G1/S y G2/M. CQ: citoquininas, CDC: ciclinas dependientes de quinasas, WEE1: quinasa nuclear perteneciente a la familia Ser/Treo, sus iniciales provienen de Western Equine Encephalitis, CYCB1: ciclina-*beta*-1, es una quinasa dependiente de ciclinas con actividad reguladora en proteínas Ser/Treo, CDKA/B: ciclinas dependientes de quinasas A o B, NO: óxido nítrico, CYCD3: ciclina-*delta*-3, ICK/KRP: inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas/proteínas relacionadas a proteínas Kip, RBR: proteínas relacionadas a proteínas del retinoblastoma, E2F: factor de transcripción para regular el progreso del ciclo celular. Adaptada de *Cytokinin and the cell cycle*, Schaller et al. (2014).

Por otro lado, concentraciones de BAP ligeramente superiores a las que nosotros utilizamos (10^{-5} M), han mostrado resultados prometedores; por ejemplo, en *C. pyrenoidosa* 4 mg L^{-1} (1.77×10^{-5} M) de BAP incrementaron la cantidad de biomasa y produjeron un aumento en 3.03 veces de ácido α -linoleico, en comparación con el control (Kokkiligadda et al., 2017). En *C. vulgaris*, Lin et al. (2018) evaluaron el efecto de BAP ($2-10 \text{ mg L}^{-1}$) en la biomasa y la producción de ácido alfa-linolénico. Ellos reportaron una concentración óptima de 4 mg L^{-1} (1.77×10^{-5} M), con un aumento de la biomasa en 1.26 veces. En *Botryococcus braunii*, 5.0 mg L^{-1} (2.21×10^{-5} M) de BAP, produjeron la mayor cantidad de biomasa.

Sin embargo, se ha informado que altas concentraciones de BAP son perjudiciales para las células vegetales. Por ejemplo, la aplicación de BAP (0.5 mg L^{-1} , 1.5 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} , 3.7 mg L^{-1} , 6.8 mg L^{-1} , 8.7 mg L^{-1} , 9.4 mg L^{-1}) en *Grand naine* (*Musa* sp.) mostró que el número de formación de brotes en los cultivos durante el proceso aumentó. No obstante, la mayor concentración de BAP aumentó simultáneamente la formación de brotes anormales (Reddy et al., 2014). Además, altas concentraciones de citoquininas han inducido una muerte celular programada tanto en animales como en plantas (Carimi et al., 2003; Vescovi et al., 2012).

En la Figura 17B, la concentración de BAP que más favoreció la producción de lípidos fue de 10^{-5} M. Es muy interesante que, en el quinto día, el contenido de lípidos aumentó en 2.8 veces más respecto al control. A esta concentración de BAP, se obtuvo el porcentaje más alto de lípidos con 27% (PS), mientras que en el control fue de 16% (PS).

Yu et al (2016) realizaron un estudio metabolómico en *Aurantiochytrium* sp. bajo un tratamiento con BAP (1.33×10^{-5} M o 3 mg mL^{-1} , concentración óptima). Al evaluar 71 metabolitos, el 76.9% de la variación de estos metabolitos estaba ligada al efecto de la fitohormona. Los metabolitos que respondieron a BAP fueron: ácidos grasos (C14:0, C18:0, C18:1, C20:4), aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, alcoholes, el escualeno, colesterol, entre otros. Este análisis mostró que BAP estimula el flujo metabólico del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT), de la vía del mevalonato y del metabolismo del glicerol, hacia la síntesis de ácidos grasos.

En un estudio similar, se aplicaron dosis de 0.01, 0.1, 1.0 y 10 mg L^{-1} de BAP en *Scenedesmus* sp. LX1. La dosis óptima que generó mayores tasas de crecimiento y producción de metil ésteres de ácidos grasos (MEAG), fue la de 0.1 mg L^{-1} (4.44×10^{-7} M),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con un incremento de lípidos de 20.7% a 25.4% (Dao et al., 2019). En nuestros resultados, la suplementación de BAP 10^{-5} M, incrementó el porcentaje de lípidos de 16% hasta un 27%. Mientras que Dao et al. (2019) obtuvieron los mejores resultados con las dosis más bajas de BAP, mientras que la dosis más alta de BAP (10 mg L^{-1} o 4.4×10^{-5} M), inhibió la división celular de la microalga. Esto es opuesto a nuestros resultados y a otros reportados, donde la mayor dosis de BAP, propició un mayor estímulo. Adicionalmente, este reporte señala que BAP aumentó la velocidad de captación de N y P en *Scenedesmus sp* LX1 e incrementó la actividad de la deshidrogenasa, lo que se traduce en mayor actividad sintética y metabólica, mayor acumulación de ATP y, por lo tanto, en un crecimiento celular y producción de metabolitos aumentados.

7.4.2 Ácido giberélico

Se conocen 20 isoformas de GAs en diversas especies de microalgas, entre ellas está el ácido giberélico, sus efectos fisiológicos son similares a los ejercidos en las plantas, es por esto que al aplicar de manera exógena esta hormona, se han inducido el crecimiento y división celular, e incrementado la biomasa y los pigmentos fotosintéticos (Romanenko 2016).

En *S. obliquus*, la concentración de AG 10^{-6} M, fue la que indujo el mayor crecimiento celular con 16.44×10^6 células mL^{-1} , mejorando la densidad celular en 1.35 veces más que el control (12.15×10^6 células mL^{-1}) (Figura 19A). Todos los tratamientos de AG (de 10^{-5} a 10^{-8} M) modificaron ligeramente la acumulación de lípidos y la productividad de biomasa en los cultivos de *S. obliquus* al final del experimento (Figuras. 19B y 19C). En el último día del experimento, AG 10^{-6} M produjo el mayor rendimiento de lípidos en biomasa (PS) con 17.8%, en comparación con el control con 16% PS (Figura 19B). AG 10^{-6} M también incrementó la productividad de biomasa a $59.88 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figura 19C). Nuestros resultados son consistentes con los de Du et al. (2017) en los que, también observaron un aumento en la cantidad de biomasa en cultivos de *C. pyrenoidosa* estimulados con AG. Ellos probaron diversas concentraciones desde 0.1 mg L^{-1} (4.44×10^{-7} M) hasta 20 mg L^{-1} (8.87×10^{-5} M), esta última generó la mayor tasa de crecimiento, mientras que 5 mg L^{-1} (2.22×10^{-5} M), la mayor productividad de lípidos. En otro estudios, la suplementación de AG (10^{-7} - 10^{-6} M) incrementó el número de células y los pigmentos fotosintéticos en condiciones de estrés por metales pesados como cadmio y plomo (Falkowska et al., 2011). Sivaramakrishnan et al. (2020) reportaron que 1 mM de AG,

produjo la mayor tasa de crecimiento ($0.274 \pm 0.23 \text{ d}^{-1}$) en *Chorella* sp., sin embargo, no se observaron cambios significativos en la composición de los ácidos grasos.

A diferencia de BAP que incrementó el contenido lipídico en *S. obliquus*, AG no mostró una diferencia significativa en la acumulación de lípidos (Figura 19B). Este comportamiento fue observado también en *C. reinhardtii* (Park et al., 2013), en donde la dosis óptima de 1 mg L^{-1} ($4.44 \times 10^{-6} \text{ M}$) mostró un aumento del 68% en la biomasa, sin embargo, no se presentaron cambios en los MEAG. En *Chlorella vulgaris* (Jusoh et al., 2018) AG ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) incrementó la densidad celular en 42%, aunque este aumento no se vio reflejado en la producción de lípidos totales.

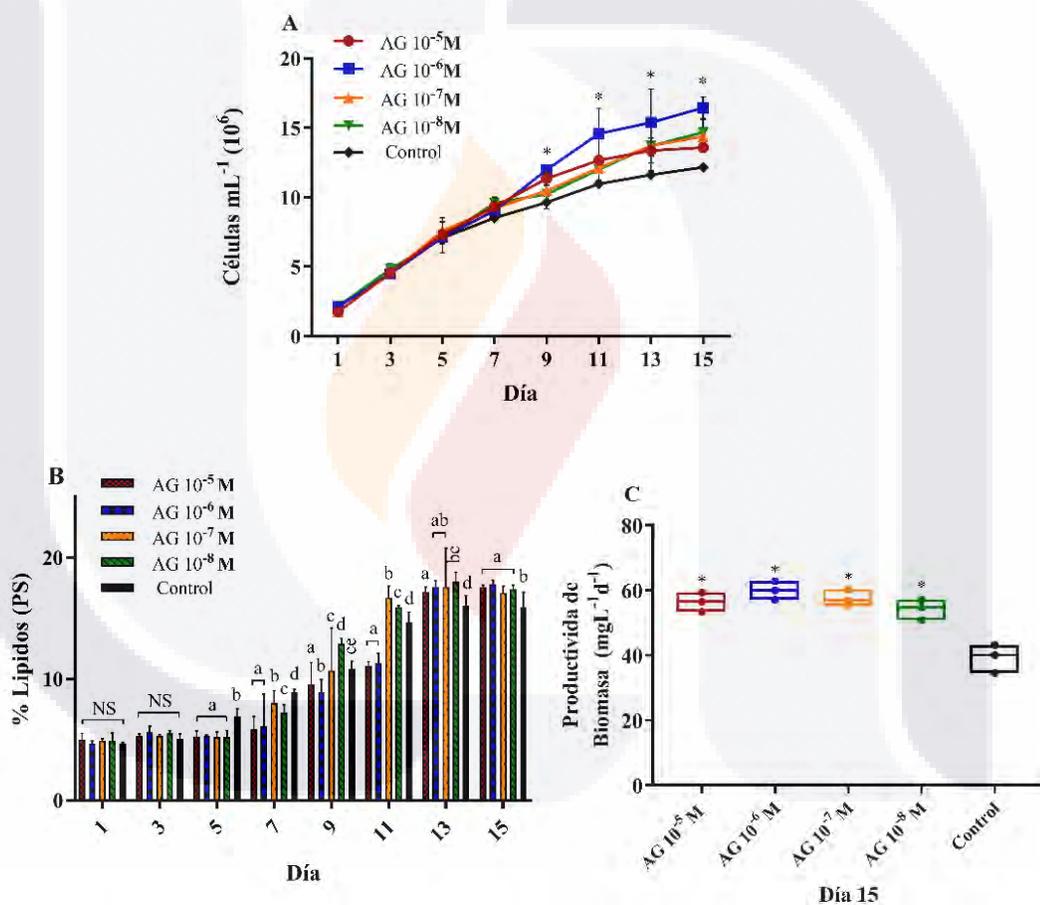


Figura 19. Tasa de crecimiento (A), porcentaje de lípidos en biomasa (PS) (B), y productividad de la biomasa ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (C) en cultivos de *S. obliquus* estimulados por AG a diferentes concentraciones: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M . Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$). La prueba de comparación múltiple de Tukey se utilizó cuando el ANOVA detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada condición. Los datos con letras diferentes son significativamente diferentes. NS= datos no significativos.

El AG tiene diversas aplicaciones en el sector agroindustrial por su polifuncional actividad ya que induce el crecimiento de plantas, estimula la germinación de semillas, interviene en la elongación celular y responde al estrés abiótico (Camara et al., 2018). Debido a la presencia de un complejo sistema de regulación homeostática en la señalización de AG, aún no se elucida completamente la función de los factores que intervienen en respuesta a esta hormona. Recientemente se encontró que la suplementación de AG promueve la orientación transversal de los microtúbulos, produciendo un crecimiento celular anisotrópico (Shibaoka 1993).

En microalgas, se ha encontrado que AG favorece la captación de nitrógeno y la capacidad de utilizar los carbohidratos (Pan et al., 2008), e incrementa el crecimiento y la acumulación de lípidos al aumentar la actividad de la esterasa y al regular la distribución intracelular de carbono (Du et al., 2015).

7.5 Efecto de BAP y AG en la densidad celular, la biomasa y la producción de lípidos en *S. obliquus* en condiciones de limitación de N

La deficiencia de N es la estrategia más utilizada para inducir una mayor acumulación de lípidos neutros en microalgas, ya que estimula la hidrólisis de fosfolípidos, aumenta la fracción intracelular de ácidos grasos de la acil- coenzima-A (acil-CoA) y activa la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), que a su vez cataliza la conversión de la acil-CoA a triacilglicerol (Xin et al., 2010). Sin embargo, simultáneamente se induce una rápida biodegradación de proteínas y una drástica disminución del crecimiento celular y productividad de biomasa (Juneja et al., 2013).

Se utilizó la concentración de 10^{-5} M para BAP y 10^{-6} M para GA, dónde se evaluó su efecto en la densidad celular bajo diferentes porcentajes de N: N-100, N-50, N-25 y N-0 para incrementar la acumulación de lípidos. La aplicación de fitohormonas en cultivos de microalgas N-limitados ha dado buenos resultados para obtener altas productividades de lípidos y biomasa (Babu et al., 2017; Mandal et al., 2019). Los cultivos de *S. obliquus* adicionados con BAP y GA tuvieron la capacidad de incrementar la densidad celular respecto a los cultivos N-reducidos sin estímulo. En los cultivos con BAP N-0 y GA N-0 se incrementó el número de células de 6.91×10^6 células mL^{-1} y de 5.19×10^6 células mL^{-1} , respectivamente, lo que equivale a dos veces comparado con los cultivos N-0 sin estímulos. La productividad de biomasa se incrementó hasta 1.8 veces más que el control en BAP N-100 con $76.16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y en BAP N-50 con $73.53 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Para los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tratamientos con AG, todas las productividades de biomasa también fueron superiores a los no estimulados. La mayor diferencia en productividad de biomasa se observó con GA-N0 que fue de $32.00 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (1.48 veces más que el control). Existe evidencia de que las citoquininas confieren una mayor resistencia al estrés abiótico en plantas, promueven la fotosíntesis, estimulan la síntesis de proteínas en cloroplastos, y regulan el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Xiaotao et al., 2013, Wu et al., 2014). Y en cuanto a las giberelinas, han mostrado que reducen considerablemente la fase de lag de crecimiento y estimulan la división celular en la fase exponencial de crecimiento de las microalgas (Park et al., 2013), además en *C. vulgaris* activaron las respuestas de defensa y disminuyeron los daños oxidativos (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012).

La producción de lípidos se vio alterada principalmente debido al estrés generado por la deficiencia de N (Figuras 20C y 21C), sin embargo, se detectó un efecto positivo sobre la acumulación de lípidos por acción de estas fitohormonas. BAP N-0 produjo el mayor rendimiento de lípidos con 55% (PS), mientras que para GA N-0 fue de 50%. Al tercer día del tratamiento con BAP N-0, se observó un incremento significativo en la producción de lípidos de 1.4-1.8 veces más, en comparación con los otros ensayos BAP, y un incremento de 6 veces (53.9% de rendimiento de lípidos PS) en comparación con N-100 para el día 7. Este comportamiento es consistente con los resultados obtenidos Yu et al. (2019). Ellos lograron incrementar la cantidad de lípidos hasta 55.3% en *Aurantiochytrium* sp. inducida por BAP (6 mg L^{-1}) y atribuyen este resultado a que BAP interviene en diversos procesos metabólicos como: síntesis de ácidos grasos, metabolismo del carbono, factores de transcripción, transducción de señales y en la vía del mevalonato.

Aunado a lo anterior, el incremento de lípidos en ausencia/limitación de N se ha adjudicado a una redistribución del carbono de la biosíntesis de carbohidratos a la síntesis de lípidos (Zhao et al., 2018) y a un aumento en la actividad de la ATP sintetasa, de la calmodulina y del flujo cíclico de electrones en el fotosistema I (Chen et al., 2015).

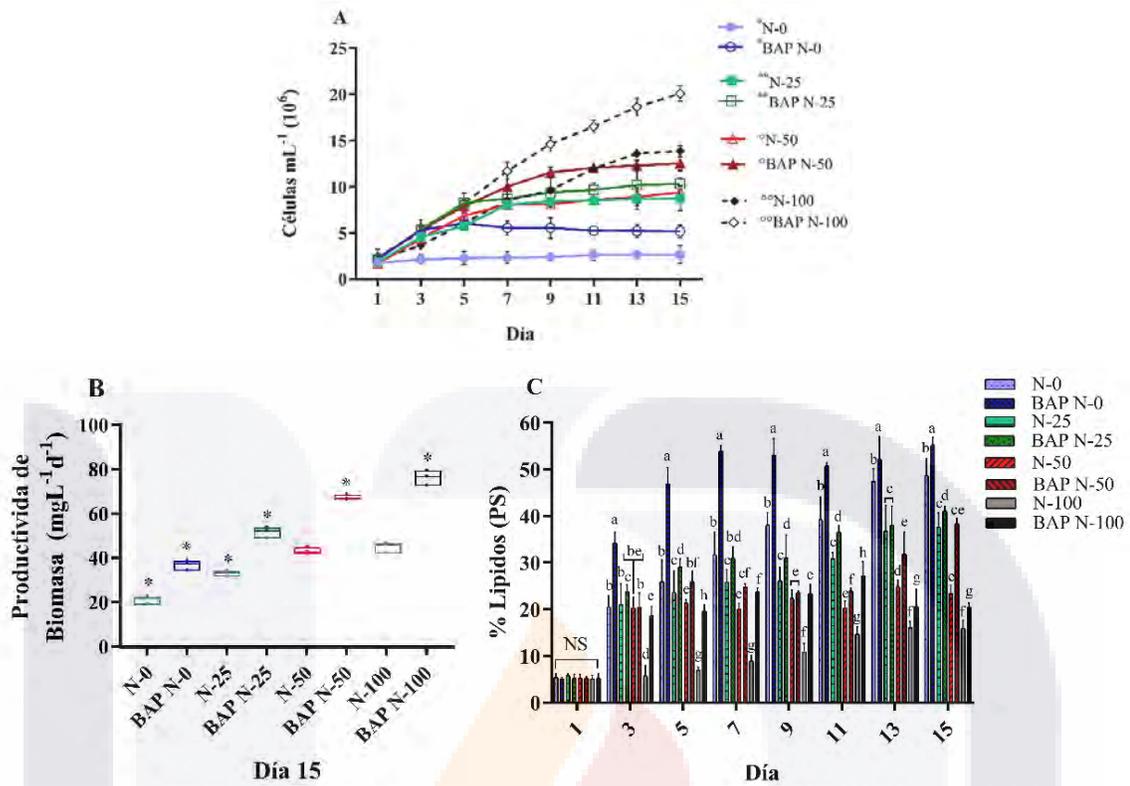


Figura 20. Tasa de crecimiento (A), productividad de la biomasa (mg L⁻¹ d⁻¹) (B), y porcentaje de lípidos en biomasa (PS) (C) de *S. obliquus*. Cada gráfico muestra el estímulo de BAP 10⁻⁵ M en *S. obliquus* a diferentes porcentajes de N: 0% (BAP N-0), 25% (BAP N-25), 50% (BAP N-50), 100% (BAP N-100), y sin estímulo de BAP 10⁻⁵ M a diferentes porcentajes de N: 0% (N-0), 25% (N-25), 50% (N-50), 100% (N-100). En la figura A, *, **, °, y °°, indican las diferencias significativas en cada par, desde el tercer al decimoquinto día. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). En la figura B, * indica las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) respecto al control. La prueba de comparación múltiple de Tukey se utilizó cuando el ANOVA detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada condición. Los datos con letras diferentes son significativamente diferentes NS= datos no significativos.

Debido a la falta de N, las células se ven forzadas a tomar el N de la clorofila y proteínas para continuar con la fabricación de enzimas esenciales con el fin de mantener el metabolismo celular. Los TAGs y otros lípidos se ven aumentados bajo estas circunstancias, más debido a una regeneración de la membrana celular que a un incremento en la actividad en la síntesis de *novoo* de ácidos grasos. El CAT interviene para tratar de restaurar la deficiencia metabólica manteniendo el nivel de NADPH y ATP, esenciales para la síntesis de ácidos grasos (Nagappan et al., 2020).

Los tratamientos con AG N-reducido (N-0, N-25 y N-50), no mostraron diferencias significativas en el rendimiento de lípidos comparados con los N-reducidos sin estímulo

(Figura 21C). Esto probablemente se deba a que el flujo de carbono se dirige principalmente hacia la síntesis de carbohidratos a manera de mantener el crecimiento celular ante la deficiencia de N (Ikaran et al., 2015). En el punto final experimental (día 15), los cultivos de *S. obliquus* N-100 y sin estímulo de fitohormonas, produjeron un máximo de 16% de rendimiento lipídico. BAP N-0 y AG N-0 superaron estos resultados en 3.4 y 3.1 veces más, respectivamente.

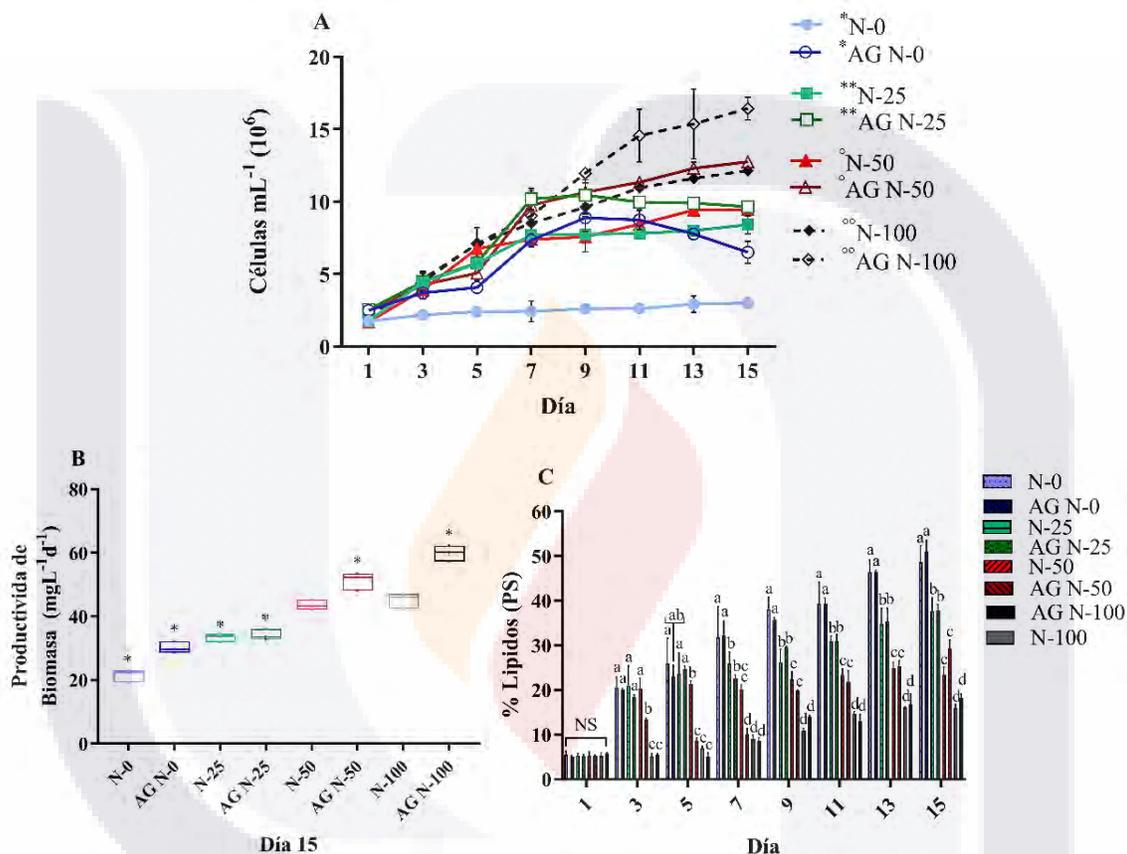


Figura 21. Tasa de crecimiento (A), productividad de la biomasa (mg L⁻¹ d⁻¹) (B), y porcentaje de lípidos (PS) (C) de *S. obliquus*. Cada gráfico muestra el estímulo de AG 10⁻⁶ M en *S. obliquus* a diferentes porcentajes de N: 0% (AG N-0), 25% (AG N-25), 50% (AG N-50), 100% (AG N-100), y sin estímulo de AG 10⁻⁶ M a diferentes porcentajes de N: 0% (N-0), 25% (N-25), 50% (N-50), 100% (N-100). En la figura A, los símbolos *, **, °, y °°, indican las diferencias significativas en cada par, desde el tercer al decimoquinto día. Las barras indican la desviación estándar de la media (n = 3). En la figura B, * indica las diferencias significativas ANOVA (p < 0.05) respecto al control. La prueba de comparación múltiple de Tukey se utilizó cuando el ANOVA detectó diferencias significativas (p < 0.05) entre cada condición. Los datos con letras diferentes son significativamente diferentes NS= datos no significativos.

Un probable mecanismo para la regulación del estrés y biosíntesis de lípidos involucra respuestas celulares como una sobreexpresión de la ribulosa 1,5 bifosfato

carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), un aumento de la eficiencia fotosintética y de clorofila, una producción elevada de antioxidasas y antioxidantes (Zhao et al., 2019), y una mayor actividad de enzimas involucradas en la absorción de nitrógeno (Pan et al., 2008, Aftab et al., 2011).

