

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Mixotrofia fotosintética inducida en *Dunaliella salina*: rendimiento y
rutas de biosíntesis de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

Willian Robert Capa Robles

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por

Willian Robert Capa Robles

y aprobada por el siguiente comité

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Director de Tesis

Dr. Jorge Olmos Soto

Dr. Jaime Farber Lorda

Dr. Jose Miguel Sandoval Gil



Dra. Patricia Juárez Camacho

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Willian Robert Capa Robles © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Willian Robert Capa Robles** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Mixotrofia fotosintética inducida en *Dunaliella salina*: rendimiento y rutas de biosíntesis de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis

Resumen aprobado por

Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Director de Tesis

La microalga *Dunaliella salina* es la fuente natural superlativa de β -caroteno que tiene propiedades nutricionales y terapéuticas valiosas. Estos atributos posicionan a esta especie como una fuente deseable para la producción masiva y sostenible de este isoprenoide C_{40} . Sin embargo, la producción fotoautotrófica clásica aún enfrenta desafíos que limitan tanto su crecimiento así como la posibilidad de obtener rendimientos y productividades mayores. En tanto que los cultivos promisorios hetero y mixotrofos aun requieren de optimización para mejorar los rendimientos celulares y producción de compuestos de alto valor agregado en esta clorofita. El objetivo de este trabajo fue investigar la capacidad de *D. salina* para crecer en condiciones heterotroficas y mixotroficas así como producir rendimientos en biomasa y carotenoides (principalmente β -caroteno) de manera práctica, sustentable, de bajo costo y con rendimientos superiores a los reportados en esta microalga. Los modos nutricionales fueron investigados optimizando la relación C/N, la fuente de carbono orgánico, la intensidad luminosa y la salinidad. El sistema de cribado realizado demostró las preferencias metabólicas y fisiológicas de *D. salina* por el glicerol sobre la glucosa, acetato, xilosa y sacarosa para lograr rendimientos óptimos en biomasa celular y acumulación de carotenoides especialmente β -caroteno bajo mixotrofia fotosintética. Esta clorofita creció deficientemente en condiciones de cultivo heterotrófico. La combinación de glicerol 12.5 mM, salinidad 3.0 M NaCl y 50 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz mejoró la absorción y asimilación del glicerol por *D. salina* y, en consecuencia, aumentó el crecimiento (2.1×10^6 células mL^{-1}) y la síntesis de β -caroteno ($4.43 \text{ pg célula}^{-1}$) en comparación con cultivos fotoautotróficos (0.9×10^6 células mL^{-1} y $1.37 \text{ pg célula}^{-1}$, respectivamente). El estrés salino y lumínico estimuló la absorción de glicerol por esta microalga. En la etapa final de crecimiento, el aumento de la intensidad de la luz (de 50 a 300 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) permitió que el β -caroteno alcanzara valores superiores a 30 pg célula^{-1} y excediera en tres veces el nivel de β -caroteno producido por los cultivos fotoautotróficos bajo la misma intensidad de luz. El aumento de la salinidad de 1.5 a 3.0 M NaCl (salinidad no isosmótica) mejoró el crecimiento y el β -caroteno algal en comparación con la salinidad isosmótica de 3.0 M NaCl. En esta investigación, el efecto de diferentes sustratos de carbono orgánico ha revelado que los fotosistemas de *D. salina* pueden optar por opciones nutricionales distintas a la fotoautotrofia obligada. La mixotrofia fotosintética inducida podría haber desencadenado la capacidad metabólica de *D. salina* para utilizar simultáneamente a la fotosíntesis y respiración, lo que permitió una mayor producción de energía y carbono en estos microorganismos. El material energético y carbonoso así producido es canalizado a través de las rutas centrales de carbono, la ruta isoprenoide del metileritritol fosfato (MEP) y la ruta de los carotenoides para aumentar la biomasa, β -caroteno y la carotenogénesis a diferencia de los sistemas fotoautotróficos o heterotróficos solos. Finalmente, la estrategia de las condiciones mixotróficas inducidas por glicerol, salinidad y luz, reveló roles desconocidos de este poliol (e. g., sustrato de carbono y energía, inducción de la síntesis de pigmentos, regulación del pH del medio externo) distintos a la osmorregulación de esta molécula en *D. salina*.

Palabras clave: glicerol, *Dunaliella salina*, β -caroteno, fotosíntesis, mixotrofia.

Abstract of the thesis presented by **Willian Robert Capa Robles** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Induced photosynthetic mixotrophy in *Dunaliella salina*: yield and biosynthetic pathways of isoprenoids, β -carotene and carotenogenesis

Abstract approved by:

Dr. Jose de Jesus Paniagua Michel
Thesis Director

The microalga *Dunaliella salina* is the superlative natural source of β -carotene which has valuable nutritional and therapeutic properties. Today, this species is a desirable source for the massive and sustainable production of this isoprenoid.^{C₄₀}. However, classic photoautotrophic production still faces challenges that limit both its growth and the possibility of obtaining higher yields and productivities. While heterotrophic and mixotrophic promoter cultures still require optimization to improve cell yields and production of high value-added compounds in this chlorophyta. The goal of this thesis was to investigate the ability of *D. salina* to grow in heterotrophic and mixotrophic conditions as well as to produce yields of biomass and carotenoids (mainly β -carotene) in a practical, sustainable, low-cost and higher yields than those reported in this microalga. The screening analysis carried out demonstrated the metabolic and physiological preferences of *D. salina* for glycerol over glucose, acetate, xylose, and sucrose for the achievement of optimal yields in cell biomass and carotenoids accumulation especially β -carotene under photosynthetic mixotrophy. This chlorophyte exhibited a deficient growth under heterotrophic conditions. The combination of 12.5 mM glycerol, 3.0 M NaCl salinity, and 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity improved absorption and assimilation of glycerol by *D. salina* and consequently this increased growth ($2.1 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$) and β -carotene synthesis ($4.43 \text{ pg cell}^{-1}$) compared to photoautotrophic cultures ($0.9 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ and $1.37 \text{ pg cell}^{-1}$, respectively). The saline and light stress stimulated the uptake of glycerol by this microalga. At the final stage of growth, the increase in light intensity (from 50 to 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) allowed the β -carotene to achieve values higher than 30 pg cell^{-1} and exceeding by three times the β -carotene level produced by photoautotrophic cultures under the same light intensity. Increasing salinity from 1.5 to 3.0 M NaCl (non-isosmotic salinity) improved the growth and microalgal β -carotene than the isosmotic salinity of 3.0 M NaCl. In this research, the effect of different organic carbon substrates has revealed that *D. salina* photosystems can choose nutritional options other than obligated photoautotrophy. The induced photosynthetic mixotrophy triggered the metabolic capability of *D. salina* to carried out photosynthesis and respiration simultaneously, which could allow for greater energy and carbon production. The energetic and carbonaceous material thus produced is channeled through the central carbon pathways, the methylerythritol phosphate isoprenoid pathway (MEP), and the carotenoid pathway to increase biomass, β -carotene, and carotenogenesis than that of either phototrophic or heterotrophic systems alone. Finally, the strategy of induced mixotrophic conditions by glycerol, salinity, and light, revealed unknown roles (e. g., carbon and energy substrate, induction of pigment synthesis, external medium pH regulation) other than in osmoregulation of this molecule in *D. salina*.

Keywords: glycerol, *Dunaliella salina*, β -carotene, photosynthesis, mixotrophy.

Dedicatoria

A Dios, quien nos da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia (Pr. 2:6).

A la memoria de mis padres Lidia y Ricardo, mi hermano Juan y mi gran amigo León.

A Perú y México, por todo lo que me han brindado para mi desarrollo personal y profesional.

A Gabriela, Bruno y Ángel, por los momentos felices compartidos en mi estancia en Ensenada.

A mis hermanos: Berta, Italo, Luz, Graciela, Lilly y Marilú; mis cuñados: Pepe y Eligio; mis sobrinos: Mabel, Carla, Charo, Raquel, Margorie, Mishell y Ricardo; y resobrinos: Sarah, Lucas y Lidia.

A mis hermanos de la fe, al pastor José María y mis amigos mexicanos: Olga, Fredy, Yohana, Irma y Bella.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CONACyT por la beca otorgada para sustentar mi manutención durante los estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por aceptarme y brindarme los medios académicos para realizar satisfactoriamente mis estudios de doctorado.

A los Departamentos de Biotecnología Marina, Oceanografía Biológica y Microbiología del CICESE por haberme prestado sus equipos y laboratorios para la realización del presente trabajo.

A mi director: Dr. José de Jesús Paniagua Michel, mi gran amigo a quien le estoy eternamente agradecido, por su paciencia y sus invaluable consejos, además de su firme decisión de apostar por esta investigación.

A mis sinodales: Dr. Jorge Olmos Soto, por su amistad, orientaciones y apoyo de materiales de laboratorio para el desarrollo del presente trabajo; Dr. Jaime Färber Lorda, por su valioso apoyo y atinados comentarios a la ejecución y redacción de la tesis; y Dr. José Sandoval Gil, por sus consejos y el apoyo en las presentaciones y redacción de la tesis.

Al Dr. Ernesto García Mendoza, por su apoyo en los análisis de HPLC y fotobiología en su laboratorio.

A los técnicos: M. en C. Rosalía Contreras Flores, por su apoyo técnico de laboratorio para la realización de esta tesis; M en C. Axel Rosas Campos, por el apoyo técnico en los análisis HPLC; y Dr. Diego Delgado Álvarez, por su apoyo en los análisis de microscopía invertida y confocal para las muestras algales.

A la Universidad Nacional del Santa (Perú) y sus autoridades: Rector Dr. Sixto Díaz; Decanos de la Facultad de Ciencias: Dr. Herón Morales, Mag. Sabino Zavaleta y Dr. Rómulo Loayza; y jefe del DABMB: Dr. Guillermo Saldaña, quienes me brindaron la licencia para realizar mis estudios de doctorado en CICESE.

A los docentes del DABMB – UNS (Perú): Dr. Carlos Azañero Díaz, Mag. Ángel Castro Alvarado, Dr. Rómulo Loayza Aguilar, Mblgo. José Villanueva Carlos y Blga. Sorayda Mendoza Espinoza, por su apoyo a mi desarrollo académico en el extranjero (México).

A las demás personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de esta tesis.

Tabla de contenido

	Pagina
Resumen en español.....	ii
Resumen en ingles.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes.....	4
1.2.1. Energía, carbono y metabolismo en microalgas.....	4
1.2.2. Fotoautotrofia en microalgas y <i>D. salina</i>	6
1.2.3. Heterotrofia en microalgas y <i>D. salina</i>	9
1.2.4. Mixotrofia clásica o fotomixotrofia.....	9
1.2.5. Mixotrofia fotosintética en microalgas y <i>D. salina</i>	11
1.2.6. Propiedades de los sustratos orgánicos de carbono usados cultivos mixotróficos.....	12
1.2.7. Carbono orgánico y rutas IPP, β -caroteno y carotenogénesis en <i>D. salina</i>	15
1.3. Justificación.....	17
1.4. Hipótesis.....	21
1.5. Objetivos	21
1.5.1. General.....	21
1.5.2. Específicos.....	21
Capítulo 2. Metodología.....	23
2.1. Cepa y condiciones iniciales de cultivo.....	23
2.2. Experimentos realizados en la tesis.....	24
2.2.1. Bioprospección de sustratos orgánicos para cultivo mixotrófico de <i>D. salina</i>	24
2.2.1.1. Adaptación de <i>D. salina</i> a heterotrofia y mixotrofia.....	24
2.2.1.2. Relación C/N.....	26
2.2.1.3. Interacción sustrato, salinidad e intensidad de luz.....	27
2.2.1.4. Parámetros poblacionales y modelación del crecimiento algal.....	28
2.2.2. Optimización de la mixotrofia fotosintética de <i>D. salina</i> usando glicerol.....	30

2.2.2.1. Fotoperiodo.....	30
2.2.2.2. Concentración de glicerol.....	31
2.2.2.3. Interacción de concentración de glicerol, salinidad e intensidad de luz.....	31
2.2.2.4. Carotenogénesis bajo condiciones optimizadas de glicerol, salinidad y luz.....	32
2.2.2.5. Glicerol y actividad del PSII.....	32
2.2.2.6. Glicerol y salinidad isoosmótica (3.0 M NaCl).....	32
2.2.3. Efecto del glicerol en <i>D. salina</i> en condiciones de mixotrofia fotosintética.....	33
2.2.3.1. Dinámica del consumo de glicerol.....	33
2.2.3.2. Efecto del glicerol en la composición bioquímica de <i>D. salina</i>	33
2.2.3.3. Perfil de pigmentos por HPLC de <i>D. salina</i> en mixotrofia fotosintética.....	34
2.2.4. Rendimiento y productividad de <i>D. salina</i> en mixotrofia fotosintética con acetato y glicerol	34
2.3. Medición de variables.....	36
2.3.1. Crecimiento y rendimiento algal.....	36
2.3.1.1. Recuentos celulares.....	36
2.3.1.2. Cambios morfológicos y morfométricos de las células algales.....	36
2.3.1.3. Peso seco de biomasa celular.....	37
2.3.1.4. Parámetros de crecimiento.....	37
2.3.2. Métodos analíticos bioquímicos.....	38
2.3.2.1. Análisis espectrofotométrico de pigmentos.....	38
2.3.2.2. Análisis de pigmentos por HPLC.....	39
2.3.2.3. Determinación de glicerol.....	40
2.3.2.4. Determinación de proteínas.....	41
2.3.2.5. Determinación de lípidos.....	41
2.3.2.6. Determinación de carbohidratos.....	42
2.3.2.7. Determinación de almidón.....	42
Método del Lugol.....	42
Método de la antrona.....	43
2.3.3. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II.....	43
Capítulo 3. Resultados.....	45
3.1. Adaptación de <i>D. salina</i> a heterotrofia y mixotrofia.....	45
3.2. Relación C/N usando sustratos orgánicos para cultivo de <i>D. salina</i>.....	46
3.2.1. Crecimiento celular.....	46
3.2.2. Respuesta de <i>D. salina</i> a medios orgánicos.....	46

3.2.2.1. Cambios en la coloración de los cultivos y el tamaño de las células.....	46
3.2.2.2. Almacenamiento masivo de almidón.....	47
3.2.2.3. Formación de sustancias poliméricas extracelulares.....	48
3.2.3. Pigmentos, almidón y pH.....	48
3.2.4. pH como covariable del efecto del SCO en el crecimiento algal.....	49
3.2.5. Perfil HPLC de pigmentos de <i>D. salina</i>.....	50
3.2.6. Eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>D. salina</i> con SCO.....	50
3.3. Interacción del sustrato orgánico, salinidad e intensidad de luz en el cultivo mixotrófico de <i>D. salina</i>	52
3.3.1. Crecimiento algal.....	52
3.3.2. Pigmentos y almidón.....	53
3.4. Parámetros poblacionales del crecimiento mixotrófico de <i>D. salina</i>	54
3.5. Modelación del crecimiento mixotrófico de <i>D. salina</i>.....	55
3.6. Optimización del crecimiento mixotrófico de <i>D. salina</i>.....	56
3.6.1. Efecto del fotoperiodo en el cultivo mixotrófico de <i>D. salina</i> con glicerol.....	56
3.6.2. Efecto de la concentración de glicerol.....	57
3.6.3. Efecto de la interacción del glicerol, salinidad no isoosmótica e intensidad de luz.	58
3.6.3.1. Crecimiento algal.....	58
3.6.3.2 Pigmentos.....	59
3.6.4. Carotenogénesis de <i>D. salina</i> bajo condiciones optimizadas de glicerol, salinidad y luz.....	61
3.6.5. Características morfológicas y morfométricas de <i>D. salina</i> en cultivo y en carotenogénesis.....	64
3.6.6. Eficiencia cuántica máxima de <i>D. salina</i> cultivada en condiciones optimizadas de glicerol, salinidad e intensidad de luz.....	65
3.6.7. Cultivo de <i>D. salina</i> con glicerol y salinidad isoosmótica (3M NaCl).....	66
3.7. Efecto del glicerol en la mixotrofia fotosintética de <i>D. salina</i>	67
3.7.1. Dinámica de consumo de glicerol por <i>D. salina</i> bajo mixotrofia fotosintética.....	67
3.7.2. Perfil de pigmentos por HPLC de <i>D. salina</i> en mixotrofia fotosintética.....	69
3.7.3. Composición bioquímica de <i>D. salina</i> bajo mixotrofia fotosintética.....	70
3.8. Comparación de los rendimientos algales con acetato y glicerol.....	70
Capítulo 4. Discusión.....	73
4.1. Prospección de sustratos de carbono orgánico para mixotrofia fotosintética de <i>D. salina</i>.....	73
4.2. Modelación de la mixotrofia fotosintética de <i>D. salina</i> con sustratos orgánicos.....	76

4.3. Optimización del glicero l, salinidad e intensidad de luz en la mixotrofia de <i>D. salina</i>	77
4.4. Hipótesis del efecto del carbono orgánico en las rutas metabólicas de <i>D. salina</i> en mixotrofia fotosintética	82
4.5. Glicerol, osmorregulación y rutas metabólicas de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis de <i>D. salina</i>	85
Capítulo 5. Conclusiones.....	92
Literatura citada.....	94

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Condiciones fisiológicas y ecológicas del crecimiento y acumulación de pigmentos en <i>D. salina</i> . A) Células en crecimiento (verde) y en carotenogénesis (roja). B) Condiciones de los ambientes donde proliferan estas células microalgales.....	7
Figura 2. Características de los principales modos metabólicos de las microalgas, considerando su grado de compartimentalización, sustratos, intermediarios y productos formados por estos biosistemas.....	10
Figura 3. Red metabólica que integra a las rutas bioquímicas de carbono, isoprenoides y carotenoides asociadas con la biosíntesis de β -caroteno en <i>D. salina</i>	16
Figura 4. Rendimiento de biomasa (células mL ⁻¹) y β -caroteno (pg célula ⁻¹) en <i>D. salina</i> cultivada en sistemas fotoautotróficos optimizando las condiciones de crecimiento (A) y de carotenogénesis (B).....	18
Figura 5. Cultivos celulares de <i>D. salina</i> bajo condiciones fotoautotróficas (A) y mixotróficas con concentraciones altas (B) y bajas (C) de sustratos orgánicos.....	23
Figura 6. Espectros de absorción visible de los extractos acetónicos de los cultivos de <i>D. salina</i> bajo condiciones fotoautotróficas y mixotróficas.....	39
Figura 7. Representación del cálculo teórico del Fv y Fm a partir de una muestra algal.....	44
Figura 8. Densidad celular de <i>D. salina</i> expuesta a las diferentes relaciones C/N y SCO.....	46
Figura 9. Células algales durante crecimiento activo en MI (A) y SCO (B) observadas con microscopía de fluorescencia (B y E) y contraste de interferencia diferencial (DIC, en inglés) (C y F), respectivamente.....	47
Figura 10. Presencia de almidón en los cultivos celulares de <i>D. salina</i> expuesta a sustratos orgánicos.....	47
Figura 11. Sustancias poliméricas excretadas por <i>D. salina</i> al medio de cultivo con sustratos orgánicos.....	48
Figura 12. Mapa de calor que representa la abundancia de los pigmentos y almidón (pg célula ⁻¹), así como el pH de cultivo de <i>D. salina</i> expuesta a los sustratos orgánicos: glucosa, acetato, xilosa, glicerol y sacarosa y el control (MI)	49
Figura 13. Dendograma de análisis de conglomerados de los principales pigmentos de <i>D. salina</i> expuesta a sustratos orgánicos. El panel A corresponde al control MI y los paneles B y C corresponden a los sustratos glucosa y acetato, respectivamente.....	51
Figura 14. Eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>D. salina</i> cultivada con diferentes SCO usando la relación C/N de 20/1.....	52

Figura 15.	Crecimiento celular de <i>D. salina</i> expuesta a la interacción del SCO, salinidad e intensidad de luz.....	53
Figura 16.	Pigmentos y almidón de células de <i>D. salina</i> expuestas a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz.....	54
Figura 17.	Cultivos de <i>D. salina</i> con diferentes sustratos orgánicos bajo la relación C/N de 20/1.....	55
Figura 18.	Densidad celular de <i>D. salina</i> con diferentes sustratos orgánicos de carbono, proyectada a partir de modelos de crecimiento no lineales.....	57
Figura 19.	Crecimiento de <i>D. salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de glicerol.	58
Figura 20.	Crecimiento de <i>D. salina</i> expuesta a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz.....	59
Figura 21.	Contenido de pigmentos (pg célula^{-1}) de <i>D. salina</i> expuesta a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz.....	60
Figura 22.	Suspensiones de <i>D. salina</i> cultivada con el tratamiento optimizado con glicerol (B) y con el medio control fotoautotrófico (A).....	60
Figura 23.	Coloración de células de <i>D. salina</i> . A) Basada en sus estados ecofisiológicos (células verdes: crecimiento; células amarillento-rojizo: carotenogénesis). B) Basada en su exposición a glicerol (células amarillentas) y acetato (células verdes) para cultivos en fase de crecimiento exponencial.....	61
Figura 24.	Efecto del glicerol en los pigmentos de las células de <i>D. salina</i> a intensidad de luz de $300 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$	62
Figura 25.	Suspensiones celulares de <i>D. salina</i> cultivada con el medio inorgánico (A) y con glicerol (B), ambos a 3.0 M NaCl y $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	63
Figura 26.	Crecimiento (G, luz: $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y carotenogénesis (C, $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de <i>D. salina</i> expuesta a $12.5 \mu\text{M glicerol}$ (GLI) y dos salinidades (1.5 y 3.0 M NaCl).....	63
Figura 27.	Características morfométricas con cultivos de <i>D. salina</i> en medio inorgánico en condiciones de crecimiento (A) y carotenogénesis (B). Cultivos de <i>D. salina</i> con glicerol en condiciones de crecimiento (C) y carotenogénesis (D).....	64
Figura 28.	Valores F_v/F_m de las células de <i>D. salina</i> cultivada con el medio inorgánico (A y C) y con glicerol (B y D), ambos expuestos a dos salinidades y DCMU.....	66
Figura 29.	Glicerol (Gli) extracelular de MI (A) y MI + Gli (B) y glicerol intracelular de MI (C) y MI + Gli (D) en <i>D. salina</i> cultivada con 12.5 mM glicerol	68
Figura 30.	Correlaciones entre glicerol extracelular y intracelular de IM (A) y Gly (B) en <i>D. salina</i> cultivada con $12,5 \text{ mM glicerol}$ y salinidades de 1.5 y 3.0 M NaCl	68

Figura 31.	Perfil HPLC de los principales pigmentos de <i>D. salina</i> cultivada con MI (a, b y c), acetato (d, e y f) y glicerol (g, h e i). Las células se cultivaron con luz intermedia ($50 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a, d y g), alta intensidad de luz ($300 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (b, e y h) y exposición a norflurazona con alta intensidad de luz (c, f e i).....	69
Figura 32.	Composición bioquímica de <i>D. salina</i> cultivada con 12.5 mM glicerol y salinidades de 1.5 y 3.0 M NaCl.....	71
Figura 33.	Diagrama de las rutas propuestas de degradación y conversión de carbono orgánico en <i>D. salina</i>	84
Figura 34.	Diagrama que muestra la interacción y balance químico del cloroplasto y mitocondria para asimilación de sustratos orgánicos especialmente glicerol en <i>D. salina</i>	83
Figura 35.	Diagrama de la hipótesis del rol de la osmorregulación y nutrición de <i>D. salina</i> bajo estrés salino (1.5 a 3.0 M NaCl) usando glicerol adicionado al medio (B) comparado al glicerol natural del medio inorgánico (A).....	76
Figura 36.	Diagrama de la hipótesis del rol de la osmorregulación y nutrición de <i>D. salina</i> bajo estrés lumínico (50 a $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) usando glicerol adicionado al medio (B) comparado al glicerol natural del medio inorgánico (A).....	88
Figura 37.	Diagrama propuesto de la asimilación de glicerol y su acoplamiento a rutas de biosíntesis de isoprenoides y carotenoides en <i>D. salina</i>	89

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Características de los modos nutricionales de las microalgas.....	11
Tabla 2. Propiedades energéticas, elementales y disponibilidad de los sustratos orgánicos usados en los cultivos de microalgas.....	13
Tabla 3. Rendimiento de la biomasa y β -caroteno de <i>D. salina</i> cultivada con sustratos orgánicos reportados en la literatura.....	20
Tabla 4. Concentraciones estequiométricas de los SCO calculados a partir de las características de los nutrientes y biomasa de <i>D. salina</i> (1 g L^{-1}).....	25
Tabla 5. Descripción de los tratamientos del experimento para evaluar la relación C/N y SCO en el cultivo de <i>D. salina</i>	26
Tabla 6. Parámetros de crecimiento de <i>D. salina</i> cultivada en condiciones mixotróficas y heterotróficas con 6 sustratos de carbono orgánico	45
Tabla 7. ANCOVA entre el pH de cultivo y SCO en el crecimiento de <i>D. salina</i>	50
Tabla 8. Parámetros de crecimiento y productividad máxima de biomasa del cultivo mixotrófico de <i>D. salina</i> con diferentes sustratos orgánicos.....	55
Tabla 9. Efecto del fotoperiodo en los parámetros de crecimiento de <i>D. salina</i> cultivada con glicerol.....	56
Tabla 10. Pigmentos de <i>D. salina</i> cultivada con medio inorgánico (MI) y glicerol (MI + Gly) a diferentes salinidades e intensidades de luz.....	62
Tabla 11. Características morfométricas de células de <i>D. salina</i> bajo mixotrofia con bajo mixotrofia con glicerol (GLY) y medio inorgánico (MI) y dos intensidades de luz....	65
Tabla 12. Densidad celular, CLa, CLb, BCar y pH de cultivo de <i>D. salina</i> con 12.5 mM glicerol (Gly) y MI (control). La salinidad isoosmótica y luz para el crecimiento algal fueron de 3.0 M NaCl y $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.....	67
Tabla 13. Comparación de parámetros de rendimiento y productividad de <i>D. salina</i> cultivada con 20 mM acetato y 12.5 mM glicerol.....	70
Tabla 14. Comparación de los parámetros de rendimiento de <i>D. salina</i> cultivada en glucosa y glicerol reportados por la literatura y en las mejores condiciones experimentales en este trabajo.....	71
Tabla 15. Biomasa y β -caroteno de <i>D. salina</i> cultivada con varios sustratos de carbono orgánico reportados por la literatura y en este trabajo.....	82

Capítulo 1. Introducción General

1.1. Introducción

Las microalgas son uno de los principales recursos acuáticos con potencial de explotación y cultivo para la obtención de compuestos económicamente valiosos. La microalga *Dunaliella salina* es reconocida como la fuente natural suprema de β -caroteno (Pourkarimi et al., 2020). Esta clorofita perteneciente al orden Chlamydomonadales y familia Dunaliellaceae (ITIS, 2021), es un habitante natural de ambientes salobres e hipersalinos (0.05 a 5.5 M NaCl) (Chen et al., 2009a). Este organismo fotosintético presenta una coloración verde cuando encuentra condiciones favorables para su crecimiento; sin embargo, cuando está expuesto a condiciones adversas (e. g., alta intensidad luminosa, alta salinidad y limitación de nutrientes) (Ambati et al., 2018; Ben-Amotz y Avron, 1989) cambia a un color amarillo-rojizo (Ginzburg, 1987), lo cual está relacionado con la acumulación masiva de β -caroteno (> 10% de peso seco) en respuesta al estrés ambiental (Borowitzka, 2013). El β -caroteno así producido presenta una composición isomérica especial (*cis/todo-trans*) que facilita su absorción y bioactividad en humanos y animales (Brennan et al., 2012). Estas propiedades bioquímicas y fisiológicas innatas en esta microalga hasta ahora no han podido ser encontradas en ningún otro organismo en la naturaleza (Ben-Amotz, 2004; Rammuni et al., 2019).

El carotenoide β -caroteno tiene propiedades naturales de provitamina A (Arscott, 2013) en humanos y sistemas animales y colorante alimentario (Bogacz-Radomska y Harasym, 2018), además de sus funciones reales y potenciales tales como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, inmunomodulador, citoprotector, antiestrés, antienvjecimiento, detoxificante, proapoptótico y antiproliferativo (Basheer et al., 2020; Cezare-Gomes et al., 2019; Rammuni et al., 2019; Wang et al., 2021). La biomasa y el β -caroteno de *D. salina* se utilizan ampliamente como suplementos alimenticios y como ingredientes funcionales en las industrias de alimentos humanos y animales, farmacéutica, biomédica, nutraceutica y cosmeceutica (Mehariya et al., 2021; Molino et al., 2020). Este microorganismo es también fuente promisoría de otros carotenoides (zeaxantina, luteína y α -caroteno), vitaminas, lípidos y proteínas (Ejike et al., 2017; Mehariya et al., 2021; Monte et al., 2020). Estudios clínicos y oncológicos asocian al β -caroteno algal con la prevención de varios tipos de cáncer en humanos (e. g., próstata, colon, mama, pulmón, hígado, piel) (Cezare-Gomes et al., 2019). El β -caroteno ha demostrado su efecto benéfico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Saini y Keum, 2019), además que puede convertirse en un fármaco nutricional valioso para el mejoramiento de la inmunidad humana contra infecciones virales (Jayawardena

et al., 2020). Existe un interés creciente de la población mundial hacia el consumo de fuentes naturales de β -caroteno como una alternativa de sustitución de su contraparte sintética (que cubre 90% del mercado de este carotenoide), la cual es cuestionada por las fuertes sospechas de su toxicidad (Kusmayadi et al., 2021) y de su baja bioactividad encontrado en humanos y animales (Ambati et al., 2018; Stargrove et al., 2008).

A pesar del escenario atractivo y alentador de las aplicaciones y usos de este carotenoide, su producción biológica y comercialización a través de microalgas como *D. salina* no ha alcanzado el desarrollo esperado, como lo explica el restringido mercado de este isoprenoide que captó unos US\$ 510 millones de dólares en el 2018, y se estima que alcance unos US\$ 525 millones para el 2025 (Diaz et al., 2021). La aseveración de que *D. salina* es fotoautotrófa obligada (Ben-Amotz y Avron, 1989; Borowitzka y Borowitzka, 1988) ha restringido el desarrollo de los cultivos masivos y de laboratorio de esta alga dentro de la nutrición inorgánica y el metabolismo fotoautotrófico (Ben-Amotz, 2004). No obstante, limitaciones de este régimen nutricional tales como: el bajo rendimiento de la biomasa (producido por fotoinhibición, daño fotooxidativo y auto-sombreado de los cultivos algales) (Patel, 2021) y los altos costos de producción han dificultado la masificación y desarrollo industrial fotoautotrófico de esta microalga, a fin de cubrir la creciente demanda de biomasa y del carotenoide β -caroteno (Gallego-Cartagena et al., 2019).

Los microorganismos y en especial las microalgas tienen gran capacidad metabólica para cambiar sus modos nutricionales acorde a las condiciones ambientales de crecimiento y sobrevivencia (Reddy et al., 2015). Además de la fotoautotrofia, se ha demostrado la existencia del metabolismo heterotrófico (carbono y energía obtenidos de sustratos orgánicos) y el metabolismo mixotrófico (sistemas fotoautotrófico y heterotrófico operando simultáneamente) en microalgas (Devi et al., 2013; Pérez-García y Bashan, 2015; Sun et al., 2016). A pesar de que el cultivo heterotrófico de microalgas se ha convertido en un medio alternativo para eliminar la necesidad de luz y producir biomasa en oscuridad, los intentos para crecer especies de *Dunaliella* heterotróficamente incluyendo *D. salina* han fracasado, puesto que se produce un escaso crecimiento algal y no resulta rentable su producción comercial (Roy et al., 2021). Contrariamente, la prospección e implementación de sistemas de cultivo mixotrófico sustentados por fuentes de carbono orgánico (CO) de alta disponibilidad y bajo costo (Baldisserotto et al., 2021; Nagarajan et al., 2020; Patnaik y Mallick, 2020) se ha convertido en una estrategia promisoría para la producción de biomasa y metabolitos algales. El conocimiento sobre la capacidad mixotrófica de algunas microalgas para distribuir y asimilar CO junto con el carbono inorgánico fijado a través de fotosíntesis está bien documentado (Baldisserotto et al., 2021; Castillo et al., 2021; Park et al., 2021; Pérez-García y Bashan, 2015; Rahimi y Jazini, 2021; Whangchai et al., 2021), pero aun no se obtienen los rendimientos deseados. El principal

objetivo del metabolismo mixotrófico es maximizar la cantidad de energía, poder reductor y carbono para la nutrición algal a fin de asegurar altas tasas de crecimiento y rendimientos comparado con los cultivos fotoautotrófico y heterotrófico abordados individualmente (Daneshvar et al., 2021; Pérez-García y Bashan, 2015).

La mixotrofia es la capacidad de un organismo para realizar fotosíntesis y quimioorganotrofia simultáneamente (Beardall y Raven, 2016). Evolutivamente, la mixotrofia es una estrategia de supervivencia ventajosa que tienen los organismos cuando es limitada la disponibilidad de luz y/o escasean los nutrientes inorgánicos en los ambientes donde medran (Palsson y Graneli, 2004). La mixotrofia clásica está reservada para un grupo de microalgas (e. g., especies de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*) que tienen un crecimiento mixotrófico en oscuridad o luz con una tasa de consumo de O₂ y producción de biomasa mucho mayor que la fotoautotrofia (Pastore et al., 2018). Otras especies microalgales, incluyendo *D. salina* optan por una mixotrofia completamente dependiente de luz para garantizar la activación y funcionamiento de los sistemas fotoautotrófico y heterotrófico (Lee, 2004), que en este trabajo se denominará mixotrofia fotosintética. El metabolismo del carbono orgánico en microalgas es especie dependiente, lo que conduce a tener diferentes respuestas en términos de crecimiento y productividad (Baldisserotto et al., 2021) y cambios en el perfil bioquímico de estos microorganismos (Penhaul Smith et al., 2021). Los sustratos de carbono orgánico: glucosa y acetato se consideran entre los más estudiados para el crecimiento mixotrófico de las microalgas (Baldisserotto et al., 2021; Liu et al., 2021; Marella et al., 2021). Otros compuestos tales como: glicerol, xilosa, fructosa, lactosa y sacarosa son de uso más reciente y promisorios para el cultivo de diferentes especies algales a fin de incrementar la producción de biomasa y metabolitos (Oliveira et al., 2021; Whangchai et al., 2021; Zanette et al., 2019). El crecimiento mixotrófico de *D. salina* ha sido demostrado con medios suplementados con glucosa (Chavoshi y Shariati, 2019a; Gim et al., 2016; Gonabadi et al., 2021; Kadkhodaei et al., 2015; Morowvat y Ghasemi, 2016; Wan et al., 2011), acetato (Chavoshi y Shariati, 2019a; Keerthi et al., 2015; Mojaat et al., 2008; Suarez et al., 1999) y glicerol (Keerthi et al., 2015; Sohrabi et al., 2019; Suarez et al., 1999), aunque en la mayoría de los casos citados, se han obtenido predominantemente tasas bajas de crecimiento y/o de producción de metabolitos en esta microalga.

Hoy, los emprendedores y las empresas biotecnológicas tienen dificultades para implementar una producción mixotrófica de microalgas bajo condiciones favorables de cultivo, así como también para maximizar el rendimiento y la productividad en este biosistema (D'Imporzano et al., 2017). Esto se debe, entre otras cosas a la falta de optimización de los sustratos orgánicos y los factores ambientales que mejor estimulan el metabolismo y crecimiento mixotrófico de *D. salina*. Al mismo tiempo, se desconoce el papel

fisio-metabólico de los sustratos orgánicos en la generación de nueva biomasa, síntesis de β -caroteno y carotenogénesis de *D. salina*, especialmente dentro del contexto de la mixotrofia fotosintética y la ruta isoprenoide del metileritritol fosfato o ruta MEP (Capa-Robles et al., 2009). Para investigar estos vacíos en el conocimiento del metabolismo mixotrófico de *D. salina*, en este trabajo se le sometió a un estudio exploratorio de varias fuentes de carbono orgánico (glucosa, sacarosa, glicerol, xilosa y acetato), y particularmente el efecto del glicerol, salinidad e iluminación en el crecimiento y rendimiento de β -caroteno en esta especie. Así también, se analiza el efecto de estos sustratos sobre los carotenoides y carotenogénesis en esta microalga. En especial, esta investigación reporta las condiciones optimizadas de glicerol, salinidad e intensidad de luz que estimulan la producción mixotrófica simultánea y competitiva de biomasa y β -caroteno en este organismo. Finalmente, se puede mencionar que la nutrición mixotrófica fotosintética puede resultar una opción viable para incrementar el rendimiento de biomasa y de β -caroteno de manera sustentable en esta clorofita, además que se podrían reducir significativamente los costos de producción, tomando en cuenta una futura utilización de fuentes orgánicas de bajo costo tales como los subproductos y desechos de la agricultura e industria.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Energía, carbono y metabolismo en microalgas

En general, los sistemas fotosintéticos de las microalgas contienen varios pigmentos, de los cuales mayormente las clorofilas de los fotosistemas II y I (PSII y PSI) capturan los fotones de luz usados en el proceso fotosintético. El PSII conduce la transferencia de protones H^+ que impulsan el gradiente electroquímico para la síntesis de ATP, además de que oxida al agua con la finalidad de extraer electrones de reposición del sistema con la consecuente liberación de O_2 ; mientras que el PSI produce NADPH a través de la ferredoxina como aceptora de electrones (Roach y Krieger-Liszkay, 2014). La estructura del PSI comprende el núcleo y los complejos colectores de luz I (LHCI, por sus siglas en inglés), formando particularmente el complejo PSI-LHCI (Roach y Krieger-Liszkay, 2014). Perez-Boerena (2020) reportó que el PSI de *D. salina* es uno de los más pequeños entre eucariotas, esto debido a que tiene un núcleo de siete subunidades a diferencia de las 14-16 subunidades de plantas y del alga *Chlamydomonas reinhardtii*; además que los LHCI están pobremente conservados a nivel de secuencias, tienen interacciones débiles en las cuatro proteínas de unión a clorofila (Lhca 1-4, por sus siglas en inglés) y se unen a pigmentos que forman nuevas rutas de energía. Sin embargo, en otra investigación se ha encontrado que en *D. salina*

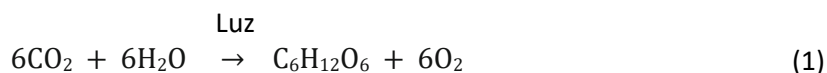
coexisten dos composiciones distintas del PSI; un PSI grande que consta de ocho subunidades adicionales que vegetales superiores (seis en el núcleo del PSI y dos en los complejos de captación de luz) y dos moléculas extras de clorofila a, las cuales resultan cruciales para la transferencia eficiente de energía de excitación en las células algales (Caspy et al., 2020). Estos mismos autores sostienen que la versión grande del PSI en *D. salina* podría ensamblarse a partir del aumento del flujo de electrones cíclicos causado por el estrés salino, que desencadena una producción acelerada de glicerol y requiere del abastecimiento de alta energía por el PSI. La versión pequeña del PSI (vestigio de la evolución del complejo fotosistémico) se usa predominantemente en altas demandas de energía y condiciones de luz; no obstante, otras formas de estrés tales como limitación de nitrógeno y fósforo, podrían modificar la estructura y funcionamiento del supercomplejo del PSI en esta microalga. En relación al PSII, *D. salina* presenta dos conformaciones centrales que difieren sustancialmente en su separación interna de dímeros y la ubicación de las antenas colectoras de luz, cuyas interacciones altamente flexibles pueden desempeñar un papel trascendental en la organización dinámica de las membranas de los cloroplastos, trayendo consigo una alteración de las propiedades de transferencia de energía de excitación y de la organización general de las membranas tilacoidales (Caspy et al., 2021).

Las microalgas requieren de energía y de carbono para realizar sus funciones de mantenimiento, crecimiento y formación de bioproductos, los cuales están integrados a través de rutas metabólicas (Reddy et al., 2015). Un estudio sobre la reconstrucción de una red bioquímica de carbono para *D. salina* CCAP19/18 reportó un modelo metabólico con 221 reacciones y 213 metabolitos producidos en tres diferentes compartimentos (citósol, cloroplasto y mitocondria). Comparativamente, estos resultados están comprendidos en las redes metabólicas: a) 160 reacciones, 164 metabolitos y dos compartimentos y b) 259 reacciones, 267 metabolitos y seis compartimentos, reportadas para la microalga verde modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Fachet et al., 2020). El hecho de que la especie modelo *C. reinhardtii* viva exclusivamente en agua dulce, y por otra parte, las especies del género *Dunaliella*, tales como *D. tertiolecta* y *D. salina* proliferen en cuerpos de agua salinos, ha servido para establecer que el metabolismo energético y de carbono puede tener no solamente similitudes sino también diferencias entre especies del mismo orden, género y especie (Fachet et al., 2020). En cepas de *D. salina* se ha observado diversidad genética y plasticidad fenotípica ligada con la capacidad carotenogénica (Tafreshi y Shariati, 2009). Estudios genómicos del metabolismo de isoprenoides y carotenoides en cepas carotenogénicas de esta microalga han revelado que genes de la enzima enolasa (cataliza conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato) están representados en una copia en su genoma, mientras otros genes como de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) y fitoeno sintasa (PSY) están duplicados (Polle et al., 2020a).

Los requerimientos nutricionales de los microorganismos están relacionados con la composición química de sus células y con sus características genéticas, las cuales determinan sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar los compuestos que se encuentran en su ambiente (Gopinathan, 2011). El carbono representa cerca del 50% de la biomasa algal (Becker, 1994). El aprovechamiento de los sustratos de carbono orgánico (CO) y/o inorgánico (CI) bajo las diferentes condiciones ambientales provoca cambios nutricionales y metabólicos en las microalgas, los cuales determinan las características de mantenimiento, crecimiento y biosíntesis de metabolitos de las células (Ananthi et al., 2021; Devi et al., 2013; Pérez-García y Bashan, 2015; Reddy et al., 2015). En la Tabla 1, se muestra una clasificación de los modos nutricionales de las microalgas (e. g., fotoautotrofia, heterotrofia y mixotrofia), considerando sus características energéticas, poder reductor y carbono. El metabolismo fotoautotrófico, basado en la fotosíntesis, es el más frecuente y eficientemente empleado por las microalgas; mientras que la heterotrofia es más facultativa, caracterizándose por ser un mecanismo de supervivencia crucial para las microalgas limitadas en luz y nutrientes (Tuchman, 1996). Así también un gran número de microalgas fotosintéticas son mixotróficas (heterótrofas facultativas) capaces de usar compuestos orgánicos suplementados al medio (Lee, 2008). Hoy, los estudios del metabolismo mixotrófico y su acoplamiento a rutas biosintéticas de isoprenoides, carotenogénesis y biosíntesis de β -caroteno en *D. salina*, representan nuevos escenarios en la expansión del conocimiento y la posible diversificación del metabolismo y fisiología en esta microalga.

