



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DE LA OSCILACIÓN DE TEMPERATURA ASOCIADO  
AL FOTOPERIODO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO  
DOCOSAHEXAENOICO EN *Isochrysis galbana***

---

Por:

**Jesús Alejandro Ramírez Vargas**

TESIS APROBADA POR LA

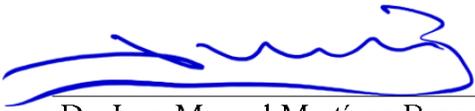
COORDINACIÓN DE MAZATLÁN, SINALOA.

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Alejandro Ramírez Vargas la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Juan Manuel Martínez Brown  
Director de tesis



---

Dra. Laura Carreón Palau  
Integrante de comité de tesis



---

Dr. Samuel Calderón Liévanos  
Integrante de comité de tesis



---

M. en C. Gabriela Velasco Blanco  
Integrante de comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efecto de la Oscilación de Temperatura Asociado al Fotoperíodo sobre la Producción de Ácido Docosahexaenoico en *Isochrysis galbana*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús Alejandro Ramírez Vargas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos



Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada (número de apoyo 823377) durante el posgrado de Maestría en Ciencias, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, unidad Mazatlán, su apoyo permitió que el sueño de un foráneo con pasión por las ciencias marinas se volviera realidad.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad Mazatlán por la oportunidad académica que me dieron al formar parte de su posgrado por excelencia Maestría en Ciencias con opción terminal en Acuicultura, los conocimientos, habilidades, conductas y relaciones que he adquirido a lo largo del trayecto me permitirán algún día alcanzar el sueño de ser un investigador en biotecnología marina.

Agradezco al proyecto “Producción de juveniles de robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis*, ciclo 2023” por el financiamiento otorgado a lo largo del proyecto, gracias a su apoyo económico se logró montar un sistema de recirculación de agua con control de temperatura para la puesta en práctica del bioensayo y adquirir los reactivos para estandarizar técnicas de análisis de biomasa microalgal en el Laboratorio de Reproducción.

Agradezco a mi Comité de tesis, por sus asesorías y conocimientos a lo largo de este proyecto, su objetividad y visión de mundo me permitió sacar adelante la investigación de la mejor manera posible, además de desarrollarme como un futuro investigador en biotecnología marina.

A mi director de tesis, el Dr. Juan Manuel Martínez Brown, por sus enseñanzas en la lógica y la filosofía me dieron una comprensión profunda sobre lo que es la ciencia, el conocimiento y el estudio del ser. Gracias a usted comprendí cual es mi papel como científico, que debo hacer y cómo debo pensar para ser un gran investigador. Me enseñó a formar una dirección en un mar de incertidumbre. Su ética profesional me indicará el camino a ser un gran profesionista. A mis asesores, la Dra. Laura Carreón Palau, por su apoyo y enseñanzas para la determinación de ácidos grasos durante mi estancia en el CIBNOR. Me recordó que como científico tengo que ser humano.

Al Dr. Samuel Calderón Liévanos quién me aterrizó en el aprendizaje en estadística y diseño experimental. Con usted al fin dominé los diseños. A la M. C. Gabriela Velasco Blanco, por sus enseñanzas prácticas y técnicas en el cultivo adecuado de microalgas, además de ofrecerme un espacio a su lado en el Laboratorio de Reproducción de Peces Marinos. Por último, pero no menos importantes, a la M. C. Luz Estela Rodríguez Ibarra y a la Dra. María Isabel Abdo de la Parra, quienes fueron como una familia para mí en el CIAD, siempre estuvieron atentas a mi cuidado y seguridad, en especial usted M. C. Estela, sin importar lo que necesitara, siempre me atendía y apoyaba en el momento que fuera.

Agradezco la Dra. Crisantema Hernández Gonzáles y a su equipo de trabajo, la M. C. Erika Yazmin Sánchez Gutiérrez del Laboratorio de Bromatología, por su apoyo en la conservación y liofilización de las muestras a.

Agradezco al Dr. Miguel Betancourt Lozano y a su equipo de trabajo, la M. C. Gabriela Aguilar Zárate del Laboratorio de Cromatografía, y la M. C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez del Laboratorio de Ecotoxicología, por su apoyo en la centrifugación, sonicación y procesado de las muestras.

Agradezco a la Dra. Laura Carreón Palau del Laboratorio de Análisis Espacial, Ecología y Conservación y a la Dra. María Concepción Lora Vilchis del Laboratorio de Microalgas al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) unidad La Paz, BCS, por su apoyo en el análisis de lípidos y ácidos grasos.

Agradezco a mis compañeros de la Planta Piloto de Peces Marinos, al técnico Biól. Jorge Alejandro Reyes Meza y a la estudiante de maestría la Lic. Nathaly Sarasty Medina por su apoyo y pasar en vela conmigo durante la recolección de muestras.

Agradezco a la M. C. Estela Rodríguez Ibarra, por su apoyo en el área administrativa y tutorial como coordinadora del posgrado, apoyo que agilizó y motivó a la finalización de este proyecto.

Agradezco al personal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad

Mazatlán, por su hospitalidad y apoyo a lo largo del posgrado, su amable trato, comportamiento y ambiente de trabajo, hicieron de mi estancia en el posgrado un gusto de experimentar.

Agradezco a mis compañeros y amigos de posgrado, su amabilidad, consejos y diversión llenaron de alegría mi corazón.

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación principalmente a mi familia. Ustedes me han apoyado a lo largo de toda mi vida. A mi padre, Jesús Ramírez Núñez, por sus inmensos esfuerzos que han permitido sacar a esta familia adelante. Tus valores por el esfuerzo que me has inculcado me han permitido lograr todo lo que me proponga a mi corta edad. A mi madre, Estrelia Vargas Beltrán, por su inmenso apoyo emocional a lo largo de mi vida, tus cariños, cuidados, valores y carácter me formaron al hombre empático, amable y determinado que soy hoy en día. A mi hermano mayor, Jorge Armando Ramírez Vargas, por formar mi carácter de una manera lógica y centrada. Gracias a tu visión de mundo aprendí a ser un hombre de ambición, con la mente enfocada a mis objetivos. A mi hermana mayor, Claudia Yanine Ramírez Vargas, mi compañera en diversión y emoción. Gracias a tu corazón aprendí a reconocer las emociones, disfrutar el momento y sentirme libre. Tu confidencialidad me ha permitido expresarme sin miedo a la represalia.

Dedico este proyecto de investigación a mi familia Mazateca, a mis tíos, J. Paulino Ríos Sáenz y Elda Maricela Miranda Zamudio. A mis primos, Paola Maricela Ríos Miranda, Elda Paulina Ríos Miranda y Francisco Paul Ríos Miranda. Gracias por permitirme estar en su hogar; me han hecho sentir que soy parte de ustedes. Me acogieron, apoyaron y cuidaron desde que llegué a tierras costeras. A pesar de estar lejos del lugar donde crecí, jamás resentí la soledad a su lado.

Dedico este proyecto de investigación a mis compañeros de posgrado, Ivana Ramos de la Cruz y David Alejandro Macías Osuna, con ustedes enfrente todas las adversidades que acontecieron en el posgrado. Ivana, tu gran inteligencia y corazón nos ayudaron en cada clase. Gracias a ti comprendemos la complejidad que presentan la lógica y la matemática. David, tu gran corazón y carácter nos alegraron cada día del posgrado, por más tensa que estuviera la situación, lograbas sacarnos una carcajada. A mis compañeras de Doctorado, Alondra Abigail Mesina Peña y Lizeth Carolina Flores Méndez, por su tutela y apoyo cada que nos sentíamos confundidos.

Por último, dedico este trabajo a Gilberto Lizárraga Calderón, llegaste en un momento crítico de mi vida, me apoyaste en cada momento, recordándome quien soy, jamás me permitiste caer, incluso

cuando yo mismo me daba por vencido, sin tu apoyo y cariño, este trabajo no tendría la calidad que presenta hoy en día.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	13
<b>RESUMEN</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
2.1. Taxonomía.....	18
2.2. Clasificaciones y Nomenclaturas de los Lípidos.....	20
2.3. Síntesis y Distribución de Ácidos Grasos en <i>I. galbana</i> .....	25
2.4. Adaptación Homeoviscosa y el Efecto de la Temperatura Sobre la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento Poblacional.....	26
2.5. Diferencias Intraespecíficas en la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento.....	26
2.6. Efecto de la Iluminación en la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento..	29
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Diseño Experimental.....	31
5.2. Condiciones Experimentales.....	31
5.3. Sistema Experimental.....	32
5.4. Desinfección y Lavado del Material.....	36
5.5. Preparación del Medio de Cultivo F/2.....	36
5.6. Obtención de la Cepa.....	38
5.7. Aclimatación de la Cepa.....	38
5.8. Inoculación de las Unidades Experimentales.....	39
5.9. Toma de Muestra.....	39
5.9.1. Tasa de Crecimiento Poblacional y Tamaño Celular.....	39
5.9.2. Determinación de la Composición Bioquímica, el Perfil de Ácidos Grasos, la Producción de DHA y la Biomasa.....	40
5.10. Caracterización de la Tasa de Crecimiento.....	41

## CONTENIDO (continuación)

5.11. Determinación del Volumen Celular.....	43
5.12. Liofilización de las Muestras.....	45
5.13. Determinación de Peso Seco, Rendimiento del Peso Húmedo y Rendimiento del Peso Seco.....	46
5.14. Determinación de Carbohidratos Totales por Método Espectrofotométrico.....	48
5.15. Determinación de Proteínas por Método Espectrofotométrico.....	52
5.16. Determinación de Lípidos Totales.....	57
5.17. Determinación de Ácidos Grasos.....	59
5.18. Concentración, Porcentaje, Rendimiento y Producción de DHA.....	64
5.18.1. Concentración de DHA.....	65
5.18.2. Porcentaje de DHA en el Perfil de Ácidos Grasos.....	65
5.18.3. Peso de Cada Célula.....	66
5.18.4. DHA por Célula.....	66
5.18.6. Rendimiento de DHA.....	67
5.18.7. Producción de DHA.....	67
5.19. Pruebas Estadísticas.....	68
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
6.1. Cinética de Crecimiento.....	70
6.2. Densidad Celular.....	73
6.3. Volumen Celular.....	74
6.4. Tasa de Crecimiento Poblacional.....	75
6.5. Rendimiento de Peso Húmedo.....	76
6.6. Rendimiento de Peso Seco.....	78
6.7. Porcentaje de Carbohidratos.....	79
6.8. Porcentaje de Lípidos Totales.....	80
6.9. Porcentaje de Proteínas.....	80
6.10. Concentración DHA.....	81
6.11. Porcentaje de DHA por Célula.....	82
6.12. Rendimiento del DHA.....	83
6.13. Producción de DHA.....	84
6.14. Porcentaje de DHA Respecto a los Ácidos Grasos Totales.....	84
6.15. Perfil de Ácidos Grasos Totales.....	85
6.16. Composición Bioquímica.....	88
6.17. Producción de DHA.....	88
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>90</b>
7.1. Cinética de Crecimiento.....	90
7.2. Composición Bioquímica y Producción de DHA.....	91
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Vías de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6, en el retículo endoplasmático.....	21
2 Vías de biosíntesis de PUFA omega-6 y omega-3 en algas.....	23
3 Sistema experimental.....	33
4 Acuarios experimentales.....	34
5 Tratamientos con y sin fotoperiodo.....	35
6 Protocolo de toma de muestra.....	40
7 Sección de la reglilla de calibración (1 mm de longitud).....	44
8 Microfotografía de <i>Isochrysis galbana</i> .....	45
9 Diagrama de flujo para la determinación cuantitativa de carbohidratos totales.....	48
10 Soluciones de Dextrosa “Anhidra” teñidas con Fenol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado.....	50
11 Curva estándar de carbohidratos.....	51
12 Diagrama de flujo de la preparación de la curva estándar con BSA.....	53
13 Diagrama de flujo de la determinación cuantitativa de proteínas.....	53
14 Soluciones de BSA teñidas con Folin-Ciocalteu.....	56
15 Curva estándar de calibración para a 750nm con los estándares de BSA.....	56
16 Listado de FAMES en el perfil de ácidos grasos de la mezcla estándar Supelco 37...	63
17 Curvas de crecimiento por tratamiento desde la siembra.....	71
18 Curvas de crecimiento de los tratamientos.....	72
19 Diagramas de Pareto del T-Valor de Densidad Celular por hora de conteo.....	73
20 Densidad celular registrada a las 136h por cada tratamiento.....	73
21 Densidad celular registrada a las 136h separado por fotoperiodo.....	74
22 Tasa de crecimiento poblacional (d <sup>-1</sup> ) alcanzadas por cada tratamiento.....	75
23 Tasa de crecimiento poblacional (d <sup>-1</sup> ) separado por fotoperiodo.....	76
24 Rendimiento de peso húmedo.....	77
25 Rendimiento de peso húmedo separado por temperatura.....	77
26 Rendimiento de peso húmedo separado por fotoperiodo.....	78
27 Rendimiento del peso seco.....	78
28 Rendimiento de peso seco separado por temperatura.....	79
29 Porcentaje de carbohidratos.....	79
30 Porcentaje de lípidos totales.....	80
31 Porcentaje de proteínas.....	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
32	Porcentaje de proteínas separado por temperatura.....	81
33	Concentración de DHA.....	82
34	Porcentaje de DHA por célula.....	82
35	Porcentaje de DHA por célula por fotoperiodo.....	83
36	Rendimiento de DHA.....	83
37	Producción de DHA.....	84
38	Porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales.....	85
39	Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la composición bioquímica.....	88
40	Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la producción de DHA.....	89

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Volúmenes celulares ( $\mu\text{m}^3$ ).....	74
2	Perfil de ácidos grasos totales.....	87

## RESUMEN

El ácido docosahexaenoico (DHA), desempeña un papel crucial en la formación y fluidez de las membranas celulares durante la morfogénesis de diversos organismos marinos, siendo especialmente importante en el desarrollo del sistema nervioso y la retina. La deficiencia dietética de DHA conduce a altas tasas de mortalidad y deformidades, por lo que es necesario enriquecer el alimento vivo con este ácido graso. Para enriquecer el alimento vivo con DHA se han explorado dos enfoques: el uso de emulsiones comerciales y el empleo de microalgas. Algunas especies de microalgas, como *Isochrysis galbana*, pueden biosintetizar DHA, aunque su contenido varía en función de la temperatura y el fotoperiodo. Las bajas temperaturas (15–19 °C) promueven un aumento en la producción de DHA al modular la fluidez de las membranas celulares. El fotoperiodo influye en los procesos metabólicos y la tasa de reproducción celular. El efecto combinado de la temperatura y el fotoperiodo sobre la tasa de reproducción celular y acumulación de DHA en *I. galbana* no ha sido estudiado en profundidad. En el presente estudio se probaron esquemas: una oscilación baja de 4 °C (21–25 °C) y una alta de 8 °C (19–27 °C), combinadas con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad o iluminación continua. Las bajas temperaturas (19–21 °C) se aplicaron durante horas luz, mientras que las temperaturas altas (25–27 °C) en horas oscuridad. Los resultados indican que *I. galbana* bajo temperaturas oscilatorias no modificó de manera significativa la producción de DHA. Sin embargo, se observó un incremento en el contenido del ácido araquidónico (ARA) en el tratamiento de 19–27 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, lo que apunta a una posible disrupción de las enzimas desaturasas  $\Delta 15$  y  $\Delta 17$  de la ruta biosintética del DHA. Los tratamientos con fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad presentaron incrementos en la densidad celular, la tasa de crecimiento poblacional y la acumulación de ácidos grasos n-6. Los tratamientos con una oscilación térmica baja (21–25 °C) favorecieron un mayor rendimiento del peso seco. En conclusión, la oscilación de temperatura combinada con el fotoperiodo no modificó la composición proximal (carbohidratos, lípidos y proteínas) de *I. galbana* y no mejoró la producción de ácidos grasos n-3, pero sí representa una alternativa para la producción de ácidos grasos n-6, lo que podría tener implicaciones en la larvicultura de peces marinos.

