

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* con diferentes  
poliaminas para la producción de biomasa y del pigmento  
astaxantina**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**María Andrea Evelyn González Ibarra**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**María Andrea Evelyn González Ibarra**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Codirectora de tesis

**Dra. Laura Valdés Santiago**  
Codirectora de tesis

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**

**Dra. Elizabeth Ponce Rivas**



**Dr. Roberto Cruz Flores**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **María Andrea Evelyn González Ibarra** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

**Cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* con diferentes poliaminas para la producción de biomasa y del pigmento astaxantina**

Resumen aprobado por:

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Co-directora

**Dra. Laura Valdés Santiago**  
Co-directora

*Haematococcus pluvialis*, es una microalga dulce biflagelada unicelular la cual es considerada una de las fuentes más prometedoras de producción de astaxantina, ya que puede llegar a acumularla hasta en un 7 % de su peso seco. Sin embargo, a pesar de ser una opción con gran potencial, aún se requiere mejorar los parámetros operativos para optimizar los rendimientos de producción, como una estrategia para resolver esta problemática, se estudió el efecto de la aplicación de poliaminas exógenas. Las poliaminas son pequeños cationes orgánicos, esenciales en todos los organismos, que se relacionan con numerosos procesos celulares. Se sabe que un incremento en su concentración está asociada al crecimiento, morfogénesis, respuesta a estrés y regulación del metabolismo en otros sistemas. En microalgas, el conocimiento es escaso, por lo cual, en este estudio se evaluó el efecto de tres poliaminas: putrescina, espermidina y espermina en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) en la producción de biomasa y composición proximal de *H. pluvialis* en la etapa vegetativa de su cultivo, y en la producción del pigmento astaxantina y composición bioquímica al inducir la carotenogénesis con estos compuestos en combinación con altas intensidades de luz (200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), con y sin nutrientes en el medio de cultivo. Se observó que el uso de las poliaminas putrescina y espermidina a bajas concentraciones (0.1 – 0.5 mM) estimularon el crecimiento celular ( $134 - 201 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  al día seis de cultivo) y la producción de proteínas en *H. pluvialis* (37 – 47 %) en los primeros días de cultivo, caso contrario con la adición de espermina (0.5 – 1.0 mM) la cual tuvo un efecto citotóxico, además se detectó que las poliaminas tienen efecto sobre las células de *H. pluvialis* inhibiendo la producción de astaxantina ( $4.3 - 11.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) y carotenoides ( $5.8 - 14.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) reduciendo su concentración, al obtener menor producción que en el grupo control al final del cultivo, sin influir en su composición proximal.

**Palabras clave:** *Haematococcus*, putrescina, espermina, espermidina, astaxantina

Abstract of the thesis presented by **María Andrea Evelyn González Ibarra** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Cultivation of the microalgae *Haematococcus pluvialis* with different polyamines for the production of biomass and the pigment astaxanthin**

Abstract approved by:

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**  
Thesis Co-Director

**Dra. Laura Valdés Santiago**  
Thesis Co-Director

*Haematococcus pluvialis*, a unicellular biflagellate microalga, is considered one of the most promising sources of astaxanthin production since it can accumulate 7% of its dry weight. However, despite being an option with great potential, improving the operating parameters to optimize production is still required to solve this problem, the application of exogenous polyamines as an alternative for this purpose. Polyamines are small organic cations essential to numerous cellular processes in all organisms. An increase in their concentration is associated with growth, morphogenesis, stress response, and regulation of metabolism in other systems. In microalgae, knowledge is scarce; therefore, this study evaluated the effect of three polyamines, putrescine, spermidine, and spermine, at different concentrations (0.1, 0.5, and 1.0 mM) on biomass production and proximal composition of *H. pluvialis* in the vegetative stage of its culture, and on the production of the pigment astaxanthin and biochemical composition by inducing carotenogenesis with these compounds in combination with high light intensities (200, 400 and 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), with and without nutrients in the culture medium. It was observed that the use of polyamine, putrescine and spermidine at low concentrations (0.1 - 0.5 mM) stimulated cell growth (134 - 201  $\times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  at day six of culture) and protein production (37 - 47 %) in *H. pluvialis* in the first days of culture; the opposite was the case with the addition of spermine (0.5 - 1.0 mM) which had a cytotoxic effect. It was also detected that polyamines influence *H. pluvialis* cells, inhibiting the production of astaxanthin and carotenoids, reducing their concentration, obtaining lower production than in the control group at the end of the culture, without influencing their proximal composition.

**Keywords:** *Haematococcus*, putrescine, spermine, spermidine, astaxanthin.

## Dedicatoria

*A mi hermana Mariana, mi mejor amiga que siempre me ha motivado, por su amor incondicional, paciencia y su apoyo sin importar la distancia.*

*A mis papás Andrea y Antonio y a mi hermano Abraham por su amor y su apoyo hoy y siempre.*

## Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado a través de la beca de posgrado que me fue otorgada para financiar mis gastos durante el desarrollo de mi investigación ya que sin esta ayuda la realización del presente estudio no hubiera sido posible.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por darme la bienvenida en esta institución, agradeciendo además todo el conocimiento y experiencias de vida, las cuales tuvieron gran impacto en esta etapa de vida.

Agradezco al Posgrado de Acuicultura por haberme abierto las puertas para seguir creciendo profesionalmente y ser parte de su comunidad durante dos años, por permitirme usar las instalaciones para la realización de este proyecto.

Especialmente a mis codirectoras de tesis, a la Dra. Beatriz Cordero, por darme una bienvenida cálida en su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, por todo el apoyo brindado dentro y fuera de CICESE. Gracias por confiar en mí. A la Dra. Laura Valdés por motivarme a esta aventura, por sus aportaciones y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Muchas gracias a los miembros de mi comité de Tesis, la Dra. Mónica Hernández y la Dra. Elizabeth Ponce por su paciencia, por sus valiosos comentarios, dudas, consejos y observaciones, que fueron valiosos para este proyecto.

Gracias a mi familia y a mis amigos, por creer en mí e impulsarme a descubrir nuevos horizontes, por ser un soporte fundamental durante la maestría y sobre todo gracias a mi mamá Andrea y mi alma gemela, mi hermana Mariana por su incondicional amor y apoyo, a mi amiga Diana por las charlas, las risas, la comprensión y esa sensación de que, a pesar de la distancia, no estoy sola. A la Dra. Lucila Ortiz Castellanos por impulsarme a vivir esta etapa de mi vida, por sus preguntas y mensajes que me brindaban apoyo.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por su apoyo y dejarme disponer de su laboratorio para realizar mis análisis.

A todos los profesores e investigadores que contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo a los técnicos del departamento especialmente al técnico M. en C. Abelardo Campos Espinoza, por su ayuda brindada durante el desarrollo de los experimentos. A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería y Luis Alberto Murillo Valenzuela por sus preguntas, por todo el apoyo emocional, las pláticas y las risas que volvieron ameno el tiempo en los laboratorios.

Al personal administrativo, Dalila E. Mercado Guzmán, Cecilia Loera, Bibiana Medina y L.C.E. Norma Alicia Fuentes Domínguez, por su orientación y brindarme su apoyo cada vez que lo necesité. Al personal de seguridad el señor Mario por la ayuda al vigilar los experimentos.

Finalmente, a los nuevos amigos que hice durante la maestría; con los que tuve el placer de coincidir, especialmente a Lesly, Angélica, Carlos, Yaneth, Melany y Christian por su apoyo, charlas, consejos, gracias a todos por los buenos tiempos que dejaron un buen recuerdo de ustedes. A mis compañeros de generación Angélica, Romario, Mayra, Hillary, Cesar, Noé, Aldo, Nayeli, Sergio y Victoria por todos los momentos compartidos, por las salidas de despeje que volvieron mi experiencia en la maestría una de las más divertidas y llena de aprendizaje. ¡De aquí al éxito amigos!

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	5
1.2 Justificación .....	8
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos .....	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>10</b>
2.1 Material biológico .....	10
2.2 Escalamiento del cultivo.....	10
2.3 Evaluación de cultivo de <i>H. pluvialis</i> con diferentes concentraciones de poliaminas.....	11
2.4 Peso seco total, peso orgánico y cenizas .....	12
2.5 Composición bioquímica de <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	13
2.5.1 Proteínas .....	13
2.5.2 Lípidos totales .....	14
2.5.3 Carbohidratos.....	14
2.5.4 Pigmentos (espectrofotometría).....	14
2.6 Inducción a la carotenogénesis .....	15

2.7	Análisis estadístico y procesamiento de datos .....	17
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>18</b>
3.1	Evaluación de la producción de biomasa de <i>H. pluvialis</i> con diferentes concentraciones de poliaminas.....	18
3.1.1	Experimento preliminar para la producción de biomasa.....	18
3.1.2	Escalamiento de cultivos a 400 ml para la producción de biomasa.....	20
3.1.3	Composición proximal.....	23
3.2	Evaluación de la producción de biomasa de <i>H. pluvialis</i> y del pigmento astaxantina con diferentes concentraciones de poliaminas en la inducción a la carotenogénesis a distintas intensidades de luz .....	26
3.2.1	Experimento preliminar en placa multipozos para la producción de astaxantina.....	26
3.2.2	Escalamiento de cultivos a 500 ml para la producción de biomasa.....	30
3.2.3	Composición proximal.....	32
3.2.4	Pigmentos.....	34
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas futuras.....</b>	<b>45</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>.....</b>	<b>46</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>.....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. El ciclo celular de <i>H. pluvialis</i> : (a) célula móvil flagelada, (b) palmeloide, (c) aplanospora, acumuladora de astaxantina, (d) quiste rojo, (e) células en división (esporangio), (f) zoosporas ricas en astaxantina liberadas del esporangio, (g) aplanosporas derivadas de zoosporas que contienen astaxantina. Barra de escala: 10 $\mu\text{m}$ . (Modificado de Bauer & Minceva, 2021).....	3
2. Diseño experimental para la optimización del cultivo verde de <i>H. pluvialis</i> en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en placa multipozos con 2.5 mL de cultivo a una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Control: Medio Basal Bold (MBB) sin poliaminas.....	11
3. Diseño experimental para la optimización del cultivo verde de <i>H. pluvialis</i> en diferentes concentraciones (0.1 y 0.5 mM) de las poliaminas putrescina y espermidina en un volumen de 400 mL a una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Control: Medio Basal Bold (MBB) sin poliaminas.....	12
4. Diseño experimental para la inducción a la carotenogénesis en <i>H. pluvialis</i> , en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) de las poliaminas putrescina y espermidina y tres intensidades de luz 200, 400 y 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con y sin fuente de nitrógeno y como controles el Medio Basal Bold (MBB) con y sin fuente de nitrógeno y sin poliaminas (recuadro rojo). En Placa multipozos con un volumen de cultivo de 2.5 ml. N = fuente de nitrógeno, P = poliaminas. ....	16
5. Diseño experimental para la inducción a la carotenogénesis en <i>H. pluvialis</i> en diferentes cultivos, putrescina 0.1 mM y espermidina 0.5 y 1.0 mM a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sin fuente de nitrógeno, Medio Basal Bold (MBB) sin fuente de nitrógeno como control, en un volumen de 500 mL. ....	17
6. Valores de absorbancia (promedio), obtenidos de los tratamientos con tres poliaminas: putrescina (PUT), espermidina (ESD) y espermina (ESM) en tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM) para la producción de biomasa de <i>H. pluvialis</i> , a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos a una longitud de onda de 650 nm. Las barras verticales indican la desviación estándar.....	19
7. Placas de cultivo con <i>H. pluvialis</i> que fueron expuestas a las poliaminas putrescina, espermidina y espermina a tres diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM). a) placa de cultivo al día ocho, células en el día ocho de cultivo con adición de espermina 0.5 y 1.0 mM (objetivo 40x) b) célula con la pared rota (liberando el material al medio), c) células con material celular dañado (sin material celular). ....	20
8. Curva de crecimiento con respecto al número de células por mililitro, obtenidos de los tratamientos con dos poliaminas (PUT = putrescina y ESD = espermidina) a una concentración de 0.1 y 0.5 mM para la producción de biomasa de <i>H. pluvialis</i> a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos a una longitud de onda de 650 nm. Las barras verticales indican la desviación estándar. ....	21
9. Cultivos de <i>H. pluvialis</i> . Al día siete de cultivo, fueron expuestas a las poliaminas putrescina y espermidina a 0.5 mM con una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; a) cultivos al día siete. Células en el cultivo con espermidina 0.5 mM al día siete de cultivo (objetivo 40x); b) células palmeloides con producción de carotenoides, c) célula con pared rota (liberando material celular al medio), d) células sin material celular o material dañado.....	22

10. Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a 0.1 mM, con medio MBB a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 25
11. Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a 0.5 mM, en medio MBB a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 25
12. Valores de absorbancia (promedio) a 650 (izquierda) y 476 nm (derecha), obtenidos en los tratamientos con la adición de las poliaminas putrescina y espermidina a tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM), combinado con tres intensidades de luz 200, 400 y  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con y sin fuente de nitrógeno en el medio, en la inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis*. Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 28
13. Placas de cultivo con *H. pluvialis* que fueron expuestas a las poliaminas putrescina y espermidina a tres diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM comenzado de izquierda a derecha) combinado con tres intensidades de luz 200, 400 y  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (comenzando de arriba hacia abajo) con (derecha) y sin fuente de nitrógeno (izquierda) en el medio. En la izquierda se muestran las placas de cultivo al día cero y en lado derecho se muestran las placas al finalizar el experimento (día siete). .... 29
14. Detección de astaxantina en unidades de absorbancia a 490 nm en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis* cultivada a 200, 400 y  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con las poliaminas putrescina (PUT) y espermidina (ESD) a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM) con y sin fuente de nitrógeno en el medio. Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 30
15. Curva de crecimiento con respecto al número de células por mililitro, obtenidos de los cultivos de *H. pluvialis* con adición de poliaminas a diferentes concentraciones (PUT = putrescina y ESD = espermidina) sin fuente de nitrógeno a  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para la producción de astaxantina. Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 31
16. Células de *H. pluvialis* (40x) cultivadas con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) sin fuente de nitrógeno en el medio a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  al día seis de cultivo, a y b) control, c y d) ESD 0.5 mM, e y f) PUT 0.1 mM, g y h) ESD 1.0 mM. (↗) Célula con pared rota (liberando los pigmentos al medio), ( $\Delta$ ) células de *Haematococcus* sin material celular dentro, células pameloides con producción de carotenoides (circulo) y aplanosporas (color rojo). .... 32
17. Composición proximal (% con base en el peso seco total) de *H. pluvialis* en la inducción a la carotenogénesis cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) sin fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones e intensidad de luz de  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 33
18. Contenido promedio de pigmentos en  $\text{mg g}^{-1}$  obtenidos en el cultivo de *H. pluvialis* (% en base al peso seco total) cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar. .... 36
19. Fotografías de los cultivos en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis* cultivada a  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con las poliaminas putrescina y espermidina a diferentes concentraciones en los días cero (superior) y tres (inferior) de cultivo. .... 36

## Lista de tablas

Tabla	Página
1 Concentración de los componentes del medio Medio Basal Bold 3N empleado en el cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i> (UTEX, The Culture Collection of Algae) .....	10
2 Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ , divisiones·día <sup>-1</sup> ) de <i>H. pluvialis</i> cultivada con dos poliaminas (PUT = putrescina y ESD = espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	23
3 Contenido promedio de pigmentos en mg g <sup>-1</sup> obtenidos en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> (% en base al peso seco total) cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). .....	35
4 Densidad celular (cél mL <sup>-1</sup> ·x10 <sup>3</sup> ) de <i>H. pluvialis</i> en etapa vegetativa cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un volumen de 400 ml. Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias significativas entre los cultivos para cada día ( $p < 0.05$ ).....	53
5 Composición proximal (% en base al peso seco total) de <i>H. pluvialis</i> en etapa vegetativa cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un volumen de 400 ml. Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias entre los tratamientos para cada día y los superíndices con números muestran las diferencias de cada cultivo con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ).....	54
6 Densidad celular (cél mL <sup>-1</sup> ·x10 <sup>3</sup> ) de <i>H. pluvialis</i> en inducción a la carotenogénesis cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones, sin fuente de nitrógeno a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias significativas entre los cultivos para cada día ( $p < 0.05$ ). .	55
7 Tasas de crecimiento promedio por tratamiento ( $\mu$ , divisiones·día <sup>-1</sup> ) de <i>H. pluvialis</i> durante la inducción a la carotenogénesis, cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .....	56
8 Composición proximal (% en base al peso seco total) de <i>H. pluvialis</i> durante la inducción a la carotenogénesis, cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los subíndices con letras marcan las diferencias entre los tratamientos para cada día y los superíndices con números muestran las diferencias de cada cultivo con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ).....	57

## Capítulo 1. Introducción

---

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que pueden formar colonias o cenobios, estas son de suma importancia para los ecosistemas acuáticos, ya que contribuyen al primer eslabón en la cadena alimenticia y ayudan al balance de oxígeno; se encuentran distribuidas en todos los ecosistemas marinos, salobres, de agua dulce y terrestres (Gómez, 2007; Espinoza, 2017; Paterson *et al.*, 2023).

Las microalgas combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales como la fotosíntesis con características propias de células microbianas tales como la capacidad de crecimiento rápido (horas a días), simplicidad de requerimientos nutritivos, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos de interés comercial, plasticidad metabólica y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (Richmond, 1986; Ścieszka & Klewicka, 2018; Coêlho *et al.*, 2019; Elisabeth *et al.*, 2021b).

Se ha reportado que existen más de 50,000 especies de algas, de las cuales aproximadamente 44,000 se han descrito (Guiry, 2024), y a la fecha se ha analizado la composición bioquímica de solo 15 especies de microalgas para su cultivo a gran escala (Mata *et al.*, 2010), cuya producción tiene aplicación en la industria biotecnológica y acuícola. Entre las principales especies con este propósito están *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium cruentum*, *Chaetoceros muelleri*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana* y *Hematococcus pluvialis* (Gómez, 2007; Mobin & Alam, 2017). Estas especies son una gran fuente natural de diferentes compuestos biológicos de alto valor comercial como enzimas, aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, polisacáridos, vitaminas, proteínas y pigmentos, entre otros (Jacob-Lopes *et al.*, 2019; Pradhan *et al.*, 2020; Torres-Tiji *et al.*, 2020).

Entre los pigmentos de valor comercial obtenidos de las microalgas, se encuentran la clorofila *a*, clorofila *b*, ficocianina, luteína,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y astaxantina, este último es el de mayor valor debido a sus características bioquímicas y efectos fisiológicos (Nishida *et al.*, 2023). Estos pigmentos, tienen grandes perspectivas de aplicación en diferentes industrias como en la farmacéutica, la cosmética y en la industria alimenticia, por sus propiedades antioxidantes.

Se considera que la astaxantina es 100 veces más eficaz que el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), 65 veces más potente que la vitamina C, 38 veces mayor que la del  $\beta$ -caroteno y 10 veces más que otros carotenoides como luteína, cantaxantina y zeaxantina (Shah *et al.*, 2016; Pan-utai *et al.*, 2017; Gherabli *et al.*, 2023).

En el área biomédica se ha reportado que la astaxantina tiene algunas propiedades benéficas para la salud humana, por ejemplo: como agente antioxidante, antiinflamatorio, antiateroscleróticos, antibacterial, neuroprotector y antitumoral, también se utiliza como biomarcador en el seguimiento de células cancerígenas. Se ha reportado que al usarlo como suplemento alimenticio en humanos mejora el fortalecimiento del sistema inmune y funciona como precursor de hormonas (Lu *et al.*, 2021; Oslan *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2023).

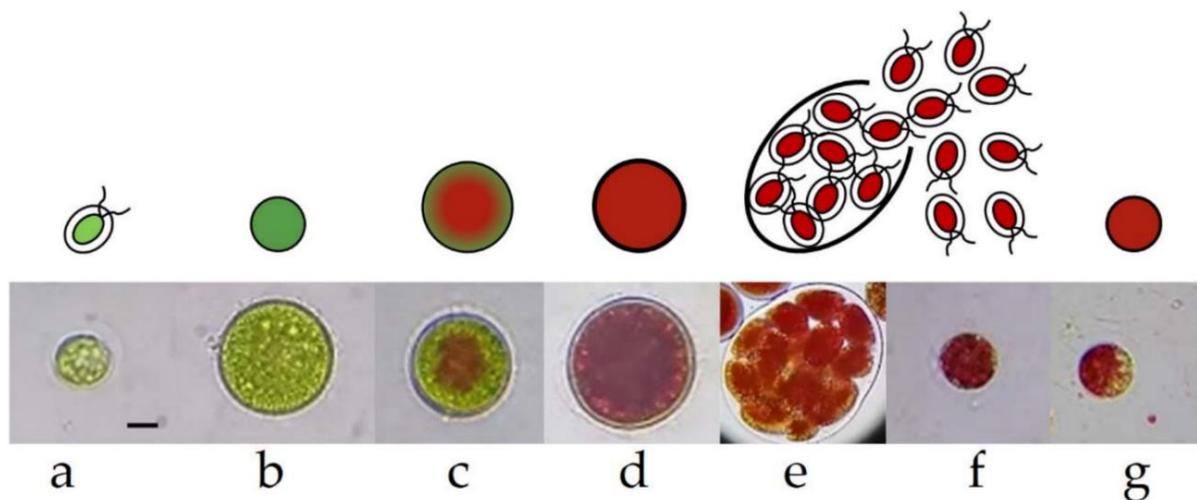
En la acuicultura la astaxantina se utiliza como complemento alimenticio para la coloración directa e indirecta de peces y crustáceos (algunos ejemplos son: camarón, salmón y peces ornamentales), así como para el fortalecimiento del sistema inmune (Wayama *et al.*, 2013; Pan-utai *et al.*, 2017; Global Market Insights, 2024). La suplementación de la astaxantina en la nutrición mejora la intensidad del color, el rendimiento del crecimiento en tilapia (Tuan Harith *et al.*, 2022) y la supervivencia de la lobina asiática (aumentando la hormona del crecimiento) (Lim *et al.*, 2019a). Además, en algunos peces se ha demostrado que proveerle astaxantina en la dieta reduce los niveles de colesterol sérico y triglicéridos (Lim *et al.*, 2019b).