7.6 Efecto de BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M bajo condiciones de limitación de N en el perfil de ácidos grasos de *S. obliquus*

El perfil de los MEAGs de *S. obliquus* inducido por BAP y AG en condiciones de limitación de N se muestra en la tabla 18. El ácido graso con mayor presencia fue C18:1 (41.12%) en BAP N-0, y en BAP N-100, el ácido palmítico (C16:0) fue el más alto (22.58%). BAP N-0, tuvo un impacto considerable en la cantidad de los AGMI, por ejemplo, en el ácido oleico (C18:1) tuvo un 19% de incremento, además de un decremento de hasta 15% en los AGS y 5% en los AGPI. Esto tiene relevancia debido a que altos porcentajes de ácido oleico y menores cantidades de AGPI, aumentan la estabilidad oxidativa del biodiesel y reducen significativamente la producción óxidos de nitrógeno (NOx) (Tat et al., 2007). En concordancia con nuestros resultados, Breuer et al. (2013) demostraron que hubo un incremento en C18:1 al someter a *S. obliquus* a una ausencia total de N. Y recientemente, se reportó que la suplementación de BAP en *Scenedesmus* sp. LX1 causó un aumento en los AGMI y, conforme la dosis de BAP se incrementó, los AGPI disminuyeron (Dao et al., 2019). En nuestros resultados, la presencia de BAP modificó ligeramente la composición de AGS. De manera general, la suplementación de BAP y el mayor grado de N-estrés aumentaron los AGMI y disminuyeron los porcentajes de AGPI. BAP N-50 y N-25 incrementaron el contenido de AGS, como el ácido palmítico C16:0, y en menor proporción el ácido esteárico C18:0, respectivamente.

En los experimentos de AG N-0, C18:1 fue el ácido graso predominante con 39.21%, y en el AG N-100, el mayor aumento fue para el ácido palmítico (C16:0) con 37.31%. Los estímulos de AG junto con un mayor estrés por deficiencia de N en *S. obliquus*, condujeron a una disminución de los AGPI en comparación con el control. Además, redujeron los valores de AGS y aumentaron los de AGMI de una manera dependiente de la deficiencia de N. Resultados similares fueron obtenidos por Jusoh et al. (2018). Además, la abundancia relativa de los AGS en *S. obliquus* bajo deficiencia de N, disminuyó conforme el estrés nutritivo se fue incrementando, mientras que la

composición de AGMI se enriqueció a mayor deficiencia de N. Estos datos concuerdan con los de Zhao et al. (2018) en *Monoraphidium* sp. y Renuka et al. (2018) en *Acutodesmus obliquus*. Un aceite con una proporción alta de AGMI y AGS es crítica para mejorar la calidad del biodiesel, ya que propiedades como la viscosidad, número de cetano y el índice de iodo se mejoran (Hoekman et al., 2012). Los resultados observados nos sugieren que es posible utilizar BAP o GA para inducir selectivamente el enriquecimiento en AGS o AGMI del aceite de *S. obliquus*.

Tabla 18. Perfil de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos totales) de *S. obliquus* bajo estímulo de fitohormonas y en condiciones de N-limitado.

Ácidos grasos	Control (% N)				BAP (% N)				AG (% N)			
	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
C14:0	0.2 ± 0.02 ^a	0.4 ± 0.52 ^a	0.27 ± 0.06 ^a	0.8 ± 0.04 ^a	2.09 ± 0.57 ^a	0.39 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.07 ^a	0.4 ± 0.54 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.05 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	0.76 ± 0.13 ^a
C16:0	16.74 ± 0.02 ^a	19.18 ± 1.72 ^a	16.07 ± 1.01 ^a	14.92 ± 1.71 ^{ab}	12.65 ± 0.93 ^{ab}	15.91 ± 4.01 ^a	22.29 ± 2.49 ^c	22.58 ± 1.09 ^c	14.69 ± 0.72 ^{ab}	22.3 ± 0.6 ^c	33.8 ± 0.36 ^d	37.31 ± 1.06 ^c
C16:1	4.01 ± 0.64 ^a	4.03 ± 0.69 ^a	4.6 ± 0.28 ^a	2.45 ± 0.33 ^a	3.81 ± 0.19 ^a	2.52 ± 0.19 ^a	3.37 ± 0.20 ^a	2.51 ± 0.22 ^a	3.87 ± 0.26 ^a	3.99 ± 0.25 ^a	3.59 ± 0.66 ^a	4.12 ± 0.15 ^a
C16:2	1.93 ± 0.91 ^a	1.52 ± 0.38 ^a	1.97 ± 1.05 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	1.93 ± 0.4 ^a	1.8 ± 0.58 ^a	1.37 ± 0.2 ^a	1.11 ± 0.06 ^a	1.57 ± 0.09 ^a	1.61 ± 0.12 ^a	1.47 ± 0.01 ^a	1.08 ± 0.24 ^a
C16:3	1.54 ± 0.19 ^a	1.3 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.08 ^{ac}	3.18 ± 0.11 ^b	0.4 ± 0.25 ^c	1.55 ± 0.29 ^a	2.46 ± 0.55 ^b	0.77 ± 0.30 ^{cc}	0.3 ± 0.04 ^c	1.13 ± 0.44 ^a	0.92 ± 0.07 ^{ac}	0.76 ± 0.16 ^{cc}
C18:0	5.16 ± 0.07 ^a	5.69 ± 0.85 ^a	2.03 ± 1.72 ^b	2.32 ± 1.81 ^b	3.43 ± 0.01 ^b	10.08 ± 0.86 ^c	6.78 ± 0.03 ^d	3.05 ± 0.02 ^b	4.36 ± 0.12 ^b	4.0 ± 0.34 ^b	4.7 ± 0.02 ^b	4.08 ± 0.26 ^b
C18:1	37.66 ± 0.80 ^a	29.02 ± 4.10 ^b	31.33 ± 0.97 ^c	21.66 ± 0.74 ^d	41.12 ± 0.63 ^e	30.03 ± 3.03 ^c	26.92 ± 1.25 ^f	25.01 ± 0.79 ^{bf}	39.21 ± 0.47 ^c	26.95 ± 1.51 ^{bf}	16.72 ± 1.09 ^g	9.31 ± 0.32 ^h
C18:2 n6	16.1 ± 0.1 ^a	14.79 ± 1.69 ^a	21.82 ± 0.53 ^b	14.43 ± 1.8 ^{ac}	16.95 ± 0.37 ^{ad}	15.68 ± 0.63 ^a	16.74 ± 0.69 ^a	16.78 ± 0.48 ^{ad}	16.84 ± 0.35 ^{ad}	17.24 ± 0.79 ^{ad}	15.90 ± 0.02 ^a	15.35 ± 0.21 ^c
C18:3	13.28 ± 0.33 ^a	19.28 ± 2.11 ^b	16.16 ± 1.06 ^a	27.66 ± 0.6 ^c	14.39 ± 0.3 ^a	17.57 ± 1.65 ^{bc}	16.98 ± 3.86 ^{ac}	20.98 ± 0.11 ^d	15.52 ± 0.5 ^a	16.11 ± 0.97 ^a	14.33 ± 0.15 ^a	15.68 ± 0.77 ^a
C20:0	3.43 ± 0.98 ^a	4.8 ± 1.25 ^a	4.88 ± 0.27 ^a	11.28 ± 1.25 ^b	3.23 ± 0.5 ^{ac}	4.46 ± 1.59 ^a	2.69 ± 0.45 ^c	6.8 ± 0.34 ^d	3.42 ± 0.5 ^a	5.88 ± 0.13 ^d	8.23 ± 0.1 ^e	11.55 ± 0.01 ^b

AGS	25.92	25.1	18.36	29.38	21.41	30.84	32.15	32.83	22.68	32.58	47.04	53.7
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.92 ^a	1.52 ^a	1.06 ^b	1.04 ^c	0.57 ^b	0.50 ^d	0.77 ^d	0.54 ^d	0.22 ^b	0.55 ^d	0.61 ^c	1.13 ^f
AGMI	41.67	33.05	35.93	24.11	44.92	32.55	30.29	27.52	43.0	30.94	20.3	13.43
	±	±	±	±	±	±	±	±	7 ±	±	±	±
	1.02 ^a	1.72 ^{bc}	1.01 ^b	0.71 ^d	0.93 ^a	0.79 ^c	1.49 ^c	1.09 ^d	0.72 ^a	0.6 ^c	0.96 ^c	1.06 ^f
AGPI	32.4	41.85	45.71	46.52	33.67	36.61	37.55	39.65	34.25	36.48	32.65	32.87
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2.04 ^a	0.89 ^b	0.98 ^c	0.63 ^c	1.49 ^a	0.69 ^d	0.8 ^{dc}	0.22 ^c	0.26 ^{ad}	0.75 ^d	0.66 ^a	1.15 ^a

BAP: bencilaminopurina y AG: ácido giberélico. C12:0, ácido láurico; C14:0 ácido mirfístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1 ácido palmitoleico; C18:1, ácido oleico; C18:2 n6, ácido linoleico; C18:3, ácido linolénico; C20:0, ácido araquídico, AGS: ácido graso saturado; AGMI: ácido graso monoinsaturado; y AGPI: ácido graso poliinsaturado. Los valores se presentan como media ± error estándar (n = 2). Diferentes letras dentro de la misma fila indican valores significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95% según la prueba de Tukey.

Finalmente, el tratamiento con AG N-0 produjo la acumulación máxima de AGMI con 43.07% (1.68 veces más) en comparación con el control. En el tratamiento con AG N-100, la composición de AGS fue la más alta con 53.7%, mientras que en la prueba control fue de 29.38%.

7.7 Análisis de expresión de genes por qRT-PCR

7.7.1 Extracción de ADN y diseño de oligonucleótidos

Se obtuvo ADN de *S. obliquus* con concentraciones entre 250 a 510 ng μL^{-1} , con buena calidad para su uso posterior en técnicas moleculares. Este fue cuantificado por espectrofotometría (Figura 22).

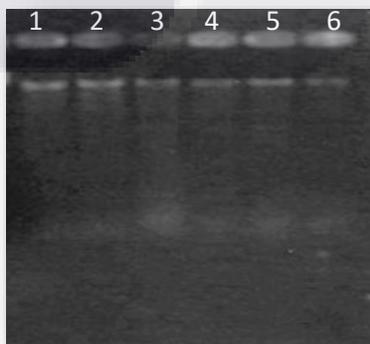


Figura 22. Réplicas de ADN genómico de *S. obliquus* (1-6). Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Los iniciadores para el gen de la DGAT fueron los siguientes: **DGAT-F** 5'- TCG TCA ACA CCT TCA ACA A -3' **DGAT -R** 5'- GTG ACA AAA CCT GGG ATG AT -3' (Sharma et al., 2005), amplificaron un fragmento de aproximadamente 500 pb en ADN y en ADNc. Los iniciadores dirigidos a *FATA* se diseñaron a partir de la secuencia *FATA* de *Scenedesmus dimorphus* (KT203350.2): **FATA-F** 5'- ATG CCG GAC ATG GAC CAC CT A-3' **FATA-R** 5'- GCA CCT GGG TGA CCA TCA ACA -3' y amplificaron un fragmento de 200 pb.

Para la amplificación del gen que codifica la enzima SAD se diseñaron iniciadores a partir de la secuencia de SAD de *S. dimorphus*, y fueron los siguientes: **SAD-F** 5'- TGC TGA AGC CGG TGG ACA A-3' **SAD-R** 5'- GAT GAG GTT CTG GAT GGT TAC-3'; los cuales amplificaron un fragmento de 450 pb. Los iniciadores diseñados para la amplificación del gen que codifica para la enzima ACP fueron: **ACP-F** 5'- AGA AGA TCG AGC CGG CAA A-3' **ACP-R** 5'- CTT CTG TTT GTC TGT GCT GCA-3'. Estos iniciadores amplificaron una región de 350 pb y se diseñaron a partir de la secuencia *ACP* ya conocida de *S. obliquus*, abarcando el sitio de unión a fosfoproteína DLGLDSL DVVELVMAFEEEF AVEIPDAD (PP-binding), que forma parte de las proteínas *acarreadoras de acilo* y durante la biosíntesis de ácidos grasos, actúa como un portador de la cadena de ácidos grasos en crecimiento.

Como gen constitutivo para normalizar los análisis de expresión por RT-PCR se utilizó el gen que codifica para la región 18S ribosomal. Los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias: AY510460.1 de *Scenedesmus deserticola*, KP726267.1 *Acutodesmus obliquus* y KU900221.1 *Tetradismus obliquus*, y fueron los siguientes: **18S-F** 5' ATA TCT TCA CGA AGC GCA TG 3' **18S-R** 5' TGT ACT CAT TCC AAT TAC CAG 3' y amplificaron un fragmento de aproximadamente 200 pb.

La obtención de una buena cantidad y calidad del ADN extraído es muy importante en el análisis molecular de cualquier organismo. El ADN obtenido generalmente debe de tener un alto rendimiento de extracción y debe de ser libre de impurezas. En microalgas la principal limitante para llevar a cabo este proceso eficientemente es su fuerte pared celular que en ocasiones impide obtener ADN con las cualidades mencionadas. *Scenedesmus obliquus* tiene una pared celular en multicapas, con polipéptidos glicosilados con manosa, galactosa y glucosa, lo que la hace muy resistente (Takeda,

1996). En este sentido, Simonelli et al. (2009), probaron diversos kits de extracción de ADN en microalgas para determinar el protocolo más eficiente en cuanto a cantidad y calidad de ADN. Los mejores fueron el kit de Qiagen Blood and tissue (QBT), el kit Qiagen Mini Plant (QPM) y el kit Ultra Clean (UC) y se podrían utilizar para generar buenos productos de PCR. Sin embargo, estos kits fueron evaluados en microalgas marinas y podrían no tener la misma eficiencia en microalgas de agua dulce como es el caso de *S. obliquus*. Aquí, utilizamos el método de fenol-cloroformo, con la cual se logró una extracción de ADN suficiente y de buena calidad. Este método ha sido, y continúa siendo el más utilizado para la extracción de ADN por su versatilidad y alta eficiencia de extracción en diferentes tipos de tejidos, además es relativamente económico (Shetty, 2020).

7.7.2 Amplificación de los genes de interés

Con los iniciadores diseñados se lograron amplificar los fragmentos correspondientes a los genes de interés a partir del ADN de *S. obliquus* (Figura 23A y 23B).

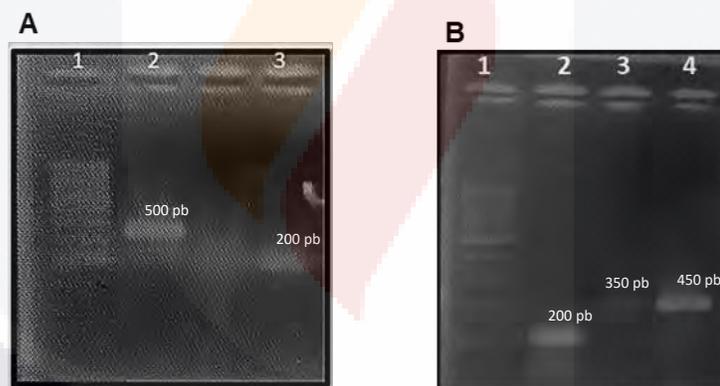


Figura 23. Amplificación de los genes de interés en ADN de *S. obliquus*. A) 1= 100 pb ADN Ladder, 2=DGTA, 3=FATA. B) 1= 100 pb Ladder ADN, 2=18S, 3=ACP, 4=SAD.

7.7.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se obtuvo el ARN total con concentraciones entre 50 y 500 ng μL^{-1} , se utilizó para la síntesis de ADNc como molde para el análisis de expresión por qRT-PCR. Se cuantificaron todas las muestras en un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y se ajustaron a 100 ng μL^{-1} para el análisis por qRT-PCR.

El aislamiento del ARN es un proceso muy delicado puesto que, una vez extraída del organismo portador tiene una vida media muy corta y se convierte en un blanco fácil de las RNAasas. Los métodos de extracción más comunes son dos principalmente: el

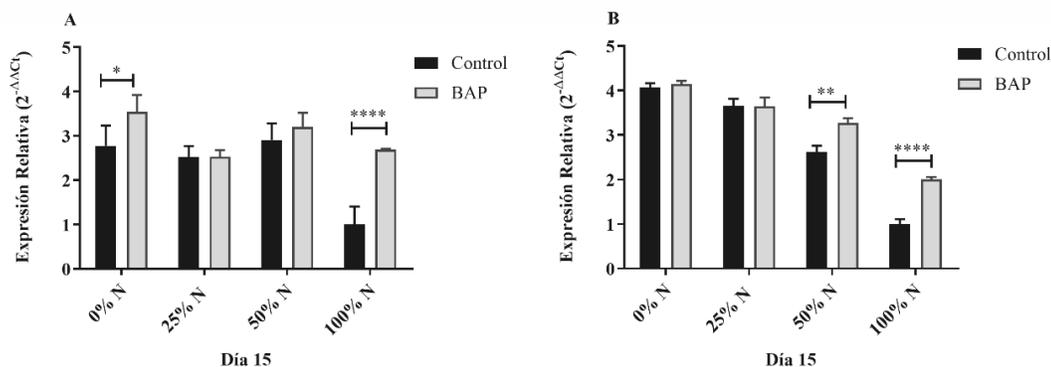
que utiliza tiocianato de guanidinio 4 M y el de fenol y SDS (Doyle, 1996). El uso de kit comerciales facilita la obtención de RNA además de proveer una calidad suficiente para posteriores estudios. Nosotros utilizamos el kit E.Z.N.A.® Plant RNA y pudimos aislar ARN total de *S. obliquus* sin contaminantes.

7.8 Análisis de expresión de genes por qRT-PCR en *S. obliquus* bajo condiciones de limitación de N y estímulo con fitohormonas

La síntesis de *novo* de ácidos grasos es crucial en el metabolismo de las microalgas, los productos de esta vía biosintética son utilizados principalmente para construir su membrana, además de almacén de energía en forma de lípidos (Murphy, 2009). Se ha reportado que el estrés por deficiencia de N en microalgas (Lei et al., 2012; Li et al., 2015; Budhaliya et al., 2017), o la aplicación exógena de fitohormonas (Mc Gee et al., 2020; Norlina, 2020; Sivaramakrishnan y Incharoensakdi, 2020) incrementan la expresión de diversos genes de la vía biosintética ácidos grasos. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos bajo el estímulo de fitohormonas simultáneamente con una deficiencia de N.

En este estudio se seleccionaron tres genes de la biosíntesis de ácidos grasos en microalgas: *ACP*, *SAD* y *FATA*, y *DGAT*, que participa en la síntesis de TAGs. En todos los tratamientos N-deficientes se observó una sobreexpresión en los cuatro genes analizados este comportamiento fue independiente del estímulo con BAP o AG, observándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$) particularmente en la expresión de los genes *ACP*, *DGAT* y *FATA* (Figuras 20 y 21).

El tratamiento BAP N-0, mostró una mayor expresión de *ACP* con un incremento de 1.26 veces en comparación con su control N-0, y de 3.5 veces más en comparación con el control N-100 no estimulado (Figura 24A). El efecto de AG en la sobreexpresión de *ACP* fue ligeramente menor a los tratamientos control N-reducidos (Figura 25A).



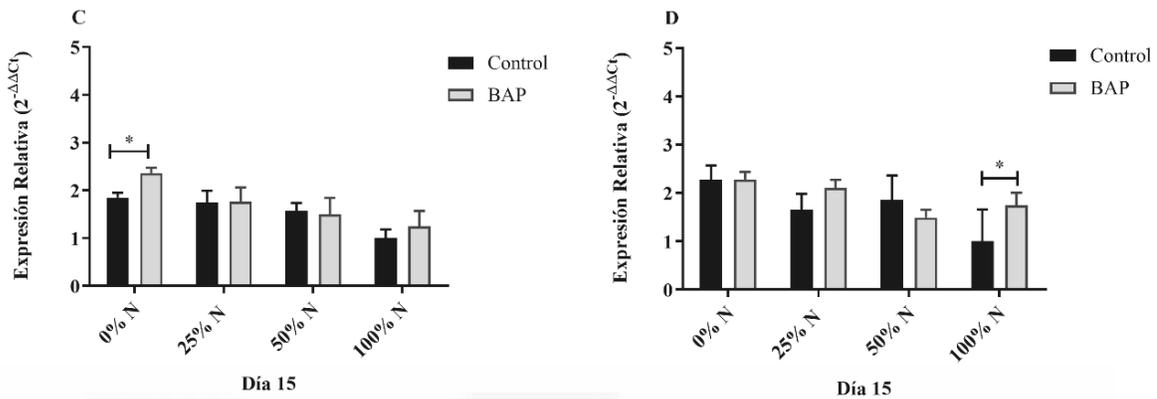


Figura 24. Expresión relativa de A) *ACP*, B) *FATA*, C) *SAD* y D) *DGAT* en *S. obliquus*. Se representan los niveles de expresión relativa de los genes de *S. obliquus*; las barras en color negro representan la expresión a diferentes porcentajes de N: 0%, 25%, 50% y 100% sin suplementación de BAP, y las barras en gris representan la expresión a los mismos porcentajes de N: 0%, 25%, 50% y 100% con estímulo de BAP. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo 18S-ribosomal. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indica las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

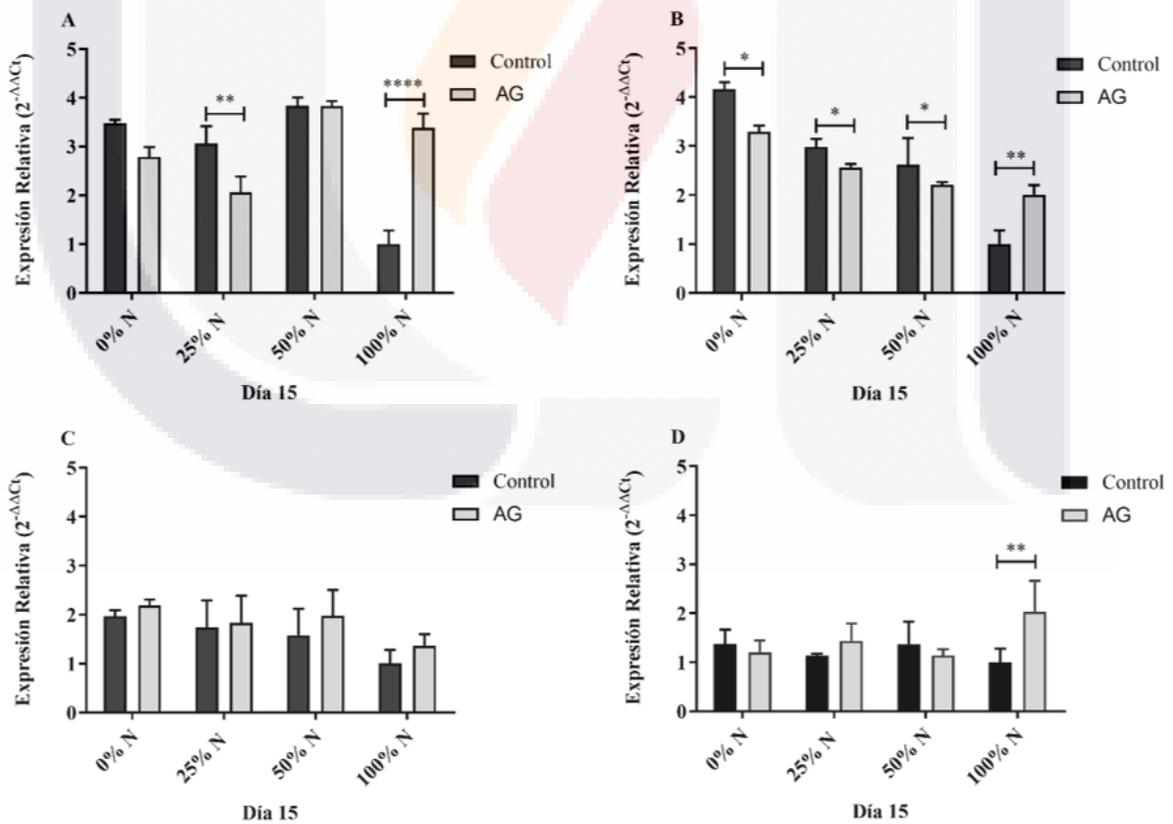


Figura 25. Expresión relativa de A) *ACP*, B) *FATA*, C) *SAD* y D) *DGAT* en *S. obliquus*. Se representan los niveles de expresión relativa de los genes de *S. obliquus*; las barras

en color negro representan la expresión a diferentes porcentajes de N: 0 %, 25 %, 50 % y 100 % sin suplementación de AG, y las barras en gris representan la expresión la expresión a los mismos porcentajes de N: 0%, 25%, 50% y 100% con estímulo de AG. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo 18S-ribosomal. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indica las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

La ACP es un intermediario dentro de grandes poliproteínas en forma de monómeros discretos o como dominios altamente conservados. Están formadas por cuatro hélices de 70-100 aminoácidos (aa) y contienen un brazo de 4'- fosfopanteteína (FPT) unido a una serina catalítica N-terminal en la hélice II (Figura 26) (Farmer et al., 2019).