**Palabras clave:** *Isochrysis galbana*, Ácido Docosahexaenoico, Oscilación térmica, Fotoperiodo.

## ABSTRACT

Docosahexaenoic acid (DHA) plays a crucial role in the formation and fluidity of cell membranes during morphogenesis in various marine animal species, being especially important in the development of the nervous system and the retina. Because marine fish larvae cannot synthesize DHA, they must obtain it through their diet. Dietary deficiency of DHA leads to high mortality rates and deformities, making it necessary to enrich live food with this fatty acid. Two approaches have been explored to enrich live food with DHA: the use of commercial emulsions and the use of microalgae. Some microalgae species, such as *Isochrysis galbana*, can biosynthesize DHA, although its content varies depending on temperature, photoperiod, and harvest time. Low temperatures (15–19 °C) have been documented to promote increased DHA production by modulating cell membrane fluidity, while photoperiod influences metabolic processes and cell reproduction rate. However, the combined effect of temperature and photoperiod on cell reproduction rate and DHA accumulation in *I. galbana* has not been studied in depth. In the present study, two thermal oscillation schemes were tested, each associated with a photoperiod: a low oscillation of 4 °C (21–25 °C) and a high oscillation of 8 °C (19–27 °C) combined with a photoperiod of 16 light hours and 8 dark hours or continuous illumination. Low temperatures (19–21 °C) were applied during light hours, while high temperatures (25–27 °C) were applied during dark hours. The results showed that *I. galbana* under oscillating temperatures did not significantly modify DHA production. However, an increase in arachidonic acid (ARA) content was observed in the 19–27 °C treatment with a 16-h light/8-h dark photoperiod, which points to a possible disruption of the desaturase enzymes  $\Delta 15$  and  $\Delta 17$  of the DHA biosynthetic pathway. In addition, the 16-h light/8-h dark photoperiod treatments showed increases in cell density, population growth rate, and n-6 fatty acid accumulation. On the other hand, treatments with a low thermal oscillation (21–25 °C) favored a higher dry-weight yield. In conclusion, temperature oscillation combined with photoperiod did not modify the proximate composition (carbohydrates, lipids, and proteins) of *I. galbana*. It did not improve the production of n-3 fatty acids, but it does represent an alternative for the production of n-6 fatty acids, which could have implications in marine fish larviculture.

**Key words:** : *Isochrysis galbana*, Docosahexaenoic Acid, Thermal Oscillation, Photoperiod.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Isochrysis galbana* (Parke., 1949), es una microalga presente en ecosistemas marinos (Alkhamis & Qin, 2013; Guiry y Guiry, 2023; Kaplan *et al.*, 1986). Se considera un organismo de interés biotecnológico con aplicaciones en las áreas de nutrición, farmacéutica y acuicultura debido a su alta tasa de crecimiento poblacional, ciclo corto de producción y su eficiencia en producción de compuestos de interés comercial, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Guan-Hua *et al.*, 2010; Bonfanti *et al.* 2017; Bhattacharjya *et al.*, 2021; Harun *et al.*, 2010). Las microalgas utilizan luz, dióxido de carbono, nutrientes y agua para producir compuestos energéticos en forma de macromoléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos (Whyte, 1987; Morales *et al.*, 2019). La cantidad y el perfil de ácidos grasos de las clases lipídicas de las microalgas son cruciales para el crecimiento y el desarrollo de animales en cultivo, en especial para larvas de organismos marinos (De Pauw *et al.*, 1984; Koven *et al.*, 1989). Especies del género *Isochrysis* se han utilizado ampliamente como alimento en la maricultura debido a su capacidad de síntesis y alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega 3 (LC-PUFA n-3) (Patil *et al.*, 2007). La capacidad de sintetizar LC-PUFA n-3, particularmente el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 n-3), posicionan a *I. galbana* como una de las mejores microalgas utilizadas para enriquecer rotíferos, que son usados como presas de larvas de peces marinos. Asimismo, *I. galbana* ha sido usada para nutrir larvas de bivalvos y crustáceos marinos (Whyte, 1987; Calder, 2017;). Entre los LC-PUFA n-3, el DHA representa el nutriente de mayor interés en *I. galbana* ya que lo acumula en mayor concentración, en comparación con otras microalgas (Volkman *et al.*, 1989; Renaud *et al.*, 2002; Pernet *et al.*, 2003).

El DHA tiene múltiples funciones durante la ontogenia de los organismos marinos, particularmente importantes durante el desarrollo embrionario, larvario y reproductivo (De Pauw *et al.*, 1984; Koven *et al.*, 1989). El DHA ha recibido más atención en la inclusión en dietas de organismos marinos por sus implicaciones en promover un buen estado físico, reduciendo el riesgo a enfermedades, su participación en el sistema antitumoral (Bai *et al.*, 2019), en el desarrollo del sistema nervioso (Lauritzen *et al.*, 2016; De Quelen *et al.*, 2011; Ahmmed *et al.*, 2019; Balakrishnan *et al.* 2019), en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa (Kim *et al.*, 2016; Molfino *et al.*, 2016), por sus efectos antiinflamatorios (Calder, 2017), en el incremento de la masa

muscular y la mejora de la actividad física de peces en sistemas de cultivos intensivos (Ji *et al.*, 2024). Bajo contenido dietético del DHA afecta los niveles de lípidos polares presentes en el sistema nervioso y visual en larvas, generando defectos morfológicos que propician deficiencias en la obtención de alimentos e inclusive inanición y eventualmente provocar la muerte (Giraldo *et al.*, 2013).

Para incrementar la producción lípidos, en especial de DHA en *I. galbana*, se ha estudiado estrategias de incremento de ácidos grasos poliinsaturados en experimentos de variación de factores ambientales (p. ej., temperatura, iluminación y nutrientes disponibles) o con modificaciones genéticas (Sánchez *et al.* 2000; Renaud *et al.* 1991; El-Din, 2019; Sun *et al.* 2018; Balakrishnan *et al.*, 2022; Bougaran *et al.*, 2012; Fabregas *et al.*, 1985; Lacour *et al.*, 2012; Rohani *et al.*, 2011). Uno de los resultados más destacables en estudios de manipulación térmica es el mayor incremento en la concentración de DHA como respuesta de la adaptación homeoviscosa inducida por temperaturas bajas (Zhu *et al.*, 1997). Otras estrategias utilizadas para incrementar los ácidos grasos n-3 en otras especies de microalgas han sido la exposición a CaCl<sub>2</sub>, nutrientes disponibles en el medio de cultivo, variación en la irradiación lumínica y el fotoperiodo (Shim *et al.*, 2020; Carvalho y Malcata 2005; Oostlander *et al.* 2020; Garnier *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2019; Huerlimann *et al.*, 2014).

En el presente trabajo abordó el efecto de la oscilación térmica ante la presencia o ausencia de un fotoperiodo sobre la composición proximal, la producción de DHA y los parámetros de crecimiento poblacional de *I. galbana*. Se probaron dos rangos de temperatura oscilatoria, una oscilación baja (OB) de 21 a 25 °C y una oscilación alta (OA) de 19 a 27 °C. Durante la fase luminosa del cultivo con fotoperiodo de 16 horas luz, se bajó la temperatura (19 y 21 °C) para promover la producción de ácidos grasos con el incremento celular: Durante la fase oscura de 8 horas, se incrementó la temperatura (25 y 27 °C) para promover la división celular. Ambos tratamientos de oscilación térmica asociado al fotoperiodo (16 horas luz, 8 horas oscuridad) se compararon con un tratamiento control que consistía en cultivos a temperaturas constantes (23 °C) sin oscilación térmica (SO), un control con fotoperiodo (CF) y un control con iluminación continua (SF).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Taxonomía

*Isochrysis galbana* Parke (1949), es una microalga marina flagelada que se clasifica dentro del reino Chromista, subreino Hacrobia, filo Haptophyta, subfilo Haptophytina, clase Coccolithophyceae, subclase Prymnesiophycidae, orden Isochrysidales, familia Isochrysidaceae y género *Isochrysis* (Guiry y Guiry, 2024). Presenta una morfología ovoide, de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de longitud y coloración pardo-amarillenta (Parke, 1949; Da silva *et al.*, 2013). Es conocida por su rápido crecimiento y alto contenido de lípidos y ácidos grasos esenciales, volviéndola un componente valioso en la acuicultura (Whyte 1987; Zhu *et al.* 1997). *I. galbana* tolera amplias condiciones de cultivo: temperatura de los 13°C a los 30°C (Renaud *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2009); iluminación de 100 a 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; salinidades de 5 a 60 ups (Alkhamis & Qin, 2013; Kaplan *et al.*, 1986; Ewart y Pruder 1981); y fotoperiodo óptimo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con la posibilidad de ser cultivado con iluminación continua (De Winter *et al.*, 2013).

Anteriormente *I. galbana* contenía dos cepas de interés para la investigación: ISO y T-ISO. Actualmente cada cepa es reconocida como una especie diferente. La cepa ISO corresponde a *Isochrysis galbana*, que es la más representativa de la familia Isochrysidales y que fue clasificada por Parke (1949). La cepa T-ISO, variedad tahitiana (*Isochrysis affinis galbana*), es reconocida como *Tisochrysis lutea* (Bendif *et al.*, 2013).

### 2.2. Clasificaciones y Nomenclaturas de los Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de moléculas orgánicas con importancia nutricional. Se caracterizan principalmente por su insolubilidad en agua y ser solubles en solventes orgánicos, como el alcohol y el éter. Se clasifican en dos categorías: lípidos neutros y lípidos polares. Los lípidos neutros son moléculas que no tienen carga eléctrica neta; son hidrofóbicos y no se disuelven

en agua. Los lípidos neutros se almacenan en el cuerpo como una fuente de energía a largo plazo y cumplen con funciones estructurales, particularmente a nivel anatómico (p. ej., aislante térmico subdérmico en mamíferos acuáticos). Los lípidos polares tienen una cabeza hidrofílica (polar) y una cola hidrofóbica (no polar). Esta estructura anfipática los vuelve esenciales para conformar la estructura de la bicapa lipídica de las membranas celulares y determina su función celular como barrera semipermeable que regula el paso de sustancias hacia y desde la célula (Brody, 2019; Parzanini *et al.*, 2023).

En *I. galbana* los lípidos neutros están conformados principalmente por triacilglicéridos (TAG) y otros compuestos como los acilglicéridos, diacilglicéridos esteroides, carotenoides, etc. Los triacilglicéridos están formados por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos. Se almacenan en gotas dentro de la microalga y se utilizan como reserva de energía. Por su parte, los lípidos polares en *I. galbana* están conformados por dos principales grupos, los glucolípidos (GL) y los fosfolípidos (PL). Los glucolípidos son lípidos unidos a un grupo de carbohidratos. Se encuentran en las membranas celulares y en algunos orgánulos. En las microalgas desempeñan un papel estructural, de señalización e identificación con el entorno. Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas celulares. Están formados por dos ácidos grasos, un grupo fosfato y una molécula de glicerol. La cabeza fosfato es polar y las colas de ácidos grasos son no polares, lo que les da la propiedad anfipática (afinidades tanto hidrófilas como hidrófobas) (Brody 2019; Khozin-Goldberg, 2016; Eltgroth *et al.*, 2005).

Dentro de los lípidos (tanto neutros como polares) se encuentran los ácidos grasos. Los ácidos grasos son moléculas compuestas por una cadena de hidrocarburos (carbono e hidrógeno) con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo. La longitud de la cadena de hidrocarburos puede variar, así como el grado de saturación (es decir, el número de dobles enlaces entre los átomos de carbono). Considerando la longitud de la cadena, los ácidos grasos se pueden clasificar en ácidos grasos de cadena corta (short chain fatty acids, SCFA) y de cadena larga (long chain fatty acids, LCFA). Los ácidos grasos de cadena corta comprenden moléculas de longitudes de cadena entre los 2 y 6 átomos de carbono y los ácidos grasos de cadena larga comprenden moléculas de longitudes de cadena entre 12 y 24 átomos. Considerando el grado de saturación los ácidos grasos se clasifican en saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados no tienen dobles enlaces entre los átomos de carbono, mientras que los ácidos grasos insaturados cuentan con dobles enlaces entre los átomos de carbono. Según el número de dobles enlaces se pueden nombrar como: ácidos grasos

monoinsaturados (Monounsaturated fatty acids, MUFA), los cuales tienen un solo doble enlace en la cadena de hidrocarburos; y ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated fatty acids, PUFA), los cuales tienen dos o más dobles enlaces. Un subgrupo comúnmente mencionado dentro de los poliinsaturados son los ácidos grasos altamente insaturados (Highly unsaturated fatty acids, HUFA), por contar con más de 4 dobles enlaces (Brody 2019; Khozin-Goldberg, 2016; Caffrey *et al.*, 2023; Tonon *et al.*, 2002).