Debido a sus múltiples aplicaciones, a nivel global, se ha presentado un aumento en la demanda de carotenoides de origen natural, ya que algunos de los pigmentos sintéticos, como la astaxantina, se producen a partir de fuentes petroquímicas. Esto plantea problemas de seguridad alimentaria (toxicidad potencial en el producto final), contaminación y sostenibilidad (Markets and Markets, 2021; Global Market Insights, 2024).

Algunas de las fuentes naturales de astaxantina son las levaduras *Phaffia rhodozyma* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la halobacteria *Halobacterium salinarum*, los caparzones de algunos crustáceos y las microalgas *C. zofingiensis*, *D. salina* y *H. pluvialis* (An *et al.*, 1991; Johnson & An, 1991; Maoka, 2011; An *et al.*, 2024). De entre estos organismos *H. pluvialis* destaca por su alta acumulación de astaxantina, ya que esta puede ser hasta un 7 % de su peso seco (Gherabli *et al.*, 2023).

*H. pluvialis* es una microalga de agua dulce distribuida mundialmente, exhibe cambios morfológicos específicos dependiendo de la etapa de crecimiento (Figura 1); su ciclo de vida implica cuatro etapas, comenzando con la etapa vegetativa, en la cual las células poseen motilidad flagelar y contienen altos niveles de clorofila y proteínas (Shah *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019). Cuando las condiciones de cultivo no son favorables, las células pierden sus flagelos (Figura 1a), aumentan su tamaño e inicia la degradación de las proteínas, etapa conocida como palmeloide (Figura 1b). Si las condiciones siguen siendo desfavorables

para su cultivo, las células entran a una etapa de enquistamiento donde muestran engrosamiento en su pared celular (Figura 1c) y la biosíntesis de carotenoides (principalmente astaxantina) aumenta significativamente adquiriendo una coloración roja (aplanospora) (Figura 1d). La cuarta etapa, conocida como germinación, comienza cuando los quistes se exponen a condiciones óptimas de crecimiento y la célula madre comienza a dividirse (Figura 1e), formando un esporangio el cual libera zoosporas que contienen astaxantina (Figura 1f). Después de cierto tiempo, si en su cultivo existe algún tipo de estrés, estas también pierden sus flagelos y forman aplanosporas (Figura 1g) (Shah *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019; Bauer & Minceva, 2021).



**Figura 1.** El ciclo celular de *H. pluvialis*: (a) célula móvil flagelada, (b) palmeloide, (c) aplanospora, acumuladora de astaxantina, (d) quiste rojo, (e) células en división (esporangio), (f) zoosporas ricas en astaxantina liberadas del esporangio, (g) aplanosporas derivadas de zoosporas que contienen astaxantina. Barra de escala: 10 µm. (Modificado de Bauer & Minceva, 2021).

El cultivo de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina consta de dos etapas; la primera etapa se enfoca en la producción de biomasa en estado vegetativo (verde), y el segundo paso consiste en exponer el cultivo a diferentes condiciones de estrés (limitación de nutrientes, altas intensidades de luz, altas salinidades, etc.), para inducir la carotenogénesis (Lee *et al.*, 2019; An *et al.*, 2024).

Al seleccionar una especie de microalga para cultivar, se debe de tener en cuenta los factores que afectan su cultivo, ya que se sabe que las microalgas habitan solo en lugares donde existen condiciones favorables para la colonización y el desarrollo. Un factor importante es la iluminación ya que es la fuente de energía para la fotosíntesis, por lo tanto, la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y el metabolismo microalgal (Richmond, 1986; Manzoni *et al.*, 2021).

Además de la luz, la temperatura es un parámetro fundamental para el crecimiento de las microalgas ya que la biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental por lo que afecta la tasa de crecimiento, el metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa (Abalde *et al.*, 1995; Manzoni *et al.*, 2021).

Otro factor importante son los nutrientes en el medio, el principal nutriente es el carbono ya que constituye el 50 % de la biomasa algal. La fuente principal de carbono es el CO<sub>2</sub> (en cultivo fotoautotrófico), aunque algunas microalgas pueden utilizar compuestos orgánicos (cultivos heterótroficos y mixotróficos) (Richmond, 1986). El nitrógeno (N<sub>2</sub>) es el segundo elemento de mayor importancia, ya que la reducción de este causa una disminución en la concentración de pigmentos y proteínas, lo que dificulta la fijación fotosintética del CO<sub>2</sub>, por lo que la fuente N<sub>2</sub> suele ser inorgánica, en forma de nitratos, nitritos y amonio. Cuando a un cultivo de microalgas se le suministra amonio y nitrato como fuente de nitrógeno, el amonio es el primero en ser consumido. Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada, como nitrato o nitrito, debe ser reducido antes de que pueda incorporarse en moléculas orgánicas (Abalde *et al.*, 1995; Elisabeth *et al.*, 2021).

La microalga *H. pluvialis* es la mejor fuente de astaxantina natural, sin embargo, su lenta tasa de crecimiento se considera una limitación importante, por lo que su producción se estima que es lenta y costosa. Debido a lo anterior, es claro que se requieren más estudios que aborden diferentes estrategias para aumentar la producción de biomasa por esta especie, así como una eficiente inducción de la producción de astaxantina.

Entre las alternativas de optimización se encuentra el uso de las poliaminas, las cuales son pequeñas moléculas orgánicas constituidas por varios grupos amino a lo largo de la cadena. Las poliaminas naturales más ampliamente distribuidas son: putrescina (PUT), espermidina (ESD) y espermina (ESM). Estas pueden encontrarse en tres diferentes formas dentro de la célula, en forma libre, en forma insoluble unidas a moléculas de bajo peso o moléculas complejas. Por su carácter policatiónico (cargadas positivamente) pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas (cargadas negativamente) tales como los fosfolípidos, las pectinas, algunas proteínas, el ADN y el ARN (Lin & Lin, 2018). Debido a estas características, las poliaminas se relacionan con numerosos procesos celulares como la división celular, el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la replicación del ADN y otros (Valdés-Santiago *et al.*, 2012; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2015; Pál *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

Las poliaminas son sintetizadas por todos los organismos, desde bacterias hasta plantas y animales superiores (Takahashi & Kakehi, 2010; Lin & Lin, 2018). La síntesis de las poliaminas PUT, ESD y ESM se deriva de la arginina y puede darse mediante dos rutas, una de ellas es la ruta de la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) y la otra se da a través de la arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19). En general, la mayoría de las microalgas poseen la vía ODC, pero algunas también parecen tener una vía ADC (Lin & Lin, 2018), siendo este el caso de *H. pluvialis* la cual puede utilizar las dos rutas para la biosíntesis de PUT (González-Ibarra, 2021).

En plantas se ha reportado que las poliaminas estimulan la síntesis de ácidos ribonucleicos y proteínas mediante la activación de la polimerasa de ARN y la sintasa de aminoacil-tARN, así como su actividad de retrasar el proceso de envejecimiento en las plantas, principalmente al inhibir la biosíntesis de etileno y debilitar la actividad de las enzimas ribonucleasa, proteasa, hidrolasa, oxidasa y otras, que degradan los metabolitos importantes para la vida de la planta (Incharoensakdi *et al.*, 2010). Las poliaminas también están involucradas en las respuestas al estrés en plantas y hongos (Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014; Tyagi *et al.*, 2023) y algunos estudios han reportado que su adición promueve el crecimiento de algunas microalgas (Lin & Lin, 2018; Tassoni *et al.*, 2018).

Aunque actualmente se sabe que las poliaminas pueden estar involucradas en numerosas funciones celulares, tales como desarrollo, morfogénesis, inducción del metabolismo secundario y respuesta al estrés, la información sobre el efecto de la adición exógena de poliaminas sobre el crecimiento en microalgas es insuficiente. En este sentido, en este trabajo se determinó la capacidad de la PUT, ESD y ESM en *H. pluvialis* para aumentar la biomasa en la etapa verde y la producción de astaxantina durante la carotenogénesis.

## 1.1 Antecedentes

Anteriormente se ha estudiado el efecto de las poliaminas en microalgas, uno de estos estudios fue realizado por Czerpak *et al.* (2003) al evaluar el efecto de la agmatina, PUT, ESD y ESM en el crecimiento, el contenido de clorofila *a* y *b*, la producción de monosacáridos y proteínas en las células de *C. vulgaris*. Los autores encontraron que la adición de poliaminas dentro del rango de concentración 0.001 – 0.1 mM estimula el crecimiento y el contenido de clorofilas, monosacáridos y proteínas, además, se descubrió que la espermidina no solo estimula la biosíntesis de clorofilas, sino que también inhibe su descomposición y

promueve la estabilización de las membranas tilacoides del cloroplasto, lo que ocasiona una activación considerable del proceso de fotosíntesis en sus fases de luz y oscuridad.

En el estudio realizado por Treves *et al.* (2017), se documentó que la adición de PUT al 0.1 M afectó positivamente la tasa de crecimiento de la microalga *C. ohadii*. En otra investigación se probó el efecto de la ESD (100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ) en el cultivo de *Chlorella* sp. a una alta concentración de  $\text{CO}_2$  (15 %) y alta intensidad de luz ( $405 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Se encontró que la ESD mejoró la resistencia de *Chlorella* sp. a los altos niveles de  $\text{CO}_2$  y de altas intensidades de la luz, ya que la producción de biomasa aumentó gradualmente con el aumento de las concentraciones de ESD (Zhang *et al.*, 2019). Además, en otro estudio se observó que la adición de PUT al 0.5 mM estimuló el crecimiento celular de *H. pluvialis* en la etapa verde (González-Ibarra, 2021).

Sipaúba-Tavares *et al.* (2015), realizaron un estudio en *H. pluvialis* para la producción de biomasa, para lo cual utilizaron medios de cultivo alternativos: fertilizante NPK (20-20-20: nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente) y NPK más macrófitos (*Eichhornia crassipes*) en comparación con el medio comercial (WC). Los resultados mostraron un mayor número de células de *H. pluvialis* con el medio NPK ( $5.4 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ ), mientras que en los medios NPK+M y WC, se obtuvieron densidades celulares menores, de  $4.1 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  y  $2.1 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  respectivamente. Los contenidos de clorofila *a* fueron significativamente mayores en medio NPK ( $41 - 102 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y menores en los medios NPK+M y WC ( $14 - 61 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Sin embargo, los contenidos de astaxantina fueron similares entre estos medios.

Por otra parte, para inducir a *H. pluvialis* a la carotenogénesis se han realizado diferentes investigaciones siendo una de ellas la realizada por İmamoğlu *et al.* (2009), en donde evaluaron los efectos de altas intensidades de luz, exponiendo a las células a 445 y 546  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ambas con tres medios diferentes: medio sin nitrógeno, medio sin fosfato y agua destilada, con  $\text{CO}_2$ , encontrando que la mejor condición de acumulación de astaxantina fue a una intensidad de 546  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con agua destilada, con  $\text{CO}_2$  y con deficiencia de nitrógeno con una producción de 29.62 y 30.07  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de astaxantina, respectivamente.

Scibilia *et al.* (2015) realizaron un estudio evaluando los efectos de la falta de nitrógeno e intensidad de luz en el crecimiento de *H. pluvialis* exponiendo a las células en fase exponencial a dos intensidades de luz (40 y 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en ambas intensidades se utilizó un medio de cultivo con y sin fuente de nitrógeno, además de otro tratamiento en donde adicionaron al cultivo difenilamina (DPA, es un inhibidor de la biosíntesis de astaxantina) con alta intensidad de luz y deficiencia de nitrógeno, demostrando que la condición más efectiva fue a una intensidad de luz de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno, con una

producción de astaxantina de  $306.63 \mu\text{g ml}^{-1}$ , además de que las células expuestas a estas condiciones mostraron mayor aumento en el diámetro en comparación a los demás tratamientos.

Zhang *et al.* (2018), probaron la inducción a la carotenogénesis utilizando un fotobiorreactor vertical de doble capa en cultivos con diferentes intensidades de luz ( $50, 100, 200$  y  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con y sin fuente de nitrógeno, encontrando que el contenido de astaxantina en los cultivos con deficiencia de nitrógeno y a  $200$  y  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , aumentó significativamente ( $27.3$  y  $37.9 \text{ mg g}^{-1}$ ) con respecto al control ( $20 \text{ mg g}^{-1}$ ).

En el estudio realizado por Hu *et al.* (2020), expusieron las células de *H. pluvialis* a dos intensidades de luz:  $40$  y  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , obteniendo como resultado la completa formación de quistes y un aumento en la biosíntesis de astaxantina al aumentar la intensidad de luz, mientras que, en los cultivos a baja intensidad de luz, solo entre el  $40$  y  $50 \%$  de las células se transformaron en quistes.

En el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), se han realizado investigaciones en *Haematococcus* sp., relacionadas con los factores que influyen tanto para la generación de biomasa, como para la inducción a la carotenogénesis. Escuredo-Vielba (2014), evaluó medios de cultivo a base de fertilizantes agrícolas en *Haematococcus* sp., y obtuvo las mayores biomásas ( $72 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ ) con un fertilizante llamado Plantafol ( $20, 20, 20$ : Nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente), a una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; y en el caso de la inducción a la carotenogénesis, se probó el efecto interactivo entre la limitación de nutrientes y altas intensidades de luz, obteniendo resultados favorables ( $0.089 - 1.01 \%$ ) en la producción de carotenoides con la limitación total de nitrógeno en el medio y una intensidad de luz de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Por otro lado, Cruz-Jiménez (2017), evaluó el efecto de diferentes intensidades de luz en el crecimiento de *Haematococcus* sp., e indujo la carotenogénesis probando altas intensidades de luz en cultivos mantenidos en fotobiorreactores planos, obteniendo las mayores densidades celulares (promedio de  $900 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) con las intensidades de luz de  $40$  y  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para la inducción a la carotenogénesis observó que al exponer el cultivo a una intensidad de luz de  $282 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y a una temperatura de  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ , se obtuvo la mayor producción de carotenoides con una producción de astaxantina de  $1.9 \mu\text{g mg}^{-1}$ .

En el estudio de Nava-Gómez (2017), se aisló una cepa local de *Haematococcus* sp., en la cual se evaluaron diferentes intensidades de luz para encontrar las mejores condiciones de crecimiento para esta cepa, encontrando que el mayor número de células ( $207 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ) se produjo a una intensidad de luz de  $30$

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En cuanto a la inducción a la carotenogénesis, se obtuvo mayor grado de inducción ( $27.5 \text{ mg g}^{-1}$ ) con la intensidad de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en combinación con 100% de  $\text{NaNO}_3$ , y con la salinidad de 0.034 M.

A pesar de los diversos estudios realizados por varios autores, para obtener la producción más eficiente de astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* y, debido a la ausencia de información del efecto de las poliaminas en su cultivo, en esta investigación se evaluó el efecto de las poliaminas en el crecimiento y biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*.

## 1.2 Justificación

En la actualidad la demanda de astaxantina ha tenido un gran incremento, llegando a generar ingresos a nivel mundial de 1943 millones de dólares en 2022, con una proyección de valor para el año 2030 de 6.9 mil millones de dólares (Grand View Research, 2023). Si bien la astaxantina de forma sintética es más barata, esta es sintetizada a partir de productos petroquímicos y no se considera adecuada como suplemento nutraceútico humano, además de tener menor capacidad antioxidante que su contraparte natural, lo que limita su uso en la alimentación animal. A medida que los consumidores toman conciencia de los beneficios para la salud asociados a los compuestos de origen natural, existe un aumento exponencial en la demanda de astaxantina de fuentes naturales, principalmente de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Por lo cual, se requiere una mayor investigación sobre el mejoramiento de las líneas de producción del cultivo de esta microalga y del pigmento astaxantina, donde el uso de poliaminas se plantea como una alternativa para adicionarlas al medio de cultivo, ya que estas han sido reportadas como moléculas que mejoran la tasa de crecimiento en algunas microalgas verdes. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el uso de las poliaminas para mejorar la producción de biomasa de *H. pluvialis* y su capacidad de producir astaxantina en diferentes condiciones de estrés.

## 1.3 Hipótesis

- La adición de las poliaminas putrescina y espermidina estimulará el crecimiento y mejorará la composición bioquímica de la microalga *H. pluvialis*.
- El efecto interactivo de las poliaminas putrescina y/o espermidina a una intensidad de luz de  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  incrementará la producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis*.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en la producción de biomasa y astaxantina en *H. pluvialis*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) en la producción de biomasa de *H. pluvialis*.
- Valorar el efecto de la adición exógena de poliaminas sobre la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de *H. pluvialis* en cultivo estático.
- Analizar el efecto interactivo de las poliaminas (putrescina y espermidina) en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) y con intensidades de luz de 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis*.
- Cuantificar la composición proximal y la producción de pigmentos (clorofilas, carotenoides totales y astaxantina) por *H. pluvialis* en cultivo estático bajo diferentes condiciones de estrés.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Material biológico

La cepa de *H. pluvialis* utilizada en este trabajo, fue obtenida del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR). La microalga se reactivó y se mantuvo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, en medio Basal Bold 3N (MBB) (UTEX, The Culture Collections of Algae) (Tabla 1) con luz continua (intensidad de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a temperatura de  $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH de 7.5 - 8.0.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó agua destilada, previamente esterilizada en autoclave a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , a 15 lb de presión por 15 min, posteriormente se agregó el medio de cultivo MBB, enriquecido con minerales traza y vitaminas del medio 'f/2'.

**Tabla 1.** Concentración de los componentes del Medio Basal Bold 3N empleado en el cultivo de la microalga *H. pluvialis* (UTEX, The Culture Collection of Algae).

Nutriente	Concentración (mM)
NaNO <sub>3</sub>	8.82
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29
NaCl	0.43

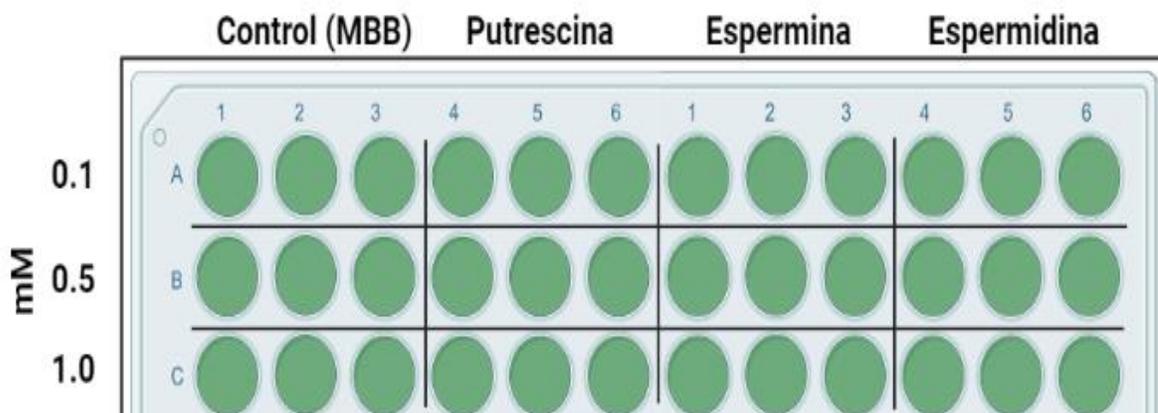
### 2.2 Escalamiento del cultivo

Para la generación de biomasa de *H. pluvialis*, se realizaron escalamientos en volúmenes crecientes (50, 100, 300 y 500 mL), en los cuales la preparación del medio fue la misma que se describió anteriormente. El inóculo para iniciar cada nivel de escalamiento fue obtenido de cultivos adicionales en fase de crecimiento exponencial y las condiciones ambientales fueron las mismas que se describieron en el apartado 2.1.

## 2.3 Evaluación de cultivo de *H. pluvialis* con diferentes concentraciones de poliaminas

El diseño experimental para el cultivo de *H. pluvialis* en cultivo vegetativo consistió en la evaluación de tres poliaminas: PUT, ESM y ESD, en tres diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM), con tres repeticiones para cada tratamiento de cultivo (3x3x3) (Figura. 2).

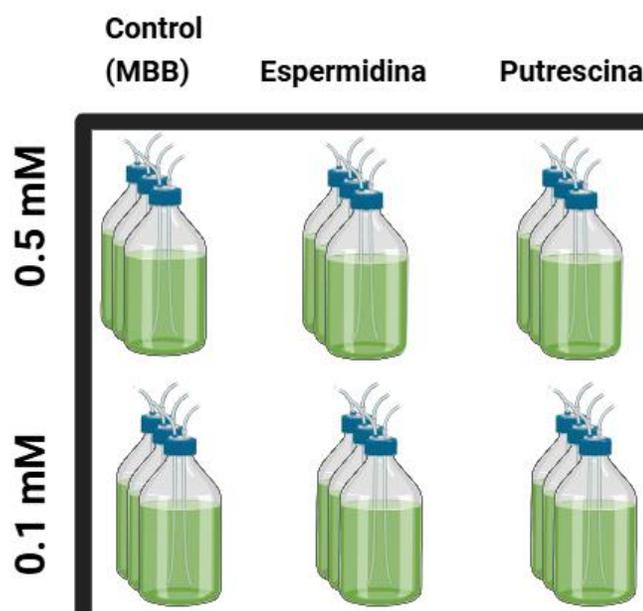
Para los cultivos en etapa verde se realizó un primer experimento en placas de cultivo de 24 pozos, de 3 mL (marca Costar® Mod.3527) con un volumen de cultivo de 2.5 mL, a una intensidad de luz de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , una temperatura de  $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y un pH de 7.0 - 8.0. El inóculo inicial fue de  $10 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ ; para los cultivos control se utilizó el medio MBB. Para evaluar la biomasa producida por medio de la densidad óptica, previamente se realizó un barrido a longitudes de onda de 400 a 750 nm para determinar la longitud de onda única para la especie para lo cual se realizaron diluciones del cultivo (1:1, 1:2, 1:4 y 1:5). Se tomaron muestras de 200  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una microplaca de 96 pozos, con fondo de cuarzo (marca Costar® Mod. 9017) para analizar las absorbancias en un lector de placa modelo "AD 200" (marca "Beckman coulter"®) a una longitud de onda de 650 nm.