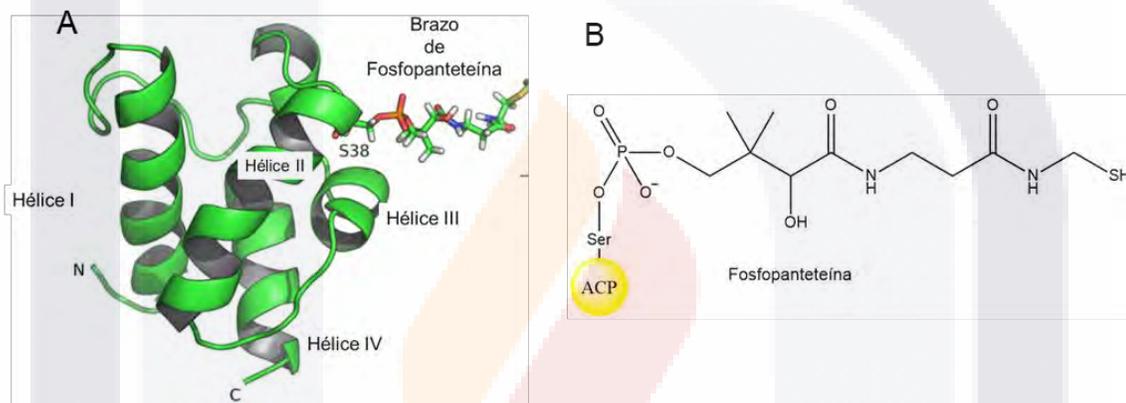


Figura 26. A) Modelo estructural de la acil ACP3 de la mupirocina. B) Representación de la estructura química de la fosfopanteteína portando a ACP. ACP3 contiene cuatro hélices con S38 sin modificar en la forma de apo de la proteína, la fosfopanteteína está ligada en la forma holo. La estructura principal de la proteína se muestra como una cinta verde en medio de la figura, con una cadena lateral S38 y la cadena de fosfopanteteína se observa como átomos con coloración CPK estándar. Imagen A tomada y traducida de *Structure, function and dynamics in acyl carrier proteins*, Farmer et al. (2019). Imagen B elaborada por Hans C. Correa en ChemDraw Professional 17.0.

Son importantes cofactores en vías metabólicas primarias y secundarias como en la biosíntesis de los ácidos grasos libres, en la de fosfolípidos, en endotoxinas, glicolípidos y, funcionan también como moléculas de señalización Byers et al. (2007). La actividad biológica de la ACP se da gracias a la unión post-traducciona del grupo prostético FPP, derivado de la CoA, este grupo es el encargado de unir covalentemente grupos acilo y transportarlos a las enzimas que participan en los ciclos de condensación, reducción y deshidratación en la biosíntesis de ácidos grasos (Chan y Vogel, 2010). El dominio ACP tiene acceso espacial a todas las actividades de la enzima ácido graso sintasa (EAGS)

La tioesterasa cataliza la liberación del producto, típicamente palmitato (16:0), que puede ser activado por la acil-CoA sintetasa y posteriormente alargado por sistemas microsómicos (Cook y McMaster 2002) (Figura 27).

En otros reportes, como en el de Sharma et al. (2015), muestran que en *Scenedesmus dimorphus* y *S. quadricauda* la expresión de *ACP* se incrementó en 3.0 y 9.0 veces, respectivamente, bajo condiciones de limitación de N (2.5 mM). En cambio, en otro estudio, se suplementó BAP y AG en *B. braunii*, e interesantemente BAP no modificó los niveles de expresión de *ACP*; sin embargo, con AG (15 mg L⁻¹) *ACP* se sobreexpresó hasta 6.35 veces más en comparación con el control (Du et al., 2020).

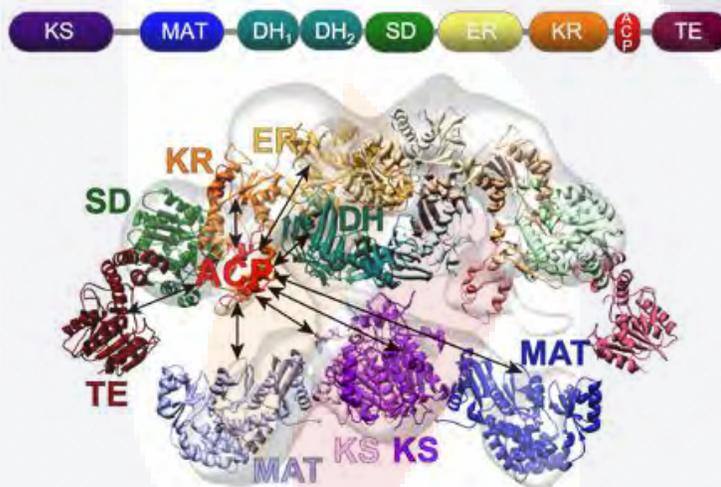


Figura 27. Organización estructural de los dominios de la EAGS. La parte superior muestra la disposición lineal de los dominios funcionales en el polipéptido. KS, β-cetoacilo sintasa; MAT, malonil/acetil transferasa; DH₁ y DH₂, subdominios de la deshidrasa; SD, dominio estructural; ER, enoil reductasa; KR, β-cetoacilo reductasa; ACP, proteína portadora de acilo; TE, tioesterasa. La parte de abajo en gris claro muestra la estructura del dímero, tal y como se ha revelado en la microscopía electrónica. Estudios bioquímicos han revelado que la ACP es capaz de establecer contactos funcionales con todos los dominios asociados a la misma subunidad, así como con los dominios KS y MAT asociados a la subunidad compañera, indicados por flechas. Imagen tomada de: http://www.chori.org/Principal_Investigators/Smith_Stuart/smith_research.html (2020).

Este último trabajo, no coincide con nuestros resultados con BAP, ya que nosotros obtuvimos en los tratamientos con BAP N-100, que la expresión de *ACP* se incrementó cerca de 3 veces más que el control N-100 (Figura 24A). No obstante, en los tratamientos con AG N-100, sí se incrementó la expresión de *ACP*, con 3.5 veces más en comparación con el control N-100 (Figura 25A). Es sabido que la deficiencia de N en microalgas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumenta el daño oxidativo en las células (Chokshi et al., 2017), en respuesta a esto, se da una sobreproducción de ácidos grasos como una manera de eliminar el consumo excesivo de productos fotoasimilados, de evitar la sobre reducción de la cadena transportadora de electrones y de contrarrestar la actividad de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Nakamura et al., 2016). En *Pseudomonas aeruginosa* se encontró que la expresión de *ACP3* se incrementó considerablemente en respuesta a estrés oxidativo (Chen et al., 2018), por lo que es muy probable que el aumento de la expresión de *ACP* en los tratamientos N-deficientes, también se deba a una respuesta a esta condición como una manera de disminuir el daño oxidativo.

La expresión en *FATA* fue la más pronunciada con aumento de hasta 4.0 veces en los ensayos de BAP N-0 y en los de N-0 sin estímulo. La expresión de *FATA* fue de 2.0 veces mayor en BAP N-100 en comparación con el tratamiento N-100 sin BAP (Figura 24B). Observamos que, a mayor deficiencia de N, mayor fue la sobreexpresión de *FATA* en los tratamientos no estimulados y estimulados con BAP y AG (Figuras 24B y 25B). La expresión de *FATA* en los tratamientos N-deficientes, fue mayor que los adicionados con AG, por ejemplo, en N-0 se obtuvieron incrementos de 4.1 veces, en N-25 de 2.9 veces y en N-50 2.65 veces más, comparados con N-100.

Los resultados también indican que BAP y AG estimulan la actividad de *FATA*, esto es porque se observó un incremento en los AGMI, principalmente en C18:1. Sin embargo, la deficiencia de N es el principal factor que dispara la expresión de *FATA*. La función principal de *FATA* es producir ácidos grasos libres al hidrolizar sustratos de oleoil-ACP, principalmente C18:1-ACP y dar por finalizada la síntesis de ácidos grasos (Salas y Ohlrogge 2002). En el girasol (*Helianthus annuus*) se estudió la expresión de *FATA* en diferentes estadios de desarrollo, y se reportó que la regulación de este gen es importante no sólo para la deposición del aceite en la semilla sino también, para la composición final del aceite. El aceite de girasol fue rico en ácidos grasos monoinsaturados (C18:1) cuando la expresión de *FATA* fue mayor (Aznar-moreno et al., 2018). De igual forma, nosotros hemos obtenido un aumento en nivel de expresión de *FATA* de hasta 4.0 veces mayor, junto con un aumento significativo de los AGMI (Figuras 24B y 25B).

Se ha propuesto un modelo estructural para *FATA* en *H. annuus* (Figura 28). La especificidad de esta enzima para la hidrólisis de los oleoil-ACP parece dársele el dominio N-terminal, aunque los rasgos estructurales y los aminoácidos específicos que determinan dicha actividad están aún por determinarse.

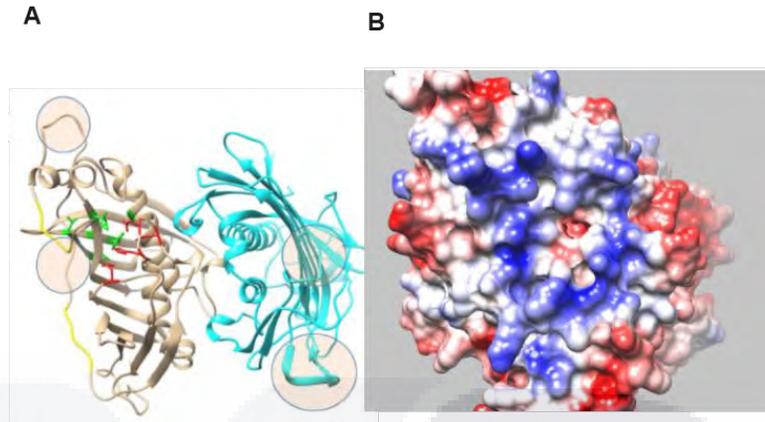


Figura 28. Modelos estructurales de la tioesterasa acil-ACP de girasol. Diagramas A) Los residuos en la unión del sustrato son verdes y los involucrados en la catálisis están en rojo. B) Las superficies moleculares muestran el potencial electrostático de acuerdo con las leyes de Coulomb con zonas cargadas positivamente rodeando la cavidad de unión a sustrato. Imagen tomada de Aznar-moreno et al. (2018).

En microalgas se ha reportado que la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos se ha visto afectada por la adición de reguladores del crecimiento, incluyendo la elongación de los ácidos grasos (Du et al., 2017). En *Chlorella pyrenoidosa*, se demostró que AG estimula la actividad de esterasa (Du et al., 2015). En *Chorella* sp. AG aumentó la actividad de *FATA* alrededor de 1.7 veces más que el control y, aunque no mejoró el contenido de ácidos grasos, sí mostró diferencias en el contenido de ácido linoleico y linolénico (Sivaramakrishnan y Incharoensakdi, 2020). Además, se observó un aumento en el contenido de H_2O_2 y un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, probablemente como una medida para anular los efectos de las ERO mediante en la vía de síntesis de lípidos (Solovchenko et al., 2012). Por otro lado, el tratamiento con BAP en *B. braunii* B12 fue capaz de incrementar hasta 63 veces la expresión de *FATA*, los autores sugieren que la presencia de BAP estresó a las células y desencadenó un aumento significativo de la regulación de *FATA* y otros genes de síntesis de lípidos, dando lugar a un incremento en la acumulación de lípidos (Du et al., 2020).

El análisis de *SAD*, reveló que los efectos de los diferentes tratamientos con BAP N-reducidos, produjeron un incremento de hasta 2.35 veces en su expresión, en comparación con los controles N-100 (Figura 24C). Los niveles de expresión de *SAD* en las pruebas inducidas con AG, no fueron significativamente superiores ($p \leq 0.05$) a las pruebas de N-reducido sin estímulo. No obstante, se observó un incremento de 2.0 veces

más en la sobreexpresión de *SAD* en ausencia total de N, comparada con la de N-100 (Figura 25C).

La síntesis de cadenas oleicas es debida en buena medida a la acción de *SAD*. Al formarse C18:0-ACP, *SAD* lo convierte en C18:1, el cual posteriormente es transportado fuera del cloroplasto (Zhao et al., 2015). Análisis espectroscópicos y comparaciones de secuencias de aminoácidos establecieron que *SAD* contiene un cluster de dihierro (Figura 29). Esta clase de proteínas presenta dos motivos E-X-X-H, separados por cerca de 100 aminoácidos, además contienen una subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa y una hidroxilasa de la monooxigenasa de metano (MMO) (Fox et al., 1993, 1994). Este complejo reacciona con la estearoil-ACP, la ferredoxina reducida [2Fe-2S] y O₂ para llevar a cabo completamente una desaturación altamente regio y estereoselectiva (Figura 30). Las interacciones con la cadena acilo indican la presencia de un mediador de hierro altamente reactivo capaz de oxidar los enlaces C-H secundarios (Fox et al., 2004).

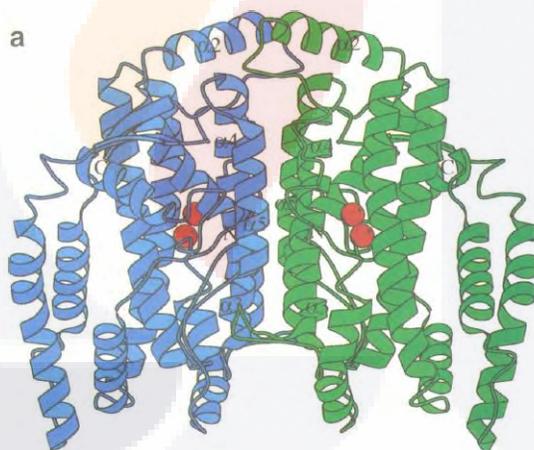


Figura 29. Dímero de la Δ^9 -desaturasa. Las dos subunidades están coloreadas en verde y azul, respectivamente, y los dos centros de hierro están indicados por esferas rojas. Ilustración tomada de Lindqvist et al. (1996).

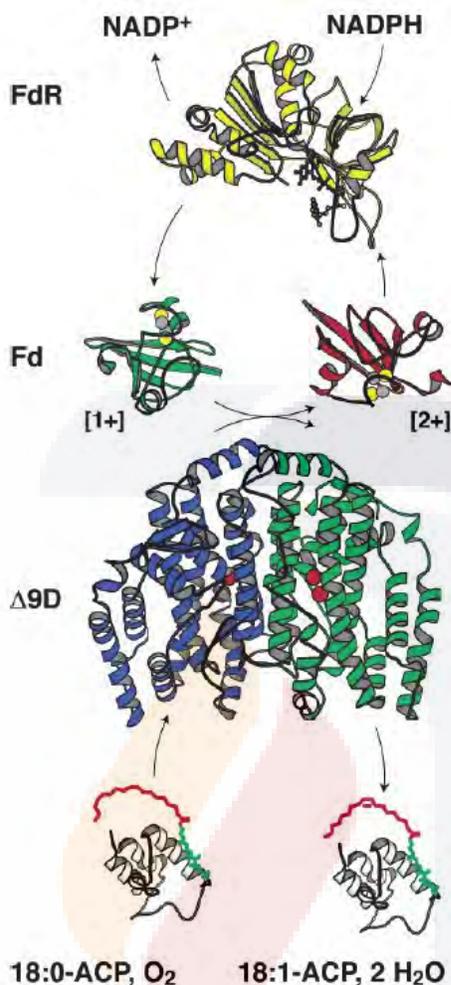


Figura 30. El complejo Δ^9 -desaturasa consiste en ferredoxina reductasa (FdR, PDB código 1FNB), [2Fe-2S] ferredoxina (Fd, 1FXA), estearoil-ACP Δ^9 -desaturasa (Δ^9 D, 1AFR), y 18:0-ACP (1ACP). La FPT y la cadena acilo de 18:0-ACP y cis- Δ^9 -18:1-ACP no están definidas estructuralmente fueron se añadidas. Ilustración tomada de Fox et al. (2004).

La deficiencia de N acoplada al estímulo de BAP o de AG, resultó en la sobreexpresión de *SAD* en 1.33-2.35 veces (Figuras 24C y 25C). A pesar de que estos incrementos no son tan pronunciados, el aceite de *S. obliquus* mostró un enriquecimiento considerable en C18:1 (Tabla 18). Este comportamiento fue observado también en *B. braunii* (Choi et al., 2011). El efecto de BAP y AG en la sobreexpresión de *SAD* fue similar a la de los controles N-deficientes no estimulados. En concordancia con nuestros resultados, en *C. pyrenoidosa* se encontró que AG no tuvo un incremento significativo en la expresión de *SAD* (Du et al., 2017). Además, está documentado que las condiciones de deficiencia de N incrementan la expresión en *SAD* (Sharma et al., 2015). El único

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tratamiento que mostró un incremento significativo en la expresión de *SAD* fue BAP N-0 (Figura 24C), este resultado sugiere que bajo este tratamiento se puede inducir la acumulación de ácido oleico, ya que la regulación de *SAD* ha mostrado una correlación positiva con C18:1 (Lei et al., 2012).

Finalmente, *DGAT* exhibió una sobreexpresión significativa estimulada tanto por BAP N-100 como por AG N-100, comparadas con los controles N-100. En el caso de los tratamientos N-0, se incrementó la expresión de *DGAT* hasta 2 veces más, aunque en este caso, no se tuvieron diferencias significativas en comparación con los tratamientos suplementados con BAP N-0 o AG N-0. La expresión de *DGAT* en todos los ensayos con BAP o AG N-reducidos, no fue significativamente diferente a la de los controles N-0, N-25 y N-50 sin estímulo (Figuras 24D y 25D). La *DGTA* ha sido correlacionada positivamente con la acumulación de lípidos (Fan et al., 2014, Li et al., 2016), ya que favorece la transferencia de ácidos grasos 16:0 o 18:1 a la posición sn-3 de los diacilgliceroles (Li et al., 2010), y es la vía principal para la biosíntesis de *nov*o de TAGs (Kirchner et al., 2016). Se han reportado dos isoformas no homólogas conocidas como *DGAT1* y *DGAT2*, que catalizan la misma reacción, pero no comparten ninguna secuencia o similitud estructural, aunque en *S. obliquuus* aún no se han identificado estas isoformas. En un estudio se analizaron las estructuras de las dos isoformas de *DGAT* en 70 organismos, y se estableció que los residuos de aminoácidos conservados se agrupan en los centros activos de las enzimas. *DGAT1* y *DGAT2* tienen 41 y 16 residuos de aminoácidos completamente conservados, respectivamente. La mayoría de ellos se encuentran en los extremos carboxílicos de la *DGAT* y pueden estar involucrados en la unión del sustrato, la catálisis directa, y/o el mantenimiento de la estructura de la proteína incluyendo la formación de oligómeros (Cao et al., 2011). En la figura 31, se muestra la estructura de la *DGAT* de *Thermomonospora curvata*, en donde se predijo la t*DGAT* consiste en pliegues aciltransferasa dependientes de la acil-CoA, se pueden observar dos dominios conectados por una ligadura helicoidal (Lázaro et al 2017). El dominio N-terminal está formado cuatro hebras beta (β 2, β 5, β 6 y β 7) rodeada por tres hélices alfa (α 2, α 4 y α 5) y el dominio C-terminal contiene cinco hebras beta (β 8, β 9, β 10, β 11 y β 12) y cinco hélices alfa (α 9, α 10, α 11, α 13 y α 14).

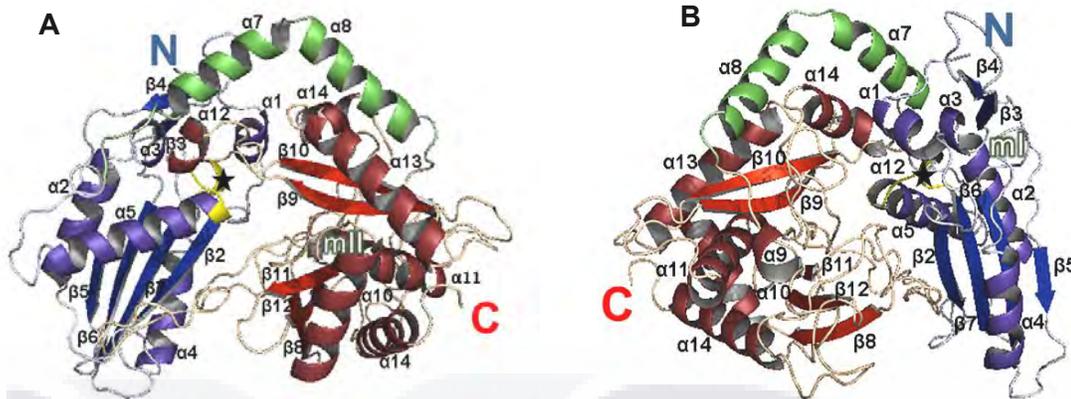


Figura 31. Modelo estructural de tDGAT. El monómero presenta una estructura con dos dominios: el dominio N-terminal está en color azul, el dominio C-terminal en rojo y los lazos de conexión en verde. Las hojas beta y las hélices alfa se muestran en colores más oscuros. El sitio activo HHxxxDG está marcado con una estrella negra y en color amarillo. Otros motivos importantes conservados están etiquetados como mI en figura A y mII, en la vista rotada 180° en figura B. Imágenes tomadas de Lázaro et al. (2017).

Al igual que en nuestra investigación, en otras especies de microalgas también se ha observado un incremento en la expresión de *DGAT* inducido por fitohormonas, por ejemplo, en cultivos N-deficientes de *Graesiella emersonii*, la expresión de *DGAT* se incrementó 3.17 veces al aplicar AIA y kinetina (Mandal et al., 2019). Estas hormonas disminuyeron la generación de ERO inducido por la deficiencia de N y estimularon la producción de lípidos. En *Mortierella alpina* la suplementación de BAP incrementó la expresión de *DGAT* 7.7 veces. Su efecto en la producción de lípidos fue el más pronunciado por encima de otras fitohormonas como AIA, IBA, AG y kinetina (Zhang et al., 2019). En este estudio también se detectó un aumento en la 6-fosfoglucoasa deshidrogenasa (G6PD) que es una enzima clave en la vía de la pentosa fosfato por proveer de NADH al sistema. La sobre producción de NADPH es un mecanismo celular que contrarresta el exceso de electrones y la producción de ERO; el exceso de NADPH protege a la célula del daño oxidativo mediante la síntesis aumentada de ácidos grasos libres (Wang et al., 2020).

Recientemente, un análisis del transcriptoma de *Aurantiochytrium* sp. reveló que 717 genes fueron diferencialmente expresados por la acción de BAP, 472 genes fueron sobreexpresados, y en 245 genes la regulación disminuyó. BAP (6 mg L⁻¹) incrementó los lípidos en 55.3% en comparación con el control. Las rutas encargadas de la síntesis de ácidos grasos insaturados se vieron afectadas por la presencia de BAP, la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la acil-CoA deshidrogenasa (ACD), la acetil-CoA sintetasa (ACS), las

subunidades A, B y C de la policétido sintasa, además de los genes involucrados en la síntesis de NADPH como la G6FD entre otros, también se sobreexpresaron, mientras que los genes para la ácido graso sintasa, la Δ^6 -ácido graso desaturasa y la Δ^9 -elongasa disminuyeron su expresión. Además, encontraron que BAP propició un mayor flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma, produciendo mayor cantidad de calmodulina para participar en señales de transducción y que fueron estimulados los genes de la caseína quinasa (CK) y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y factores de transcripción (Figura 32) (Yu et al., 2019).

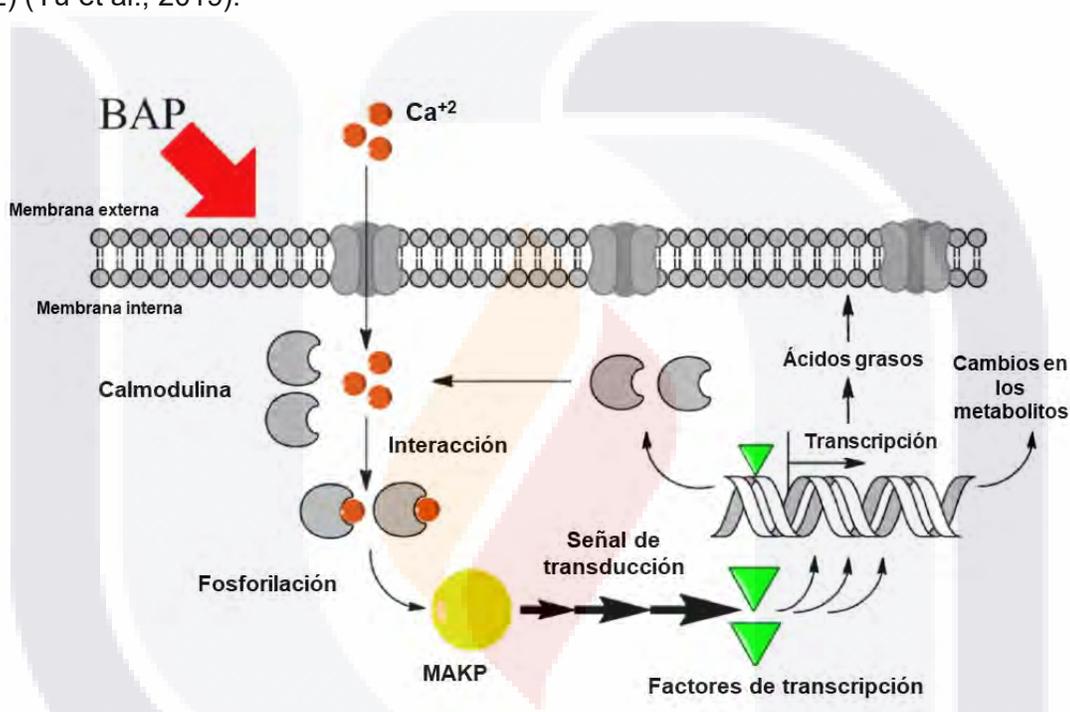


Figura 32. Modo de regulación de BAP en células de *Aurantiochytrium* sp. Imagen tomada y traducida de Yu et al. (2019).

El mecanismo de acción por el cual otras fitohormonas alteran o regulan los niveles de expresión de algunos genes involucrados en el metabolismo lipídico de microalgas sigue sin elucidarse. Sin embargo, un estudio sobre el efecto de AG en *Aurantiochytrium* sp. reportó que esta hormona regula el flujo metabólico hacia la síntesis de ácidos grasos, promueven la glucólisis, intervienen en la vía del mevalonato y dirige el flujo de carbono hacia la síntesis de piruvato y acetil-CoA (Yu et al., 2016).