*I. galbana* presenta una amplia variedad de ácidos grasos, siendo de principal interés los ácidos grasos altamente poliinsaturados de cadena larga, como el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido araquidónico (ARA), por desempeñar funciones fisiológicas importantes, como ser precursores de factores parácrinos y autócrinos que median la salud cardiovascular y el desarrollo neurológico de animales acuáticos (Bai *et al.*, 2019; Lauritzen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Molfino *et al.*, 2016; Bandarra *et al.*, 2003).

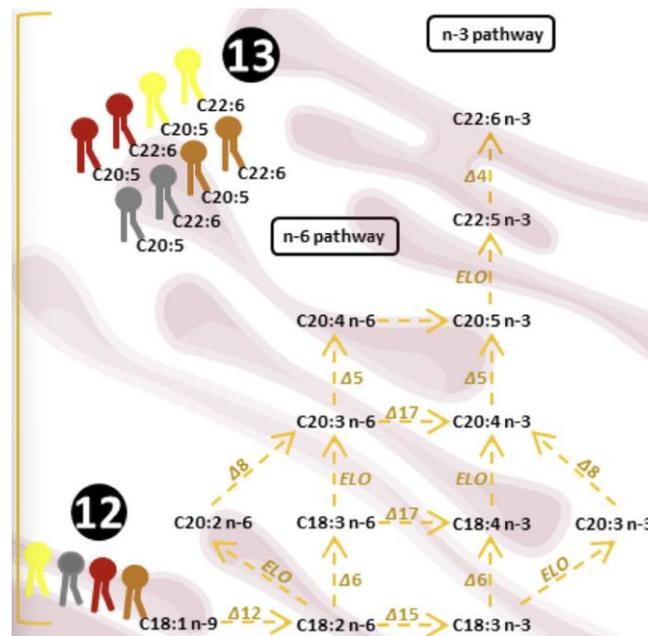
### 2.3. Síntesis y Distribución de Ácidos Grasos en *I. galbana*

La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados comienza con la elongación y desaturación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, asociadas con el metabolismo de las microalgas. Este proceso ocurre en tres fases (Mühlroth *et al.*, 2013):

- La síntesis del ácido hexadecatrienoico (C16:3-ACP), en los cloroplastos.
- La vía de la policétido sintasa (vía PKS), también en los cloroplastos.
- Las vías de ácidos grasos n-3 y n-6, en el retículo endoplasmático (Figura 1).

La síntesis *de novo* comienza con la transformación de CO<sub>2</sub> presente en las microalgas. El CO<sub>2</sub> es fijado mediante el ciclo de Calvin y uno de los productos de este ciclo es el piruvato (Hüner *et al.*, 2023). El piruvato es convertido en Acetil-CoA mediante enzimas del complejo de piruvato deshidrogenasa (Pyruvate dehydrogenase complex, PDC). El Acetil-CoA es transformado en Malonil-CoA por la enzima Acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase). Posteriormente, el Malonil-CoA es transformado a Malonil-ACP mediante la enzima metionina adenosiltransferasa (Methionine adenosyltransferase, MAT). El Malonil-ACP es un precursor fundamental para la producción de acil-ACP a través de la vía de la policétido sintasa (vía PKS).

En el plástido, la reserva de acil-ACP proporciona ácidos grasos unidos a una proteína transportadora de acilo (acyl carrier protein, ACP). Las desaturasas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  y  $\Delta 6$  realizan la desaturación de C16:0-ACP a C16:3-ACP para sintetizar los lípidos de la membrana microalgal a través de la esterificación del C16:3- ACP en una base lipídica de glicerol (Domergue *et al.*, 2003). El origen de las estructuras lipídicas puede distinguirse por la longitud del ácido graso en la posición sn-2 del glicerol-3- fosfato (G3P). La vía derivada de los lípidos del cloroplasto, llamada vía procariota, esterifica ácidos grasos C16 en la posición sn-2 del G3P, mientras que la vía derivada de los lípidos del retículo endoplasmático, llamada vía eucariota, tiene ácidos grasos C18 esterificados en la posición sn-2 (Gurr and Harwood, 2002; Sato *et al.*, 2003).



**Figura 1.-** Vías de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6, en el retículo endoplasmático. Figura tomada de Maciel *et al.* (2024).

En el interior del cloroplasto, la enzima GPAT esterifica ácidos grasos en la posición sn-1 del G3P con C16 (C16:0-CoA o C16:3-CoA) o C18 (C18:0-CoA o C18:1-CoA). Después, la enzima aciltransferasa del ácido lisofosfatídico (lisofosfatidic acid acyltransferase, LPAAT) esterifica un C16 (C16:0-CoA o C16:3- CoA) en ácido lisofosfatídico (liso-PA) en la posición sn-2 (Frentzen *et al.*, 1983). El ácido fosfatídico (PA) resultante es fosforilado por la enzima PAP para generar diacilglicéridos (DAG por sus siglas en inglés). Los ácidos grasos y el DAG, así como otros lípidos,

pueden actuar como precursores para producir fosfolípidos, glucolípidos y lípidos neutros, principalmente triacilglicéridos (Fan *et al.*, 2011; Kennedy, 1961).

El ácido graso C18:0 llega al citosol en forma de C18:0-CoA (estearoil-CoA) o C18:1-CoA (olearoil-CoA). La desaturación del ácido esteárico (SA, C18:0) a ácido oleico (OA, C18:1) tiene lugar a través de una enzima  $\Delta 9$  desaturasa en el cloroplasto o en el retículo. A excepción de la  $\Delta 9$  desaturasa presentes en el cloroplasto, las desaturasas y elongasas localizadas en el retículo endoplasmático utilizan ácidos grasos unidos a un glicerol como sustrato (Guschina y Harwood, 2006; Smith *et al.*, 2021). La síntesis de lípidos del retículo endoplasmático ocurre comúnmente a través de la vía de Kennedy o la vía de adición de Acil (Avidan *et al.*, 2021; Kennedy, 1961).

La mayoría de los ácidos grasos se exportan utilizando proteína de transporte de membrana, como la proteína FAX1 y la acil-CoA sintetasa de cadena larga (Long chain acyl-CoA synthetase, LACS), con la finalidad de transportar los ácidos grasos al citoplasma, donde se incorporan al pool citosólico de ácidos grasos para ser procesados posteriormente en el retículo endoplasmático. (Bai *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2016).

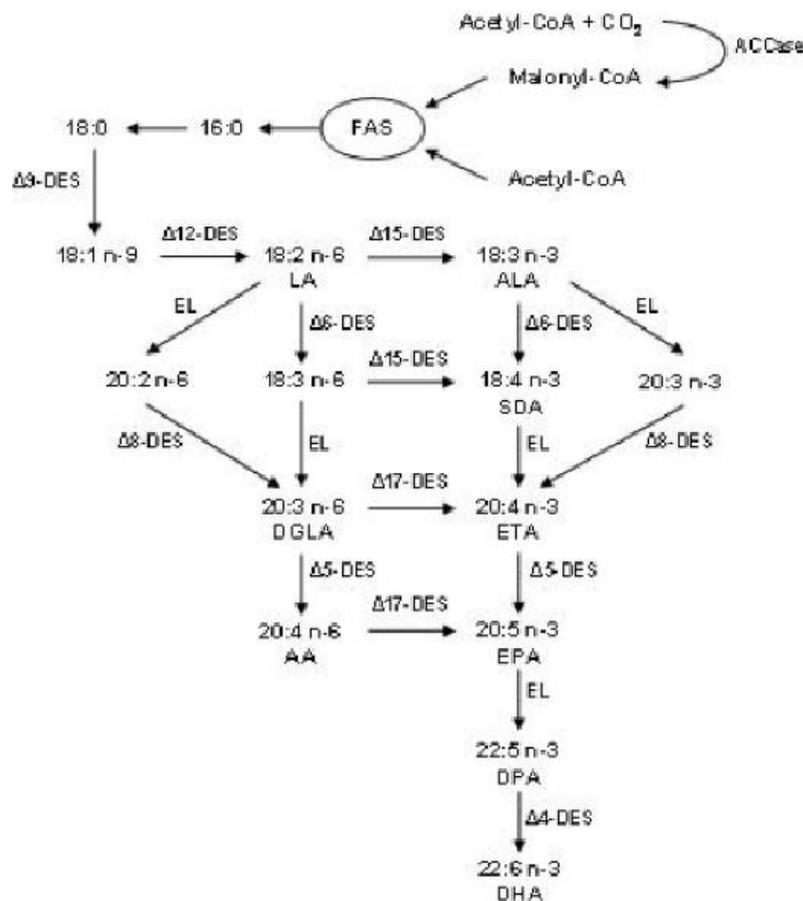
En el retículo endoplasmático, se toman del pool citosólico ácidos grasos C18 para producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga mediante dos vías, la vía n-3 y la vía n-6. Comienza con la producción del ácido graso C18:1 n-9, el cual mediante la desaturasa  $\Delta 12$ , produce C18:2 n-6, precursor inicial de la vía n-6. Parte del C18:2 n-6 se convierte con desaturasa  $\Delta 15$  en C18:3 n-3, precursor inicial de la vía n-3. La vía n-3 se encarga de producir ácidos grasos de cadena larga con un doble enlace en el tercer carbono mediante el uso de las enzimas elongasas y las enzimas desaturasas  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ , el mayor ácido graso polinsaturado de cadena larga que produce la vía n-3 es el C22:6 n-3 (DHA). Por su parte, la vía n-6 se encarga de producir ácidos grasos de cadena larga con un doble enlace en el sexto carbono mediante el uso de las enzimas elongasas y las enzimas desaturasas  $\Delta 6$ ,  $\Delta 8$ , y  $\Delta 5$ , el mayor ácido graso polinsaturado de cadena larga que produce la vía n-6 es el C20:4 n-6 (ARA). Los ácidos grasos de la vía n-6 se pueden integrar a la vía n-3 mediante el uso de la desaturasa  $\Delta 15$  y  $\Delta 17$  (Maciel *et al.*, 2024).

Los lípidos derivados del retículo endoplasmático pueden ser transportados a la membrana envolvente interna (MIE por sus siglas en inglés) de los cloroplastos para generar lípidos plastidiales con ácidos grasos  $>C18$ , manteniéndolos en los esqueletos de glicerol (LaBrant *et al.*, 2018).

Shiran *et al.* (1996) y Qi *et al.* (2002) indican que, en *I. galbana*, el EPA y el DHA pueden sintetizarse a través de las vías habituales de las series n-6 y n-3, pero también por rutas alternativas

que implican pasos de elongación y  $\Delta 8$ -desaturación. En las vías habituales omega-6 y omega-3, el LA y el ALA compiten entre sí por la  $\Delta 6$ -desaturasa para generar ácido  $\gamma$ -linolénico (ALA, 18:3 n-3) y SDA (18:4 n-3), que a su vez se elongan a ácidos dihomo- $\gamma$ -linolénico (DGLA, 20:3 n-6) y eicosatetraenoico (ETA, 20:4 n-3). DGLA y n-3 ETA también compiten por la  $\Delta 5$ -desaturasa para formar ARA (20:4 n-6) y EPA.

En contraste al esquema de la ruta de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6 en Pavlovophyceae de Maciel *et al.* (2024) (Figura 1), Robertson *et al.* (2013) indican, en su ruta de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6 en algas, que el 18:3 n-6 se convierte en 18:4 n-3 a mediante la desaturasa  $\Delta 15$  (Figura 2), debido a que la desaturasa  $\Delta 15$  tiene una mayor afinidad a los ácidos grasos C18 (Lee *et al.*, 2016).



**Figura 2.-** Vías de biosíntesis de PUFA omega-6 y omega-3 en algas: Síntesis de ácidos grasos C20 y C22 mediante pasos de desaturación y elongación a partir de ácidos grasos C18. Figura tomada de Robertson *et al.* (2013).

En la mayoría de las microalgas, los ácidos grasos de cadena larga se acumulan principalmente en los lípidos polares, especialmente fosfolípidos y glucolípidos (Maciel *et al.*, 2024). Las propiedades de los ácidos grasos, como la longitud el nivel de saturación de sus cadenas y su carga polar, influyen en las propiedades físicas de la membrana, como la fluidez, la permeabilidad, el grosor de la bicapa, la carga y la curvatura intrínseca (Ernst *et al.*, 2016; Harayama y Riezman, 2018). Por lo tanto, los LC-PUFAs, principalmente EPA y DHA, son esenciales para mantener la estabilidad y función de las membranas ante condiciones de estrés como cambios de nutrientes, temperatura, salinidad y cantidad e intensidad de luz. Además, los fosfolípidos actúan como matriz de diversos procesos metabólicos, e intervienen en las vías de señalización celular (por ejemplo, en condiciones de estrés, la síntesis de DHA protege las membranas de las bacterias de daños oxidativos) (Sun *et al.*, 2011).

Varios autores indican que la partición de los ácidos grasos EPA y DHA en triacilglicéridos es el resultado de un ajuste acelerado de la composición de las membranas celulares en respuesta a una condición de estrés. Condiciones específicas parecen iniciar procesos de remodelación celular, donde los lípidos de las membranas de los tilacoides se descomponen y sus PUFAs n-3 constitutivos se reconstruyen en TAGs, evitando un ciclo más lento de síntesis, ensamblaje y distribución (Eichenberger y Gribo, 1997; Guedes *et al.*, 2010; Guihéneuf y Stengel, 2017; B. Huang *et al.*, 2020; Tatsuzawa y Takizawa, 1995). Por lo general, la síntesis de EPA y DHA se eleva en la fase de crecimiento exponencial, con abundancia en el medio de nitrógeno y fósforo, debido a una mayor síntesis de membranas en las células en crecimiento activo (Eichenberger y Gribo, 1997; B. Huang *et al.*, 2020). Durante la fase de crecimiento exponencial, la haptófito *Diacronema lutheri* presentó fosfolípidos enriquecidos en DHA y galactolípidos principalmente los monogalactodiacilglicéridos (MGDG), como lípidos enriquecidos en EPA, composición que se perdería en la fase estacionaria (Meireles *et al.*, 2003).