1.2.2. Fotoautotrofia en microalgas y *D. salina*

Las microalgas fotoautotróficas aprovechan la energía luminosa y H_2O a través de la fotosíntesis según ecuación (1) para producir ATP y NADH, además que requieren solamente carbono inorgánico en forma de CO_2 y/o HCO_3 para sus procesos metabólicos tales como: respiración, crecimiento, síntesis de metabolitos (Zhang et al., 2018). El régimen y el espectro óptimo de luz para el crecimiento algal



son especie específicos debido, entre otras cosas, a la diferencia de absorción de luz y de eficiencia de conversión de energía dependientes del perfil de pigmentos, arquitectura celular y arreglo del cloroplasto

de cada especie (Li et al., 2020). Las condiciones de iluminación de los cultivos algales, tales como: luz continua, ciclos de luz/oscuridad, duración del fotoperiodo e intensidad de luz, afectan significativamente el crecimiento celular y la composición de la biomasa algal (Xu et al., 2016). La luz es un factor limitante para el crecimiento de las algas: si la intensidad de luz es baja, la respiración celular consume los compuestos ricos en carbono a una tasa tan alta que aquella que es producida por la fotosíntesis dejando de producir biomasa nueva (Beardall y Raven, 2016). Cuando la intensidad de luz es alta, el proceso de fotoinhibición del fotosistema II produce radicales libres conduciendo a un daño oxidativo y en casos severos conduce a la muerte de las células (Lehmuskero et al., 2018). Consecuentemente, los cultivos de *D. salina* deberían recibir intensidades de luz intermedias ($80-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a fin de asegurar el metabolismo fotosintético de síntesis de ATP y NADPH en cantidad necesaria para conducir la fijación de carbono CO_2 mediante el ciclo de Calvin (Gu et al., 2014). El ciclo de Calvin en plantas y algas verdes provee de triosas fosfatos como bloques estructurales en la síntesis de metabolitos tales como: sacarosa para el transporte de carbono, y almidón para el almacenamiento de carbono (Ball, 1998).

La especie *D. salina* acumula almidón como carbono de reserva en su cloroplasto (Avron, 1992). Las algas verdes de agua dulce tales como *Scenedesmus* y *Chlamydomonas* frecuentemente producen apreciables cantidades de sacarosa; mientras las especies marinas e hipersalinas de *Dunaliella* cuando encuentran condiciones favorables para su crecimiento, sintetizan glicerol fotosintético como el mayor carbohidrato soluble y solo poseen niveles traza de sacarosa y glucosa (Craigie y McLachlan, 1964).

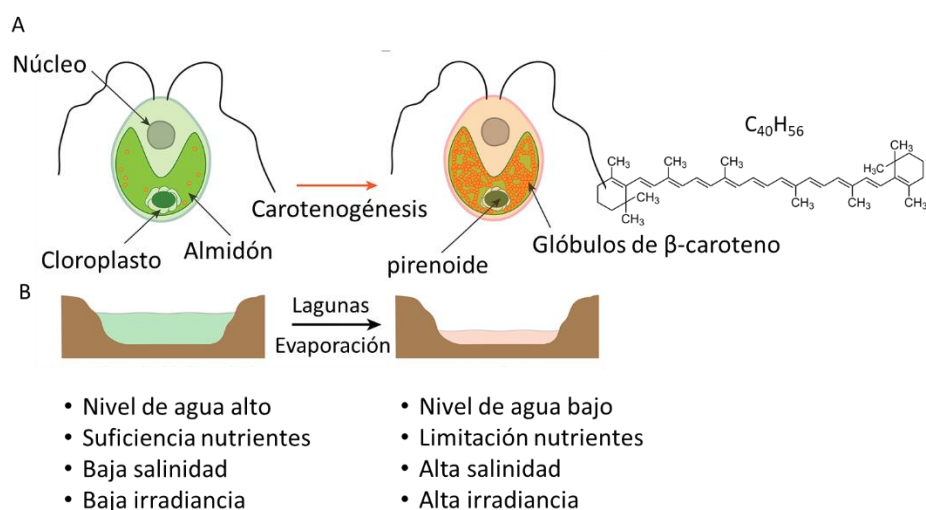


Figura 1. Condiciones fisiológicas y ecológicas del crecimiento y acumulación de pigmentos en *D. salina*. A) Células en crecimiento (verde) y en carotenogénesis (roja). B) Condiciones de los ambientes donde proliferan estas células microalgales. Adaptado de Varela et al. (2015).

Las células de *D. salina* según las condiciones ambientales pueden encontrarse como células verdes y anaranjadas (Figura 1). En el panel A, se observa que las células verdes poseen un cloroplasto con membrana tilacoidal apesada, núcleo y escasos globulos de β -caroteno en el cloroplasto; mientras las células anaranjadas tienen un cloroplasto con membrana tilacoidal reducida y lleno de globulos carotenoides (Polle et al., 2020b). En el panel B, se observa que las células verdes predominan en lagunas con altos niveles de agua, suficientes nutrientes y medio salino disuelto; mientras que las células anaranjadas proliferan cuando los cuerpos de agua disminuyen su volumen de agua (evaporación) y ocurre limitación de nutrientes y aumento de la salinidad (Varela et al., 2015).

Especialmente, la microalga *D. salina* puede vivir en un amplio rango de concentraciones de NaCl que van desde 0.05 M hasta la saturación alrededor de 5.5 M (Chen et al., 2009a). Cuando esta alga crece a salinidades optimas (1.5-1.7 M NaCl) muestra una expresión mejorada y optima de genes fotosintéticos tales como: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, anhidrasa carbónica y ATP sintasa (Sharma et al., 2015).

Dentro de los sistemas de protección del aparato fotosintético en esta alga se encuentra la zeaxantina para la protección de los centros de reacción PSII fotodañados (Borowitzka et al., 1990; Jin et al., 2003), mientras que bajo choque hipoosmótico e hiperosmótico en oscuridad, las células algales presentan estados de transición I (Liu y Shen, 2004) y II (Liu y Shen, 2006), respectivamente. Estas algas para sobrevivir en ambientes acuáticos hipersalinos, donde hay una escasez de un sistema de carbonatación y de diversas formas de carbono inorgánico (Oren, 2005) necesitan optimizar la asimilación fotosintética de CO_2 y derivar los recursos de carbono y energía en la síntesis de glicerol para mantener su equilibrio osmótico (Oren, 2014; Xia et al., 2014).

El CO_2 contenido en el aire y que se disuelve en los medios naturales y en cultivo puede ser suficiente para mantener una fotosíntesis no limitada en las algas (Becker, 1994). Sin embargo, esta fuente inorgánica no puede satisfacer los requerimientos de carbono para mantener rendimientos algales elevados en los sistemas comerciales basados exclusivamente en condiciones fotoautotróficas (Ben-Amotz, 2004), por lo que se requiere de una suplementación de CO_2 gas y/o HCO_3^- al medio del cultivo algal (Grobbeelaar, 2013). No obstante, *D. salina* está catalogada como especie intolerante a CO_2 que carece de estados de transición de energía I a II, y muestra daños al PSI bajo condiciones de alto CO_2 probablemente asociadas con la acidificación citoplasmática y del estroma del cloroplasto (Borowitzka, 2016).

1.2.3. Heterotrofia en microalgas y *D. salina*

A pesar de que la mayoría de las microalgas son organismos fotoautotróficos, algunas especies han retenido la capacidad metabólica de crecer exclusivamente bajo condiciones heterotróficas no requiriendo luz para tal fin (Barros et al., 2019). Las microalgas heterótroficas usan energía y carbono de los compuestos orgánicos (e. g., glucosa y acetato) para crecimiento y síntesis de productos metabólicos. Dentro de las microalgas que presentan heterotrofia destacan varias especies y cepas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como también el dinoflagelado marino *Cryptothecodinium cohnii*, siendo el único representante que se cultiva heterotrófica y comercialmente para la producción de ácidos grasos ω -3, especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA) (Přibyl y Cepák, 2019). La heterotrofia en *D. salina* ha sido demostrada, aunque no es recomendada para el cultivo masivo debido a su escaso rendimiento celular (Keerthi et al., 2015; Chavoshi y Shariati et al., 2019a, b). Esto ocurre, entre otras cosas, porque los sistemas de transporte activo para varios sustratos orgánicos de carbono en estas microalgas son probablemente inducidos con luz, y de algún modo la fotosíntesis interviene en los procesos energéticos que se llevan a cabo con la nutrición orgánica, tal como ha sido reportado en *D. parva* (Hard y Gilmour, 1996), *D. tertiolecta* (Berner et al., 1989), *D. bardawil* (Chavoshi y Shariati et al., 2019b), *D. salina* (Chavoshi y Shariati et al., 2019a) y en nuestros experimentos con esta última especie.

1.2.4. Mixotrofia clásica o fotomixotrofia

La clasificación metabólica histórica de los organismos basada en la propuesta de Atkinson (1977), incluye exclusivamente a plantas (autótrofos) y bacterias (heterótroficos). Sin embargo, actualmente existe una reconsideración creciente de que muchos organismos terrestres y acuáticos no son estrictamente heterótroficos o autótrofos, sino más bien mixótroficos. Se ha planteado que la mixotrofia se encuentra distribuida prácticamente en toda la filogenia eucariota y en la mayoría de los ecosistemas del planeta, lo que sugiere la existencia de una presión evolutiva surgida con este régimen metabólico (Firmin et al., 2021; Selosse et al., 2017).

Las microalgas que presentan mixotrofia (=fotomixotrofia) (Tabla 1) crecen más rápido y pueden sintetizar compuestos a través de rutas fotoautotróficas y heterotróficas, además que estos cultivos tienen costos reducidos de luz y compuestos orgánicos comparado con los metabolismos fotoautotrófico y heterotrófico, respectivamente (Khan et al., 2018). Los sistemas mixotróficos podrían evitar los problemas

que tienen los cultivos fotoautotróficos de las algas, tales como: la escasa penetración de luz producida por las altas densidades celulares y la limitación de la tasa de fijación de carbono a través de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) (Bhatnagar et al., 2011; Kenny y Flynn, 2017). Debido a un balance entre fotosíntesis y respiración, la mixotrofia reduce la producción deliberada de O_2 y CO_2 al medio comparado a los cultivos algales fotoautotróficos y heterotróficos (Abiusi et al., 2020a; Grama et al., 2016). Este modo de nutrición también reduce el efecto inhibitorio por luz, induce la síntesis de metabolitos tales como pigmentos y ácidos grasos, y protege a las células algales del daño oxidativo por O_2 (Estévez-Landazábal et al., 2013). La inclusión y asimilación de los sustratos orgánicos en los cultivos mixotróficos podría favorecer el aumento y la diversificación del suministro de energía y de la alocación de carbono en las microalgas, trayendo consigo el aumento de las tasas de respiración y crecimiento de las células (Figura 2). Así como también, el incremento en la síntesis de productos metabólicos y cambios en la fisiología y morfología celular (Sun et al., 2018).

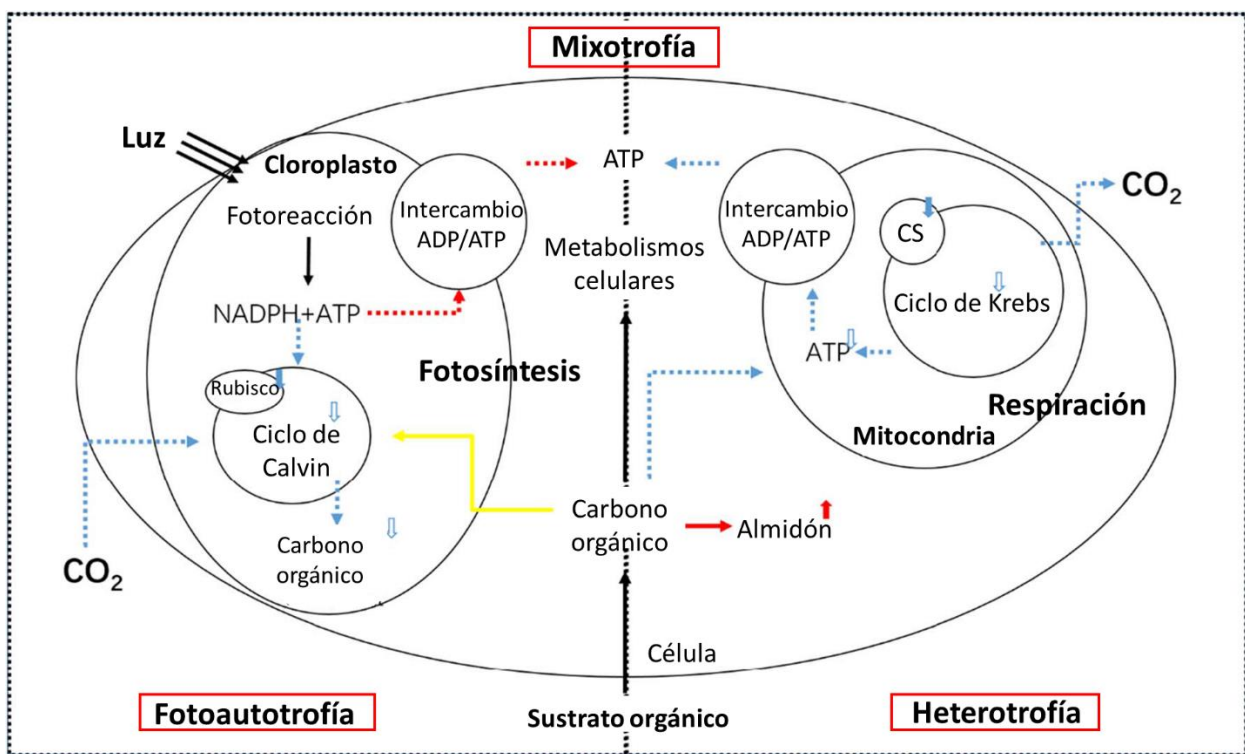


Figura 2. Características de los principales modos metabólicos de las microalgas, considerando su grado de compartimentalización, sustratos, intermediarios y productos formados por estos biosistemas. Adaptado de Zhang et al. (2017) y Pérez-García y Bashan (2015). Abreviaturas: ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; Rubisco: ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa; CS: citrato sintasa.

La nutrición mixotrófica en microalgas se presenta a través de dos mecanismos: facultativo y obligado. Las especies mixótrofas facultativas, dependiendo de las condiciones ambientales preponderantes, pueden crecer igualmente bien como fotoautótrofos o heterótrofos; mientras que las cepas mixótrofas obligadas, son principalmente fotoautótrofos y requieren para su sobrevivencia de nutrimentos obtenidos por fagotrofia y/o osmotrofia (Barsanti et al., 2008; Rai et al., 2013). Dentro de las microalgas con mixotrofia facultativa, podemos incluir a especies de los generos de diatomeas: *Phaeodactylum*, *Nitzschia* y *Cryptocodinium* (Griffiths et al., 2011) y en las microalgas verdes, podemos citar a *Chlorella* y *Botryococcus* (Cheah et al., 2018), *Scenedesmus* (Bhatnagar et al., 2011), *Chlamydomonas* y *Tetraselmis* (Chen y Johns, 1994). Estas especies resultan más robustas y productivas para crecer con fuentes de carbono orgánico como acetato, glucosa y glicerol a fin de acumular gran cantidad de biomasa y metabolitos de interés económico. No obstante, muchas microalgas de agua dulce, marinas y hipersalinas que crecen mixotróficamente pueden tener variaciones en la incorporación y asimilación de los sustratos orgánicos, las cuales están determinadas por las condiciones ambientales, nutricionales e ingenieriles usadas en los sistemas de cultivo de las microalgas (Penhaul Smith et al., 2020).

Tabla 1. Características de los modos nutricionales de las microalgas.

Metabolismo	Fuente de ATP	Fuente de NADPH	Fuente de Carbono	Observación	Referencia
Fotoautotrofia	Luz	H ₂ O	CO ₂	Uso de fotosíntesis	Ananthi et al. (2021)
Heterotrofia	CO	CO	CO	Cultivos en oscuridad	
Fotoheterotrofia	Luz	CO	CO	Cultivos con luz sin fijación de Cl	Wilken et al. (2014)
Pseudo-mixotrofia	Luz + CO	H ₂ O + CO	CO + Cl	Cultivos bifásicos con luz y oscuridad	Subramanian et al. (2016)
Fotomixotrofia	Luz + CO	H ₂ O + CO	CO + Cl	Cultivos con luz y oscuridad y CO	Solymosi et al. (2020)
Mixotrofia fotosintética	Luz + CO	H ₂ O + CO	CO + Cl	Cultivos con luz y CO	En este trabajo

Abreviaturas: CO: carbono orgánico; Cl: carbono inorganico.

1.2.5. Mixotrofia fotosintética en microalgas y *D. salina*

Desde hace varias décadas, se tiene la concepción de que muchas microalgas por sus condiciones de fotoautótrofas obligadas no pueden usar sustratos orgánicos de carbono para su crecimiento y síntesis de compuestos bioquímicos. No obstante, a raíz del descubrimiento de la mixotrofia facultativa en algunas

especies microalgales consideradas fotoautótrofas obligadas, esta visión ha cambiado. Así, la rodofita unicelular extremófila *Cyanidioschyzon merolae* ha demostrado capacidad de usar sustratos carbonosos y especialmente glicerol para respiración y crecimiento en condiciones heterotróficas y mixotróficas (Moriyama et al., 2015), con lo cual ha quedado demostrado que la fotoautotrofia obligada debería ser considerada una característica nutricional más que ambiental en muchas microalgas.

La definición de mixotrofia en bacterias y plantas no puede ser extrapolada a las microalgas, sabiendo que estas últimas son organismos con amplia diversidad biológica y ecológica que han sufrido distintas mutaciones y adaptaciones fisiológicas naturales y artificiales. Así también, dentro del proceso de definición y caracterización de la mixotrofia en microalgas, han surgido controversias por diferentes autores sobre la diferenciación de los metabolismos fotomixotrófico, fotoheterotrófico y pseudomixotrófico. Por lo cual, en este trabajo se presentan algunas características diferenciales que tienen estas clases de metabolismo de carbono orgánico en luz (Tabla 1).

La comunidad científica ha aceptado por mucho tiempo los planteamientos que niegan la existencia del crecimiento heterotrófico y/o mixotrófico en las diferentes especies de *Dunaliella* (Borowitzka, 2013; Ben-Amotz, 2004; Ben-Amotz & Avron, 1989; Borowitzka & Borowitzka, 1988). Aunque, avances más recientes sobre el cultivo de *D. salina* con sustratos orgánicos de carbono (glucosa, acetato y glicerol) (Chavoshi y Shariati, 2019a; Gonabadi et al., 2021; Keerthi et al., 2015; Sohrabi et al., 2019) describen el potencial de estos compuestos orgánicos en el crecimiento y la producción de β -caroteno de esta microalga, que la sitúan más como una especie mixótrofa facultativa que una fotoautótrofa obligada. Por su particularidad de crecimiento heterotrófico deficiente, en esta tesis se define por primera ocasión que *D. salina* presenta mixotrofia fotosintética facultativa. Cabe destacar que en la fotomixotrofia o mixotrofia clásica, el rendimiento de la mixotrofia con luz y con oscuridad puede ser igual o mayor que la fotoautotrofia, mientras que el rendimiento de la mixotrofia fotosintética (con luz) es la única que podría superar al metabolismo fotoautotrófico en esta microalga.

1.2.6. Propiedades de los sustratos orgánicos de carbono usados en cultivos mixotróficos

Los microorganismos usan sustratos de carbono orgánico fermentables (e. g., glucosa, xilosa, rafinosa, galactosa) y no fermentables (e. g., glicerol, acetato, lactosa) para su crecimiento y síntesis de metabolitos. Los sustratos fermentables pueden ser metabolizados en ausencia de O_2 , mientras que aquellos no

fermentables requieren de O₂ y una cadena respiratoria mitocondrial funcional (Kocharin y Nielsen, 2013). Las microalgas presentan particularidades en su metabolismo tal como la preferencia de sustratos fermentables sobre no fermentables (Khan et al., 2018). Otras algas prefieren un determinado sustrato de carbono dentro de una extensa gama de compuestos orgánicos ofertados. Otras especies cuando son cultivadas con un sustrato de carbono no fermentable (glicerol) son forzados a usar la respiración aeróbica para la producción de energía celular (Stames y O'Toole, 2013).

La sacarosa es uno de los sustratos orgánicos con más alto calor de combustión, que no es más que la energía liberada como calor cuando un mol de una sustancia es totalmente oxidado con exceso de oxígeno (Tabla 2). No obstante, la utilización de disacáridos es difícil de asimilación como fuente de carbono orgánico por las microalgas (Wang et al., 2016). Contrariamente a los sustratos de un alto grado de reducción (número de electrones disponible para transferirse al oxígeno en la combustión), el crecimiento de los microorganismos con sustratos de bajo grado de reducción puede presentar limitaciones energéticas, aunque poseen una capacidad mejorada de conversión de carbono (Roels, 1980). El glicerol tiene el más alto grado de reducción por carbono, comparado con azúcares y ácidos orgánicos tal como acetato (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades energéticas, elementales y disponibilidad de los sustratos orgánicos usados en los cultivos de microalgas.

Característica	Sustrato de carbono orgánico				
	Sacarosa	Glucosa	Xilosa	Acetato	Glicerol
N° átomos de carbono	12	6	5	2	3
Grado de reducción	4.0 ²	4.0 ¹	4.0 ¹	4.0 ²	4.7 ¹
Calor de combustión kJ mol ⁻³	5.64	2.81	4.73	0.80	0.22
Disponibilidad ³	Mediana (residuos de melaza de la industria azucarera)	Mediana a baja (residuos de la industria del vino y restos lignocelulósicos)	Mediana (residuos de la industria del papel y pulpa)	Mediana (residuos de biodigestores y producción de biohidrógeno)	Alta (residuos de producción de biodiesel)
Precios ³	medianos	medianos a altos	medianos	Bajos	Bajos

(1): Verduyn (1991); (2): Beck et al. (2017); (3): Murarka et al. (2008)

La conversión de glicerol en intermediarios glucolíticos (e. g., fosfoenolpiruvato o piruvato) genera el doble de equivalentes reductores que los producidos por el metabolismo de glucosa o xilosa (Yazdani y Gonzáles, 2007), que lo convierten en materia prima ideal para producir compuestos químicos y combustibles con los rendimientos teóricos máximos de moléculas reducidas (Murarka et al., 2008; Xiberras et al., 2019).

Se ha reportado que la glucosa es un sustrato de carbono orgánico preferido para el cultivo mixotrófico de microalgas con altos beneficios en la biomasa y contenido de lípidos (Deng et al., 2019). Las microalgas cultivadas con glucosa pueden tener las más altas tasas de respiración que cualquier otra fuente de carbono orgánico, principalmente por el hecho de que la glucosa produce más energía por mol y es capaz de afectar rutas metabólicas involucradas en la asimilación de carbono, tamaño celular y síntesis de almidón y lípidos (Chen et al., 2015). No obstante, esta hexosa resulta en un nutriente costoso que puede representar hasta el 80% del costo total de los medios de producción (Estévez-Landazábal et al., 2013; Grama et al., 2016), además de su escasa disponibilidad debida a su competencia con materias primas usadas en la elaboración de alimentos y biocombustibles (Safi et al., 2014). El cultivo de *D. salina* con glucosa ha demostrado producir mejoras en el crecimiento, tamaño celular y síntesis de almidón y lípidos (Chavoshi y Shariati, 2019; Morowvat y Ghasemi, 2016).

El acetato también puede ser usado como fuente de carbono orgánico en cultivos mixotróficos de microalgas. La biodisponibilidad de acetato y otros ácidos es comparativamente superior comparado con glucosa, puesto que evita las vías metabólicas complejas (glucólisis) y no requiere de oxidación a formas más simples de azúcares (Chandra et al., 2015). El aumento en la síntesis de lípidos en microalgas parece ser dependiente de la suplementación de acetato, puesto que las células algales necesitan de una fuente primaria del precursor acetil CoA (Tan y Lee, 2016). El acetato es un residuo de la producción de biohidrógeno que tienen un prominente potencial de utilización en los cultivos microalgales (Heredia-Arroyo et al., 2010; Rai et al., 2013). En algunas microalgas, la disociación interna del ion acetato ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$), especialmente en altas concentraciones, provoca la acidificación del citosol y una fuerte acumulación de aniones que causa daños celulares (Chalima et al., 2017). Se ha sugerido que *D. salina* tiene capacidad de incorporar fácilmente acetato y por tanto podría ser usado como sustrato orgánico de carbono en el crecimiento y lípidos de esta microalga (Chavoshi y Shariati, 2019; Keerthi et al., 2015).

El glicerol es otro sustrato orgánico usado en los cultivos mixotróficos de microalgas con resultados muy alentadores para la producción de biomasa y lípidos algales (Cheah et al., 2018; Liang et al., 2019). Este poliol es un sustrato altamente soluble y un metabolito de producto final cuya síntesis y acumulación no compete con otras rutas metabólicas en los microorganismos (Shetty et al., 2019). La asimilación de glicerol

es especie dependiente, por lo que algunas microalgas muestran un alto crecimiento celular en medios inorgánicos suplementados con este sustrato, mientras que otras especies no (Cheah et al., 2018). El glicerol ha demostrado no tener un efecto nocivo sobre las células microalgales, incluso con altas concentraciones (Goyal et al., 2021; Taghavi y Robinson, 2016). Además, el glicerol crudo, residuo de la industria del biodiesel, tiene un gran potencial de uso para los cultivos microalgales (Heredia-Arroyo et al., 2010; Rai et al., 2013). El crecimiento de *Chlorella sorokiniana* CY-1 es incrementado significativamente con 1 g L^{-1} de glicerol; mientras que altas concentraciones de este sustrato, incrementan la viscosidad del medio y pueden afectar negativamente el crecimiento algal (Cheah et al 2018). En *D. salina*, se ha observado la existencia de variaciones fisiológicas ligadas con el crecimiento y productividad de lípidos cuando es cultivada con glicerol (Keerthi et al., 2015; Sohrabi et al., 2019; Suarez et al., 1999), lo cual debería ser abordado en los estudios posteriores con esta microalga.

La sacarosa también está siendo evaluada como sustrato orgánico en el cultivo mixotrófico de microalgas. Se ha encontrado que algunas especies como *Nannochloropsis salina* toleran bajas concentraciones de sacarosa (0.5 g L^{-1}) para mejorar su crecimiento y producción mixotrófica de pigmentos (Kumar y Saramma, 2017). Otras especies como *Pavlova lutheri* toleran hasta 3.5 g L^{-1} de sacarosa para aumentar su crecimiento y producción de lípidos comparado a las condiciones fotoautotróficas (Bashir et al., 2019). No obstante, hasta ahora no se conocen los mecanismos de utilización y crecimiento mixotrófico con este disacárido. En el caso de *D. salina*, hay estudios recientes del uso de la sacarosa como sustrato orgánico de carbono para el crecimiento y producción de lípidos y carbohidratos (Andreeva et al., 2021). Finalmente, los derivados de materiales lignocelulósicos tales como: D-xilosa y L-arabinosa, se han constituido en prominentes materias primas con abundancia y bajo costo que pueden usarse en los cultivos microalgales (Zheng et al., 2014). No obstante, un número reducido de especies microalgales han demostrado capacidad de sobrevivir y crecer en pentosas C_5 como la xilosa dentro de condiciones mixotróficas y heterotróficas (De Freitas et al., 2019; Song y Pei, 2018). Por tanto, se requiere de más investigaciones del uso de estos sustratos orgánicos en el cultivo de microalgas, incluyendo *D. salina*.

1.2.7. Carbono orgánico y rutas IPP, β -caroteno y carotenogénesis en *D. salina*

El metabolismo central de carbono presenta una serie compleja de reacciones enzimáticas para convertir azúcares en precursores metabólicos, los cuales son usados para generar biomasa o productos metabólicos celulares (Noor et al., 2010). El ciclo de Calvin-Benson y la glucólisis son procesos celulares

relacionados con el metabolismo del carbono, responsables de la conversión de C_1 a C_3 . Las algas verdes sintetizan piruvato (Pir, C_3) y gliceraldehido 3-fosfato (GAP, C_3) como precursores iniciales de la ruta MEP (metileritritol fosfato) (Capa-Robles et al., 2009), responsable de la síntesis de los bloques estructurales C_5

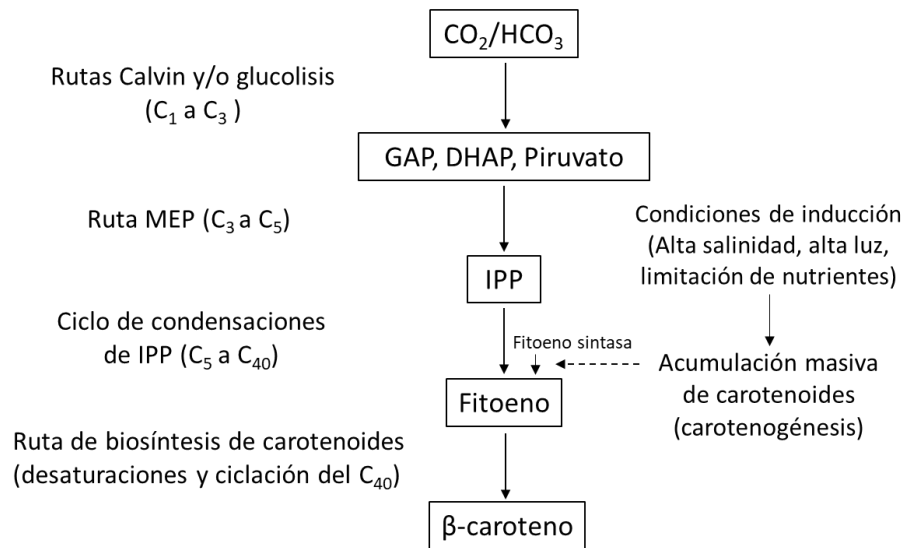


Figura 3. Red metabólica que integra a las rutas bioquímicas de carbono, isoprenoides y carotenoides asociadas con la biosíntesis de β -caroteno en *D. salina*. GAP: gliceraldehido 3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato.

de IPP (isopentenil pirofosfato). El ensamblaje y reconfiguración de las unidades IPP conlleva a la formación de isoprenoides, tales como β -caroteno. El proceso de biosíntesis de carotenoides y en especial del β -caroteno está integrado a través de rutas, subrutas y nodos principales del metabolismo de carbono (Figura 3).

La síntesis de β -caroteno en *D. salina* puede ocurrir bajo condiciones de crecimiento y en carotenogénesis (Davidi et al., 2014; Davidi et al., 2015) (Figura 3). Se ha planteado que la carotenogénesis de *D. salina* podría ser un mecanismo fisiológico de almacenamiento de carbono, en el cual el β -caroteno es sintetizado y almacenado como un producto extra de la fotosíntesis y del exceso de carbono en el medio (Ben-Amotz y Shaish, 1992; Solovchenko y Minyuk, 2021). Sin embargo, otra propuesta con más aceptación establece que la carotenogénesis es un mecanismo de protección de las células algales al estrés físico (e. g., alta intensidad de luz, alta temperatura y alta salinidad) (Ben-Amotz y Avron, 1983) y químico (e. g., limitación de nitrógeno, fósforo y sulfato) (Borowitzka, 2016). En las especies carotenogénicas de *D. salina*, el gen de la fitoeno sintasa (Psy) (enzima limitante de la ruta de carotenoides para la síntesis de fitoeno y β -caroteno) (Figura 3) puede tener varias copias, las cuales se ha hipotetizado que se sobreexpresan cuando las células

están en condiciones adversas de cultivo, desencadenando la carotenogenesis en esta microalga (Lou et al., 2020; Polle et al., 2020a). En la regulación de la ruta MEP en *D. salina* se ha demostrado la existencia de perfiles diferenciales de expresión de algunas isoformas de la enzima deoxixilulosa sintasa (DXS), cuyo nivel de expresión es regulado a través del control por retroalimentación con los intermediarios claves IPP y/o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Elleuch et al., 2019). Así también, se ha encontrado una correlación positiva entre el β -caroteno y la actividad de la enzima geranyl geranyl pirofosfato sintasa (GGPS), ocurriendo una alta actividad de esta enzima ligada con una alta acumulación de β -caroteno (Xu et al., 2022).

La adición de carbono orgánico a los medios de crecimiento puede estimular la carotenogénesis y sus rutas biosintéticas en varios microorganismos incluyendo microalgas. La disponibilidad de los sustratos orgánicos de carbono (e. g., glucosa y acetato) es un factor crucial para la acumulación masiva de β -caroteno y/o astaxantina en microalgas carotenogénicas que se cultivan hetero y mixotroficamente (Solovchenko y Minyuk, 2021). Estos autores sostienen que los sustratos podrían disminuir la fijación de carbono fotosintético por el principio de retroalimentación, estimulando cambios en el estado redox del citoplasma y en la cadena transportadoras de electrones en mitocondrias y cloroplastos y aumentando la acumulación de carotenoides como la astaxantina.

En especies clorofitas tales como *Haematococcus pluvialis* cuando es cultivada mixotróficamente con acetato como fuente de carbono orgánico y bajo estrés salino puede acumular astaxantina hasta 30 pg célula⁻¹ o 48 mg g⁻¹ (Ren et al., 2021). La microalga *D. salina* cultivada bajo condiciones mixotróficas usando glucosa o acetato puede acumular β -caroteno en concentraciones hasta de 5 pg célula⁻¹ (Mojaat et al., 2008) o 6.0 - 8.0 mg g⁻¹ (Ahuja et al., 2020; Morowvat y Ghasemi, 2016). Consecuentemente, las nuevas investigaciones de mixotrofia en *D. salina* deberían enfocarse, entre otras cosas, a la mejora de los rendimientos de biomasa y de carotenoides a través de una producción mixotrófica que maneje equilibradamente los metabolismos fotoautotrófico y heterotrófico, así como también, el sinergismo de los sistemas fotosintético y respiratorio, de tal manera que se pueda eficientizar la utilización de carbono orgánico y luz en estas microalgas (Patel et al., 2021).

1.3. Justificación

La producción de biomasa y bioproductos tal como el β -caroteno se han asociado como productos de fotoautotrofia obligada en *D. salina* (Ben-Amotz, 2004; Ben-Amotz y Avron, 1989; Becker 1994; Borowitzka

y Borowitzka, 1988; Borowitzka, 2013; Chavoshi y Shariati 2019a), lo cual ha obedecido a la facilidad y simplicidad de su operatividad, marginando otros modos de nutrición. Los sistemas de cultivo fotoautotróficos se enfrentan al problema de los bajos rendimientos de la biomasa y β -caroteno, lo cual está íntimamente ligado a las bajas cifras de conversión de energía fotosintética y la competencia metabólica de carbono en esta microalga (Figura 4). No obstante, se hipotetiza que los fotosistemas algales podrían tener la capacidad de optar por rutas alternativas a la fotoautotrofia tales como glucólisis, ciclo de Krebs, ciclo del glicerol, entre otros. Por lo que es necesario ahondar en las investigaciones sobre cómo el metabolismo heterotrófico y/o mixotrófico podrían influir significativamente en la producción rentable y sostenible de esta clorofita utilizando carbono orgánico en condiciones que favorezcan mayores rendimientos en biomasa y β -caroteno. La producción mixotrófica puede tener cierta ventaja sobre los cultivos fotoautotróficos, entre otras cosas, porque estos biosistemas no están limitados por luz y tampoco son afectados por la fotoinhibición (Castillo et al., 2021), además que podrían contribuir a una regulación eficiente de energía, carbono, gases (CO_2/O_2) y pH.

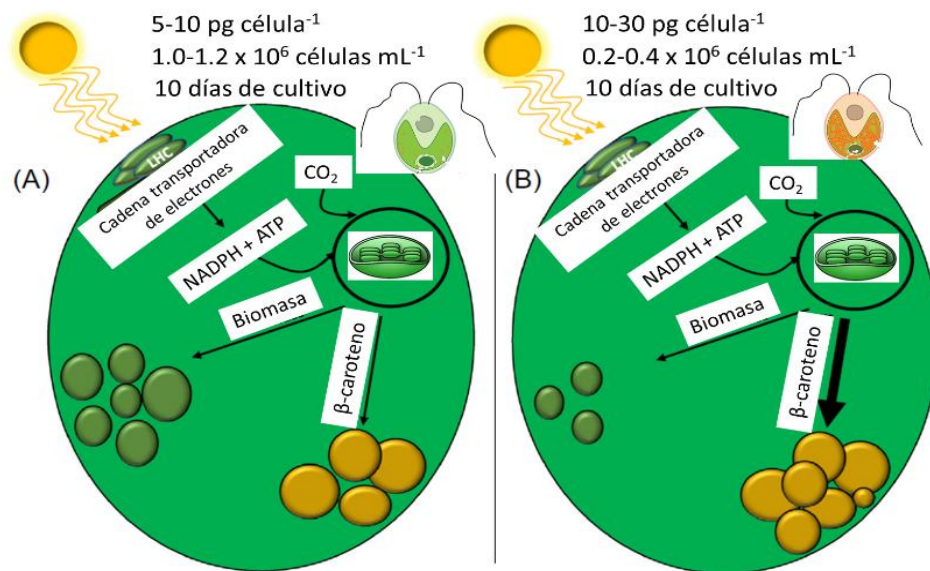


Figura 4. Rendimiento de biomasa (células mL⁻¹) y β -caroteno (pg célula⁻¹) en *D. salina* cultivada en sistemas fotoautotróficos optimizando las condiciones de crecimiento (A) y de carotenogénesis (B). Adaptado de Gómez y González (2005) y Naduthodi et al. (2021).

La mayoría de las iniciativas de cultivos fotoautotróficos y mixotróficos presentan limitaciones en los rendimientos algales y productividades de β -caroteno obtenidos (Tabla 3). Así, cuando la microalga *D. salina* es cultivada en condiciones fotoautotróficas puede sintetizar carotenoides (β -caroteno) en un rango bajo (0.7- 2.4 pg célula⁻¹), aunque manteniendo un crecimiento celular mejorado (10⁷ células mL⁻¹);

mientras que en cultivos mixotróficos de esta microalga, hay un crecimiento algal moderado (1.2×10^6 células mL^{-1}) y el β -caroteno alcanza los $70 \text{ pg célula}^{-1}$ (Tabla 3). Estos rendimientos se alcanzan generalmente bajo condiciones de cultivo particulares, tales como: alta concentración de sustratos, gran tamaño de inóculo y alta intensidad de luz, así como también, largos períodos de cultivo, adición de otros nutrientes (C y N) y uso de sistemas de agitación o aireación, que afectan los costos de producción de microalgas (Tabla 3). Consecuentemente, se requiere la optimización de los sistemas mixotróficos a través de la combinación de las fuentes de carbono inorgánico y orgánico y los factores ambientales, con el fin de mejorar la producción de biomasa y metabolitos algales a través de un sistema mixotrófico práctico, económico y sustentable.

El interés de estudiar la nutrición mixótrofa de *D. salina*, está enfocado a conocer cómo la nutrición de carbono orgánico puede tener influencia en el crecimiento celular, β -caroteno y carotenogénesis. La nutrición orgánica de carbono repercute con muchos cambios fisiológicos y metabólicos en las microalgas, los cuales son específicos de cada especie, y se encuentra en las investigaciones en *D. salina*. La propuesta de la mixotrofia fotosintética como método de cultivo se abordó en una primera etapa a través de la bioprospección de sustratos orgánicos de carbono (glucosa, acetato, xilosa, sacarosa y glicerol) para lograr altos rendimientos y metabolitos celulares comparándolo con la nutrición fotoautotrófica y heterotrófica en *D. salina*. Después, se procedió a la optimización de las condiciones de sustratos, salinidad e iluminación a fin de mejorar las productividades y bioproductos algales (e. g., β -caroteno). Los experimentos de cultivo mixotrófico se realizaron en condiciones de laboratorio, proyectando su posterior escalamiento a cultivos masivos con sustratos orgánicos de bajo costo, como el glicerol crudo que podría convertirse en un sustrato de características energéticas y bioquímicas favorables para el crecimiento de las microalgas, incluyendo *D. salina*.

Tabla 3. Rendimiento de la biomasa y β -caroteno de *D. salina* cultivada con sustratos orgánicos reportados en la literatura.