7.9 Extracción asistida con irradiación infrarroja (EAIR)

Se investigó la EAIR de lípidos totales en *S. obliquus* evaluando mezclas de seis disolventes con polaridad variable como: AcOEt, CH₂Cl₂, EtOH, Hex, IsPrOH y MeOH, a tres proporciones diferentes (1:2, 2:1 y 3:2), bajo irradiación infrarroja (250 W) por 10 min. Para evaluar la eficiencia de esta técnica, se compararon los resultados con aquellos obtenidos en los métodos convencionales de extracción de lípidos extracción como la extracción Soxhlet (ES), la de Folch y la de Bligh-Dyer (BD) (Figura 33). Se utilizaron 0.2 g de biomasa (PS) cosechada a los 20 d de cultivo para cada uno de los ensayos.

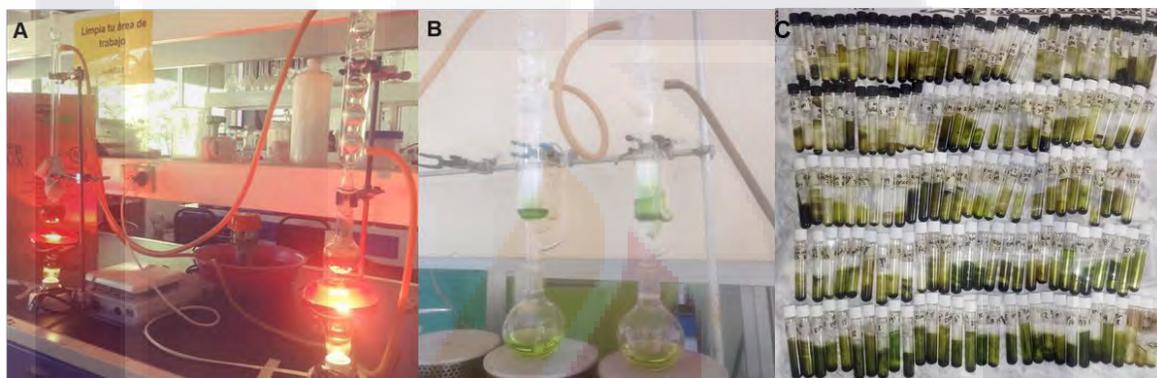


Figura 33. Extracción de lípidos de *S. obliquus* con solventes. A) Extracción asistida con IR, B) Extracción Soxhlet, C) Muestras de aceite obtenido por los cuatro métodos aplicados.

La EAIR generó rendimientos de extracción de 3.9-15.5% de lípidos totales. Las mezclas de disolventes con mayor eficiencia de extracción fueron las de proporción 1:2 (v/v) de CH₂Cl₂/MeOH, AcOEt/MeOH y Hex/MeOH con 15.56, 15.43 y 14.05%, respectivamente. De manera general, la proporción 2:1 (v/v) de todas las mezclas de disolventes produjo menores rendimientos de extracción que la proporción 1:2 (v/v), y mayores, a los generados por la proporción 3:2 v/v (Figura 34).

Se observó una diferencia significativa en los ensayos con diferentes proporciones (1:2 contra 2:1 y 3:2) en una misma mezcla de disolventes, y una diferencia de hasta 5% en el rendimiento, comparado con aquellas mezclas en las cuáles el MeOH no está presente. Estos resultados sirvieron como base la optimización de este proceso por metodología de superficies de respuesta (MSR).

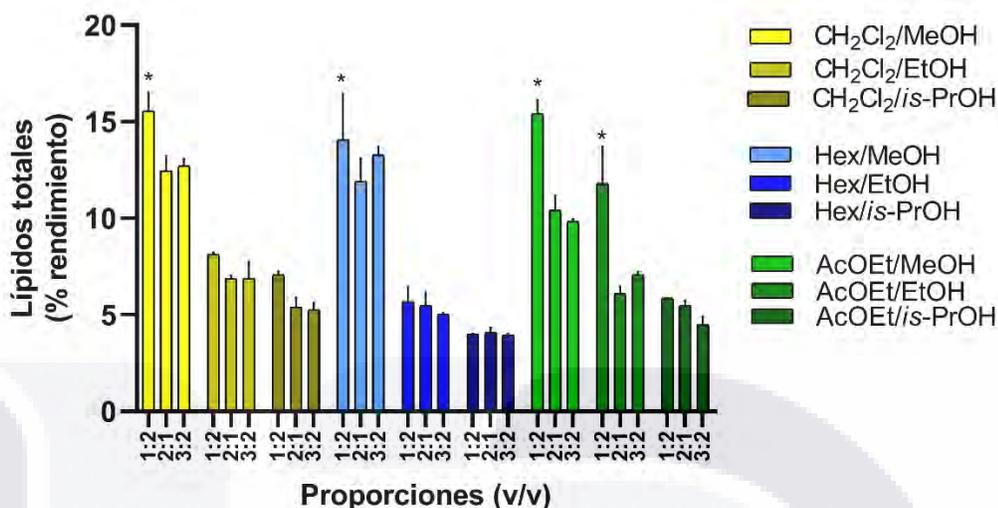


Figura 34. Porcentaje de rendimiento de lípidos obtenidos con la EAIR. Condiciones: 0.2 g biomasa (PS), 10 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 10 min. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 2$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

Se han aplicado diversos métodos para extraer lípidos u otros metabolitos en microalgas: Soxhlet (McNichol et al., 2012), microondas (Dai et al., 2014), ultrasonido (Araujo et al., 2013), líquidos iónicos (Shankar et al., 2017), fluidos supercríticos (Solana et al., 2014) y enzimáticos (Gerken et al., 2013). Sin embargo, es importante señalar que, aunque se ha empleado la irradiación infrarroja para la extracción de metabolitos en plantas (Fu et al., 2011; Qu et al., 2016; Cheaib et al., 2018), en microalgas, no hay reportes de su aplicación para la extracción de lípidos o algún otro metabolito. La EAIR consiste en calentar el disolvente de extracción que está en contacto con la muestra, en este caso, la biomasa microalgal, y dispersar los compuestos de la matriz de la muestra en el disolvente. Además del efecto de calor, la irradiación infrarroja genera cambios en la matriz y en el analito a extraer. Una molécula orgánica absorbe la IR y la convierte en energía de rotación molecular a una frecuencia de 100 cm^{-1} , a frecuencias absorbidas de $10,000\text{--}100\text{ cm}^{-1}$ la molécula dispersará la energía en forma de vibración (Silverstein et al., 2014). Estudios de EAIR de metabolitos se han llevado a cabo exitosamente, por ejemplo, Cai et al. (2011) combinaron la EAIR con HPLC para la determinación de catequina, epicatequina y procianidina B2 en semillas de uva. El polvo de las semillas de uva se dispersó en diferentes mezclas de agua-metanol y fueron irradiadas por 30 min. La eficiencia de la extracción fue comparable con otros métodos de extracción como el

de microondas, la extracción por ultrasonidos y el térmico. En otro estudio, se obtuvieron extractos del del fruto (orujo) y la semilla de *P. armeniaca*, y se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPL), obteniéndose rendimientos superiores de los extractos.

7.9.1 Extracción Soxhlet, Folch y Bligh-Dyer

Los resultados de la ES se muestran en la figura 35. La proporción de mezcla de disolventes que arrojó los mejores porcentajes de extracción fue la 1:2, utilizando al MeOH en la mezcla. En el ensayo de CH₂Cl₂/MeOH (1:2) se obtuvo 22.09% ± 0.21 de rendimiento, en el de Hex/MeOH 21.93% ± 1.59 y en el de AcOEt/MeOH 22.92% ± 0.70. Se observaron diferencias significativas sólo entre los ensayos de un mismo grupo, es decir, entre diferentes proporciones, pero con la misma mezcla de disolventes. Es evidente que, el MeOH, contribuye en mayor grado a la extracción de lípidos totales en comparación con el EtOH y el isPrOH, siendo este último, el que menos favoreció el proceso de extracción (Figura 35).

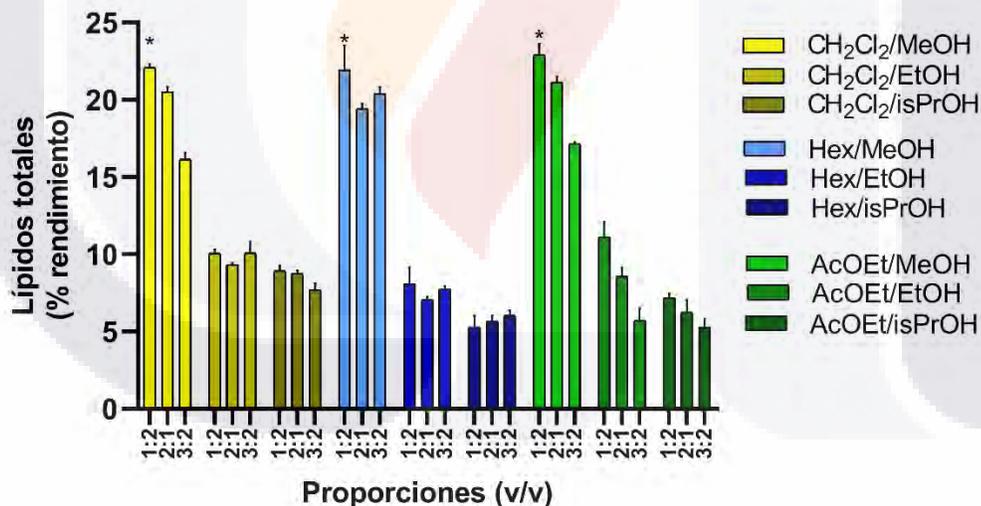


Figura 35. Porcentaje de rendimiento de lípidos con extracción Soxhlet. Condiciones: 0.2 g biomasa (PS), 150 mL disolventes, tiempo extracción 180 min a reflujo. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 2$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

Las técnicas de Folch y de Bligh-Dyer, son de las más utilizadas para la extracción de lípidos, en este estudio, el método de extracción de Folch (CHCl₃/MeOH, 2:1), el porcentaje de extracción fue más bajo en comparación con los obtenidos en la ES, y en la

EAIR; obteniéndose un 9.57% de rendimiento. Para la extracción BD, el porcentaje lipídico fue mayor con 10.61%, sin embargo, sigue siendo menor en comparación con la EAIR y la ES (Figura 36). Probablemente, la mayor capacidad de extracción utilizando la IR en comparación con la BD y Folch, se debe no sólo al calor emitido por la fuente, sino también a la emisión de un espectro continuo sobre los compuestos orgánicos, esto excita a las moléculas del disolvente, y produce un mayor flujo y capacidad de arrastre de los lípidos (Chen et al., 2010).

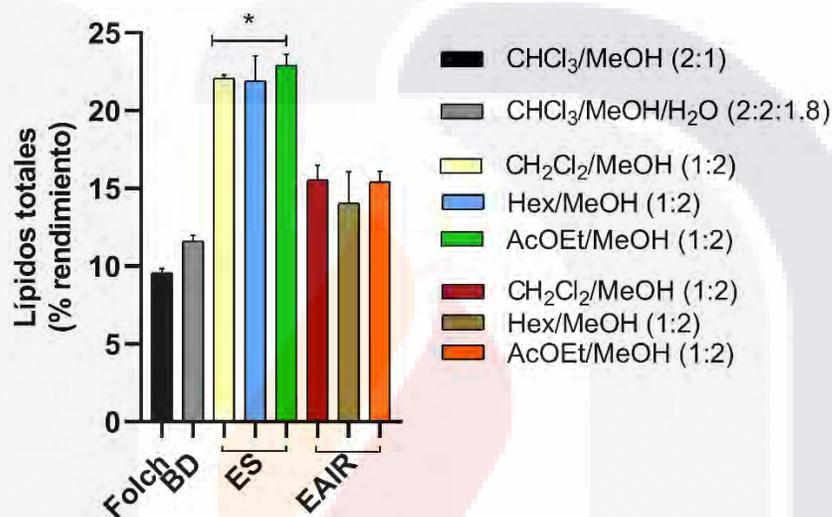


Figura 36. Comparación del rendimiento de lípidos totales obtenidos por diferentes métodos de extracción. Condiciones para Folch y BD: relación m/v (0.2 g/10 mL) 10 min a temperatura ambiente. EAIR: relación m/v (0.2 g/10 mL), 10 min bajo IR (250 W). ES: relación m/v (0.2 g/150 mL), 180 min a reflujo. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 2$). * indica una diferencia significativa ANOVA ($p < 0.05$).

Los datos obtenidos en la EAIR fueron inferiores a la ES, el rendimiento más alto de lípidos fue de $15.56\% \pm 0.93$ que, comparado con el $22.92\% \pm 0.70$ de la ES, parecería indicar que este método es mejor para la extracción de lípidos en *S. obliquus*. Sin embargo, el proceso en la ES requiere largos periodos de calentamiento, grandes volúmenes de disolvente (150 mL en este trabajo), lo que representa una mayor dificultad para desechar correctamente los disolventes, un alto gasto energético, de insumos, y además, suscita a una posible descomposición térmica de los metabolitos extraídos (Cheung et al., 1998; López-Bascón et al., 2020). Mientras que, en la EAIR, el proceso de extracción sólo tomó 10 min con un consumo de 10 mL de disolventes. Las extracciones de Folch y de Bligh-Dyer han demostrado ser eficaces en la extracción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

lípidos en diversos estudios (Sun et al., 2020; Karim et al., 2020), no obstante, la utilización de estos disolventes clorados peligrosos, neurotóxicos, cancerígenos y en general, dañinos para la salud humana y el medio ambiente, es una de las principales limitantes para su aplicación en la extracción de lípidos a escala industrial (de Jesus et al., 2019). En estas dos técnicas, se aplicaron las mismas condiciones de tiempo y de relación biomasa/disolvente (m/v) como en la EAIR, con la diferencia de que no hubo un calentamiento durante el proceso de extracción; esto contribuyó a una disminución en el consumo energético.

En este trabajo, la mezcla AcOEt/MeOH (1:2) fue una de las soluciones que mostró un mayor rendimiento lipídico: en la EAIR $15.43\% \pm 0.68$ y en la ES $22.92\% \pm 0.70$, lo que representa un 45.42% y un 116.02% de incremento, respectivamente comparando con la técnica de BD. Contrastando con la técnica de Folch, el incremento fue de 61.23% y 130.82% para la EAIR y la ES, respectivamente. En concordancia con estos resultados, Wu et al. (2017), demostraron que, como disolventes únicos, el AcOEt y el MeOH tienen una alta capacidad de extraer lípidos en *Chlorella* sp. El primero, específicamente sobre los lípidos neutros, y el segundo, en lípidos totales; ambos comparados con otros disolventes como CHCl_3 , EtOH y Hex. También, encontraron que la mezcla MeOH/AcOEt 2:1, tuvo un aumento en el rendimiento de extracción de lípidos (tiempo de extracción 5 h a 60°C), en comparación con la extracción ejercida por estos mismos disolventes por separado (446.9% y 92.6%, respectivamente), y un incremento de 69.8% en comparación con la técnica de BD. Nosotros obtuvimos resultados similares, y podemos agregar que la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2), también ofrece una alta capacidad de extracción de lípidos equiparable a la de AcOEt/MeOH (1:2). Debido a las restricciones del uso del CHCl_3 como disolvente para extraer lípidos, Cequier et al. (2008) evaluaron al CH_2Cl_2 como disolvente alternativo al cloroformo, debido a sus menores toxicidad y restricciones medioambientales. Ellos utilizaron únicamente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en proporción 2:1, como mezcla para la extracción de lípidos en diversas muestras animales y vegetales. Encontraron que esta mezcla tuvo resultados comparables a los del $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1, pero una mayor cantidad de ácidos grasos en el caso de tejidos animales. En nuestro caso, la ES con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2) fue la de mayor eficiencia en la extracción de lípidos ($22.09\% \pm 0.21$), con resultados muy por encima a los generados por la técnica de Folch ($9.57\% \pm 0.27$) y BD ($10.61\% \pm 0.38$), mientras que para la EAIR se obtuvo un rendimiento de $15.56\% \pm 0.93$ (Figura 36). En *Tetraselmis* sp. se probó la

extracción de lípidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) y se comparó con otras mezclas como $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1), IsPrOH/Hex (1:1.25). El resultado de esta evaluación fue que el $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) obtuvo un mayor porcentaje de lípidos totales (15.05%) en comparación con las demás (Li et al., 2014).

En el caso de la mezcla de Hex/MeOH (1:2) se observaron también buenos resultados, para la ES se extrajo un $21.93\% \pm 1.59$ y en la EAIR un $14.05\% \pm 2.02$. Estos porcentajes fueron inferiores los de AcOEt/MeOH (1:2) y $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2) pero superiores a las demás mezclas y proporciones evaluadas. En un estudio previo, la capacidad de extracción (Soxhlet) de una mezcla de Hex/IsPrOH (3:2) fue evaluada y comparada en *Dunaliella* sp. contra la eficiencia de Hex puro y una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1). Los porcentajes de extracción fueron superiores (13.93%) a los del Hex puro (5.14%) e inferiores a los de la técnica de Folch (17.5%) (Zonouzi et al., 2016). En este reporte no fueron evaluadas otras mezclas, como lo hicimos en nuestro caso, en donde también observamos que la proporción 3:2 ($6.05\% \pm 0.27$) generó mejores resultados que la 2:1 ($5.65\% \pm 0.27$) y 1:2 ($5.30\% \pm 0.27$). De igual forma, nuestra mezcla de Hex/IsPrOH (3:2) en la ES, no tuvo un porcentaje de extracción lipídica superior a la técnica de Folch ($6.05\% \pm 0.31$ vs $9.57\% \pm 0.27$). No obstante, queda demostrado que la mezcla Hex/MeOH 1:2 tuvo rendimientos más altos que la Hex/IsPrOH en cualquiera de sus proporciones.

7.9.2 Efecto del disolvente

La elección del disolvente indicado y en particular, la identificación de una mezcla de disolventes con mayor eficiencia de extracción de lípidos es esencial para incrementar la rentabilidad del proceso, disminuir costos, y evitar contaminación ambiental. Como se muestra en la figura 36, las soluciones que mostraron mayor capacidad de extracción fueron las de AcOEt/MeOH (1:2), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ y Hex/MeOH (1:2). Para comprender cómo es que estos disolventes fueron capaces de extraer lípidos de la matriz celular, nos tenemos que remontar al principio de que la solubilidad de los compuestos orgánicos está basada en “lo similar disuelve a lo similar”. De esta manera, al utilizar un disolvente no polar (DNP) como Hex (0.009), AcOEt (0.228), o CH_2Cl_2 (0.309), (valores de polaridad relativa según Reichardt, 2007), estos penetran a través de la membrana celular hacia el citoplasma e interaccionan con los lípidos neutros, por medio de interacciones de Van der Waals, formando un complejo disolvente-lípidos (DL). El complejo DL se difunde a través

de la membrana celular hacia una fina capa estática de disolvente que rodea la célula, y finalmente, en una segunda difusión, el complejo DL se conduce y permanece en el disolvente orgánico extracelular (Figura 37A). Un mecanismo alternativo, es donde las gotas de lípidos (GL) contienen lípidos neutros y lípidos polares. Estas GL se encuentran asociadas a proteínas de membrana mediante enlaces de hidrógeno, lo cual hace imposible que un DNP rompa esta unión y se liberen las GL (Figura 37B). En este caso, un disolvente polar (DP) como IsPrOH (0.546), EtOH (0.654), MeOH (0.762), puede formar enlaces de hidrógeno con las GL y romper su asociación con proteínas de membrana celular, liberando el complejo y facilitando la difusión hacia la matriz extracelular (Halim et al., 2012). La ventaja de utilizar mezclas de DNP-DP, es que se pueden extraer las GL libres y asociadas, incrementando la eficiencia del proceso, aunque simultáneamente se extraen lípidos polares en el proceso.

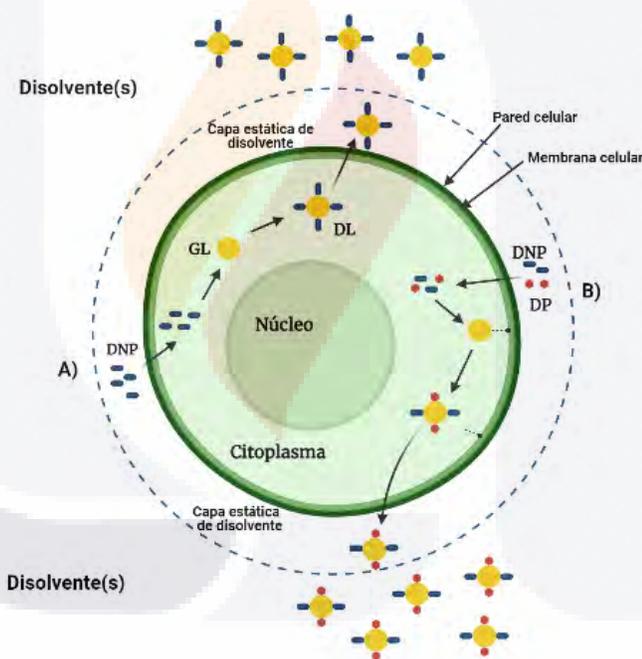


Figura 37. Diagrama del mecanismo propuesto para la extracción de lípidos por solventes en microalgas. A) Mecanismo de extracción por disolventes no polares. B) Mecanismo de extracción por disolventes polares y no polares. DNP: disolvente no polar, GL: gotas de lípidos, DL: complejo disolvente-lípidos, DP: disolvente polar. Imagen elaborada en Biorender.com. Adaptada de Halim et al. (2012).

Independientemente del disolvente no polar utilizado en las mezclas de extracción, la presencia del MeOH es indispensable para un mayor rendimiento lipídico. Nuestros resultados confirman la importancia de utilizar el MeOH para la extracción de lípidos como

está descrito por las técnicas de BD y Folch. La alta polaridad (0.762) de este disolvente, le provee gran capacidad de permear y penetrar la membrana celular, lo que le permite difundirse, interactuar, solubilizar y extraer los lípidos de la matriz intracelular (Wu et al., 2017). El AcOEt es un disolvente menos polar que el MeOH, y se ha reportado que tiene una alta selectividad para extraer lípidos neutros (Lu et al., 2015). Por esta razón, al utilizar dicha disolución, los porcentajes de extracción de lípidos se incrementaron.

El parámetro de solubilidad de Hildebrand (HSP) está relacionado íntimamente con la capacidad de un líquido para interactuar y solubilizar a otro líquido (nuestro caso las gotas de lípidos). Este se define como la raíz cuadrada de la densidad de la energía cohesiva, característica de las interacciones intermoleculares en un líquido o un sólido puro. Este parámetro de solubilidad está relacionado con la entalpía de la mezcla de acuerdo a la ecuación 6 (Fink, J. K., 2017):

$$\Delta H_m = n_s V_s \phi_p (\delta_s - \delta_p)^2 \text{ ec. 6}$$

Dónde ΔH_m , es el calor de mezcla; n_s , el número de moles de disolvente; V_s , el volumen molar de disolvente; ϕ_p , la fracción de volumen de polímero; δ_s , un parámetro de solubilidad del disolvente, y δ_p , un parámetro de solubilidad del polímero.

Esta ecuación describe que conforme la ΔG_m (energía de Gibbs) disminuye, la ΔH_m (entalpía) disminuye. Entonces, si dos parámetros de solubilidad de Hildebrand (de dos líquidos diferentes) se aproximan entre sí, el calor de mezcla se aproxima a un mínimo. Es decir, los líquidos con un parámetro de solubilidad similar tienen más probabilidades de ser miscibles. Para nuestro fin, las mezclas de disolventes con mayor capacidad de extracción de lípidos deberán tener un HSP similar al HSP de los lípidos a extraer, es por eso que al evaluar diferentes proporciones de disolventes se pudo encontrar las mezclas y proporciones adecuadas para este propósito, AcOEt/MeOH y CH₂Cl₂/MeOH (ambas 1:2). Los disolventes sin una alta polaridad como el AcOEt y el CH₂Cl₂, tienen un valor de HSP de 18.2 y 20.2, respectivamente. Mientras que el del disolvente polar (MeOH), es de 36.2 (Fink, J. K., 2017). De acuerdo a lo anterior, se puede proponer que al mezclar estos disolventes polares y no polares en proporción 1:2, se formó un líquido con HSP parecido al de las GL con gran potencial de romper y traspasar las membranas celulares; de solubilizar los lípidos totales, y de extraerlos con mayor facilidad del interior celular.

7.9.3 Optimización de la EAIR con metodología de superficie de respuesta

En la sección 7.9 se mostraron los resultados de los análisis previos de la EAIR bajo diversas mezclas y proporciones de disolventes. De acuerdo a esta sección, dos mezclas fueron las que mostraron una mayor eficiencia de extracción de lípidos totales en *S. obliquus*: CH₂Cl₂/MeOH (1:2) con 15.56% ± 0.93 y AcOEt/MeOH (1:2) con 15.43% ± 0.68 de rendimiento. No hay una diferencia significativa entre estos dos resultados, sin embargo, el CH₂Cl₂ es un disolvente clorado, que a pesar de tener un umbral límite de presencia (50 ppm) inferior al del CHCl₃ (Cequier et al., 2008), es más tóxico que el AcOEt (Joshi et al., 2019) y peligroso para la salud humana (Burek et al., 1984). Además, debido a la alta selectividad del AcOEt de extraer lípidos neutros (Lu et al., 2015), y con el fin de catalogar este proceso como una extracción ambientalmente amigable, se eligió la mezcla de AcOEt/MeOH para realizar la optimización de la EAIR.