Modificando las condiciones de cultivo, es posible optimizar la producción total de los ácidos grasos o que su modificación parcial sea la respuesta de la microalga a un estrés inducido.

## 2.4. Adaptación Homeoviscosa y el Efecto de la Temperatura Sobre la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento Poblacional

La adaptación homeoviscosa es un proceso mediante el cual las células ajustan la composición de lípidos en las membranas a diferentes temperaturas para mantener una fluidez adecuada. Este ajuste, que ocurre dentro de la bicapa lipídica, afecta la movilidad y función de las proteínas de membrana, así como la difusión de moléculas y la señalización celular (Sinensky, 1974; Wen and Chen, 2003; Colombo *et al.*, 2019). La fluidez de la membrana y su correcto funcionamiento depende de varios factores como la composición de ácidos grasos y la temperatura en la que se encuentra el organismo. En temperaturas bajas, la membrana pasa de un estado líquido cristalino funcional a una fase gel que compacta las capas de lípidos, limitando la movilidad de los lípidos, incrementando la rigidez de la membrana y reduciendo la permeabilidad. En altas temperaturas, la membrana pasa del estado líquido cristalino a uno más fluido al desordenar las capas de lípidos, incrementando la movilidad de los lípidos, afectando la fluidez y la permeabilidad de la membrana, volviéndola susceptible a agentes externos y propensa a lisis. En este contexto, la adaptación homeoviscosa implica un balance entre el contenido de ácidos grasos saturados e insaturados de las membranas celulares, por lo que, para ajustar la fluidez ante los cambios de temperatura, la membrana celular incorpora (cuando la temperatura disminuye) o retira (cuando la temperatura aumenta) ácidos grasos a la membrana celular con la finalidad de recuperar su fase líquida cristalina (Jebbar *et al.*, 2020; Shim *et al.*, 2020; Ernst *et al.*, 2016).

En *I. galbana*, bajas temperaturas inducen el mecanismo de respuesta de la adaptación homeoviscosa. Zhu *et al.* (1997) reportan que cuando se cultiva *I. galbana* TK1 en temperaturas frías (15 °C) se obtiene un incremento en la producción de PUFAS y en el porcentaje de DHA (22%), pero disminuye la productividad de peso seco. La producción de peso seco alcanzó su punto máximo a las 7 horas a 30 °C, mientras que, en 15 °C, el punto máximo de producción fue alcanzado a las 12 horas. Asimismo, la fase de cultivo tiene efecto en la producción de PUFAS, se reporta una mayor concentración de PUFAS en fase exponencial que en fase estacionaria en temperaturas altas (30°C) y bajas (15°C).

Renaud *et al.* (2002) reportaron una temperatura óptima de crecimiento a 27 °C (tasa de crecimiento específico 0.97 día<sup>-1</sup>) y una tolerancia térmica hasta los 33 °C. Presentando la muerte celular a 35

°C. Altas temperaturas provocan el incremento de la producción de lípidos y el contenido de ácidos grasos saturados. A 27°C se reporta la mayor concentración de ácidos grasos saturados (45% de los ácidos grasos).

## 2.5. Diferencias Intraespecíficas en la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento

La temperatura afecta la producción de biomasa y lípidos en *I. galbana*; entre 25 y 30 °C se favorece un aumento de la biomasa y a 15 °C la producción de lípidos (Zhu *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2023). Sayegh y Montagnes (2010) reportan que la composición bioquímica y tasa de crecimiento poblacional de *I. galbana* en respuesta a la temperatura varían según la cepa y sus diferencias intraespecíficas. Estos autores indicaron que existen cepas (T y D) con resistencia a cambios térmicos, reportando variaciones mínimas en la producción de biomasa y composición bioquímica en cultivos en temperaturas de 15 a 30 °C. En contraste, otras cepas (M y G) de *I. galbana* presentaron modificaciones significativas en la tasa de crecimiento poblacional y composición bioquímica ante las modificaciones de temperatura.

Liu *et al.* (2013) realizaron una revisión analizando 19 cepas de *I. galbana* cultivadas 22 °C, con intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en reactores de columna con burbujeo con 100 mL de medio f/2 modificado (200 mg/L de N y 9 mg/L de P) con salinidad de 35, para determinar diferencias entre cepas en el crecimiento y la capacidad de producción de DHA. Los autores encontraron que el contenido de DHA osciló entre el 6.8% y el 17.0% del total de ácidos grasos, el mayor contenido de DHA ocurrió en la fase de crecimiento exponencial en la mayoría de las cepas, siendo la cepa #153180 la que obtuvo la mayor producción de DHA con 17.5% del perfil de ácidos grasos.

## 2.6. Efecto de la Iluminación en la Composición Bioquímica y la Tasa de Crecimiento

La intensidad de luz (radiación de flujo de fotones), la longitud de onda y el fotoperiodo modifican la tasa de crecimiento y composición bioquímica de *I. galbana* (Che *et al.*, 2019; He *et al.*, 2018;

Suhaimi *et al.*, 2021; Ohi *et al.* 2002; Li y Liu 2020; Schulze *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2014). Considerando la cantidad de horas luz, el fotoperiodo ha demostrado formar parte del proceso de sincronización en el ciclo celular de las microalgas (Lien y Knutser, 1979). Michels *et al* (2014) implementaron un régimen de temperatura fría (10, 15 y 20 °C) en horas oscuridad (aproximadamente 12 horas) en *Tetraselmis suecica* para estudiar modificaciones en la productividad bioquímica, reportando que se observó un mayor contenido de carbohidratos y un menor contenido de proteínas en los periodos con más luz. Los carbohidratos producidos durante el día se utilizaron para la síntesis de proteínas durante la noche, mientras que el contenido de ácidos grasos se mantuvo constante durante el día. La tasa de pérdida de carbohidratos por la noche estaba linealmente relacionada con la tasa de crecimiento específica.

Considerando la fuente de luz y su longitud de onda, los cultivos en fotobiorreactores con diodos de luz (LEDS) con diferentes longitudes de onda, indujeron un cambio en la composición bioquímica y la tasa de crecimiento poblacional. Che *et al.* (2019) reportaron que cultivos de *I. galbana* con una intensidad de luz de  $400\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  incrementaron la tasa de crecimiento poblacional y la producción de lípidos, y que a los  $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ocurrió una disminución en la tasa de crecimiento poblacional debido a la fotoinhibición. El fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas oscuridad indujo una mayor producción de biomasa en comparación con los fotoperiodos de iluminación continua y el de 12 horas luz con 12 horas oscuridad. Por otra parte, la exposición a una iluminación con longitud de onda verde (520 nm) incrementó la producción de lípidos totales en un 65.2%. Se indica en el estudio que el aumento en el contenido de lípidos durante la exposición a la iluminación con longitud de onda verde probablemente se debe a la conversión de los carbohidratos acumulados que sirven como precursores para la síntesis de lípidos.

He *et al.* (2018) reportaron que la mayor producción de DHA en *I. galbana* ocurre en las intensidades lumínicas de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con porcentajes de DHA de 8.54% cuando se cultiva con una longitud de onda de roja: azul (640: 465 nm) y se cosecha en fase exponencial. Por su parte, cuando se cultivó con una longitud de onda luz verde y se cosechó en fase estacionaria, se obtuvo un porcentaje de DHA de 9.46%.

Suhaimi *et al.* (2021) reportaron que diferentes longitudes de onda producen diferentes efectos en *I. galbana*. Cuando se cultivó la microalga con iluminación fluorescente e iluminación LED se obtuvo una mayor densidad celular y cuando se cultivó con una longitud de onda amarilla (580nm) se obtuvo un mayor porcentaje de lípidos (27%) con base en el peso seco. Por último, cuando se

cultivó la microalga con iluminación fluorescente (400-700nm), se obtuvo un mayor porcentaje de carbohidratos (8.2%) en relación con el peso seco. Suhaimi *et al.* (2021) señalaron que estos efectos causados por diferentes longitudes de onda se pueden deber a la tasa y la eficiencia de transporte de electrones.

Por su parte, Li y Liu (2020) reportaron el efecto de distintas longitudes de onda de luz (luz blanca (400-700nm), luz azul (400-500nm), luz roja (570-680nm) y luz verde (450-600nm) producidas por sistemas LED sobre el crecimiento, el contenido de pigmento, la absorción de luz, eficiencia fotosintética y los parámetros de fluorescencia de clorofila de la cepa IOAC724S de *I. galbana*. La tasa de crecimiento de las microalgas expuestas a luz verde no fue significativamente diferente de la de luz blanca, pero fue significativamente superior a la de la luz azul o la luz roja. Las cuatro longitudes de luz fueron absorbidas eficazmente, con una tasa de absorción de hasta el 92%-93%. La luz absorbida por los pigmentos contribuye sólo en parte a la luz absorbida por las células, oscilando entre el 8.3% en luz roja y el 59.7% en luz azul. La mayor absorción de luz se obtuvo en las células cultivadas con luz blanca, pero disminuyó la eficiencia fotosintética. Con la luz verde, se mostró un aumento drástico de la eficiencia fotosintética, asociado a una absorción de luz cercana a la de las células expuestas a luz blanca (ambas al 30.6%), lo que sugiere que la luz verde promueve la fotosíntesis de *I. galbana* equilibrando la absorción y la eficiencia fotosintética.

### 3. HIPÓTESIS

*Isochrysis galbana* responde a los cambios de temperatura mediante la adaptación homeoviscosa. Ante cambios de temperatura se genera un ajuste de la fluidez de membrana a través de la concentración del DHA. Se propone que, si a temperaturas entre los 15 y 19 °C incrementa la concentración celular del DHA y entre los 25 y 27 °C aumenta la tasa de crecimiento poblacional, entonces, un cultivo sometido a un régimen térmico oscilatorio ajustará su fluidez de membrana en respuesta al estrés cuando se exponga a temperaturas bajas y aumentará crecimiento celular cuando se exponga a temperaturas altas. En presencia de un fotoperiodo, algunas microalgas señalizan su ciclo celular ante la presencia o ausencia de luz. En presencia de luz se produce la interfase del ciclo celular (Gap 1, Síntesis y Gap 2) y durante este proceso ocurre la acumulación de proteínas y compuestos de almacenamiento energético. En contraste, en oscuridad comienza la fase de mitosis que resulta en la división celular.

Por lo tanto, si *I. galbana* se cultiva con una temperatura oscilatoria entre los límites térmicos inferiores (19°C ó 21°C) en horas luz y los límites térmicos superiores (25°C ó 27°C) en horas oscuridad, se esperaría que en la fase cálida y oscura se favorezca la tasa de crecimiento poblacional, mientras que en la fase fría e iluminada aumente la producción de DHA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la oscilación de temperatura baja (21 a 25 °C) y alta (19 a 27 °C) asociada al fotoperiodo, en los cultivos de *Isochrysis galbana* CIB 88, sobre el crecimiento poblacional, la biomasa, la producción de ácido docosahexaenoico (DHA) y la composición proximal.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar la cinética de crecimiento y la tasa de crecimiento poblacional
2. Determinar la producción unitaria y volumétrica de biomasa
3. Determinar el perfil de ácidos grasos, la producción unitaria y volumétrica de DHA
4. Determinar el contenido unitario y volumétrico de carbohidratos, lípidos y proteínas

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño Experimental

Se realizó un diseño experimental con 2 factores, temperatura (amplitud de oscilación térmica) y fotoperiodo, en cultivos de *I. galbana* (cepa CIB88) para determinar los cambios en composición bioquímica y producción de DHA productor por el efecto de cada factor de manera independiente y en interacción.

### 5.2. Condiciones Experimentales

Se realizaron seis tratamientos, cada uno con cuatro réplicas (24 unidades experimentales en total), con los que se examinó la interacción y el efecto de los dos factores con diferentes niveles “2<sup>k</sup>”:

- El factor temperatura “O” con 3 niveles de oscilación: el nivel “Sin Oscilación [SO]” temperatura constante (23°C); el nivel “Oscilación Baja [OB]” con 4 grados centígrados de oscilación (de 21°C a 25°C); el nivel “Oscilación Alta [OA]” con 8 grados centígrados de oscilación (de 19°C a 27°C).
- El factor fotoperiodo “F” con dos niveles: el nivel “Iluminación continua [SF]” con 24 horas de luz continua; y el nivel “Con Fotoperiodo [CF]” con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

En los tratamientos con oscilación alta se incrementó la temperatura de 19 a 27 °C (incremento de 1 °C cada 15 ± 2 minutos), manteniendo los 27 °C por 8 horas, posteriormente se redujo de 27 a 19 °C (diminución de 1 °C cada 5 ± 1 minutos), manteniendo los 19 °C por 16 horas. En los tratamientos con oscilación baja se incrementó la temperatura de 21 a 25 °C (incremento de 1 °C cada 15 ± 2 minutos), manteniendo los 25 °C por 8 horas, posteriormente se redujo de 25 a 21°C (diminución de 1 °C cada 5 ± 1 minutos), manteniendo los 21 °C por 16 horas. En los tratamientos con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad que estuvieron asociados a una oscilación de

temperatura, se sincronizaron los cambios de temperatura con respecto al fotoperiodo, 16 horas de luz con temperaturas bajas (19 y 21 °C) y 8 horas de oscuridad con temperaturas altas (25 y 27 °C). Generando en total 6 tratamientos con la combinación de los niveles (3x2) de cada factor.