Metabolismo/ sustrato	Biomasa	β -caroteno	Observaciones	Referencia
Fotoautotrofico				
CO ₂	1.0–5.0 × 10 ⁶ cells mL ⁻¹	4- 8 pg cell ⁻¹	Diferentes cepas; temperatura: 25-30 °C; intensidad de luz: 150 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; sin aireación; 60 días de cultivo	Cifuentes et al. (1992)
CO ₂	0.6 - 7.5 × 10 ⁷ células mL ⁻¹	0.7- 2.4 pg célula ⁻¹	Temperatura: 25-30 °C, luz: 10–15 klux; 1-1.5 g L ⁻¹ KNO ₃ ; agitación; 15-16 días de cultivo.	Pourkarimi et al. (2020)
CO ₂	1.3 g L ⁻¹	70 mg L ⁻¹ (53.8 mg g ⁻¹)	Aireación: 600 mL min ⁻¹ ; adición CO ₂ ; Luz: 600-1000 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 6-7 días de cultivo	Xi et al. (2020)
NaHCO ₃	4.0 × 10 ⁷ células mL ⁻¹	0.5 pg célula ⁻¹	5 g L ⁻¹ NaHCO ₃ ; agitación: 160 rpm; temperatura: 30 °C; 280 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 18 días de cultivo.	Kim et al. (2017)
Heterotrofico				
Glucosa	--	--	Tasa de crecimiento y clorofila en <i>D. salina</i> es escaso y cercano a cero.	Chavoshi y Shariati (2019a)
Mixotrofico				
Glucosa	1.015 g L ⁻¹	8.12 mg g ⁻¹	15.0 g L ⁻¹ glucosa; 1.80 g L ⁻¹ KNO ₃ ; 0.043 g L ⁻¹ NaHCO ₃ ; agitación: 130 rpm; 21 días de cultivo.	Morowvat y Ghasemi (2016)
	1.24 g L ⁻¹	6.07 mg g ⁻¹	13.23 g L ⁻¹ glucosa; 3.145 g L ⁻¹ nitrato de potasio; 0.043 g L ⁻¹ NaHCO ₃ ; 21 días de cultivo	Ahuja et al. (2020)
Acetato	1.0-1.2 x 10 ⁶ células mL ⁻¹	< 5 pg célula ⁻¹	5 g L ⁻¹ acetato; adición CO ₂ ; agitación: 200 rpm; Luz: 400 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 8 días de cultivo.	Mojaat et al. (2008)
	1.2 x 10 ⁶ células mL ⁻¹	70 pg célula ⁻¹	4 g L ⁻¹ acetato; 1 g L ⁻¹ extracto de malta; 3 g L ⁻¹ extracto de levadura; luz: 150 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 26 días de cultivo.	Keerthi et al. (2015)
Glicerol	1.0 x 10 ⁶ células mL ⁻¹	0.94 pg célula ⁻¹	1 g L ⁻¹ glicerol; luz: 189 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 18 días de cultivo.	Suarez et al. (1999)
	4.0-5.0 x 10 ⁶ células mL ⁻¹	0.8-1.0 pg célula ⁻¹	2.5 g L ⁻¹ glicerol; agitación: 150 rpm; temperatura: 30 °C; luz: 75 μ mol fotones m ² s ⁻¹ ; 12 días de cultivo.	Sohrabi et al. (2019)

1.4. Hipótesis

La microalga *D. salina* puede optar por la nutrición heterotrófica y/o mixotrófica utilizando sustratos de carbono orgánico (glucosa, acetato, glicerol, sacarosa, xilosa) para producir simultáneamente altos rendimientos de biomasa y β -caroteno en condiciones mixotróficas inducidas por la combinación de salinidad e iluminación y obedeciendo a sus rutas de biosíntesis de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Evaluar la capacidad productiva y metabólica de *D. salina* al ser sometida diferentes sustratos orgánicos de carbono y condiciones de salinidad e iluminación con la finalidad de incrementar la producción de biomasa y carotenoides, especialmente β -caroteno y estimular la carotenogenesis en esta microalga bajo cultivo mixotrófico fotosintético, desarrollado de manera práctica, económica y sustentable.

1.5.2. Específicos

- a) Determinar el efecto de la heterotrofia y mixotrofia en el crecimiento de *D. salina* cultivada usando diferentes sustratos orgánicos de carbono (glucosa, acetato, xilosa, glicerol y sacarosa).
- b) Evaluar la influencia de la relación C/N en el rendimiento de biomasa, pigmentos (clorofilas y carotenoides) y productos de reserva (almidón) de *D. salina* cultivada con varios sustratos orgánicos de carbono.
- c) Estimar parámetros cinéticos y de modelación del crecimiento de *D. salina* mediante mixotrofia fotosintética inducida con diferentes sustratos orgánicos de carbono.

- d)** Evaluar el rendimiento de biomasa y de bioproducto (β -caroteno) en *D. salina* a través de la mixotrofia fotosintética inducida mediante la optimización de la combinación de glicerol, salinidad e iluminación.
- e)** Estudiar el rol de la mejor fuente de carbono orgánico en la mixotrofia de *D. salina* y su relación con las rutas metabólicas de biosíntesis de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis.
- f)** Determinar el rendimiento cuántico máximo de *D. salina* bajo mixotrofia fotosintética inducida mediante glicerol, salinidad e iluminación.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Cepa y condiciones iniciales de cultivo

La microalga *Dunaliella salina* BC02 fue obtenida de la colección de microalgas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE (México) y cultivada en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio inorgánico (MI) propuesto para *Dunaliella* (Ben-Amotz y Avron, 1983). Los matraces con las suspensiones algales fueron colocados en una cámara ambiental construida *ex professo* para mantener estable la temperatura de cultivo (22 ± 02 °C) (Imamoglu et al., 2014) y manejar las intensidades de luz experimentales a través del uso de lámparas fluorescentes cool white de 40 watts. Inicialmente, precultivos fotoautotróficos de *D. salina* fueron desarrollados en MI con luz $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidad 1.5 M NaCl, pH 7.0 - 7.5 y agitación manual diaria, a fin de prevenir la sedimentación y mantener una distribución uniforme de las células para captación de luz y nutrientes. Una vez en fase exponencial, los cultivos iniciales fueron cosechados e inoculados (a un porcentaje de 10% y 0.1×10^6 células ml^{-1}) a cada medio de cultivo mixotrófico y a los controles fotoautotróficos con medios inorgánicos (MI), los cuales fueron expuestos a las mismas condiciones ambientales antes descritas (Figura 5).

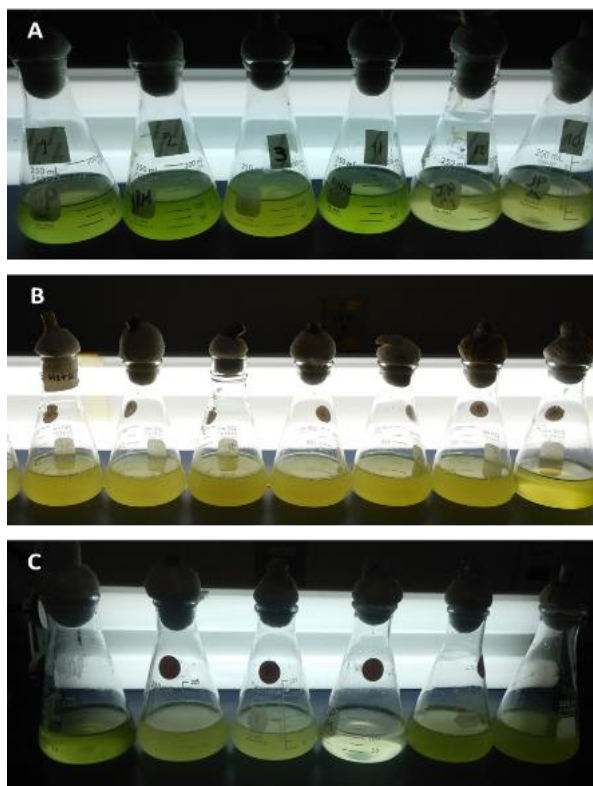


Figura 5. Cultivos celulares de *D. salina* bajo condiciones fotoautotróficas (A) y mixotróficas con concentraciones altas (B) y bajas (C) de sustratos orgánicos.

2.2. Experimentos realizados en la tesis

2.2.1. Bioprospección de sustratos orgánicos para cultivo mixotrófico de *D. salina*

2.2.1.1. Adaptación de *D. salina* a heterotrofia y mixotrofia

Algunas microalgas como *D. salina* optan por la nutrición orgánica a través de regulaciones bioquímicas y celulares para su mantenimiento y crecimiento con diversos sustratos orgánicos en los ambientes hipersalinos, lo cual no ha sido abordado a detalle. En ese sentido, un experimento de adaptación de *D. salina* a la heterotrofia y mixotrofia fue conducido a través de un diseño factorial 5x2 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: sustrato orgánico con 05 niveles (glucosa, acetato, sacarosa, xilosa y glicerol) y el Factor 2: régimen nutricional con 02 niveles (mixotrófico y heterotrófico). El experimento consistió en 30 unidades experimentales que se dividieron en 10 tratamientos con 3 réplicas cada uno. Los cultivos mixotróficos fueron establecidos con el uso de los diferentes sustratos orgánicos y las condiciones de crecimiento más favorables en esta microalga: luz continua a $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, salinidad 1.5 M NaCl y pH 6.8 - 7.0 (Xu et al., 2016). Los sistemas heterotróficos recibieron las mismas condiciones de cultivo, excepto que fueron expuestos a oscuridad. En base a relaciones estequiométricas de nutrientes y de biomasa propuestas por Capa (2009), se determinaron las concentraciones de sustratos orgánicos que se usaron en los experimentos de adaptación de esta microalga a mixotrofia y heterotrofia. Cabe mencionar que en estos cálculos se despreció el aporte del Cl (gas) del medio de cultivo. El cálculo de la cantidad de sustrato orgánico que se adicionó al medio de cultivo de *D. salina* para producir 1 g L^{-1} de biomasa algal, se basó en las ecuaciones (2), (3) y (4):

$$X - X_0 = \frac{Y_{X/S}}{S_0 - S} \quad (2)$$

Donde:

X y X_0 : Concentración final e inicial de biomasa, respectivamente.

S_0 y S: Concentración inicial y final de sustrato, respectivamente

$Y_{x/s}$: Rendimiento de biomasa algal por consumo de sustrato

Sabiendo que, al inicio de todo cultivo algal, no hay consumo de sustrato ($S = 0$) ni producción de biomasa ($X_0 = 0$), entonces la Ec. 2 se puede reducir a:

$$S_0 = \frac{X}{Y_{x/s}} \quad (3)$$

Ahora si consideramos una concentración final de biomasa de 1 g L^{-1} , entonces la Ec. 3 puede reemplazarse de la siguiente manera:

$$S_0 = \frac{1}{Y_{x/s}} \quad (4)$$

De acuerdo con la Ec. 3, se calcularon las concentraciones equimolares de los sustratos de carbono orgánico (SCO) para los experimentos de heterotrofia y mixotrofia. De la tabla 4, se desprende que para producir teóricamente 1 g L^{-1} de biomasa mixotrófica de *D. salina* se necesita preparar un litro de medio de cultivo con 1.25 g de glucosa. En cambio, si se usara el acetato se necesitarían 2.83 g de sustrato orgánico.

Tabla 4. Concentraciones estequiométricas de los SCO calculados a partir de las características de los nutrientes y biomasa de *D. salina* (1 g L^{-1}).

Nombre común	Sustrato (S)		Biomasa (X) (%)	$Y_{x/s}$	S_0 (g L^{-1})
	Formula química	%			
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	40	50	0.80	1.25
Acetato	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	17.64	50	0.35	2.83
Sacarosa	$\text{C}_{12}/\text{H}_{22}/\text{O}_{11}$	42.07	50	0.84	1.19
Xilosa	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	39.97	50	0.80	1.25
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	39.09	50	0.78	1.28

Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales conforme a Capa (2009). Con la información obtenida, se determinaron el número máximo de células (N_{max}) (Rodríguez-Maroto et al., 2005), tasa de crecimiento específica (μ) y tiempo de duplicación (T_d) de acuerdo con Guillard (1973). Finalmente, los datos obtenidos fueron sometidos a un ANOVA de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey con un nivel de significancia del 0.05, de acuerdo con las recomendaciones de Montgomery (2004).

2.2.1.2. Relación C/N

La relación C/N es un importante factor de producción de los cultivos microalgales puesto que de éste dependen importantes características biológicas y productivas tales como composición bioquímica, tasa de crecimiento y productos metabólicos. El estudio del efecto de la relación C/N usando carbono orgánico en el crecimiento y pigmentos de *D. salina* se condujo a través de un diseño factorial 6x5 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: relación C/N con 06 niveles (7/1, 10/1, 20/1, 30/1, 40/1 y 50/1) y Factor 2: sustrato orgánico con 05 niveles (glucosa, acetato, sacarosa, xilosa y glicerol). El experimento con diferentes relaciones C/N y SCO consistió en 90 unidades experimentales que correspondieron a 30 tratamientos con 3 réplicas cada uno, conforme a la Tabla 5. Los cultivos microalgales desarrollados con el medio inorgánico (MI) fueron considerados como controles fotoautotróficos.

Tabla 5. Descripción de los tratamientos del experimento para evaluar la relación C/N y SCO en el cultivo de *D. salina*.

Sustrato (g L ⁻¹)	Relación C/N (NaNO ₃ = 0.425 g L ⁻¹)					
	7/1	10/1	20/1	30/1	40/1	50/1
Glucosa	1.22	1.75	3.50	5.25	7.00	8.75
Acetato	2.78	3.96	7.93	11.89	15.85	19.81
Sacarosa	1.17	1.67	3.34	5.01	6.68	8.35
Xilosa	1.23	1.76	3.52	5.27	7.03	8.79
Glicerol	1.26	1.79	3.59	5.38	7.17	8.96

Los SCO representativos usados en nuestros experimentos fueron D-glucosa, D-xilosa, sacarosa, glicerol y acetato de sodio adquiridos de Sigma Aldrich (México). Inicialmente, se desarrollaron precultivos fotoautotróficos bajo las siguientes condiciones: MI, luz 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidad 1.5 M NaCl, pH entre 7.5 - 8.0 y agitación manual diaria. El crecimiento mixotrófico de *D. salina* fue comparado con el cultivo fotoautotrófico, puesto que un crecimiento celular reducido fue observado con los sustratos orgánicos en condiciones heterotróficas (oscuridad). En muchos casos, las células pueden carecer de energía en condiciones de luz tenue u oscuridad, lo que no les permite activar la síntesis o traducción de transportadores en la membrana celular, incluso si el sustrato orgánico está presente (Lee, 2004). Por lo cual, esto explicaría porqué se produjo un efecto estimulante de la luz sobre el metabolismo de los SCO en las células de *D. salina*. Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales conforme a Capa (2009). Con la información obtenida, se determinó el Nmax de los distintos tratamientos (Rodríguez-Maroto et al., 2005), basado en las diferentes relaciones

C/N y SCO. Para encontrar diferencias significativas en el crecimiento algal, los datos fueron sometidos a un ANOVA de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey con un nivel de significancia del 0.05. Al mismo tiempo, se realizó una evaluación de la respuesta de *D. salina* a los medios orgánicos mediante los cambios en el tamaño de las células usando un microscopio invertido Nikon Eclipse TI y sistema confocal, conforme a Kleinegris et al. (2011). Así también, se registró el almacenamiento masivo de almidón (prueba rápida con Lugol) y la formación de sustancias poliméricas extracelulares mediante la observación visual.

Simultáneamente, se realizó la determinación espectrofotométrica de almidón (Takeshita et al., 2015) y los principales pigmentos (Lichtenthaler y Wellburn, 1985; Wellburn, 1994) de *D. salina* cultivada con los diferentes sustratos orgánicos usando la relación C/N (20/1) apropiada para el crecimiento de esta microalga. Así también, se registró el pH de cultivo con un pH-metro marca Hanna meter (HI98130). Con la información obtenida, se construyó un mapa de calor para representar las variaciones en la abundancia de los pigmentos, almidón y el pH de cultivo. Posteriormente, se realizó un ANCOVA para eliminar la heterogeneidad de los datos de crecimiento de *D. salina* cultivada con los diferentes sustratos orgánicos (variable dependiente) que tienen influencia del pH de cultivo (covariable). Después, se realizó un análisis HPLC de los pigmentos en esta microalga (Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008; Van Heukelem y Thomas, 2001) cultivada con las mejores condiciones C/N (20/1) y los sustratos orgánicos más representativos (glucosa y acetato). El perfil HPLC de los pigmentos fue agrupado a través de análisis de clústeres. Finalmente, se determinó la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) (White et al., 2011) para los cultivos de esta microalga con los distintos SCO.

2.2.1.3. Interacción sustrato, salinidad e intensidad de luz

La salinidad e intensidad de luz y su interacción con el carbono orgánico son algunos de los factores ambientales que afectan el crecimiento celular y la producción de pigmentos en microalgas (Moreno-García et al., 2019). El estudio del efecto de la interacción de los SCO, salinidad e intensidad de luz sobre el crecimiento y pigmentos de *D. salina* se condujo a través de un diseño factorial 6x2x2 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: sustrato con 06 niveles (MI, glucosa, acetato, sacarosa, xilosa y glicerol); Factor 2: salinidad con 02 niveles (1.5 M y 3.0 M NaCl) y Factor 3: intensidad de luz con 02 niveles (50 y 100 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Los cultivos algales desarrollados con el medio inorgánico (MI) fueron tomados como controles fotoautotróficos. Este experimento consistió en 72 unidades experimentales correspondientes

a 24 tratamientos y 3 réplicas de cada uno. Los cultivos mixotróficos recibieron agitación manual diaria y se registró el pH con ayuda de un pH-metro marca Hanna meter (HI98130).

Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares (Capa, 2010) y biomasa seca (Zhu y Lee, 1997) de los cultivos microalgales. Así también, se realizó la cuantificación de los pigmentos se realizó usando acetona 100% y un espectrofotómetro HACH DR 5000 (Lichtenthaler y Wellburn, 1985; Wellburn, 1994). Se determinó el contenido de almidón de las muestras algales a través del método de la antrona (Brányiková et al., 2011). Los datos de densidad celular, contenido de pigmentos y almidón fueron sometidos a un ANOVA de tres vías con prueba *a posteriori* de Tukey (Montgomery, 2004), a fin de encontrar diferencias significativas entre los distintos tratamientos a partir de sustratos, salinidades e intensidades de luz.

2.2.1.4. Parámetros poblacionales y modelación del crecimiento algal

En la actualidad, la microbiología predictiva es una herramienta valiosa que busca explicar mediante modelos matemáticos, los cambios dinámicos en la biomasa y metabolitos de los microorganismos expuestos a sustratos, factores ambientales y tiempo, con la finalidad de proporcionarnos beneficios de carácter ecofisiológico e industrial (Chambi Rodríguez y Torres Jiménez, 2021). En ese sentido, se realizaron cultivos de *D. salina* con los SCO y el medio control (MI) usando una relación C/N de 20/1, salinidad 1.5 M NaCl e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. De acuerdo a las recomendaciones de Chagas et al. (2015), Morowvat y Ghasemi (2016) y Rodríguez-Maroto et al. (2005), se determinaron los parámetros de crecimiento y productividad de biomasa como sigue: X_{max} = concentración máxima de biomasa (g L^{-1}); μ_{max} = tasa de crecimiento específica máxima (día^{-1}); N_{max} = número celular máximo (células ml^{-1}); D_{max} = día en el cual se alcanza el N_{max} ; P_{max} = productividad máxima de biomasa (g L^{-1}). Con esta información y según Praveen et al. (2018), se determinaron los modelos de crecimiento siguientes: logístico modificado, Gompertz modificado y Baranyi-Roberts, equivalentes a las ecuaciones (5), (6) y (7), respectivamente.

Modelo Logístico modificado

$$Y(t) = \frac{X_0 e^{(\mu_{\text{max}} t)}}{\left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{\text{max}}}\right) \left(1 - e^{(\mu_{\text{max}} t)}\right)\right]} \quad (5)$$

Modelo Gompertz modificado

$$Y(t) = A * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max} \exp(1)}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

Modelo Baranyi-Roberts

$$Y(t) = \mu_{max} X(t) - \ln \left(1 + \frac{\exp(\mu_{max} X(t)) - 1}{\exp C} \right) \quad (7)$$

Donde

$$X(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(e^{-\mu_{max} t} + e^{-\mu_{max} \lambda} - e^{-\mu_{max}(t+\lambda)} \right)$$

Abreviaturas:

Y(t): es el rendimiento de biomasa proyectado con respecto al tiempo (t)

X(t): es una función de ajuste para el crecimiento celular

X₀: concentración inicial de biomasa (g L⁻¹)

t: Es el tiempo en el que se alcanza la productividad máxima de biomasa (días)

A: es la biomasa máxima producida en las condiciones de cultivo establecidas (g L⁻¹)

λ: es la fase de latencia observada (días)

C: Diferencia entre la concentración de biomasa final e inicial

Para evaluar la confiabilidad de los modelos de crecimiento, los valores experimentales y modelados fueron sometidos a las métricas estadísticas: coeficiente de determinación (R²) y error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés).

2.2.2. Optimización de la mixotrofia fotosintética de *D. salina* usando glicerol

Con base a los mejores resultados de producción de β -caroteno y autorregulación del pH de cultivo obtenidos, nosotros seleccionamos al glicerol como sustrato orgánico promisorio para continuar con nuestras investigaciones de optimización y mejoramiento del crecimiento, β -caroteno y carotenogénesis en *D. salina* bajo mixotrofia fotosintética. Nuestra selección se sustenta porque la glucosa hasta ahora no ha demostrado ser un buen sustrato orgánico ya que muchas veces actúa reduciendo la evolución fotoquímica del O_2 , la afinidad celular por CO_2 y la síntesis de enzimas del ciclo de Calvin en las microalgas (Liu et al., 2009). Además, que es un sustrato relativamente costoso comparado a otros sustratos (Kim et al., 2019). El acetato puede ser tóxico para varios microorganismos en altas concentraciones (Chalima et al., 2017) y algunas veces no estimula la síntesis de β -caroteno (Mojaat et al., 2008). La xilosa y sacarosa no pueden ser asimiladas fácilmente por los microorganismos, incluyendo microalgas debido a deficiencias enzimáticas (Kuyper et al., 2003; Wang et al., 2018). Contrariamente, el glicerol puede ser asimilado apropiadamente por los microorganismos fotosintéticos en condiciones respiratorias (Clomburg y Gonzalez, 2013). Este poliol carece de efectos tóxicos sobre las células algales incluso en altas concentraciones (Taghavi y Robinson, 2016). Esta molécula es el mayor subproducto de la industria del biodiesel (glicerol crudo) que debido a sus características salinas podría promover el crecimiento y producción de microorganismos carotenogénicos halofílicos (Bindea et al. 2018).

2.2.2.1. Fotoperiodo

El régimen de luz y el fotoperiodo son componentes críticos en la determinación de la producción de biomasa de los cultivos microalgales (Wahidin et al., 2013). En ese sentido, se realizó un experimento para evaluar el efecto del fotoperiodo de luz y oscuridad (L/O) (24/0, 18/6, 12/12, 6/18 y 0/24) en el crecimiento de *D. salina* cultivada con glicerol, lo cual fue conducido a través de un diseño completamente al azar. El experimento consistió en 15 unidades experimentales, 5 tratamientos y 3 réplicas para cada uno. El régimen de oscuridad fue manejado retirando a los cultivos algales de la fuente de luz y cubriéndolos herméticamente con papel aluminio a fin de evitar cualquier ingreso de luz. Se realizaron cultivos de *D. salina* con los SCO y los diferentes fotoperiodos usando la relación C/N de 20/1, salinidad 1.5 M NaCl e intensidad de luz de $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios a los cultivos microalgales. Con la información obtenida, se determinaron el número máximo de células (N_{max}) (Rodríguez-Maroto et al., 2015), tasa de crecimiento específica (μ) y

tiempo de duplicación (Td) (Guillard, 1973). Finalmente, los datos obtenidos fueron sometidos a un ANOVA de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey con un nivel de significancia del 0.05.

2.2.2.2. Concentración de glicerol

Los estudios previos demostraron una heterogeneidad en los resultados sobre las concentraciones de glicerol más apropiadas para el cultivo de *D. salina* (Keerthi et al., 2015; Sohrabi et al., 2019; Suarez et al., 1999). Por lo que se optó por llevar a cabo un experimento para evaluar el efecto de la concentración de glicerol (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 mM) en el crecimiento de *D. salina*, conducido a través de un diseño completamente al azar. El experimento consistió en 21 unidades experimentales, 7 tratamientos y 3 réplicas de cada uno. Se realizaron cultivos de *D. salina* con una salinidad 1.5 M NaCl e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La variable de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales. Con la información obtenida, se determinó el Nmax de los tratamientos con las diferentes concentraciones de glicerol ensayadas (Rodríguez-Maroto et al., 2015). Finalmente, los datos fueron sometidos a un ANOVA de una vía con prueba *a posteriori* de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 (Montgomery, 2004).

2.2.2.3. Interacción de concentración de glicerol, salinidad e intensidad de luz

En esta parte del trabajo, se realizó un experimento para evaluar el efecto combinado de la concentración de glicerol, salinidad e intensidad de luz sobre el crecimiento y pigmentos de *D. salina* y se condujo a través de un diseño factorial 4x2x3 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: concentración de glicerol con 04 niveles (0, 6.25, 12.5 y 25 mM); Factor 2: salinidad con 02 niveles (1.5 M y 3.0 M NaCl) y Factor 3: intensidad de luz con 03 niveles (10, 50 y 100 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los cultivos algales desarrollados con el medio inorgánico (MI) fueron considerados como controles fotoautotróficos. El experimento consistió en 72 unidades experimentales, 24 tratamientos y 3 réplicas para cada uno. De acuerdo con los modos de nutrición, las intensidades de luz fueron establecidas de la siguiente manera: heterotrofia (10 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mixotrofia (50 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y fotoautotrofia (100 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Sforza et al., 2019) usando un medidor de luz (VWR, numero de catálogo 21800-014). Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares (Capa, 2009) y biomasa seca (Zhu y Lee, 1997) de los cultivos. La cuantificación de los pigmentos se realizó usando acetona 100% y un espectrofotómetro HACH

DR 5000 ((Lichtenthaler y Wellburn, 1985; Wellburn, 1994). Los datos de densidad celular y contenido de pigmentos fueron sometidos a un ANOVA de tres vías con prueba *a posteriori* de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 (Montgomery, 2004), a fin de encontrar diferencias significativas entre los distintos tratamientos correspondientes a niveles de sustrato, salinidades e intensidades de luz.

2.2.2.4. Carotenogénesis bajo condiciones optimizadas de glicerol, salinidad y luz

Con la finalidad de estimular la síntesis masiva de β -caroteno, las células de *D. salina* que alcanzaron su máximo crecimiento al séptimo día de cultivo en mixotrofia con glicerol fueron expuestas a una alta intensidad de luz (50 a 300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por un periodo de 3 días (Guevara et al., 2005). Después de lo cual, se realizó un análisis HPLC de los principales pigmentos (Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008; Van Heukelem y Thomas, 2001) de *D. salina* cultivada con glicerol y sometida al cambio de intensidad de luz. Los datos de contenido de pigmentos fueron sometidos a un ANOVA de una vía con prueba de diferencia significativa de Tukey con un nivel de significancia del 0.05.

2.2.2.5. Glicerol y actividad del PSII

En esta parte del trabajo se propuso evaluar la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) del PSII de *D. salina* expuesta a la acción del sustrato glicerol y el inhibidor 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilúrea (DCMU). Este experimento se realizó mediante un diseño factorial 2x2 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: sustrato con dos niveles (MI y glicerol) y Factor 2: Inhibidor con dos niveles (con y sin DCMU). El ensayo se condujo con 12 unidades experimentales que correspondieron a 4 tratamientos y 3 réplicas cada uno. Se realizaron cultivos de *D. salina* a una salinidad 1.5 M NaCl e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores de eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) obtenidos con los distintos tratamientos (White et al., 2011) fueron sometidos a un ANOVA de dos vías con prueba de Tukey *a posteriori* con un nivel de significancia del 0.05.

2.2.2.6. Glicerol y salinidad isoosmótica (3.0 M NaCl)

Otro grupo de experimentos fue desarrollado para evaluar si la influencia del glicerol en el crecimiento de *D. salina* es dependiente del cambio de salinidad (1.5 a 3.0 M, salinidad no-isoosmótica) y no es una

consecuencia propia de la adaptación salina (3 M, salinidad isoosmótica). El experimento conducido a través de un diseño completamente al azar consistió en 6 unidades experimentales las cuales correspondieron a 2 tratamientos (salinidad isoosmótica y no isoosmótica) con 3 réplicas cada uno. Se realizaron cultivos de *D. salina* usando 12.5 mM glicerol e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La variable de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales. Con la información obtenida, se determinó el Nmax de los distintos tratamientos (Rodríguez-Maroto et al., 2015). Finalmente, estos datos fueron sometidos a un ANOVA de una vía con prueba de Tukey *a posteriori* con un nivel de significancia del 0.05.

2.2.3. Efecto del glicerol en *D. salina* en condiciones de mixotrofia fotosintética

2.2.3.1. Dinámica del consumo de glicerol

En esta parte del trabajo, se realizó un experimento para evaluar el consumo del glicerol en *D. salina* el cual se condujo a través de un diseño completamente al azar. El experimento consistió en 6 unidades experimentales, 2 tratamientos (MI y glicerol) y 3 réplicas para cada uno. Los cultivos algales tuvieron una duración de 7 días con muestreos cada 2 días. Se realizaron cultivos de *D. salina* usando una salinidad 1.5 M NaCl e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se determinaron las concentraciones de glicerol extracelular e intracelular de los cultivos de *D. salina*. Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales. El pH se registró a través de pH-metro marca Hanna meter (HI98130). La biomasa seca se obtuvo con el método gravimétrico recomendado por Zhu y Lee (1997). La cuantificación de los pigmentos (clorofilas *a* y *b* y β -caroteno) se realizó con una extracción en acetona al 100% (Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008; Van Heukelem y Thomas, 2001) y un espectrofotómetro HACH DR 5000 usando longitudes de onda descritas en las ecuaciones 15-17 (Lichtenthaler y Wellburn, 1985; Wellburn, 1994). El contenido de glicerol extracelular e intracelular se evaluó conforme a Petrovic y Plemenitas (2003) y usando un kit de extracción (Ref. 12812) de la compañía BioSystems Reagents & Instruments (España). Finalmente, los datos se sometieron a un ANOVA de una vía con prueba de Tukey *a posteriori* con un nivel de significancia del 0.05.

2.2.3.2. Efecto del glicerol en la composición bioquímica de *D. salina*

La evaluación del efecto del glicerol en la composición bioquímica de *D. salina* fue conducida a través de un diseño factorial 4x2x3 que correspondió a lo siguiente: Factor 1: tipo de metabolito con cuatro niveles

(carbohidratos, almidón, lípidos y proteínas), Factor 2: salinidad con dos niveles (1.5 y 3.0 M NaCl) y Factor 3: concentración de glicerol con dos niveles (0 y 12.5 mM). El experimento consistió en 48 unidades experimentales que correspondieron a 16 tratamientos con 3 réplicas cada uno. El experimento tuvo una duración de 7 días, con muestreos al inicio, mitad y final del cultivo. La determinación de proteínas se realizó a través del método de Bradford (1976) (sección 2.3.2.4). Los lípidos se determinaron según Bligh y Dyer (1959) (sección 2.3.2.5). Los carbohidratos se evaluaron con el método propuesto por Dubois et al. (1956) (sección 2.3.2.6). El almidón se determinó usando el método de la antrona (Brányiková et al., 2011) (sección 2.3.2.7). Los datos de la composición bioquímica fueron sometidos a un ANOVA de tres vías con prueba *a posteriori* de Tukey, a fin de encontrar diferencias significativas entre las distintas combinaciones de los tratamientos.

2.2.3.3. Perfil de pigmentos por HPLC de *D. salina* en mixotrofia fotosintética

Se diseñó un experimento completamente al azar para evaluar el efecto de los medios glicerol (12.5 mM), acetato (20 mM) y MI sobre el perfil de los principales pigmentos: clorofilas y carotenoides de *D. salina* en etapa de crecimiento (sexto día de cultivo) y carotenogénesis (décimo día de cultivo) y expuesta al inhibidor norflurazona en ambas condiciones fisiológicas. El inhibidor norflurazona (Sigma, SKU: 34364-100mg) fue usado en una concentración de 100 nM (Ben-Amotz et al., 1987) a fin de evaluar su efecto sobre la síntesis del precursor primario de los carotenoides (fitoeno), relacionándolo con la síntesis de β -caroteno y el metabolismo de los sustratos orgánicos de carbono en esta microalga

2.2.4. Rendimiento y productividad de *D. salina* en mixotrofia fotosintética con acetato y glicerol

Se realizó un experimento de comparación de los rendimientos y productividades de los dos mejores sustratos orgánicos (glicerol y acetato) de nuestro trabajo. El ensayo fue conducido a través de un diseño completamente al azar y constó de 6 unidades experimentales con 2 tratamientos (20 mM acetato y 12.5 mM glicerol) y 3 réplicas cada uno. Los cultivos mixotróficos fueron desarrollados con luz 50 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidad 1.5 M NaCl, pH entre 7.5 - 8.0 y agitación manual diaria. Las variables de medición en este experimento fueron los recuentos celulares diarios de los cultivos microalgales. El pH se registró a través de pH-metro marca Hanna meter (HI98130). La biomasa seca se obtuvo con el método gravimétrico

recomendado por Zhu y Lee (1997). La cuantificación de los pigmentos (clorofilas *a* y *b* y β -caroteno) se realizó con una extracción en acetona al 100% (Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008; Van Heukelem y Thomas, 2001) y un espectrofotómetro HACH DR 5000 usando longitudes de onda descritas en las ecuaciones 15-17 (Lichtenthaler y Wellburn, 1985; Wellburn, 1994). Con la información obtenida, se calculó la productividad de biomasa máxima (PBMmax) (g biomasa seca L⁻¹) y productividad de BCar máxima (PBCarmax) (mg β -caroteno g⁻¹ biomasa seca). Así también, la productividad volumétrica (PV) (g L⁻¹ día⁻¹), rendimiento de biomasa/consumo de sustrato (Y_{x/s}) (g g⁻¹) y rendimiento de producto (β -caroteno)/consumo de sustrato (Y_{p/s}) (mg g⁻¹) fueron calculados a partir de las ecuaciones (8), (9) y (10) conforme a Gupta y Pawar (2019). La productividad volumétrica fue calculada con el crecimiento algal máximo obtenido al séptimo día de cultivo., de acuerdo con lo siguiente:

$$PV = \frac{X_2 - X_1}{T_2 - T_1} \quad (8)$$

Donde:

X₂ y X₁: Biomasa seca inicial y final (g)

T₂ y T₁: Tiempo de cultivo inicial y final (días)

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Sustrato consumido}} \quad (9)$$

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Producto producido (BCar)}}{\text{Sustrato consumido}} \quad (10)$$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un valor $p < 0.05$ para detectar diferencias significativas en las productividades y rendimientos algales con glicerol y acetato usando el programa STATISTICA 12.0. Así también se aplicó una prueba de Tukey *a posteriori* para evaluar diferencias entre medias de los tratamientos antes mencionados.

2.3. Medición de variables

2.3.1. Crecimiento y rendimiento algal

2.3.1.1. Recuentos celulares

La densidad celular de *D. salina* fue obtenida a partir de los recuentos directos para cada tratamiento experimental y control usando una cámara Neubauer y un microscopio compuesto Olympus modelo BX60., siguiendo las recomendaciones de Capa (2009). El cálculo de la densidad celular (células mL⁻¹) se realizó de acuerdo con la ecuación (11):

$$C = N * 10 * 1000 * D \quad (11)$$

Donde:

C: Densidad de cultivo (células mL⁻¹)

N: Promedio de células contadas

10: Factor de volumen de la cámara (mL)

1000: Factor de conversión a mL

D: Dilución (mL)

2.3.1.2. Cambios morfológicos y morfométricos de las células algales

Las respuestas de *D. salina* a medios orgánicos fue estudiada a través de los cambios morfológicos de las células algales. Para esto, se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse TI, de acuerdo con las recomendaciones de Kleinegris et al. (2011). La presencia de almidón en las células algales se determinó con la prueba de Lugol recomendada por Takeshita et al. (2015). Las sustancias poliméricas extracelulares en esta microalga fueron determinadas mediante observación visual directa. Posteriormente, se evaluaron las características morfológicas de las células de *D. salina* cultivadas con glicerol durante crecimiento y

carotenogénesis, usando un microscopio invertido Olympus Fluoview (FV-1000) equipado con una cámara Olympus DR controller 2002 (Japón). Al mismo tiempo, se determinaron características morfométricas de largo y ancho de las células usando el programa ImageJ (Fuji, Japón). Las dimensiones celulares registradas correspondieron al promedio de 30 células. Conforme a Sun y Liu (2003) y Xu et al. (2016), el volumen celular fue calculado a partir de la ecuación (12):

$$V = \frac{\pi}{6} * d^2 * h \quad (12)$$

Donde:

d: Diámetro transversal de un cuerpo subsférico (en μm)

h: Diámetro longitudinal de un cuerpo subsférico (en μm)

2.3.1.3. Peso seco de biomasa celular

La biomasa celular inicial y final fueron determinadas gravimétricamente para calcular el peso seco de las células (PS) como lo recomiendan Zhu y Lee (1997). Alícuotas de 10 mL de cultivo microalgal de cada condición mixotrófica y los controles fotoautotróficos fueron filtrados a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F, 47 mm, tamaño de poro 0.7 μm) previamente pesados y calcinados (a 450 °C por 2 h) usando una bomba de vacío (35 a 55 mm Hg). Seguidamente, los filtros fueron lavados tres veces con 20 mL de formato de amonio 0.5 M con la finalidad de remover la sal residual. Finalmente, los filtros fueron secados en una estufa a una temperatura de 65°C y pesados para obtener la biomasa seca a peso constante.

2.3.1.4. Parámetros de crecimiento

Con los datos obtenidos de los recuentos celulares diarios, se construyó una curva de crecimiento y de su porción exponencial, se determinó la tasa de crecimiento específica (μ) y el tiempo de duplicación (T_d) de acuerdo con Guillard (1973) y Capa (2010) y según las ecuaciones (13) y (14), respectivamente.

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{T_1 - T_0} \quad (13)$$

Donde:

N_1 y N_0 : Densidad celular final e inicial (Células ml^{-1})

T_1 y T_0 : Tiempo de cultivo final e inicial (días)

$$T_d = \frac{0.6931}{\mu} \quad (14)$$

Donde:

T_d : es la inversa de la μ multiplicado por Ln 2 (0.6931)

2.3.2. Métodos analíticos bioquímicos

2.3.2.1. Análisis espectrofotométrico de pigmentos

Los pigmentos fotosintéticos tienen un papel crucial en la captura de fotones de energía, fotoprotección y antioxidación en las plantas y microalgas. Por lo cual, es importante el estudio del comportamiento de estos metabolitos con la nutrición mixotrófica en estas microalgas. Con este propósito, se realizó la extracción y cuantificación espectrofotométrica de los pigmentos conforme a Wellburn (1994). Para este propósito, se colocaron 2 ml de suspensión de algas en microtubos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C usando una centrífuga refrigerada Eppendorf 5424R. Enseguida se eliminó el agua de cada tubo y se añadió 1 ml de acetona 100% para disolver la pastilla residual. Luego, las muestras se agitaron con vórtex y se almacenaron a 4 °C en oscuridad durante al menos 5 horas. Posteriormente, los homogenizados se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Después de separarlos de los restos celulares, los extractos algales se usaron inmediatamente para las mediciones espectrofotométricas. Para la identificación de las absorbancias de clorofila *a* (CLa), clorofila *b* (CLb) y β -caroteno (BCar) (Figura 6) se necesitó de una cubeta de cuarzo de 2 ml y un espectrofotómetro Hach DR 5000. Los espectros de barrido entre 200-700 nm, con una resolución de 1.0 nm, fueron registrados y procesados digitalmente. Las

ecuaciones (15) (16) y (17) describen las concentraciones de los pigmentos de acuerdo con Lichtenthaler y Wellburn (1985):

$$\text{Chl } a = 11.75A_{662} - 2.35A_{645} \text{ (en } \mu\text{g mL de extracto}^{-1}\text{)} \quad (15)$$

$$\text{Chl } b = 18.61A_{645} - 3.96A_{662} \text{ (en } \mu\text{g mL de extracto}^{-1}\text{)} \quad (16)$$

$$\text{BCar} = \frac{1000A_{470} - 2.27\text{Chl } a - 81.4\text{Chl } b}{227} \text{ (en } \mu\text{g mL de extracto}^{-1}\text{)} \quad (17)$$

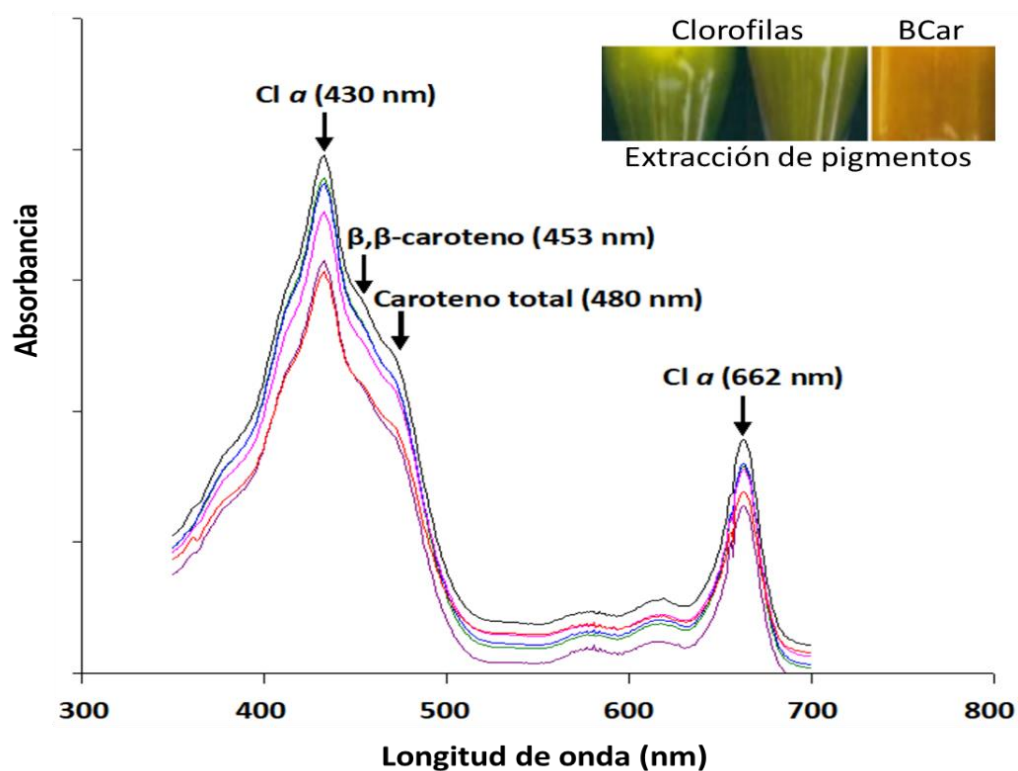


Figura 6. Espectros de absorción visible de los extractos acetónicos de los cultivos de *D. salina* bajo condiciones fotoautotróficas y mixotróficas.