**Figura 2.** Diseño experimental para la optimización del cultivo verde de *H. pluvialis* en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en placa multipozos con 2.5 mL de cultivo a una intensidad de luz de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Control: Medio Basal Bold (MBB) sin poliaminas.

Una vez terminado el primer experimento, se seleccionaron cuatro tratamientos para escalar los cultivos de *H. pluvialis* a 400 mL: PUT y ESD a las concentraciones de 0.1 y 0.5 mM (Figura 3). Este ensayo se realizó en dos etapas en la primera se evaluaron los tratamientos con PUT y ESD a la concentración de 0.5 mM junto con el control (MBB) y en la segunda etapa se valoraron los tratamientos con PUT y ESD a la

concentración de 0.1 mM junto con el control (MBB). El crecimiento de *H. pluvialis* se evaluó por medio de recuentos celulares diarios ( $\text{cél mL}^{-1}$ ), los cuales se realizaron en un microscopio compuesto Primo Star (Carl Zeiss), y se utilizó una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. También se midió la densidad óptica (DO) a 650 nm por medio de un lector de placa "AD 200" (marca "Beckman coulter"®).



**Figura 3.** Diseño experimental para la optimización del cultivo verde de *H. pluvialis* en diferentes concentraciones (0.1 y 0.5 mM) de las poliaminas putrescina y espermidina en un volumen de 400 mL a una intensidad de luz de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Control: Medio Basal Bold (MBB) sin poliaminas.

## 2.4 Peso seco total, peso orgánico y cenizas

El peso seco total (PST) de la biomasa producida, se cuantificó concentrando un volumen conocido del cultivo en filtros de fibra de vidrio (GFC, de 47 mm de diámetro y  $1.2 \mu\text{m}$  de poro de retención de partículas), previamente lavados, incinerados en la mufla a  $500^\circ\text{C}$  y pesados. Las muestras se lavaron con agua destilada (Vonshak, 1997; Zhu & Lee, 1997) y se secaron en la estufa a  $70^\circ\text{C}$  por 24 h, posteriormente se pesaron en una balanza analítica modelo GR 202 (marca AND), a continuación, se incineraron en una mufla a  $500^\circ\text{C}$  por 24 h, para obtener el peso de cenizas (PC). El peso seco orgánico (PSO) se obtuvo por diferencia de pesos entre el PST y el PC. Los cálculos se realizaron con las siguientes formulas:

$$\text{PST } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(\text{PSFM} - \text{PSF})}{VF} \quad (1)$$

$$PC (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(PCFM - PSF)}{VF} \quad (2)$$

$$PSO (\mu\text{g mL}^{-1}) = PST - PC \quad (3)$$

En donde:

PST = peso seco total

PC = peso de cenizas

PSO = peso seco orgánico

PSFM = peso seco del filtro con muestra

PCFM = peso de cenizas del filtro con muestra

PSF = peso seco del filtro sin muestra

VF = volumen de la muestra filtrado

## 2.5 Composición bioquímica de *Haematococcus pluvialis*

Para cuantificar la composición bioquímica (proteínas, lípidos totales, carbohidratos y pigmentos) de *H. pluvialis* en las diferentes fases de crecimiento se recolectaron muestras de 10 mL de los cultivos en los diferentes tratamientos. Las muestras recolectadas se colocaron en tubos falcon, se centrifugaron a una velocidad de 4900 rpm a 15 °C durante 15 min, el sobrenadante se desechó y los paquetes celulares se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

### 2.5.1 Proteínas

Para la extracción de proteínas totales se empleó el método de Rausch (1981) con NaOH al 1 N, y la

detección se realizó siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con el estándar de albumina de suero bovino (0 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), llevando a cabo las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro DR6000, a una longitud de onda de 750 nm.

### 2.5.2 Lípidos totales

Para el análisis de lípidos totales se empleó el método de extracción de Blight & Dyer (1959) modificado con diclorometano: metanol (1:2) (Cequier-Sánchez *et al.*, 2008) y la detección se realizó por espectrofotometría, conforme al método descrito por Pande *et al.* (1963). Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro DR6000, a una longitud de onda de 590 nm. Para la curva de calibración se utilizó el estándar de tripalmitina (0 a 1  $\text{mg mL}^{-1}$ ).

El paquete celular de las muestras previamente almacenadas, se resuspendió en agua destilada y se traspasó a microtubos de silicón (marca VWR®), los cuales se centrifugaron (a 9000 rpm durante 5 min) para retirar el sobrenadante. Previamente se agregó a cada microtubo 0.20 g de perlas de zirconia de 0.5 mm (marca BioSpec). A cada microtubo con muestra se le agregó 1 mL de diclorometano: metanol (1:2).

Para la extracción de los lípidos, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, y posteriormente se agitaron por 3 min utilizando un Bead beater (marca BioSpec). Se realizó una segunda extracción y se centrifugó nuevamente.

### 2.5.3 Carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó de acuerdo con el método de Dubois *et al.* (1956), para la extracción se utilizó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M como agente extractor (Whyte, 1987). Para la curva de calibración se usó glucosa como estándar (0 a 150  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Las lecturas de la absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 485 nm.

### 2.5.4 Pigmentos (espectrofotometría)

La determinación de pigmentos se llevó a cabo por medio de espectrofotometría, se identificaron

clorofilas, carotenoides totales y astaxantina; la extracción se realizó con dimetil sulfóxido (DMSO) (Boussiba *et al.*, 1992; Damiani, 2010, modificado).

Para la extracción de clorofilas, las muestras se resuspendieron en 2 mL de solución de KOH al 5 % (p/v) en metanol al 30 % (v/v), en seguida se colocaron en baño María a 70 °C por 5 min, posteriormente se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante; se realizó una segunda extracción con 1 mL de la solución. La extracción de carotenoides se realizó con 250 µL de ácido acético y 5 mL de DMSO en baño María a 70 °C por 5 min, las muestras se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante con los carotenoides. El proceso de extracción se realizó en semioscuridad.

Para la determinación de las clorofilas *a* y *b* se utilizaron las ecuaciones propuestas por Jeffrey y Humphrey (1979). Los carotenoides totales se cuantificaron de acuerdo con Wellburn (1994). Para la detección de astaxantina se utilizó la ecuación propuesta por Davies (1976).

$$C_a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647} \quad (4)$$

$$C_b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \quad (5)$$

$$C_{Totales} = \frac{1000 a(480) - 0.89 C_a - 70.16 C_b}{220} \quad (6)$$

$$Astaxantina (\mu g g^{-1}) = \frac{absorción * volumen de DMSO * 10^6}{A^{1\%} * 100 * peso muestra (g)} \quad (7)$$

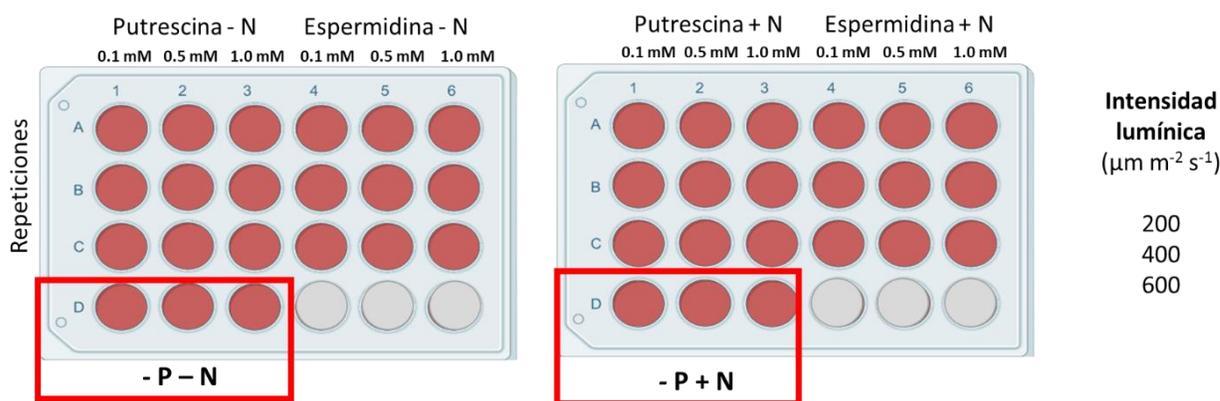
En donde:

$A^{1\%}$  = Coeficiente de extinción para DMSO 2220

## 2.6 Inducción a la carotenogénesis

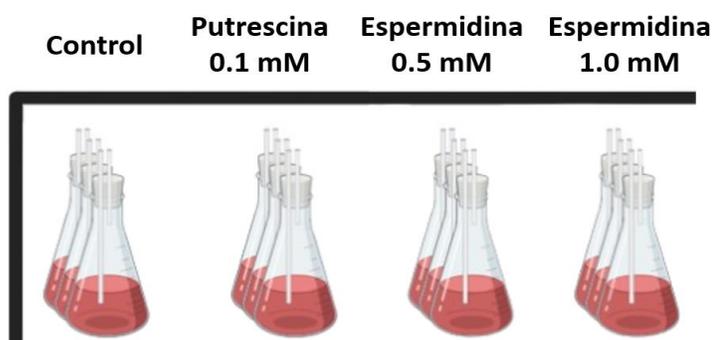
Para la inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis*, se desarrolló un primer experimento con un diseño

de 3x2x3x2x3, donde se evaluó el efecto combinado de tres intensidades de luz 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con dos poliaminas (PUT y ESD) en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM), con la adición de nutrientes del medio MBB completos y con nutrientes, pero sin la fuente de nitrógeno en el medio, y como controles el Medio Basal Bold (MBB) con y sin fuente de nitrógeno, sin poliaminas con tres repeticiones en cada caso (Figura 4). El ensayo se realizó en placas de cultivo de 24 pozos de 3 mL (marca Costar® Mod.3527) con un volumen de cultivo de 2.5 mL. Para seleccionar las tres mejores condiciones en la producción de astaxantina, se midió este pigmento por espectrofotometría al día 7 de cultivo.



**Figura 4.** Diseño experimental para la inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis*, en diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) de las poliaminas putrescina y espermidina y tres intensidades de luz 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con y sin fuente de nitrógeno y como controles el Medio Basal Bold (MBB) con y sin fuente de nitrógeno y sin poliaminas (recuadro rojo). En Placa multipozos con un volumen de cultivo de 2.5 ml. N = fuente de nitrógeno, P = poliaminas.

Para analizar la producción del pigmento astaxantina bajo los diferentes factores de estrés, una vez terminado el ensayo y seleccionadas las mejores condiciones, se realizó un escalamiento a 500 mL, con tres condiciones de inducción (PUT 0.1 mM y ESD a 0.5 y 1.0 mM sin fuente de nitrógeno) (Figura 5), para lo cual se recolectaron muestras diariamente para el análisis del PST, PSO, composición proximal y pigmentos (clorofilas, carotenoides totales y astaxantina). Los cultivos se mantuvieron con aireación continua a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El control fue un cultivo con los nutrientes del Medio Basal Bold (MBB) sin fuente de nitrógeno y sin poliaminas.



**Figura 5.** Diseño experimental para la inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis* en diferentes cultivos, putrescina 0.1 mM y espermidina 0.5 y 1.0 Mm a  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  sin fuente de nitrógeno, Medio Basal Bold (MBB) sin fuente de nitrógeno como control, en un volumen de 500 mL.

## 2.7 Análisis estadístico y procesamiento de datos

Para evaluar el efecto de las poliaminas en el crecimiento y composición bioquímica de *H. pluvialis* en la etapa verde, así como las pruebas de inducción a la carotenogénesis, se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA), se realizaron pruebas para comprobar normalidad con Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas de los datos con la prueba de Levene. En los casos donde no se cumplió con los supuestos de normalidad, se realizaron pruebas no paramétricas.

Para los experimentos de producción de biomasa de *H. pluvialis* se realizó un análisis ANOVA de un factor (composición bioquímica) y ANOVA de dos factores (crecimiento y composición bioquímica), en los casos donde se encontraron diferencias se realizó una prueba de Tukey, considerando como factores las diferentes poliaminas y las concentraciones de estas en el medio de cultivo. En los casos donde no se cumplió con la normalidad se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y para encontrar las diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de Dunn.

Para evaluar el efecto de las poliaminas sobre la inducción a la carotenogénesis con los diferentes tratamientos empleados, se realizó un ANOVA de una vía. Las variables de respuesta que se evaluaron fueron: la producción de biomasa (número de células, PST y PSO) y la composición bioquímica (lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos). En los casos donde los datos no cumplieron con la normalidad, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y donde se encontraron diferencias se realizó la prueba de Dunn.

Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  y los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Evaluación de la producción de biomasa de *H. pluvialis* con diferentes concentraciones de poliaminas

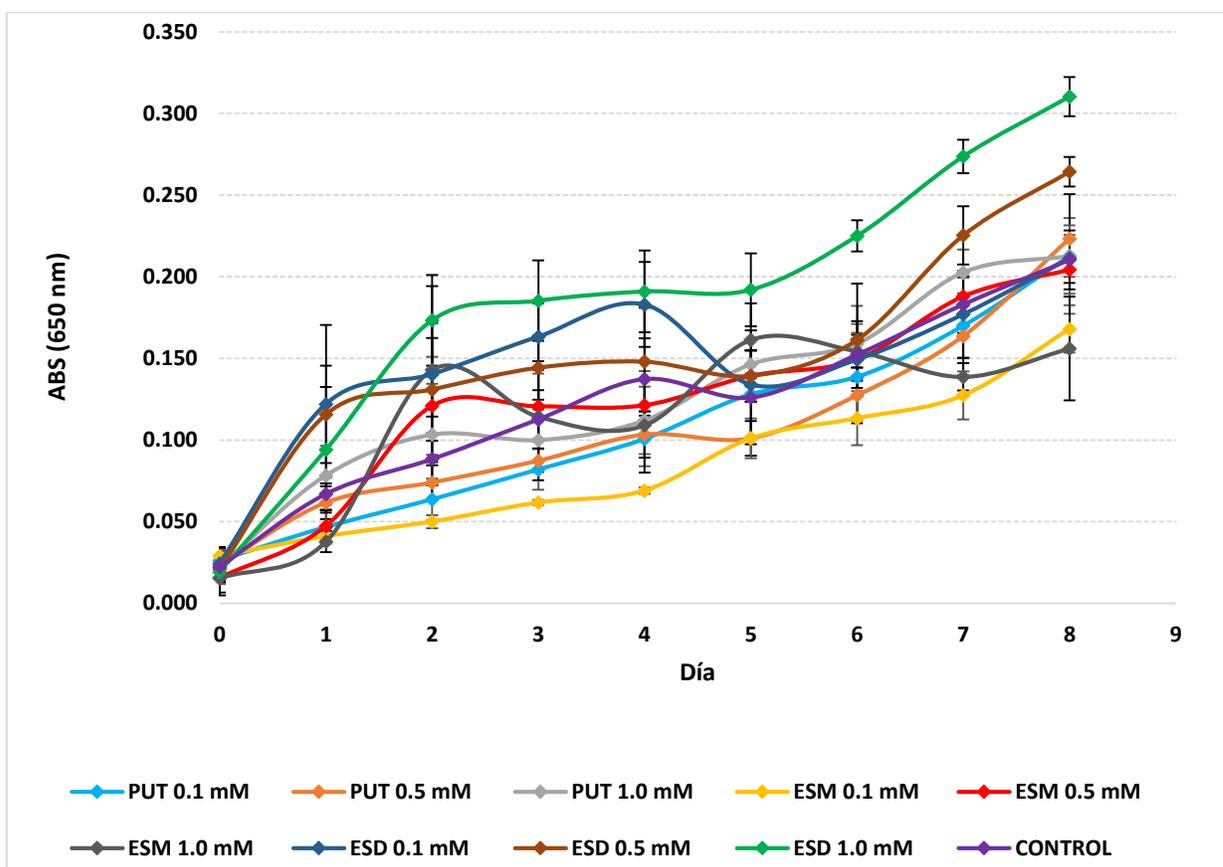
#### 3.1.1 Experimento preliminar para la producción de biomasa

Los resultados de las densidades celulares de *H. pluvialis* obtenidos en los tratamientos con la adición de tres poliaminas (PUT, ESD y ESM), a tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM) durante el experimento preliminar en placa se muestran en las figuras 6 y 7.

En general, se observó un aumento en la densidad celular de *H. pluvialis* a través del tiempo en todos los tratamientos. Los cultivos entraron a la fase exponencial 24 h después de la inoculación, con las mayores tasas de crecimientos (2.3 a 2.5 div día<sup>-1</sup>) en los tratamientos con ESD en todas las concentraciones, mientras que con las poliaminas PUT y ESM las tasas de crecimiento estuvieron entre 0.5 y 1.8 div día<sup>-1</sup>, siendo las más bajas a 0.1 mM (con 0.8 y 0.5 div día<sup>-1</sup> respectivamente) comparativamente con el control (1.6 div día<sup>-1</sup>) (Figura 6).

En el segundo día los tratamientos con ESM 0.5 y 1.0 mM y ESD 1.0 mM aún se mantenían en fase de crecimiento exponencial, con tasas de crecimiento de 1.4, 1.9 y 0.9 div día<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que el resto de los tratamientos entraron a fase de crecimiento lento (con 0.2 a 0.4 div día<sup>-1</sup>). En el resto de los días, la mayoría de los tratamientos se mantuvieron en fase de crecimiento lento, con las excepciones de los tratamientos con ESM 0.1 y 1.0 mM, donde, al día cinco, se observaron tasas de crecimiento de 0.5 y 0.6 div día<sup>-1</sup> respectivamente, al igual que ESD al 0.5 mM con 0.5 div día<sup>-1</sup>.

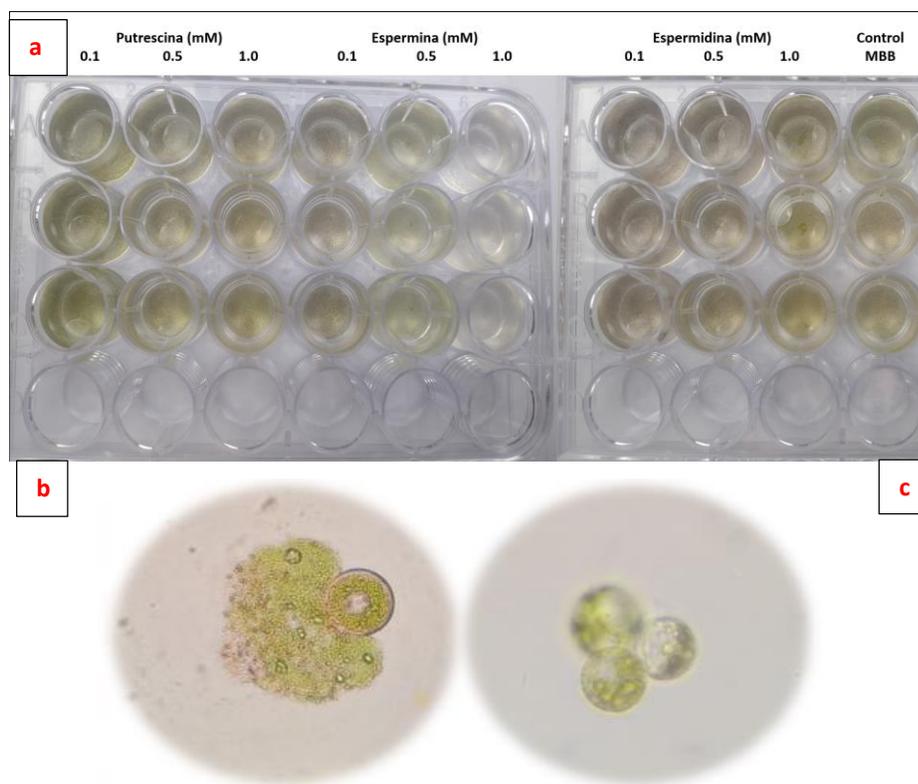
A partir del día seis de cultivo se observaron las mayores biomásas en el tratamiento con ESD a la concentración de 1.0 mM, con densidades de 0.225 DO<sub>650</sub> (día seis), con continuos incrementos hasta el día ocho (DO<sub>650</sub> = 0.310) siendo diferentes al resto de los cultivos ( $p < 0.05$ ). En este día también se observaron densidades altas con el tratamiento de ESD en la concentración de 0.5 mM (DO<sub>650</sub> = 0.264), aunque menor que el tratamiento de ESD al 1.0 mM, pero mayor que el resto de los tratamientos, incluyendo el cultivo control (DO<sub>650</sub> = 0.152) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Valores de absorbancia (promedio), obtenidos de los tratamientos con tres poliaminas: putrescina (PUT), espermidina (ESD) y espermina (ESM) en tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM) para la producción de biomasa de *H. pluvialis*, a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos a una longitud de onda de 650 nm. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Los resultados en el día ocho mostraron que el tratamiento con ESD en la concentración de 1.0 mM, tuvo la mayor influencia positiva en el crecimiento de *H. pluvialis* ( $\text{DO}_{650} = 0.310$ ), seguido de la ESD a la concentración de 0.5 mM ( $\text{DO}_{650} = 0.264$ ), aunque con el resto de los tratamientos no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Los tratamientos con PUT a 0.1, 0.5 y 1.0 mM fueron los que presentaron mayor absorbancia ( $\text{DO}_{650} = 0.213$ , 0.223 y 0.213 respectivamente) seguido de ESD 0.1 mM ( $\text{DO}_{650} = 0.211$ ) y por último el control ( $\text{DO}_{650} = 0.210$ ).

Al término del experimento, en los cultivos con los tratamientos de ESM al 0.5 y 1.0 mM, se detectó un efecto negativo en la adición de esta poliamina de forma exógena, ya que se observó una apariencia turbia en los cultivos (Figura 7<sup>a</sup>), a pesar de que se observaron valores de  $\text{DO}_{650}$  de 0.204 y 0.156 respectivamente, sin embargo esto se debe al efecto de turbidez mencionado, con observaciones microscópicas se detectó daño celular, células con material celular liberado al medio de cultivo (Figura 7b y c).