7.9.3.1 Diseño central compuesto

Partiendo del análisis unidimensional realizado previamente, se determinó la región de operabilidad para llevar a cabo la MSR. Se realizaron 14 experimentos en orden aleatorio para reducir los efectos de variabilidad, y se incluyeron 6 réplicas en el punto central para un total de 20 ensayos. Las variables independientes fueron el tiempo de extracción (min), la relación masa/volumen de disolvente (g/mL) y la proporción de la mezcla (v/v) utilizada. El DCC junto con los resultados del rendimiento lipídico obtenido luego de realizar los experimentos, se muestran en la tabla 19.

Se calculó una ecuación polinómica cuadrática basada en el análisis de regresión múltiple con los datos y resultados derivados del DCC utilizando el algoritmo del software Design Expert (ec. 7):

$$R = 22.11 + 0.827X_1 + 0.769X_2 + -1.27X_3 + -0.196X_1X_2 + -0.031X_1X_3 + 0.138X_2X_3 + -0.593X_1^2 + -0.48X_2^2 + -0.337X_3^2 \quad \text{ec. 7}$$

Dónde R es la respuesta obtenida y representada como el % de lípidos totales extraídos, X₁, X₂, X₃, los factores.

Tabla 19. Diseño central compuesto factorial completo de las tres variables estudiadas. Datos obtenidos del % de lípidos totales extraídos de *S. obliquus*.

No. de experimento	X ₁ Tiempo de extracción (min)	X ₂ Relación masa/volumen (g/mL)	X ₃ Proporción de disolventes (v/v)	Rendimiento lípidos totales (%)
1	50	50	0.5	22.44
2	35	100	0.875	22.09
3	35	100	0.875	22.21
4	50	150	1.25	20.85
5	50	150	0.5	22.73
6	9.77	100	0.875	18.57
7	35	100	0.875	22.91
8	50	50	1.25	19.1
9	20	50	0.5	20.31
10	35	100	0.875	21.79
11	35	184.10	0.875	22.24
12	35	100	0.875	21.71
13	20	50	1.25	18
14	60.23	100	0.875	22.38
15	35	100	0.875	21.94
16	35	100	0.244	22.63
17	20	150	0.5	22.29
18	35	15.91	0.875	19.35
19	20	150	1.25	19.63
20	35	100	1.50567	19.08

En la tabla anterior, se muestra que el tiempo es un factor importante para incrementar el rendimiento de lípidos, conforme este va en aumento, la extracción se mejora. Sin embargo, dependiendo de la combinación de la relación m/v y la proporción de disolventes en la mezcla, es posible disminuir el tiempo de extracción y aumentar el rendimiento de los lípidos. En el análisis unidimensional previo (sección 7.9), el rendimiento más alto obtenido para la mezcla AcOEt/MeOH (1:2) fue de 15.43% ± 0.68. En los resultados del DCC, se muestra que los porcentajes aumentan significativamente, teniendo un porcentaje de extracción máximo de 22.91, para el experimento número 7.

Se determinó la significancia estadística del diseño experimental mediante la prueba F de ANOVA. La relación estadística entre la respuesta y los factores seleccionados con un nivel de confianza del 95% se muestra en la tabla 20. El análisis de regresión fue estadísticamente significativo, con un valor p en el modelo fue de < 0.0001 (< 0.05). El valor del coeficiente de determinación R² = 94.82%, nos dice que sólo el 5.18% de la variación en el modelo no puede explicarse, lo que confirma la compatibilidad con

los datos predichos por el modelo. Se puede observar que las variables con mayor impacto en el modelo son el tiempo ($p < 0.0001$) y la proporción de los disolventes ($p < 0.0001$).

Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado promedio	Valor F	Valor P
Modelo	45.69	9	5.08	20.35	< 0.0001
A	9.35	1	9.35	37.47	0.0001
B	8.09	1	8.09	32.43	0.0002
C	19.12	1	19.12	76.66	< 0.0001
AB	0.3081	1	0.3081	1.24	0.2924
AC	0.0078	1	0.0078	0.0313	0.8631
BC	0.1540	1	0.1540	0.6174	0.4502
A ²	4.65	1	4.65	18.63	0.0015
B ²	2.98	1	2.98	11.95	0.0062
C ²	2.71	1	2.71	10.86	0.0081
Residual	2.49	10	0.2494		
Error puro	0.9417	5	0.1883		

Desv. est. 0.4994, $R^2 = 0.9482$, R^2 ajustada = 0.9017, precisión adecuada = 15.74. A: tiempo, B: relación m/v, C: proporción de disolventes.

En la tabla 21 se muestran los parámetros de regresión de los modelos cuadráticos ajustados con sus respectivos coeficientes de determinaciones múltiples (R^2). Se obtuvieron buenos ajustes mientras que la variabilidad de la respuesta fue explicada por el modelo.

Tabla 21. Coeficientes de regresión del modelo de segundo orden predicho para el % de lípidos totales por EAIR.

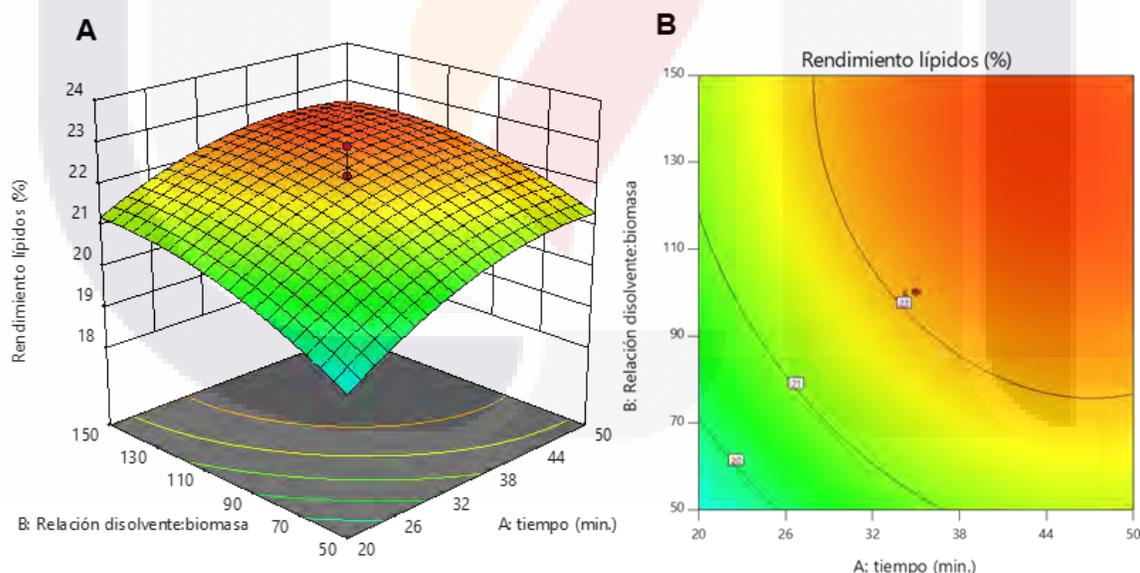
Fuente	Coefficiente estimado	Error estándar
Intercepción	22.11	0.2037
A	0.8272**	0.1351
B	0.7696**	0.1351
C	-1.18*	0.1351
AB	-0.1962	0.1766
AC	-0.0312	0.1766
BC	0.1388	0.1766
A ²	-0.5679*	0.1316
B ²	-0.4548*	0.1316
C ²	-0.4336*	0.1316
C.V. %	2.37	

A,B,C: linear. AB: interacción. A²,B² y C² cuadrático. * Significante al 5%.
 **significante al 1%.

El 0.9017 del coeficiente de determinación ajustado (R² ajustada) apoya la significación del modelo y reconstituye la expresión con todos los términos significativos mostrados. El bajo coeficiente de variación (2.37%) indica que los resultados obtenidos son confiables.

7.9.3.2 Análisis de la superficie de respuesta

Para determinar el valor óptimo de cada variable independiente y obtener la máxima respuesta, se elaboraron curvas de superficie de respuesta, la cuales describen las interacciones de las variables independientes. La relación entre las variables independientes y dependientes se muestra en gráficas de superficie de respuesta tridimensionales (3D) y en los gráficos de contorno bidimensionales (2D). La superficie de respuesta 3D y los gráficos de contorno 2D facilitan la representación gráfica de la ecuación de regresión obtenido en el modelo (Figura 38).



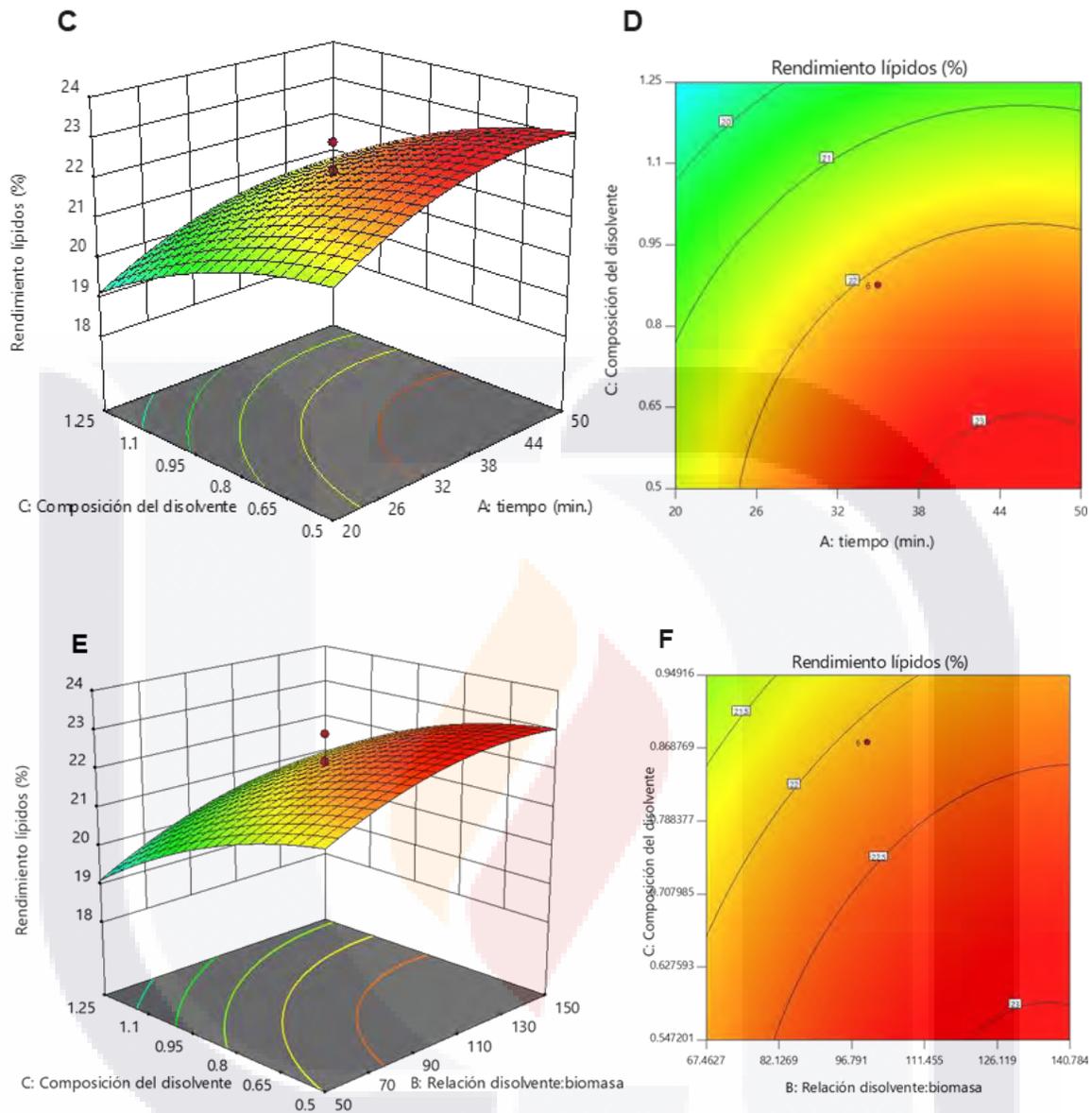


Figura 38. Gráficas del efecto del tiempo de extracción (X_1), composición del disolvente (X_2) y relación disolvente-biomasa (X_3) sobre el porcentaje de extracción de lípidos totales en *S. obliquus*. A, C y E: gráficas de superficie de respuesta; B, D y F: gráficas de contorno.

Las curvas de contorno representan un número infinito de combinaciones de dos variables independientes manteniendo a la tercer variable sin cambios. De esta forma, es como se pueden visualizar los gráficos de superficie de respuesta en 3D.

La figura 35A, muestra la respuesta de superficie desarrollada por el modelo para la interacción entre el tiempo de extracción y la relación disolvente/biomasa, estas variables mostraron tener efectos cuadráticos en la respuesta ya que el porcentaje de

lípidos se incrementó a un máximo de 22.91% conforme el tiempo se va incrementando, no obstante, existe un punto dónde el porcentaje no se modifica a pesar de que el tiempo se incrementa más allá de 50 min. De manera similar, en la gráfica de contornos 35B, en dónde se fijó la composición del disolvente, nos muestra la interacción entre el tiempo de extracción y la relación disolvente:biomasa. Esta interacción no fue estadísticamente significativa, aunque sí podemos observar que conforme se incrementan, de manera simultánea, los valores de estas dos variables, se incrementa el rendimiento de lípidos.

En la figura 35C, la relación disolvente/biomasa ejerció un efecto cuadrático significativo en la respuesta. Se observa un fino y constante incremento conforme se hace mayor el volumen total del disolvente, hasta alcanzar un máximo entre las regiones de 0.86-0.5. Al mantener constante la variable disolvente/biomasa, podemos observar la respuesta de la interacción entre el tiempo y la composición del disolvente. Esta interacción no fue significativa y mostró tener un efecto inverso, es decir, al disminuir la proporción de uno de los dos disolventes utilizados en la mezcla e incrementar el tiempo de extracción, se obtuvo una mejor respuesta.

La figura 35E y F, nos muestran el efecto cuadrático y de interacción entre la composición del disolvente y la proporción disolvente/biomasa. No se obtuvo una respuesta significativa entre la interacción de estas dos variables, y su comportamiento fue similar al de las variables tiempo y la composición del disolvente, esto es, al disminuir la composición del disolvente e incrementar la relación disolvente:biomasa, se observa una mejor respuesta.

7.9.3.3 Validación experimental

Finalmente, para darle soporte al estudio de optimización con MSR de la EAIR de lípidos, se realizaron los experimentos correspondientes bajo las condiciones óptimas predichas por el modelo (Tabla 22). En esta tabla se muestra como los valores predichos y experimentales son similares, con un 23.247% y 24.2%, respectivamente. Con este estudio de optimización, se logró incrementar el rendimiento de lípidos con el uso de la EAIR de $15.43\% \pm 0.68$ hasta $24.2\% \pm 0.97$, es decir un 63.76% más, previo a la optimización. Además, si comparamos estos resultados con los obtenidos mediante la ES, este porcentaje resultó ser superior ya que el máximo rendimiento obtenido por este método fue de $22.92\% \pm 0.70$. Cabe resaltar que bajo las condiciones en las que se obtuvo este porcentaje en la ES, el consumo de tiempo, energía (calor) e insumos, fue mucho

mayor (180 min de extracción con una relación m/v 1:750), a aquellas necesarias en la EAIR optimizada.

Tabla 22. Resultados de la validación del modelo teóricos contra los valores experimentales en la optimización por MSR de la EAIR.

Condiciones de optimización		Valor Predicho* (%)	Valor obtenido** (%)
Tiempo de extracción (min)	43.88		
Relación biomasa/ disolvente (g/mL)	1:129.90	23.247 ± 1.09	24.2 ± 0.97
Composición de disolvente (v/v) AcOEt/MeOH	0.57:2.43		

*Promedio ± IC (intervalo de confianza a 95%), ** Promedio ± DS (desviación estándar, $n = 4$).

Queda demostrado que la implementación de la EAIR junto con AcOEt/MeOH (0.57:2.43 v/v) para obtener lípidos totales en *S. obliquus* es un método seguro y sencillo, en dónde es posible obtener altos rendimientos de extracción, con una disminución en tiempo, gasto de energía e insumos durante el proceso.

8. CONCLUSIONES

El cultivo de *S. obliquus* bajo condiciones estándar, sin ningún tipo de estímulo o estrés, generó rendimientos lipídicos de aproximadamente 16%, con una biomasa de 0.7-0.8 g/L.

Todas las concentraciones evaluadas (10^{-5} M- 10^{-8} M) de BAP y AG M estimularon la densidad celular en *S. obliquus*. Sin embargo, BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M mostraron un mayor efecto, ya que incrementaron la cantidad de biomasa en alrededor de 50%. La producción de lípidos en *S. obliquus* también se estimuló por la presencia de BAP 10^{-5} M, la cual se incrementó a un 27%. Todas las concentraciones de AG a pesar de que tuvieron un efecto positivo en la tasa de crecimiento de la microalga no mostraron un incremento significativo en el rendimiento lipídico (17.9% con AG 10^{-6} M).

La combinación del estímulo de fitohormonas BAP 10^{-5} M y AG 10^{-6} M con estrés por ausencia (N-0) y deficiencia de N (N-25 y N-50) mantuvo el crecimiento celular cercano al de los cultivos controles N-100. No obstante, la tasa de crecimiento bajo estas condiciones fue significativamente superior en los cultivos suplementados con las fitohormonas en comparación con los cultivos sin estímulo más la N-deficiencia. La producción de lípidos en *S. obliquus* se incrementó hasta un 50% en los tratamientos con N-0 y, hasta 55% en el tratamiento BAP N-0. AG no mostró un estímulo en el rendimiento de los lípidos ya que generó resultados similares a aquellos obtenidos en los ensayos N-deficientes.

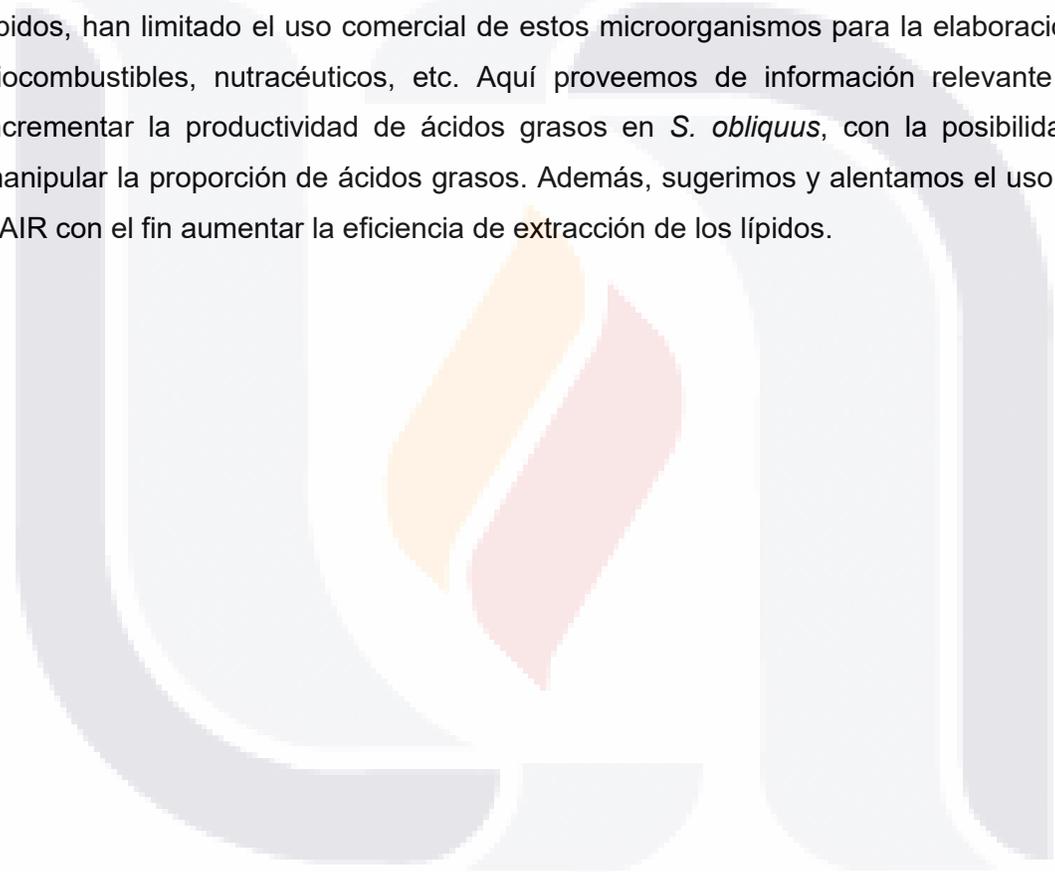
El perfil lipídico evaluado en los 16 tratamientos reveló que la presencia de estas fitohormonas, fue capaz de modificar la abundancia relativa de los ácidos grasos en el aceite de *S. obliquus*. Los incrementos más importantes se dieron en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, principalmente C16:0 y C18:1.

El análisis de expresión de genes de *ACP*, *FATA*, *SAD* y *DGAT* en los 16 tratamientos con BAP y AG N-deficientes, mostraron incrementos principalmente en ausencia de N. El efecto de BAP y AG N-deficientes en la expresión de *ACP*, *FATA*, *SAD* y *DGAT* fue, en algunos casos, ligeramente superior a la mostrada en los cultivos sin fitohormonas N-deficientes. Adicionalmente, se obtuvo una sobreexpresión de dos veces mayor en los tratamientos BAP y AG N-100 comparados con los N-100 sin estímulo.

La técnica de EAIR satisfizo los requisitos de una extracción “verde” y mostró ser superior a las técnicas convencionales de extracción de lípidos. Los rendimientos de los

lípidos fueron hasta un 152.8% mayor que la técnica de Folch, 128.0% mayor que la de Bligh-Dyer y 2% mayor que la Soxhlet. La utilización de la EAIR junto con el AcOEt/MeOH (0.57:2.43), disminuyó la toxicidad del proceso (vs Folch y BD), redujo el tiempo de extracción (de 180 min a 43.88 min), y el consumo de disolventes fue 6 veces menor (vs Soxhlet).

Finalmente, la cantidad y la proporción de los ácidos grasos es determinante para su aprovechamiento en el campo bioenergético, farmacéutico o alimentario. La relativa poca cantidad de aceite producido por las microalgas y la baja eficiencia de extracción de lípidos, han limitado el uso comercial de estos microorganismos para la elaboración de biocombustibles, nutracéuticos, etc. Aquí proveemos de información relevante para incrementar la productividad de ácidos grasos en *S. obliquus*, con la posibilidad de manipular la proporción de ácidos grasos. Además, sugerimos y alentamos el uso de la EAIR con el fin aumentar la eficiencia de extracción de los lípidos.



9. REFERENCIAS

- Abd El Baky, H. H., El-Baroty, G. S., Ibrahem, E. A. (2014). Antiproliferation and antioxidant properties of lipid extracts of the microalgae *Scenedesmus obliquus* grown under stress conditions. *Der Pharma Chemica*, 6(5), 24-34.
- Abdel-Daim, M. M., Farouk, S. M., Madkour, F. F., Azab, S. S. (2015). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 37(2), 126-139.
- Abdelhafez, H. M., El-Wahsh, A. M., y Ahmed, D. (2019). Hypolipidemic effects of aphanizomenon flos-aquae and slimquick on cardiac muscle fibers of the adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 77(3), 5258-5275.
- Abida H, Dolch LJ, Meï C, Villanova V, Conte M et al (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology*, 167(1),118-136.
- Abomohra, A. E. F., Wagner, M., El-Sheekh, M., Hanelt, D. (2013). Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. *Journal of applied phycology*, 25(4), 931-936.
- Abomohra, A. E. F., Jin, W., El-Sheekh, M. (2016). Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management*, 108, 23-29.
- Ackman, R. G., C. S. Tocher, J. McLachlan, (1968). Marine phytoplankter fatty acids. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 25(8), 1603-1620.
- Aftab, T., Khan, M. M. A., Idrees, M., Naeem, M. (2011). Optimizing nitrogen levels combined with gibberellic acid for enhanced yield, photosynthetic attributes, enzyme activities, and artemisinin content of *Artemisia annua*. *Frontiers of Agriculture in China*, 5(1), 51-59.
- Algotharm Cosmétique Marine, (2020). Diciembre 16. Recuperada de <https://algotharm.lv/en/seaweed/scenedesmus-obliquus-en/>.
- Al Hattab, M.; Ghaly, A. (2015). Microalgae oil extraction pre-treatment methods: critical review and comparative analysis. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*. 5, 172.
- Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M. C., Perales, J. A. (2015). Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. *Bioresource technology*, 181, 90-96.
- Amdoun, R., Benyoussef, E. H., Benamghar, A., Sahli, F., Bendifallah, N., Khelifi, L. (2021). Approaches for Modeling and Optimization of the Secondary Metabolite Production by Plant Biotechnology Methods. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications*, 803-836.

- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, London.
- Andrews, M., Raven, J. A., Lea, P. J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of applied biology*, 163(2), 174-199.
- Anschau, A., Caruso, C. S., Kuhn, R. C., Franco, T. T. (2017). Validation of the sulfo-phospho-vanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 19-27.
- Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 95-98.
- Aznar-Moreno, J. A., Sánchez, R., Gidda, S. K., Martínez-Force, E., Moreno-Pérez, A. J., Venegas Calerón, M., Salas, J. J. (2018). New insights into sunflower (*Helianthus annuus* L.) FatA and FatB thioesterases, their regulation, structure and distribution. *Frontiers in plant science*, 9, 1496.
- Babu, A. G., Wu, X., Kabra, A. N., Kim, D. P. (2017). Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. *Algal research*, 23, 178-185.
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., O'Leary, S. J. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of applied phycology*, 31(1), 309-318.
- Becker, W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Eds.)
- Ben-Amotz, A., T. G. Tornabene, W. H. Thomas (1985). Chemical profiles of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology*, 21(1), 72-81.
- Ben-Amotz, A. (1996). Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of phycology*, 32(2), 272-275.
- Benemann, J. R. (1978). *Biofuels: a survey* (No. EPRI-ER-746-SR). Electric Power Research Inst. (EPRI), Palo Alto, CA (United States).
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bishop, W. M., Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2(5), 1-6.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bogos B, Ughy B, Domonkos I, Laczkó-Dobos H, Komenda J, Abasova L, Cser K, Vass I, Sallai A, Wada H, Gombos Z (2010). Phosphatidylglycerol depletion affects photosystem II activity in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. *Photosynthesis Research*, 103(1), 9-30.

- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of applied phycology*, 7(1), 3-15.
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., and Raven, J. A. (Eds.). (2016). *The physiology of microalgae* (Vol. 6). Cham: Springer.
- Brown, L.M., Zeiler, K.G., (1993). Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conv. Manage.* 34(9-11), 1005-1013.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 143, 1-9.
- Budhaultiya, R., Purkayastha, J. (2017). Differential expression of acetyl-CoA carboxylase (accase) gene in *Chlorella ellipsoidea* under nitrogen replete and deplete condition along with growth, lipid and fatty acid profile. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 3(1), 287-294.
- Byers, D. M., Gong, H. (2007). Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(6), 649-662.
- Camara, M. C., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C., Bertrand, E., Soccol, C. R. (2018). Current advances in gibberellic acid (GA3) production, patented technologies and potential applications. *Planta*, 248(5), 1049-1062.
- Cai, Y.; Yu, Y.; Duan, G.; Li, Y. (2011). Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872-1877.
- Cao, H. (2011). Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms. *BMC research notes*, 4(1), 249.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Schiavo, F. L. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3), 413-421.
- Cartens, M., Grima, E. M., Medina, A. R., Giménez, A. G., González, J. I. (1996). Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(8), 1025-1031.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A. G., Zarate, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4297-4303.
- Chacón-Lee, T. L., González-Marino, G. E. (2010). Microalgae for healthy foods - Possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6), 655-675.
- Chan, D. I., Vogel, H. J. (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal*, 430(1), 1-19.

Cheab, D., El Darra, N., Rajha, H. N., El-Ghazzawi, I., Mouneimne, Y., Jammoul, A., Louka, N. (2018). Study of the selectivity and bioactivity of polyphenols using infrared assisted extraction from apricot pomace compared to conventional methods. *Antioxidants*, 7(12), 174.

Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206.

Chen, H., Hu, J., Qiao, Y., Chen, W., Rong, J., Zhang, Y., Wang, Q. (2015). Ca²⁺-regulated cyclic electron flow supplies ATP for nitrogen starvation-induced lipid biosynthesis in green alga. *Scientific reports*, 5, 15117.

Chen, J. E., Smith, A. G. (2012). A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *Journal of biotechnology*, 162(1), 28-39.

Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., Surampalli, R. Y. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 336-346.

Chen, W. C., Hsu, Y. C., Chang, J. S., Ho, S. H., Wang, L. F., Wei, Y. H. (2019). Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga *Scenedesmus obliquus* CWL-1. *Bioresource technology*, 291, 121891.

Chen, Y., Duan, G., Xie, M., Chen, B., Li, Y. (2010). Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae*. *Journal of separation science*, 33(17-18), 2888-2897.

Chen, Z., Wang, L., Qiu, S., Ge, S. (2018). Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production. *BioMed Research International*, 2018.

Cheung, P. C., Leung, A. Y., Ang, P. O. (1998). Comparison of supercritical carbon dioxide and Soxhlet extraction of lipids from a brown seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4228-4232.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.

Choi, G. G., Kim, B. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2011). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Journal of applied phycology*, 23(6), 1031-1037.

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 60.

Christie, W.W. (2020) A Lipid Primer-the Diversity of Natural Lipids. Recuperado de https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/basics/whatlip/index.htm

Cohen, Z., Margheri, M. C., Tomaselli, L. (1995). Chemotaxonomy of cyanobacteria. *Phytochemistry*, 40(4), 1155-1158.

Cook, H. W., McMaster, C. R. (2002). Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In *New comprehensive biochemistry* (Vol. 36, pp. 181-204). Elsevier.

Costa, J. A. V., Cozza, K. L., Oliveira, L., Magagnin, G. (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 439-442.

Czerpak, R., Bajguz, A. (1997). Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenes, with differential effects on xanthophylls in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66(1), 41-46.

Dai, Y. M., Chen, K. T., Chen, C. C. (2014). Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 250, 267-273.

Dao, G. H., Wang, X. X., Zhang, T. Y., Wu, G. X., Zhan, X. M., Hu, H. Y. (2019). Enhanced biomass production and fatty acid accumulation in *Scenedesmus* sp. LX1 treated with 6-benzylaminopurine. *Algal Research*, 44, 101714.

Ding, W., Peng, J., Zhao, Y., Zhao, P., Xu, J. W., Li, T., Yu, X. (2019). A strategy for boosting astaxanthin accumulation in green microalga *Haematococcus pluvialis* by using combined diethyl aminoethyl hexanoate and high light. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 171-181.

de Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Moreira, L. S., Maciel, M. R. W., Maciel Filho, R. (2019). Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renewable Energy*, 143, 130-141.

Demirbas A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. 51(12), 2738-49.

Dörmann, P. (2005) Membrane lipids. In: Murphy D (ed). *Plant lipids Biology*, utilization and manipulation. CRC Press, Boca Raton, 123-160.

Doyle, K. (1996). The source of discovery: protocols and applications guide. *Madison: PROMEGA*.

Du, H., Ahmed, F., Lin, B., Li, Z., Huang, Y., Sun, G., Gao, Z. (2017). The effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* ZF strain. *Energies*, 10(11), 1696.

Du, H., Ren, J., Li, Z., Zhang, H., Wang, K., Lin, B., Gao, Z. (2020). Plant growth regulators affect biomass, protein, carotenoid, and lipid production in *Botryococcus braunii*. *Aquaculture International*, 1-22.

Du, K.; Tao, H.; Wen, X.; Geng, Y.; Li, Y. (2015) Enhanced growth and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* by plant growth regulator GA3. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24, 3414-3419.

Fakhry, E. M., El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56(1), 6.

Fallah, A. A., Sarmast, E., Dehkordi, S. H., Engardeh, J., Mahmoodnia, L., Khaledifar, A., Jafari, T. (2018). Effect of *Chlorella* supplementation on cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical nutrition*, 37(6), 1892-1901.

Falkowska, M., Pietryczuk, A., Piotrowska, A., Bajguz, A., Grygoruk, A., Czerpak, R. (2011). The Effect of Gibberellic Acid (GA 3) on growth, metal Biosorption and metabolism of the Green Algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck Exposed to Cadmium and Lead Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(1), 53-59.

Fan, J.; Cui, Y.; Wan, M.; Wang, W. (2014) Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 17.

Farmer, R., Thomas, C. M., Winn, P. J. (2019). Structure, function and dynamics in acyl carrier proteins. *PLoS one*, 14(7), e0219435.

Feng, P., Yang, K., Xu, Z., Wang, Z., Fan, L., Qin, L., Hu, L. (2014). Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource technology*, 173, 406-414.

Fink, J. K. (2017). *Reactive polymers: fundamentals and applications: a concise guide to industrial polymers*. William Andrew.

Folch, J., Lees, M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Fox, B.G., Shanklin, J., Somerville, C., Munck, E. (1993) Stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90, 2486-2490.

Fox, B.G., Shanklin, J., Ai, J., Loehr, T.M., Sanders-Loehr, J., (1994) Resonance Raman evidence for an Fe-O-Fe center in stearoyl-ACP desaturase. Primary sequence identity with other diiron-oxo proteins. *Biochemistry*, 33, 12776-12786.

Fox, B. G., Lyle, K. S., Rogge, C. E. (2004). Reactions of the diiron enzyme stearoyl-acyl carrier protein desaturase. *Accounts of chemical research*, 37(7), 421-429.

Fu, Y., Zhang, L., Chen, G. (2011). Determination of carbohydrates in Folium *Lysium Chinensis* using capillary electrophoresis combined with far-infrared light irradiation-assisted extraction. *Journal of Separation Science*, 34, 3272-3278.

Gao, Y., Yang, M. and Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresouce technology*, 147, 484-91.

George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and

physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*-A potential strain for biofuel production. *Bioresource technology*, 171, 367-374.

Gerken, H. G., Donohoe, B., Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237(1), 239-253.

Goodman, J. M. (2009). Demonstrated and inferred metabolism associated with cytosolic lipid droplets. *Journal of lipid research*, 50(11), 2148-2156.

Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports*, 34(4), 545-555.

Gordon, H. T., Bauernfeind, J. C., y Furia, T. E. (1983). Carotenoids as food colorants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(1), 59-97.

Gouveia, L., Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36(2), 269-274.

Gouveia, L., Oliveira, A. C., Congestri, R., Bruno, L., Soares, A. T., Menezes, R. S., Tzovenis, I. (2017). Biodiesel from microalgae. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, 235-258. Woodhead Publishing.

Grama, B. S., Delhaye, A., Agathos, S. N., Jeffryes, C. (2016). β -carotene and other carotenoids and pigments from microalgae. En Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (eds). *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, pp. 265-286.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27(3), 597-613.

Guldhe, A., Renuka, N., Singh, P., Bux, F. (2019). Effect of phytohormones from different classes on gene expression of *Chlorella sorokiniana* under nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production. *Algal Research*, 40, 101518.

Guschina, I. A., Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45(2), 160-186.

Gutiérrez Pulido, H., De la Vara Salazar, R., Cano Carrasco, A. R. T. (2008). Análisis y diseño de experimentos. Tercera ed., McGraw Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.

Halim, R., Danquah, M. K., Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances*, 30(3), 709-732.

Halperin, S. A., Smith, B., Nolan, C., Shay, J., y Kralovec, J. (2003). Safety and immunoenhancing effect of a *Chlorella*-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, 169(2), 111-117.

Hamed, I. (2016). The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104-1123.

Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., Yan, Y. (2018). Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. *Fermentation*, 4(2), 25.

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763-784.

Harwood, J.L. (1998) *Membrane lipids in algae*. En Siegenthaler PA, Murata N (eds). Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics. Kluwer, Dordrecht, pp. 53-64.

Hashtroudi, M. S., Shariatmadari, Z., Riahi, H., Ghassempour, A. (2013). Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from northern Iran, as rich sources of major carotenoids. *Food chemistry*, 136(3-4), 1148-1153.

Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16(1), 143-169.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., y Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 185-196.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.

Huang, Y., Cui, G., Li, B., Zhu, X., Yang, Z. (2018). Elevated atmospheric CO₂ enhances grazer-induced morphological defense in the freshwater green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography*, 63(2), 1004-1014.

Ido, A. L., de Luna, M. D. G., Capareda, S. C., Maglinao Jr, A. L., Nam, H. (2018). Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. *Energy*, 157, 949-956.

Ikaran, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S. (2015). The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal research*, 10, 134-144.

Indira, P., Biswajit, R. (2012). Commercial and industrial applications of microalgae-A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100

Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Venkatakrishnan, V., Nagaraj, S., y Rengasamy, R. (2013). *In vitro* anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3(2), 99-105

Jez, S., Spinelli, D., Fierro, A., Dibenedetto, A., Aresta, M., Busi, E., Basosi, R. (2017). Comparative life cycle assessment study on environmental impact of oil production from microalgae and terrestrial oilseed crops. *Bioresource technology*, 239, 266-275.

Joshi, D. R., Adhikari, N. (2019). An overview on common organic solvents and their toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1-18.

Jouni, Z., Makhoul, Z. (2012). *U.S. Patent Application No. 13/488,018*.

Joventino, I. P., Alves, H. G., Neves, L. C., Pinheiro-Joventino, F., Leal, L. K. A., Neves, S. A., y Viana, G. B. (2012). The microalga *Spirulina platensis* presents anti-inflammatory

action as well as hypoglycemic and hypolipidemic properties in diabetic rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 9(1).

Juneja, A., Ceballos, R. M., Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607-4638.

Jusoh, M., Loh, S. H., Aziz, A., San Cha, T. (2019). Gibberellin promotes cell growth and induces changes in fatty acid biosynthesis and upregulates fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* UMT-M1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(2), 450-459.

Kageyama, H., Waditee-Sirisattha, R., Tanaka, Y., Takabe, T. (2017). Osmoprotectant and sunscreen molecules from halophilic algae and cyanobacteria. *Algal green chemistry*. En Elsevier (eds), pp. 1-16.

Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L. A., Gleadow, R., Beardall, J. (2016). Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1509-1520.

Karim, A., Islam, M. A., Khalid, Z. B., Faizal, C. K. M., Khan, M. M. R., Yousuf, A. (2020). Microalgal cell disruption and lipid extraction techniques for potential biofuel production. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 129-147). Academic Press.

Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701.

Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: recent advances in gene identification. *Biochimie*, 93(1), 91-100.

Kirchner, L., Wirshing, A., Kurt, L., Reinard, T., Glick, J., Cram, E. J., Lee-Parsons, C. W. (2016). Identification, characterization, and expression of diacylglycerol acyltransferase type-1 from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 13, 167-181.

Kiran, B., Kumar, R., Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy conversion and management*, 88, 1228-1244.

Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., Deshmukh, D. (2016). Statistical optimization using central composite design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. *Ecological Engineering*, 92, 73-81.

Klaitong, P., Fa-Aroonsawat, S., Chungjatupornchai, W. (2017). Accelerated triacylglycerol production and altered fatty acid composition in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-10.

Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., Nishimura, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Wada, H., Masuda, T., Ohta, H. (2013). Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 73(2), 250-261.

Koller, M., Muhr, A., y Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal research*, 6, 52-63.

Kokkiligadda, S., Pandey, B., Ronda, S. R. (2017). Effect of plant growth regulators on production of alpha-linolenic acid from microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Sādhanā*, 42(10), 1821-1824.

Konícková, R., Vanková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Muchová, L., Subhanová, I., Strnad, H. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, 13(2), 273-283.

Kumar, S. J., Kumar, G. V., Dash, A., Scholz, P., Banerjee, R. (2017). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research*, 21, 138-147.

Kumar, V., Bhatnagar, A. K., Srivastava, J. N. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 7043-7048.

Kuriakose, G. C., y Kurup, M. G. (2008). Evaluation of renoprotective effect of aphanizomenon flos-aquae on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Renal failure*, 30(7), 717-725.

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC plant biology*, 11(1), 124.

Lázaro, B., Villa, J. A., Santín, O., Cabezas, M., Milagre, C. D., De La Cruz, F., Moncalián, G. (2017). Heterologous expression of a thermophilic diacylglycerol acyltransferase triggers triglyceride accumulation in *Escherichia coli*. *PloS one*, 12(4), e0176520.

Leblond, J. D., Chapman, P. J. (2000). Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids in marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 36(6), 1103-1108.

Lee, S. Y., Khoiroh, I., Vo, D. V. N., Kumar, P. S., Show, P. L. (2020). Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-21.

Neetoo, H., Chen, H. (2014). Alternative food processing technologies. Food Processing: Principles and Applications, 2nd ed.; Clark, S., Jung, S., Lamsal, B., Eds, 137-169.

Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L., Wang, J. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 18.

Li, Y., Naghdi, F. G., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., Schenk, P. M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-9.

Liady, M. N. D., Tangou, T. T., Fiogbe, E. D., Cauchie, H. M., Vassel, J. L. (2015). About the interest of a zooplankton compartment in pond systems: methodology to study the

growth kinetic of *Daphnia pulex* on *Scenedesmus* sp. *Water Science and Technology*, 71(10), 1436-1443.

Liao, Y. (2014). Mixotrophic cultivation of the microalga *Scenedesmus obliquus* with reused municipal wastewater (Tesis de maestría). Recuperada de azu.azd.edu/etd/13489/sip1.m.pdf (arizona.edu).

Li, D. W., Cen, S. Y., Liu, Y. H., Balamurugan, S., Zheng, X. Y., Alimujiang, A., Li, H. Y. (2016). A type 2 diacylglycerol acyltransferase accelerates the triacylglycerol biosynthesis in heterokont oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of biotechnology*, 229, 65-71.

Li, H., He, J., Yin, R., Mou, Q., Bai, Y., Yang, B. (2019). Green, infrared-assisted extraction based on statistical modeling for ultra-high performance liquid chromatography determination of bioactive isoflavones from *Puerariae Lobatae*. *Separation Science Plus*, 2(6), 216-224.

Li, R., Yu, K., Hildebrand, D. F. (2010). DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 45(2), 145-157.

Limón, P., Malheiro, R., Casal, S., Acién-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., Rodrigues, N., Pereira, J. A. (2015). Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. *Food chemistry*, 175, 203-211.

Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y., Meng, C. (2018). Plant growth regulators promote lipid and carotenoid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1549-1561.

Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., Shanklin, J. (1996). Crystal structure of delta-9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO journal*, 15(16), 4081-4092.

Liu, B., Benning, C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 300-309.

Liu, J. G., Hou, C. W., Lee, S. Y., Chuang, Y., Lin, C. C. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. *Process biochemistry*, 46(7), 1405-1410.

Liu, J., Sun, Z., Zhong, Y., Huang, J., Hu, Q., Chen, F. (2012). Stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from the oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*: cloning, characterization and transcriptional analysis. *Planta*, 236(6), 1665-1676.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.

López-Bascón, M. A., de Castro, M. L. (2020). Soxhlet extraction. In *Liquid-Phase Extraction* (pp. 327-354). Elsevier.

Lu, W., Wang, Z., Yuan, Z. (2015). Characteristics of lipid extraction from *Chlorella* sp. cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. *Bioresource technology*, 191, 433-437.

Ma, X. N., Chen, T. P., Yang, B., Liu, J., Chen, F. (2016). Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine drugs*, 14(4), 61.

Mahale, V. E., Chaugule, B. B. (2013). Optimization of freshwater green alga *Scenedesmus incrassatulus* for biomass production and augmentation of fatty acids under abiotic stress conditions. *Phykos*, 43(1), 22-31.

Mandal, M. K., Chanu, N. K., Chaurasia, N. (2020). Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: A potential approach for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 297, 122439.

Maršálek, B., Zahradníčková, H., Hronková, M. (1992). Extracellular abscisic acid produced by cyanobacteria under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 139(4), 506-508.

Marrez, D. A., Naguib, M. M., Sultan, Y. Y., Higazy, A. M. (2019). Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. *Heliyon*, 5(3), e01404.

Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.

Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., y Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food and function*, 8(8), 2672-2685.

Mc Gee, D., Archer, L., Fleming, G. T., Gillespie, E., Touzet, N. (2020). The effect of nutrient and phytohormone supplementation on the growth, pigment yields and biochemical composition of newly isolated microalgae. *Process Biochemistry*, 92, 61-68.

McNichol, J., MacDougall, K. M., Melanson, J. E., McGinn, P. J. (2012). Suitability of Soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. *Lipids*, 47(2), 195-207.

Merz, C.R. and Main, K.L. (2017). microalgae bioproduction-feeds, foods, nutraceuticals, and polymers. En *Fuels, chemicals and materials from the oceans and aquatic sources* (eds F.M. Kerton and N. Yan), pp. 83-112.

Mindrebo, J. T., Misson, L. E., Johnson, C., Noel, J. P., Burkart, M. D. (2020). Activity mapping the acyl carrier protein: elongating ketosynthase interaction in fatty acid biosynthesis. *Biochemistry*, 59(38), 3626-3638.

Mišurcová, L., Ambrožová, J., Samek, D. (2011). Seaweed lipids as nutraceuticals. In *Advances in food and nutrition research*, vol. 64, pp. 339-355. Academic Press.

Momeni, M. M., Kahforoushan, D., Abbasi, F., Ghanbarian, S. (2018). Using chitosan/CHPATC as coagulant to remove color and turbidity of industrial wastewater: optimization through RSM design. *Journal of environmental management*, 211, 347-355.

Morelli, E., y Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, 167(2), 289-296.

Moser, B. R. (2011). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *Biofuels*, 285-347.

Mou, Q., He, J., Yin, R., Yang, B., Fu, M., Fang, J., Li, H. (2017). Response surface optimized infrared-assisted extraction and UHPLC determination of flavonoid types from *Flos Sophorae*. *Molecules*, 22(6), 1000.

Mourelle, M. L., Gómez, C. P., Legido, J. L. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, 4(4), 46.

Mousavi, P.; Morowvat, M.H.; Montazeri-Najafabady, N.; Abolhassanzadeh, Z.; Mohagheghzadeh, A.; Hamidi, M.; Niazi, A.; Ghasemi, Y. (2016). Investigating the effects of phytohormones on growth and β -carotene production in a naturally isolates stain of *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 164-171.

Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, T. V. (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, 7, 117-123.

Murphy, D. J. (Ed.). (2009). *Plant lipids: biology, utilization and manipulation*. John Wiley & Sons.

Murthy, K. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., Ravishankar, G. A. (2005). *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*-a green microalga. *Life Sciences*, 76(12), 1381-1390.

Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P. C., Jayaraman, H., Alagarsamy, V., Pugazhendhi, A., Ponnusamy, V. K. (2020). Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. *Process Biochemistry*, 91, 1-14.

Nakamura, Y., Li-Beisson, Y. (Eds.) (2016). *Lipids in plant and algae development*. Cham: Springer International Publishing.

Neetoo, H., Chen, H. (2014). Alternative food processing technologies. *Food Processing: Principles and Applications*, 2nd ed.; Clark, S., Jung, S., Lamsal, B., Eds, 137-169.

Norlina, R., Norashikin, M. N., Loh, S. H., Aziz, A., San Cha, T. (2020). Exogenous abscisic acid supplementation at early stationary growth phase triggers changes in the regulation of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* UMT-M1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-17.

Odadjare, E. C., Mutanda, T., Olaniran, A. O. (2017). Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), 37-52.

Pan, X., Chang, F., Kang, L., Liu, Y., Li, G., Li, D. (2008). Effects of gibberellin A3 on growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). *Journal of plant physiology*, 165(16), 1691-1697.

Pandian, P., David, R. A. (2012). *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae. *Current Science*, 102(4), 616-620.

Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, 31(4), 391-401.

Park, W. K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C. W., Choi, Y. E., Yang, J. W. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(5), 1128-1142.

Patnaik, R., Mallick, N. (2015). Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass as feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: an integrated paradigm for microalgal biorefinery. *Algal research*, 12, 328-336.

Peng, Z., Zhang, H., Tian, H., Shan, L., Zhang, Z., Ding, H., Li, X. (2020). The phylogeny and functional characterization of peanut acyl-ACP thioesterases. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-12.

Pienkos, P. T., Darzins, A. L. (2009). The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 3(4), 431-440.

Piotrowska, A., Czerpak, R. (2009). Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine-and phenylurea-type cytokinins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 573-585.

Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A. (2014). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation*, 73(1), 57-66.

Priyadarshani, I., Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of microalgae-A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100.

Pulz, O., y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), 635-648.

Putri, L. S. E. (2015). Biosorption ability of microalgae *Scenedesmus dimorphus* for Cr (VI) and Cd in aqueous solution. *Advanced Science Letters*, 21(2), 196-198.

Qu, Y., Li, C., Zhang, C., Zeng, R., Fu, C. (2016). Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 148, 345-353.

Raafat, K., El-Darra, N., Saleh, F. A., Rajha, H. N., Maroun, R. G., Louka, N. (2018). Infrared-assisted extraction and HPLC-analysis of *Prunus armeniaca* L. (pomace) and detoxified-kernel and their antidiabetic effects. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 156-167.

Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. (2017). Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 765-773.

Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 2, 61.

Ravindran, B., Kurade, M. B., Kabra, A. N., Jeon, B. H., Gupta, S. K. (2017). Recent advances and future prospects of microalgal lipid biotechnology. In *Algal Biofuels*, Springer, Cham., pp. 1-37.

Reddy, D. R. D., Suvarna, D., Rao, D. M. (2014). Effects of 6-benzyl amino purine (6-BAP) on *in vitro* shoot multiplication of *Grand Naine* (Musa sp.). *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 5(1), 36-42.

Reichardt, C. (2007). Solvents and solvent effects: an introduction. *Organic process research and development*, 11(1), 105-113.

Renuka, N.; Guldhe, A.; Singh, P.; Ansari, F.A.; Rawat, I.; Bux, F. (2017). Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. *Energy Conversion and Management*, 140, 14-23.

Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B. Z., Bibby, K., Peccia, J. (2011). Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC genomics*, 12(1), 148.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.

Romanenko, K. O., Kosakovskaya, I. V., Romanenko, P. O. (2016). Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. *International Journal on Algae*, 18(2), 179-201.

Ryckebosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K., y Foubert, I. (2012). Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24(6), 128-130

Sabatini, S. E., Juarez, A. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., Molina, M. D. C. R. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1200-1206.

Salama, E.S., Kabra, A.N., Ji, M.K.; Kim, J.R., Min, B., Jeon, B.H. (2014). Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresource Technology*, 172, 97-103.

Salas, J. J., Ohlrogge, J. B. (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403(1), 25-34.