2.3.2.2. Análisis de pigmentos por HPLC

En esta parte del trabajo, el perfil de pigmentos fue determinado usando un sistema HPLC Agilent 1260 equipado con una columna de fase inversa Zorbax XDB-C8 (4,6 x 150 mm, tamaño de poro de 3,5 μm y

flujo de 1 ml min^{-1} ; Agilent Technologies) siguiendo el método de Van Heukelem y Thomas (2001) adaptado por Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008). Los pigmentos se extrajeron de la biomasa celular con 1 ml de acetona 100% durante toda la noche en oscuridad. Después, las muestras se almacenaron a -20°C . Previamente a los análisis, las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante fue filtrado con un filtro Whatman (diámetro $0.22\ \mu\text{m}$) a microtubos de color ámbar para su uso en el análisis HPLC. La temperatura de la columna estuvo en 60°C y el volumen de inyección fue de 1 ml. La fase móvil consistió en: disolvente A, metanol y acetato de tetrabutil amonio 28 mM, 70:30 (v:v); disolvente B, metanol. El gradiente de suministro del disolvente estuvo en % B (min): 5%, 0 min; 5%, 5 min; 95%, 22 min; 95%, 27 min; 5%, 30 min como ha sido reportado por Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008). Los pigmentos se eluyeron a una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} y se detectaron dentro de un rango de absorbancia de 360 a 700 nm, específicamente a 436 nm para separar adecuadamente las clorofilas y los carotenoides. La identificación de los pigmentos se realizó de acuerdo con Wright y Montoura (1997) basándose en la comparación de los tiempos de retención de las muestras con los tiempos de los estándares de pigmentos puros (DHI Laboratory Products, Hørsholm, Dinamarca).

2.3.2.3. Determinación de glicerol

El glicerol extra e intracelular fue evaluado enzimáticamente (glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa) mediante un paquete de extracción y cuantificación (Ref. 12812) de la compañía BioSystems Reagents & Instruments (España). Este paquete comercial sirvió para determinar el glicerol extracelular y total de acuerdo con las recomendaciones de Petrovic y Plemenitas (2003). Para esto, un grupo de microtubos conteniendo 1 mL de suspensiones algales fueron directamente centrifugados a 5,000 rpm por 10 min a 4°C cuyos sobrenadantes fueron usados para estimar el glicerol extracelular. Otros tubos con 1 mL de cultivos algales fueron incubados por 10 min a 100°C . Después, los homogenizados fueron centrifugados a 5,000 rpm por 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron usados para determinación de glicerol total. Para ambos casos, los sobrenadantes conteniendo glicerol fueron diluidos con agua destilada a una relación 1:1. Seguidamente, a tres microtubos conteniendo: $10\ \mu\text{L}$ del extracto algal diluido, $10\ \mu\text{L}$ de glicerol puro con concentración conocida y $10\ \mu\text{L}$ de agua destilada (control) se les agregó 1 mL del reactivo químico enzimático proporcionado en el paquete de extracción. Después, los microtubos se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente ($20\text{-}22^{\circ}\text{C}$) por 15 min. Finalmente, dichas soluciones fueron medidas a una absorbancia de 500 nm. Cabe mencionar que el color aparente de las muestras se mantuvo estable durante al menos 2 horas. Finalmente, el glicerol intracelular fue calculado de la diferencia entre el glicerol

total y glicerol extracelular. Una curva de calibración fue construida con glicerol puro en un rango de concentración de 0.5 -10 mg mL⁻¹. Las concentraciones de glicerol fueron normalizadas a peso seco de las células.

2.3.2.4. Determinación de proteínas

Para determinación de proteínas se siguió el método de Bradford (1976). Para cada muestra, un tubo conteniendo 10 mL de suspensión algal fue centrifugado a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C. Seguidamente, la pastilla celular fue colocada en un tubo con rosca conteniendo 5 mL de NaOH 0.1 N. Este contenido fue mezclado con una varilla de vidrio y el tubo fue cubierto con papel de aluminio. Los tubos se colocaron a 100 °C por 8 min y estos recipientes se sacaron y se enfriaron a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugarse a 3,000 rpm por 15 min a 4 °C. Este paso se repitió tres veces hasta que el paquete celular no mostrara una coloración amarillenta. Posteriormente, se colocaron 10 µL del extracto químico en un microtubo y se le adicionó 1 mL del reactivo Bradford. Esta mezcla se sometió a reacción por un lapso de 5 min y después se tomó 1 mL del producto de reacción para las lecturas espectrofotométricas a 595 nm. Una curva de calibración fue construida con albumina de suero bovino en un rango de concentración de 10-100 mg mL⁻¹.

2.3.2.5. Determinación de lípidos

Para determinación de lípidos se siguió el método de Bligh y Dyer (1959). Para cada muestra, se tomó un tubo conteniendo 10 mL de suspensión algal fue centrifugado a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C. La pastilla celular se transfirió a un tubo de ensayo con rosca, se le agregó 2 mL H₂SO₄ concentrado y se maceró con una varilla limpia durante 5 min. Los tubos levemente cerrados (hasta el primer tope) con papel de aluminio se colocaron en una mufla a 200 °C durante 15 min. Después, las muestras se retiraron con guantes resistentes al calor y se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas lentamente con 3 mL de agua destilada y homogenizadas con ayuda del vortex dentro de una campana de extracción de gases y después se dejaron reposar en un baño de hielo por 5 min. Finalmente, las muestras se midieron a 375 nm con un blanco conteniendo 1 mL H₂SO₄ concentrado. Una curva de calibración fue construida con tripalmitina en un rango de concentración de 5-40 mg mL⁻¹.

2.3.2.6. Determinación de carbohidratos

Para determinación de carbohidratos se siguió el método de Dubois et al. (1956). Para cada muestra, se tomó un tubo conteniendo 10 mL de suspensión algal fue centrifugado a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C. La pastilla celular se transfirió a un tubo de ensayo con rosca, se le agregó 1 mL H₂SO₄ 1 M y se maceró con una varilla de vidrio limpia durante 5 min, para posteriormente someterse a 4 mL H₂SO₄ 1.0 M (5 mL) mezclando vigorosamente.

Después de adquirir temperatura ambiente, la muestra se sometió a 100 °C. Enseguida, los tubos se retiraron del baño y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Inmediatamente, los tubos se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C y se retiró el extracto ácido con una pipeta Pasteur evitando no resuspender la pastilla celular adherida al fondo del tubo. Posteriormente, la alícuota de 1 mL se sometió a 1 mL H₂SO₄ 1.0 M homogenizando vigorosamente mediante la acción de un vortex.

Después, los tubos con los extractos ácidos fueron mezclados con 1 mL de fenol al 5% y se dejaron reposar por 40 min, agregándoseles 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Una vez a temperatura ambiente, las muestras fueron medidas a 485 nm con un blanco que consistió en 1 mL de H₂SO₄ 1.0 M. Una curva de calibración fue construida con glucosa anhidra en un rango de concentración de 5-20 mg mL⁻¹.

2.3.2.7. Determinación de almidón

La determinación de almidón se realizó primero con el método del Lugol y después con el método de la antrona; este cambio obedeció al mejoramiento de la sensibilidad del método seleccionado.

Método del Lugol

En este método, el contenido de almidón de las células algales fue evaluado usando un método espectrofotométrico modificado basado en Lugol (Takeshita et al., 2015). Alícuotas de 5 mL de suspensión algal y 5 mL de solución de Lugol (5 g I₂ y 10 g KI disueltos en 100 mL de agua destilada) fueron incubados a 100 °C por un lapso de 10 min. Después, las muestras fueron enfriadas y centrifugadas a 5000 rpm por un tiempo de 5 min a 4 °C. El sobrenadante y los blancos fueron medidos a 660 nm. La concentración de almidón se calculó de acuerdo con la ecuación (18):

$$\text{Almidón} = \frac{N_{A660} + 0.139}{0.00257} \text{ (en } \mu\text{g mL de extracto}^{-1}\text{)} \quad (18)$$

Método de la antrona

Para determinación de almidón se siguió el método de la antrona (Brányiková et al., 2011). Previamente a la determinación del almidón, se removió el contenido de pigmentos de las células algales mediante acetona al 100%. Para la hidrólisis total de almidón, 3.3 mL de ácido perclórico al 30% fueron adicionados a la pastilla residual, mezclados por 15 min a 25 °C y centrifugados a 3,000 rpm durante 5 min. Este procedimiento debió ser repetido tres veces con la finalidad de extraer todo el almidón de las muestras algales. Los extractos parciales fueron juntados para obtener un volumen aproximado de 10 mL. Después, 0.5 mL del extracto fueron enfriados a 0 °C por 10 min y sometidos a 2.5 mL de la solución de antrona (2 g de antrona en 1 L de H₂SO₄ al 72%) y mezclados vigorosamente. Esta mezcla se mantuvo a 100 °C durante 8 min. La absorbancia de la muestra a temperatura ambiente fue medida a 625 nm. Una curva de calibración fue construida con glucosa anhidra en un rango de concentración de 5-15 mg mL⁻¹.

2.3.3. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II

El parámetro más estudiado para medir el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II es la relación entre la fluorescencia variable (Fv) y la fluorescencia máxima (Fm), denominado como Fv/Fm (White et al., 2011). Para desarrollar este método, primero se registró la fluorescencia a partir de muestras previamente adaptadas a oscuridad durante 15 min, a 25 °C, utilizando un fluorómetro modulado en amplitud de pulso (DUAL-PAM 100, Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). La señal de fluorescencia F₀ en la oscuridad fue obtenida con pulsos de excitación de 2 Hz y la señal de fluorescencia máxima fue medida en la oscuridad con un pulso de luz saturante de 0.8 s de duración (Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008). Las mediciones por triplicado para cada muestra y cinco pulsos de saturación a intervalos de 30 s fueron lo suficiente para obtener un nivel estacionario de fluorescencia máxima (Fm) (Figura 7) de las células de *D. salina*. La señal de fluorescencia se normalizó al contenido de clorofila a de las células algales (White et al., 2011). El índice Fv/Fm está dado por la ecuación (19):

$$Fv/Fm = \frac{Fm - F_0}{Fm} \quad (19)$$

Donde:

Fv: fluorescencia variable

Fm: fluorescencia máxima

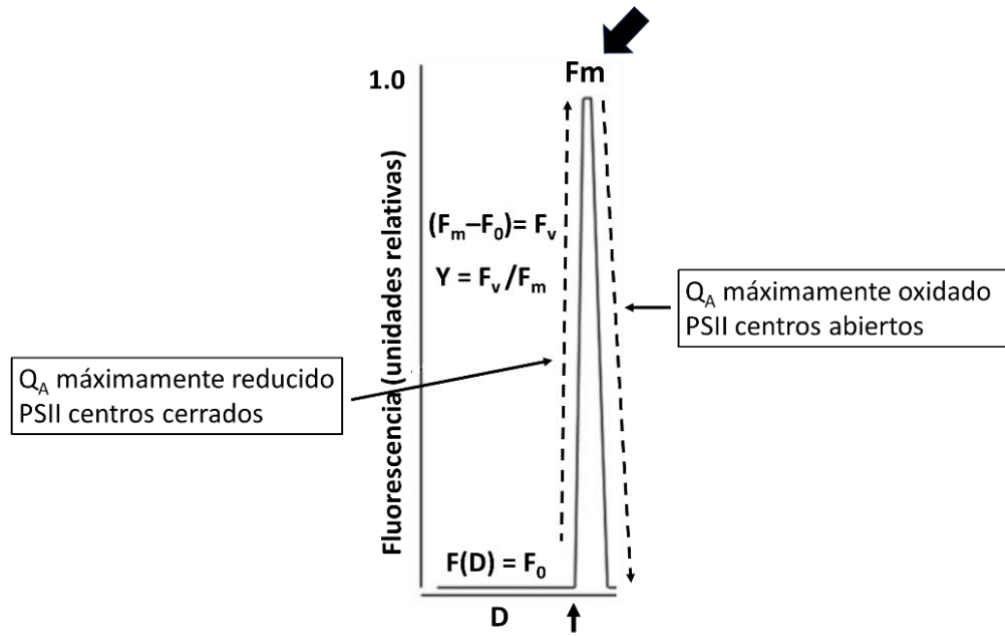


Figura 7. Representación del cálculo teórico del Fv y Fm a partir de una muestra algal.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Adaptación de *D. salina* a heterotrofia y mixotrofia

En la tabla 6, se muestran los resultados de número celular máximo (Nmax), tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (Td) de *D. salina* obtenido al séptimo día de su cultivo con 6 diferentes sustratos de carbono orgánico y condiciones nutricionales. Los cultivos algales alcanzaron los mayores Nmax y μ , así como los menores Td, comparado con los valores obtenidos en condiciones heterotróficas (oscuridad). El acetato fue el sustrato que mejores resultados de crecimiento algal mostró en las condiciones mixotróficas ensayadas (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de *D. salina* cultivada en condiciones mixotróficas y heterotróficas con 6 sustratos de carbono orgánico. Los valores de Nmax ($N^\circ \times 10^6$ células mL^{-1}), μ (dia^{-1}) y T_g (días) están dentro de paréntesis, corchetes y llaves, respectivamente.

Sustrato orgánico	Condición de cultivo	
	Mixotrófica	Heterotrófica
Glucosa	(0.315 ± 0.012 ^d)	(0.109 ± 0.020 ^e)
	[0.189 ± 0.025 ^d]	[0.080 ± 0.012 ^e]
	{3.67 ± 0.15 ^d }	{8.72 ± 0.07 ^e }
Sacarosa	(0.610 ± 0.034 ^b)	(0.090 ± 0.047 ^f)
	[0.288 ± 0.013 ^b]	[0.029 ± 0.018 ^g]
	{2.41 ± 0.08 ^b }	{23.54 ± 0.12 ^g }
Glicerol	(0.480 ± 0.095 ^c)	(0.112 ± 0.084 ^e)
	[0.256 ± 0.014 ^b]	[0.080 ± 0.008 ^e]
	{2.72 ± 0.24 ^c }	{8.70 ± 0.16 ^e }
Acetato	(0.852 ± 0.083 ^a)	(0.100 ± 0.054 ^e)
	[0.338 ± 0.012 ^a]	[0.056 ± 0.016 ^f]
	{2.05 ± 0.04 ^a }	{12.42 ± 0.19 ^f }
Xilosa	(0.360 ± 0.089 ^d)	(0.085 ± 0.093 ^f)
	[0.215 ± 0.008 ^c]	[0.015 ± 0.005 ^h]
	{3.23 ± 0.05 ^d }	{45.73 ± 0.10 ^h }

3.2. Relación C/N usando sustratos orgánicos para cultivo de *D. salina*

3.2.1. Crecimiento celular

La mayoría de los tratamientos con diferentes relaciones C/N y SCO alcanzaron densidades celulares máximas al séptimo día de cultivo mixotrófico (Figura 8). Cada sustrato exhibió diferente densidad celular máxima, destacándose el acetato, seguido de la sacarosa en una proporción C/N de 20/1 como los mejores sustratos orgánicos para crecimiento de *D. salina*. Las densidades celulares máximas obtenidas para glucosa y glicerol correspondieron a las proporciones 20/1 y 30/1, respectivamente. Sin embargo, el crecimiento celular con xilosa no fue influenciado por las proporciones C/N, lo cual podría estar relacionado con la baja capacidad de asimilación en este sustrato (Figura 8). Los rendimientos algales con acetato superaron el crecimiento celular con el MI fotoautotrófico (0.95×10^6 células mL⁻¹).

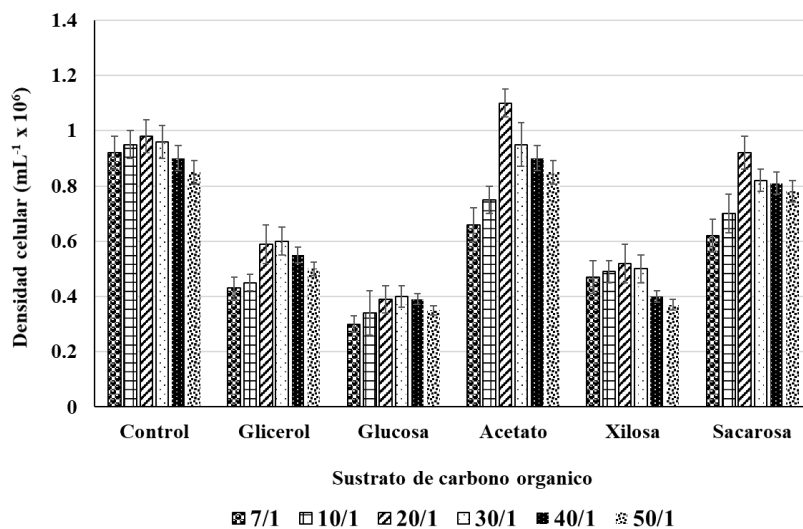


Figura 8. Densidad celular de *D. salina* expuesta a las diferentes relaciones C/N y SCO.

3.2.2. Respuesta de *D. salina* a medios orgánicos

3.2.2.1. Cambios en la coloración de los cultivos y el tamaño de las células

La mayoría de los cultivos de *D. salina* con sustratos orgánicos mostraron un cambio de una coloración verde (cultivos fotoautótrofos) (Figura 9A) a amarillenta (Figura 9D). Así también, las células algales cuando

fueron expuestas a sustratos orgánicos experimentaron un aumento de tamaño (Figura 9E,F) comparado a las condiciones fotoautotróficas (Figura 9B,C).

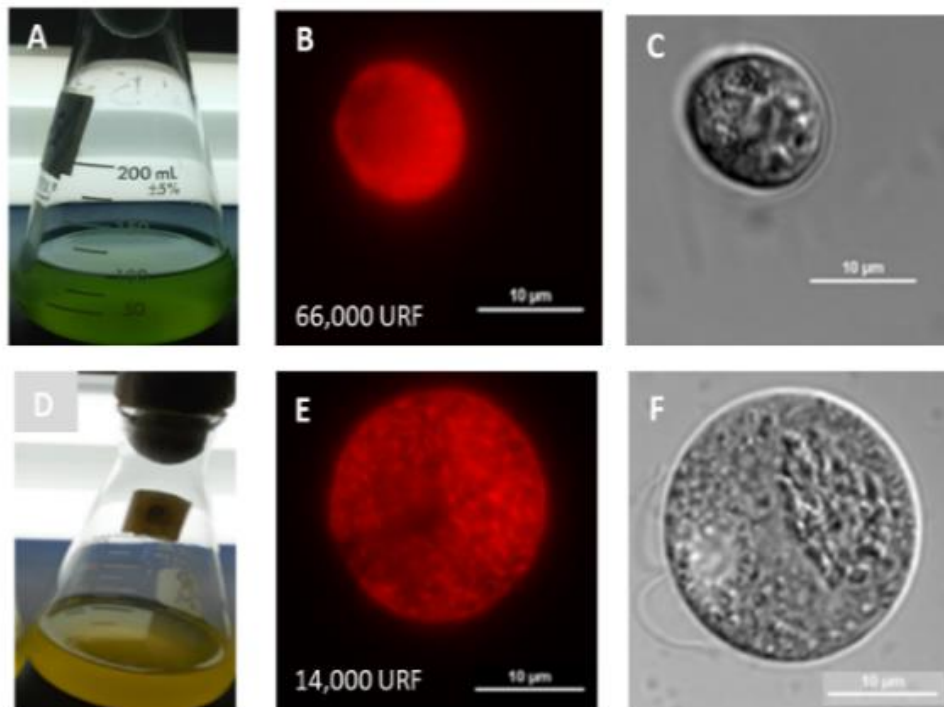


Figura 9. Células algales durante crecimiento activo en MI (A) y SCO (B) observadas con microscopía de fluorescencia (B y E) y contraste de interferencia diferencial (DIC, en inglés) (C y F), respectivamente.

3.2.2.2. Almacenamiento masivo de almidón

Las células de *D. salina* sintetizaron y acumularon masivamente almidón frente a la presencia de altas concentraciones de los sustratos orgánicos, principalmente con glucosa en el medio de cultivo (Figura 10).

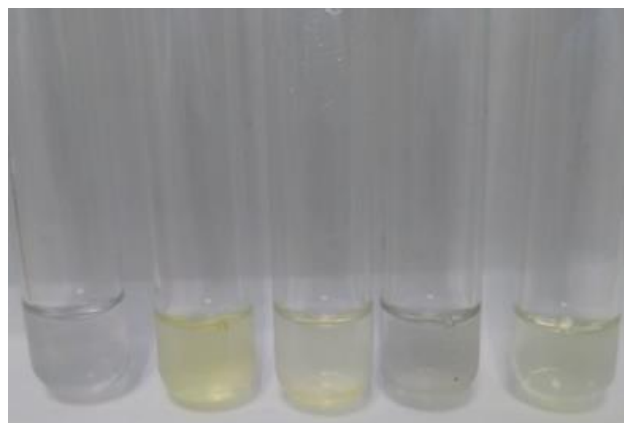


Figura 10. Presencia de almidón en los cultivos celulares de *D. salina* expuesta a sustratos orgánicos.

3.2.2.3. Formación de sustancias poliméricas extracelulares

En los cultivos de *D. salina* se observaron sustancias poliméricas extracelulares (EPS, en inglés) frente a altas concentraciones de los sustratos orgánicos principalmente glucosa y sacarosa en el medio de cultivo (Figura 11).

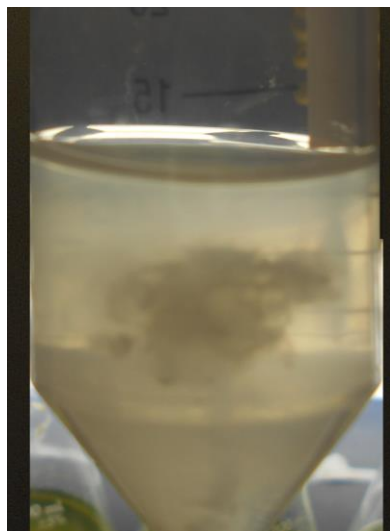


Figura 11. Sustancias poliméricas excretadas por *D. salina* al medio de cultivo con sustratos orgánicos.

3.2.3. Pigmentos, almidón y pH

En la Figura 12, se muestran los perfiles de pigmentos de *D. salina* cultivada con los diferentes sustratos orgánicos comparado a los cultivos fotoautotróficos (control) bajo la relación C/N (20/1) más apropiada para el crecimiento de esta alga. Los contenidos de las clorofilas *a* y *b* con los SCO fueron menores a la cantidad de pigmentos obtenido con el medio fotoautotrófico (MI). No obstante, el mayor contenido de β -caroteno fue obtenido con los cultivos con glicerol. El cultivo de *D. salina* con el sustrato glucosa en la proporción C/N (20/1) presentó los mayores contenidos de almidón sobre acetato y glicerol (Figura 12).

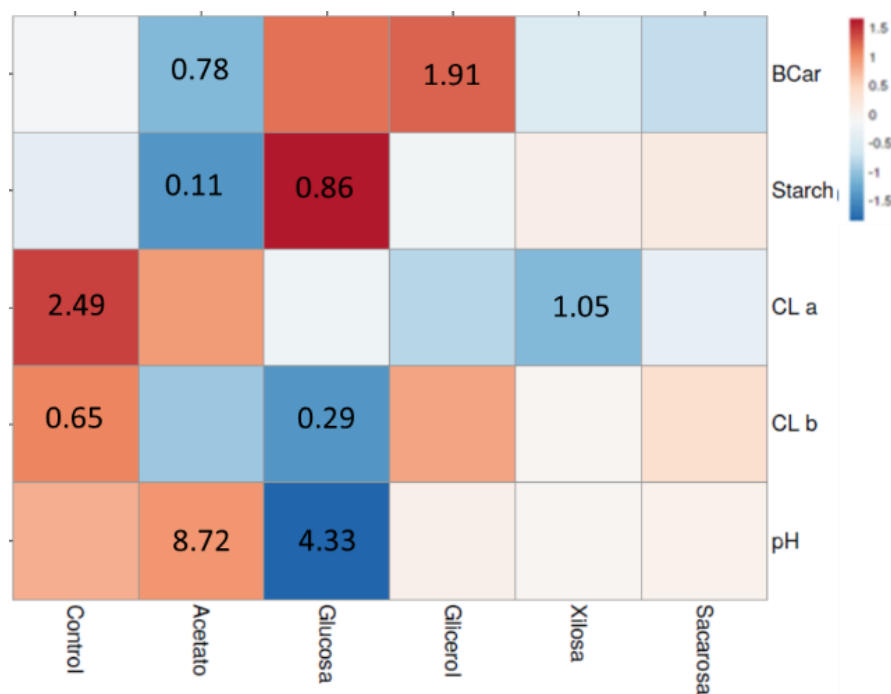


Figura 12. Mapa de calor que representa la abundancia de los pigmentos y almidón (pg celula^{-1}), así como el pH de cultivo de *D. salina* expuesta a los sustratos orgánicos: glucosa, acetato, xilosa, glicerol y sacarosa y el control (MI).

El pH del cultivo se comporta de manera diferente dependiendo del sustrato orgánico. Así, los cultivos algales con glucosa produjeron un pH ácido; mientras que los cultivos con acetato desarrollaron un pH muy alcalino. Los demás sustratos orgánicos (sacarosa, glicerol y xilosa) presentaron un pH ligeramente alcalino (Figura 12).

3.2.4. pH como covariable del efecto del SCO en el crecimiento algal

Existen varios parámetros que pueden tener un efecto de covariable con las diferentes SCO que afectan el crecimiento de *D. salina* expuesta. De acuerdo con el análisis de covarianza (Tabla 7), se observa que pH es una covariable de los SCO que afectan el crecimiento de *D. salina*.

Tabla 7. ANCOVA entre el pH de cultivo y SCO en el crecimiento de *D. salina*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Intercepto	31.34	1	31.340	0.342	0.560
pH	676.06	1	676.063	7.387	0.008
SCO	12,979.64	5	2,595.929	28.367	0.000
Error	5,948.25	65	91.512		

3.2.5. Perfil HPLC de pigmentos de *D. salina*

Los resultados de pigmentos con HPLC fueron procesados con análisis multivariado de clústeres usando distancias euclidianas de 0.15 y con las unidades en $\mu\text{g célula}^{-1}$. Los tres clústeres formados en el tratamiento control demuestran la condición fotoautotrófica de los cultivos algales que tiene un reacomodo de los pigmentos. En tanto que los dos clústeres obtenidos con los tratamientos con glucosa y acetato muestran la acción de la mixotrofia con el consiguiente reacomodo de pigmentos (Figura 13).

3.2.6. Eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) de *D. salina* con SCO

La eficiencia cuántica máxima F_v/F_m es un índice no invasivo extremadamente sensible para evaluar el bienestar del aparato fotosintético de microalgas a través de la eficiencia fotoquímica del PSII en respuesta al metabolismo energético y la interacción entre la asimilación de carbono y nutrientes (Cecchin et al., 2018; White et al., 2011). Este índice se utilizó para evaluar el beneficio de los sustratos orgánicos en la eficiencia fotosintética de *D. salina* bajo las condiciones de crecimiento mixotrófico. En los sustratos orgánicos, los valores más altos de F_v/F_m fueron obtenidos con acetato (relación C/N de 20/1), los cuales son relativamente similares a los valores obtenidos con los controles fotoautotróficos (Figura 14). Por otro lado, los valores F_v/F_m para los tratamientos con glucosa, xilosa, glicerol y sacarosa resultaron negativos para la eficiencia fotosintética de esta microalga (Figura 14).

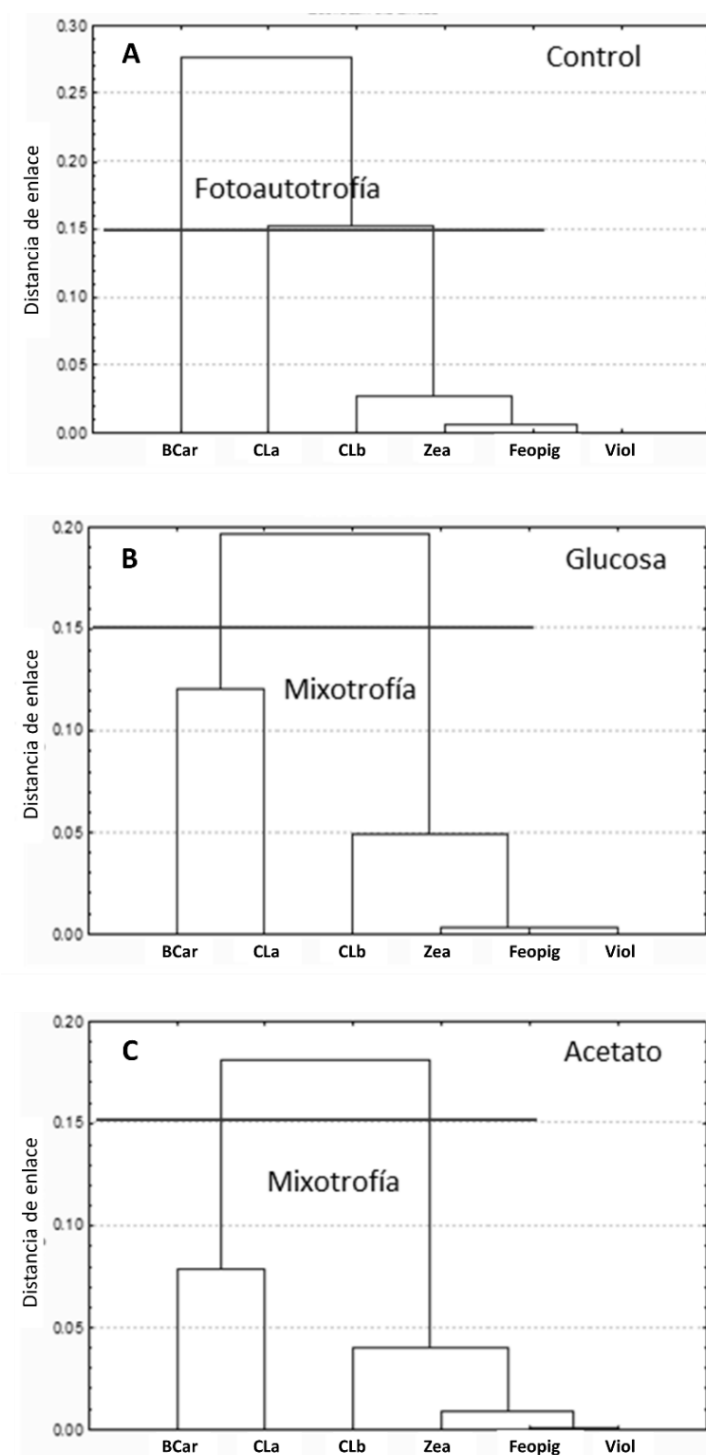


Figura 13. Dendrograma de análisis de conglomerados de los principales pigmentos de *D. salina* expuesta a sustratos orgánicos. El panel A corresponde al control MI y los paneles B y C corresponden a los sustratos glucosa y acetato, respectivamente.

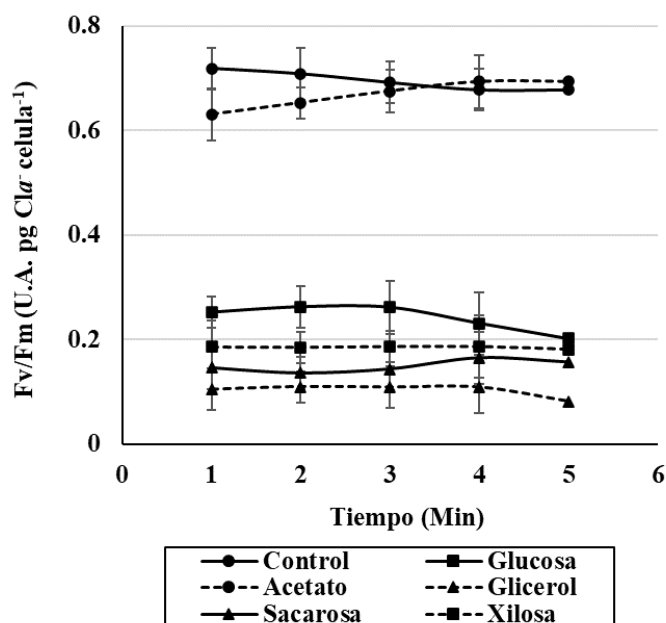


Figura 14. Eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) de *D. salina* cultivada con diferentes SCO usando la relación C/N de 20/1. Los valores corresponden al promedio \pm DE con tres replicas.

3.3. Interacción del sustrato orgánico, salinidad e intensidad de luz en el cultivo mixotrófico de *D. salina*

3.3.1. Crecimiento algal

El experimento del efecto del sustrato orgánico, salinidad e intensidad de luz fue conducido a través de un análisis factorial. En relación con los efectos principales, la salinidad de 1.5 M NaCl y la intensidad de la luz de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fueron los niveles que reportaron mayores densidades celulares. En el efecto combinado, el mejor tratamiento para el crecimiento de *D. salina* correspondió al acetato (relación C/N de 20/1) con 1.5 M NaCl de salinidad y $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz (Figura 15).

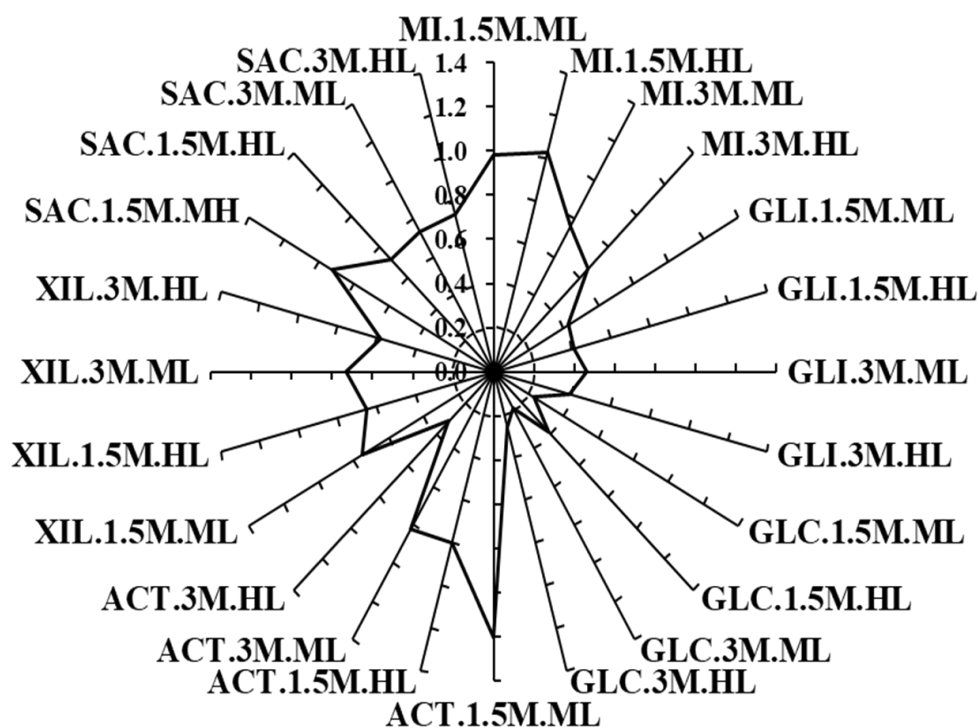


Figura 15. Crecimiento celular de *D. salina* expuesta a la interacción del SCO, salinidad e intensidad de luz. Sustratos: MI, medio inorgánico; GLI, glicerol; GLC, glucosa; ACT, acetato; XIL, xilosa; SAC, sacarosa. Salinidad: 1.5 y 3.0 M NaCl. Intensidad de luz: ML, luz intermedia, $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; HL, luz alta, $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3.2. Pigmentos y almidón

En la Figura 16, se observa el comportamiento de los pigmentos y almidón de los diferentes tratamientos constituidos por el sustrato orgánico, salinidad e intensidad de luz. En comparación con el cultivo fotoautótrofo, hay una reducción del contenido de CLA y CLB en la mayoría de los tratamientos con sustratos orgánicos, así como también el aumento en el BCar y almidón en los tratamientos con glicerol y glucosa, respectivamente (Figura 16). El tratamiento de glicerol (C/N-20/1), salinidad de 3M NaCl y $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es el que favoreció una mayor síntesis de β -caroteno en *D. salina*.

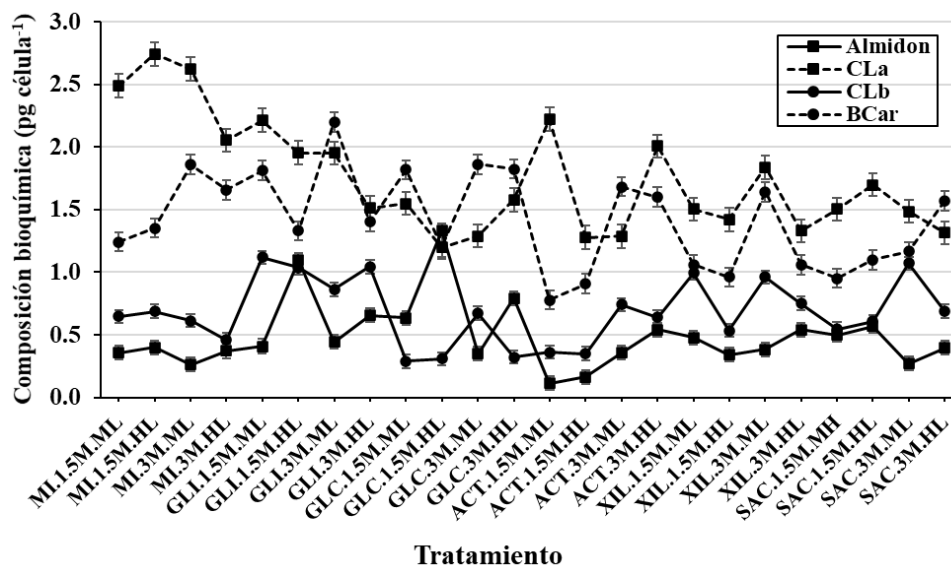


Figura 16. Pigmentos y almidón de células de *D. salina* expuestas a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz. Sustratos: MI, medio inorgánico; Gly, glicerol; Glc, glucosa; Act, acetato; Xyl, xilosa; Suc, sacarosa. Salinidad: 1.5 y 3.0 M NaCl. Intensidad de luz: ML, luz intermedia, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; HL, luz alta, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.4. Parámetros poblacionales del crecimiento mixotrófico de *D. salina*

En la tabla 8, se muestra los parámetros de crecimiento y productividad volumétrica de los cultivos algales con los diferentes sustratos de carbono orgánico. Los mayores valores para concentración máxima de biomasa, tasa específica de crecimiento máximo, número celular máximo, día del máximo crecimiento y productividad máxima fueron obtenidos con acetato, los cuales superan a los valores obtenidos con los demás sustratos orgánicos (glucosa, xilosa, sacarosa y glicerol) y medio inorgánico (MI). En la Figura 17, se muestra la coloración de los cultivos de *D. salina* con los diferentes sustratos orgánicos de carbono evaluados, destacándose un color verde intenso de los cultivos con acetato relacionado con el mayor crecimiento algal (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de crecimiento y productividad máxima de biomasa del cultivo mixotrófico de *D. salina* con diferentes sustratos orgánicos.

Fuente carbono orgánico	Numero celular		Parámetros de crecimiento		Productividad máxima de biomasa
	X_{max}	μ_{max}	N_{max} ($\times 10^6$ célula.ml ⁻¹)	D_{max}	P_{max}
MI (control)	1.16 ± 0.04	0.43 ± 0.01	1.10 ± 0.15	6	0.653 ± 0.006
Glicerol	0.58 ± 0.08	0.30 ± 0.03	0.56 ± 0.02	6	0.219 ± 0.009
Glucosa	0.35 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.34 ± 0.05	6	0.048 ± 0.010
Acetato	1.33 ± 0.05	0.46 ± 0.06	1.25 ± 0.08	6	0.778 ± 0.006
Xilosa	0.84 ± 0.07	0.37 ± 0.02	0.78 ± 0.12	6	0.411 ± 0.008
Sacarosa	0.97 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.90 ± 0.12	6	0.422 ± 0.004

Donde: X_{max} = concentración máxima de biomasa (g.L⁻¹); μ_{max} = tasa de crecimiento específica máxima (d⁻¹); N_{max} = número celular máximo; D_{max} = día donde se alcanza el N_{max} ; P_{max} = Productividad máxima de biomasa (g.L⁻¹).

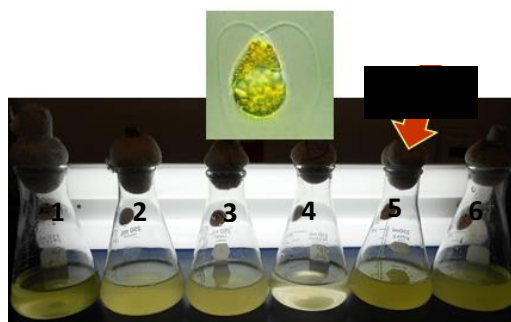


Figura 17. Cultivos de *D. salina* con diferentes sustratos orgánicos bajo la relación C/N de 20/1. 1: MI, 2: glicerol, 3: xilosa, 4: glucosa, 5: acetato, 6: sacarosa.

3.5. Modelación del crecimiento mixotrófico de *D. salina*

En la Figura 18, se muestran los modelos no lineales (logístico, Gompertz y Baranyi-Roberts) para crecimiento mixotrófico de *D. salina* con los diferentes sustratos orgánicos de carbono (glucosa, xilosa, sacarosa, glicerol y acetato). En base a los mejores valores de las pruebas de bondad de ajuste: coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (RMSE), se encontró que el modelo de Baranyi-Roberts es el que mejor ajustó los datos experimentales y esperados del crecimiento mixotrófico algal con un R^2 entre 0.88-0.98 y RMSE entre 0.0001-0.0010, seguido por los modelos logístico (R^2 : 0.82-0.90 y RMSE:

0.0024-0.0201) y Gompertz (R^2 : 0.42-0.81 y RMSE: 0.0039-0.0142). Consecuentemente, queda establecido que las densidades celulares de cultivo fueron ajustadas apropiadamente con los modelos no lineales de crecimiento, especialmente el modelo Baranyi-Roberts, revelando la ocurrencia de la mixotrofia fotosintética en *D. salina*.