**Figura 7.** Placas de cultivo con *H. pluvialis* que fueron expuestas a las poliaminas putrescina, espermidina y espermina a tres diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM). a) placa de cultivo al día ocho, células en el día ocho de cultivo con adición de espermina 0.5 y 1.0 mM (objetivo 40x) b) célula con la pared rota (liberando el material al medio), c) células con material celular dañado (sin material celular).

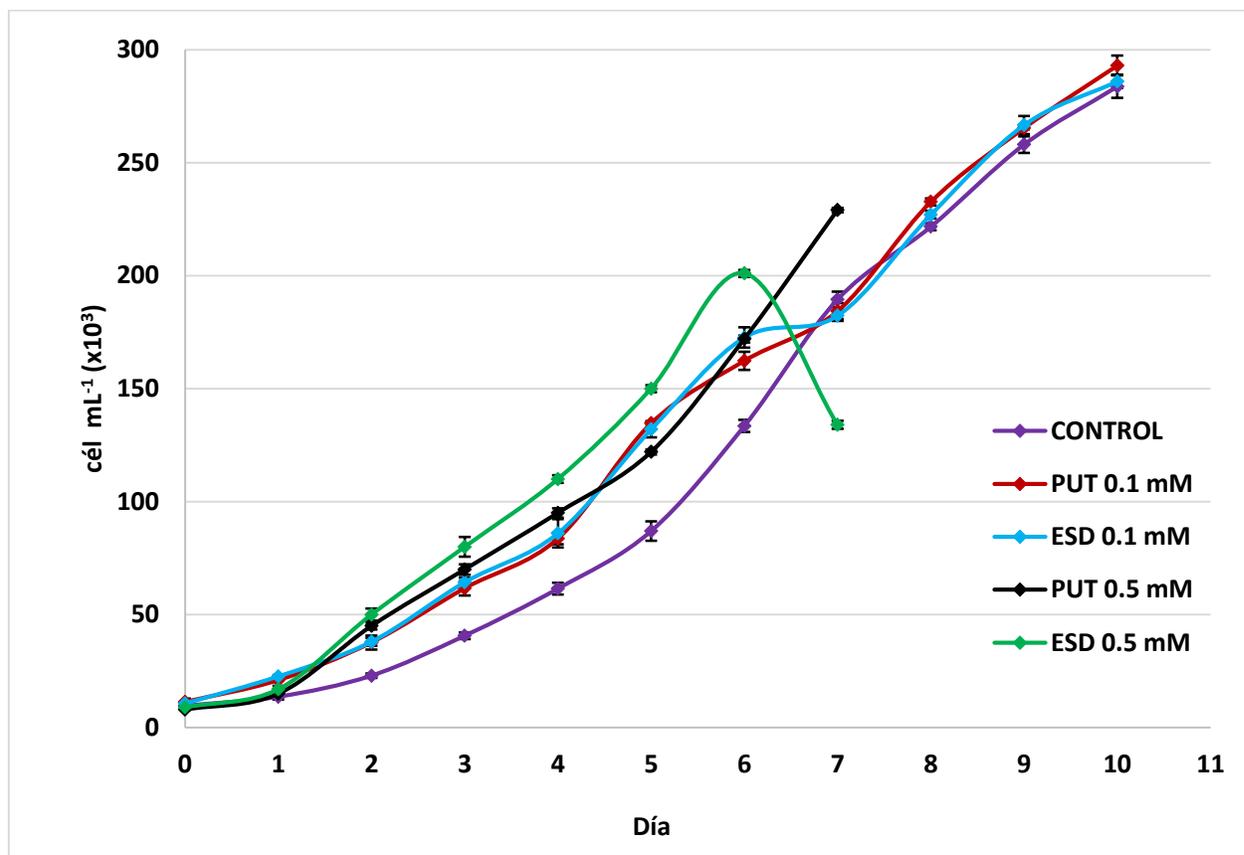
### 3.1.2 Escalamiento de cultivos a 400 ml para la producción de biomasa

Los resultados obtenidos durante el experimento preliminar llevaron a tomar la decisión de descartar los tratamientos con ESM inicialmente propuestos, ya que con esta poliamina se observó daño celular. El segundo experimento se realizó con los demás tratamientos, escalando los cultivos a un volumen de 400 mL, para evaluar la composición proximal de *H. pluvialis* como respuesta a los diferentes tratamientos. Durante este ensayo se descartaron otros dos tratamientos, PUT y ESD al 1.0 mM, ya que al día cuatro de cultivo los tratamientos tuvieron los mismos efectos citotóxicos que los obtenidos con la adición de ESM en el ensayo preliminar.

Los resultados de las densidades celulares ( $\text{cel ml}^{-1}$ ) de *H. pluvialis*, obtenidos en los tratamientos con la adición de las poliaminas PUT y ESD a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM) se muestran en la figura 8 (Anexo A). En la primera etapa de este experimento, donde se probaron los cultivos con adición de PUT y ESD a 0.5 mM, se decidió terminar este ensayo al día siete del cultivo, a pesar del incremento mostrado en los

cultivos con PUT a 0.5 mM, ya que se observó un efecto citotóxico en las células de *H. pluvialis* con el tratamiento con ESD.

Se observó que las microalgas cultivadas en todos los tratamientos entraron en la fase exponencial desde el día uno, esta fase tuvo una duración de tres días en todos los tratamientos, con 0.6 hasta 1.1 div día<sup>-1</sup>. Los tratamientos con PUT y ESD al 0.1 mM y el control tuvieron un nuevo incremento celular al día cinco (0.7, 0.6 y 0.6 div día<sup>-1</sup> respectivamente).

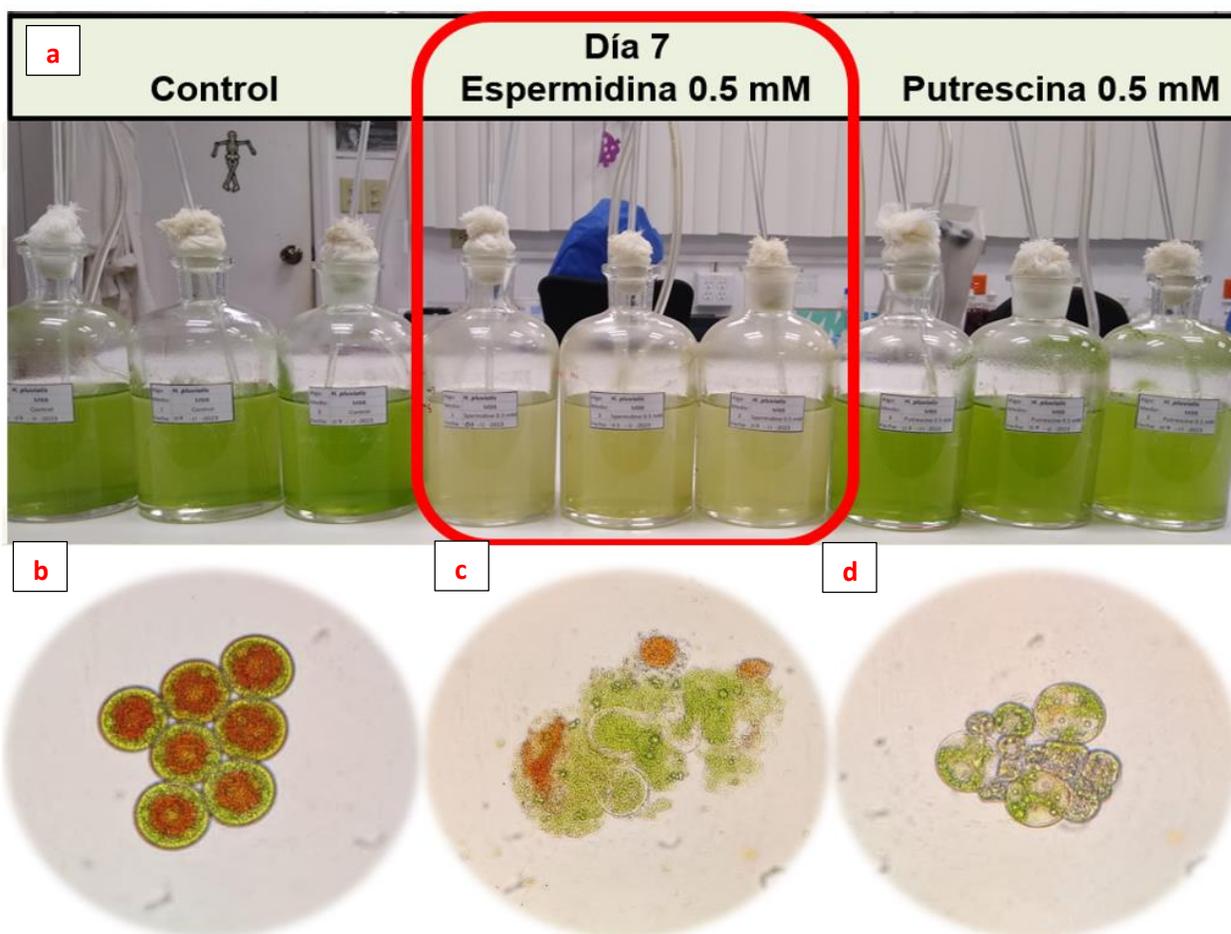


**Figura 8.** Curva de crecimiento con respecto al número de células por mililitro, obtenidos de los tratamientos con dos poliaminas (PUT = putrescina y ESD = espermidina) a una concentración de 0.1 y 0.5 mM para la producción de biomasa de *H. pluvialis* a  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medidos a una longitud de onda de 650 nm. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Las diferencias en las densidades celulares entre los tratamientos se observaron desde el día dos al día ocho (Figura 8). La mayor densidad celular se obtuvo en el tratamiento con ESD al 0.5 mM (días dos al seis) alcanzando la mayor biomasa al día seis de cultivo ( $201 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ ), al día siete la mayor biomasa se observó en el cultivo con PUT al 0.5 mM ( $229 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ ) y al día ocho la mayor densidad se obtuvo en el cultivo con PUT al 0.1 mM ( $232 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ ). Durante el primer día, así como al final del cultivo (días

nueve y diez) no se observaron diferencias en las densidades celulares de los tratamientos ( $p > 0.05$ ) alcanzando una biomasa promedio de  $283 - 293 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ .

Las máximas tasas de crecimiento ( $1.6 \text{ div día}^{-1}$ ) se obtuvieron al día dos con la adición de PUT y ESD al 0.5 mM y al día uno en el cultivo con PUT al 0.1 mM ( $1.1 \text{ div día}^{-1}$ ), mientras que en el control la mayor tasa de crecimiento se encontró al día tres ( $0.9 \text{ div día}^{-1}$ ) (Tabla 2).



**Figura 9.** Cultivos de *H. pluvialis*. Al día siete de cultivo, fueron expuestas a las poliaminas putrescina y espermidina a 0.5 mM con una intensidad de luz de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; a) cultivos al día siete. Células en el cultivo con espermidina 0.5 mM al día siete de cultivo (objetivo 40x); b) células palmeloides con producción de carotenoides, c) célula con pared rota (liberando material celular al medio), d) células sin material celular o material dañado.

Por otra parte, los cultivos con el tratamiento con ESD al 0.5 mM entraron en fase de muerte al día siete, y presentaron una apariencia turbia (Figura 9a), al hacer una revisión al microscopio, se observaron además de las células palmeloides con producción de carotenoides (Figura 9 b), se detectó daño celular, material celular dañado o liberado al medio de cultivo (Figura 9 c y d).

**Tabla 2.** Tasas de crecimiento promedio por tratamiento ( $\mu$ , divisiones día<sup>-1</sup>) de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT = putrescina y ESD = espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a 30  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Día	Tratamiento				
	Control	0.1 mM		0.5 mM	
		PUT	ESD	PUT	ESD
1	0.6	0.9	1.1	0.9	0.9
2	0.6	0.8	0.7	1.6	1.6
3	0.9	0.7	0.8	0.6	0.7
4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5
5	0.6	0.7	0.6	0.4	0.4
6	0.5	0.3	0.4	0.5	0.4
7	0.4	0.2	0.1	0.4	-0.6
8	0.3	0.3	0.3	-	-
9	0.2	0.2	0.2	-	-
10	0.1	0.1	0.1	-	-

### 3.1.3 Composición proximal

Los resultados de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de *H. pluvialis* en fase vegetativa, se expresan como el porcentaje con base en el peso seco total de la microalga obtenidos en los diferentes tratamientos con la adición de las poliaminas PUT y ESD a dos concentraciones (0.1, 0.5 mM) (Figura 10 y 11, Anexo B).

De acuerdo con los resultados de la composición proximal entre los medios de cultivo para cada día (Figura 10 y 11), se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas entre los cultivos al día dos, con la mayor concentración en los cultivos con PUT al 0.1 y ESD al 0.1 mM (37 y 41 %, respectivamente), así como en los días tres y cinco en el tratamiento con ESD al 0.5 mM (47 y 44 % respectivamente), por el contrario las menores concentraciones se observaron en el control en los días dos y tres (34 y 28 % respectivamente) ( $p < 0.05$ ) y en el cultivo con ESD al 0.5 mM al día siete (27 %). En el resto de los días no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ).

Al analizar el contenido de proteínas de *H. pluvialis* expuesta a los diferentes tratamientos, con respecto al tiempo de cultivo, se observaron diferencias significativas con el tratamiento control ( $p < 0.01$ ), teniendo la menor concentración en los días tres, seis y siete (28, 24 y 30 % respectivamente) (Figuras 10 y 11). Con el tratamiento con ESD al 0.1 mM, hubo una disminución del contenido de proteínas con respecto al tiempo, obteniendo el menor porcentaje al día seis (25 %) (Figura 10). Esta tendencia se observó en el cultivo con ESD al 0.5 mM en donde al día siete se obtuvo el menor porcentaje (27 %) (Figura 11), lo que coincide con la disminución de la tasa de crecimiento observada en la tabla 2.

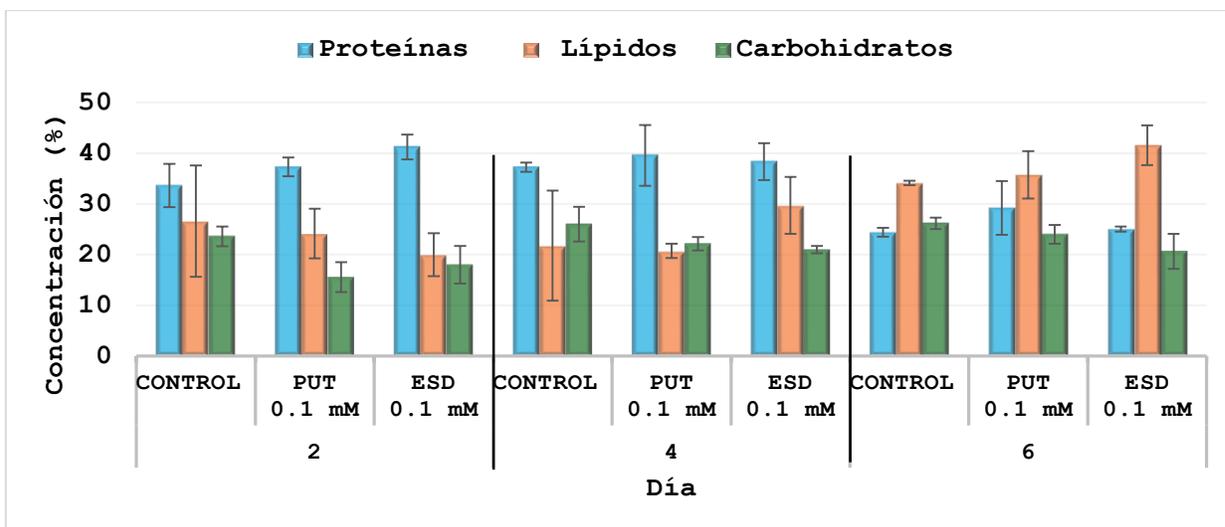
Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de lípidos ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos para cada día. En el día seis, el mayor porcentaje se obtuvo en el tratamiento con ESD 0.1 mM (42 %) (Figura 10) y en el día siete la mayor concentración se encontró en el cultivo con PUT 0.5 mM (33 %) (Figura 11).

Al analizar el porcentaje de lípidos de cada tratamiento con respecto al tiempo, los cultivos en donde se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) fueron con PUT 0.1 mM y con ESD 0.1 mM, teniendo la mayor concentración al día seis con porcentajes de 36 y 42 % respectivamente (Figura 10), resultados acordes con lo reportado en la tabla 2 donde se observa que los cultivos están en fase de crecimiento lento durante los últimos días del cultivo.

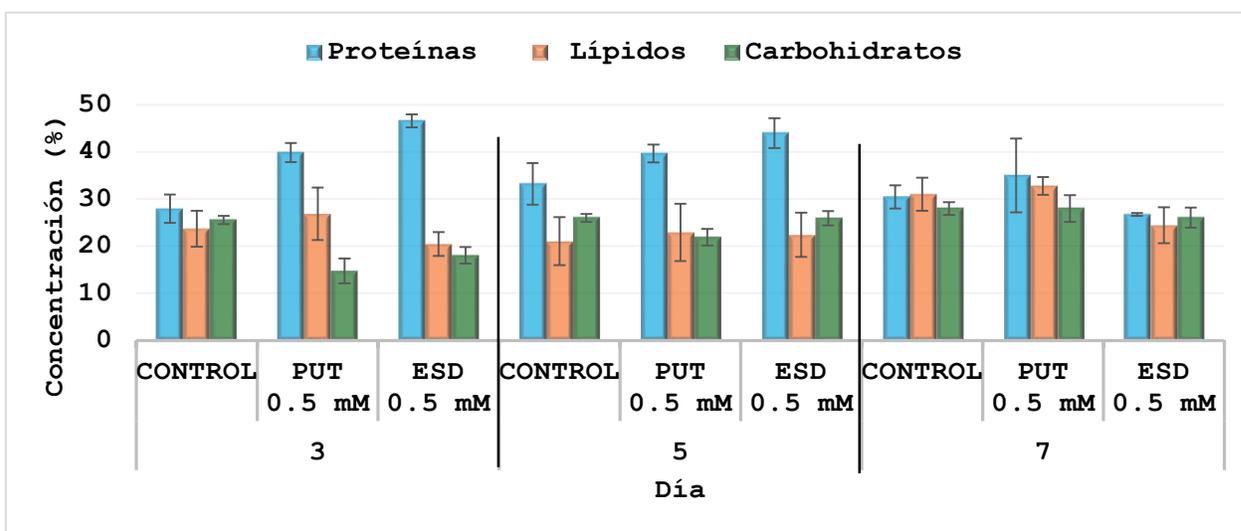
En el análisis de carbohidratos entre los diferentes cultivos para cada día durante el experimento de producción de biomasa se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos al día dos y tres teniendo la mayor concentración en el cultivo control con un 24 y 26 % respectivamente (Figura 10 y 11), el resto de los días no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte, al analizar el porcentaje de carbohidratos de cada tratamiento con respecto al tiempo de cultivo de forma individual, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mostrando un aumento con respecto al tiempo. En el cultivo con PUT 0.1 mM la mayor concentración se obtuvo al día seis y en el cultivo con PUT 0.5 mM la mayor concentración se obtuvo al día siete (24 y 28 % respectivamente), el tratamiento con ESD al 0.1 mM alcanzó su mayor concentración desde el día cuatro (21%) (Figura 10). En el cultivo con PUT al 0.5 mM la mayor concentración se obtuvo desde el día cinco, llegando a acumular 28% al día siete (Figura 11), lo que coincide con la disminución en las tasas de crecimiento (Figura 8), mientras que en los controles el contenido de carbohidratos no tuvo cambios significativos con respecto al tiempo, y las concentraciones estuvieron entre 24 y 28 %.

Al realizar un análisis comparativo de la composición proximal en la fase exponencial (días dos y tres) con los tratamientos, se detectó que el tipo de poliaminas adicionada tiene un efecto en la producción de proteínas en las células de *H. pluvialis*, teniendo el mayor porcentaje en los cultivos donde se adicionó ESD (41 – 47 %), seguido de los cultivos con adición de PUT (37 – 40 %), teniendo en ambos casos mayor contenido que el control (34 %) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido de proteínas debido a la concentración utilizada de cada poliamina.



**Figura 10.** Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a 0.1 mM, con medio MBB a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar.



**Figura 11.** Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a 0.5 mM, en medio MBB a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar.

En el contenido de lípidos no se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), el promedio obtenido fue del 20 al 27 %. En el porcentaje de carbohidratos la mayor concentración se encontró en el control ( $p < 0.05$ ), mientras que en los cultivos donde se adicionaron poliaminas no se observaron diferencias entre PUT y ESD en ambas concentraciones ( $p > 0.05$ ).

## 3.2 Evaluación de la producción de biomasa de *H. pluvialis* y del pigmento astaxantina con diferentes concentraciones de poliaminas en la inducción a la carotenogénesis a distintas intensidades de luz

### 3.2.1 Experimento preliminar en placa multipozos para la producción de astaxantina

Los resultados de las densidades celulares de *H. pluvialis* con base en la absorbancia a 650 nm y 490 nm, en los tratamientos con la adición de dos poliaminas (PUT y ESD) a tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM), combinado con tres intensidades de luz 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con y sin fuente de nitrógeno en el medio obtenidos durante el experimento preliminar se muestran en la figura 12.

En este experimento se realizó una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis) para cada variable medida (densidad óptica a 650 y 476 nm y contenido de astaxantina en absorbancia a 490 nm) por cada factor, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad a pesar de haber sido transformados. Además, debido al análisis estadístico empleado no se pudo evaluar el efecto interactivo de los factores de estrés sobre la densidad óptica y la producción de astaxantina.

En general, en todos los cultivos se observa una disminución con respecto al tiempo en la absorbancia a 650 nm, que corresponde al contenido de clorofila en el cultivo, y un aumento en los valores de absorbancia obtenidos a la longitud de onda de 476 nm que corresponde al contenido de carotenoides totales en el cultivo.