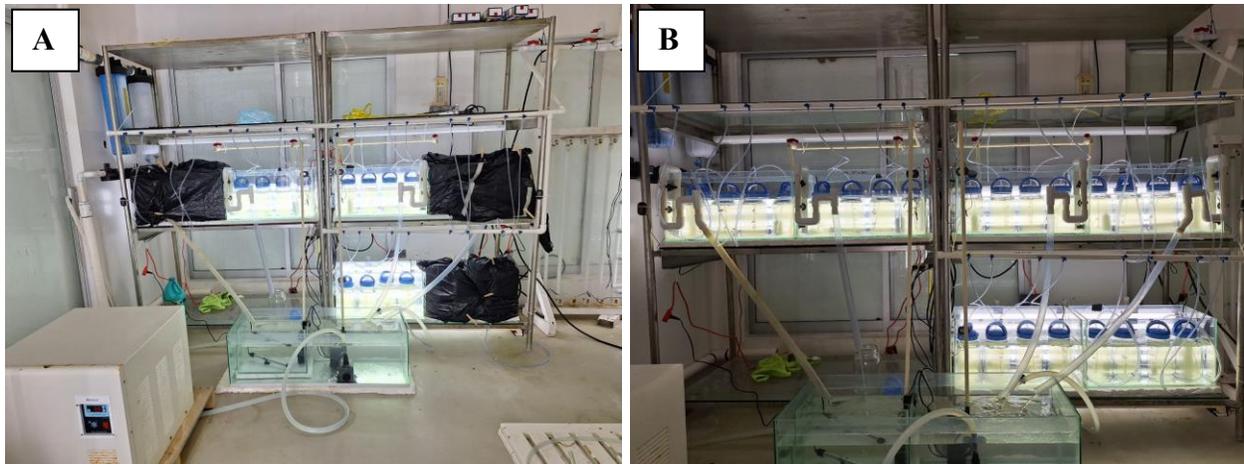
Con lo descrito anteriormente, los tratamientos fueron:

- OACF.- Oscilación Alta (19° a 27°C) – Con Fotoperiodo (16h luz y 8h oscuridad).
- OASF.- Oscilación Alta (19° a 27°C) –Iluminación continua (24h luz).
- OBCF.- Oscilación Baja (21° a 25°C) – Con Fotoperiodo (16h luz y 8h oscuridad).
- OBSF.- Oscilación Baja (21° a 25°C) – Iluminación continua (24h luz).
- SOCF.- Sin Oscilación (23°C) – Con Fotoperiodo (16h Luz y 8h Oscuridad).
- SOSF.- Sin Oscilación (23°C) – Iluminación continua (24h Luz).

Los tratamientos SOSF y SOCF se consideraron de la siguiente manera: SOSF como control que corresponde a las condiciones de cultivo en el laboratorio de Microalgas de la Planta Piloto de Peces Marinos del CIAD Unidad Mazatlán; SOCF como control de prueba, que corresponde a las condiciones de cultivo previamente mencionadas con la variación del fotoperiodo.

### 5.3. Sistema Experimental

El sistema experimental (Figura 3) conformado por seis acuarios de 60 litros (27.9 cm\*30.5 cm\*70.2 cm) con calentadores automáticos, conectados a un sistema de recirculación con enfriador de agua para regular la temperatura de acuerdo con cada requerimiento térmico. Cada acuario contaba con cuatro unidades experimentales. Cada unidad experimental compuesto de un recipiente de vidrio de 2 L, con 1.7 L de medio de cultivo F/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975) inoculado con  $234,375 \pm 5,759$  células/mL. Cada unidad estuvo conectada a un sistema de aireación filtrada para mantener la agitación del cultivo. Las unidades fueron etiquetadas con un código de identificación para establecer el número de réplica y tratamiento (por ejemplo, recipiente OACF1: unidad experimental con las condiciones 19 a 27°C [OA], fotoperiodo 16h Luz/ 8h Oscuridad [CF], réplica 1[1]).



**Figura 3.-** Sistema experimental. a) En la esquina inferior izquierda se observa el enfriador de agua conectado al reservorio. b) Tubería de entrada de agua a los acuarios por bombeo del reservorio. Cada uno cuenta con un sistema de salida por gravedad que retornaba el agua al reservorio.

El control de las temperaturas inferiores (19 y 21 °C) se llevó a cabo dentro de un reservorio de 200 L (39.9 cm\*30.8 cm\*100.2 cm) conectado a un enfriador en línea (BOYU Series LN modelo BYLN-2600, China) mediante una bomba sumergible (EVANS, modelo AQUA60W, México) con flujo óptimo de 18 L/min (manteniendo una temperatura de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Dentro del reservorio se encontraba otro contenedor (40 L) provisto de dos calentadores de agua automáticos de 300W (SUNNY, modelo SGH-380, México), que mantuvieron la temperatura en  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  (Figura 3). Del reservorio, el agua a  $19^\circ\text{C}$  se suministró mediante una bomba sumergible (BOYU, Series SP modelo, SP-2300, China) a los acuarios que tuvieron los tratamientos de oscilación térmica alta (OA). Mientras del contenedor a  $21^\circ\text{C}$ , el agua fue suministrada con una bomba sumergible (BOYU, Series SP modelo, SP-2300, China) a los acuarios de los tratamientos con oscilación baja (OB, Figura 3).

El control de las temperaturas superiores (25 y 27 °C) fueron logrados con calentadores de agua automáticos de 100 W (SUNNY, modelo SGH-380, México) uno en cada acuario, manteniendo la temperatura de acuerdo con cada tratamiento (OA [ $27^\circ\text{C}$ ] y OB [ $25^\circ\text{C}$ ]). Cada uno conto con una piedra aireadora para favorecer el movimiento del agua y mantener una temperatura homogénea (Figura 3).

Para disminuir la temperatura en las unidades experimentales, se encendía el sistema de recirculación durante el fotoperiodo de 16 horas luz, alcanzada la temperatura deseada era mantenida de acuerdo con el tratamiento (OA [ $19^\circ\text{C}$ ] y OB [ $21^\circ\text{C}$ ]) el resto de las 16 horas. Pasado

el tiempo, se apagaba el sistema y se encendían los calentadores automáticos para incrementar la temperatura según el tratamiento (OA [27 °C] y OB [25 °C]) y mantenerla el resto de las ocho horas. Coordinando el encendido del equipo para calentar o refrigerar de acuerdo con el tratamiento térmico y lumínico.

Los acuarios con los tratamientos control, no tuvieron conexión ni interacción con el reservorio. Cada uno contaba con un calentador de agua automático de 300W (SUNNY, modelo SGH-380, México) y aireación para favorecer el movimiento del agua y mantener homogénea la temperatura  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

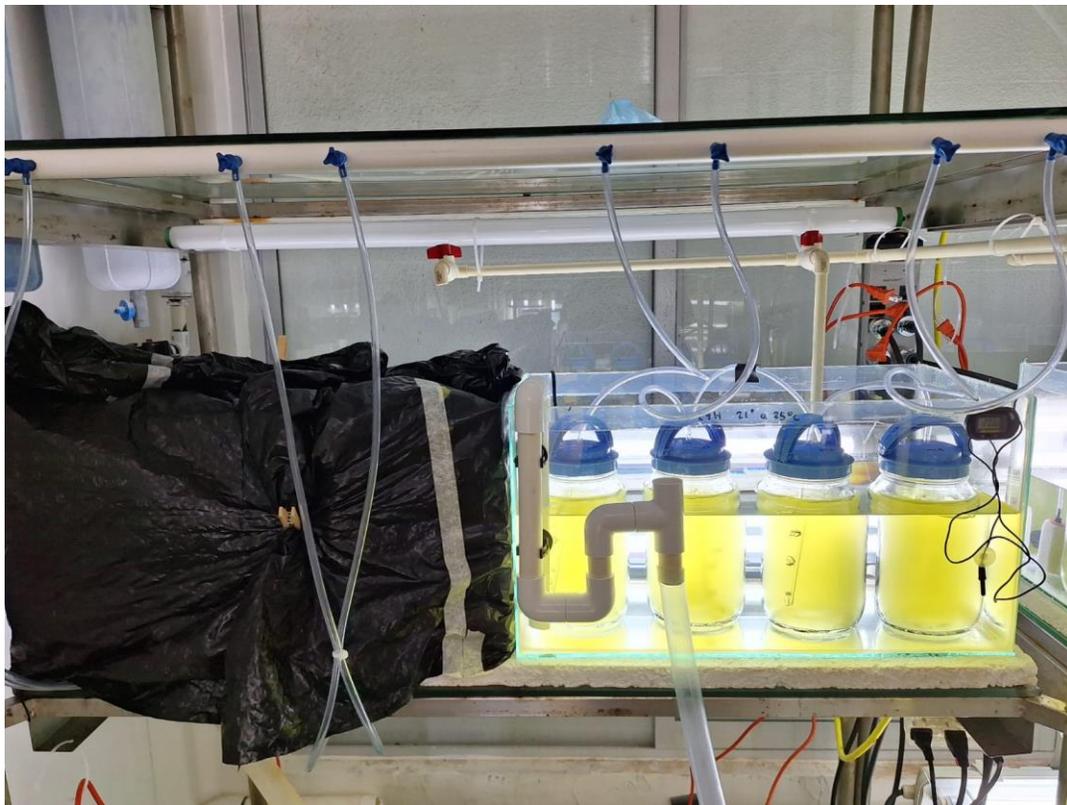


**Figura 4.-** Acuarios experimentales. Cada uno representaba un tratamiento con 4 unidades experimentales equipados con entradas y salidas de agua, calentadores automáticos, aireadores e iluminación compartida para controlar las condiciones del tratamiento.

El sistema de iluminación consistió en luminarias conformadas por dos lámparas tubulares LED opacas de 18W (PHILCO, cod. 57155, México). Se usaron dos luminarias en posición horizontal para iluminar dos tanques con 8 unidades experimentales en posición vertical, cada unidad

experimental recibió una iluminancia de  $6,000 \pm 100$  lx. La iluminancia se midió con un Luxómetro (HANNA Instrumentes, modelo HI97500, Italia). Para determinar la irradiancia se usó la calculadora en línea “Convert Lux to PPF - Online Calculator” (<https://waveformlighting.com/horticulture/convert-lux-to-ppfd-online-calculator>) (Staff, 2023). Se consideró el factor de conversión del espectro “High CRI LED 6500K”, acorde a las lámparas usadas. Así, se determinó que cada unidad experimental obtuvo una irradiancia aproximada de  $103.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 1.72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para controlar la cantidad de horas luz en cada acuario de manera independiente, los tratamientos con fotoperiodo eran cubiertos completamente durante ocho horas con una lona de plástico opaca de tres capas. Los acuarios cumplían con el mismo régimen de oscilación de temperatura junto con los tratamientos sin fotoperiodo como se observa en la Figura 5.



**Figura 5.-** Tratamientos con y sin fotoperiodo. A la izquierda el acuario se encuentra cubierto por una lona de plástico opaco de triple capa. El tratamiento a la derecha tenía iluminación continua (SF). Todos los tratamientos con fotoperiodo (CF) fueron cubiertos durante las 8 horas del periodo oscuro.

#### 5.4. Desinfección y Lavado del Material

Todo el material utilizado en el estudio recibió un tratamiento de desinfección o esterilización.

El material para la preparación del medio de cultivo, manejo de la cepa, toma de muestra y conteo celular fue lavado previamente con jabón convencional y abundante agua, enjuagado con agua destilada y esterilizado a 121°C, 15 psi por 15 minutos.

Previo al inicio del bioensayo, el sistema de recirculación fue lavado con limpiador de vidrios Windex (SC Johnsons) y desinfectado con agua clorada al 0.2%. Durante el bioensayo, el sistema de recirculación fue vaciado y relleno con agua destilada clorada al 0.1%, para evitar la contaminación cruzada.

Las unidades experimentales fueron lavadas con jabón libre de fosfatos al 15% (MERCCK, código MX1400005004, Alemania) y enjuagadas con agua destilada. Posteriormente, se dejaron secar por 24 horas. Después, se les llenaron con 1.6 L de agua de mar hiperfiltrada, con salinidad de 27 y se cloraron al 0.1%. Permanecieron con el agua clorada 48 h antes del inicio del bioensayo, para asegurar la desinfección en el interior.

El material para la determinación de lípidos totales, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos, fue lavado con detergente libre de fosfatos y enjuagado con agua destilada abundante con la finalidad de evitar contaminantes en la determinación.

#### 5.5. Preparación del Medio de Cultivo F/2

Considerando los rendimientos de los distintos medios de cultivo sobre *I. galbana* (Sánchez *et al.*, 2000) y la disponibilidad de reactivos, se optó por el uso del medio de cultivo F/2 (Guillard & Ryther, 1962), sin silicatos. El medio se preparó generando cuatro soluciones de nutrientes mayores (nitrato y fosfato) y nutrientes menores (minerales y vitaminas).

Se prepararon las soluciones de nutrientes siguientes:

- Solución stock de nitrato
  - En 1 L de agua destilada agregar 75 g de NaNO<sub>3</sub>.

- Solución stock de fosfato
  - En 1 L de agua destilada agregar 5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
- Solución stock de minerales
  - Para la solución de minerales se requirió preparar previamente cinco soluciones madre de cinco reactivos diferentes, una solución madre por cada reactivo, los cuales se describen a continuación:
    - En 250 mL de agua destilada agregar 2.45 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
    - En 250 mL de agua destilada agregar 1.575 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
    - En 250 mL de agua destilada agregar 5.5 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
    - En 250 mL de agua destilada agregar 2.5 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
    - En 250 mL de agua destilada agregar 45 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .
  - En 955 mL de agua destilada se agregó 3.15 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4.36 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de cada una de las cinco soluciones stock de minerales, obteniendo un volumen final de 1 L.
- Solución stock de vitaminas
  - Nota: La solución stock de vitaminas se debe preparar con materiales y agua destilada previamente esterilizados. Estos reactivos no se deben esterilizar debido a que las vitaminas se desnaturalizan al someterlas a altas temperaturas.
  - Para la solución stock de vitaminas se prepararon previamente dos soluciones stock, una de biotina (vitamina H) y otra de cianocobalamina (vitamina  $\text{B}_{12}$ ), de la siguiente manera:
    - En 250 ml de agua destilada esterilizada se agregaron 25 mg de biotina (vitamina H).
    - En 250 ml de agua destilada esterilizada se agregaron 250 mg de cianocobalamina (vitamina  $\text{B}_{12}$ ).
  - En 989 mL de agua destilada esterilizada se agregaron 200 mg de tiamina (vitamina  $\text{B}_1$ ), 10 mL de la reserva de biotina (vitamina H) y 1 mL de cianocobalamina (Vitamina  $\text{B}_{12}$ ).