3.6. Optimización del crecimiento mixotrófico de *D. salina* con glicerol

3.6.1. Efecto del fotoperiodo en el cultivo mixotrófico de *D. salina* con glicerol

El fotoperiodo representa el número de las horas de luz y oscuridad a lo largo del día que necesitan los organismos como las plantas y microalgas para regular un conjunto de funciones biológicas, tales como la reproducción y el crecimiento. El fotoperiodo tiene una gran influencia en el metabolismo de los nutrientes y la síntesis de compuestos orgánicos y consecuentemente en la productividad algal (Alqadi et al., 2017).

Las fuentes de carbono orgánico se utilizan para proporcionar energía a fin de aumentar el crecimiento celular y estimular la síntesis de bioproductos a través de cambios en las vías metabólicas de asimilación y distribución de carbono regulados por el fotoperiodo (Sun et al., 2018). En la Tabla 9, se muestran los resultados de crecimiento celular máximo (N_{max}), tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (T_d) de *D. salina* obtenido al séptimo día de cultivo con glicerol usando diferentes fotoperiodos. Especialmente, los cultivos algales con glicerol y luz continua (24/0) mostraron los más altos valores de N_{max} y μ , así también, el más corto T_d , comparado a valores obtenidos con los otros niveles L/O de 18/6, 12/12 y 6/18. Por otro lado, el tratamiento L/O de 0/24 produjo los más bajos crecimientos algales (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto del fotoperiodo en los parámetros de crecimiento de *D. salina* cultivada con glicerol.

Condición metabólica	Fotoperiodo L/D	N_{max} ($N^\circ \times 10^6$ células mL^{-1})	μ (dia^{-1})	T_g (días)
Mixotrofia	24/0	0.73 ± 0.03^a	0.44 ± 0.02^a	1.59 ± 0.06^c
	18/6	0.61 ± 0.02^b	0.38 ± 0.01^b	1.86 ± 0.07^c
	12/12	0.58 ± 0.02^b	0.33 ± 0.04^c	2.16 ± 0.05^c
	6/18	0.19 ± 0.01^c	0.16 ± 0.02^d	4.42 ± 0.09^b
Heterotrofia	0/24	0.13 ± 0.01^d	0.06 ± 0.05^e	12.28 ± 0.04^a

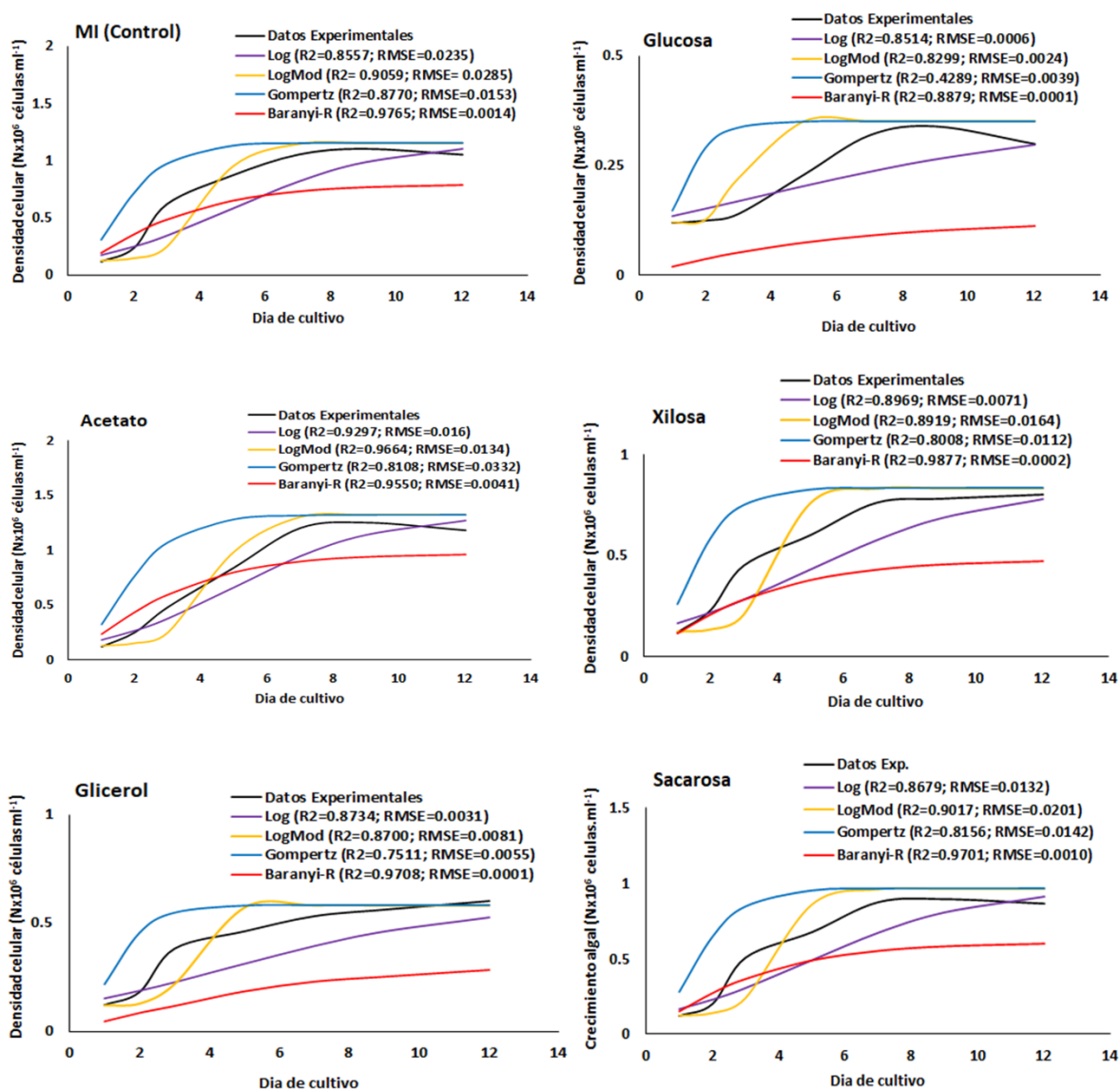


Figura 18. Densidad celular de *D. salina* con diferentes sustratos orgánicos de carbono, proyectada a partir de modelos de crecimiento no lineales. En esta, se incluyen los estimadores estadísticos R^2 y RMSE.

3.6.2. Efecto de la concentración de glicerol

La heterogeneidad de las salinidades y niveles de glicerol más favorecen el crecimiento de *D. salina* (Keerthi et al., 2015; Sohrabi et al., 2019; Suarez et al., 1999), nos impulsó a diseñar un experimento para evaluar el efecto de la concentración de glicerol en el cultivo de *D. salina* bajo la condición isoosmótica más favorable del crecimiento algal (1.5 M NaCl) (Farhat et al., 2011). La concentración de 12.5 mM de

glicerol es la que más promovió el crecimiento de esta microalga (1.19×10^6 células mL^{-1}) ($p < 0.05$) incluso excediendo la densidad celular obtenida con los cultivos fotoautotróficos (MI) (Figura 19).

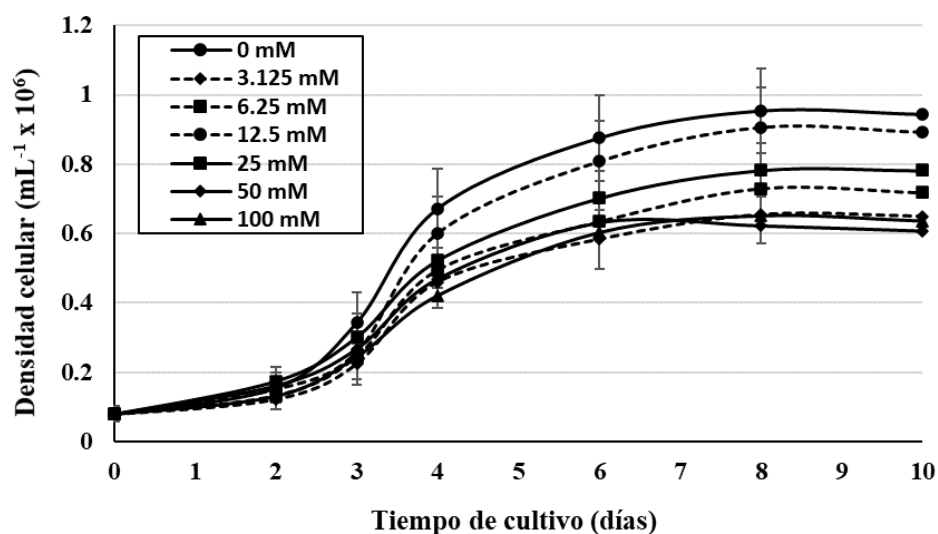


Figura 19. Crecimiento de *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de glicerol.

3.6.3. Efecto de la interacción del glicerol, salinidad no isoosmótica e intensidad de luz

3.6.3.1. Crecimiento algal

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del glicerol en el cultivo mixotrófico de esta alga verde, se evaluó el efecto del nivel de glicerol combinado con diferentes salinidades e intensidades de luz. En la Figura 20, se muestra que los mejores rendimientos celulares obtenidos con el tratamiento de 12.5 mM glicerol, 3 M NaCl salinidad (no isoosmótica) y $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz ($p < 0.05$) excedieron tres veces el rendimiento celular obtenido con el control fotoautotrófico (con la misma salinidad no isoosmótica 3 M). Así también, la densidad celular obtenida con el tratamiento eficiente con glicerol duplicó el crecimiento celular con el MI a la salinidad óptima de crecimiento (1.5 M NaCl) (Figura 20).

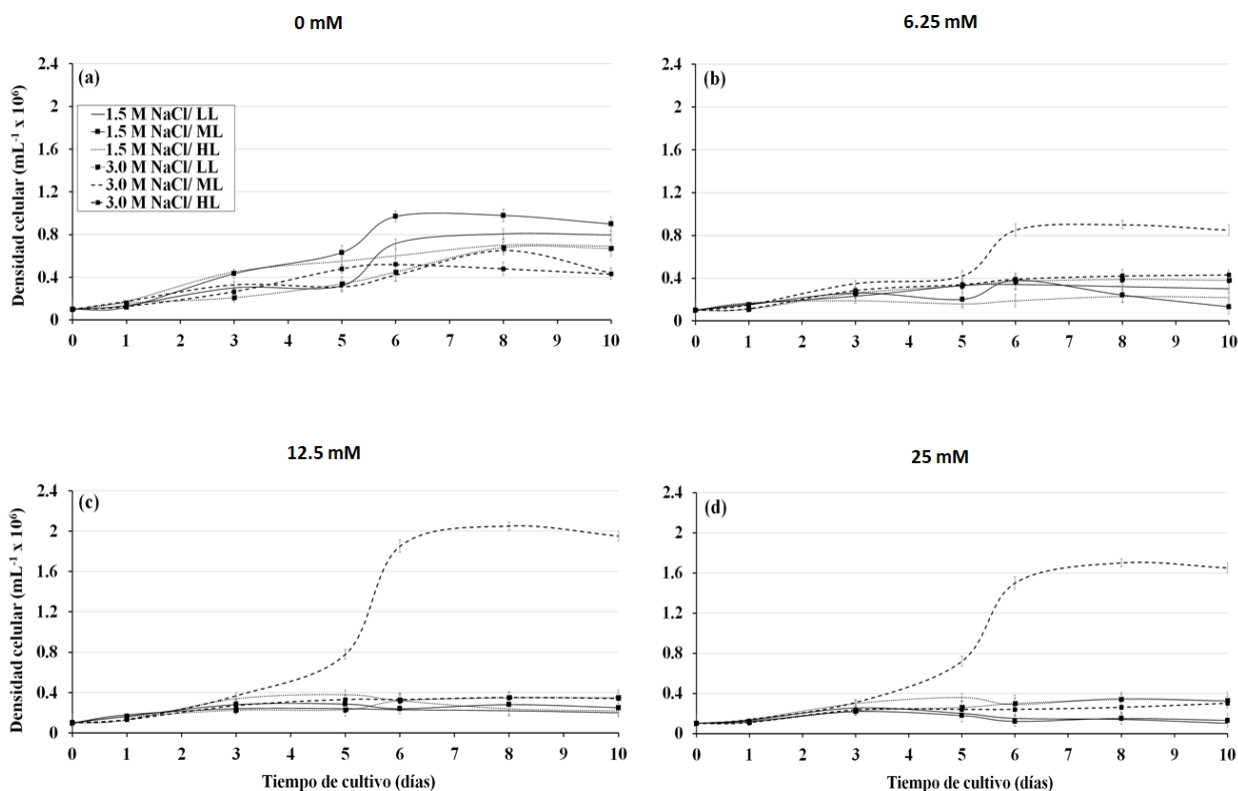


Figura 20. Crecimiento de *D. salina* expuesta a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz.

3.6.3.2. Pigmentos

Se observó un aumento notable de las clorofilas *a* y *b* y β -caroteno en *D. salina* cultivada con el tratamiento T19 (12.5 mM glicerol, salinidad 3.0 M NaCl y $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$) comparado con los demás tratamientos en estudio (Figura 21). Además, la coloración de los cultivos algales con el tratamiento optimizado con glicerol (Figuras 22B y 23B) es diferente a las tonalidades de los cultivos con medios inorgánicos (MI) (control fotoautotrófico) (Figura 22A) y acetato (control mixotrófico) (Figura 23B). Incluso los cultivos celulares con glicerol presentaron un ligero color amarillento, que, de acuerdo con nuestros resultados, estaría relacionado con una mayor biosíntesis de β -caroteno y/o estados previos a la carotenogenesis en esta microalga (23A).

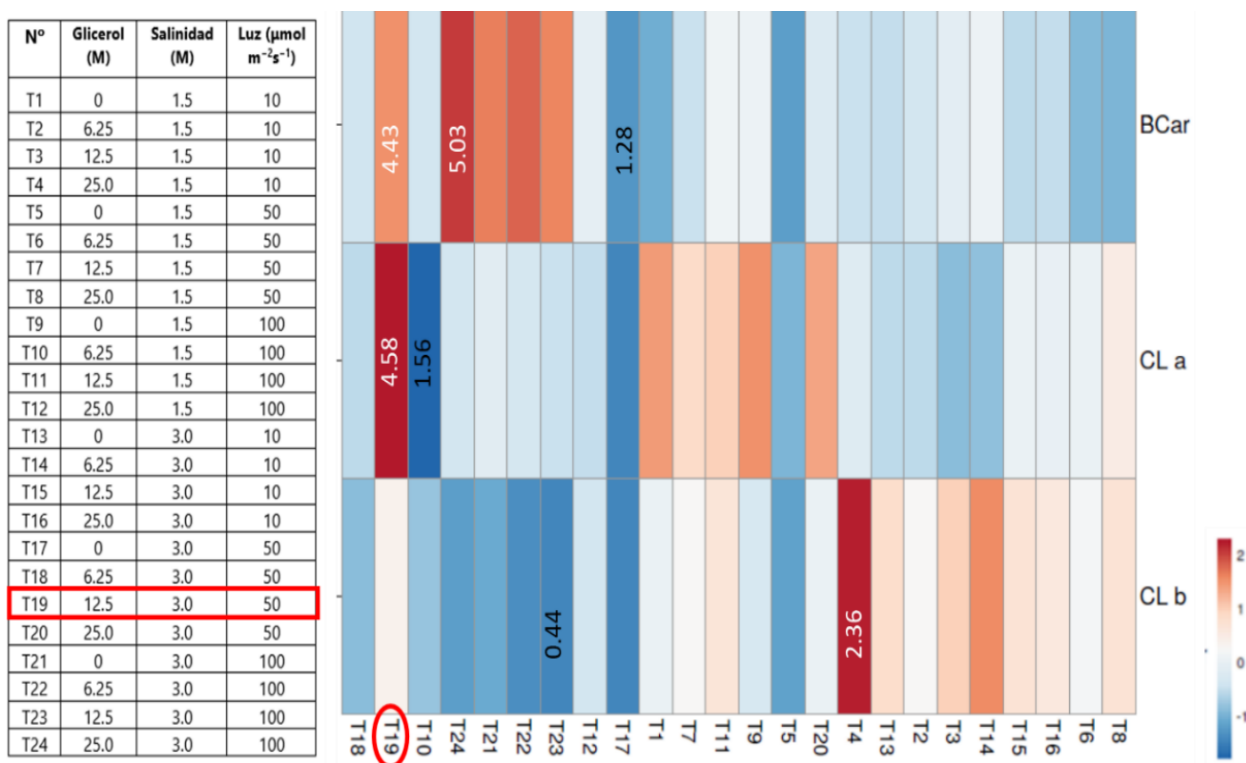


Figura 21. Contenido de pigmentos (pg celula^{-1}) de *D. salina* expuesta a la interacción del sustrato de carbono orgánico, salinidad e intensidad de luz. CL a: Clorofila a; CL b: clorofila b; BCar: β -caroteno.

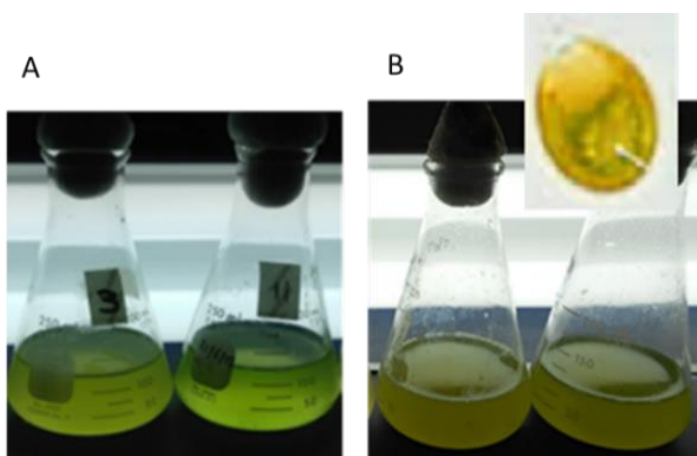


Figura 22. Suspensiones de *D. salina* cultivada con el tratamiento optimizado con glicerol (B) y con el medio control fotoautotrófico (A).

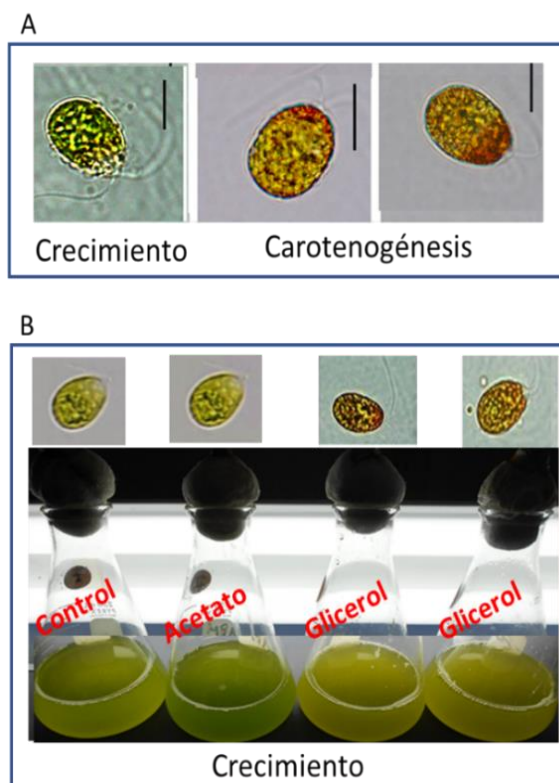


Figura 23. Coloración de células de *D. salina*. A) Basada en sus estados ecofisiológicos (células verdes: crecimiento; células amarillento-rojizo: carotenogénesis). B) Basada en su exposición a glicerol (células amarillentas) y acetato (células verdes) para cultivos en fase de crecimiento exponencial.

3.6.4. Carotenogénesis de *D. salina* bajo condiciones optimizadas de glicerol, salinidad y luz

En la Figura 24, se muestra el comportamiento de los pigmentos de las células de *D. salina* expuestas al cambio de intensidad de luz: luz intermedia ($50 \mu\text{M fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a luz alta ($300 \mu\text{M fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) al final de la fase de crecimiento exponencial con glicerol. En los 1-3 días de exposición a estrés lumínico, se observa que las células algales cultivadas con glicerol tienen una disminución del contenido de clorofila a y aumento masivo de β -caroteno (caotenogénesis). En los días 5-7 de exposición hay una disminución ligera del β -caroteno y aumento de la clorofila a . En el medio inorgánico (control), hay una disminución paulatina del contenido de clorofila a y un aumento progresivo de β -caroteno a lo largo de los 7 días de exposición de las células algales a la alta irradiancia.

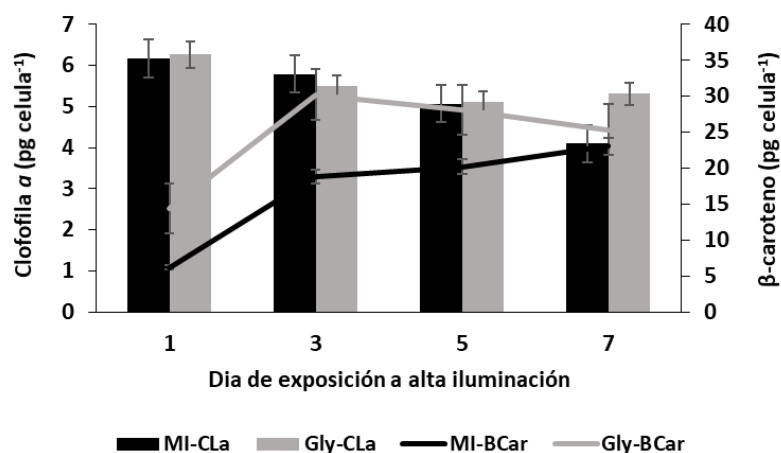


Figura 24. Efecto del glicerol en los pigmentos de las células de *D. salina* a intensidad de luz de $300 \mu\text{M}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. MI-CLa y MI-BCar: contenidos de clorofila *a* y β -caroteno en el medio inorgánico. Gly-CLa y Gly-BCar: contenidos de clorofila *a* y β -caroteno en el medio glicerol. Barras: clorofila *a* y líneas: β -caroteno.

Tabla 10. Pigmentos de *D. salina* cultivada con medio inorgánico (MI) y glicerol (MI + Gly) a diferentes salinidades e intensidades de luz. Los pigmentos (CLa: clorofila *a*, CLb: clorofila *b*, BCar: β -caroteno). Las letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes en el contenido de pigmento para cada tratamiento.

Intensidad de luz	Salinidad (NaCl)	Medio de cultivo	CLa (pg celula ⁻¹)	CLb (pg celula ⁻¹)	BCar (pg celula ⁻¹)
50 μM fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz mediana)	1.5 M	MI	3.37 ± 0.06^e	1.06 ± 0.02^e	1.85 ± 0.03^d
	3.0 M	MI	4.92 ± 0.09^d	1.31 ± 0.02^d	2.64 ± 0.05^d
300 μM fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz alta)	1.5 M	MI	6.55 ± 0.12^a	2.17 ± 0.04^a	5.81 ± 0.11^c
	1.5 M	MI + GLY	5.92 ± 0.11^b	1.96 ± 0.04^b	6.44 ± 0.12^c
	3.0 M	MI	5.45 ± 0.09^c	1.52 ± 0.03^c	20.11 ± 0.38^b
	3.0 M	MI + GLY	6.52 ± 0.12^a	1.50 ± 0.03^c	32.38 ± 0.59^a

En la Tabla 10 y Figura 25, se muestra la carotenogénesis y producción masiva de β -caroteno de *D. salina* en cultivos mixotróficos con glicerol estimulados por el cambio en la intensidad de la luz. Los tratamientos con glicerol y luz alta aumentaron significativamente sus niveles de clorofilas *a* y *b* y del carotenoide β -caroteno, en comparación con los controles que fueron expuestos a luz intermedia y alta, con salinidades de 1.5 y 3.0 M NaCl (Tabla 10 y Figura 25). Las células de *D. salina* con glicerol toman una coloración anaranjada a los 10 días de cultivo con medio glicerol e inducción con alta iluminación; mientras que las células algales expuestas a fotoautotrofia a este mismo tiempo e intensidad de luz, mantienen una coloración verdosa y cambian a anaranjado de manera lenta y gradualmente (17-20 días).

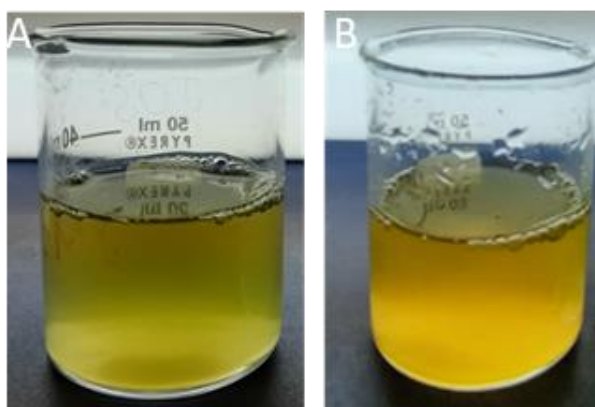


Figura 25. Suspensiones celulares de *D. salina* cultivada con el medio inorgánico (A) y con glicerol (B), ambos a 3.0 M NaCl y $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

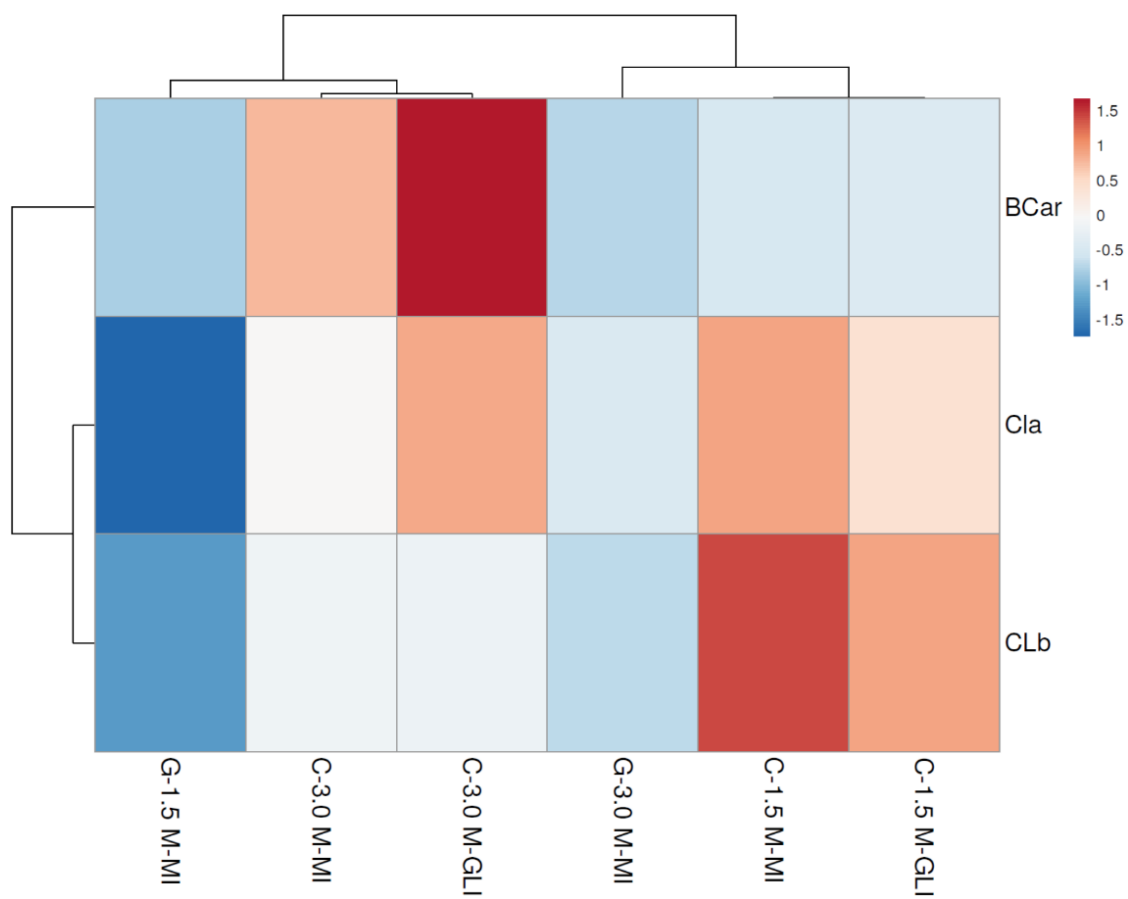


Figura 26. Crecimiento (G, luz: $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (pg célula^{-1}) y carotenogénesis (C, $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (pg célula^{-1}) de *D. salina* expuesta a $12.5 \mu\text{M}$ glicerol (GLI) y dos salinidades (1.5 y 3.0 M NaCl).

En la Figura 26, el mapa de calor también nos muestra un análisis de conglomerados de los datos. En el mismo, se observa que los tratamientos con glicerol y MI con alta luz ($300 \mu\text{M}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y salinidad 1.5 M NaCl forman grupos diferentes y distanciados con los tratamientos con glicerol y MI con alta luz ($300 \mu\text{M}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y salinidad (3.0 M NaCl). Por otro lado, los tratamientos con glicerol y MI con alta luminosidad tienen al β -caroteno en un grupo dominante y distanciado con un grupo formado entre las clorofilas a y b de los cultivos celulares de *D. salina*.

3.6.5. Características morfológicas y morfométricas de *D. salina* en cultivo y en carotenogénesis

En la Figura 27A, se muestra que las células de *D. salina* en crecimiento con medio inorgánico presentaron una forma esférica, mientras que las células que estaban en carotenogénesis aumentaron su tamaño y cambiaron a una forma ovalada (Figura 27B). Las células en crecimiento conteniendo glicerol en el medio fueron grandes y ovaladas (Figura 27C), mientras que las células en carotenogénesis fueron grandes y dominadas por formas más alargadas y elipsoides (Figura 27D).

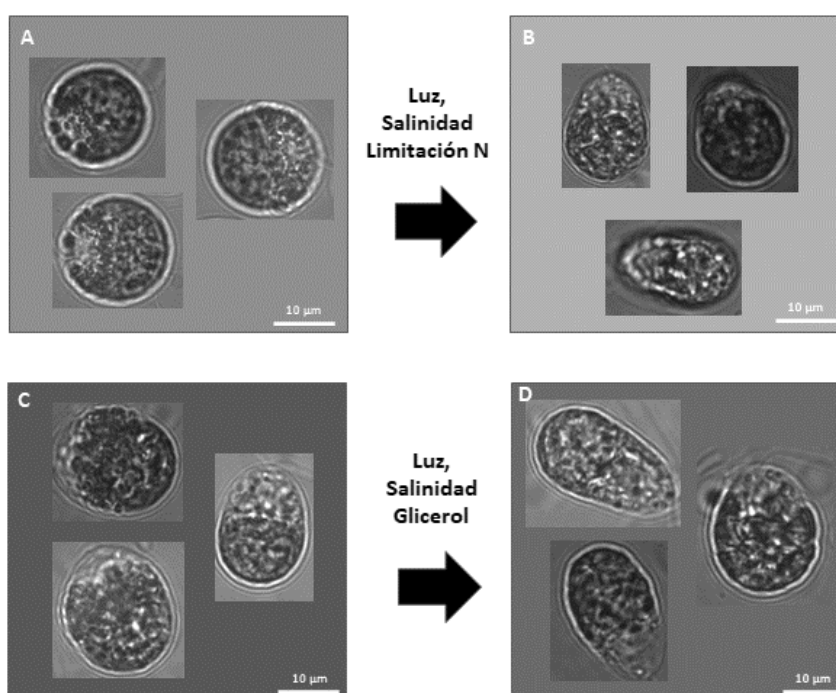


Figura 27. Características morfométricas con cultivos de *D. salina* en medio inorgánico en condiciones de crecimiento (A) y carotenogénesis (B). Cultivos de *D. salina* con glicerol en condiciones de crecimiento (C) y carotenogénesis (D).

En la Tabla 11, se muestra las variaciones en la longitud, ancho y volumen de las células de *D. salina* cultivadas en medios con glicerol y con dos salinidades e intensidades de luz. Las células que se encuentran en crecimiento y expuestas a intensidad de luz intermedias ($50 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) junto a las células en carotenogénesis con el medio control y más intensidad de luz ($300 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mostraron menores longitudes que las células en carotenogénesis que recibieron esta alta intensidad de luz y glicerol en el medio. Las células en crecimiento y con intensidades de luz menores fueron más anchas que las células en carotenogénesis con intensidades mayores de luz. Finalmente, las células en crecimiento y con intensidades de luz menores tuvieron más volumen que las células en carotenogénesis con intensidades mayores de luz. Cabe destacar que las células en carotenogénesis que recibieron glicerol tuvieron más volumen que las células de los controles fotoautotróficos.

Tabla 11. Características morfométricas de células de *D. salina* bajo mixotrofia con glicerol (GLY) y medio inorgánico (MI) y dos intensidades de luz.

Intensidad de luz	Salinidad (NaCl)	Medio de cultivo	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Volumen (μm^3)
50 $\mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (crecimiento)	1.5 M	MI	15.33 ± 0.96^b	13.98 ± 0.84^a	1571.53 ± 95.80^a
	3.0 M	MI + GLY	15.19 ± 0.95^b	12.41 ± 0.92^a	1226.31 ± 92.90^b
300 $\mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (carotenogénesis)	1.5 M	MI	15.07 ± 0.90^b	10.65 ± 0.80^b	894.97 ± 65.28^d
	3.0 M	MI + GLY	17.19 ± 0.84^a	10.49 ± 0.83^b	990.34 ± 86.90^c

3.6.6. Eficiencia cuántica máxima de *D. salina* cultivada en condiciones optimizadas de glicerol, salinidad e intensidad de luz

El índice de fluorescencia de CLa, F_v/F_m es usado para evaluar los cambios en la actividad fotosintética, específicamente la eficiencia cuántica máxima del PSII de las células algales adaptadas a la luz y expuestas a glicerol. Los valores F_v/F_m de los cultivos algales con glicerol fueron menores que aquellos obtenidos con la fotoautotrofia (MI). En este trabajo, la actividad de PSII de *D. salina* cultivada en glicerol se ve afectada por el nivel de salinidad (Figura 28). F_v/F_m de las células de *D. salina* cultivadas en las condiciones optimizadas de glicerol y luz es mayor para la salinidad 3.0 M que 1.5 M, aunque es menor que para los cultivos fotoautotróficos (Figura 28a,c). Los cultivos de algas con glicerol y DCMU a 1.5 y 3.0 M NaCl mostraron una caída notable en el F_v/F_m de las células de *D. salina* para ambas salinidades (Figura 28b,d).

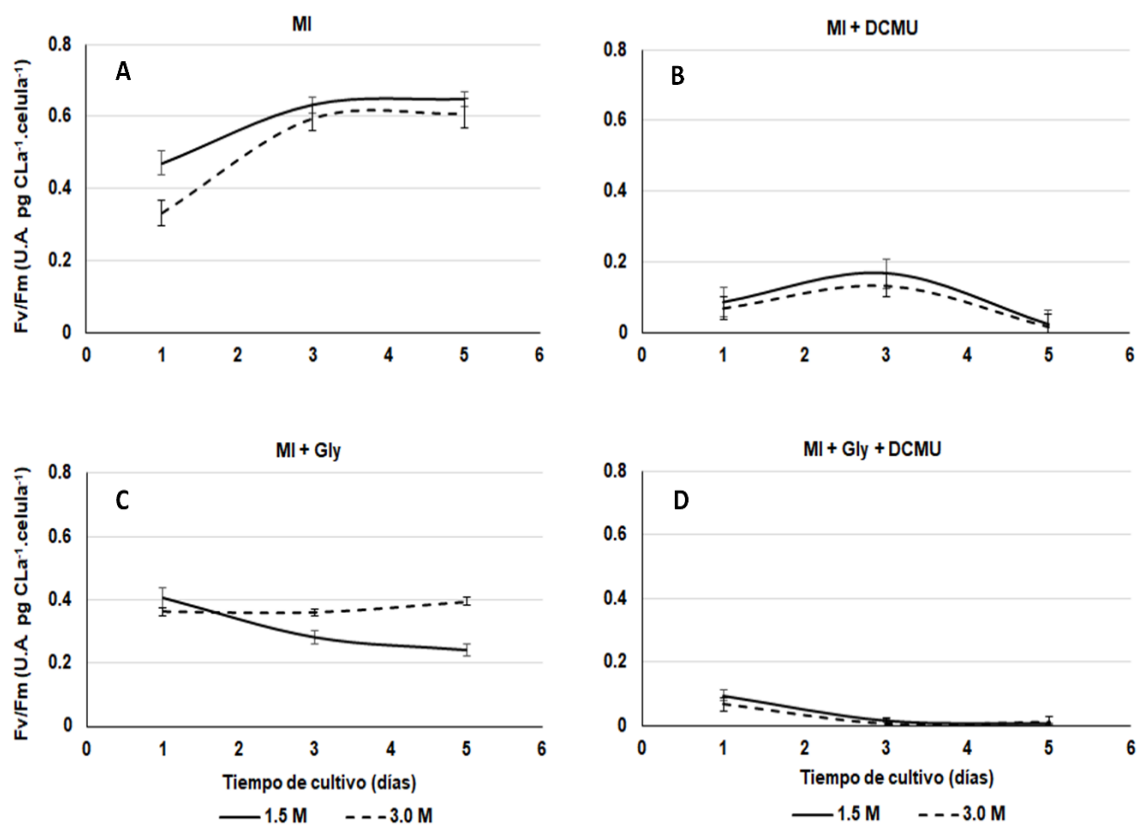


Figura 28. Valores Fv/Fm de las células de *D. salina* cultivada con el medio inorgánico (A y C) y con glicerol (B y D), ambos expuestos a dos salinidades y DCMU.

3.6.7. Cultivo de *D. salina* con glicerol y salinidad isoosmótica (3M NaCl)

Se desarrolló un experimento para comprobar si el efecto del glicerol en el cultivo de *D. salina* era determinado por el cambio de la salinidad (1,5 a 3,0 M NaCl) (salinidad no isoosmótica) y no por la adaptación salina (3 M) (salinidad isoosmótica). Esta microalga exhibe un crecimiento celular intermedio (0.98×10^6 células ml⁻¹) con la salinidad isoosmótica 3M (Tabla 12), lo que representa 40% de la producción algal obtenida con sus pares no isoosmóticos (1,5 a 3,0 M NaCl) (Figura 20). Las concentraciones de CLa, CLb y BCar en las células algales expuestas a la salinidad isoosmótica fueron menores que aquellas obtenidas con la salinidad no isoosmótica 3M (Tabla 12 y Figura 21). El pH del cultivo con la salinidad isoosmótica se mantuvo ligeramente ácido (Tabla 12) en comparación con el pH ligeramente básico del cultivo de algas con salinidad no isoosmótica (dato no mostrado).

Tabla 12. Densidad celular, CLa, CLb, BCar y pH de cultivo de *D. salina* con 12.5 mM glicerol (Gly) y MI (control). La salinidad isoosmótica y luz para el crecimiento algal fueron de 3.0 M NaCl y 50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. El pH final correspondió al séptimo día de cultivo. Los valores con superíndices diferentes en la misma columna son significativamente diferentes.

Medio de cultivo	Densidad celular ($\text{mL}^{-1} \times 10^6$)	CLa (pg celula^{-1})	CLb (pg celula^{-1})	BCar (pg celula^{-1})	pH final
MI	0.82 \pm 0.07 ^a	1.02 \pm 0.09 ^a	0.15 \pm 0.01 ^b	2.39 \pm 0.22 ^a	7.85 \pm 0.32 ^a
MI + 12.5 mM Gly	0.98 \pm 0.09 ^a	1.05 \pm 0.09 ^a	0.57 \pm 0.05 ^a	2.24 \pm 0.20 ^a	6.52 \pm 0.09 ^b
Valor p	P > 0.070	P > 0.712	P < 0.000	P > 0.426	P < 0.001

3.7. Efecto del glicerol en la mixotrofia fotosintética de *D. salina*

3.7.1. Dinámica de consumo de glicerol por *D. salina* bajo mixotrofia fotosintética

Otro experimento se llevó a cabo para conocer la dinámica de incorporación del glicerol en *D. salina* (Figura 29). Se observa una disminución progresiva del glicerol exógeno de esta microalga con una salinidad de 3.0 M comparado con 1.5 M NaCl (Figura 29b). En tanto, se observa una escasa cantidad de glicerol intracelular en todo el cultivo de algas para las condiciones salinas de 1.5 y 3.0 M (Figura 29d). Así también, se observaron concentraciones muy bajas de glicerol extracelular (Figura 29a) e intracelular (Figura 29c) en el medio inorgánico sin glicerol para ambas salinidades. Con estos resultados, se demostró preliminarmente la absorción de glicerol del medio con *D. salina*. En la Figura 30A, se observa una relación lineal entre la concentración del glicerol intracelular y el contenido de glicerol extracelular en los cultivos celulares con medios inorgánicos a salinidades 1.5 y 3.0 M NaCl. Sin embargo, se observa una relación exponencial entre el aumento del glicerol intracelular y el consumo del glicerol extracelular en los cultivos celulares con medios enriquecidos con glicerol a salinidades 1.5 y 3.0 M NaCl (Figura 30B).