Sato N, Moriyama T (2007) Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis. *Eukaryot Cell*, 6(6), 1006-1017.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Schaller, G. E., Street, I. H., Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current opinion in plant biology*, 21, 7-15.

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, 1(1), 20-43.

Servel, M. O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L., De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36(3), 691-693.

Shankar, M., Chhotaray, P. K., Agrawal, A., Gardas, R. L., Tamilarasan, K., Rajesh, M. (2017). Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococcum* microalgae. *Algal research*, 25, 228-236.

Sharma, T., Gour, R. S., Kant, A., Chauhan, R. S. (2015). Lipid content in *Scenedesmus* species correlates with multiple genes of fatty acid and triacylglycerol biosynthetic pathways. *Algal research*, 12, 341-349.

Shetty, P. J. The Evolution of DNA Extraction Methods. (2020) - 8(1). AJBSR.MS.ID.001234

Shibaoka, H. (1993). Regulation by gibberellins of the orientation of cortical microtubules in plant cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20(5), 461-470.

Silambarasan, T., Kumaran, M., Kalaichelvan, D., Dhandapani, R. (2014). Antioxidant and antiproliferative activity of the extract from fresh water algae *Scenedesmus obliquus* RDS01. *International Journal of Advanced Engineering and Science*, 1, 37-40.

Silverstein R. M.; Webster, F. X, Kiemle, D. J., Bryce, D. L., (2015). *Spectrometric identification of organic compounds*. Eighth edition Hoboken, NJ: Wiley.

Singh, P., Rani, B., Chauhan, A. K., Maheshwari, R. (2012). Lycopene's antioxidant activity in cosmetics meadow. *International research journal of pharmacy*, 3(1), 46-47.

Sirikhachornkit, A., Suttangkakul, A., Vuttipongchaikij, S., Juntawong, P. (2018). *De novo* transcriptome analysis and gene expression profiling of an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus* TISTR8540 during nitrogen deprivation-induced lipid accumulation. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.

Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A. (2020). Plant hormone induced enrichment of *Chlorella* sp. omega-3 fatty acids. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 7.

Skjanes, K., Celine, R., Peter, L. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in Biotechnology*, 33(2), 172-215.

Slocombe, S. P., Benemann, J. R. (Eds.). (2017). *Microalgal production for biomass and high-value products*. CRC Press.

Solana, M., Rizza, C. S., Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between

Scenedesmus obliquus, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311-318.

Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 167-176.

Souza, J.M.; Yokoya, N.S. (2016). Effects of cytokinins on physiological and biochemical responses of the agar-producing red alga *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 28, 3491-3499.

Stirk, W. A., van Staden, J., Novák, O., Doležal, K., Strnad, M., Dobrev, P. I., Balint, P. (2011). Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle 1. *Journal of Phycology*, 47(2), 291-301.

Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Van Staden, J. (2014). Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 66-76.

Stolz, P., Obermayer, B. (2005). Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics and toiletries*, 120(3), 99-106.

Sugimoto K, Sato N, Tsuzuki M (2007). Utilization of a chloroplast membrane sulfolipid as a major internal sulfur source for protein synthesis in the early phase of sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 581(23), 4519-4522.

Sulochana, S. B., Arumugam, M. (2016). Influence of abscisic acid on growth, biomass and lipid yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresource Technology*, 213, 198-203.

Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., Huang, H. (2019). Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(4), 552-566.

Sun, F., Chen, H., Chen, D., Tan, H., Huang, Y., Cozzolino, D. (2020). Lipidomic Changes in Banana (*Musa cavendish*) during Ripening and Comparison of Extraction by Folch and Bligh–Dyer Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), 11309-11316.

Takeda, H. (1996). Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, 42(3), 673-675.

Tang, B., Row, K. H. (2013). Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *Journal of chromatographic science*, 51(7), 599-607.

Tang, G., y Suter, P. M. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1(2), 111-118.

Tat, M. E., Wang, P. S., Van Gerpen, J. H., Clemente, T. E. (2007). Exhaust emissions from an engine fueled with biodiesel from high-oleic soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(9), 865-869.

Thinakar Vel, M., Von der Weid, D., Edwin, N. (1999). *Spirulina*, a nutrition booster. In 7th World Congress on Clinical Nutrition, New Delhi, India.

Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M., y Yamashita, E. (2012). Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1).

Udayan, A., Kathiresan, S., Arumugam, M. (2018). Kinetin and Gibberellic acid (GA3) act synergistically to produce high value polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201. *Algal research*, 32, 182-192.

UTEX "Culture collection of algae at the University of Texas at Austin", 2020. Recuperado de <https://utex.org/>.

Vescovi, M., Riefler, M., Gessuti, M., Novák, O., Schmölling, T., Lo Schiavo, F. (2012). Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4. *Journal of experimental botany*, 63(7), 2825-2832.

Vicente, A. A. (2007). Novel technologies for the thermal processing of foods.

Vo, T. S., Ngo, D. H., Kim, S. K. (2012). Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochemistry*, 47(3), 386-394.

von Alvensleben, N., Heimann, K. (2018). The potential of microalgae for biotechnology: a focus on carotenoids. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, 1, 117-142.

Wagner, M., Hoppe, K., Czabany, T., Heilmann, M., Daum, G., Feussner, I., Fulda, M. (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), 407-416.

Wang, M., Chen, H., Ailati, A., Chen, W., Chilton, F. H., Lowther, W. T., Chen, Y. Q. (2018). Substrate specificity and membrane topologies of the iron-containing ω 3 and ω 6 desaturases from *Mortierella alpina*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(1), 211-223.

Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Hao, G., Chen, W., Chen, Y. Q. (2020). The role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in NADPH supply in the oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina*. *Frontiers in microbiology*, 11, 818.

Welter, C., Schwenk, J., Kanani, B., Van Blargan, J., Belovich, J. M. (2013). Minimal medium for optimal growth and lipid production of the microalgae *Scenedesmus dimorphus*. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 32(4), 937-945.

Whitcomb, P. J., Anderson, M. J. (2004). *RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments*. CRC press.

Wu, J., Alam, M. A., Pan, Y., Huang, D., Wang, Z., Wang, T. (2017). Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 71, 323-329.

Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., y Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of toxicology*, 90(8), 1817-1840.

Xiaotao, D., Yuping, J., Hong, W., Haijun, J., Hongmei, Z., Chunhong, C., Jizhu, Y. (2013). Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters, antioxidative system and carbohydrate accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under low light. *Acta physiologiae plantarum*, 35(5), 1427-1438.

Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.

Xin, L., Hong-Ying, H., Yu-Ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource technology*, 102(3), 3098-3102.

Yang, Y. H., Du, L., Hosokawa, M., Miyashita, K., Kokubun, Y., Arai, H., Taroda, H. (2017). Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Oleo Science*, ess16205.

Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K., Hirata, K. (2004). Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 167(6), 1335-1341.

Yu, W. L., Ansari, W., Schoepp, N. G., Hannon, M. J., Mayfield, S. P., Burkart, M. D. (2011). Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial cell factories*, 10(1), 91.

Yu, X., Chen, L., Zhang, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Frontiers in microbiology*, 6, 56.

Yu, X. J., Sun, J., Zheng, J. Y., Sun, Y. Q., Wang, Z. (2016). Metabolomics analysis reveals 6-benzylaminopurine as a stimulator for improving lipid and DHA accumulation of *Aurantiochytrium* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 1199-1207.

Yu, X. J., Chen, H., Huang, C. Y., Zhu, X. Y., Wang, Z. P., Wang, D. S., Wang, Z. (2019). Transcriptomic Mechanism of the Phytohormone 6-Benzylaminopurine (6-BAP) Stimulating Lipid and DHA Synthesis in *Aurantiochytrium* sp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(19), 5560-5570.

Yu, Z., Pei, H., Jiang, L., Hou, Q., Nie, C., Zhang, L. (2018). Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae. *Bioresource technology*, 247, 904-914.

Zanella, L., Vianello, F. (2020). Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. *Journal of Functional Foods*, 68, 103919.

Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 1-19.

Zhang, H., Wang, Z., Feng, Y., Cui, Q., Song, X. (2019). Phytohormones as stimulators to improve arachidonic acid biosynthesis in *Mortierella alpina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 131, 109381.

Zhao, N., Zhang, Y., Li, Q., Li, R., Xia, X., Qin, X., Guo, H. (2015). Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 9-16.

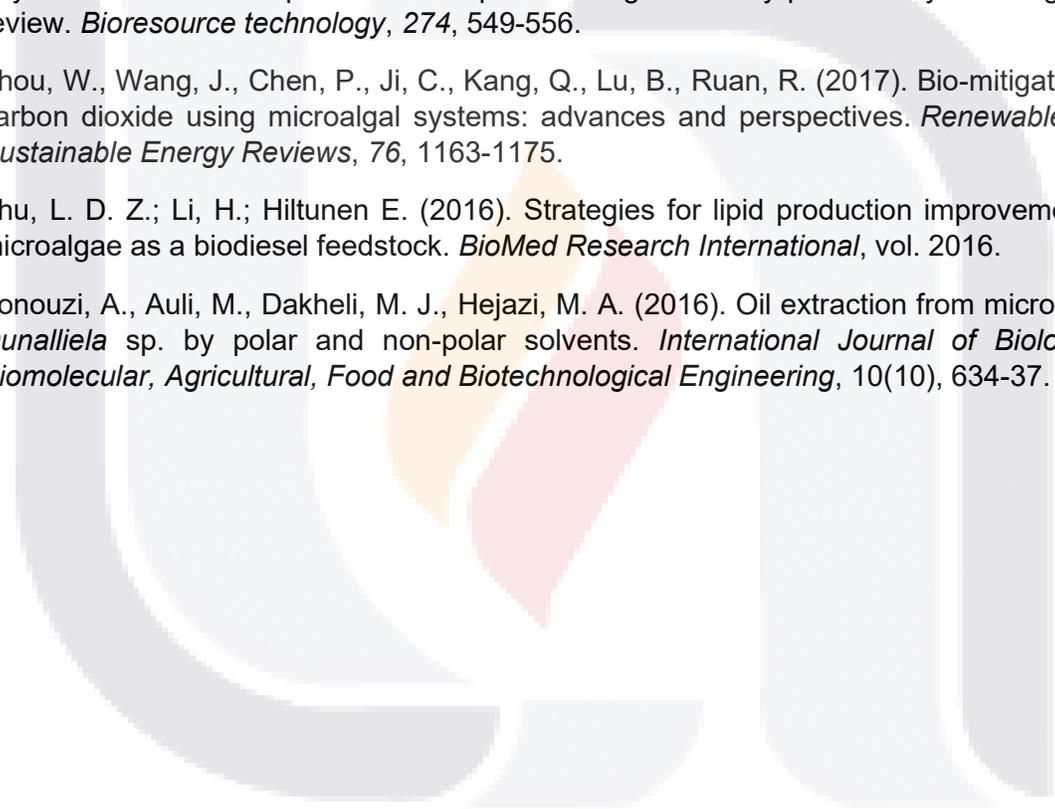
Zhao, Y., Li, D., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T., Ma, H., Yu, X. (2018). Melatonin enhances lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions via a multi-level mechanism. *Bioresource technology*, 259, 46-53.

Zhao, Y., Wang, H. P., Han, B., Yu, X. (2019). Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: a review. *Bioresource technology*, 274, 549-556.

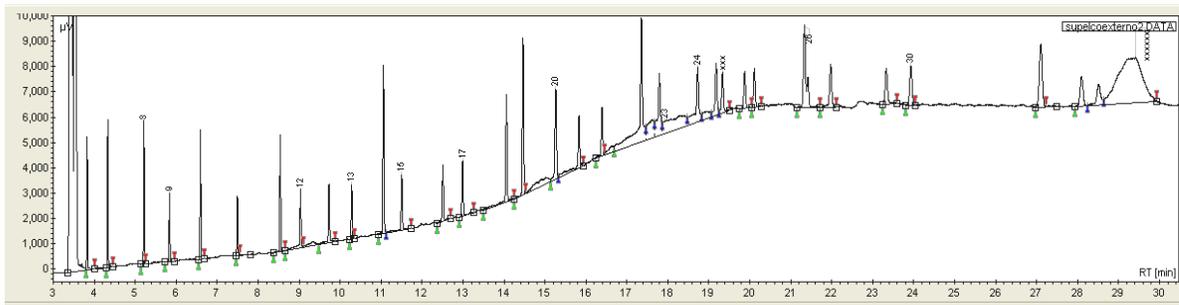
Zhou, W., Wang, J., Chen, P., Ji, C., Kang, Q., Lu, B., Ruan, R. (2017). Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: advances and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 1163-1175.

Zhu, L. D. Z.; Li, H.; Hiltunen E. (2016). Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *BioMed Research International*, vol. 2016.

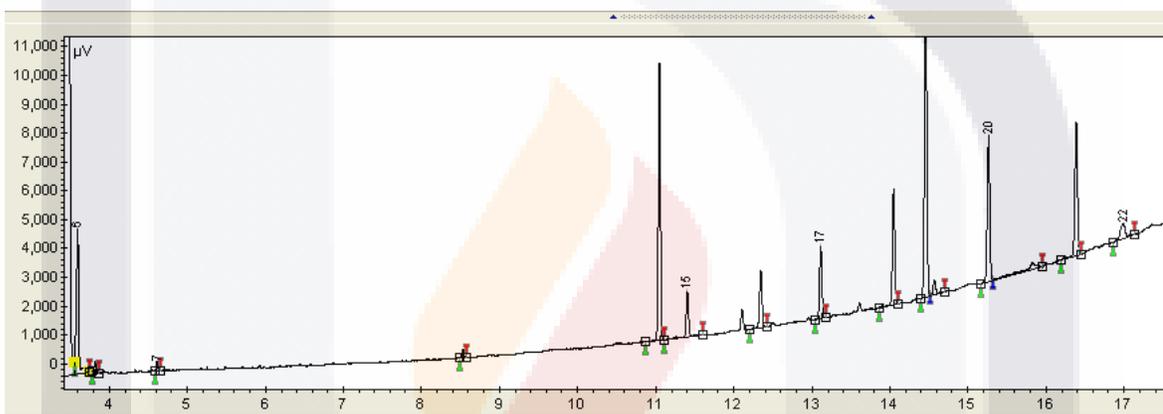
Zonouzi, A., Auli, M., Dakheli, M. J., Hejazi, M. A. (2016). Oil extraction from microalgae *Dunaliella* sp. by polar and non-polar solvents. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 10(10), 634-37.



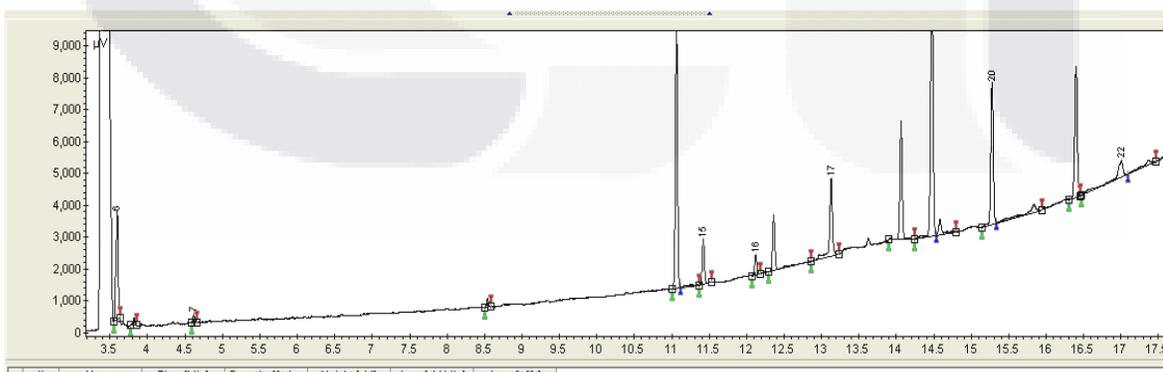
ANEXOS



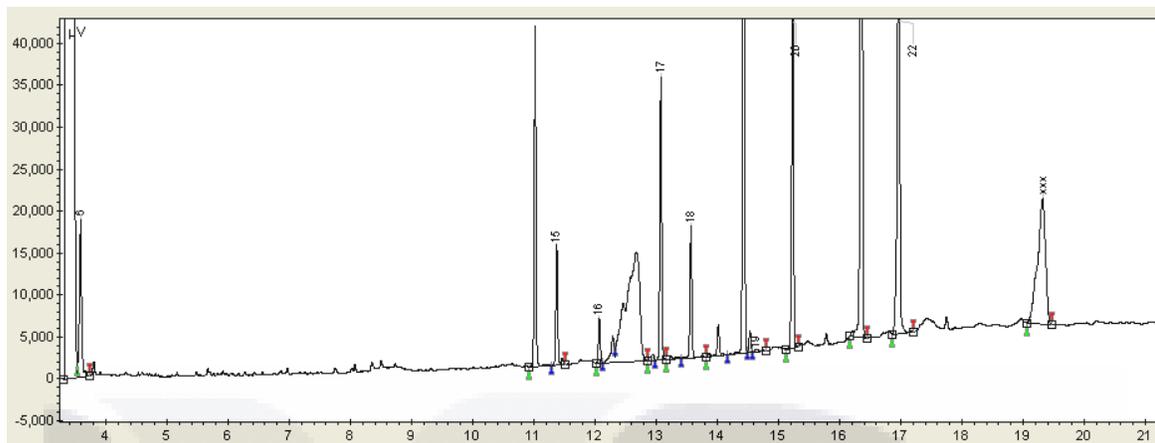
Anexo 1. Cromatograma del estándar Supelco® 37 Component FAME Mix.



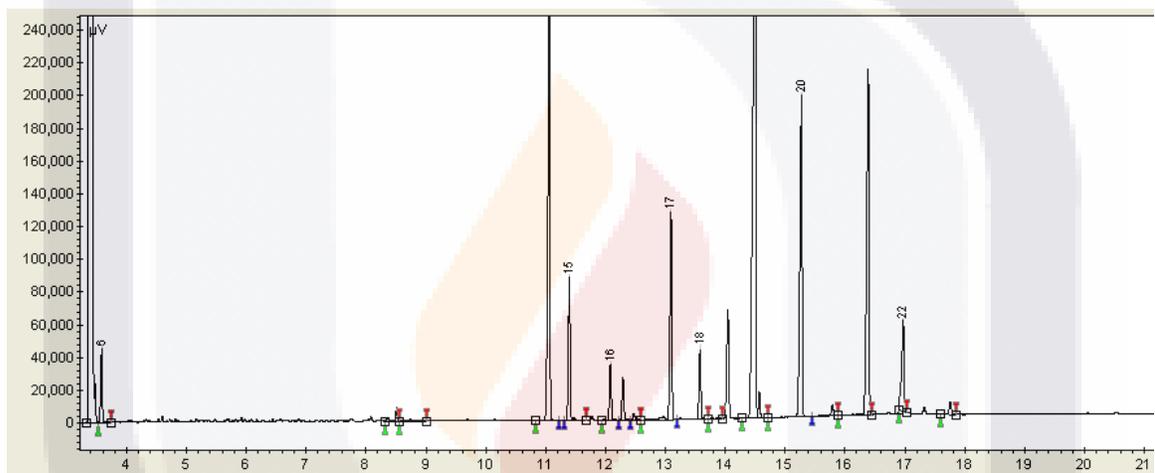
Anexo 2. Cromatograma de la muestra control N-0.



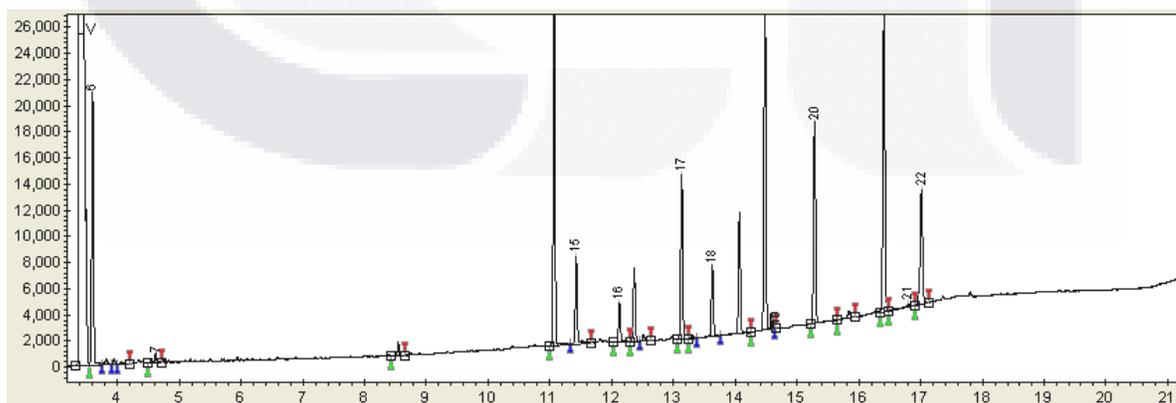
Anexo 3. Cromatograma de la muestra control N-0 (réplica).



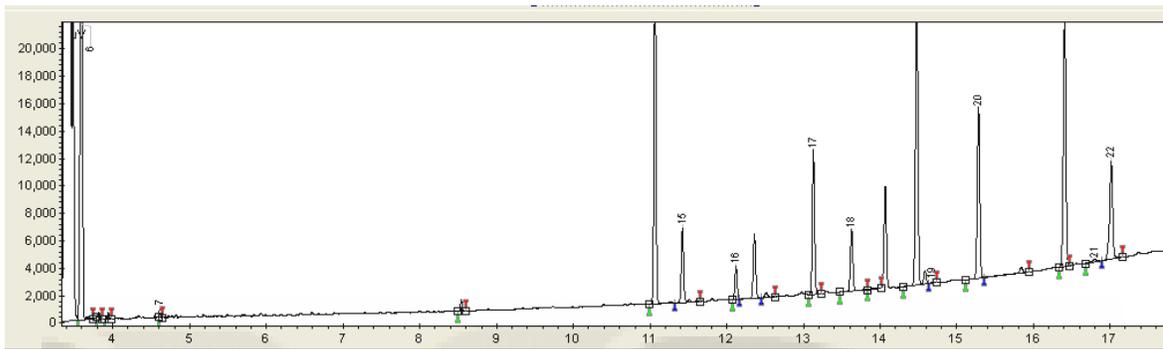
Anexo 4. Cromatograma de la muestra control N-25.



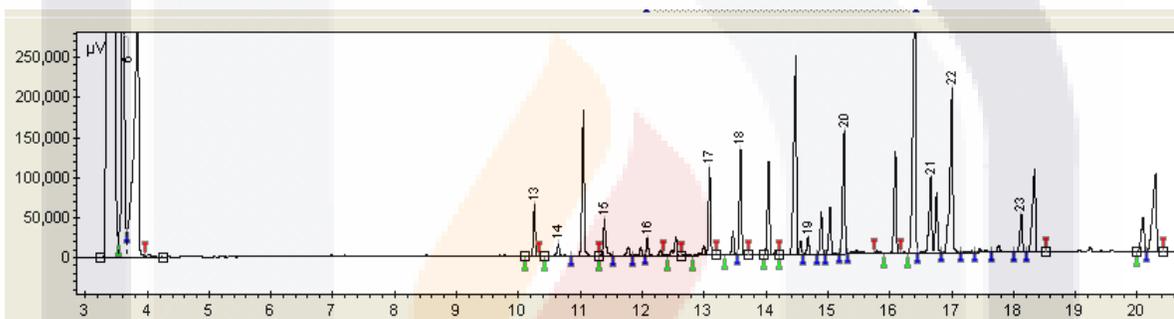
Anexo 5. Cromatograma de la muestra control N-25 (réplica).



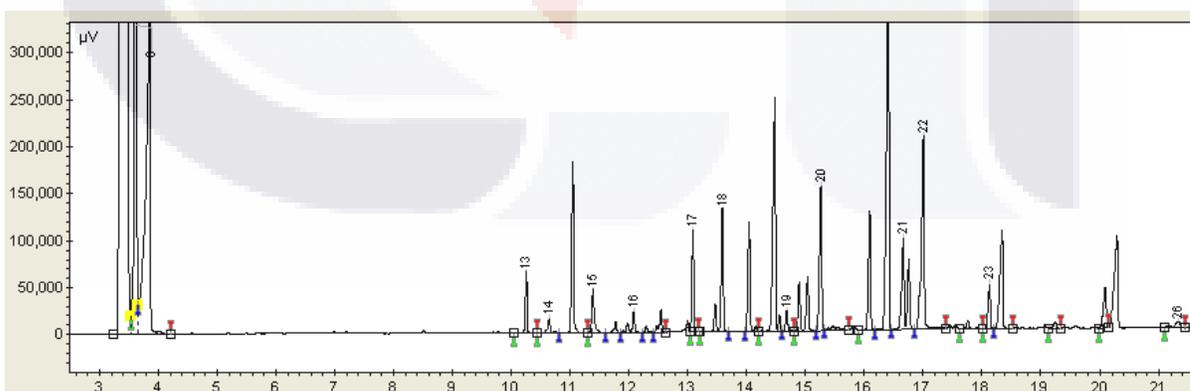
Anexo 6. Cromatograma de la muestra control N-50.