Una vez preparadas las soluciones stock de minerales, nitrato y fosfato, se deben esterilizar por 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Posterior a la esterilización, se debe dejar enfriar a temperatura ambiente y mantenerse siempre en refrigeración sin exposición a la luz. Solo se deben manipular las

soluciones stock con material estéril y en zonas axénicas (bajo campana de flujo laminar o con el uso de mechero) para evitar la contaminación del medio y de los cultivos.

Para preparar el medio de cultivo F/2, por cada 996.5 mL de agua dulce, salada, etc. Se agregó:

- 1 mL de la solución stock de nitrato
- 1 mL de la solución stock de fosfato.
- 1 mL de la solución stock de minerales
- 0.5 mL de la solución stock de vitaminas

En el caso de *I. galbana* no se requiere el uso de silicatos ya que la especie no cuenta con una frústula, se evitó el uso de silicatos para evitar la precipitación (NCMA, s. f.).

## 5.6. Obtención de la Cepa

La cepa CIB 88 de *Isochrysis galbana* utilizada en el presente estudio fue adquirida de la Colección de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR) Unidad La Paz. Esta cepa fue aislada de una muestra de agua marina proveniente de la bahía de La Paz, B. C. S. México.

## 5.7. Aclimatación de la Cepa

Una vez en el laboratorio de microalgas de la Planta Piloto de Peces Marinos-CIAD, la cepa CIB88 fue resembrada en tubos de ensayo con 15 mL de medio F/2 estéril (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975). La cepa se aclimató a las siguientes condiciones: 23°C, con iluminación de 24 horas luz e irradiancia de 250-300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 6 semanas previas al experimento (condiciones a las que se mantienen las cepas en el laboratorio de microalgas de la Planta Piloto de Peces Marinos-CIAD).

En el periodo de aclimatación, las cepas fueron resembradas cada 15 días. Cada semana a partir de la segunda semana de aclimatación se realizaron desdobles de la cepa para incrementar su volumen en la siguiente secuencia: de 15 mL a matraces de 250 mL con 150 mL de medio F/2 estéril; de

150 mL a matraces de 2 L con 1.5 L de medio F/2 estéril; de 1.5 L a matraces de 6 L con 4 L de medio F/2 estéril.

### 5.8. Inoculación de las Unidades Experimentales

Al inicio del bioensayo, a cada una de las unidades experimentales, se le depositó agua de mar hiperfiltrada a 27 PSU, clorada al 0.1% por 48 horas, se les agregó 0.2 g de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) para neutralizar el cloro. Una hora después de la neutralización, se tomaron muestras de cada unidad y se usó ortotolidina (PENTAIR, EUA) para determinar la presencia de cloro residual y confirmar la eficacia de la neutralización. Confirmada la neutralización, a cada unidad se le agregó 1.7 mL de las soluciones de nitratos, fosfatos, vitaminas y minerales para preparar el medio de cultivo F/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975). Las unidades descloradas y con 1.6 L de medio F/2, se inocularon con 100 mL de un cultivo madre de *I. galbana* con  $5,840,000 \pm 592,565$  células/mL para alcanzar en cada unidad una concentración de 350,000 células/mL. Posteriormente, se les suministró aireación mediante un tubo de vidrio estéril conectado a una manguera de plástico del sistema de aireación. Finalmente, las unidades experimentales fueron repartidas entre los tratamientos según su etiquetado.

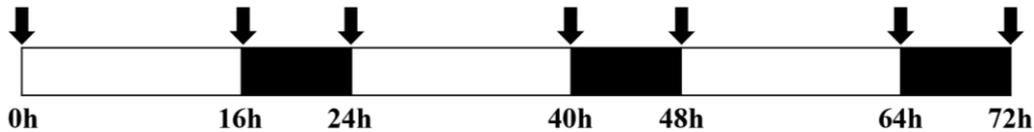
### 5.9. Toma de Muestra

A continuación, se describen las técnicas y tiempos utilizados según el objetivo a cubrir:

#### **5.9.1. Tasa de Crecimiento Poblacional y Tamaño Celular**

De cada unidad experimental se tomaron muestras de 1 mL con pipetas de vidrio estériles de 2 mL, a las 0, 16, 24, 40, 48, 64, 72, 88, 96, 112, 120 y 136 horas.

Después de la toma de muestras en el tiempo inicial (0h), cada muestreo correspondió a un cambio en la oscilación de temperatura acorde al cambio de fotoperiodo como se muestra en la figura 6.



**Figura 6.-** Protocolo de toma de muestra desde el del experimento (0h), cada 16 horas y 8 horas de manera sucesiva, respectivo al fotoperiodo. Los rectángulos blancos representan fases con iluminación y los rectángulos negros representan fases sin iluminación, la toma de muestra se realizó de la misma manera en las horas 88, 96, 112, 120 y hasta el momento de cosecha a las 136 horas.

Por lo tanto, se tomaron muestras cada 16 horas (finalización del ciclo “frío” [19 y 21°C] con presencia de luz) y 8 horas (finalización del ciclo “cálido” [25 y 27 °C] en oscuridad).

Se consideró como tiempo final para la cosecha las 136 horas debido a que algunos tratamientos alcanzaron antes la fase estacionaria, e incluso, algunas unidades experimentales ya se encontraron en fase de muerte.

En las tomas de muestra a los tiempos 120 y 136 horas, además de realizarse los conteos celulares se tomaron microfotografías de las células para su medición. Las microfotografías se obtuvieron de acuerdo con lo descrito en la sección 5.11. *Determinación del volumen celular.*

### **5.9.2. Determinación de la Composición Bioquímica, el Perfil de Ácidos Grasos, la Producción de DHA y Biomasa**

A las 136 horas, de acuerdo con las cinéticas de crecimiento, la mayoría de los tratamientos se encontraron en fase de desaceleración y fase estacionaria. De acuerdo con Fidalgo *et al.* (1998), se consigue una mayor acumulación de DHA en la fase de desaceleración, por lo que las 136 horas marcaron el final del bioensayo.

A las 136 horas, cada unidad experimental fue retirada del sistema de recirculación y fue refrigerada a 4°C durante 2 horas, para detener cualquier actividad metabólica en las unidades experimentales y favorecer la precipitación de la biomasa. No se utilizó ningún reactivo coagulante

o precipitante para evitar cualquier daño posible a la membrana celular, con la finalidad de mantener intactos todos los ácidos grasos.

Mientras los cultivos se refrigeraban, en una báscula milimétrica (Adventurer de la marca OHAUS (modelo AR1530, EUA) se pesaron 24 tubos de polipropileno de 15 mL (FALCON, modelo FA352097, EUA) vacíos y sin tapa, para mantener un registro del peso de los tubos vacíos, dato necesario para determinar la obtención de biomasa húmeda y seca. Cada tubo pesado se etiquetó con el código de identificación de cada una de las unidades experimentales.

Pasadas las 2 horas en refrigeración, con una pipeta de 15 mL se recolectaron 14 mL de cada unidad experimental y fueron depositados en los tubos FALCON.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm y 4 °C, por 20 minutos en una Centrifuga BECKMAN GS (modelo GS-15R, USA).

Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante con pipetas Pasteur de plástico, con el cuidado de no tomar o resuspender el precipitado. Retirado el sobrenadante, se pesó para registrar la cantidad de biomasa acumulada por centrifugación. La biomasa acumulada se obtuvo a partir de la resta del peso del tubo con biomasa húmeda menos el peso del tubo vacío (ambos pesos se tomaron sin tapa). Una vez registrado el peso de la biomasa húmeda acumulada, se volvió a depositar 14 mL de biomasa de las unidades experimentales a sus respectivos tubos codificados. Se depositó el líquido lentamente resbalando por las paredes del tubo para evitar deshacer la pastilla de biomasa concentrada. Este proceso de rellenado se repitió hasta que cada tubo registrara una biomasa húmeda mayor a los 250 mg para asegurar que después de la liofilización quedara al menos 25 mg de muestra por tubo. Se registró la cantidad de centrifugaciones y rellenados de cada tubo al igual que la biomasa húmeda recolectada.

Una vez que cada tubo registró un peso mayor de 250 mg, fueron almacenados en un ultracongelador (Revco RDE Series, THERMOSCIENTIFIC, modelo RDE30086FA, USA) a -60 °C. Los tubos se mantuvieron en congelación por un mínimo de 48 h para proceder con la liofilización.

#### 5.10. Caracterización de la Tasa de Crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento poblacional se hicieron conteos celulares a las 0, 16, 24, 40,

48, 64, 72, 88, 96 112, 120 y 136 horas. Con una pipeta Pasteur de vidrio (una pipeta diferente por unidad) se tomó un 1 mL de cada unidad experimental. La muestra se depositó en un microtubo de 1.6 mL (NEPTUNE, modelo 4445, EUA) y se fijó con 3 gotas de Yodo Lugol al 10%, para detener el metabolismo y movimiento de las células presentes en la muestra, con la finalidad de facilitar el proceso de conteo; la muestra fijada se dejó reposar durante 5 minutos.

Posteriormente, con una pipeta Pasteur de vidrio se agitó vigorosamente, se tomaron 500  $\mu$ L de la muestra y se depositaron en una cámara Neubauer con línea doble brillante, profundidad de 0,1mm (Marienfeld Superior, modelo 0640130, Alemania) y se dejó precipitar por dos minutos.

La muestra se observó en un microscopio con el objetivo de 40X. Se contaron los cuadros de las cuatro esquinas y el cuadro central. El conteo obtenido se registró como “número de células contadas”. Para cada unidad experimental el conteo se realizó por cuadruplicado.

Para obtener la densidad celular se utilizó la fórmula reportada por Velasco-Blanco y Abdo-Parra (2013):

$$\text{Densidad celular} = (\text{Número de células contadas en los 5 cuadros})(5)(10,000)$$

Donde:

Densidad celular = células por mililitro de medio de cultivo a una determinada hora (células/mL)

Con los datos de densidad celular a diferentes tiempos, se obtuvo la curva de crecimiento que relaciona los valores de densidad ( $X$  = células/mL) a través del tiempo ( $T$  = horas). Mediante la observación de la pendiente en la gráfica se determinaron las fases: adaptativas, de aceleración, exponencial y desaceleración (Guillard, 1973).

La tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) se determinó con la siguiente ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

X = Densidad celular (células/mL) en dos tiempos de la fase de crecimiento exponencial o logarítmica.

In = Logaritmo natural de  $X_2$  y  $X_1$ .

T = Tiempo en (horas).

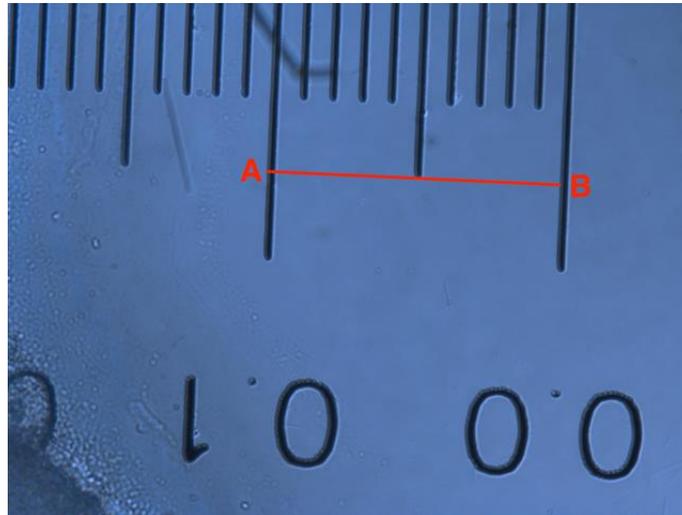
### 5.11. Determinación del Volumen Celular

Para determinar la existencia de una sincronización en el ciclo celular acorde al fotoperiodo identificando un incremento en el volumen en presencia de luz y una disminución del volumen en ausencia de luz, se tomaron microfotografías de las células de cada unidad experimental a las 120 y 136 horas. De las muestras obtenidas (sección 5.9.1 *Tasa de crecimiento poblacional y tamaño celular*), se tomaron micrografías con un microscopio óptico con iluminación de interferencia diferencial (OLYMPUS modelo BX53, Japón) equipado con una cámara digital (modelo QCOLOR5, EUA) y operada mediante el programa Q-Capture Pro 7 (QIMAGING, Canadá). Por cada muestra se tomaron de 10 a 14 microfotografías con el objetivo de 60 X. Al finalizar la serie fotográfica se tomó la imagen de una escala micrométrica de calibración. Las microfotografías digitales se almacenaron en formato TIFF y se convirtieron posteriormente a formato PNG mediante un convertidor de archivos en línea (Convertio; <https://convertio.co/es/>).

Antes de efectuar la medición de las longitudes celulares se procedió a realizar la calibración de las medidas en el programa SigmaScan Pro (Versión 5.0.0, USA). Para calibrar la transformación de la distancia en píxeles a micrómetros se usó la imagen de la escala micrométrica como referencia. Primero se tendió una línea entre dos puntos (puntos A y B en la Figura 7) de una distancia conocida en micrómetros (p. ej., 1000  $\mu\text{m}$ ; Figura 7) de la imagen de la reglilla de calibración. Entonces, la distancia de la línea tendida expresada en píxeles se especificó para establecer un factor de conversión en micrómetros que usó el programa en las sucesivas mediciones. Así quedó calibrada la toma de distancias en las diferentes microfotografías.