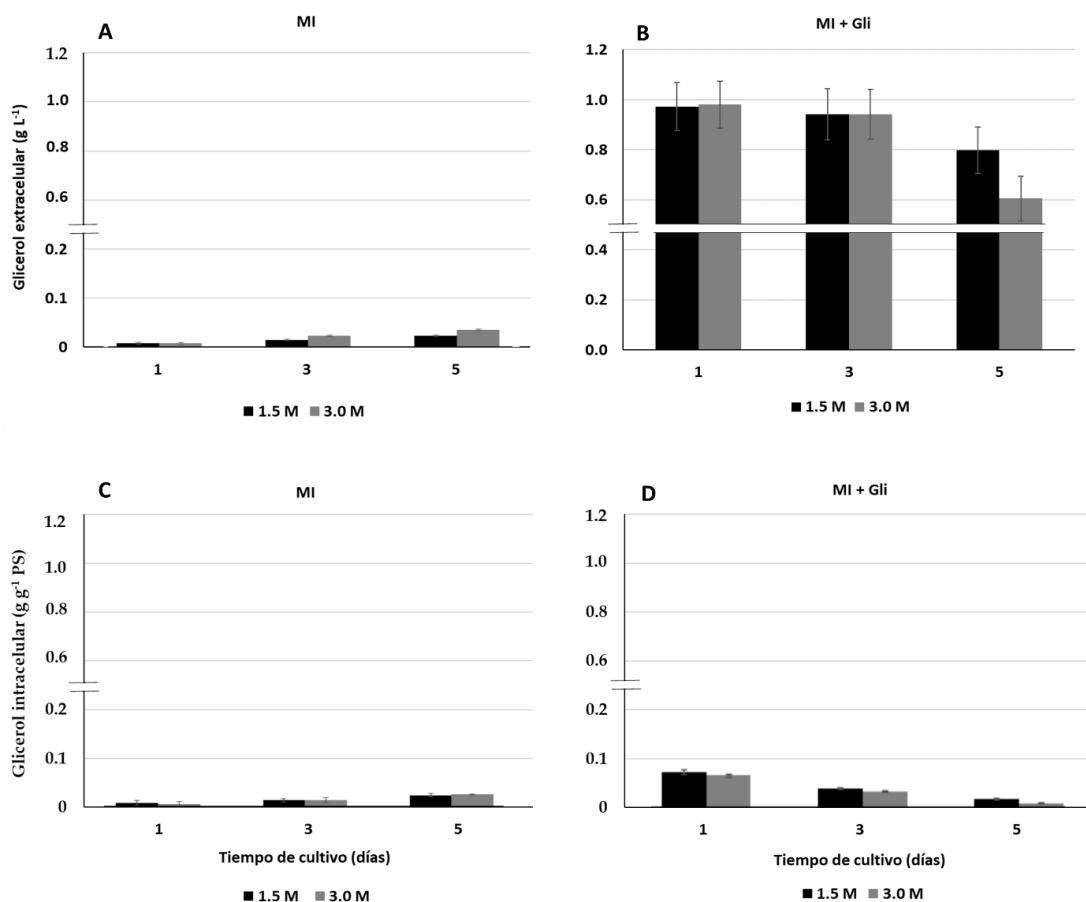


Figura 29. Glicerol (Gli) extracelular de MI (A) y MI + Gli (B) y glicerol intracelular de MI (C) y MI + Gli (D) en *D. salina* cultivada con 12,5 mM glicerol. Las salinidades correspondieron a 1.5 y 3.0 M NaCl. Las concentraciones de glicerol intracelular se normalizaron a peso seco (PS). Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres replicas.

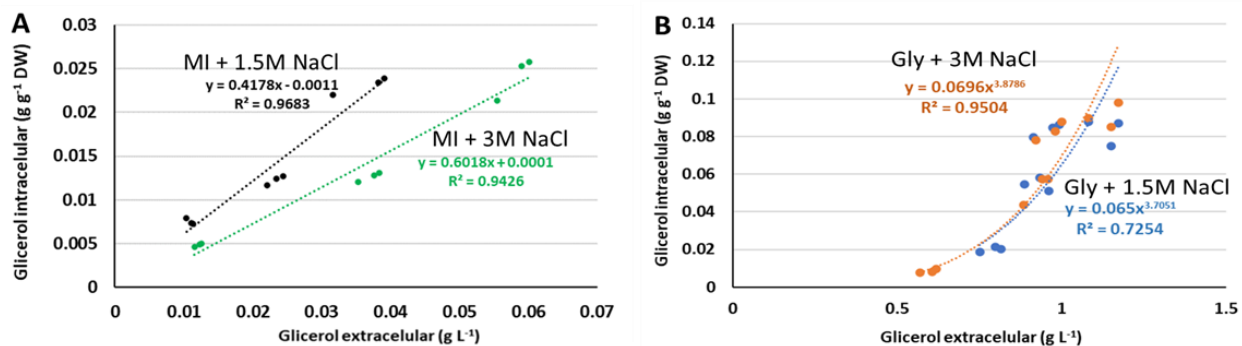


Figura 30. Correlaciones entre glicerol extracelular y intracelular de IM (A) y Gly (B) en *D. salina* cultivada con 12,5 mM glicerol y salinidades de 1.5 y 3.0 M NaCl. DW: peso seco.

3.7.2. Perfil de pigmentos por HPLC de *D. salina* en mixotrofia fotosintética

En la Figura 31, se presenta el perfil HPLC de los principales pigmentos de *D. salina* cultivada con MI, acetato y glicerol en el décimo día de cultivo. En los cultivos de *D. salina* con MI bajo luz intermedia ($50 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 31a), alta intensidad de luz ($300 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 31b) y alta intensidad de luz y norfluorazona (Figura 31c) domina la clorofila *a*, mientras que el β -caroteno esta ausente con el uso de este inhibidor. En los cultivos de esta alga con acetato, las células expuestas a luz intermedia (Figura 31d), alta intensidad de luz (Figura 31e) y alta intensidad de luz y norfluorazona (Figura 31f) hay dominancia de la clorofila *a* y el escaso el contenido de β -caroteno en alta intensidad de luz con o sin este químico. Finalmente, en los cultivos de esta especie con glicerol y luz intermedia (Figura 31g), alta intensidad de luz (Figura 31h) y alta intensidad de luz y norfluorazona (Figura 31i) está presente la clorofila *a*, mientras que hay bajos y altos contenidos de β -caroteno y zeaxantina a una alta intensidad de luz con o sin adición de este inhibidor enzimático, respectivamente.

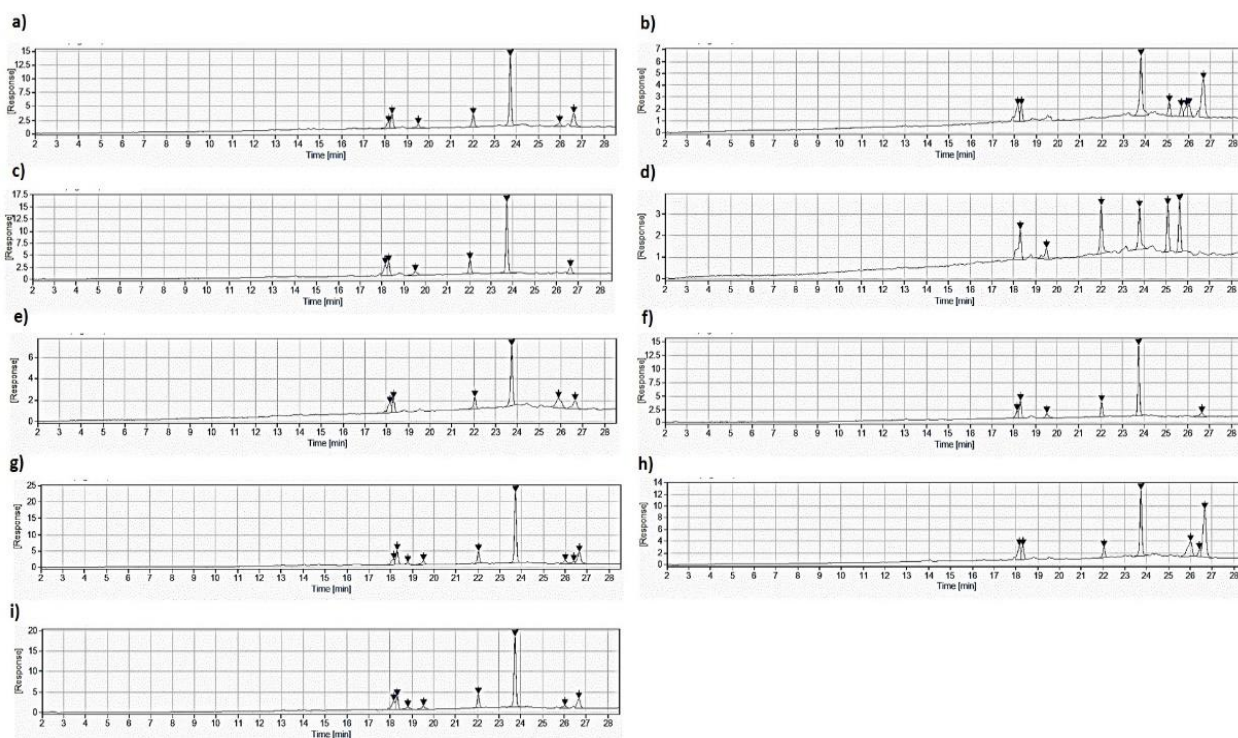


Figura 31. Perfil HPLC de los principales pigmentos de *D. salina* cultivada con MI (a, b y c), acetato (d, e y f) y glicerol (g, h e i). Las células se cultivaron con luz intermedia ($50 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a, d y g), alta intensidad de luz ($300 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (b, e y h) y exposición a norfluorazona con alta intensidad de luz (c, f e i). Tiempos de retención de clorofilas *a* (23.718 min) y *b* (22.002 min), β -caroteno (26.598 min) y zeaxantina (18.125 min).

3.7.3. Composición bioquímica de *D. salina* bajo mixotrofia fotosintética

En la Figura 32, se muestra la composición bioquímica (almidón, proteínas, lípidos y carbohidratos) de *D. salina* cuando es cultivada con glicerol a salinidades 1.5 y 3.0 NaCl. En la misma, se observa que los contenidos de la mayoría de las biomoléculas descritas son similares en los cultivos con MI y glicerol, excepto el contenido de carbohidratos en los cultivos algales con glicerol es menor al MI.

3.8. Comparación de los rendimientos algales con acetato y glicerol

Los cultivos fotoautótrofos de microalgas, como en el caso de *Dunaliella*, se caracterizan *per se* por una baja capacidad de los fotosistemas de las algas para captar energía luminosa, así como también, por la escasa disponibilidad de carbono inorgánico en los ambientes y medios extremos e hipersalinos. Sin embargo, dado que el cultivo mixotrófico de *D. salina* se regula con cloruro de sodio y glicerol, estas condiciones pueden convertirse en una estrategia promisoría de cultivo para aumentar los rendimientos de producción en esta microalga. La especie *D. salina* cultivada en glicerol exhibió altas productividades y rendimientos, es decir, productividad de biomasa (PBM_{max}) y BCar (PBCar_{max}), productividad volumétrica (VP), rendimiento de biomasa/sustrato (Y_{x/s}) y producto de rendimiento (β-caroteno)/sustrato (Y_{p/s}), comparado al acetato (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de parámetros de rendimiento y productividad de *D. salina* cultivada con 20 mM acetato y 12.5 mM glicerol. Los valores corresponden a los promedios ± DE. Las medias que no tienen el superíndice común en una misma columna son significativamente diferentes (P<0.05).

Sustrato carbono orgánico	PBM _{max} (g L ⁻¹)	PBCar _{max} (mg g ⁻¹)	PV (g L ⁻¹ day ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{p/s} (mg g ⁻¹)
Acetato	1.21 ± 0.06 ^b	0.93 ± 0.04 ^b	0.24 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.01 ^b	0.54 ± 0.03 ^b
Glicerol	2.10 ± 0.10 ^a	7.14 ± 0.15 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	1.54 ± 0.07 ^a	38.90 ± 0.90 ^a
ANOVA	P < 0.000	P < 0.000	P < 0.002	P < 0.000	P < 0.000

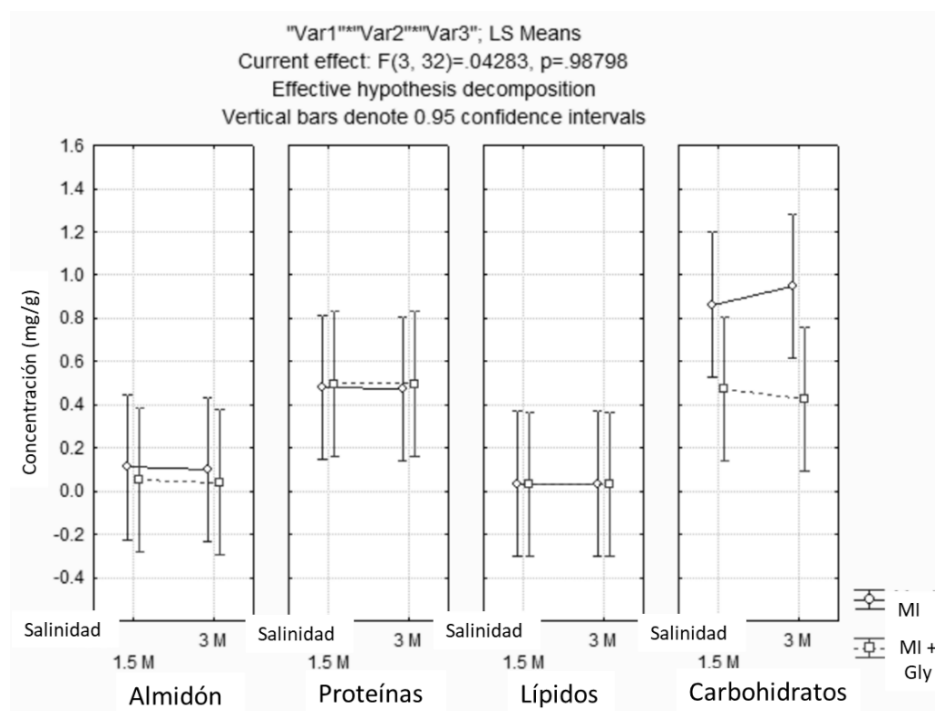


Figura 32. Composición bioquímica de *D. salina* cultivada con 12.5 mM glicerol y salinidades de 1.5 y 3.0 M NaCl.

Quando *D. salina* es cultivada con glicerol exhibe altos valores de rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) y de rendimiento de producto (β -caroteno)/sustrato ($Y_{p/s}$) comparado con acetato (Tabla 13). Cabe resaltar que los cultivos mixotróficos de *D. salina* con glicerol no recibieron un aporte extra de C y N, ni tampoco aereación sino agitación manual dos veces al día. A pesar de esto, nuestros resultados de rendimiento $Y_{x/s}$ están muy cerca a los valores obtenidos con glicerol por Sohrabi et al. (2019). Así también, los valores $Y_{p/s}$ fueron superiores a los valores reportados sobre iniciativas mixotróficas en esta especie (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de los parámetros de rendimiento de *D. salina* cultivada en glucosa y glicerol reportados por la literatura y en las mejores condiciones experimentales en este trabajo.

Sustrato orgánico de carbono	$Y_{x/s}$ ($g\ g^{-1}$)	$Y_{p/s}$ ($mg\ g^{-1}$)	Reference
Glucosa	--	1.10 ± 0.06	Gonabadi et al. (2021)
Glicerol	2.50 ± 0.08	1.16 ± 0.02	Sohrabi et al. (2019)
	2.33 ± 0.03	43.5 ± 0.08	En este trabajo

Las condiciones mixotróficas inducidas por el glicerol revelaron nuevos roles como sustrato de carbono y energía, inducción de la síntesis de pigmentos, regulación del pH del medio externo que se adhieren a la función de osmorregulación del glicerol en *D. salina*. El glicerol puede convertirse en un sustrato compatible y prometedor para la producción sostenida de biomasa y β -caroteno de *D. salina* y otras especies relacionadas.

Capítulo 4. Discusión

4.1. Prospección de sustratos de carbono orgánico para mixotrofia fotosintética de *D. salina*

Esta investigación sobre la prospección de fuentes de carbono orgánico demostró que los fotosistemas de *D. salina* pueden elegir otras opciones nutricionales a la fotoautotrofia. Como se sabe, esta clorofita se considera un fotoautótrofo obligado (Ben-Amotz y Avron, 1989; Borowitzka y Borowitzka, 1988) al que se le ha restringido su crecimiento y cultivo a depender de la energía derivada de la fotosíntesis implicando bajos rendimientos de biomasa y β -caroteno algal, así como los altos costos de producción de este isoprenoide C_{40} (Díaz et al., 2021). En este trabajo, la adaptación a las condiciones de cultivo mixotrófico en esta microalga es notada por la asimilación de los sustratos orgánicos ensayados (Tabla 6), lo cual se capitalizó en más energía y contenido de carbono y se vió traducido en cierta mejora del crecimiento y acumulación de β -caroteno en esta microalga. La condición heterotrófica solo promovió un reducido crecimiento de las algas. Este comportamiento fisiológico se relaciona con la fotoautotrofia estricta de las especies de *Dunaliella* (e. g., *D. salina* y *D. bardawil*), que no permite la producción heterotrófica masiva y comercial (Chavoshi y Shariati, 2019b).

La relación C/N es un parámetro de cultivo influyente en la composición bioquímica, tasa de crecimiento y producción de metabolitos. Las microalgas en general tienen una relación C/N de 5 – 20/1 (Collos y Berges, 2003) y *D. salina* presenta una relación C/N de 124-60/1 en mixotrofia (Chavoshi y Shariati, 2019a; Keerthi et al., 2015). La relación C/N optima va a depender de la cepa estudiada y del modo de cultivo usado (Nagarajan et al., 2018). La microalga *Tetraselmis chuii* puede lograr altas productividades de biomasa (cinco veces más que el crecimiento fotoautotrófico) y puede acumular más polisacáridos y lípidos totales cuando es cultivada con glucosa (10 g L^{-1}) y NaNO_3 en una relación C/N de 16/1 (Lu et al., 2017). En el cultivo mixotrófico de *Chlorella* sp. TISTR 8990 usando glucosa, nitrato de potasio y diferentes relaciones C/N (29/1, 63/1, 95/1), se encontró una mayor productividad de biomasa con la relación 29/1, mientras que las relaciones 63/1 y 95/1 sirvieron para producir la mayor cantidad de lípidos y ácidos grasos (Nagarajan et al., 2018). En general, la relación C/N de 6.6 es recomendada para producir fotoautotróficamente biomasa algal; mientras que para cultivo mixotrófico en acetato, *C. sorokiniana* y *C. reinhardtii* usan una relación C/N de 5.6 y 7.1, respectivamente (Lacroux et al., 2021). Los resultados demuestran que el crecimiento y la síntesis de metabolitos celulares de *D. salina* están regulados por una relación C/N apropiada para los sustratos orgánicos ensayados (Figuras 8 y 12). Los mayores crecimientos algales son obtenidos con la relación C/N de 20/1 y usando acetato. Este sustrato C_2 es el que tiene una

mayor tasa de difusión a través de la membrana celular de microalgas (Gimmler y Hartung, 1988). La sacarosa, glicerol y xilosa son sustratos poco asimilables debido a problemas enzimáticos de las microalgas. La glucosa es el sustrato menos eficiente puesto que puede producir una inhibición de la fotosíntesis y disminución de la clorofila conduciendo a un blanqueamiento de las células (Martínez y Orus, 1991). La relación C/N del medio de crecimiento juega un rol crucial y diversificado en las rutas metabólicas de los carotenoides y lípidos, puesto que ambos metabolitos comparten el acetil CoA como precursor común de sus rutas. Consecuentemente, relaciones altas C/N pueden favorecer más altos rendimientos de los lípidos. Así también, las respuestas fisiológicas tales como el almacenamiento de almidón y la eliminación de sustancias poliméricas por *D. salina* revelan en gran medida la incorporación de los sustratos orgánicos a las células algales, así como también, el exceso de nutrientes en el medio que a veces no favorece su absorción eficiente por esta microalga. La relación C/N produce diferentes microambientes intracelulares en los que hay suficiente o exceso de moléculas de carbono y reacciones bioquímicas que estimulan o reprimen en gran medida el metabolismo y la producción de microalgas (Sun et al. 2020). Queda el reto en demostrar cómo el manejo de la relación C/N puede estimular mayores crecimientos celulares y contenidos de pigmentos usando los sustratos orgánicos y la mixotrofia fotosintética en *D. salina*.

La disminución en los contenidos de CLa, CLb y β Car de *D. salina* con la mayoría de los sustratos orgánicos en comparación con cultivos fotoautótrofos (Control) (Figura 12) puede ser indicativo de las condiciones heterotróficas y mixotróficas con luz moderada preponderantes en los cultivos, como ha sido reportado en *C. sorokiniana* UTEX 1230 (Cecchin et al., 2018) y UTEX 1602 (Marchello et al., 2018), respectivamente. Recientemente, Chavoshi y Shariati (2019a), corroboraron la disminución de la concentración de clorofila total en *D. salina* UTEX 200 cultivada con 100 mM acetato o 60 mM glucosa en comparación con cultivos fotoautotróficos. Sin embargo, Kadkhodaei et al. (2015) reportaron un mayor contenido de clorofila total en cepas de *D. salina* (D1, D2 y UTEX 1644) cultivadas con glucosa (15 g L⁻¹). Estas variaciones pueden responder a desequilibrios de transición entre la fotoautotrofia y heterotrofia, que no pueden descartarse dependiendo de las condiciones experimentales de crecimiento mixotrófico (Abiusi et al., 2020b). La acumulación significativa de clorofilas y β -caroteno con sustratos orgánicos dentro de sus ventajas sobre el cultivo fotoautótrofo significó la disminución a la dependencia de luz (Cecchin et al., 2018; Cheirsilp y Torpee, 2012; Marchello et al., 2018) y confirmó la ocurrencia de la mixotrofia en *D. salina*.

El cultivo de *D. salina* con el sustrato glucosa reveló los mayores contenidos de almidón sobre los demás sustratos usando una relación C/N de 20/1 (Figura 12). Este comportamiento puede ser el resultado de la activación de enzimas glucolíticas, como la hexoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa y la fosfofructoquinasa ligados con el metabolismo de los sustratos glucolíticos (Roth et al., 2019). La

conversión de glucosa en almidón puede ocurrir sin GAP y del resto de la glucólisis (Yang et al., 2000). La activación diferencial de estas enzimas glucolíticas es clave para controlar la represión de la fotosíntesis, disminución de clorofila y reducción de enzimas del ciclo de Calvin de las células microalgales expuestas a sustratos orgánicos (Martínez y Orús, 1991; Roth et al., 2019). Simultáneamente, ocurre el metabolismo respiratorio a una tasa modulada por la actividad glucolítica citosólica de los sustratos azucarados destinados a los productos de reserva (almidón) en lugar de producir energía para el crecimiento algal como ha sido reportado en las especies clorofita *Chromochloris zofingiensis* (Roth et al., 2019) y rodofita *Cyanidioschyzon merolae* (Moriyama et al., 2015). Alternativamente, estas microalgas asimilan sustratos orgánicos como glicerol y acetato optando por un nodo metabólico (Gly-DHAP-GAP) y por la ruta alterna del glioxilato, respectivamente.

Los cultivos de *D. salina* con una relación C/N (20/1) usando sustratos glucolíticos como glucosa mantienen pH extremadamente ácidos, mientras que con el glicerol es ligeramente ácido y con el acetato es muy alcalino. Generalmente, el pH para el crecimiento fotoautotrófico de muchas microalgas marinas y de agua dulce, incluida *D. salina*, está dentro del rango de 7-9 (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Algunos sustratos orgánicos pueden cambiar el pH del medio y otras propiedades como viscosidad, presión osmótica y coeficiente de transferencia gas-líquido (Pérez-García y Bashan, 2015). La absorción de compuestos glucolíticos como glucosa por *D. salina* tiende a acidificar el medio hipersalino (1.5 y 3.0 M NaCl) blanqueando las células. Una de las recomendaciones para corregir este desbalance iónico es la inhibición de la actividad de la bomba de H⁺-ATPasa interna mediante la disminución de la concentración de fosfato del medio (0.2 a 0.05 mM) (Chavoshi y Shariati, 2019a). Dado que el pH aumenta con la actividad fotosintética y el consumo de CO₂, la alcalinización del medio salino con el acetato es una característica distintiva de condiciones apropiadas para la síntesis de energía y crecimiento de esta clorofita. La ligera acidez del medio y el menor crecimiento de las algas con el glicerol (Figuras 8 y 12) podrían estar relacionados con el efecto inhibitorio de este poliol a altas concentraciones en el medio (Sohrabi et al., 2019).

Los mayores valores de Fv/Fm obtenidos con acetato (Figura 14) están dentro del rango (0.55 – 0.67) reportado por Singh et al. (2019) para *D. salina* cultivada con el mismo sustrato y la salinidad de 2M NaCl. En estas circunstancias, se comprueba una actividad normal del PSII primario desde el agua hasta la quinona A, involucrando la producción de ATP a través de la fotofosforilación cíclica que participa en la absorción de acetato por las células algales (Johnson y Alric, 2012). En estas condiciones de cultivo, el acetato es el sustrato orgánico que menos afecta la actividad del PSII y más bien promueve el metabolismo y crecimiento de esta microalga. En tanto, los bajos valores Fv/Fm y los rendimientos celulares de *D. salina*

obtenidos con glucosa, sacarosa, xilosa y glicerol pueden resultar en una fotosíntesis disminuida por daño/degradación de PSII causada principalmente por las altas concentraciones de estos sustratos tal como han reportado Sohrabi et al. (2019).

La interacción de los sustratos orgánicos (C/N de 20/1), salinidad e intensidad de luz mejoró ligeramente el crecimiento de *D. salina* (Figura 15). En nuestras condiciones experimentales, la salinidad para crecimiento mixotrófico de esta microalga es la misma de su crecimiento fotoautotrófico (1.5-1.7M NaCl) (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Pérez-Boerema, 2020; Sharma et al., 2015). En tanto, la densidad celular de *Pavlova lutheri* en cultivos mixotróficos aumentan significativamente cuando la salinidad aumenta del 10 al 30%; sin embargo, hay una disminución en el crecimiento algal a niveles más altos de salinidad (Bashir et al., 2019). El cambio en la salinidad no parece afectar la asimilación de los sustratos orgánicos a altas concentraciones en el medio, sino que influye directamente en el proceso de osmorregulación de esta microalga, tal como ha sido demostrado en el crecimiento mixotrófico eficiente de *Isochrysis galbana* a 50 mM de glicerol y 35 ‰ de salinidad (Alkhamis y Qin, 2013).

Los mejores crecimientos celulares de *D. salina* en mixotrofia fotosintética fueron obtenidos en luz continua (Tabla 9) y, por el contrario, estas microalgas mostraron un crecimiento discreto o reducido al ser expuestas a varios regímenes de luz y oscuridad (fotoperiodo), conforme a los resultados obtenidos. La intensidad de luz más apropiada para los cultivos algales con los sustratos orgánicos está muy cercana a las irradiancias recomendadas para el crecimiento mixotrófico de algas verdes ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Sforza et al., 2019; Tang et al., 2014). Esta intensidad de luz es intermedia al rango de 80-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ recomendado para proporcionar suficiente energía e impulsar la fotosíntesis y el ciclo de Calvin en la fijación del carbono en esta alga (Gu et al., 2014). Estos hallazgos no hacen más que corroborar la baja dependencia de la luz de *D. salina* en cultivos mixotróficos, lo que podría tener cierto impacto económico en la producción masiva de esta microalga.

4.2. Modelación de la mixotrofia fotosintética de *D. salina* con sustratos orgánicos

Por lo general, los modelos empíricos comúnmente usados para evaluar el cultivo fotoautotrófico, heterotrófico y mixotrófico de microalgas tales como el modelo de Gompertz y el modelo logístico y sus modificaciones no explican totalmente la cinética del crecimiento algal puesto que no cubren todas las fases de crecimiento microbiano o no tienen en cuenta algunas propiedades específicas como la fase lag

(Esser et al., 2015). El modelo logístico define las poblaciones microbianas en función de la población inicial (biomasa), la tasa de crecimiento y la población final. (Praveen et al., 2018). El modelo Gompertz modificado incluye biomasa inicial y fase lag en comparación con el modelo original muy usado en la modelación del cultivo de microalgas (Padil et al., 2021). El modelo Baranyi-Roberts es geoméricamente diferente porque exhibe un cuasi-segmento durante la fase lag de la curva de crecimiento (Praveen et al., 2018). Hay varios estudios reportados sobre la modelación del cultivo mixotrófico de microalgas. El crecimiento mixotrófico de *Chlorella* sp. fue evaluado usando varios modelos de crecimiento no lineales (Gompertz, logístico, Baranyi-Roberts, Morgan) y las métricas estadísticas: coeficiente de determinación (R^2) y error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés), encontrando que los modelos logístico y Gompertz son los que más se ajustan a los datos experimentales (valores R^2 cercanos al 98% y valores RMSE de 0.3-0.4) obtenidos con el crecimiento mixotrófico de esta microalga (Praveen et al., 2018). En otro trabajo, se encontró que los modelos logístico y Gompertz modificado tenían las mejores predicciones de los perfiles de biomasa de *Chlorella* sp. cultivada bajo mixotrofia, comparado a otros modelos matemáticos como Morgan, Baranyi o Buchanan (Padil et al., 2021). Estos mismos autores demostraron que el modelo modificado de Gompertz (que incluye biomasa inicial y fase lag) en comparación con el modelo original es el que realmente demuestra una excelente predicción de los datos experimentales de crecimiento en esta microalga. La predicción del crecimiento mixotrófico de *Tetraselmis* sp. FTC 209 fue evaluado a través de cuatro modelos de crecimiento no lineal (logístico, logístico con lag, Gompertz modificado y Baranyi-Roberts), de los cuales, se encontró que estadísticamente el modelo de Baranyi-Roberts es el que más se ajusta a los datos experimentales (Mohamed et al., 2014). En los experimentos de mixotrofia desarrollados en *D. salina* con varios sustratos orgánicos, se ha demostrado que los datos de densidad celular obtenidos siguen el modelo de Baranyi-Roberts conforme con los valores maximizados de R^2 y RSME (Figura 18). En este modelo, se incorpora una función de ajuste que describe la adaptación del inóculo al medio de cultivo (Mohamed et al., 2014), lo cual puede brindar una mayor robustez a la correlación de nuestros datos experimentales con los valores modelados.

4.3. Optimización del glicerol, salinidad e intensidad de luz en la mixotrofia de *D. salina*

En relación con los fotoperiodos ensayados (L/O): 24/0, 18/6, 12/12, 6/18 y 0/24, el crecimiento celular de *D. salina* fue maximizado con el fotoperíodo 24/0 durante mixotrofia con glicerol (Figuras 19 y 20). En algunas microalgas, la disponibilidad de luz continua (24/0) maximiza los niveles de expresión de muchos genes que codifican enzimas del metabolismo central de carbono (Zheng et al., 2013), aumentando la tasa

de asimilación de carbono y, en consecuencia, incrementando ostensiblemente la tasa de crecimiento y biomasa de *D. salina* (Chauton et al., 2013; Xu et al., 2016). En ese sentido, el metabolismo mixotrófico de *D. salina* usando glicerol es favorecido por la luz continua dada la capacidad fotoautotrófica especial que tiene esta alga y que involucra entre otras cosas la activación y/o regulación por luz de las enzimas de transporte de sustratos, pigmentos accesorios y enzimas del metabolismo del carbono.

El crecimiento y producción de microalgas en cultivos mixotróficos con glicerol parece ser dependiente de la especie, la concentración del sustrato y las condiciones de crecimiento. El mayor crecimiento mixotrófico de *Isochrysis galbana* en glicerol se alcanza con 50 mM (4.6 g L^{-1}) (Alkhamis y Qin, 2013), en *Thalassiosira pseudonana* se consigue con 2.5 g L^{-1} de glicerol (Baldisserotto et al., 2021), en *Phaeodactylum tricornutum* con 0.1 M (9.2 g L^{-1}) (Morais et al., 2021), en *D. tertiolecta* con 1.0 g L^{-1} (Liang et al., 2019), en *D. salina* IR-1 con 2.5 g L^{-1} (Sohrabi et al., 2019) y en este trabajo, *D. salina* BC02 con 1.25 g L^{-1} . En microalgas como *Tisochrysis lutea* usan glicerol para el crecimiento mixotrófico y no heterotrófico, lo cual está ligado con la presencia de transportadores de glicerol que solo funcionan bajo la luz y posiblemente influenciados por la fotosíntesis (Hu et al., 2018). En este trabajo, los niveles bajos de glicerol son los que mejoran el crecimiento de *D. salina* lo que sugiere una mejor difusión y/o transporte activo de este sustrato a través de la membrana y la maquinaria enzimática de estas algas, tal como se reporta en diatomeas (Marella et al., 2021). El glicerol a altas concentraciones podría tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la productividad de las microalgas (Sohrabi et al., 2019) provocado por la alta presión osmótica que inhibe la actividad metabólica de las células eucariotas (Chaiyaso y Manowattana, 2018). Incluso, niveles altos de glicerol pueden cambiar la ultraestructura del cloroplasto, reducir la energía de excitación en PSII y disminuir la actividad fotosintética, así como los pigmentos clorofilianos (Grama et al., 2016).

La microalga *D. salina* es capaz de crecer en un amplio rango de salinidades (0.05 M a 5.5 M NaCl) (Chen et al., 2009a) y su crecimiento óptimo se obtiene con salinidades entre 1.5 - 1.7 M NaCl (Borowitzka y Borowitzka, 1988). En especies de *Dunaliella* como *D. tertiolecta* la captación de glicerol requiere de la activación de transportadores de unión a membrana GUP1 (proteína de captación de glicerol) inducido por un mecanismo de respuesta rápida al choque hiperosmótico (0.5 a 4.0 M NaCl) (Lin et al., 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, el aumento de la salinidad de 1.5 a 3.0 M NaCl más que con otras salinidades (datos no mostrados) puede haber influenciado la modificación de la permeabilidad celular e inducido el transporte activo provocando la absorción de las concentraciones disponibles de glicerol a las células de *D. salina*. Las células que están expuestas al aumento de salinidad (1.5 a 3.0 M NaCl) están recibiendo estrés salino, lo que puede desencadenar una síntesis masiva del pool

enzimático involucrado en la incorporación y asimilación de glicerol exógeno para destinarlo a la captación de energía y carbono necesarios en la regulación osmótica, el crecimiento y los pigmentos celulares. Esta ventaja está sustentada por su menor costo energético para el metabolismo celular comparado con la asimilación del glicerol endógeno a partir de la fotosíntesis o la degradación del almidón cuando las células están sometidas a condiciones fotoautotróficas (Kaplan et al., 1980). La conversión directa de glicerol en gliceraldehído 3-fosfato (G3P) permite la unión a precursores asociados con las vías metabólicas del carbono de la fotosíntesis y la respiración (fosfoenolpiruvato o piruvato) que pueden afectar positivamente el crecimiento celular y la síntesis de metabolitos celulares (Chen et al., 2009b; Yazdani y González, 2007).

La asimilación de glicerol por las microalgas parece ser dependiente de la especie puesto que el crecimiento de algunas algas no es estimulado por la presencia de glicerol, mientras que otras especies tienen un crecimiento celular a una tasa más alta que los cultivos fotoautotróficos (Cheah et al., 2018). Hay especies microalgales como *Neochloris oleabundans*, *Botryococcus braunii* y *Dunaliella* sp., que maximizan su crecimiento con 5 g L⁻¹ de glicerol (Choi y Lee, 2015). La especie *D. salina* consume glicerol en concentraciones variables de 0.5 y 1.0 g L⁻¹ (Suarez et al., 1999) a 2.5 g L⁻¹ (Sohrabi et al., 2019). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, la microalga *D. salina* consume lentamente glicerol en bajas concentraciones durante el cultivo, lo cual posiblemente es dependiente de sus necesidades nutricionales y osmorregulatorias. Queda justificado que el crecimiento mixotrófico algal se puede potenciar metabólicamente cuando se usan sustratos orgánicos como glicerol puesto que se suelen activar rutas alternas y reacciones anapleróticas para la asimilación de mayor cantidad de carbono que aquel proveniente de las reacciones fotosintéticas (Morais et al., 2021). Este metabolismo diversificado y productivo podría convertir al glicerol en un sustrato adecuado y *sui géneris* para explotar la mixotrofia fotosintética en *D. salina*.

El aumento de la salinidad (1.5 a 3.0 M NaCl) puede inducir una mayor capacidad antioxidante de las células de *D. salina* (Farhat et al., 2011), lo cual repercutiría en la mejora del crecimiento celular y la síntesis de metabolitos celulares. La adición de 1 g L⁻¹ (12.5 mM) de glicerol al medio puede aumentar las clorofilas *a* y *b*, y los carotenoides en *D. tertiolecta* (Liang et al., 2019). El incremento del β-caroteno observado en *D. salina* cultivada con glicerol parece que se deba a que este sustrato reducido puede fácilmente incorporarse en rutas fotosintéticas y respiratorias que favorecen el crecimiento celular y la síntesis de pigmentos clorofilianos y carotenoides en esta microalga. A diferencia de la glucosa, el glicerol es uno de los sustratos de carbono no fermentables que más promueve la biosíntesis de β-caroteno en microalgas (Cuaresma et al., 2011; Wozniak et al., 2011) debido, entre otras cosas, a que el glicerol y sus

intermediarios son precursores de las vías biosintéticas del acetil-CoA y terpenoides (Cuaresma et al., 2011). En el metabolismo mixotrófico, una parte del C-glicerol puede ingresar al ciclo TCA donde intermediarios del citrato son expresados a nivel genético para inducir la respiración mediante una vía mitocondrial alterna a fin de facilitar la síntesis masiva de carotenoides (Han et al., 2013).

Los cultivos celulares que lograron su máximo crecimiento algal con el tratamiento más apropiado (12.5 mM Gly, 3.0 NaCl y $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) alcanzaron progresivamente altos niveles de β -caroteno ($32.38 \text{ pg celula}^{-1}$) después de cinco días de estar sometidos a alta intensidad de luz ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Xu et al. (2016) reportaron el aumento de glicerol endógeno de las células de *D. salina* CCAP 19/30 cuando son expuestas a un aumento en la intensidad de la luz (50 a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) provocando la estabilización del aparato fotosintético y el aumento de clorofila en esta microalga. Las condiciones de alta intensidad de luz estimulan el proceso de carotenogénesis en esta microalga favoreciendo la acumulación masiva de β -caroteno. La microalga *Chlamydomonas acidophila* cultivada en glicerol puede mejorar la ruta bioquímica del β -caroteno en comparación con su metabolismo fotoautotrófico (Cuaresma et al., 2011). En estas condiciones, la producción de acetil-CoA y NADPH requerida para aumentar el contenido de β -caroteno debería provenir del exceso de energía del catabolismo del glicerol. Así también, la bioconversión de glicerol exógeno en intermediarios claves del metabolismo general, podría haber tenido un impacto directo en la síntesis de hormonas inductoras de carotenogénesis. El β -caroteno y el crecimiento celular de *D. salina* MCCS-001 pueden alcanzar tasas más altas utilizando ácido indol-3-acético (auxina) (Mousavi et al., 2016), el cual podría haberse derivado del glicerol exógeno (Kasahara, 2016) conforme pudo haber ocurrido en esta tesis.

Conforme a los resultados de esta tesis, el tamaño de las células de *D. salina* varía según las fases de crecimiento (verde) y carotenogénesis (roja) y se encuentran muy cercanos a los valores reportados por Borovkov et al. (2019) para la longitud (16.88 y $17.3 \mu\text{m}$) y ancho (10.1 y $11 \mu\text{m}$) de las células verdes y rojas, respectivamente. Los cambios en la morfología de las células de *D. salina* se suscitan como respuesta a los cambios en el ciclo de cultivo y a las condiciones ambientales tales como: los cambios de salinidad, composición mineral del medio, temperatura e iluminación (Borovkov et al., 2019). A esto se suma, el uso de sustratos orgánicos que modifica las propiedades fisicoquímicas del medio y consecuentemente afectan la morfología de las células algales. En cultivo y carotenogénesis, la longitud y ancho de las células de *D. salina* puede oscilar entre las 11 - $25 \mu\text{m}$ y 6 - $15 \mu\text{m}$, respectivamente (Borovkov et al., 2019). En los resultados de esta tesis, la longitud y ancho de las células de *D. salina* en mixotrofia con glicerol están dentro de los rangos antes descritos. No obstante, el hecho que haya células más grandes en los cultivos con la baja intensidad de luz y salinidad comparado a cultivos hipersalinos y carotenogénicos con células

más pequeñas, indican que el estrés hiperosmótico, la intensidad de luz y la edad del cultivo de manera individual o colectivamente pueden estar influenciando la reducción del volumen de las células algales (Borovkov et al., 2019). La reducción del volumen celular puede ser el resultado de la respiración y consumo de almidón para producir energía y metabolitos, así como también la reducción del tamaño de la reserva de glicerol tal como se ha reportado en *D. salina* CCAP 19/30 (Xu et al., 2016). Estos cambios osmóticos parecen estar ocurriendo en los resultados de esta investigación, aunado a la acumulación de β -caroteno que pueden estar afectando el volumen celular que es más notorio en los tratamientos que contienen glicerol comparado a los controles.

En este trabajo, la disminución en el F_v/F_m de los cultivos algales con glicerol y DCMU se debe a que este sustrato podría alterar el estado energético de la fotosíntesis, especialmente a través del daño en algunos centros de reacción del PSII de *D. salina*. Se hipotetiza que esta microalga depende del suministro de energía y de las moléculas reductoras de la fotosíntesis y el metabolismo del glicerol para asignar carbono hacia el crecimiento y la síntesis de metabolitos.

Hasta ahora, los reportes sobre parámetros de bioproducción en microalgas expuestas a mixotrofia con glicerol son escasos. El PV de *D. salina* en glicerol es menor que el PV ($0.46 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) reportado para esta alga con altas concentraciones de glucosa durante 18 días de cultivo (Morowvat y Ghasemi, 2016). El valor PBMmax ($2,000 \text{ mg L}^{-1}$) con glicerol es más alto que la cantidad encontrada para *D. salina* FACHB (519 mg L^{-1}) (Wan et al., 2011) y *D. salina* ($1,015 \text{ mg L}^{-1}$) (Morowvat y Ghasemi, 2016) usando glucosa y para el cultivo fotoautotrófico de *D. salina* SA ($1,231.66 \text{ mg L}^{-1}$) (Ahmed et al., 2017). A diferencia de otros compuestos orgánicos, el glicerol es un sustrato eficiente y no competitivo porque puede inducir la interconexión de rutas metabólicas (e. g., ciclo de Calvin, ciclo de glicerol, ciclo de TCA) a través de la actividad simultánea de los metabolismos fotoautótrofos y fotoheterótrofos dentro del cultivo mixotrófico de esta especie. De esta manera, la energía química y las moléculas de carbono producidas podrían promover una alta biomasa y mejorar el contenido de β -caroteno en esta microalga halófila.