Los resultados obtenidos de la densidad óptica a 650 nm, que corresponde al contenido de clorofila, se encuentran graficados en la figura 12. De acuerdo con los estadísticos al día siete del cultivo la absorbancia varía dependiendo de la intensidad de luz a la que se expuso el cultivo. En general en todos los cultivos la mayor concentración se tuvo a la intensidad de 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ( $\text{DO}_{650} = 0.728 - 1.340$ ) seguido de la intensidad de 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\text{DO}_{650} = 0.623 - 0.955$ ), y la concentración mínima se obtuvo a una intensidad de luz de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\text{DO}_{650} = 0.373 - 1.073$ ) ( $p < 0.05$ ) datos que coinciden con lo observado en la figura 13.

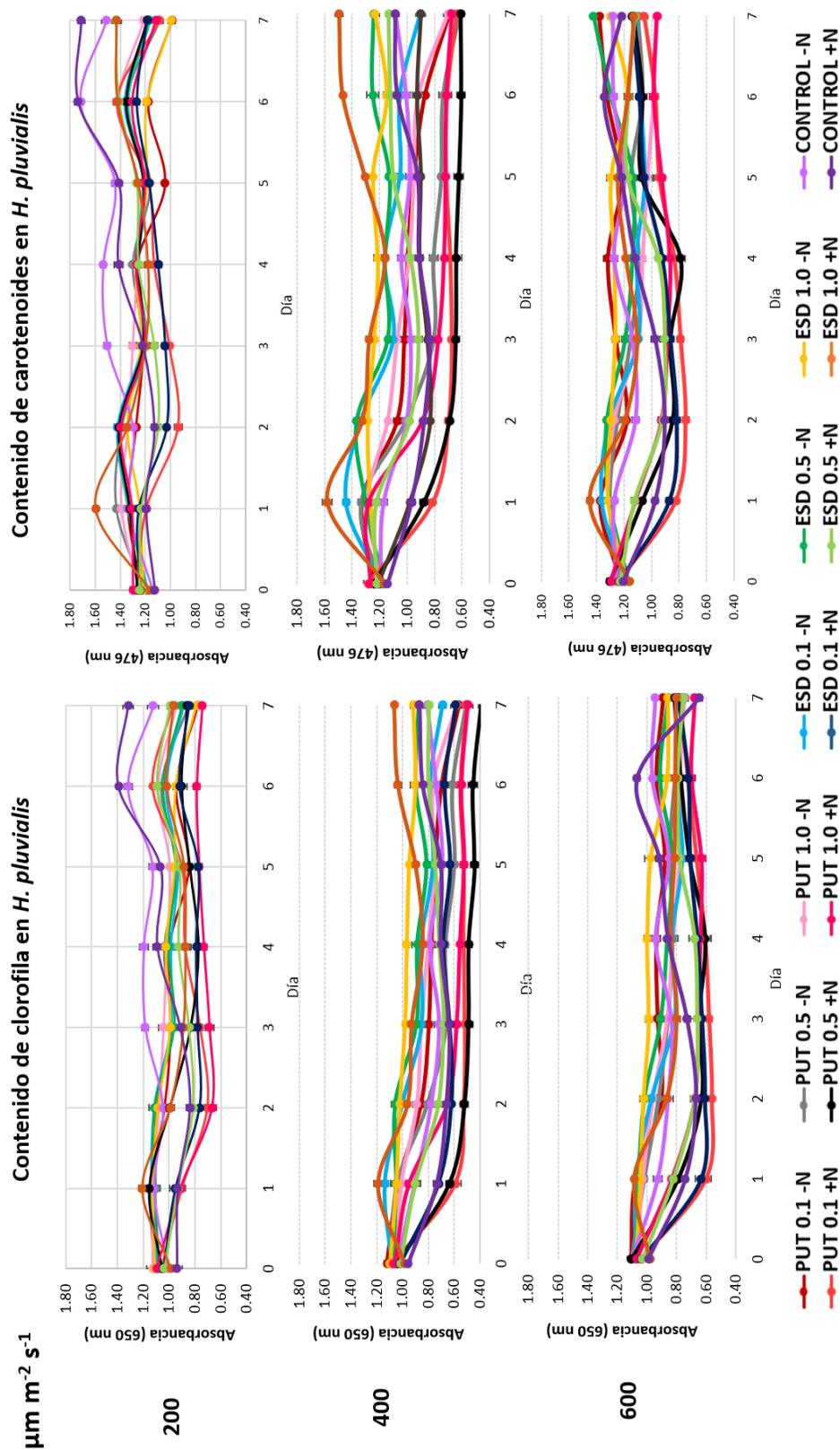
Por otro lado, se observó, de manera general, que no hubo diferencias entre los tratamientos con y sin fuente de nitrógeno en el medio de cultivo ( $p > 0.05$ ), en cambio se encontró que con la adición de

poliaminas se tuvieron las mayores concentraciones de clorofila ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos control ( $DO_{650} = 0.623 - 1.340$ ) y en los cultivos donde se adicionó ESD ( $DO_{650} = 0.566 - 1.073$ ) (Figura 12), por el contrario, las menores concentraciones se obtuvieron en los cultivos donde se adicionó PUT ( $DO_{650} = 0.373 - 0.993$ ). De igual forma fue mayor la densidad obtenida conforme aumentó la concentración de la poliamina adicionada ( $p < 0.05$ ).

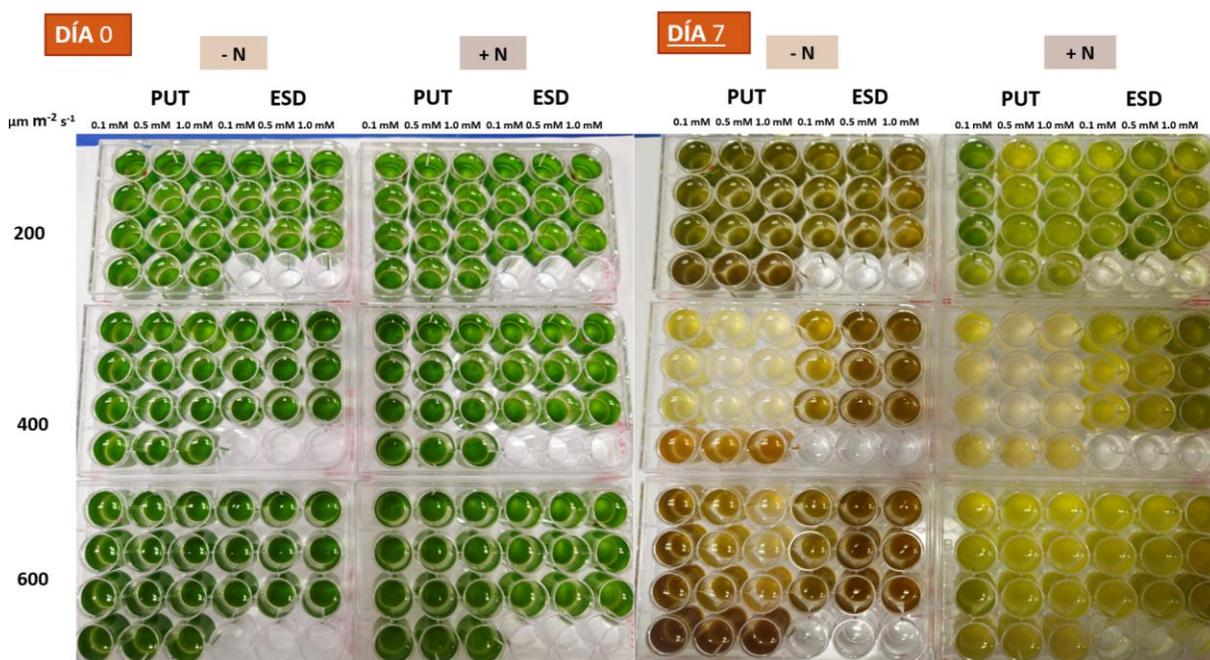
En cuanto a los valores obtenidos de la densidad óptica a 476 nm, que corresponde al contenido de carotenoides (Figura 12), en general, en todos los tratamientos se observó que dependiendo de la intensidad de luz a la que fueron expuestos los cultivos, varió la absorbancia obtenida al día siete de cultivo, la misma tendencia se observó a 650 nm, teniendo los valores más altos a la intensidad de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $DO_{476} = 0.964 - 1.741$ ) seguido de la intensidad de  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $DO_{476} = 0.944 - 1.442$ ) y por último la intensidad de luz de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $DO_{476} = 0.586 - 1.524$ ) ( $p < 0.05$ ).

En relación con la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio no se observó un efecto en la absorbancia obtenida a 476 nm entre todos los tratamientos (con fuente de nitrógeno  $DO_{476} = 0.586 - 1.741$ ; sin fuente de nitrógeno  $DO_{476} = 0.587 - 1.554$ ) ( $p > 0.05$ ) (Figura 12). Sin embargo, la adición de poliaminas sí tuvo un efecto en la absorbancia obtenida a 476 nm, las mayores concentraciones se obtuvieron al adicionar ESD ( $DO_{476} = 0.862 - 1.524$ ), al igual que en los tratamientos control ( $DO_{476} = 1.055 - 1.741$ ) ( $p < 0.05$ ). Además, la concentración de poliaminas en el medio de cultivo ocasiona variaciones en la absorbancia obtenida, teniendo la mayor densidad en los cultivos con una concentración de 0.5 mM ( $DO_{476} = 0.586 - 1.457$ ) y 1.0 mM ( $DO_{476} = 0.671 - 1.524$ ), sin obtener valores mayores de absorbancias que el cultivo control ( $DO_{476} = 1.055 - 1.741$ ) ( $p < 0.05$ ).

Al término del experimento, en los cultivos con los tratamientos de PUT al 0.5 y 1.0 mM a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con y sin fuente de nitrógeno en el medio, se observó una apariencia turbia y se detectó daño celular (material celular dañado o liberado al medio de cultivo) (Figura 13).



**Figura 12.** Valores de absorbancia (promedio) a 650 (izquierda) y 476 nm (derecha), obtenidos en los tratamientos con la adición de las poliaminas putrescina y espermidina a tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM), combinado con tres intensidades de luz 200, 400 y 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con y sin fuente de nitrógeno en el medio, en la inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis*. Las barras verticales indican la desviación estándar.

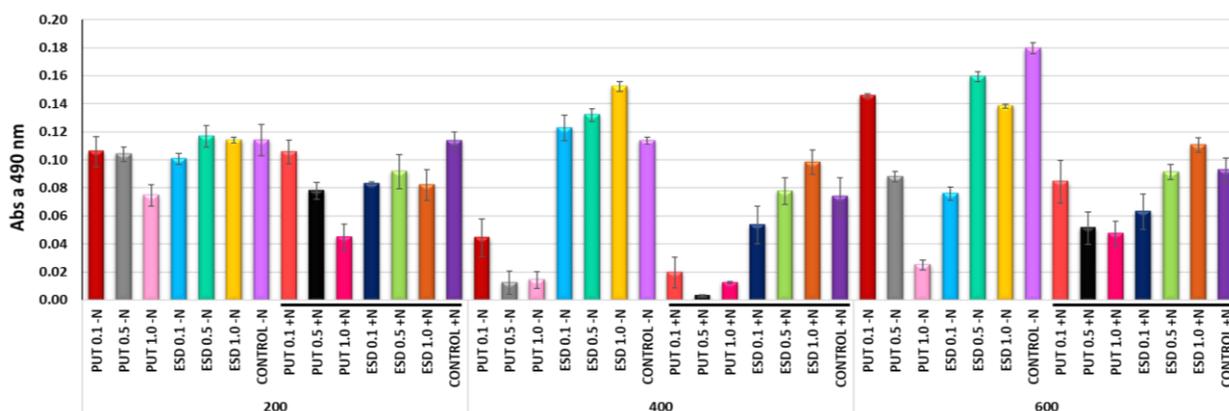


**Figura 13.** Placas de cultivo con *H. pluvialis* que fueron expuestas a las poliaminas putrescina y espermidina a tres diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM comenzado de izquierda a derecha) combinado con tres intensidades de luz 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (comenzando de arriba hacia abajo) con (derecha) y sin fuente de nitrógeno (izquierda) en el medio. En la izquierda se muestran las placas de cultivo al día cero y en lado derecho se muestran las placas al finalizar el experimento (día siete).

Los resultados del análisis de astaxantina en unidades de absorbancia a 490 nm en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis*, cultivada a diferentes intensidades de luz (200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), con las poliaminas putrescina (PUT) y espermidina (ESD) a diferentes concentraciones (con y sin fuente de nitrógeno) al día siete de cultivo, se muestran en la figura 14.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en general, el contenido de astaxantina en todos los tratamientos, incluido el control, fluctúa dependiendo de la intensidad lumínica a la que es cultivada *H. pluvialis*, teniendo las mayores concentraciones promedio en los cultivos expuestos a la intensidad de 600 ( $\text{DO}_{490} = 0.01 - 0.184$ ) y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\text{DO}_{490} = 0.038 - 0.126$ ) (Figura 14), mientras que las menores concentraciones se encontraron en la intensidad de luz de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ), a excepción de los tratamientos con ESD y el control, todos sin fuente de nitrógeno. Además, se observó que el nitrógeno tuvo un efecto en la producción de astaxantina, teniendo las mayores concentraciones ( $p < 0.05$ ) en todos los tratamientos sin fuente de nitrógeno ( $\text{DO}_{490} = 0.005 - 0.184$ ), en comparación con los tratamientos donde se adiciono nitrógeno al medio de cultivo ( $\text{DO}_{490} = 0.002 - 0.119$ ) (Figura 14).

Las mayores concentraciones del pigmento se obtuvieron con la adición de la poliamina ESD (0.1 mM  $DO_{490} = 0.038 - 0.129$ ; 0.5 mM  $DO_{490} = 0.067 - 0.163$ ; 1.0 mM  $DO_{490} = 0.069 - 0.156$ ) ( $p < 0.05$ ) al igual que con los tratamientos control ( $DO_{490} = 0.061 - 0.184$ ) ( $p > 0.05$ ). Así mismo, se analizó el efecto de la concentración de las poliaminas y se obtuvo que al adicionarlas en el medio de cultivo ocasiona variaciones en la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, teniendo la mayor densidad en los cultivos control ( $DO_{490} = 0.061 - 0.184$ ), seguido de la concentración de 0.5 ( $DO_{490} = 0.067 - 0.163$ ) y 1.0 mM ( $DO_{490} = 0.069 - 0.156$ ) con la adición de ESD y de 0.1 mM ( $DO_{490} = 0.012 - 0.147$ ) en la adición de PUT.



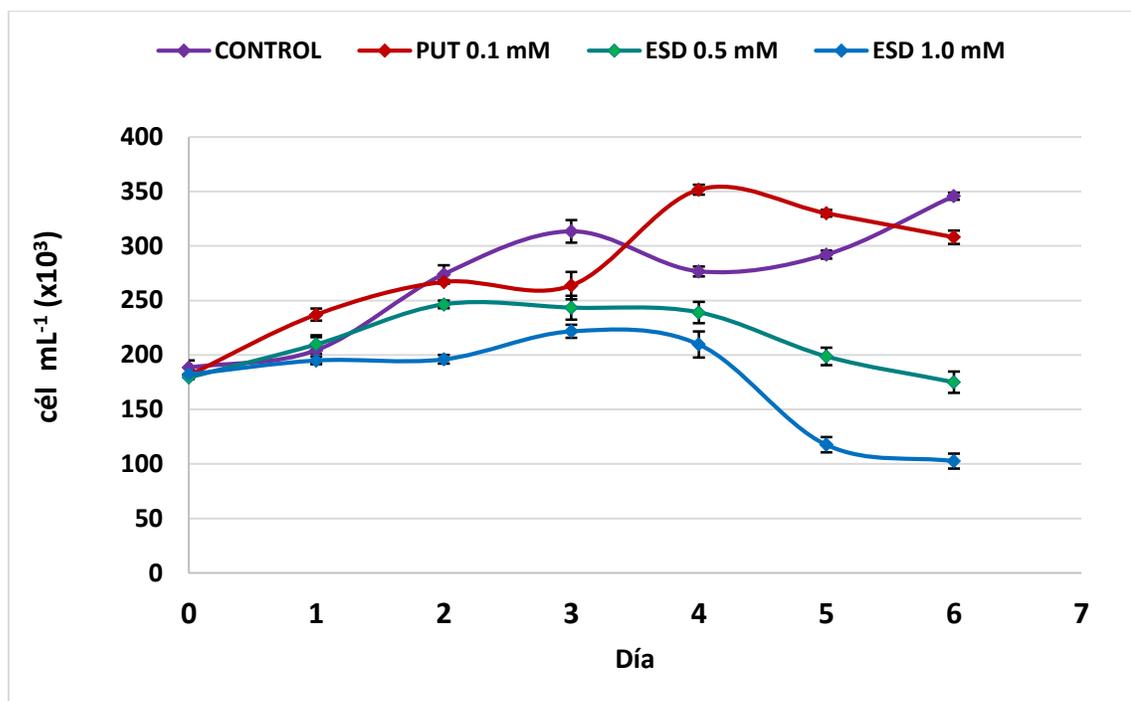
**Figura 14.** Detección de astaxantina en unidades de absorbancia a 490 nm en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis* cultivada a 200, 400 y 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con las poliaminas putrescina (PUT) y espermidina (ESD) a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM) con y sin fuente de nitrógeno en el medio. Las barras verticales indican la desviación estándar.

### 3.2.2 Escalamiento de cultivos a 500 ml para la producción de biomasa

Con todos los resultados obtenidos y lo observado durante el experimento preliminar se seleccionó la concentración de nitrógeno y la intensidad de luz que más favoreciera la producción de astaxantina. De los tratamientos propuestos inicialmente se seleccionaron tres: PUT al 0.1 mM y ESD a 0.5 y 1.0 mM, con la intensidad de luz a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y dejando a los cultivos sin fuente de nitrógeno. En estas condiciones se realizó un nuevo experimento escalando los cultivos a un volumen de 500 ml para evaluar la composición bioquímica.

En la figura 15 se muestran los resultados de la densidad celular de *H. pluvialis* cultivada a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con las poliaminas PUT y ESD a diferentes concentraciones obtenidas mediante recuentos celulares. En los cultivos se tuvieron variaciones en la densidad celular de *H. pluvialis* a lo largo del tiempo (Figura 15 y anexo 3). En general, en el cultivo control se observó un incremento en la densidad celular conforme al

tiempo de cultivo, manteniéndose en fase de crecimiento lento, mismo comportamiento que se detectó en el tratamiento con PUT 0.1 mM. Por el contrario, en los cultivos donde se adiciono ESD, en la concentración de 0.5 mM hasta el día tres tuvo un aumento en número de células y posteriormente la densidad decayó, y en la concentración a 1.0 mM su densidad fue variando a lo largo del cultivo.

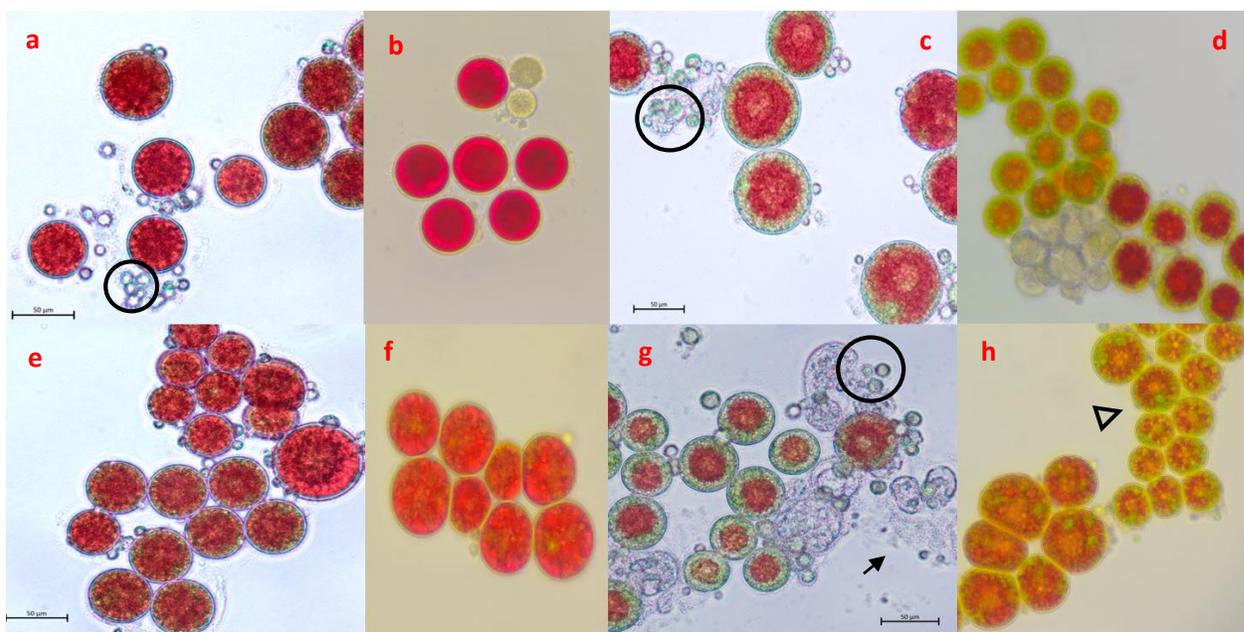


**Figura 15.** Curva de crecimiento con respecto al número de células por mililitro, obtenidos de los cultivos de *H. pluvialis* con adición de poliaminas a diferentes concentraciones (PUT = putrescina y ESD = espermidina) sin fuente de nitrógeno a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para la producción de astaxantina. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Al día cuatro los resultados mostraron que los cultivos con PUT 0.1 mM tuvieron la mayor influencia positiva en el aumento de biomasa de *H. pluvialis* durante la inducción a la carotenogénesis, donde se alcanzó su mayor concentración ( $352 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ), en el caso del cultivo control la mayor concentración se alcanzó al día seis de cultivo ( $346 \times 10^3 \text{ cél mL}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). En este día se observó el cultivo en fase de crecimiento lento, mientras que los demás tratamientos presentaron una disminución en la densidad celular. A partir del día cinco el control entró nuevamente en fase de crecimiento lento (anexo D) teniendo la mayor concentración al día seis, mientras que en los demás cultivos disminuyó la concentración celular.