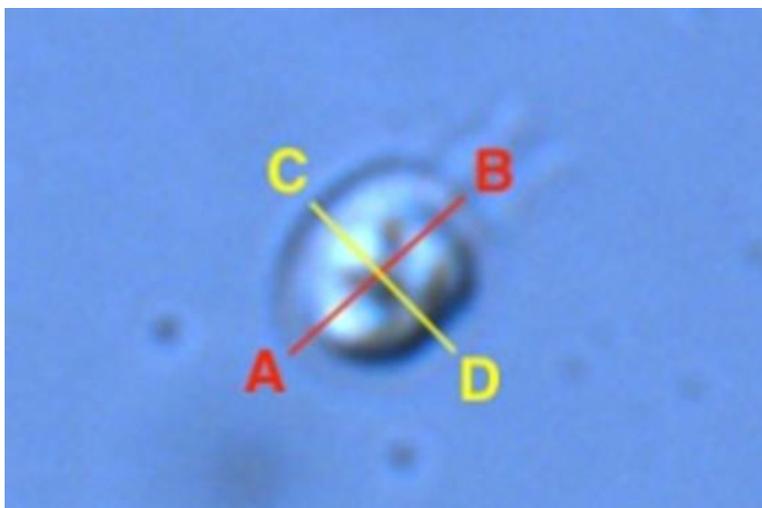
Mediante el uso del programa se determinó la longitud y el ancho celular en  $\mu\text{m}$  a partir de los

pixeles tomados en la fotografía usando de referencia otra fotografía de una regla de medición en milímetros (mm). El volumen se determinó suponiendo una figura elipsoide por célula, utilizando una constante como remplazo a la medida de altura. A continuación, se explicará paso a paso las acciones realizadas para determinar el volumen:



**Figura 7.-** Sección de la reglilla de calibración (1 mm de longitud) usada para calibrar las medidas de longitud de las microfotografías obtenidas a las 120 horas. La calibración convierte la distancia en pixeles de la imagen a su equivalente en  $\mu\text{m}$ . La distancia entre los puntos A y B representa 100  $\mu\text{m}$ .

Después de efectuar la calibración, se tomó la longitud y el ancho de al menos 30 células por muestra (720 medidas de longitud y 720 medidas de ancho, en total). La longitud se tomó a partir de los dos puntos más alejados de la membrana celular, tomando como referencia del eje de simetría la posición de los flagelos. El ancho se tomó realizando una línea perpendicular justo en medio de la recta que representa la longitud (Figura 8).



**Figura 8.-** Microfotografía de *Isochrysis galbana*. Se señalan las medidas tomadas para calcular el área y volumen de cada célula. La distancia entre los puntos A y B representa la longitud de la célula. La distancia entre los puntos C y D representa el ancho de la célula.

Las medidas de la longitud obtenidas se usaron para calcular el volumen celular a partir de la fórmula para determinar el volumen de un elipsoide (Heming y Buddintong, 1988), la cual se describe a continuación:

$$V = 0.1667\pi LH^2$$

Donde:

V: Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ )

L: Longitud de la célula ( $\mu\text{m}$ )

H: Ancho de la célula ( $\mu\text{m}$ )

## 5.12. Liofilización de las Muestras

La biomasa obtenida de cada unidad experimental fue liofilizada (Liofilizador FreeZone 1L,

LABCONCO, modelo 7740021, EUA) a  $-52\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con una presión de 0.205 mBar, por 48 horas. A los 24 tubos FALCO codificados con al menos 250 mg de biomasa húmeda ultracongelada a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se le retiró la tapa a cada tubo, se le colocó papel PARAFILM (modelo PM-996, EUA) con múltiples perforaciones para permitir la salida del vapor de agua generado en la sublimación del proceso de liofilización. Finalizada la liofilización, se retiraron las tapas de papel PARAFILM y se volvieron a pesar los tubos en la báscula milimétrica (Adventurer, OHAUS, modelo AR1530, EUA) para registrar el peso del tubo con biomasa seca. Con este dato, mediante diferencia gravimétrica, después se dividió entre el volumen centrifugado (mL) y se obtuvo el peso seco por mililitro de cultivo.

Se corroboró el secado total de las muestras con el uso de una espátula de acero. La espátula se introducía en el tubo para moler la pastilla de biomasa seca, si no quedaban restos adheridos de polvo de biomasa a la espátula, se consideraba que la biomasa perdió toda la humedad.

### 5.13. Determinación de Peso Seco, Rendimiento del Peso Húmedo y Rendimiento del Peso Seco

Para la obtención del peso seco producido por tratamiento se utilizaron los datos del peso de los tubos vacíos y el peso de los tubos con biomasa seca posterior a la liofilización, mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$PS = \text{Peso tubo con biomasa seca} - \text{Peso tubo vacío}$$

Donde:

PS = Peso seco (mg).

Peso tubo con biomasa seca = El peso del tubo posterior a la liofilización sin tapa (mg).

Peso tubo vacío = El peso del tubo vacío sin tapa registrado previo a la toma de muestra (mg).

El rendimiento del peso húmedo (RPH) se considera como aquella cantidad de biomasa húmeda

obtenida a partir de la recopilación en cada centrifugación, eliminando el líquido sobrenadante, a partir de un volumen conocido de mililitros del medio de cultivo tomado de las unidades experimentales a las 136 horas. El RPH se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$RPH = \frac{Biomasa\ húmeda\ (mg)}{Volumen\ centrifugado\ (mL)}$$

Donde:

RPH = Rendimiento peso húmedo (mg/mL).

Biomasa húmeda = El total de la biomasa húmeda recopilada (mg).

Volumen centrifugado = La cantidad de mililitros centrifugados de la unidad experimental para obtener la biomasa húmeda (mL).

El rendimiento del peso seco (RPS) se considera como aquella cantidad de biomasa seca obtenida a partir de la biomasa húmeda recopilada en un volumen conocido de mililitros del medio de cultivo tomado de las unidades experimentales a las 136 horas. El RPS se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$RPS = \frac{PS\ (mg)}{Volumen\ centrifugado\ (mL)}$$

Donde:

RPS = Rendimiento de peso seco (mg/mL).

PS = Peso seco (mg).

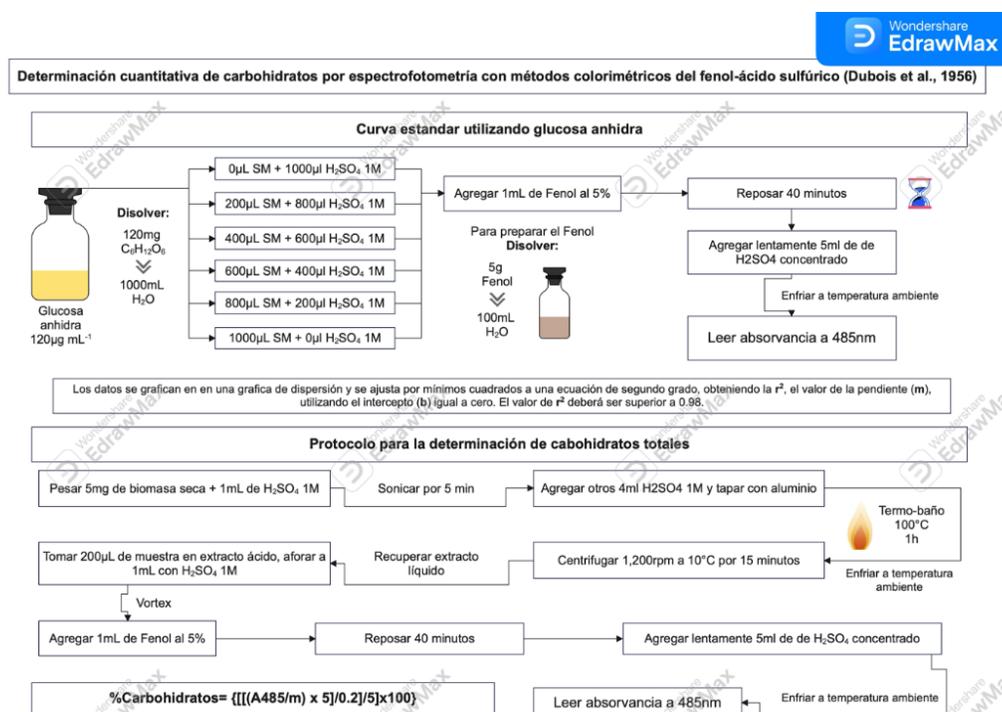
Volumen centrifugado = La cantidad de mililitros centrifugados de la unidad experimental para obtener la biomasa húmeda (mL).

## 5.14. Determinación de Carbohidratos Totales por Método Espectrofotométrico

La extracción de los carbohidratos totales se realizó con 5 mg de biomasa liofilizada y  $H_2SO_4$  de acuerdo a la metodología propuesta por Whyte (1987). La determinación cuantitativa de los carbohidratos totales extraídos se determinó por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico descrita por Dubois *et al.* (1956), utilizando de referencia una curva de calibración realizada con Dextrosa “anhidra” ( $C_6H_{12}O_6$ ).

Antes de proceder con la extracción y determinación de los carbohidratos totales, todo el material fue lavado con detergente libre de fosfatos (MERCK, código MX1400005004, Alemania), enjuagado con agua destilada y secado en su totalidad.

A continuación, se describe paso a paso la metodología de extracción (Whyte, 1987) y determinación cuantitativa (Dubois *et al.*, 1956), con las modificaciones propuestas por Arredondo-Vega *et al.* (2017a) para muestras de microalgas (Figura 9).



**Figura 9.-** Diagrama de flujo para la determinación cuantitativa de carbohidratos totales por espectrofotometría.

La extracción de carbohidratos totales se realizó por cada unidad experimental, cada muestra por separado, para evitar contaminación cruzada. Se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada seca, se almacenaron en un tubo de vidrio con taparrosca y una capa de papel aluminio. Se le asignó a cada tubo el código de identificación de la unidad experimental. A cada tubo con muestra liofilizada se le agregó 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, se mantuvieron los tubos a temperatura ambiente. Se sonicaron durante 30 minutos en un equipo AQUASONIC (VWR Scientific Products modelo 550HT, EUA) para favorecer la lisis celular. Se colocaron los tubos tapados individualmente con papel aluminio en un termo-baño con agitador (VWR Scientific Products modelo 1227, EUA) a 95°C durante 2 horas.

- Nota: (Arredondo-Vega *et al.*, 2017a) indica “calentar en termo-baño a 100 °C por 1 hora”, sin embargo, por limitaciones del equipo presente en las instalaciones, no se pudieron alcanzar estas condiciones, por lo que se optó realizar la modificación antes mencionada.

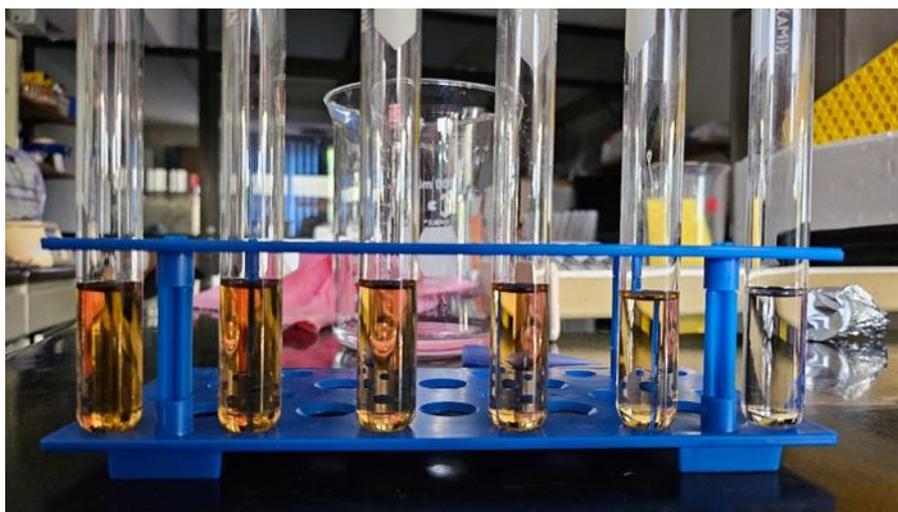
Se retiraron los tubos del baño y se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente (20 °C) en la centrifuga (HWLAB modelo 8M2303146, China).

- Nota: (Arredondo-Vega *et al.*, 2017a) se indica “centrifugar a 1200 g a 10° C por 15 minutos”, sin embargo, por limitaciones del equipo presente en las instalaciones, no se pudieron alcanzar estas condiciones, por lo que se optó realizar la modificación antes mencionada.

Posterior al centrifugado, se separó el extracto ácido con una pipeta Pasteur de vidrio teniendo cuidado de no tomar residuos sólidos presentes en el fondo, y se depositó en otro tubo de vidrio. Con el extracto ácido separado se realizó la determinación cuantitativa de los carbohidratos totales. Preparación de la curva estándar para la determinación cuantitativa de los carbohidratos totales. Se prepararon las siguientes soluciones en tubos a partir de una reserva de 120 µg/mL de dextrosa anhidra (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>):

- 0 µL reserva dextrosa + 1000 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 0 µg/mL Dextrosa
- 200 µL reserva dextrosa + 800 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 24 µg/mL Dextrosa
- 400 µL reserva dextrosa + 600 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 48 µg/mL Dextrosa
- 600 µL reserva dextrosa + 400 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 72 µg/mL Dextrosa
- 800 µL reserva dextrosa + 200 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 96 µg/mL Dextrosa
- 1000 µL reserva dextrosa + 0 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M = 120 µg/mL Dextrosa

A cada tubo se le agregó 1 mL de Fenol al 5% y se mezcló en vortex hasta obtener una mezcla homogénea (Fisher Analog Vortex modelo 9454FIALUS, EUA). Se dejaron en reposo por 40 minutos. Pasado el reposo, se agregaron lentamente a cada tubo 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, lo que incrementa la temperatura de la muestra, por lo tanto, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez alcanzaron la temperatura ambiente viraron a una coloración amarillo ocre (Figura 10), para analizar la muestra se tomaron 4 mL del tubo y se depositaron en una cubetilla para espectrofotómetro de 5 mL. Todas las cubetillas se leyeron a 485 nm en el espectrofotómetro (UNICO modelo 1200, EUA), usando como blanco la solución que contenía solamente 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 10.-** Soluciones de Dextrosa “Anhidra” teñidas con Fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, de acuerdo con la técnica de Dubois *et al.* (1956)

Para la determinación cuantitativa de los carbohidratos totales, en un tubo vacío se depositaron 200  $\mu$ L del extracto ácido con los carbohidratos extraídos (considerando previamente que las muestras tienen alrededor de un 30% de carbohidratos). Se aforaron a 1 mL con 800  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A cada tubo se le agregó 1mL de Fenol al 5% y se mezcló en vortex. Se dejaron en reposo por 40 minutos. Pasado el reposo, se agregaron lentamente a cada tubo 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, y se dejaron a enfriar a temperatura ambiente. Una vez alcanzaron la temperatura, para analizar la muestra se tomaron 4 mL del tubo, se depositaron en una cubetilla y se leyó a 485 nm en el espectrofotómetro, usando con un blanco preparado de la misma manera, sustituyendo el extracto

ácido de la muestra, con 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración de carbohidratos totales en muestras microalgales se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración (Figura 11).