En la mayoría de los cultivos mixotróficos de *D. salina*, ocurre un mejoramiento de la densidad celular, al mismo tiempo que se produce una baja cantidad de β -caroteno o viceversa (Tabla 15). El sistema de cultivo mixotrófico con glicerol es más apropiado para la producción simultánea de biomasa y β -caroteno en *D. salina* en comparación con la literatura reportada (Tabla 15). Sohrabi et al. (2019) alcanzaron rendimientos de biomasa superiores al crecimiento algal obtenido en este trabajo, a expensas de una mayor cantidad de glicerol y de inóculos, agitación mecánica, temperaturas elevadas y largos periodos de cultivo

comparado al sistema experimental desarrollado en esta tesis que trabaja con bajos niveles de glicerol, sin agitación mecánica, temperaturas intermedias y periodos cortos de cultivo.

Tabla 15. Biomasa y β -caroteno de *D. salina* cultivada con varios sustratos de carbono orgánico reportados por la literatura y en este trabajo.

Substrato	Biomasa	β -caroteno	Referencia
Inorgánico	1.7×10^6 células mL ⁻¹	4-8 pg célula ⁻¹	Cifuentes et al. (1992)
Glucosa	0.99 g L ⁻¹	8.03 mg g ⁻¹	Morowvat y Ghasemi (2016)
Acetato	$1.0-1.2 \times 10^6$ células mL ⁻¹	< 5 pg célula ⁻¹	Mojaat et al. (2008)
Glicerol	1.0×10^6 células mL ⁻¹	0.94 pg célula ⁻¹	Suarez et al. (1999)
	$4.0-5.0 \times 10^6$ células mL ⁻¹	0.8-1.0 pg célula ⁻¹	Sohrabi et al. (2019)
	2.15×10^6 células mL ⁻¹ (2.0 g L ⁻¹)	30 pg célula ⁻¹ (50 mg g ⁻¹)	En este trabajo

4.4. Hipótesis del efecto del carbono orgánico en las rutas metabólicas de *D. salina* en mixotrofia fotosintética

La asimilación de carbono inorgánico es totalmente conocida en las microalgas incluyendo *D. salina* (Figura 33). En el mismo se destaca el papel trascendental que cumple la enzima RUBISCO y ciclo de Calvin que llevan a cabo la conversión de un carbono tan sencillo como CO₂ o HCO₃ en moléculas complejas que se necesitan en el metabolismo microalgal. En la Figura 33, se presenta una hipótesis del efecto del carbono orgánico en las rutas metabólicas de *D. salina* en mixotrofia fotosintética. En la misma se muestra como la glucosa puede asimilarse a través de las rutas de la glucólisis y de la pentosa fosfato. La xilosa puede realizar su catabolismo también mediante la ruta de la pentosa fosfato. La sacarosa usa la ruta de la sacarosa sintasa. El glicerol mantiene su propio ciclo de degradación y mantenimiento en esta microalga halofílica. Finalmente, el acetato es el sustrato cuyo metabolismo es mayormente citoplasmático y el resto de los sustratos es predominantemente cloroplástico. Este último sustrato usa el ciclo del glioxilato en glioxisomas que aunado al ciclo TCA en las mitocondrias producen la energía y los componentes celulares necesarios para muchas algas (Figura 33). Todas las sustratos y rutas de degradación mencionados están orientados a producir energía y los precursores del metabolismo central de carbono tales como GAP, DHAP, piruvato y acetyl CoA.

Cuando se estudia la cinética de consumo del glicerol extracelular natural y artificial (nutriente), se encuentra que el modelo lineal es el que mayormente explica el consumo de la escasa cantidad de glicerol extracelular natural del medio inorgánico. En tanto que el modelo potencial (apropiado para variaciones

extremas de variables de estudio) es el que mejor explica la reducción paulatina de glicerol extracelular incorporado como nutriente en el medio con 3.0 M en comparación con 1.5 M NaCl. Así también, queda demostrado que el modelo potencial es el que mejor explica la correlación entre la asimilación del glicerol intracelular y el consumo del glicerol extracelular en la microalga. La presencia de glicerol extracelular natural en el medio inorgánico contradice a lo planteado por Avron (1992) quien sostiene la inexistencia de glicerol exógeno nativo en los cultivos de *D. salina*. El choque salino (3M NaCl) controla probablemente el destino C-glicerol. A pesar de no tener un efecto en el contenido de almidón, proteínas y lípidos, puede tener una influencia considerable en la disminución de los carbohidratos conforme a los resultados obtenidos.

De acuerdo con los resultados de la dinámica del glicerol, extracelular e intracelular, se puede inferir que el glicerol puede estar incorporándose en el metabolismo y la síntesis de biomasa. En la Figura 34, se explica el destino que siguen los sustratos inorgánicos y orgánicos especialmente el glicerol como compuesto aportante de energía, NADPH y carbono en los procesos metabólicos que ocurren a nivel de cloroplasto y mitocondria, lo cual favorece ostensiblemente la producción de biomasa y los metabolitos celulares como los pigmentos. En los cultivos mixotróficos con glicerol puede ocurrir un intercambio de nutrientes (C/N) y de gases CO_2/O_2 que pueden influir directamente en el balance del pH de los cultivos algales.

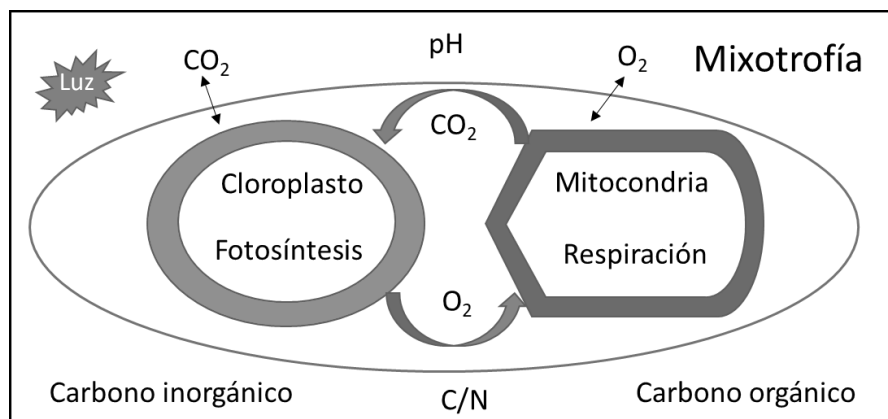


Figura 34. Diagrama que muestra la interacción y balance químico del cloroplasto y mitocondria para asimilación de sustratos orgánicos especialmente glicerol en *D. salina*.

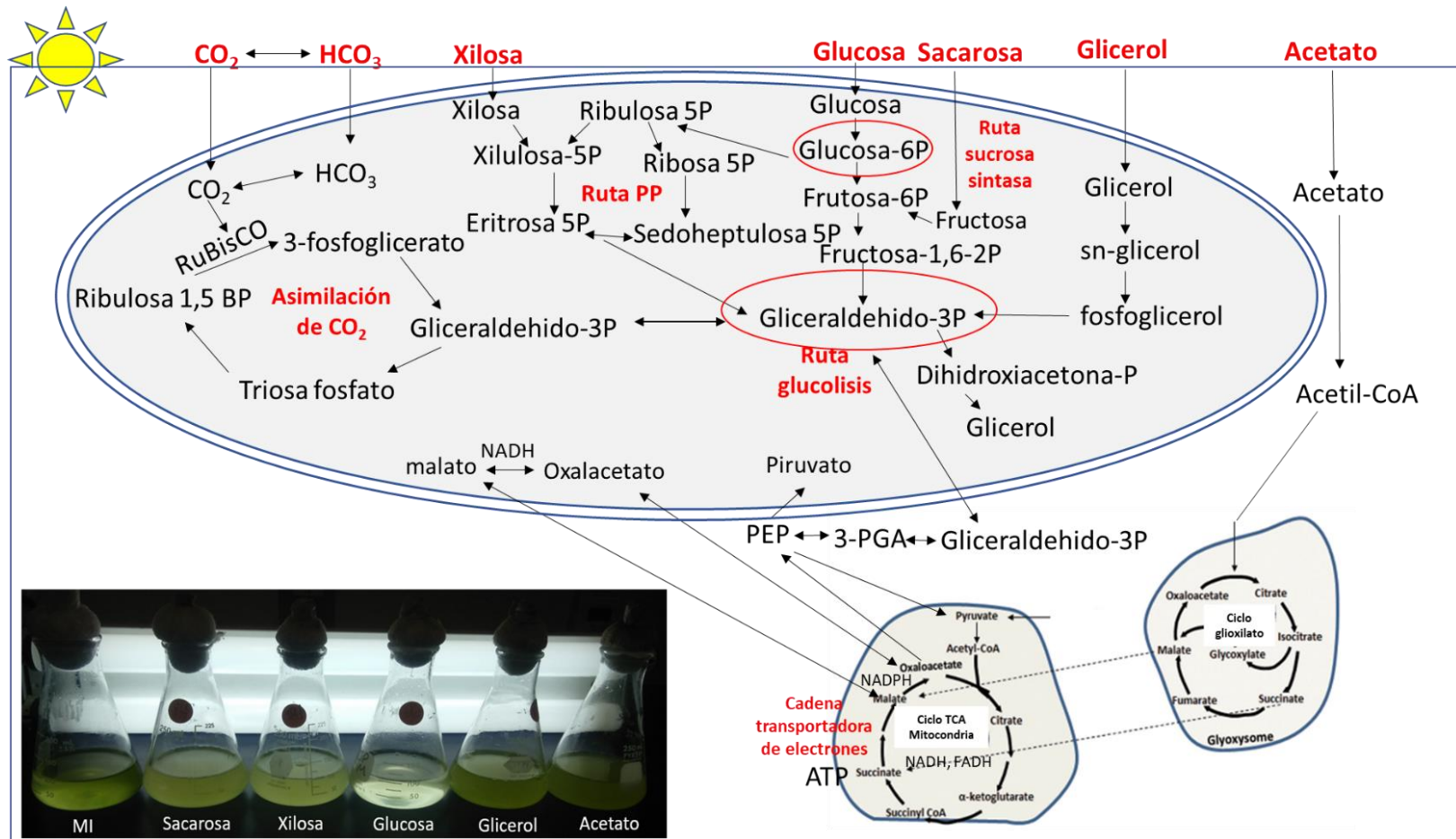


Figura 33. Diagrama de las rutas propuestas de degradación y conversión de carbono orgánico en *D. salina*. Adaptado de Hamed et al. (2016).

4.5. Glicerol, osmorregulación y rutas metabólicas de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis de *D. salina*

En este trabajo se proponen hipótesis que buscan explicar los roles del glicerol en la osmorregulación y rutas de su incorporación en *D. salina* bajo estrés salino y lumínico (Figuras 35 y 36). En la Figura 35B, se proponen dos mecanismos de incorporación del glicerol que hayan ocurrido en los experimentos aquí desarrollados: uno de incorporación rápida que está directamente relacionado con el proceso de osmorregulación y el otro de incorporación continua que involucra la asimilación del glicerol para crecimiento y síntesis de metabolitos en esta microalga que contrasta con la osmorregulación natural de esta especie (Figura 35A).

La incorporación de glicerol exógeno antes que la síntesis endógena de glicerol conlleva a que no ocurra la degradación de almidón o síntesis a partir del carbono fotosintético de este osmolito puesto que las células no necesitan producir glicerol cuando está disponible para absorción en el medio externo, tal como se ha demostrado en células de *D. salina* expuestas a altas concentraciones de glicerol (Lv et al., 2021). Una de las características diferenciales del metabolismo del glicerol incorporado exógenamente por células de *D. salina* es que estimula rutas biosintéticas y altos contenidos de aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, triptófano, lisina, arginina, cisteína y metionina, muchos de los cuales actúan como osmolitos compatibles, precursores para metabolitos secundarios o como formas de almacenamiento de nitrógeno orgánico (He et al., 2020).

Los cambios metabólicos en la incorporación del glicerol del medio exógeno a las células de *D. salina* cultivada en condiciones hipersalinas pasan por reajustes y sobrerregulaciones a nivel de transcripción de corto plazo en el metabolismo de la glucólisis y el ciclo de TCA (Lv et al., 2021). Además, que se puede estar incorporando energía y moléculas reductoras desde glicerol a través de reacciones fotosintéticas dependientes de luz (ciclo de Calvin), tal como ocurre con *Chlorella protothecoides* (Zhang et al., 2016). De esta manera, se estarían sobreproduciendo moléculas C_3 tales como DHAP, GAP o piruvato, intermediarios claves del metabolismo central del carbono de estas células algales. Consecuentemente, se puede estar produciendo la energía, moléculas reductoras y carbono a través del metabolismo mixotrófico de *D. salina*. Las células de *D. salina* cultivadas con glicerol y expuestas a altas intensidades de luz orientan su metabolismo de carbono a la acumulación masiva de carotenoides, especialmente β -caroteno. En esta actividad, una parte del carbono y energía proveniente del glicerol exógeno puede estar movilizándose hacia las rutas MEP y de los carotenoides, estimulando la síntesis de las enzimas y las hormonas necesarias

para llevar a cabo el proceso de carotenogénesis en esta microalga. En esta parte, los metabolismos fotosintéticos y respiratorios pueden coadyuvar a la carotenogénesis mixotrófica. Ambos mecanismos podrían producir los sustratos iniciales (GAP y piruvato) de la ruta MEP que sirve para extender la cadena C_5 a C_{40} y producir los distintos isoprenoides incluyendo la familia de carotenoides tales como β -caroteno.

Así también, se ha planteado la regulación de intermediarios de la ruta MEP para la conversión del clorofilide en clorofila en plantas y probablemente en microalgas (Kim et al., 2013). Cuando *D. salina* alcanza su máximo crecimiento en glicerol y se expone a altas intensidades de luz puede provocar que las células algales ingresen a un proceso de carotenogénesis (Figura 36). Esto sucede dentro de un contexto de disponibilidad de energía y carbono fotosintético y respiratorio que sirve para estimular intermediarios del ciclo de Krebs y moléculas como acetil CoA y piruvato que actúan sobre la sobreexpresión de enzimas de la ruta MEP y la síntesis de hormonas (e. g., auxinas y ácido indolacético) (Figura 36). Los niveles de transcripción de algunos genes que codifican enzimas carotenogénicas pueden ser sobrestimulados por la alta intensidad de luz, trayendo consigo la acumulación masiva de carotenoides (Wang et al., 2014). En estas condiciones, se activan los elementos de respuesta a luz y hormonas presentes en los promotores de genes que expresan enzimas cruciales de la carotenogénesis como la fitoeno sintasa o fitoeno desaturasa involucradas en la síntesis masiva de carotenoides especialmente el β -caroteno como ocurre con la microalga *D. salina*. La enzima fitoeno sintasa es el punto más importante de regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Welsch et al., 2000). En todos los medios probados (Figura 31), la norflurazona ejerció su efecto de inhibidor sobre la enzima fitoeno sintasa provocando el bloqueo de la síntesis y acumulación de fitoeno y de los carotenoides anoxigénicos como β -caroteno y los oxicarotenoides como zeaxantina. Así también, la norlurazona bloqueó la carotenogénesis en esta microalga expuesta a mixotrofia con glicerol.

Los carotenoides son considerados como pigmentos accesorios colectores de luz dentro de los cloroplastos y tienen funciones de moléculas fotoprotectoras, atenuadoras de las clorofilas en estado triplete y atrapadoras de radicales de oxígeno tóxico (Du et al., 2017). Las rutas de síntesis y acumulación de β -caroteno en *D. salina* han sido parcialmente analizadas, mientras que los mecanismos fisiometabólicos y de señalización que disparan la acumulación de este metabolito están escasamente estudiados (Xu y Harvey, 2019). La regulación de la biosíntesis de pigmentos y en especial β -caroteno en *D. salina* ocurre tanto a nivel transcripcional como postranscripcional bajo diferentes rutas metabólicas (e. g., rutas MEP y carotenoides) y metabolitos (e. g., GAP, DHAP, piruvato y acetil CoA) (Figura 37). Esta compleja interacción repercute a nivel fisiológico y molecular en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental y nutricional en *D. salina* (Lv et al., 2016). En este trabajo, los cultivos mixotróficos de *D. salina* con glicerol bajo

condiciones de crecimiento y carotenogénesis, presentan contenidos de carbohidratos y almidón menores a los valores obtenidos con los cultivos fotoautotróficos. Estas diferencias se deben al metabolismo reducido del glicerol como sustrato orgánico de los cultivos mixotróficos. La mixotrofia fotosintética con glicerol no se canaliza en la glucólisis ni en la síntesis de almidón; a diferencia que el metabolismo fotoautotrófico necesita de intermediarios glucolíticos para la formación de almidón como producto de reserva y de control por retroalimentación negativa de la acumulación de β -caroteno.

El β -caroteno se acumula en gotas lipídicas dentro de los espacios intertilacoidales del cloroplasto y el citosol (Bonfond et al., 2017). Estas estructuras supramoleculares contienen ácidos grasos, principalmente el ácido oleico (Mendoza et al., 1999) que sirve para dar fluidez a las membranas en el interior del cloroplasto de las células algales (Katz et al., 1995). El aumento simultáneo de los contenidos de β -caroteno y ácidos grasos en *D. salina* tiene sustento en que los procesos de biosíntesis de carotenoides y lípidos usan a las moléculas de acetil CoA como bloques estructurales (Nelson y Cox, 2019). Además, el ácido abscísico (ABA) podría inducir la acumulación de ácidos grasos y carotenoides por el mejoramiento de la biosíntesis de acetil CoA (Sun et al., 2012; Zhang et al., 2020). El glicerol como sustrato orgánico de cadena corta, puede unirse directamente a la síntesis de los intermediarios GAP, piruvato y/o acetil CoA, los cuales a su vez podrían conectar a rutas como MEP y carotenoides para la formación de isoprenoides y β -caroteno en *D. salina* (Ding et al., 2016; Zhang et al., 2020), lo cual ha quedado establecido en este trabajo (Figura 37). La transformación de glicerol en GAP y piruvato genera tres veces más equivalentes reductores de lo que se produce con glucosa o xilosa, que convierte a este sustrato como idóneo para la biosíntesis de los carotenoides y sus intermediarios, que como compuestos reducidos requieren de una gran cantidad de equivalentes reductores (Guo et al., 2018).

El piruvato y el GAP son los sustratos iniciales de la ruta de biosíntesis de isoprenoides del metileritritol fosfato (MEP). El primer paso regulatorio y limitante de la ruta MEP son las enzimas deoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) y deoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR), cuya sobreexpresión podría aumentar significativamente el contenido de carotenoides totales tal como se ha reportado en *D. salina* (Capa et al., 2009; Polle et al., 2020a). Se ha encontrado que la inhibición por retroalimentación de DXS por IPP y/o DMAPP puede resultar en un importante mecanismo regulador de la ruta MEP y de la biosíntesis de carotenoides (Nisar et al., 2015). Cabe mencionar que la suplementación y asimilación de glicerol exógeno por parte de *D. salina* debería incrementar significativamente las reservas celulares de GAP y piruvato trayendo consigo mejoras en la síntesis de los intermediarios de rutas claves como MEP, carotenoides y de carotenogénesis que estimulan la acumulación masiva de β -caroteno (Sohrabi et al., 2019; Zhang et al., 2020).

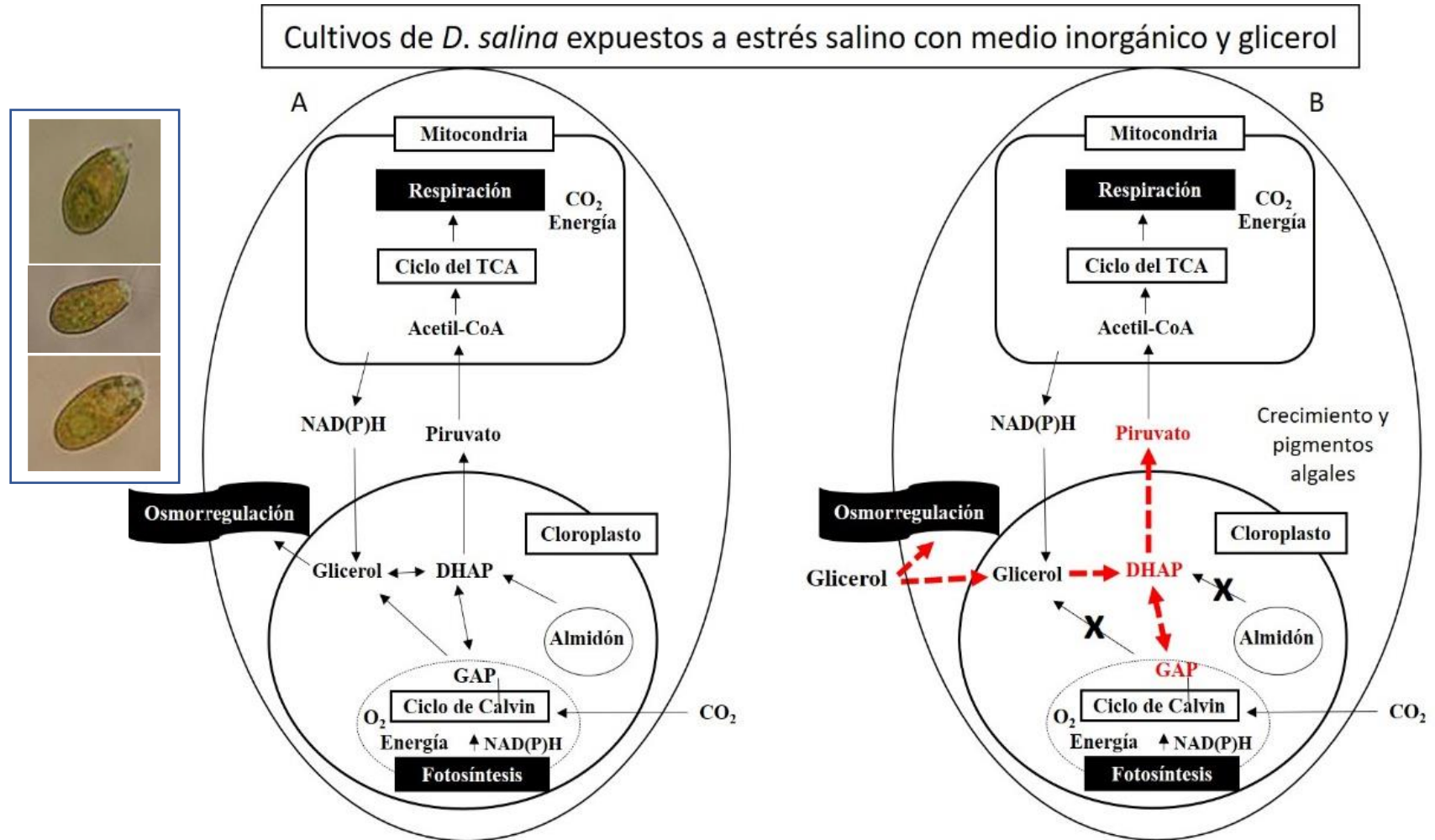


Figura 35. Diagrama de la hipótesis del rol de la osmorregulación y nutrición de *D. salina* bajo estrés salino (1.5 a 3.0 M NaCl) usando glicerol adicionado al medio (B) comparado al glicerol natural del medio inorgánico (A). Microfotografías extraídas de Borovkov et al. (2019).

Cultivos de *D. salina* expuestos a estrés lumínico con medio inorgánico y glicerol

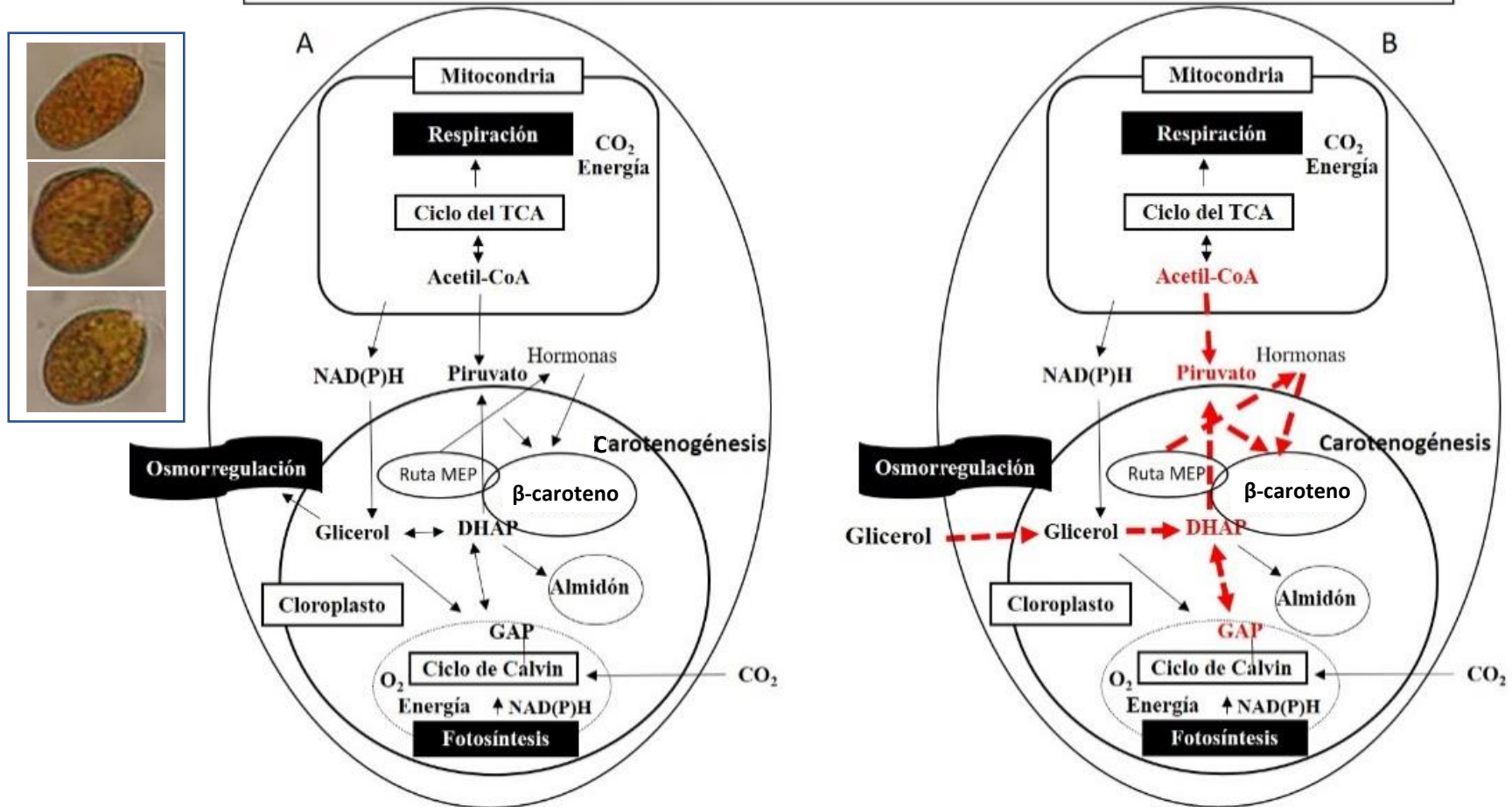


Figura 36. Diagrama de la hipótesis del rol de la osmorregulación y nutrición de *D. salina* bajo estrés lumínico (50 a $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) usando glicerol adicionado al medio (B) comparado al glicerol natural del medio inorgánico (A). Microfotografías extraídas de Borovkov et al. (2019).

La mixotofía puede ayudar a las microalgas a producir metabolitos fotoprotectores como los carotenoides y β -caroteno inducidos por luz tal como ocurre en condiciones fotoautotróficas (Castillo et al., 2021). Varios factores ambientales pueden influir en la disponibilidad de precursores metabólicos dado que alteran la expresión de varios genes de las rutas MEP y de los carotenoides bajo condiciones mixotróficas (Cazzonelli y Pogson, 2010). La salinidad e intensidad de luz aunado a la nutrición con carbono orgánico son los factores más importantes para modificar y optimizar el proceso de síntesis intermediarios y producción de β -caroteno en *D. salina* bajo los sistemas de cultivo mixotrófico (Herrero et al., 2012; Pourkarimi et al., 2020). Especialmente, la luz juega un rol clave en la biosíntesis de carotenoides, a través de la detección de señales de luz y la regulación transcripcional, que estimulan la sobreproducción de β -caroteno en *D. salina*, en respuesta al estrés lumínico (Wang et al., 2022). Otros factores tales como: temperatura, salinidad, nutrientes y pH, necesitan ser estudiados en el contexto del metabolismo mixotrófico para conocer y mejorar los rendimientos algales y productividades de β -caroteno en esta microalga (Reshma et al., 2021).

En condiciones mixotróficas, las fuentes de carbono orgánico muchas veces reducen la fijación de carbono inorgánico por fotosíntesis, y bajo estas condiciones, hay un aumento de la tasa de crecimiento algal producido con un costo metabólico (respiración) que supera la ganancia energética de la fotosíntesis (Chavoshi y Shariati, 2019b). Cuando especies clorofitas como *Haematococcus pluvialis* son expuestas a alta intensidad de luz en mixotrofía, la fijación de carbono producida por la fotosíntesis es comprometida y menos carbono inorgánico es reducido; mientras que el carbono orgánico fijado decrece rápida y significativamente en las condiciones de estrés lumínico, trayendo consigo un aumento significativo en la relación de conversión de carbono fijado a astaxantina y otros carotenoides (Gu et al., 2014).

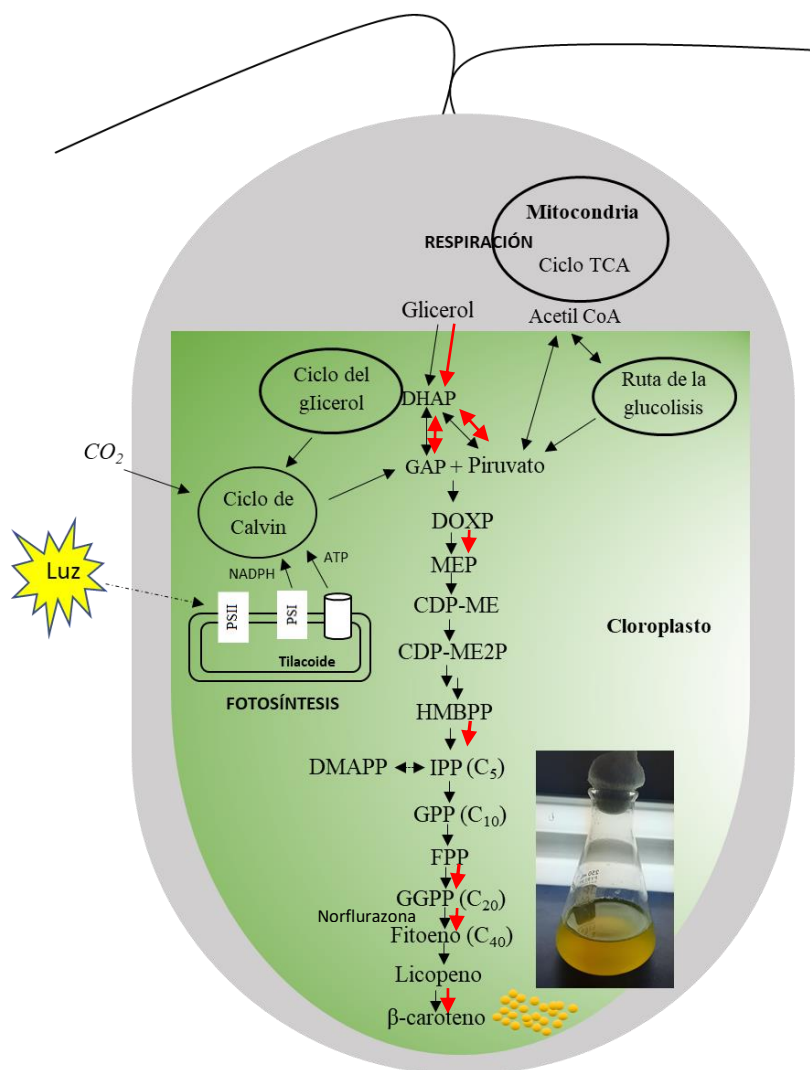


Figura 37. Diagrama propuesto de la asimilación de glicerol y su acoplamiento a rutas de biosíntesis de isoprenoides y carotenoides en *D. salina*. Líneas negras: metabolismo de carbono y síntesis constitutiva de carotenoides. Líneas rojas: sobreexpresión del metabolismo isoprenoides, síntesis de β-caroteno y carotenogenesis en mixotrofica con glicerol. DOXP: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato; MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; CDP-ME: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato; CDP-ME2P: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclopirofosfato; HMBPP: (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; GPP: geranyl difosfato; FPP: farnesil pirofosfato; GGPP: geranylgeranyl difosfato.

Capítulo 5. Conclusiones

- Los fotosistemas de *D. salina* están capacitados para elegir otras opciones que la fotoautotrofia obligada, entre las cuales se destaca la mixotrofia facultativa caracterizada por un alto crecimiento en carbono orgánico de manera simultánea con la fijación de carbono inorgánico en presencia de luz y un crecimiento celular escaso en oscuridad (heterotrofia).
- Las células de *D. salina* cuando son expuestas a altas concentraciones de sustratos orgánicos de carbono (e. g., glucosa, acetato y glicerol) pueden presentar una serie de cambios que van desde su morfología, la excreción de sustancias poliméricas hasta la acumulación masiva de almidón comparado a los cultivos fotoautotróficos usados como controles.
- De las relaciones C/N ensayadas (7/1, 10/1, 20/1, 30/1 y 40/1), se encontró que la relación C/N de 20/1 es la que mejor promueve el crecimiento algal y los pigmentos (clorofilas *a* y *b* y β -caroteno) de las células algales que son afectados por la mayoría de los sustratos orgánicos comparado a los cultivos fotoautotróficos y teniendo en cuenta que es la primera vez que se reporta un trabajo sobre relaciones C/N usando carbono orgánico en esta especie.
- La evaluación de los sustratos orgánicos de carbono (glucosa, acetato, glicerol, sacarosa y xilosa) con la mejor relación C/N (20/1), demostró que la glucosa, sacarosa y xilosa estimularon bajos crecimientos y pigmentos celulares en *D. salina*.
- En esta relación C/N (20/1), el acetato favoreció los mayores crecimientos celulares y bajos niveles de pigmentos; mientras que el glicerol estimuló rendimientos algales intermedios y particularmente, aumentó la síntesis masiva de β -caroteno y favoreció la autorregulación del pH de cultivo en esta alga.
- En las condiciones experimentales usadas, el modelo Baranyi-Roberts es el que mejor describió el crecimiento de *D. salina* en mixotrofia con los sustratos orgánicos ensayados.
- Se ha demostrado que esta microalga posee la capacidad fisio-metabólica y productiva para asimilar sustratos orgánicos de carbono altamente reducidos y con elevada solubilidad como el glicerol. Esta molécula con ramificación compleja a rutas del carbono inorgánico y orgánico es el mejor candidato para producción de biomasa y carotenoides, (β -caroteno) de *D. salina* bajo mixotrofia fotosintética.
- Frente a la escasa información disponible sobre la manipulación adecuada de las condiciones mixotróficas de cultivo para producción de *D. salina*, en este trabajo se ha encontrado que las condiciones optimizadas: bajo nivel de sustrato (12.5 mM de glicerol), luz intermedia (50 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e hipersalinidad (3.0 M NaCl), favorecen un mayor consumo de glicerol por las células algales, destinado a capitalizar más energía y carbono para el mejoramiento del crecimiento y la acumulación de β -caroteno.
- La combinación de 12.5 mM de glicerol, 3.0 M NaCl de salinidad y el incremento de intensidad de luz (50 a 300 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) causó la acumulación masiva de β -caroteno (30 pg célula⁻¹) en esta microalga.

- La dinámica de consumo del glicerol nativo del medio por las células algales sigue una tendencia lineal, mientras que el consumo del glicerol agregado al medio por parte de las células sigue un comportamiento exponencial. Esto demuestra una gran capacidad de asimilación de este sustrato por *D. salina* inducida por las condiciones de salinidad e iluminación proporcionadas en el cultivo mixotrófico fotosintético.
- Los análisis bioquímicos realizados en los experimentos de mixotrofia en *D. salina* demuestran que la asimilación del glicerol probablemente está destinada al metabolismo central de carbono y de carotenoides para la obtención de energía, biomasa y síntesis de β -caroteno más que productos de reserva como almidón y lípidos comparado a otros sustratos como glucosa y acetato.
- La asimilación de glicerol por la microalga *D. salina* en mixotrofia fotosintética es particular por el abastecimiento diversificado de moléculas GAP, DHAP y piruvato dentro de los metabolismos fotosintético (ciclo de Calvin) y respiratorio (acetil CoA y ciclo TCA) que están actuando simultáneamente en esta microalga.
- En un futuro cercano, el sistema de producción mixotrófica fotosintética de *D. salina* propuesto podría evaluarse y escalarse a mayores volúmenes de cultivo a fin de transferir y adaptar las cepas algales, los sustratos (glicerol) y los factores ambientales (salinidad e iluminación) de las condiciones de laboratorio a la producción masiva de gran escala, en periodos de tiempo mayores, con el consecuente mantenimiento o mejoramiento de los rendimientos y productividades algales.

Literatura citada

- Abiusi, F., Wijffels, R. H., Janssen, M. 2020a. Oxygen Balanced Mixotrophy under Day-Night Cycles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8 (31), 11682-11691. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03216>.
- Abiusi, F., Wijffels, R. H., Janssen, M. 2020b. Doubling of microalgae productivity by oxygen balanced mixotrophy. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8 (15), 6065-6074. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00990>.
- Ahmed, R. A., He, M., Aftab, R. A., Zheng, S., Nagi, M., Bakri, R., Wang, C. 2017. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports*, 7, 8118. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07540-x>.
- Ahuja, S., Roy, A., Kumar, L., Bharadvaja, N. 2020. Media optimization using Box Behnken design for enhanced production of biomass, beta-carotene and lipid from *Dunaliella salina*. *Vegetos*, 33, 31-39. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00079-4>.
- Alkhamis, Y., Qin, J. G. 2013. Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions. *BioMed Research International*, 2013, 983465. <https://doi.org/10.1155/2013/983465>.
- Almazán-Becerril, A., García-Mendoza, E. 2008. Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific of Mexico: a nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas*, 34(1), 29-43. <https://doi.org/10.7773/cm.v34i1.1151>.
- Alqadi, M. A., Taib, S. M., Din, M. F., Kamyab, H. 2017. Effect of photoperiod on the growth of *Chlamydomonas incerta* and pollutant removal. *Malaysian Journal of Civil Engineering*, 29(1), 69-78. <https://doi.org/10.11113/mjce.v29.15683>.
- Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., Yuepeng, S. 2018. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25, 1-22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>.
- Ananthi, V., Raja, R., Carvalho, I. S., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A., Arun, A. 2021. A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. *Fuel*, 284, 118965. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118965>.
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Dolganyuk, V., Michaud, P., Ivanova, S. 2021. Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content. *Marine drugs*, 19(7), 381. <https://doi.org/10.3390/md19070381>.
- Arcott, S. 2013. Food sources of carotenoids. En: Tanumihardjo, S. A. (Ed.), *Carotenoids and human health*. Humana Press, New York. pp. 3-19.
- Atkinson, D. E. 1977. *Cellular energy metabolism and its regulation*. Academic Press, New York.
- Avron, M. 1992. Osmoregulation. En: Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. pp 135-164.

- Baldisserotto, C., Sabia, A., Guerrini, A., Demaria, S., Maglie, M., Ferroni, L., Pancaldi, S. 2021. Mixotrophic cultivation of *Thalassiosira pseudonana* with pure and crude glycerol: Impact on lipid profile. *Algal Research*, 54, 102194. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102194>.
- Ball, S. G., Van de Wal, M., Visse, R. 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in plant science*, 3(12), 462-467. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01342-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01342-9).
- Barros, A. C., Gonçalves, A. L., Simões, M. 2019. Microalgal/cyanobacterial biofilm formation on selected surfaces: the effects of surface physicochemical properties and culture media composition. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 375-387. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1582-3>.
- Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P. 2008. The world of algae. En: Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (Eds.), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Springer, Pisa. pp. 1-15.
- Basheer, S., Huo, S., Zhu, F., Qian, J., Xu, L., Cui, F., Zou, B. 2020. Microalgae in Human Health and Medicine. En: Alam, M. A., Xu, J. L., Wang, Z. (Eds.), *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer Nature, Singapore. pp. 149-174.
- Bashir, K. M., Mansoor, S., Kim, N. R., Grohmann, F. R., Shah, A. A., Cho, M. G. 2019. Effect of organic carbon sources and environmental factors on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Annals of Microbiology*, 69, 353-368. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1423-2>.
- Beardall, J., Raven, J. A. 2016. Carbon Acquisition by Microalgae. En: Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 89-99.
- Beck, A. E., Bernstein, H. C., Carlson, R. P. 2017. Stoichiometric Network Analysis of Cyanobacterial Acclimation to Photosynthesis-Associated Stresses Identifies Heterotrophic Niches. *Processes*, 5, 32. <https://doi.org/10.3390/pr5020032>.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Great Britain.
- Ben-Amotz, A. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products. Major industrial species: *Dunaliella*. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, Great Britain. pp. 273-280.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. 1992. β -carotene biosynthesis. En: Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. pp. 205-216.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: Cresswell, R. C., Rees, T. A., Shah, N. (Eds.), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific and Technical Press, Harlow. pp. 91-114.
- Ben-Amotz, A., Gressel, J., Avron, M. 1987. Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology*, 23(1), 176-181. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1987.00176.x>.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72, 593-597. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.593>.

- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., Falkowski, P. G. 1989. Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25, 70-78. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x>.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K. C. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy* 88, 3425-3431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064>.
- Bindea, M., Rusu, B., Rusu, A., Trif, M., Leopold, L. F., Dulf, F., Vodnar, D. C. 2018. Valorification of crude glycerol for pure fractions of docosahexaenoic acid and β -carotene production by using *Schizochytrium limacinum* and *Blakeslea trispora*. *Microbial Cell Factories*, 17, 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0945-4>.
- 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. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Bogacz-Radomska, L., Harasym, J. 2018. β -Carotene-properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2, 69-74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>.
- Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Mayzaud, P., Bernard, O., Sciandra, A. 2017. Coupling and uncoupling of triglyceride and beta-carotene production by *Dunaliella salina* under nitrogen limitation and starvation. *Biotechnology for biofuels*, 10, 25. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0713-4>.
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Memetshaeva, O. A., Avsiyan, A. L., Lelekov, A. S., Movikova, T. M. 2019. Morphological and Morphometrical Features in *Dunaliella salina* (Chlamydomonadales, Dunaliellaceae) During the Two-phase Cultivation Mode. *Ecologica Montenegrina*, 22, 157-165. <https://doi.org/10.37828/em.2019.22.12>.
- Borowitzka, M. A. 2016. Algal physiology and large-scale outdoor cultures of microalgae. En: Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 601-652.
- Borowitzka, M. A. 2013. *Dunaliella*: Biology, Production, and Markets. En: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons, Chichester. pp. 359-368.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., Kessly, D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2, 111-119. <https://doi.org/10.1007/BF00023372>.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. 1988. *Dunaliella*. En: Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 27-58.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brányiková, I., Marsálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bisová, K., Zachleder, V., Vítová, M. 2011. Microalgae- Novel Highly Efficient Starch Producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766-776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>.

- Brennan, L., Mostaert, A., Murphy, C., Owende, P. 2012. Phytochemicals from algae. En: Bergeron, C., Carrier, D. J., Ramaswamy, S. (Eds.), Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 199-240.
- Capa, W. 2010. Biología y Biotecnología de Microalgas. CONCYTEC Editor, Chimbote (Perú).
- Capa-Robles, W., Paniagua-Michel, J., Olmos Soto, J. 2009. The biosynthesis and accumulation of β -carotene in *Dunaliella salina* proceed via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. Natural Product Research, 23(11), 1021-1028. <https://doi.org/10.1080/14786410802689689>.
- Caspy, I., Fadeeva, M., Mazor, Y., Nelson, N. 2021. Structure of *Dunaliella* Photosystem II reveals conformational flexibility of stacked and unstacked supercomplexes. BioRxiv, 470333. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.470333>.
- Caspy, I., Malavath, T., Klaiman, D., Fadeeva, M., Shkolnisky, Y., Nelson, N. 2020. Structure and energy transfer pathways of the *Dunaliella salina* photosystem I supercomplex. Biochimica et biophysica acta - Bioenergetics, 1861(10), 148253. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148253>.
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., Galindo, E. 2021. Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. Biochemical Engineering Journal, 176, 108183. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108183>.
- Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends in Plant Science, 15(5), 1360-1385. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>.
- Cecchin, M., Benfatto, B., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M., Ballottari, M. 2018. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. Scientific Reports, 8, 6465. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24979-8>.
- Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M., Ferreira-Camargo, L., Singh, A., Monteiro de Carvalho, J. C. 2019. Potential of microalgae carotenoids for industrial application. Applied Biochemistry and Biotechnology, 188, 602-634. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-02945-4>.
- Chagas, A. L., Rios, A. O., Jarenkow, A., Marcílio, N. R., Ayub, M. A., Rech, R. 2015. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. Process Biochemistry, 50(6), 981-988. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.012>.
- Chaiyaso, T., Manowattana, A. 2018. Enhancement of carotenoids and lipids production by oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 48(1), 13-23. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1381620>.
- Chalima, A., Oliver, L., Fernández de Castro, L., Karnaouri, A., Dietrich, T., Topakas, A. 2017. Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds. Fermentation, 3(4), 54. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>.
- Chambi Rodriguez, A. D., Torres Jiménez, A. M. 2021. Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. Revista de Investigaciones Altoandinas, 23(1), 47-54. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2021.213>.
- Chandra, R., Arora, S., Rohit, M. V., Venkata Mohan, S. 2015. Lipid metabolism in response to individual short chain fatty acids during mixotrophic mode of microalgal cultivation: Influence on biodiesel

- saturation and protein profile. *Bioresource technology*, 188, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.088>.
- Chauton, M. S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O., Bones, A. M. 2013. Gene Regulation of Carbon Fixation, Storage, and Utilization in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Acclimated to Light/Dark Cycles. *Plant Physiology*, 161(2), 1034-1048. <https://doi.org/10.1104/pp.112.206177>.
- Chavoshi, Z. Z., Shariati, M. 2019a. Lipid production in *Dunaliella salina* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *Biologia*, 74, 1579-1590. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00336-6>.
- Chavoshi, Z. Z., Shariati, M. 2019b. Lipid production in *Dunaliella bardawil* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Brazilian Journal of Oceanography*, 67, e19249. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592019024906709>.
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J., Ling, T. C. 2018. Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. *Energy Conversion and Management*, 164, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.02.094>.
- Cheirsilp, B., Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>.
- Chen, T., Liu, J., Guo, B., Ma, X., Sun, P., Liu, B., Chen, F. 2015. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*. *Scientific Reports*, 5, 14936. <https://doi.org/10.1038/srep14936>.
- Chen, H., Jiang, J. 2009a. Osmotic Responses of *Dunaliella* to the Changes of Salinity. *Journal of Cellular Physiology*, 219, 251-258. <https://doi.org/10.1002/jcp.21715>.
- Chen, H., Jiang, J., Wu, G. 2009b. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of Glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6178-6182. <https://doi.org/10.1021/jf900447r>.
- Chen, F., Johns, M. R. 1994. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochemistry*, 29(4), 245-252. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80064-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80064-2).
- Choi, H. J., Lee, S. 2015. Biomass and oil content of microalgae under mixotrophic conditions. *Environmental Engineering Research*, 20(1), 25-32. <https://doi.org/10.4491/eer.2014.043>.
- Cifuentes, A. S., Gonzalez, M., Conejeros, M., Dellarossa, V., Parra, O. 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *Journal of Applied Phycology*, 4, 111-118. <https://doi.org/10.1007/BF02442459>.
- Clomburg, J. M., Gonzalez, R. 2013. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.006>.
- Collos, Y., Berges, J. A. 2002. Nitrogen metabolism in phytoplankton. EOLSS Publishers (UNESCO). *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Consultado el 07 de enero de 2022, de <http://www.eolss.net/sample-chapters/c09/E2-27-03-03.pdf>.
- Craigie, J., McLachlan, J. 1964. Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Canadian Journal of Botany*, 42(6), 777-778. <https://doi.org/10.1139/b64-068>.

- Cuaresma, M., Casal, C., Forján, E., Vílchez, C. 2011. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 167-177. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0841-3>.
- Daneshvar, E., Ok, Y. S., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., Bhatnagar, A. 2021. Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>.
- Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., Pick, U. 2015. Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic β -carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 167(1), 60-79. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248450>.
- Davidi, L., Shimoni, E., Khozin-Goldberg, I., Zamir, A., Pick, U. 2014. Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 164(4), 2139-56. <https://doi.org/10.1104/pp.113.235119>.
- de Freitas, B., Brächer, E. H., de Morais, E. G., Atala, D., de Morais, M. G., Costa, J. 2019. Cultivation of different microalgae with pentose as carbon source and the effects on the carbohydrate content. *Environmental technology*, 40(8), 1062-1070. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1417491>.
- Deng, X. Y., Xue, C. Y., Chen, B., Amoah, P. K., Li, D., Hu, H. L., Gao, K. 2019. Glucose addition-induced changes in the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella kessleri*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(4), 1202-1209. <https://doi.org/10.1002/jctb.5870>.
- Devi, M., Swamy, Y., Venkata Mohan, S. 2013. Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. *Bioresource Technology*, 142, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.001>.
- Díaz, J. P., Inostroza, C., Acién, F. G. 2021. Scale-up of a Fibonacci-Type Photobioreactor for the Production of *Dunaliella salina*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 188-204. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03410-x>.
- D'Imporzano, G., Salati, S., Varonesi, D., Scaglia, B., Adani, F. 2017. Microalgae Mixotrophic Growth: Opportunity for Stream Depuration and Carbon Recovery. En: Tripathi, B. N., Kumar, D. (Eds.), *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology*. Springer Nature, Singapore. pp. 141-177.
- Ding, Z., Zhang, Z., Zhong, J, Luo, D., Zhou, J., Yang, J., Xiao, L., Shu, D., Tan, H. 2016. Comparative transcriptome analysis between an evolved abscisic acid-overproducing mutant *Botrytis cinerea* TBC-A and its ancestral strain *Botrytis cinerea* TBC-6. *Scientific Reports*, 6, 7487. <https://doi.org/10.1038/srep37487>.
- Du, H., Ahmed, F., Lin, B., Li, Z., Huang, Y., Sun, G., Ding, H., Wang, C., Meng, C., 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, 1696. <https://doi.org/10.3390/en10111696>.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

- Eiler, A. 2006. Evidence for the Ubiquity of Mixotrophic Bacteria in the Upper Ocean: Implications and Consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7431-7437. <https://doi.org/10.1128/AEM.01559-06>.
- Ejike, E. C. C., Collins, S. A., Balasuriya, N., Swanson, A. K., Mason, B., Udenigwe, C. C. 2017. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.026>.
- Elleuch, F., Hlima, H. B., Barkallah, M., Baril, P., Abdelkafi, S., Pichon, C., Fendri, I. 2019. Carotenoids Overproduction in *Dunaliella* Sp.: Transcriptional Changes and New Insights through Lycopene β Cyclase Regulation. *Applied Sciences*, 9, 5389. <https://doi.org/10.3390/app9245389>.
- Esser, D. S., Leveau, J. H. and Meyer, K. M. (2015). Modeling microbial growth and dynamics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8831-8846. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6877-6>.
- Estévez-Landazábal, L. L., Barajas-Solano, A. F., Barajas-Ferreira, C., Kafaro, V. 2013. Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(2), 113-126. <https://doi.org/10.29047/issn.0122-5383>.
- Fachet, M., Witte, C., Flassig, R. J., Rihko-Struckmann, L. K., McKie-Krisberg, Z., Polle, J. E., Sundmacher, K. 2020. Reconstruction and analysis of a carbon-core metabolic network for *Dunaliella salina*. *BMC Bioinformatics*, 21, 1. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3325-0>.
- Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C. and Smaoui, A. (2011). Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 47, 1072-1077. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>.
- Fast, A. G., Schmidt, E. D., Jones, S. W., Tracy, B. P. 2015. Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.014>.
- Firmin, A., Selosse, M. A., Dunand, C., Elger, A. 2021. Mixotrophy in aquatic plants, an overlooked ability. *Trends in Plant Science*, S1360-1385(21)00242-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.011>.
- Gallego-Cartagena, E., Castillo-Ramírez, M., Martínez-Burgos, W. 2019. Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1325-1330. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.07.010>.
- Gim, G., Ryu, J., Kim, M., Kim, P., Kim, S. 2016. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 605-16. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1741-y>.
- Gimmler, H., Hartung, W. 1988. Low permeability of the plasma membrane of *Dunaliella parva* for solutes. *Journal of Plant Physiology*, 133, 165-172. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80132-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80132-9).
- Ginzburg, M., 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. En: Callow, J. A. (Ed.), *Advances in Botanical Research* Vol. 14. Academic Press, San Diego. pp. 93-183.

- Gómez, P. I., González, M. A. 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2-3), 151-162. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>.
- Gonabadi, E., Samadlouie, H. R., Zenoozian, M. S. 2021. Optimization of culture conditions for enhanced *Dunaliella salina* productions in mixotrophic culture. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-9, Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1922917>.
- Gopinathan, K. P. 2011. Microbiology: Opening doors to the diversity of the life sciences. En: Burma, D. P., Chakravorty, M. (Eds.), *From Physiology and Chemistry to Biochemistry*. Pearson Longman, India. pp. 229-266.
- Goyal, S., Hernández, N. B., Cochran, E. W. 2021. An update on the future prospects of glycerol polymers. *Polymer International*, 70(7), 911-917. <https://doi.org/10.1002/pi.6209>.
- Grama, B. S., Agathos, S. N., Jeffryes, C. S. 2016. Balancing photosynthesis and respiration increase microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1611-1618. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01544>.
- Griffiths, M. J., Dicks, R. G., Richardson, C., Harrison, S. 2011. Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel. En: InTech (Ed.), *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*. <https://doi.org/10.5772/30085>.
- Grobbelaar, J. 2013. Inorganic Algal Nutrition. En: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons, Chichester. pp. 123-133.
- Gu, W., Li, H., Zhao, P., Yu, R., Pan, G., Gao, S., Xie, X., Huang, A., He, L., Wang, G. 2014. Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies. *Scientific Reports*, 4, 6661. <https://doi.org/10.1038/srep06661>.
- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L., Vásquez, A., Rosales, N. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 331-337. <https://doi.org/10.15517/RBT.V53I3-4.14593>.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. En: Stein, J. R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 289-313.
- Guo, J. Y., Hu, K. L., Bi, C., Li, Q., Zhang, X. 2018. Construction of an alternative glycerol-utilization pathway for improved β -carotene production in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45, 697-705. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2045-1>.
- Gupta, S., Pawar, S. B. 2019. Strategic mixed substrate cultivation of microalgae: productivity, respiration, yield, and lipid quality. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1573-1588. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1688-7>.
- Hammed, A. M., Prajapati, S. K., Simsek, S., Simsek, H. 2016. Growth regime and environmental remediation of microalgae. *Algae*, 31(3), 189-204. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.28>.

- Han, D., Li, Y., Hu, Q. 2013. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*, 28(2), 131-147. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.131>.
- Hard, B., Gilmour, D. J. 1996. The uptake of organic compounds by *Dunaliella parva* CCAP 19/9. *European Journal of Phycology*, 31(3), 217-224. <https://doi.org/10.1080/09670269600651411>.
- He, Q., Lin, Y., Tan, H., Zhou, Y., Wen, Y., Gan, J., Li, R., Zhang, Q. 2020. Transcriptomic profiles of *Dunaliella salina* in response to hypersaline stress. *BMC Genomics*, 21, 115. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6507-2>.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B. 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1978-1995. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8974-4>.
- Herrero, C., Orosa, M., Abalde, J., Rioboo, C., Cid, A. 2012. Astaxanthin Production in Cysts and Vegetative Cells of the Microalga *Haematococcus Pluvialis* Flotow. En: Johnsen, M. N. (Ed.), *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. Nova Science Publishers, New York. pp. 359-371.
- Hu, H., Ma, L., Shen, X., Li, Wang, H., Zeng, R. J. 2018. Effect of cultivation mode on the production of docosaheptaenoic acid by *Tisochrysis lutea*. *AMB Express*, 8, 50. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0580-9>.
- Huang, L., Xing, X., Zhou, P., Puma, G. L. 2021. Mixotrophic bacteria for environmental detoxification of contaminated waste and wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 6627-6648. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11514-5>.
- ITIS (Interagency Taxonomic Information System). 2021. *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco. Consultado el 12 de agosto del 2021, de https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=5421#null.
- Imamoglu, E., Demirel, Z., Dalay, M. C. 2014. Evaluation of culture conditions of locally isolated *Dunaliella salina* strain EgeMacc-024. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 22-7. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.008>.
- Jayawardena, R., Sooriyaarachchi, P., Chourdakis, M., Jeewandara, C., Ranasinghe, P. 2020. Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14, 367-382. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.015>.
- Jin, E. S., Yokthongwattana, K., Polle, J. E., Melis, A. 2003. Role of the Reversible Xanthophyll Cycle in the Photosystem II Damage and Repair Cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 132(1), 352-364. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019620>.
- Johnson, X., Alric, J. 2012. Interaction between Starch Breakdown, Acetate Assimilation, and Photosynthetic Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26445-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.370205>.
- Jones, S. W., Fast, A. G., Carlson, E. D., Wiedel, C. A., Au, J., Antoniewicz, M. R., Papoutsakis, E. T., Tracy, B. P. 2016. CO₂ fixation by anaerobic non-photosynthetic mixotrophy for improved carbon conversion. *Nature Communications*, 7, 12800. <https://doi.org/10.1038/ncomms12800>.
- Kasahara, H. 2016. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 34-42. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1086259>.

- Kadkhodaei, S., Abbasiliasi, S., Shun, T., Fard-Masoumi, H., Mohamed, M., Movahedi, A., Rahim, R., Ariff, A. 2015. Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic condition using response surface methodology. *RSC Advances*, 5, 38141-38151. <https://doi.org/10.1039/C5RA04546K>.
- Kaplan, A., Schreiber, U., Avron, M. 1980. Salt-induced metabolic changes in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 65, 810-813. <https://doi.org/10.1104/pp.65.5.810>.
- Katz, A., Jiménez, C., Pick, U. 1995. Isolation and Characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 108(4), 1657-1664. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1657>.
- Keerthi, S., Koduru, U., Sarma, N. 2015. A nutrient medium for development of cell dense inoculum in mixotrophic mode to seed mass culture units of *Dunaliella salina*. *Algological studies*, 147, 7-28. https://doi.org/10.1127/algol_stud/2014/0177.
- Kenny, P., Flynn, K. J. 2017. Physiology limits commercially viable photoautotrophic production of microalgal biofuels. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 2713-2727. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1214-3>.
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17, 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- Kim, H. S., Park, W. K., Lee, B., Seon, G., Suh, W. I., Moon, M., Chang, Y. K. 2019. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. HS2 using screening, statistical assessment, and validation. *Scientific Reports*, 9, 19383. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55854-9>.
- Kim, G., Heo, J., Kim, H., Han, J. 2017. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource Technology*, 237, 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.009>.
- Kim, S., Schlicke, H., Van Ree, K., Karvonen, K., Subramaniam, A., Richter, A., Grimm, B., Braam, J. 2013. *Arabidopsis* Chlorophyll Biosynthesis: An Essential Balance between the Methylerythritol Phosphate and Tetrapyrrole Pathways. *The Plant Cell*, 25, 4984-4993. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119172>.
- Kleinegris, D. M. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A., Wijffels, R. H. 2011. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.005>.
- Kocharin, K., Nielsen, J. 2013. Specific growth rate and substrate dependent polyhydroxybutyrate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 3(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-18>.
- Kumar, S. S., Saramma, A. V. 2017. Effect of Organic Carbon Compounds on the Growth and Pigment Composition of Microalga - *Nannochloropsis salina*. *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 12(9), 1707-1719. Recuperado el 20 de enero de 2022, de https://www.researchgate.net/publication/324089887_Effect_of_Organic_Carbon_Compounds_on_the_Growth_and_Pigment_Composition_of_Microalga-Nannochloropsis_salina.

- Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H. W., Huang, C. Y., Chang, J. S. 2021. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans - Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271, 129800. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800>.
- Kuyper, K., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S., de Laat, W., den Ridder, J. J., Op den Camp, H. J., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. 2003. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. *FEMS Yeast Research*, 4, 69-78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7).
- Lacroux, J, Seira, J, Trably, E, Bernet, N., Steyer, J. P., Van Lis, R. 2021. Mixotrophic Growth of *Chlorella sorokiniana* on Acetate and Butyrate: Interplay Between Substrate, C:N Ratio and pH. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703614>.
- Lee, R. 2008. *Phycology*. (4th ed.) Cambridge University Press, New York.
- Lee, Y. K. 2004. Algal Nutrition: Heterotrophic Carbon Nutrition. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, Great Britain. pp. 116-124.
- Lehmuskero, A., Chauton, M. S., Boström, T. 2018. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168, 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.
- Li, Y., Li, L., Liu, J. Qin, R. 2020. Light absorption and growth response of *Dunaliella* under different light qualities. *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1041-1052. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02057-9>.
- Liang, M. H., Xue, L. L., Jiang, J. G. 2019. Two-Stage Cultivation of *Dunaliella tertiolecta* with Glycerol and Triethylamine for Lipid Accumulation: A Viable Way to Alleviate the Inhibitory Effect of Triethylamine on Biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(4), e02614-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02614-18>.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>.
- Lin, H., Fang, L., Low, C. S., Chow, Y., Lee, Y. K. 2013. Occurrence of glycerol uptake in *Dunaliella tertiolecta* under hyperosmotic stress. *The FEBS Journal*, 280, 1064-1072. <https://doi.org/10.1111/febs.12100>.
- Liu, N., Guo, B., Cao, Y., Wang, H., Yang, S., Huo, H., Kong, W., Zhang, A., Niu, S. 2021. Effects of organic carbon sources on the biomass and lipid production by the novel microalga *Micractinium reisseri* FM1 under batch and fed-batch cultivation. *South African Journal of Botany*, 139, 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.028>.
- Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 21, 239-246. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9355-z>.
- Liu, X. D., Shen, Y. G. 2006. Salt shock induces state II transition of the photosynthetic apparatus in dark-adapted *Dunaliella salina* cells. *Environmental and Experimental Botany*, 57(1-2), 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.04.001>.

- Liu, X. D., Shen, Y. G. 2004. NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, *Dunaliella salina*. *FEBS Letters*, 569, 337-340. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.065>.
- Lou, S., Zhu, X., Zeng, Z., Wang, H., Jia, B., Li, H., Hu, Z. 2020. Identification of microRNAs response to high light and salinity that involved in beta-carotene accumulation in microalga *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 48, 101925. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101925>.
- Lu, L., Wang, J., Yang, G., Zhu, B. 2017. Biomass and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* under mixotrophic culture conditions with various C:N ratios. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(2), 303-312. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5299-3>.
- Lv, H., Kim, M., Park, S., Baek, K., Oh, H., Polle, J. E., Jin, E. 2021. Comparative transcriptome analysis of short-term responses to salt and glycerol hyperosmotic stress in the green alga *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 53, 102147. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102147>.
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., Jia, S. 2016. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS One*, 11(3), e0152226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226>.
- Marchello, A. E., Dos Santos, A. C., Lombardi, A. T., Oliveira de Souza, C. W., Montanhim, G. C. 2018. Physiological and ecological aspects of *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *Microbial Ecology*, 76, 791-800. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1170-8>.
- Marella, T. K., Bhattacharjya, R., Tiwari, A. 2021. Impact of organic carbon acquisition on growth and functional biomolecule production in diatoms. *Microbial Cell Factories*, 20, 135. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01627-x>.
- Martínez, F., Orús, M. 1991. Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 101. *Plant Physiology*, 95(4), 1150-5. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1150>.
- Maru, B. T., Munasinghe, P. C., Gilary, H., Jones, S. W., Tracy, B. P. 2018. Fixation of CO₂ and CO on a diverse range of carbohydrates using anaerobic, non-photosynthetic mixotrophy. *FEMS Microbiology Letters*, 365(8), 8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny039>.
- Matantseva, O. V., Skarlato, S. O. 2013. Mixotrophy in Microorganisms: Ecological and Cytophysiological Aspects. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(4), 377-388. <https://doi.org/10.1134/S0022093013040014>.
- Mehariya, S., Goswami, R. K., Karthikeyan, O. P., Verma, P. 2021. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere*, 280, 130553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130553>.
- Mendoza, H., Martel, A., Jiménez del Río, M., García Reina G. 1999. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 11, 15-19. <https://doi.org/10.1023/A:1008014332067>.
- Mohamed, M. S., Shun, T. J., Kadkhodaei, S., Mohamad, R. 2014. Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp. FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.002>.

- Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A., Legrand, J. 2008. Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.009>.
- Molino, A., Mehariya, S., Di Sanzo, G., Larocca, V., Martino, M., Leone, G. P., Marino, T., Chianese, S., Balducchi, R., Musmarra, D. 2020. Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization*, 36, 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.11.014>.
- Monte, J., Ribeiro, C., Parreira, C., Costa, L., Brive, L., Casal, S., Brazinha, C., Crespo, J. G. 2020. Biorefinery of *Dunaliella salina*: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol. *Bioresource Technology*, 297, 122509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122509>.
- Montgomery, D. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. LIMUSA Wiley, Mexico D.F.
- Morais, K. C., Conceição, D., Vargas, J. V., Mitchell, D. A., Mariano, A. B., Ordonez, Galli-Terasawa, L. V., Kava, V. M. 2021. Enhanced microalgae biomass and lipid output for increased biodiesel productivity. *Renewable Energy*, 163, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.082>.
- Moreno-Garcia, L., Gariépy, Y., Barnabé, S., Raghavana, G. S. 2019. Effect of environmental factors on the biomass and lipid production of microalgae grown in wastewaters. *Algal Research*, 41, 101521. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101521>.
- Moriyama, T., Mori, N., Sato, N. 2015. Activation of oxidative carbon metabolism by nutritional enrichment by photosynthesis and exogenous organic compounds in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: evidence for heterotrophic growth. *SpringerPlus*, 4, 559. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1365-0>.
- Morowvat, M., Ghasemi, Y. 2016. Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.008>.
- 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(8), 164-171. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60826>.
- Muradyan, E. A., Klyachko-Gurvich, G. L., Tsoglin, L. N., Sergeyenko, T. V., Pronina, N. A. 2004. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(1), 53-62. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000011303.11957.48>.
- Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., Gonzalez, R. 2008. Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1124-1135. <https://doi.org/10.1128/AEM.02192-07>.
- Naduthodi, M. I., Claassens, N. J., D'Adamo, S., van der Oost, J., Barbosa, M. J. 2021. Synthetic Biology Approaches To Enhance Microalgal Productivity. *Trends in Biotechnology*, 39(10), 1019-1036. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.12.010>.

- Nagarajan, D., Lee, D., Chen, C., Chang, J. 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology*, 302, 122817. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817>.
- Nagarajan, D., Lee, D., Chang, J. 2018. Heterotrophic Microalgal Cultivation. En: Liao, Q., Chang, J., Herrmann, C., Xia, A. (Eds.), *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion*. Springer Nature, Singapore. pp. 117-160.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2019. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega S. A., Mexico D.F.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N., Pogson, B. J. 2015. Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8, 68-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>.
- Noor, E., Eden, E., Milo, R., Alon, U. 2010. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Molecular Cell*, 39(5), 809-820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.031>.
- Oliveira, C. Y., D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R., Lopes, R. G., Derner, R. B. 2021. Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga *Choricystis minor* var. minor. *Science of the Total Environment*, 759, 143476. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143476>.
- Oren, A. 2014. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21, 23. <https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y>.
- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>.
- Padil, Putra, M. D., Nata, I. F., Wicakso, D. R., Zulfarina, Irawan, C., Amri, A. 2021. Prospective peat swamp water as growth medium for microalgal cultivation and kinetic study. *Alexandria Engineering Journal*, IF3.732. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.06.087>.
- Palsson, C., Granéli, W. 2004. Nutrient limitation of autotrophic and mixotrophic phytoplankton in a temperate and tropical humic lake gradient. *Journal of Plankton Research*, 26(9), 1005-1014. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh089>.
- Park, J. E., Zhang, S., Han, T. H., Hwang, S. J. 2021. The Contribution Ratio of Autotrophic and Heterotrophic Metabolism during a Mixotrophic Culture of *Chlorella sorokiniana*. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 18, 1353. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031353>.
- Pastore, M., Santaefemia, S., Bertucco, A., Sforza, E. 2018. Light intensity affects the mixotrophic carbon exploitation in *Chlorella protothecoides*: consequences on microalgae-bacteria based wastewater treatment. *Water Science & Technology*, 78(8), 1762-1771. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.462>.
- Patel, A. K., Singhanian, R. R., Sim, S. J., Di Dong, C. 2021. Recent advancements in mixotrophic bioprocessing for production of high value microalgal products. *Bioresource Technology*, 320, 124421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124421>.
- Patnaik, R., Mallick, N. 2020. Individual and combined supplementation of carbon sources for growth augmentation and enrichment of lipids in the green microalga *Tetradismus obliquus*. *Journal of Applied Phycology*, 32, 205-219. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01979-3>.

- Penhaul Smith, J. K., Hughes, A. D., McEvoy, L., Thornton, B., Day, J. G. 2021. The carbon partitioning of glucose and DIC in mixotrophic, heterotrophic and photoautotrophic cultures of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*, 43, 729-743. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03073-y>.
- Penhaul Smith, J. K., Hughes, A.D., McEvoy, L., Day, J. G. 2020. Tailoring of the biochemical profiles of microalgae by employing mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100321>.
- Perez-Boerema, A., Klaiman, D., Caspy, I., Netzer-El, S. Y., Amunts, A., Nelson, N. 2020. Structure of a minimal photosystem I from the green alga *Dunaliella salina*. *Nature plants*, 6(3), 321-327. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0611-9>.
- Pérez-García, O., Bashan, Y. 2015. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics. En: Prokop, A., Bajpai, R., Zappi, M. (Eds.), *Algal Biorefineries: Products and Refinery Design*. Springer International Publishing, Cham. pp. 61-131.
- Petrovic, U., Plemenitas, A. 2003. Determination of intra-and extracellular concentration of glycerol in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* grown at different environmental salinities. En: Wolf, K., Breunig, K., Barth, G. (Eds.), *Non-conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology*. Springer-Verlag, New York. pp. 127-130.
- Polle, J. E., Calhoun, S., McKie-Krisberg, Z., Prochnik, S., Neofotis, P., Yim, W. C., Hathwaik, L. T., Jenkins, J., Molina, H., Bunkenborg, J., Grigoriev, I. V., Barry, K., Schmutz, J., Jin, E., Cushman, J. C., Magnusson, J. K. 2020a. Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity. *Algal Research*, 50, 101990. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101990>.
- Polle, J. E., Roth, R., Ben-Amotz, A., Goodenough, U. 2020b. Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Algal Research*, 49, 101953. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101953>.
- Pourkarimi, S., Hallajisani, A., Alizadehdakhel, A., Nouralishahi, A., Golzary, A. 2020. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101771. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>.
- Praveen, K., Abinandan, S., Natarajan, R., Kavitha, M. S. 2018. Biochemical responses from biomass of isolated *Chlorella* sp., under different cultivation modes: non-linear modelling of growth kinetics. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(02), 489-496. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20170188>.
- Přibyl, P., Cepák, V. 2019. Screening for heterotrophy in microalgae of various taxonomic positions and potential of mixotrophy for production of high-value compounds. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1738-9>.
- Rahimi, M., Jazini, M. 2021. Mixotrophic cultivation of *Chromochloris zofingiensis* on glycerol, acetate, and vinasse. *Journal of Applied Phycology*, 33, 3579-3590. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02568-z>.
- Rai, M. P., Nigam, S., Sharma, R. 2013. Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. *Biomass and Bioenergy*, 58, 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.038>.

- Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., Attalage, R. A. 2019. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*, 277, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>.
- Reddy, C., Modestra, J., Kumar, A., Venkata-Mohan, S. 2015. Waste Remediation Integrating with Value Addition: Biorefinery Approach Towards Sustainable Bio-based Technologies. En: Kalia, V. C. (Ed.), *Microbial Factories: Biofuels, Waste treatment*. Springer, India. pp. 230-256.
- Reshma, R., Chitra Devi, K., Dinesh Kumar, S., Santhanam, P., Perumal, P., Krishnaveni, N., Begum, A., Pragnya, M., Arthikha, R., Dhanalakshmi, B., Mi-Kyung Kim. 2021. Enhancement of pigments production in the green microalga *Dunaliella salina* (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100672>.
- Roach, T., Krieger-Liszkay, A. 2014. Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Current protein & peptide science*, 15(4), 351-362. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327105143>.
- Rodríguez-Maroto, J. M., Jiménez, C., Aguilera, J., Niell, F. X. 2005. Air bubbling results in carbon loss during microalgal cultivation in bicarbonate-enriched media: experimental data and process modeling. *Aquacultural Engineering*, 32, 493-508. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.012>.
- Roels, J. A. 1980. Simple model for the energetics of growth on substrates with different degrees of reduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(1), 33-53. <https://doi.org/10.1002/bit.260220104>.
- Roth, M. S., Westcott, D. J., Iwai, M., Niyogi, K. K. 2019. Hexokinase is necessary for glucose-mediated photosynthesis repression and lipid accumulation in a green alga. *Communications Biology*, 2, 347. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0577-1>.
- Roy, U. K., Nielsen, B. V., Milledge, J. J. 2021. Antioxidant Production in *Dunaliella*. *Applied Sciences*, 11, 3959. <https://doi.org/10.3390/app11093959>.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- Saini, R. K., Keum, Y. S. 2019. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46, 657-674. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2104-7>.
- Schmidt, S., Raven, J. A., Paungfoo-Lonhienne, C. 2013. The mixotrophic nature of photosynthetic plants. *Functional Plant Biology*, 40(5), 425-438. <https://doi.org/10.1071/FP13061>.
- Selosse, M. A., Charpin, M., Not, F. 2017. Mixotrophy everywhere on land and in water: the *grand écart* hypothesis. *Ecology Letters*, 20(2), 246-263. <https://doi.org/10.1111/ele.12714>.
- Sforza, E., Pastore, M., Barbera, E., Bertucco, A. 2019. Respirometry as a tool to quantify kinetic parameters of microalgal mixotrophic growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 839-851. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02087-9>.

- Sharma, P., Kothari, S. L., Kachhwaha, S. 2015. Expression analysis of photosynthesis genes in *Dunaliella salina* grown at different NaCl concentrations. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3(6), 15-21. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3603>.
- Shetty, P., Gitau, M. M., Maróti, G. 2019. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. *Cells*, 8(12), 1657. <https://doi.org/10.3390/cells8121657>.
- Sohrabi, D., Jazini, M. H., Shariati, M. 2019. Mixotrophic cultivation of *Dunaliella salina* on crude glycerol obtained from calcinated fatty acid production process. *Russian Journal of Marine Biology*, 45(6), 470-480. <https://doi.org/10.1134/S1063074019060105>.
- Solovchenko, A., Minyuk, G. 2021. The physiology of astaxanthin production by carotenogenic microalgae. En: Ravishankar, G. A., Rao, A. R. (Eds.), *Global perspectives on Astaxanthin: from industrial production to food, health, and pharmaceutical applications*. Academic Press, London. pp. 19-35.
- Solymosi, D., Nikkanen, L., Muth-Pawlak, D., Fitzpatrick, D., Vasudevan, R., Howe, C. J., Lea-Smith, J., Allahverdiyeva, Y. 2020. Cytochrome cM Decreases Photosynthesis under Photomixotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 68031. *Plant Physiology*, 183, 700-716. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00284>.
- Song, M., Pei, H. 2018. The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. *Bioresource Technology*, 263, 525-531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.020>.
- Stames, E. M., O'Toole, J. F. 2013. Mitochondrial Aminopeptidase Deletion Increases Chronological Lifespan and Oxidative Stress Resistance while Decreasing Respiratory Metabolism in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 8(10), e77234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077234>.
- Stargrove, M. B., Treasure, J., McKee, D. L. 2008. *Herb, Nutrient, and Drug Interactions: Clinical Implications and Therapeutic Strategies*. Mosby Elsevier, London.
- Subramanian, G., Yadav, G., Sen, R. 2016. Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing carbon footprint of algal biorefinery: A techno-economic perspective. *RSC Advances*, 6, 72897-72904. <https://doi.org/10.1039/C6RA14611B>.
- Suarez, G., Romero, T., Borowitzka, M. 1999. Cultivo de *Dunaliella salina* en medio orgánico. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de Maracaibo*, 33(3), 211-225. Consultado el 4 de junio de 2020, de <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/bolcib/v33n3/articulo05.pdf>.
- Sun, H., Ren, Y., Mao, X., Li, X., Zhang, H., Lao, Y., Chen, F. 2020. Harnessing C/N balance of *Chromochloris zofingiensis* to overcome the potential conflict in microalgal production. *Communications Biology*, 3, 186. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0900-x>.
- Sun, H., Zao, W., Mao, X., Li, Y., Wu, T., Chen, F. 2018. High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 227. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1225-6>.
- Sun, Z., Li, T., Zhou, Z., Jiang, Y. 2016. Microalgae as a Source of Lutein: Chemistry, Biosynthesis, and Carotenogenesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 153, 37-58. https://doi.org/10.1007/10_2015_331.

- Sun, J., Li, H., Yuan, Q. 2012. Metabolic Regulation of Trisporic Acid on *Blakeslea trispora* Revealed by a GC-MS-Based Metabolomic Approach. PLOS ONE, 7(9), e46110.
- Sun, J., Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton Research, 25(11), 1331-1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>.
- Tafreshi, A. H., Shariati, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107, 14-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>.
- Taghavi, N., Robinson, G. 2016. Improving the optimum yield and growth of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and CW15 using various carbon sources and growth regimes. African Journal of Biotechnology, 15(23), 1083-1100. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14789>.
- Tan, K. W., Lee, Y. K. 2016. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. Biotechnology for biofuels, 9, 255. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0671-2>.
- Tang, T., Fadaei, H., Hu, Z. 2014. Rapid evaluation of algal and cyanobacterial activities through specific oxygen production rate measurement. Ecological Engineering, 73, 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.095>.
- Takeshita, T., Takeda, T., Ota, S., Yamazaki, T., Kawano, S. 2015. A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. Cytologia, 80(4), 475-481. <https://doi.org/10.1508/cytologia.80.475>.
- Tesitel, J., Tesitelova, T., Minasiewicz, J., Selosse, M. A. 2018. Mixotrophy in Land Plants: Why To Stay Green?. Trends in Plant Science, 23(8), 656-659. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.010>.
- Tuchman, N. 1996. The role of heterotrophy in algae. En: Stevenson, R., Bothwell, M., Lowe, R. (Eds.), Algal Ecology: Freshwater benthic ecosystems. Academic Press, San Diego. pp. 299-319.
- Van Heukelem, L., Thomas, C. S. 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. Journal of Chromatography A, 910(1), 31-49. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00603-4).
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., León, R. 2015. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. Photosynthesis research, 125(3), 423-436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>.
- Verduyn, C. 1991. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. Antonie Van Leeuwenhoek, 60(3-4), 325-53. <https://doi.org/10.1007/BF00430373>.
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S. R. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. Bioresource Technology, 129, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J., Oyler, G., Betenbaugh, M., Nie, Z, Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 835-844. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3399-8>.

- Wang, J., Wang, Y., Wu, Y., Fan, Y., Zhu, C., Fu, X., Chu, Y., Chen, F., Sun, H., Mou, H. 2022. Application of Microalgal Stress Responses in Industrial Microalgal Production Systems. *Marine Drugs*, 20, 30. <https://doi.org/10.3390/md20010030>.
- Wang, L., Liu, Z., Jiang, H., Mao, X. 2021. Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.077>.
- Wang, S. K., Wang, X., Tao, H. H., Sun, X. S., Tian, Y. T. 2018. Heterotrophic Culture of *Chlorella pyrenoidosa* Using Sucrose as the Sole Carbon Source by Co-culture with Immobilized Yeast. *Bioresource Technology*, 249, 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.049>.
- Wang, S., Wu, Y., Wang, X. 2016. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 220, 615-620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.010>.
- Wang, H., Ou, C. G., Zhuang, F. Y., Ma, Z. G. 2014. The dual role of phytoene synthase genes in carotenogenesis in carrot roots and leaves. *Molecular Breeding*, 34, 2065-2079. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0163-7>.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H., von Lintig, J. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, 211(6), 846-854. <https://doi.org/10.1007/s004250000352>.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Whangchai, K., Mathimani, T., Sekar, M., Shanmugam, S., Brindhadevi, K., Van Hung, T., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Pugazhendhi, A. 2021. Synergistic supplementation of organic carbon substrates for upgrading neutral lipids and fatty acids contents in microalga. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 105482. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105482>.
- Wilken, S., Schuurmans, J. M., Matthijs, H. C. 2014. Do mixotrophs grow as photoheterotrophs? Photophysiological acclimation of the chrysophyte *Ochromonas danica* after feeding. *New Phytologist*, 204(4), 882-889. <https://doi.org/10.1111/nph.12975>.
- White, S., Anandraj, A., Bux, F. 2011. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource Technology*, 102, 1675-1682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.097>.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V. 2011. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*, 11(3), 252-262. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00711.x>.
- Wright, S., Montoura, R. F. C. 1997. Guidelines for collection and pigment analysis of marine samples. En: Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. (Eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing, París. pp. 429-445.

- Xi, Y., Wang, J., Chu, Y., Chi, Z., Xue, S. 2020. Effects of different light regimes on *Dunaliella salina* growth and β -carotene accumulation. *Algal Research*, 52, 102111. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102111>.
- Xia, B. S., Wang, J., Duan, J., Bai, L. 2014. The relationship of glycerol and glycolysis metabolism pathway under hyperosmotic stress in *Dunaliella salina*. *Central European Journal of Biology*, 9(9), 901-908. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0323-0>.
- Xiberras, J., Klein, M., Nevoigt, E. 2019. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’ carbon source. *Biotechnology Advances*, 3, 107378. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017>.
- Xu, L., Gao, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Nan, F., Liu, X., Xie, S. 2022. Relationship between β -Carotene Accumulation and Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase in Different Species of *Dunaliella*. *Plants*, 11, 27. <https://doi.org/10.3390/plants11010027>.
- Xu, Y., Harvey, P. J. 2019. Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light. *Antioxidants*, 8, 123. <https://doi.org/10.3390/antiox8050123>.
- Xu, Y., Ibrahim, I. M., Harvey, P. J. 2016. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 305e315. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.021>.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 87-102. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2).
- Yazdani, S. S., González, R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 213-219. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.002>.
- Zanette, C. M., Mariano, A. B., Yukawa, Y. S., Mendes, I., Spier, M. R. 2019. Microalgae mixotrophic cultivation for β -galactosidase production. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1597-1606. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1720-y>.
- Zhang, Zhang, C., Liu, J., Yang, N. 2020. A strategy for stimulating astaxanthin and lipid production in *Haematococcus pluvialis* by exogenous glycerol application under low light, *Algal Research*, 46, 101779. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101779>.
- Zhang, L., Zhang B., Zhu, X., Chang, H., Ou, S., Wang, H. 2018. Role of Bioreactors in Microbial Biomass and Energy Conversion. En: Liao, Q., Chang, J., Herrmann, C., Xia, A. (Eds.), *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion*. Springer Nature, Singapore. pp. pp. 117-160.
- Zhang, E. S. B. 2016. Enhanced microalgae growth and lipid production: A study of cytostatic inhibitors and glycerol assimilation. Thesis degree of Doctor of Philosophy. University of Queensland, 187 pp.
- Zheng, Y., Yu, X., Li, T., Xiong, X., Chen, S. 2014. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP⁺-linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 125. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0125-7>.

- Zheng, Y., Quinn, A. H., Sriram, G. 2013. Experimental evidence and isotopomer analysis of mixotrophic glucose metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbial Cell Factories*, 12, 109. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-109>.
- Zhu, C. J., Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9, 189-194. <https://doi.org/10.1023/A:1007914806640>.