En la figura 16 se observan fotografías de las células de *H. pluvialis* de los tratamientos al término del experimento (día seis), en la cual se muestra que las células con mayor concentración de pigmentos

carotenoides y con menor daño celular fueron en el control (Figura 16a y b) y en el tratamiento con PUT al 0.1 mM (Figura 16e y f), mientras que en los cultivos con los tratamientos de ESD al 0.5 y 1.0 mM, se obtuvo una menor concentración de carotenoides (ESD al 0.5 mM Figura 16c y d, ESD 1.0 mM Figura 16g y h) y un mayor daño celular, además de una apariencia turbia en el medio de cultivo.



**Figura 16.** Células de *H. pluvialis* (40x) cultivadas con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) sin fuente de nitrógeno en el medio a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  al día seis de cultivo, a y b) control, c y d) ESD 0.5 mM, e y f) PUT 0.1 mM, g y h) ESD 1.0 mM. (○) Célula con pared rota (liberando los pigmentos al medio), (△) células de *Haematococcus* sin material celular dentro, células pameloides con producción de carotenoides (circulo) y aplanosporas (color rojo).

### 3.2.3 Composición proximal

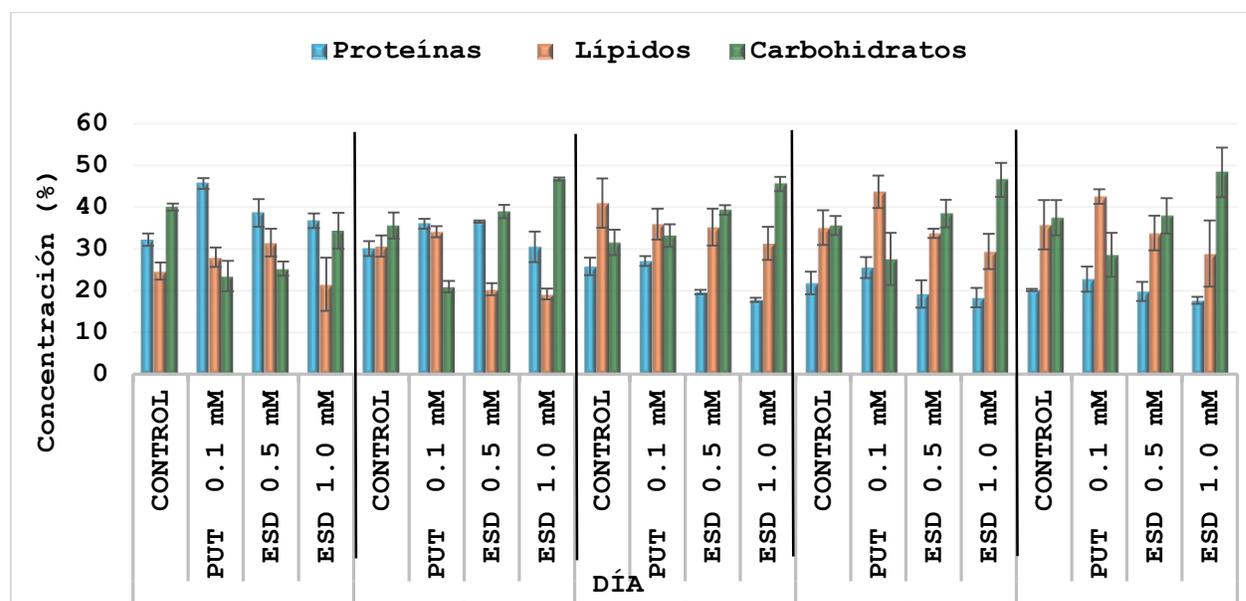
Los resultados de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de *H. pluvialis*, se expresan en base al porcentaje del peso seco total de la microalga obtenido con los diferentes tratamientos (Figura 17 y anexo E).

De acuerdo con los resultados en el porcentaje de proteínas entre los medios de cultivo para cada día (Figura 17), se encontraron diferencias significativas entre los cultivos desde el día uno con la mayor concentración en el cultivo con PUT al 0.1 mM (46 %), al día dos los mayores porcentajes se obtuvieron con la adición de PUT 0.1 mM y ESD 0.5 mM (36 y 37 % respectivamente), en el tercer día los cultivos con mayor concentración fueron el control y PUT 0.1 mM (26 y 27 % respectivamente), y en los días cuatro y cinco los mayores porcentajes se obtuvieron en los tratamientos con PUT al 0.1 mM (26 y 23 %

respectivamente), ESD 0.5 mM (19 y 20 % respectivamente) y el control (22 y 20 % respectivamente) ( $p < 0.05$ ).

Al analizar de forma individual el porcentaje de proteínas de *H. pluvialis* en cada tratamiento con respecto al tiempo de cultivo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en general hubo una disminución con respecto al tiempo teniendo la menor concentraciones a partir del día tres de cultivo, la mayor concentración alcanzada en todos los tratamientos se obtuvo al día uno y la menor al día cinco.

Comparando el porcentaje de lípidos acumulados en las células de *H. pluvialis* entre los medios de cultivo para cada día (Figura 17), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al día tres el mayor porcentaje se obtuvo en los cultivos control y PUT 0.1 mM (31 y 34 % respectivamente), y en los días cuatro y cinco la mayor concentración se encontró en el cultivo con PUT 0.1 mM (44 y 43 % respectivamente). En los demás días no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 17.** Composición proximal (% con base en el peso seco total) de *H. pluvialis* en la inducción a la carotenogénesis cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) sin fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones e intensidad de luz de  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar.

Al analizar el porcentaje de lípidos de cada tratamiento con respecto al tiempo de cultivo, en general se observa un incremento al paso del tiempo, en el cultivo control el mayor porcentaje alcanzado se encontró en el día tres (41 %) (Figura 17), en el cultivo con PUT 0.1 mM los mayores valores detectados fueron en los días cuatro (44 %) y cinco (43 %) ( $p < 0.05$ ), y con ESD 0.5 y 1.0 mM los porcentajes se mantuvieron similares con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ) excepto en el primer día para ESD 0.1 mM y el día dos de cultivo

donde se presentaron las concentraciones más bajas, con porcentaje promedio de 20.3 % ( $p < 0.05$ ).

En los resultados del análisis de carbohidratos de cada tratamiento con respecto al tiempo de cultivo, en el control no se observa un patrón definido a través de los días, con la mayor concentración al día uno (40 %), posteriormente el contenido de carbohidratos disminuyó hasta el día tres de cultivo en el cual alcanzó su menor concentración (32 %), después no hubo diferencias en los niveles de carbohidratos ( $p > 0.05$ ). En el tratamiento con la adición de PUT 0.1 mM, la mayor concentración se obtuvo en los días tres al cinco, con una concentración promedio de 30 %. Por otra parte, en los tratamientos con ESD 0.5 y 1.0 mM hubo un incremento del primer día con 25 % y 34 %, al segundo día con 39 % y 47 %, respectivamente ( $p < 0.05$ ), y posteriormente no hubo diferencias significativas en los niveles de carbohidratos, alcanzando las mayores concentraciones al día dos en el cultivo con ESD 0.5 mM (39 %) y en el cultivo con ESD 1.0 mM al día cinco (48 %) (Figura 17).

Para el análisis entre los medios de cultivo para cada día durante la inducción (Figura 17), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos. Al día uno, el mayor porcentaje fue en el cultivo control (40 %) y en el resto de los días la mayor concentración se obtuvo en el cultivo con ESD 0.1 mM.

### 3.2.4 Pigmentos

El contenido de los pigmentos identificados en cada uno de los tratamientos se resume en la tabla 3. Se incluyen los contenidos de carotenoides totales, astaxantina y clorofila total para cada uno de los tratamientos evaluados ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

En general en todos los cultivos se observó un incremento de los carotenoides totales con respecto al tiempo, en el caso del control, el incremento del día uno al cinco fue de  $10.6 \text{ mg g}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ), con la poliamina PUT 0.1 mM fue de  $9.9 \text{ mg g}^{-1}$  y con ESD 0.5 mM, aunque con un valor menor, también se obtuvo un incremento de  $5.8 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que con ESD 1.0 mM se observó el menor incremento ( $1.7 \text{ mg g}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). En la comparación de los carotenoides entre tratamientos por cada día de cultivo, se observaron las mayores concentraciones en el control en los días dos al cuatro, con un promedio de  $10.3 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que las concentraciones significativamente más bajas fueron con el tratamiento de ESD 1.0 mM, con un promedio de  $4.6 \text{ mg g}^{-1}$  en los días dos al cinco ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3; Figura 18).

Con respecto al contenido de astaxantina, se encontraron las mayores concentraciones en el día cinco,

con el tratamiento con PUT 0.1 mM ( $11.2 \text{ mg g}^{-1}$ ), y el control ( $11.5 \text{ mg g}^{-1}$ ), sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). En el día 3 con PUT también fue similar al control ( $8.0 \text{ mg g}^{-1}$  y  $6.8$ , respectivamente). En el día uno no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En los días dos y cuatro, el control presentó los valores más altos ( $5.5$  y  $8.9 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente).

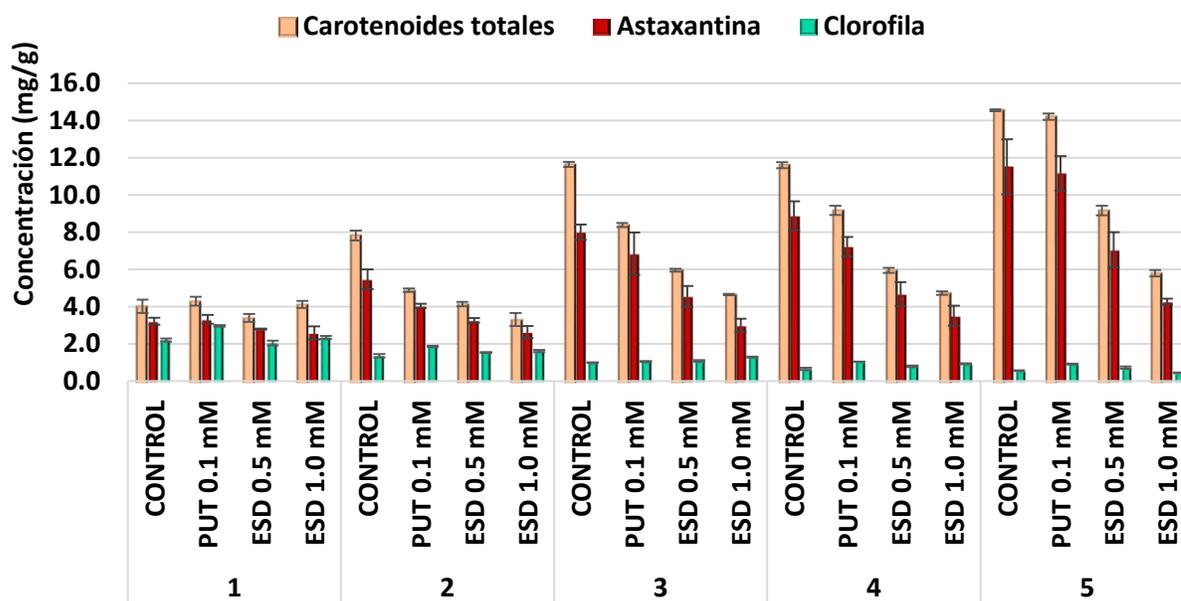
**Tabla 3.** Contenido promedio de pigmentos en  $\text{mg g}^{-1}$  obtenidos en el cultivo de *H. pluvialis* cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Desviación estándar entre paréntesis. Los superíndices con números muestran las diferencias en pigmentos con respecto al tiempo y los subíndices con letras marcan las diferencias entre los tratamientos para cada día ( $p < 0.05$ ).

Día	Tratamiento	Carotenoides totales	Astaxantina	Clorofilas
1	CONTROL	4.0 (0.3) <sup>4</sup> ab	3.2 (0.2) <sup>4</sup>	2.2 (0.4) <sup>1</sup> b
	PUT 0.1 mM	4.3 (0.4) <sup>3</sup> a	3.3 (0.4) <sup>3</sup>	3.0 (0.2) <sup>1</sup> a
	ESD 0.5 mM	3.4 (0.3) <sup>3</sup> b	2.8 (0.7) <sup>3</sup>	2.0 (0.2) <sup>1</sup> b
	ESD 1.0 mM	4.1 (0.4) <sup>23</sup> ab	2.6 (0.2) <sup>3</sup>	2.3 (0.2) <sup>1</sup> b
2	CONTROL	7.8 (0.7) <sup>3</sup> a	5.5 (0.3) <sup>3</sup> a	1.4 (0.3) <sup>2</sup>
	PUT 0.1 mM	4.9 (0.3) <sup>3</sup> b	4.0 (0.4) <sup>3</sup> b	1.9 (0.1) <sup>2</sup>
	ESD 0.5 mM	4.1 (0.6) <sup>3</sup> c	3.3 (0.4) <sup>3</sup> c	1.5 (0.1) <sup>2</sup>
	ESD 1.0 mM	3.3 (0.4) <sup>3</sup> d	2.6 (0.4) <sup>3</sup> c	1.6 (0.3) <sup>2</sup>
3	CONTROL	11.6 (0.6) <sup>2</sup> a	8.0 (0.7) <sup>2</sup> a	1.0 (0.1) <sup>23</sup> b
	PUT 0.1 mM	8.4 (1.1) <sup>2</sup> b	6.8 (0.7) <sup>2</sup> a	1.1 (0.1) <sup>3</sup> ab
	ESD 0.5 mM	6.0 (0.6) <sup>2</sup> c	4.6 (0.4) <sup>2</sup> b	1.1 (0.1) <sup>23</sup> ab
	ESD 1.0 mM	4.7 (0.7) <sup>23</sup> d	3.0 (0.5) <sup>23</sup> c	1.3 (0.0) <sup>23</sup> a
4	CONTROL	11.6 (1.3) <sup>2</sup> a	8.9 (0.1) <sup>2</sup> a	0.7 (0.2) <sup>3</sup>
	PUT 0.1 mM	9.2 (1.0) <sup>2</sup> b	7.2 (0.5) <sup>2</sup> b	1.0 (0.2) <sup>3</sup>
	ESD 0.5 mM	6.0 (0.9) <sup>2</sup> c	4.7 (0.3) <sup>2</sup> c	0.8 (0.1) <sup>3</sup>
	ESD 1.0 mM	4.7 (0.7) <sup>2</sup> d	3.5 (0.3) <sup>12</sup> d	0.9 (0.1) <sup>34</sup>
5	CONTROL	14.6 (2.3) <sup>1</sup> a	11.5 (0.2) <sup>1</sup> a	0.6 (0.1) <sup>3</sup> ab
	PUT 0.1 mM	14.2 (1.3) <sup>1</sup> a	11.2 (0.2) <sup>1</sup> a	0.9 (0.2) <sup>3</sup> a
	ESD 0.5 mM	9.2 (0.8) <sup>1</sup> b	7.1 (0.2) <sup>1</sup> b	0.7 (0.3) <sup>3</sup> ab
	ESD 1.0 mM	5.8 (0.2) <sup>1</sup> c	4.3 (0.0) <sup>1</sup> c	0.5 (0.2) <sup>4</sup> b

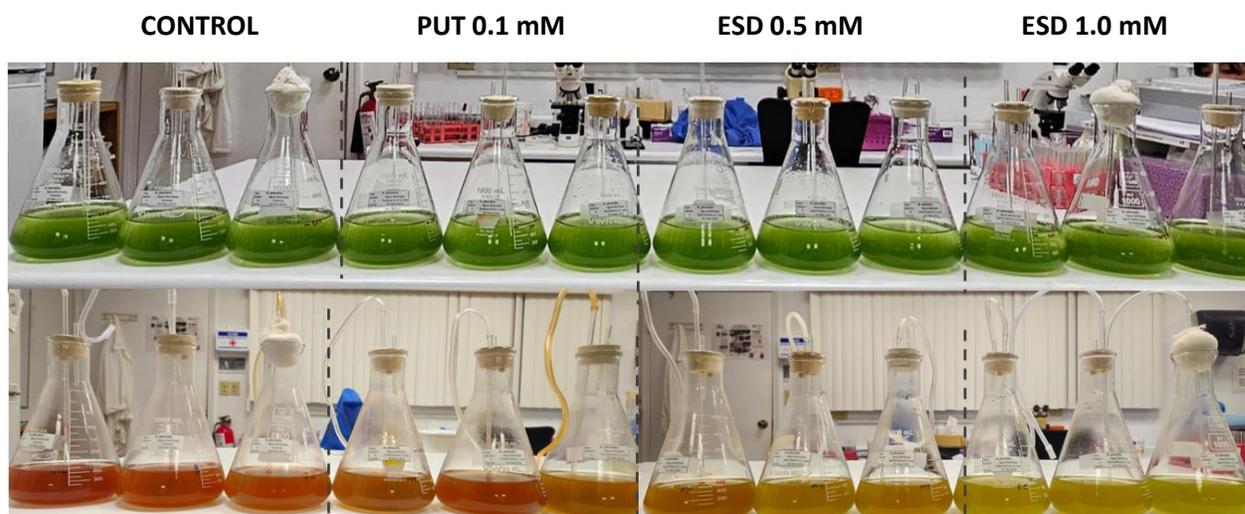
En la comparación del contenido de astaxantina en cada tratamiento a través del tiempo, se observó en el control un incremento del primer día ( $3.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) al día cinco ( $11.5 \text{ mg g}^{-1}$ ) ( $p < 0.5$ ). En el tratamiento con PUT 0.1 mM, el incremento se observó del día dos al tres ( $5.5$  y  $8.0 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente) y en el día cinco ( $11.2 \text{ mg g}^{-1}$ ), en los demás tratamientos, el incremento del carotenoide se observó del día dos al tres y del cuatro al cinco. Las menores concentraciones en todos los tratamientos fueron en los dos primeros días de cultivo de *H. pluvialis*.

En el caso del contenido de clorofilas en cada tratamiento a través del tiempo, se observó una relación inversa a lo que se presentó en la astaxantina, con un decremento del día uno al tres y posteriormente no hubo diferencias significativas en la concentración de clorofilas del día tres al cinco con ninguno de los

tratamientos. En la comparación de los tratamientos para cada día de cultivo, solo en el primer día se observó la mayor concentración de clorofilas de  $3.0 \text{ mg g}^{-1}$  en el tratamiento con PUT 0.1 mM, en los demás días no se observó una diferencia clara entre tratamientos.



**Figura 18.** Contenido promedio de pigmentos en  $\text{mg g}^{-1}$  obtenidos en el cultivo de *H. pluvialis* (% en base al peso seco total) cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las barras verticales indican la desviación estándar.



**Figura 19.** Fotografías de los cultivos en la inducción a la carotenogénesis de *H. pluvialis* cultivada a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con las poliaminas putrescina y espermidina a diferentes concentraciones en los días cero (superior) y tres (inferior) de cultivo.

En la figura 19 se muestran los cultivos de *H. pluvialis* al día cero (inicial) y tres de cultivo. En donde se pueden observar las diferencias en las tonalidades de los cultivos en inducción a la carotenogénesis. En los cultivos control se muestra un color rojizo, una tonalidad marrón-rojizo en los cultivos con el tratamiento de PUT 0.1 mM, color marrón en el cultivo con ESD 0.5 mM y un color amarillo-naranja con ESD 1.0 mM. Además, se observó que la coloración es más intensa en los tratamientos control y PUT 0.1 mM.

## Capítulo 4.      Discusión

---

En la actualidad, la microalga *H. pluvialis* es considerada como el mayor productor de astaxantina natural, carotenoide de alto valor económico y el mejor antioxidante, siendo 38 veces más potente que el  $\beta$ -caroteno y 100 veces más efectiva que la vitamina E (Pan-utai *et al.*, 2017; Nishida *et al.*, 2023). La astaxantina participa en la reducción y estabilización en la eliminación de radicales libres, ayudando así a la prevención de la oxidación y en el bienestar general (Galarza *et al.*, 2023).

El efecto antioxidante de la astaxantina, procedente de fuente natural, es de 20 a 90 veces más que el de su contraparte sintética (BGG World, 2023), lo cual le confiere una amplia variedad de aplicaciones en humanos y animales, en las industrias alimentaria, cosmética, nutricional y farmacéutica, lo que ha motivado un aumento en la demanda de astaxantina natural.

*H. pluvialis*, siendo el mayor productor de astaxantina natural se ha convertido en una fuente comercial importante, por lo que se han incrementado los estudios para determinar las condiciones óptimas para su crecimiento y síntesis de este carotenoide. De acuerdo con la literatura, se ha demostrado que la adición de poliaminas de forma exógena promueve el crecimiento de algunas microalgas (Tassoni *et al.*, 2018), por lo cual en este trabajo se ensayó el efecto de la adición de poliaminas de manera exógena tratando de aumentar la tasa de crecimiento de *H. pluvialis* y la producción del pigmento astaxantina.

Los resultados de las densidades celulares de *H. pluvialis*, obtenidos durante el experimento preliminar en los tratamientos con la adición de tres poliaminas (PUT, ESD y ESM) a tres concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 mM), demuestran que la adición de ESM de manera exógena en concentraciones superiores a 0.1 mM presenta un efecto citotóxico en el cultivo de *H. pluvialis* en etapa vegetativa. Estas observaciones son consistentes con lo publicado por Theiss *et al.* (2002; 2004) donde reportaron que la adición de ESM (en concentraciones superiores a 0.3 mM) en cultivos de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, inhibió el crecimiento celular, 8 h después del comienzo de la fase de luz (régimen de 14 h de luz/10 h de oscuridad), daño que pudo revertirse mediante la adición posterior de PUT o ESD. En ese trabajo se encontró también que la adición de ESM exógena causó una disminución en la actividad de la ODC y los niveles de PUT y ESD intracelulares afectando negativamente la transición a la fase de división celular.