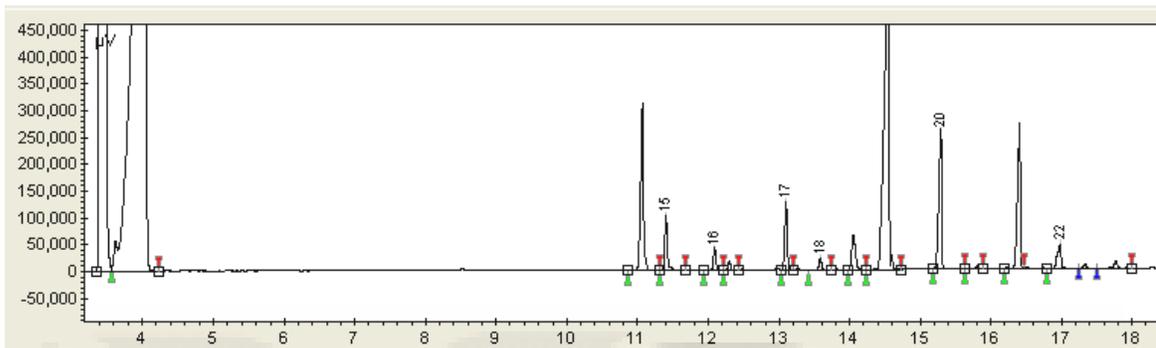
Anexo 7. Cromatograma de la muestra control N-50 (réplica).



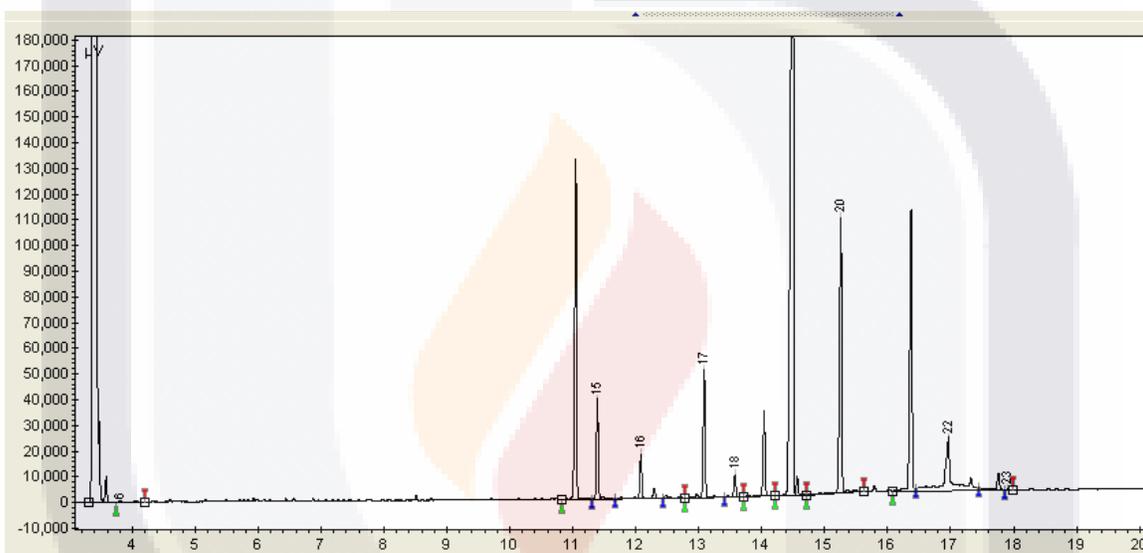
Anexo 8. Cromatograma de la muestra control N-100.



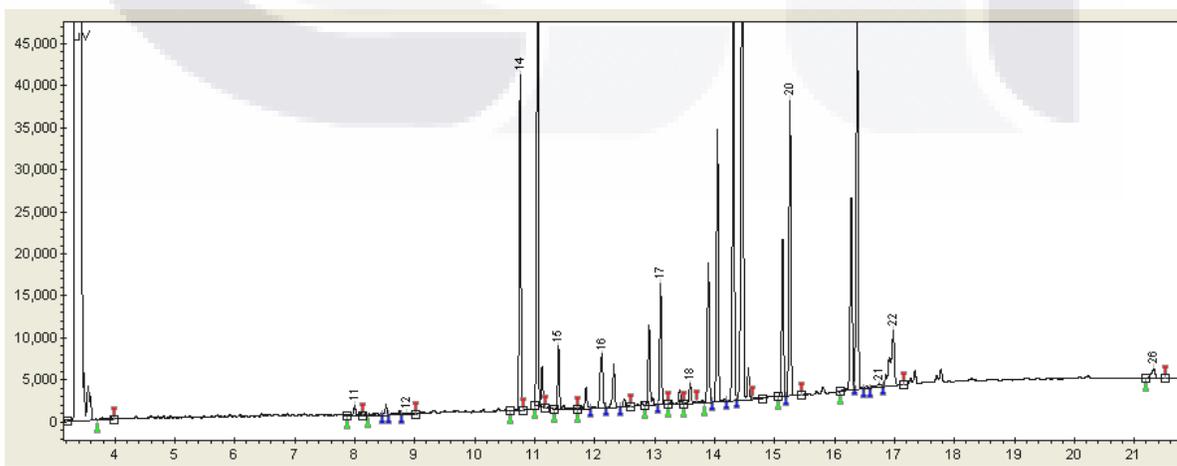
Anexo 9. Cromatograma de la muestra control N-100 (réplica).



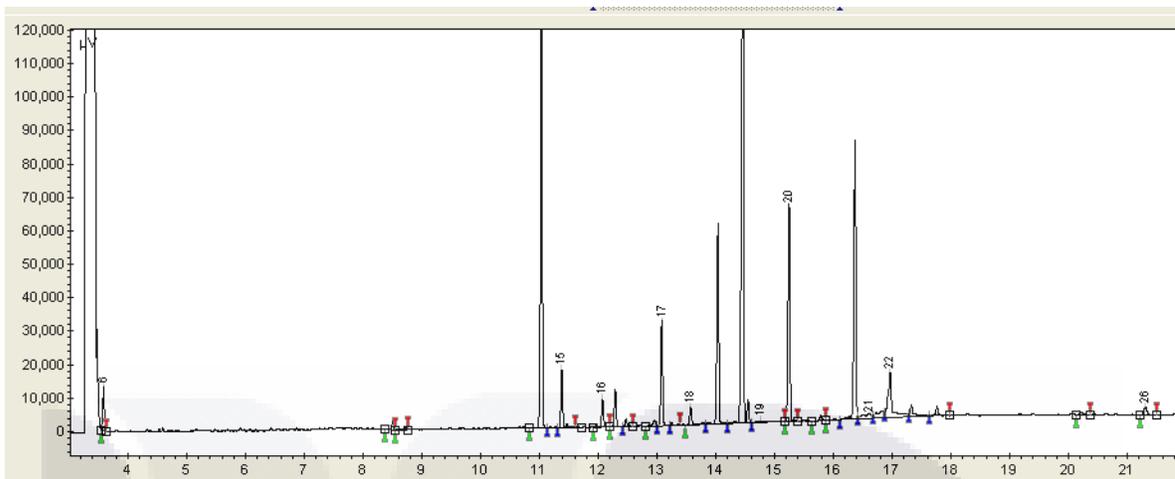
Anexo 10. Cromatograma de la muestra BAP N-0.



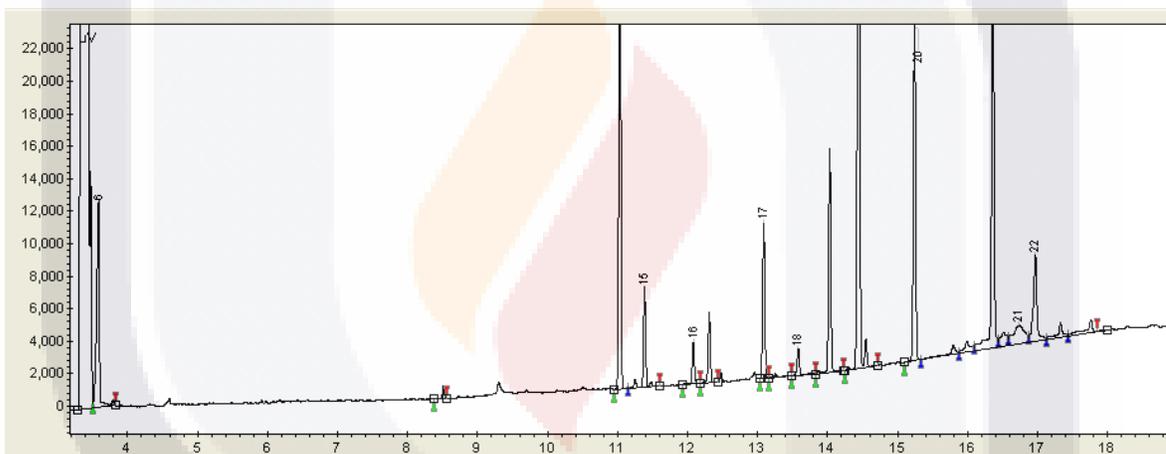
Anexo 11. Cromatograma de la muestra BAP N-0 (réplica).



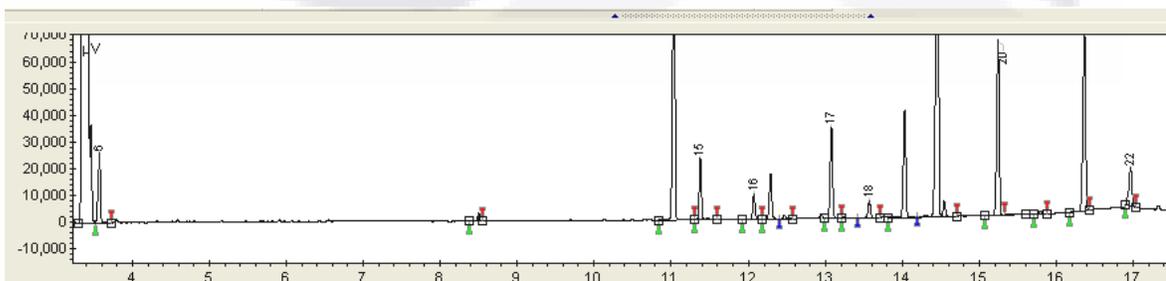
Anexo 12. Cromatograma de la muestra BAP N-25.



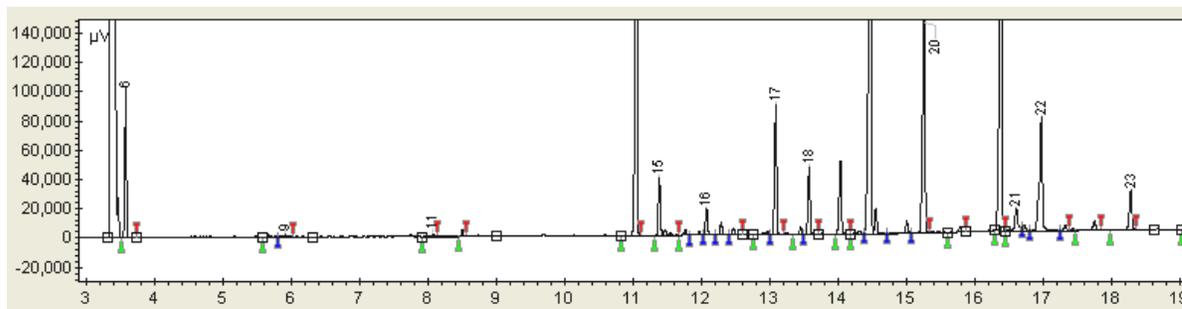
Anexo 13. Cromatograma de la muestra BAP N-25 (réplica).



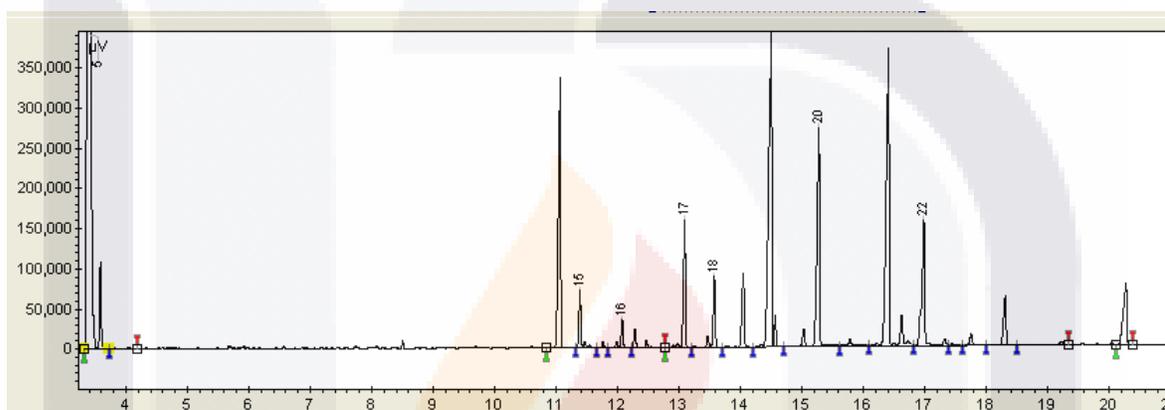
Anexo 14. Cromatograma de la muestra BAP N-50.



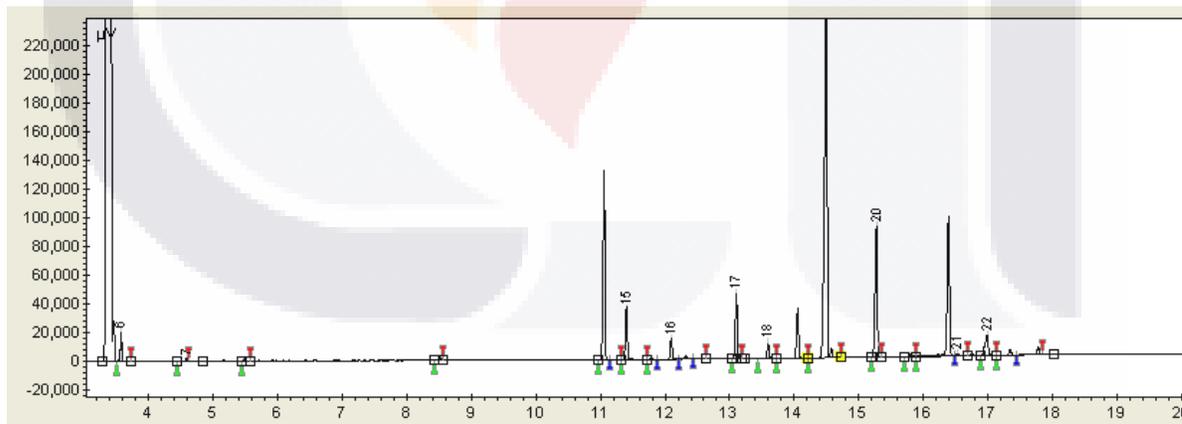
Anexo 15. Cromatograma de la muestra BAP N-50 (réplica).



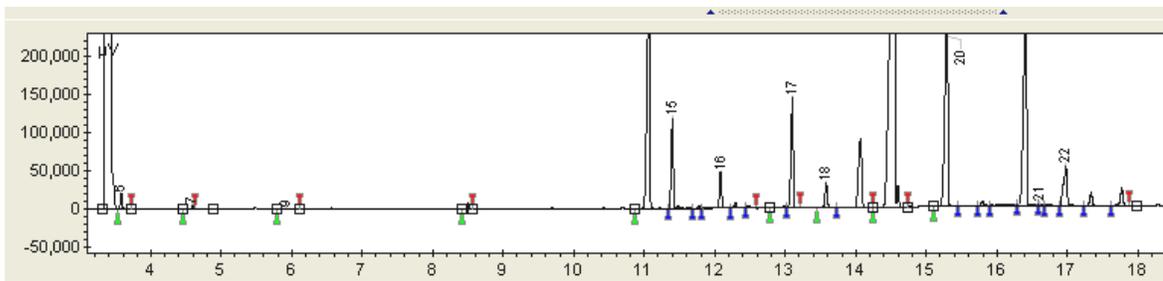
Anexo 16. Cromatograma de la muestra BAP N-100.



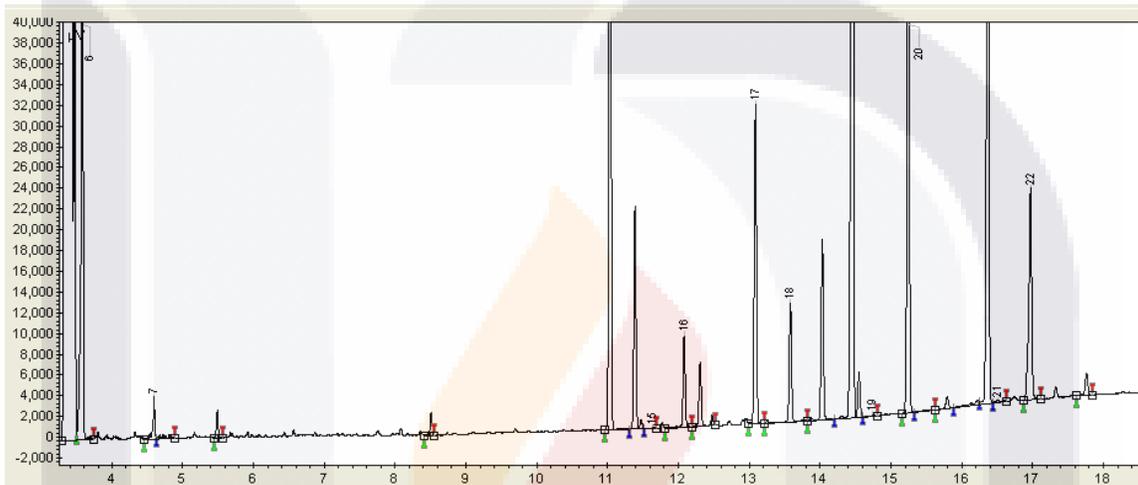
Anexo 17. Cromatograma de la muestra BAP N-100 (réplica).



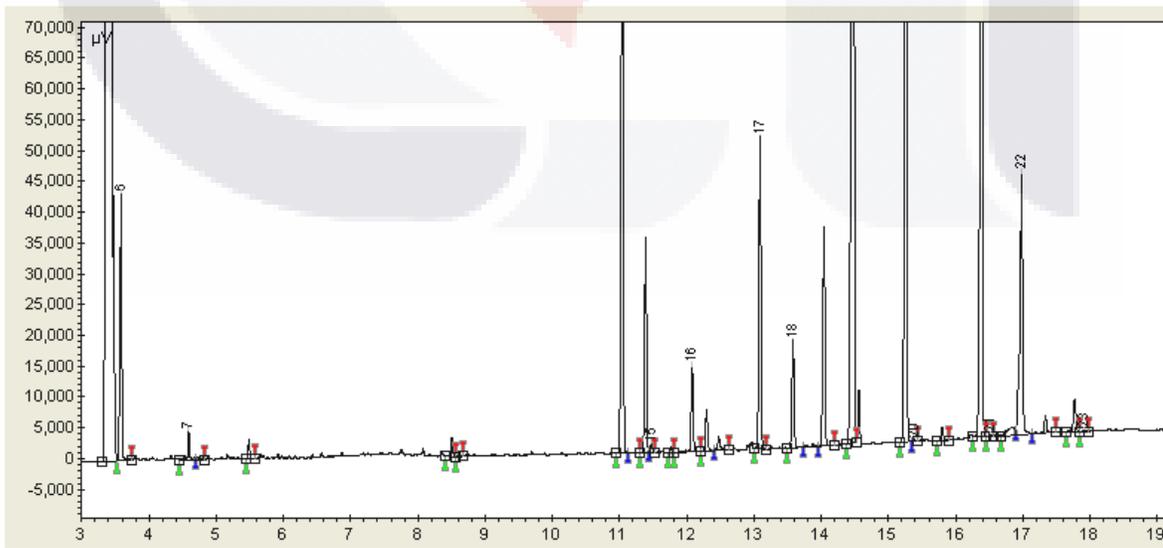
Anexo 18. Cromatograma de la muestra AG N-0.



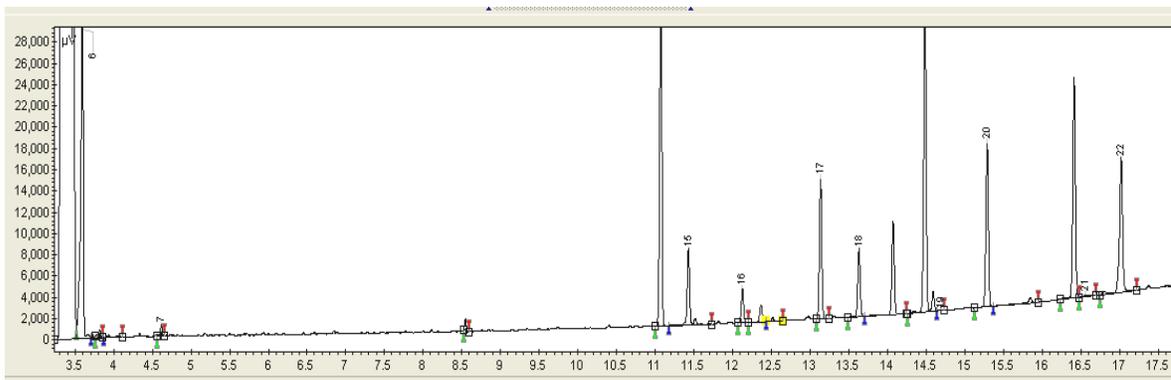
Anexo 19. Cromatograma de la muestra AG N-0 (réplica).



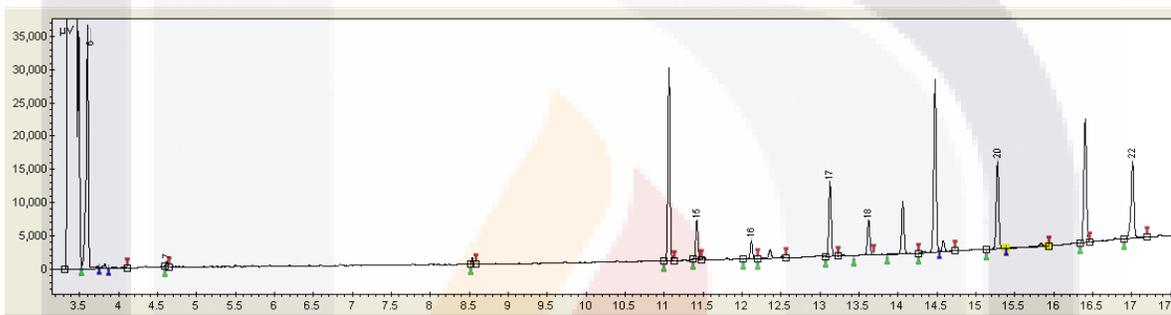
Anexo 20. Cromatograma de la muestra AG N-25.



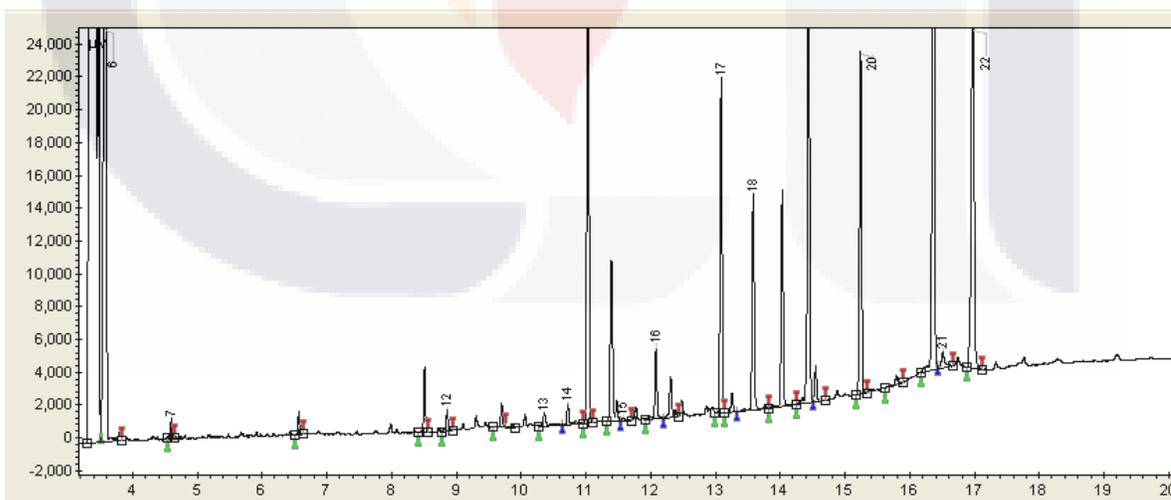
Anexo 21. Cromatograma de la muestra AG N-25 (réplica).



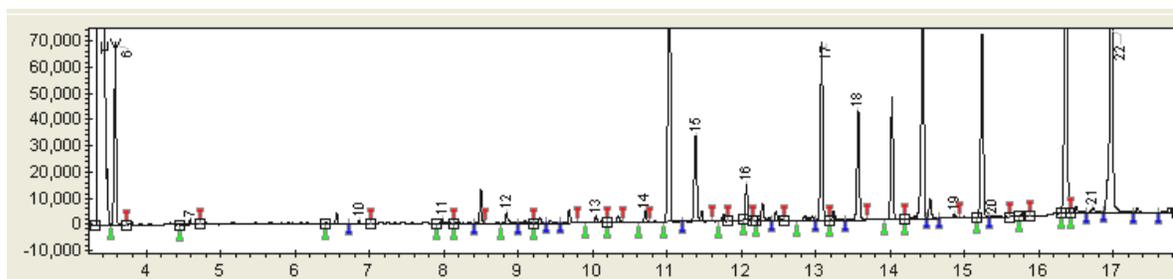
Anexo 22. Cromatograma de la muestra AG N-50.



Anexo 23. Cromatograma de la muestra AG N-50 (réplica).



Anexo 24. Cromatograma de la muestra AG N-100.



Anexo 25. Cromatograma de la muestra AG N-100 (réplica).