Resultados similares fueron obtenidos por Treves *et al.* (2017), quienes cultivaron *C. ohadii* en fotobiorreactores en un rango de temperatura de 15 – 40 °C con intensidades de luz que iban desde la oscuridad hasta 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  más la adición de espermina 0.1 mM de forma exógena, los autores

observaron que la poliamina ralentizó el crecimiento en la fase I (crecimiento exponencial) de su cultivo. Estos reportes coinciden con los resultados de este estudio, lo que indica un efecto tóxico de la espermina el cual podría deberse a que la adición exógena de ESM en altas concentraciones provoque cambios estructurales en la membrana del tilacoide y reduce la cantidad de clorofila como ha sido reportado por otros autores (Beigbeder *et al.*, 1995).

Por otra parte, durante los experimentos en etapa vegetativa (tanto en placa como en el escalamiento), se observó que la adición de las poliaminas PUT y ESD de manera exógena en el medio de cultivo mejoró la tasa de crecimiento de *H. pluvialis*, lo cual concuerda con lo reportado en otras investigaciones, donde se ha publicado que la adición de PUT y ESD al medio de cultivo recolectado del medio natural, aumentó la biomasa de la cianobacteria *Mycrocystis aeruginosa* (Maestrini *et al.*, 1999). Además, se describe que la ESD en concentraciones bajas (0.1 – 0.3 mM) mejoró significativamente la tasa de crecimiento al ser adicionadas al cultivo de *Chlorella* a una alta concentración de CO<sub>2</sub> (15%) y una alta intensidad de luz (405  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Zhang *et al.*, 2019).

Así mismo se ha publicado que la adición de PUT 0.1 mM tiene un impacto positivo en el crecimiento de *C. ohadii*, estimula el crecimiento al ser adicionada durante el crecimiento exponencial (fase I) y ocasiona que el retraso del crecimiento sea más corto al adicionar poliaminas en la fase II (crecimiento lento) y la tasa de crecimiento ascendente observada normalmente en la fase III (crecimiento exponencial adicional) se alcanzó mucho antes (Treves *et al.*, 2017). Además, en otra investigación se documentó que la adición de PUT al 0.5 mM de forma exógena al medio de cultivo, estimuló el crecimiento celular de *H. pluvialis* en la etapa verde (González-Ibarra, 2021).

Se sabe que las poliaminas interactúan con el ADN y el ARN, por lo tanto, pueden estar involucradas en numerosas funciones como la replicación celular (Bordenave *et al.*, 2019), esto puede estar relacionado con los resultados obtenidos en este trabajo, sobre el impacto de las poliaminas en la densidad celular de *H. pluvialis* en etapa vegetativa, donde la adición de PUT y ESD mostró un efecto positivo en concentraciones de 0.1 a 0.5 mM en el caso de la PUT y en concentraciones bajas de ESD (0.1 mM), ya que a 0.5 mM el efecto se volvió negativo a los siete días en las condiciones probadas. El mismo efecto fue observado en otros estudios, donde los autores encontraron que la adición de poliaminas (PUT, ESD, ESM) dentro del rango de concentración de 0.001 – 0.1 mM estimula el crecimiento, pero a una concentración de 1.0 mM muestran un efecto tóxico en las células de *C. vulgaris* (Czerpak *et al.*, 2003). Theiss *et al.* (2004), reportaron que al adicionar concentraciones superiores a 0.3 mM de ESD y 1.5 mM de PUT tienen un efecto tóxico en las células de *C. reinhardtii*.

Se sugiere que en las microalgas verdes la secuencia de eventos que relaciona la biosíntesis de poliaminas con la división celular es la siguiente: aumento de la actividad de la ODC, acumulación de poliaminas, replicación del ADN y liberación de autoesporas (Cohen *et al.*, 1983).

De acuerdo con los resultados de la composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de la microalga *H. pluvialis* en la etapa vegetativa obtenidos con los diferentes tratamientos, se plantea que la adición de poliaminas estimula el contenido de proteínas en esta microalga durante los primeros días de cultivo (hasta el día cinco), esta respuesta fue superior con respecto al control. Esta observación también fue reportada por Czerpak *et al.* (2003) donde los autores encontraron que la adición de poliaminas dentro del rango de concentración 0.001 – 0.1 mM estimula el contenido de proteínas en *C. vulgaris*.

Al comparar los resultados del contenido de proteínas se detectó que los porcentajes obtenidos son similares a lo reportado para la composición típica de *H. pluvialis* en etapa vegetativa (26 – 44 %) (Ba *et al.*, 2016). En cuanto a la disminución observada en el tratamiento ESD 0.5 mM al final del cultivo puede ser explicada por la fase de muerte en el cultivo y el daño que presentaron las células de *H. pluvialis*.

La adición de poliaminas aumentó el contenido de lípidos en *H. pluvialis* al entrar en fase de crecimiento lento (24 – 42 %) para los días seis y siete de cultivo. Aunque estos porcentajes son mayores en comparación con el contenido típico de lípidos en *H. pluvialis* reportado en la literatura (16 – 25 %) (Ba *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2023). Esto podría ser debido a que las muestras analizadas en estos estudios corresponden a cultivos en fase de crecimiento exponencial, obteniendo así porcentajes similares a los de la fase exponencial (16 – 30 %) de cada uno de los cultivos de este experimento.

El menor contenido de carbohidratos fue durante los primeros días de cultivo en los medios donde se adicionaron poliaminas, efecto esperado, ya que al tener altas tasas de crecimiento en estos cultivos, el contenido de carbohidratos disminuye y la célula se centra en producir mayor contenido de proteínas para su replicación (Raja *et al.*, 2023), esta disminución difiere a lo reportado anteriormente, ya que en otra investigación el adicionar PUT, ESD y ESM (0.001 – 0.1 mM) estimuló la producción de monosacáridos (Czerpak *et al.*, 2003). A pesar de la disminución en el porcentaje de carbohidratos con la adición de poliaminas, los resultados obtenidos a lo largo del cultivo son similares a lo reportado en la literatura para composición típica de *H. pluvialis* (15 – 37 %) (Ba *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2023).

En cuanto al cultivo de *H. pluvialis* en la etapa vegetativa, la adición de poliaminas en el medio tuvo un efecto positivo en la fase exponencial (mayor producción de biomasa y de proteínas). Aunque, para

obtener un mayor contenido de proteínas, la mejor alternativa sería adicionar ESD a 0.1 mM, ya que en concentraciones altas de esta poliamina se presenta un efecto citotóxico en *H. pluvialis*, mientras que con PUT el contenido de proteínas fue mayor que el control, pero menor que con ESD.

De acuerdo con lo observado en el experimento de inducción a la carotenogénesis a nivel de placa multipozos, la intensidad de luz tiene un efecto significativo sobre la densidad óptica a 650 nm (contenido de clorofilas) y a 476 nm (contenido de carotenoides) teniendo la mayor concentración a 200, 600 y 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Visiblemente se observaron diferencias en la tonalidad de los cultivos con y sin fuente de nitrógeno en el medio, detectando mayor intensidad en la tonalidad café-rojiza en los cultivos sin nutrientes.

La adición de poliaminas tuvo un efecto sobre la absorbancia obtenida a 476 nm, obteniendo mayor concentración en los cultivos donde se adicionó ESD en todas las concentraciones probadas, siendo mayor la absorbancia conforme aumentaba la concentración ESD en el medio. En cuanto a la adición de PUT se detectó que a altas intensidades de luz ésta indujo daño celular y una apariencia turbia en el cultivo, este efecto se incrementó conforme aumentó la concentración de la poliamina en el medio de cultivo.

La astaxantina producida se vio afectada por la intensidad de luz a la que fue cultivada *H. pluvialis*, obteniendo la mayor concentración a 600 y 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , también se detectó que la falta de nutrientes mejora la inducción a la carotenogénesis tal como ha sido reportado anteriormente (Scibilia *et al.*, 2015; Oslan *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). En las placas multipozos se observó que la adición y concentración de poliaminas provocó cambios en la producción de este pigmento, la mayor producción se obtuvo con ESD y se detectó que a mayor concentración de ESD, mayor era la producción de astaxantina, mientras que con PUT este efecto era inversamente proporcional, aunque los niveles obtenidos con la adición de poliaminas no lograron ser mayores a los obtenidos en los cultivos control. Esto puede deberse a que el efecto protector que le confieren las poliaminas a la microalga provoque que las células no detecten la necesidad de aumentar la producción de carotenoides y especialmente astaxantina como pigmento protector, ya que de acuerdo a la literatura, tanto en plantas como en algas las poliaminas desempeñan papeles fundamentales en la protección contra el estrés abiótico incluido el estrés lumínico, aunque el papel de las poliaminas en los cloroplastos no se entiende completamente, se sabe que la aplicación exógena de estas estabilizan las membranas de los tilacoides (Kotzabasis *et al.*, 1993) y ayudan a ajustar la tasa fotosintética durante condiciones de estrés (Sfichi-Duke *et al.*, 2008; Takahashi & Kakehi, 2010; Lin & Lin, 2018).

En el experimento de inducción a la carotenogénesis en *H. pluvialis* cultivada a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con las poliaminas PUT y ESD a diferentes concentraciones en un volumen de 500 ml, los resultados de la densidad celular mostraron que a diferencia de lo observado a nivel de cultivo de 2.5 ml, la adición de ESD a 0.5 y 1.0 mM tuvo un efecto citotóxico ya que se detectó mayor daño celular que el obtenido con la adición de PUT 0.1 mM y en el control, lo que ocasionó además, una apariencia turbia en estos cultivos. Esta discrepancia puede deberse a que al tener los cultivos con poco volumen en placas multipozos, las células se mantuvieron estáticas la mayor parte del cultivo, lo cual no ayudó a que todas las células del cultivo interactuaran con el medio de forma uniforme y un posible efecto de sombreado, lo que tal vez provocó un efecto no replicable en cultivos con aireación continua, la cual le da aporte de  $\text{CO}_2$ , mayor recepción de luz y mejor disponibilidad de nutrientes.

La adición de PUT probablemente protegió a las células durante los primeros cuatro días de la inducción, ya que la densidad celular se incrementó a través del tiempo a pesar de no contar con nutrientes en el medio, lo cual podría indicar que la microalga utilizó a la PUT como fuente de carbono y nitrógeno tal como es utilizado en el medio marino en donde las poliaminas representan una fuente importante de nitrógeno orgánico disuelto (Liu *et al.*, 2016; Lin & Lin, 2018).

En cuanto al efecto de las poliaminas sobre la composición proximal de *H. pluvialis* en esta etapa, se observó que su adición no influye en las tendencias de cambio predecibles en esta microalga durante la inducción a la carotenogénesis, los cuales de acuerdo con la literatura son un decremento de los niveles de proteínas y un aumento en la concentración de lípidos y carbohidratos, ya que las células de la microalga entran a fase estacionaria como protección al estrés lumínico y la falta de nutrientes (Sun *et al.*, 2018; Raja *et al.*, 2023), efectos que fueron observados durante este ensayo.

Los resultados de la composición proximal obtenidos son consistentes con lo publicado por Dragos *et al.* (2010) donde indujeron a las células de *H. pluvialis* a la carotenogénesis con alta intensidad de Luz ( $630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante diecisiete días, y con lo reportado en la literatura para composición típica de *H. pluvialis* (15 – 37 %) (Álvarez *et al.*, 2020; Raja *et al.*, 2023).

El incremento en la producción de carotenoides totales y astaxantina en todos los cultivos, durante la inducción a la carotenogénesis, fue lo esperado, ya que estos actúan como pigmentos fotosintéticos que protegen a la célula del estrés lumínico (Manzoni *et al.*, 2021). Los tratamientos donde se dio la mayor concentración de estos carotenoides durante todo el experimento fueron con el control y PUT 0.1 mM, lo cual coincide con lo observado en el recuento celular donde con estos tratamientos se obtuvieron las

mayores densidades. En el caso de PUT, su adición a diferencia de lo observado en las placas multipozos, además de ayudar al incremento celular, podría tener efecto protector en las células contra el estrés lumínico, ya que se ha demostrado que la PUT endógena está presente en los complejos antena, ayuda a estabilizar las membranas tilacoides y a modular la tasa fotosintética (Kotzabasis *et al.*, 1993; Beigbeder *et al.*, 1995).

Otros autores han demostrado que durante el estrés salino la adición exógena de poliaminas ayuda a revertir el daño causado en el complejo antena y la tasa fotosintética durante condiciones de estrés, permitiendo además el crecimiento celular, efecto que podría estar ocurriendo durante el estrés lumínico en *H. pluvialis* (Demetriou *et al.*, 2007; Sfichi-Duke *et al.*, 2008; Lin & Lin, 2018). También se ha documentado que la adición exógena de ESD (0.03 – 0.3 mM) tiene un efecto reparador en el sistema fotosintético de las microalgas, además de disminuir el estrés oxidativo (mejora la actividad de las enzimas antioxidantes) causado por las altas intensidades de luz (Zhang *et al.*, 2019). Lo antes mencionado difiere con lo observado durante este ensayo ya que los cultivos donde se adicionó ESD se detectaron células dañadas, lo cual podría deberse a que en este trabajo se utilizaron concentraciones mayores (0.5 y 1.0 mM) a lo publicado.

En relación con la producción de carotenoides al finalizar este experimento, se detectó que las concentraciones obtenidas en todos los cultivos (0.43 – 1.09 %) son similares a lo obtenido en otra investigación, en la cual también se probó la limitación de nitrógeno y alta intensidad de luz ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Escuredo-Vielba, 2014), superando los porcentajes obtenidos por esta autora al final del cultivo (en el día dieciséis de cultivo) en los cultivos control y PUT 0.1 mM al día cinco, lo cual podría deberse a que en este experimento se utilizó el doble de la intensidad de luz, lo que tal vez ocasionó mayor estrés y por ende mayor producción de carotenoides. Por otra parte, los resultados obtenidos son menores a los publicados por Saha *et al.* (2013), lo cual podría deberse a que estos autores limitaron el cultivo de nitrógeno y fosforo, así como un mayor tiempo de inducción (trece días) al utilizado en este estudio.

En el caso de la producción de astaxantina, al compararla con otras investigaciones en donde se trabajó con limitación de nutrientes y alta intensidad de luz ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se observó que los porcentajes obtenidos son similares a los publicados por Nava-Gómez (2017), pero son menores a lo reportado por Zhang *et al.* (2018) los cuales reportan lo doble a lo obtenido en este trabajo. Las diferencias pueden ser debidas a los volúmenes de cultivo empleados en estas investigaciones y a la duración del cultivo ya que estos autores contemplaron el doble de tiempo que fue utilizado en este ensayo. Otros estudios donde trabajaron con altas intensidades luz ( $282$  y  $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Cruz-Jiménez, 2017; Grujić *et al.* 2022), han

reportado concentraciones menores a las obtenidas en este ensayo, lo cual podría corroborar que la deficiencia de nutrientes es un factor importante para la acumulación de astaxantina.

En cuanto a los resultados obtenidos de clorofilas en *H. pluvialis* durante la inducción a la carotenogénesis, se observó que el contenido en los tratamientos es inversamente proporcional al contenido de carotenoides, donde se tuvo una disminución en el contenido de clorofilas con respecto al tiempo en todos los cultivos, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Raja *et al.*, 2023), y es debido a que la deficiencia de nitrógeno inhibe la biosíntesis de clorofilas de *H. pluvialis* y promueve la degradación de clorofila b (Cakmak *et al.*, 2012; Scibilia *et al.*, 2015). Las mayores concentraciones de clorofilas obtenidas con PUT 0.1 mM, ESD (0.5 mM) y el control al final del cultivo, indica que la adición de estas poliaminas a la concentración mencionada no tiene un efecto sobre los niveles de clorofilas en *H. pluvialis*, pero al aumentar la concentración de ESD (1.0 mM) induce la disminución en la concentración de estas, siendo significativamente menor a los demás tratamientos, lo cual difiere con lo publicado anteriormente ya que algunos autores mencionan que la adición de ESD (0.03 – 0.3 mM) exógena, aumenta la síntesis de clorofilas bajo estrés lumínico (Zhang *et al.*, 2019). Esta diferencia podría deberse a la concentración agregada al medio de cultivo, ya que en el trabajo anterior la concentración era menor a la utilizada en este trabajo. A pesar de esta disminución los porcentajes de clorofilas obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura para la composición típica de *H. pluvialis* en células aplanosporas (Raja *et al.*, 2023).

De acuerdo con lo reportado en este trabajo, sobre la respuesta de *H. pluvialis* a la adición exógena de poliaminas en el medio se podría suponer que *H. pluvialis* contiene los genes que codifican a los transportadores de poliaminas, los cuales le dan la capacidad de captar las poliaminas exógenas presentes en el medio de cultivo, al igual que en otras microalgas, aunque no se han estudiado a profundidad los transportadores en este tipo de organismos (Lin & Lin, 2018). Además, a pesar de que *H. pluvialis* fue posiblemente capaz de absorber las poliaminas del ambiente no se sabe qué porcentaje de la concentración añadida fue integrada.

Aunque el conocimiento sobre el efecto de la adición exógena de poliaminas sobre el crecimiento en microalgas actualmente es escaso, de acuerdo con los resultados obtenidos, las poliaminas tienen un papel como posibles inductores de cambios metabólicos en las microalgas, pero la modulación de sus niveles influye en el crecimiento, la división celular, los perfiles de metabolitos (Treves *et al.*, 2017), la fotosíntesis (Lin & Lin, 2018), el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la replicación del DNA, las respuestas a factores estresantes y otras funciones fisiológicas (Majumdar *et al.*, 2017; Ball, 2019; Guasco, 2019).

## Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas futuras

---

Las hipótesis planteadas (1 y 2) fueron parcialmente probadas, ya que la adición de putrescina y espermidina promovieron el crecimiento celular, pero a altas concentraciones (0.5 y 1.0 mM) tuvieron un efecto negativo en las células de *H. pluvialis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se demuestra que el uso de las poliaminas putrescina y espermidina en concentraciones bajas (0.1 mM) estimulan el crecimiento celular, induciendo a un incremento de la biomasa de la microalga *H. pluvialis* y una mayor producción de proteínas en la etapa vegetativa durante los primeros días de cultivo, lo cual demuestra que esta especie tiene la capacidad de incorporar las poliaminas exógenas presentes en el medio de cultivo, sin embargo, se requieren estudios adicionales donde se pueda determinar la concentración que se integra en las células y las vías de absorción.

La adición de las poliaminas no mejora la producción de carotenoides totales ni de astaxantina en particular.

Como se ha descrito, dado que las poliaminas son componentes esenciales para el crecimiento de las microalgas, se recomienda realizar más investigaciones, principalmente sobre los genes relacionados con el transporte, el almacenamiento y la conjugación de las poliaminas con otras moléculas, así como los niveles de tolerancia de estas por las microalgas.

## Literatura citada

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo-Paredes, P., Torres, E. & Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións. DOI: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- An, G., Bielich, J., Auerbach, R., & Johnson, E. (1991). Isolation and Characterization of Carotenoid Hyperproducing Mutants of Yeast by Flow Cytometry and Cell Sorting. *Nature Biotechnology*, 9(1), 70-73. <https://doi.org/10.1038/nbt0191-70>
- Ba, F., Ursu, A. V., Laroche, C., & Djelveh, G. (2016). *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. *Bioresource Technology*, 200, 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.012>
- Ball, V. (2019). Electrodeposition from Tannic acid-polyamine blends at pH = 5.0 is due to aggregate deposition and oxidation. *Colloids And Surfaces A Physicochemical And Engineering Aspects*, 578, 123530. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.05.091>
- Bauer, A., & Minceva, M. (2021). Examination of Photo-, Mixo-, and Heterotrophic Cultivation Conditions on *Haematococcus pluvialis* Cyst Cell Germination. *Applied Sciences*, 11(16), 7201. <https://doi.org/10.3390/app11167201>
- Beigbeder, A., Vavadakis, M., Navakoudis, E., & Kotzabasis, K. (1995). Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B Biology*, 28(3), 235-242. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07113-g](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07113-g)
- BGG World. (2023). AstaZine® Astaxanthin. <https://bggworld.com/astaxanthin-astazinem/>
- 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>
- Bordenave, C. D., Mendoza, C. G., Bremont, J. F. J., Gárriz, A., & Rodríguez, A. A. (2019). Defining novel plant polyamine oxidase subfamilies through molecular modeling and sequence analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1361-z>
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., Elibol, Z., & Tekinay, T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology And Bioengineering*, 109(8), 1947-1957. <https://doi.org/10.1002/bit.24474>
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A. G. & Zárata, R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4297-4303.
- Coêlho, D. F., Tundisi, L. L., Cerqueira, K. S., Da Silva Rodrigues, J. R., Mazzola, P. G., Tambourgi, E. B., & De Souza, R. R. (2019). Microalgae: Cultivation Aspects and Bioactive Compounds. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 62. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>
- Cohen, E., Arad, S. M., Heimer, Y. H., & Mizrahi, Y. (1984). Polyamine Biosynthetic Enzymes in the Cell Cycle of *Chlorella*. *Plant Physiology*, 74(2), 385-388. <https://doi.org/10.1104/pp.74.2.385>

- Cruz-Jiménez, M. A. (2017). Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus* sp. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.]
- Czerpak, R., Bajguz, A., Piotrowska, A., Dobrogowska, R., Matejczyk, M., & Wiesławski, W. (2011). Biochemical activity of di- and polyamines in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72(1), 19-24. <https://doi.org/10.5586/asbp.2003.003>
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., & Kotzabasis, K. (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(4), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.02.020>
- 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/ac60111a17>
- Elisabeth, B., Rayen, F., & Behnam, T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical Reviews In Biotechnology*, 41(4), 457-473. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Escuredo-Vielba, R. (2014). Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]
- Espinoza E, F. M. (2017). Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados? *Ciencia*, 68 (2), 1-4. <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/MicroAlgas.pdf>
- Galarza, J. I., Zhunio, B. P., Arredondo-Vega, B. O., & Tomalá, S. R. (2023). Astaxantina: El antioxidante natural con múltiples beneficios para la salud. Una revisión. *Revista Científica Ecociencia*, 10(4), 1-23. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.104.782>
- Gherabli, A., Grimi, N., Lemaire, J., Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2023). Extraction of Valuable Biomolecules from the Microalga *Haematococcus pluvialis* Assisted by Electrotechnologies. *Molecules*, 28(5), 2089. <https://doi.org/10.3390/molecules28052089>
- Global Market Insights (2024). Astaxanthin Market Size & Share, Growth Analysis Report. Recuperado de [https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market?utm\\_source=globenewswire.com&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=Paid\\_globenewswire](https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market?utm_source=globenewswire.com&utm_medium=referral&utm_campaign=Paid_globenewswire)
- Gómez L., L. M. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3-16. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>
- González-Ibarra, M. A. E. (2021). Análisis *in silico* de los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas y efecto de la putrescina en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* [Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato].
- Grand View Research. (2023). Astaxanthin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Dried Algae Meal Or Biomass, Oil, Softgel, Liquid), By Source (Natural, Synthetic). Recuperado de <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/astaxanthin-market-162119410.html>

- Guasco H, C., Chávez S, J. L., Ferriz, R. A., de la Torre C, K., Elton P, E., & García G, T. (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(2), 51-57. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000200004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000200004&lng=es&tlng=es)
- Guiry, M. D. (2024). How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. *Journal Of Phycology*, 60(2), 214-228. <https://doi.org/10.1111/jpy.13431>
- Hu, C., Cui, D., Sun, X., Shi, J., & Xu, N. (2020). Primary metabolism is associated with the astaxanthin biosynthesis in the green algae *Haematococcus pluvialis* under light stress. *Algal Research*, 46, 101768. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101768>
- Incharoensakdi, A., Jantaro, S., Raksajit, W., & Mäenpää, P. (2010). Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response. ID: 41237288. <https://www.semanticscholar.org/paper/Polyamines-in-cyanobacteria%3A-biosynthesis%2C-and-Incharoensakdi-Jantaro/577e36418f0ea6cacd3d62e7f87f7fee7cdcccb6>
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.003>
- Johnson, E., & An, G. (1991). Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), 297-326. <https://doi.org/10.3109/07388559109040622>
- Kim, B., Lee, S., Narasimhan, A. L., Kim, S., & Oh, Y. (2022). Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: recent advances. *Bioresource Technology*, 343, 126124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126124>
- Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K. A., & Ghanotakis, D. (1993). Polyamines in the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 38(1), 83-88. <https://doi.org/10.1007/bf00015064>
- Lee, C., Jeon, M. S., Kim, J. Y., Lee, S. H., Kim, D. G., Roh, S. W., & Choi, Y. E. (2019). Effects of an auxin-producing symbiotic bacterium on cell growth of the microalga *Haematococcus pluvialis*: Elevation of cell density and prolongation of exponential stage. *Algal Research*, 41, 101547. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101547>
- Li, F., Cai, M., Wu, Y., Lian, Q., Qian, Z., Luo, J., Zhang, Y., Zhang, N., Li, C., & Huang, X. (2022). Effects of Nitrogen and Light Intensity on the Astaxanthin Accumulation in Motile Cells of *Haematococcus pluvialis*. *Frontiers In Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.909237>
- Li, K., Wang, W., & Xiao, W. (2023). Astaxanthin: A promising therapeutic agent for organ fibrosis. *Pharmacological Research*, 188, 106657. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106657>
- Lim, K. C., Yusoff, F. M., Shariff, M., & Kamarudin, M. S. (2019a). Dietary administration of astaxanthin improves feed utilization, growth performance and survival of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture Nutrition*, 25(6), 1410-1421. <https://doi.org/10.1111/anu.12961>
- Lim, K. C., Yusoff, F. M., Shariff, M., Kamarudin, M. S., & Nagao, N. (2019b). Dietary supplementation of astaxanthin enhances hemato-biochemistry and innate immunity of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture*, 512, 734339. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734339>

- Lin, H., & Lin, H. (2018). Polyamines in microalgae: Something borrowed, something new. *Marine Drugs*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.3390/md17010001>
- Liu, Q., Nishibori, N., Imai, I., & Hollibaugh, J. (2016). Response of polyamine pools in marine phytoplankton to nutrient limitation and variation in temperature and salinity. *Marine Ecology Progress Series*, 544, 93-105. <https://doi.org/10.3354/meps11583>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. & Randall, R. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, Q., Li, H., Zou, Y., Liu, H., & Yang, L. (2021). Astaxanthin as a microalgal metabolite for aquaculture: A review on the synthetic mechanisms, production techniques, and practical application. *Algal Research*, 54, 102178. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102178>
- Maestrini, S., Balode, M., Bechemin, C., & Purina, I. (1999). Nitrogenous organic substances as potential nitrogen sources, for summer phytoplankton in the Gulf of Riga, eastern Baltic Sea. *Plankton Biology & Ecology*, 46 (1), 8-17. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00173/28437/>
- Majumdar, R., Shao, L., Turlapati, S. A., & Minocha, S. C. (2017). Polyamines in the life of Arabidopsis: profiling the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene family during its life cycle. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1208-y>
- Manzoni M., M., Montenegro H., C. A., & Martínez J., A. (2021). Insights into Microalgae Culture Systems: A Critical review. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 25(5). <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Manzoni-Maroneze-et-al.-2021.pdf>
- Maoka, T. (2011b). Carotenoids in Marine Animals. *Marine Drugs*, 9(2), 278-293. <https://doi.org/10.3390/md9020278>
- MarketsandMarkets (2021). Astaxanthin Market by Source (Natural, Synthetic), Form (Dry, Liquid), Method of Production (Microalgae Cultivation, Chemical Synthesis, Fermentation), Application (Dietary Supplements, Food & Beverages, Cosmetics), and Region -Global Forecast to 2026). Recuperado de <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/astaxanthin-market-162119410.html>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*, 110, 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177>
- Nava-Gómez, B. (2017). Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]
- Nishida, Y., Berg, P., Shakersain, B., Hecht, K., Takikawa, A., Tao, R., Kakuta, Y., Urugami, C., Hashimoto, H., Misawa, N., & Maoka, T. (2023). Astaxanthin: Past, Present, and Future. *Marine Drugs*, 21(10), 514. <https://doi.org/10.3390/md21100514>

- Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. B., Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, *11*(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., & Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31297-6>
- Pan-utai, W., Parakulsuksatid, P., & Phomkaivon, N. (2017). Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *12*, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.004>
- Patel, A. K., Tambat, V. S., Chen, C. W., Chauhan, A. S., Kumar, P., Vadrade, A. P., Huang, C. Y., Dong, C. D., & Singhania, R. R. (2022). Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, *364*, 128030. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128030>
- Paterson, S., Gómez-Cortés, P., De la Fuente, M. A., & Hernández-Ledesma, B. (2023). Bioactivity and Digestibility of Microalgae *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. as Basis of Their Potential as Novel Functional Foods. *Nutrients*, *15*(2), 477. <https://doi.org/10.3390/nu15020477>
- Pradhan, B., Nayak, R., Patra, S., Jit, B. P., Ragusa, A., & Jena, M. (2020). Bioactive Metabolites from Marine Algae as Potent Pharmacophores against Oxidative Stress-Associated Human Diseases: A Comprehensive Review. *Molecules*, *26*(1), 37. <https://doi.org/10.3390/molecules26010037>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Narayanan, M., Kandasamy, S., & Jayappriyan, K. (2023). *Haematococcus: Biochemistry, Biotechnology and Biomedical Applications*. Springer Nature <https://doi.org/10.1007/978-981-99-2901-6>
- Rausch, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, *78*(3), 237-251. <https://doi.org/10.1007/bf00008520>
- Richmond, A (1986). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press. Florida. (1er edición).
- Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., & Murray, P. (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, *128*, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.049>
- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., & Ballottari, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, *12*, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2018). Algae in food: a general review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, *59*(21), 3538-3547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
- Sfichi-Duke, L., Ioannidis, N. E., & Kotzabasis, K. (2008). Fast and reversible response of thylakoid-associated polyamines during and after UV-B stress: a comparative study of the wild type and a mutant lacking chlorophyll b of unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Planta*, *228*(2), 341-353. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0741-1>

- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Sipaúba-Tavares, L. H., Berchielli-Morais, F. A., & Scardoeli-Truzzi, B. (2015). Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 796-803. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23013>
- Torres-Tijj, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, 41, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Sun, X., Ren, L., Zhao, Q., Ji, X., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology For Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
- Takahashi, T., & Kakehi, J. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals Of Botany*, 105(1), 1-6. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp259>
- Tassoni, A., Awad, N., & Griffiths, G. (2018). Effect of ornithine decarboxylase and norspermidine in modulating cell division in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology And Biochemistry*, 123, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.014>
- Theiss, C., Bohley, P., Bisswanger, H., & Voigt, J. (2004). Uptake of polyamines by the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and their effect on ornithine decarboxylase activity. *Journal Of Plant Physiology*, 161(1), 3-14. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00987>
- Theiss, C., Bohley, P., & Voigt, J. (2002). Regulation by Polyamines of Ornithine Decarboxylase Activity and Cell Division in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 128(4), 1470-1479. <https://doi.org/10.1104/pp.010896>
- Treves, H., Murik, O., Kedem, I., Eisenstadt, D., Meir, S., Rogachev, I., Szymanski, J., Keren, N., Orf, I., Tiburcio, A. F., Alcázar, R., Aharoni, A., Kopka, J., & Kaplan, A. (2017). Metabolic Flexibility Underpins Growth Capabilities of the Fastest Growing Alga. *Current Biology*, 27(16), 2559-2567.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.014>
- Tuan Harith, Z., Mohd Sukri, S., Remlee, N. F. S., Mohd Sabir, F. N., & Zakaria, N. N. A. (2022). Effects of dietary astaxanthin enrichment on enhancing the colour and growth of red tilapia, *Oreochromis* sp. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.06.001>
- Tyagi, A., Ali, S., Ramakrishna, G., Singh, A., Park, S., Mahmoudi, H., & Bae, H. (2023). Revisiting the Role of Polyamines in Plant Growth and Abiotic Stress Resilience: Mechanisms, Crosstalk, and Future Perspectives. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 42(8), 5074-5098. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10847-3>
- Valdés-Santiago, L., & Ruiz-Herrera, J. (2014). Stress and polyamine metabolism in fungi. *Frontiers in Chemistry*, 1. <https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00042>
- Valdés-Santiago, L., & Ruiz-Herrera, J. (2015). Polyamines in fungi. En CRC Press eBooks. <https://doi.org/10.1201/b19200>

- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., León-Ramírez, C. G., & Ruiz-Herrera, J. (2012). Polyamine Metabolism in Fungi with Emphasis on Phytopathogenic Species. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2012/837932>
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiological, Cell-Biology and Biotechnology. Vonshak, A. (Ed). Taylor and Francis, 213-215.
- Whyte, J. N. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60(3-4), 231-241. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)
- Zhang, W., Zhou, X., Zhang, Y., Cheng, P., Ma, R., Cheng, W., & Chu, H. (2018). Enhancing astaxanthin accumulation in *haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column Photobioreactors. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), 2019-2028. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07008>
- Zhang, X., Cheng, J., Lu, H., Chu, F., Xu, J., Wang, X., & Cen, K. (2019). Spermidine enhanced resistance of *Chlorella* to high levels of CO<sub>2</sub> and light intensity for improving photosynthetic growth rate. *RSC Advances*, 9(45), 26495-26502. <https://doi.org/10.1039/c9ra05152j>
- Zhu, C. J. & Lee, Y. K. (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9, 189-194.

## Anexos

### Anexo A. Densidad celular de *H. pluvialis* cultivada con diferentes poliaminas

**Tabla 4.** Densidad celular (cél mL<sup>-1</sup>×10<sup>3</sup>) de *H. pluvialis* en etapa vegetativa cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> en un volumen de 400 ml. Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias significativas entre los cultivos para cada día (p < 0.05).

Día	Tratamiento				
	Control	PUT 0.1 mM	ESD 0.1 mM	PUT 0.5 mM	ESD 0.5 mM
0	10 (0.6)	11 (1.5)	10 (0.6)	8 (0.0)	9 (0.0)
1	15 (1.2)	21 (0.0)	22 (0.6)	15 (1.5)	17 (1.5)
2	23 (1.0) <b>c</b>	37 (3.1) <b>b</b>	38 (1.7) <b>b</b>	45 (1.5) <b>a</b>	50 (2.6) <b>a</b>
3	44 (1.5) <b>e</b>	61 (3.2) <b>d</b>	64 (2.1) <b>cd</b>	70 (2.3) <b>bc</b>	80 (4.4) <b>a</b>
4	63 (2.6) <b>d</b>	83 (2.5) <b>c</b>	86 (6.2) <b>c</b>	95 (2.1) <b>b</b>	110 (1.7) <b>a</b>
5	93 (4.4) <b>d</b>	134 (0.6) <b>b</b>	132 (3.6) <b>b</b>	122 (1.2) <b>c</b>	150 (1.5) <b>a</b>
6	132 (2.6) <b>d</b>	162 (4.0) <b>c</b>	172 (4.5) <b>b</b>	172 (1.5) <b>b</b>	201 (1.5) <b>a</b>
7	174 (3.5) <b>b</b>	184 (3.5) <b>b</b>	182 (2.3) <b>b</b>	229 (1.0) <b>a</b>	134 (1.7) <b>c</b>
8	221 (1.5) <b>c</b>	232 (1.5) <b>a</b>	227 (1.7) <b>b</b>	-	-
9	258 (3.6)	265 (0.6)	266 (4.0)	-	-
10	283 (5.0)	293 (4.4)	286 (3.0)	-	-

## Anexo B. Composición proximal de *H. pluvialis* cultivada con diferentes poliaminas

**Tabla 5.** Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* en etapa vegetativa cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a dos concentraciones (0.1 y 0.5 mM), en medio MBB a  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en un volumen de 400 ml. Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias entre los tratamientos para cada día y los superíndices con números muestran las diferencias de cada cultivo con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ).

Día	Proteínas			Lípidos			Carbohidratos		
	CONTROL	PUT 0.1 mM	ESD 0.1 mM	CONTROL	PUT 0.1 mM	ESD 0.1 mM	CONTROL	PUT 0.1 mM	ESD 0.1 mM
2	34 (4.3) <sup>1b</sup>	37 (1.9) <sup>ab</sup>	41 (2.4) <sup>1a</sup>	27 (11.0) <sup>12</sup>	24 (4.9) <sup>2</sup>	20 (4.2) <sup>2</sup>	24 (2.0) <sup>a</sup>	16 (2.9) <sup>2b</sup>	18 (3.7) <sup>2ab</sup>
4	37 (0.9) <sup>1</sup>	40 (6.0)	38 (3.6) <sup>1</sup>	22 (10.9) <sup>2</sup>	21 (1.4) <sup>2</sup>	30 (5.6) <sup>2</sup>	26 (3.4)	22 (1.3) <sup>1</sup>	21 (0.7) <sup>1</sup>
6	24 (0.9) <sup>2</sup>	29 (5.3)	25 (0.5) <sup>2</sup>	34 (0.4) <sup>1b</sup>	36 (4.7) <sup>1ab</sup>	42 (3.9) <sup>1a</sup>	26 (1.1)	24 (1.8) <sup>1</sup>	21 (3.4) <sup>1</sup>
	CONTROL	PUT 0.5 mM	ESD 0.5 mM	CONTROL	PUT 0.5 mM	ESD 0.5 mM	CONTROL	PUT 0.5 mM	ESD 0.5 mM
3	28 (3.0) <sup>c</sup>	40 (2.0) <sup>b</sup>	47 (1.4) <sup>1a</sup>	24 (3.8) <sup>12</sup>	27 (5.6)	20 (2.5)	26 (0.9) <sup>a</sup>	15 (2.6) <sup>2b</sup>	18 (1.8) <sup>2b</sup>
5	33 (4.4) <sup>b</sup>	40 (1.9) <sup>ab</sup>	44(3.2) <sup>1a</sup>	21 (5.1) <sup>2</sup>	23 (6.1)	22 (4.7)	26 (0.9)	22 (1.8) <sup>12</sup>	26 (1.5) <sup>1</sup>
7	30 (2.5) <sup>ab</sup>	35 (7.9) <sup>a</sup>	27(0.3) <sup>2b</sup>	31 (3.5) <sup>1ab</sup>	33 (1.9) <sup>a</sup>	24 (3.8) <sup>b</sup>	28 (1.4)	28 (2.9) <sup>1</sup>	26 (2.1) <sup>1</sup>

### Anexo C. Densidad celular de *H. pluvialis* cultivada con diferentes poliaminas en la inducción a la carotenogénesis

**Tabla 6.** Densidad celular (cél mL<sup>-1</sup>×10<sup>3</sup>) de *H. pluvialis* en inducción a la carotenogénesis cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones, sin fuente de nitrógeno a 600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Desviación estándar entre paréntesis. Los subíndices con letras marcan las diferencias significativas entre los cultivos para cada día (p < 0.05).

Día	Tratamiento			
	Control	PUT 0.1 mM	ESD 0.5 mM	ESD 1.0 mM
0	188 (6.8)	181 (0.6)	179 (1.2)	182 (4.0)
1	204 (12.1) <b>b</b>	237 (5.6) <b>a</b>	210 (8.5) <b>b</b>	195 (3.6) <b>b</b>
2	274 (8.2) <b>a</b>	267 (1.7) <b>a</b>	246 (3.5) <b>b</b>	196 (4.0) <b>c</b>
3	313 (10.3) <b>a</b>	264 (12.5) <b>b</b>	243 (11.1) <b>bc</b>	222 (6.0) <b>c</b>
4	277 (4.5) <b>b</b>	352 (4.5) <b>a</b>	239 (9.8) <b>c</b>	210 (11.9) <b>d</b>
5	292 (3.6) <b>b</b>	330 (3.0) <b>a</b>	199 (8.0) <b>c</b>	118 (7.0) <b>d</b>
6	346 (3.2) <b>a</b>	308 (6.1) <b>b</b>	175 (9.6) <b>c</b>	103 (6.8) <b>d</b>

#### Anexo D. Tasas de crecimiento de *H. pluvialis* cultivada con diferentes poliaminas en la inducción a la carotenogénesis

**Tabla 7.** Tasas de crecimiento promedio por tratamiento ( $\mu$ , divisiones·día<sup>-1</sup>) de *H. pluvialis* durante la inducción a la carotenogénesis, cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Día	Tratamiento			
	Control	PUT 0.1 mM	ESD 0.5 mM	ESD 1.0 mM
0	0.1	0.4	0.2	0.1
1	0.4	0.2	0.2	0.0
2	0.2	0.0	0.0	0.2
3	-0.2	0.4	0.0	-0.1
4	0.1	-0.1	-0.3	-0.8
5	0.2	-0.1	-0.2	-0.2
6	0.1	0.4	0.2	0.1

### Anexo E. Composición proximal de *H. pluvialis* cultivada con diferentes poliaminas en la inducción a la carotenogénesis

**Tabla 8.** Composición proximal (% en base al peso seco total) de *H. pluvialis* durante la inducción a la carotenogénesis, cultivada con dos poliaminas (PUT= putrescina y ESD= espermidina) a diferentes concentraciones a  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los subíndices con letras marcan las diferencias entre los tratamientos para cada día y los superíndices con números muestran las diferencias de cada cultivo con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ).

Día	Tratamiento	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
1	CONTROL	32 (1.5) <sup>1c</sup>	25 (2.1) <sup>2</sup>	40 (0.8) <sup>1a</sup>
	PUT 0.1 mM	46 (1.3) <sup>1a</sup>	28 (2.3) <sup>4</sup>	24 (3.7) <sup>12b</sup>
	ESD 0.5 mM	39 (3.3) <sup>1b</sup>	32 (3.3) <sup>1</sup>	25 (1.7) <sup>2b</sup>
	ESD 1.0 mM	37 (1.7) <sup>1bc</sup>	22 (6.4) <sup>12</sup>	34 (4.3) <sup>2a</sup>
2	CONTROL	30 (1.8) <sup>12b</sup>	31 (2.6) <sup>12a</sup>	36 (3.2) <sup>12b</sup>
	PUT 0.1 mM	36 (1.2) <sup>2a</sup>	34 (1.4) <sup>34a</sup>	21 (1.4) <sup>2c</sup>
	ESD 0.5 mM	37 (0.3) <sup>1a</sup>	20 (1.5) <sup>2b</sup>	39 (1.6) <sup>1b</sup>
	ESD 1.0 mM	30 (3.6) <sup>1b</sup>	19 (1.3) <sup>2b</sup>	47 (0.4) <sup>1a</sup>
3	CONTROL	26 (2.1) <sup>23a</sup>	41 (5.9) <sup>1</sup>	32 (3.1) <sup>2c</sup>
	PUT 0.1 mM	27 (1.2) <sup>3a</sup>	36 (3.7) <sup>23</sup>	33 (2.7) <sup>1c</sup>
	ESD 0.5 mM	20 (0.5) <sup>2b</sup>	25 (4.4) <sup>1</sup>	39 (1.1) <sup>1b</sup>
	ESD 1.0 mM	18 (0.5) <sup>2b</sup>	31 (4.0) <sup>1</sup>	46 (1.7) <sup>1a</sup>
4	CONTROL	22 (2.7) <sup>34ab</sup>	35 (4.1) <sup>12b</sup>	36 (2.3) <sup>12bc</sup>
	PUT 0.1 mM	26 (2.5) <sup>3a</sup>	44 (3.9) <sup>1a</sup>	28 (6.3) <sup>12c</sup>
	ESD 0.5 mM	19 (3.3) <sup>2ab</sup>	34 (1.1) <sup>1b</sup>	38 (3.3) <sup>1ab</sup>
	ESD 1.0 mM	18 (2.3) <sup>2b</sup>	29 (4.2) <sup>1b</sup>	47 (4.1) <sup>1a</sup>
5	CONTROL	20 (0.3) <sup>4ab</sup>	36 (5.9) <sup>12ab</sup>	37 (4.2) <sup>12b</sup>
	PUT 0.1 mM	23 (3.0) <sup>3a</sup>	43 (1.7) <sup>12a</sup>	29 (5.3) <sup>12b</sup>
	ESD 0.5 mM	20 (2.3) <sup>2ab</sup>	34 (4.2) <sup>1b</sup>	38 (4.2) <sup>1b</sup>
	ESD 1.0 mM	18 (0.9) <sup>2b</sup>	29 (7.9) <sup>12b</sup>	48 (5.9) <sup>1a</sup>