**Figura 11.-** Curva estándar de carbohidratos formada a partir de las absorbancias leídas en el espectrofotómetro a 485nm.

Los cálculos para obtener el contenido total absoluto (µg/mL) o relativo (% de peso seco, PS), se realizaron considerando los datos de peso de la muestra de microalga seca (liofilizada), el volumen total de extracto ácido (Ve), el volumen del extracto ácido (Vm) utilizado para la cuantificación de los carbohidratos y la pendiente (m) de la recta de calibración (en este caso 0.0106). Representado con la siguiente formula:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\left[ \left( \frac{A_{485}}{m} \right) * V_e \right]}{PS} \times 100$$

Donde:

A<sub>485</sub>: Absorbancia a 485 nm.

m: Pendiente de la curva estándar.

Ve: Volumen del extracto ácido (mL).

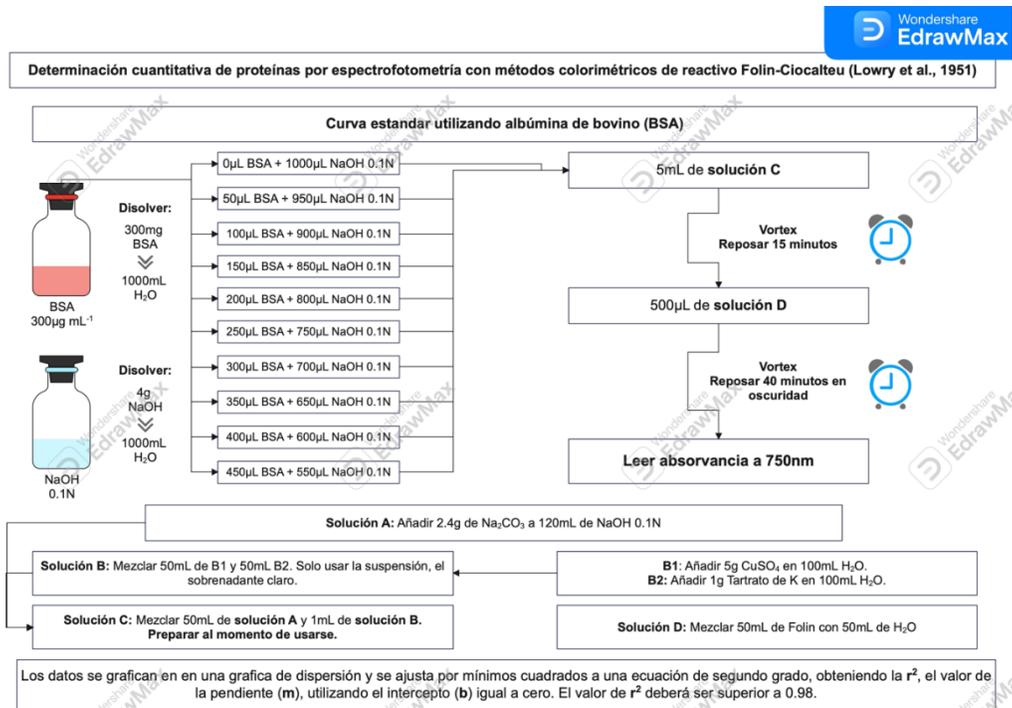
Vm: Volumen de la alícuota calculada (mL).

PS: Peso de la muestra liofilizada (mg).

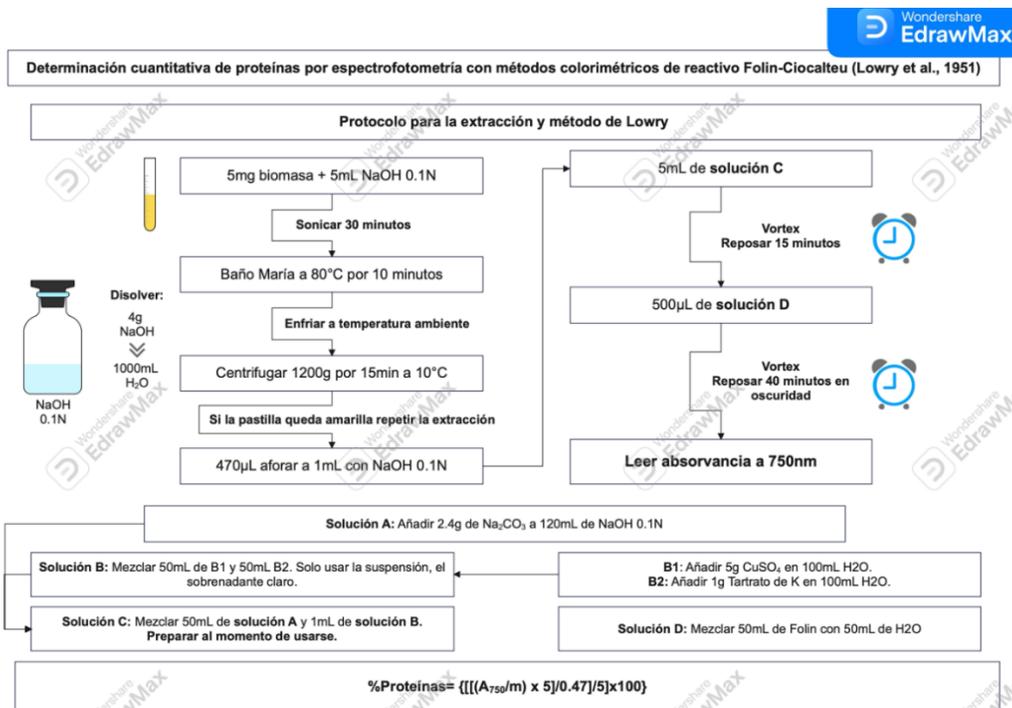
#### 5.15. Determinación de Proteínas Totales por Método Espectrofotométrico

La extracción de proteínas se realizó con 5 mg de biomasa liofilizada y NaOH a 80°C de acuerdo al método propuesto por López *et al.* (1992); la determinación cuantitativa de las proteínas extraídas se determinó por el procedimiento colorimétrico aplicando el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-tungstico: FMT) después de un tratamiento con solución alcalina de cobre, metodología descrita por Lowry *et al.* (1951), utilizando de referencia una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin, BSA) y con las modificaciones propuestas por . Arredondo-Vega *et al* (2017). Se puede observar de manera resumida en las figuras 12 y 13.

Previo a la extracción y determinación de proteínas, todo el material fue lavado con detergente libre de fosfatos marca MERCK (Código MX1400005004, Alemania), enjuagado con agua destilada y secado en su totalidad.



**Figura 12.-** Diagrama de flujo de la preparación de la curva estándar con BSA para la determinación cuantitativa de proteínas por espectrofotometría con métodos colorimétricos de reactivo Folin-Ciocalteu.



**Figura 13.-** Diagrama de flujo de la determinación cuantitativa de proteínas por espectrofotometría con métodos colorimétricos de reactivo Folin-Ciocalteu.

La extracción de proteínas se realizó por cada unidad experimental, cada muestra por separado, para evitar la contaminación cruzada. Se pesaron 5 mg de biomasa liofilizada seca y se almacenaron en un tubo de vidrio con taparrosca. Se le asignó a cada tubo el código de identificación de la unidad experimental. A cada tubo con muestra liofilizada se le agregó 5 mL de NaOH 0.1M. Se sonicaron (AQUASONIC VWR Scientific Products, modelo 550HT, EUA) durante 30 minutos para favorecer la lisis celular. Se colocaron los tubos en el termo-baño (VWR Scientific Products, modelo 1227, EUA) con agitador a 80 °C durante 20 minutos. Se retiraron los tubos del baño y se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente (20 °C) en la centrifuga (HWLAB modelo 8M2303146, China).

- Nota: (Arredondo-Vega *et al.*, 2017b) se indica “centrifugar a 1200g a 10°C por 15 minutos”, sin embargo, por limitaciones del equipo presente en las instalaciones, no se pudieron alcanzar estas condiciones, por lo que se optó realizar la modificación antes mencionada.

Con la biomasa precipitada en el tubo, se separó el extracto alcalino con una pipeta Pasteur de vidrio teniendo cuidado de no tomar residuos sólidos presentes en el fondo, y se depositó en otro tubo de vidrio. El extracto alcalino separado contenía las proteínas para la determinación cuantitativa. Antes de realizar la curva y análisis de resultados, se prepararon las siguientes soluciones.

- Nota: Algunos reactivos se prepararon al momento de usarse porque son susceptibles a la degradación.

Para preparar la **solución A**: Se añadió 10 g de NaCO<sub>3</sub> a 500 mL de NaOH 0.1N.

Para preparar la **solución B**: Mezclar 50 mL de la **solución B1** con 50 mL de la **solución B2**. Solo usar la suspensión sobrenadante clara.

Para preparar la **solución B1**: Añadir 5 g de CuSO<sub>4</sub> en 100 mL de agua destilada.

Para preparar la **solución B2**: Añadir 1 g de Tartrato de K en 100 mL de agua destilada.

Para preparar la **solución C**: Mezclar 50 mL de **solución A** con 1 mL de **solución B**. **Preparar al momento de usarse.**

Para preparar la **solución D**: Mezclar 50 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-tungstico: FMT) con 50 mL de agua destilada. **Preparar al momento de usarse.**

Preparación de la curva estándar para la determinación cuantitativa de las proteínas

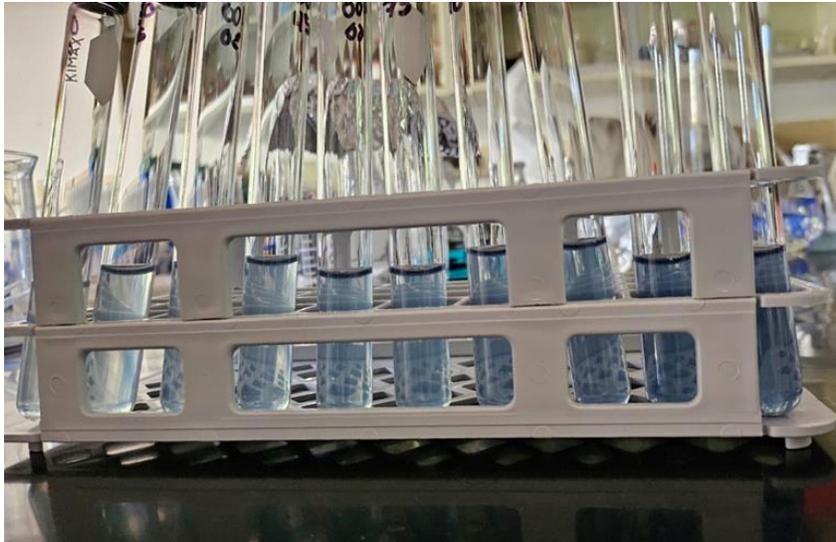
Se prepararon las siguientes soluciones en tubos a partir de una solución concentrada (reserva) de

300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Albumina de Suero Bovino (BSA)

- 0  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 1000  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 50  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 950  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 100  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 900  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 150  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 850  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 200  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 800  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 250  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 750  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 300  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 700  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 350  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 650  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 105  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 400  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 600  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA
- 450  $\mu\text{L}$  reserva BSA + 550  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N = 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA

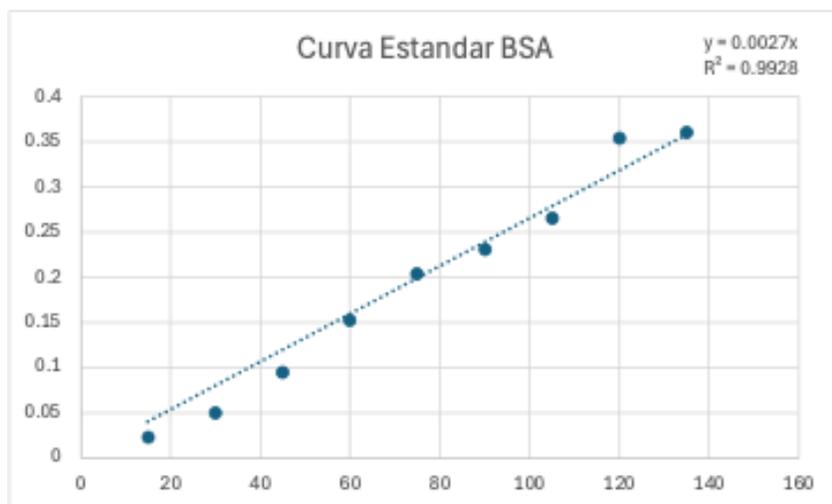
A cada tubo se le agregó 5 mL de **solución C** y se mezclaron en vortex hasta tener una mezcla homogénea (Fisher Analog Vortex modelo 9454FIALUS, EUA). Se dejaron en reposo por 15 minutos. Pasado el reposo, a cada tubo se le agregó 500  $\mu\text{L}$  de **solución D** y se mezclaron en vortex. Se dejaron en reposo por 40 minutos en oscuridad. Pasados los 40 minutos las muestras cambiaron a una coloración azul entre cerúleo, ultramarino e índigo según la concentración (Figura 14), en este punto para analizar la muestra se tomaron 4 mL del tubo, se depositaron en una cubeta para espectrofotómetro de 5 mL y se leyeron a 750 nm en el espectrofotómetro (UNICO modelo 1200, EUA), usando como blanco la solución que contenía solamente 1 mL de NaOH 0.1N.

Para la determinación cuantitativa de proteínas en un tubo se depositaron 470  $\mu\text{L}$  del extracto alcalino con las proteínas extraídos (considerando previamente que las muestras tienen alrededor de un 16% de proteínas). Se aforaron a 1 mL con 530  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1N. A cada tubo se le agregó 5 mL de **solución C** y se mezclaron en vortex. Se dejaron en reposo por 15 minutos. Pasado el reposo, a cada tubo se le agregó 500  $\mu\text{L}$  de **solución D** y se mezclaron con un vortex. Se dejaron en reposo por 40 minutos en oscuridad. Pasados los 40 minutos las muestras cambiaron a una coloración azul entre cerúleo, ultramarino e índigo según la concentración (Figura 14), en este punto para analizar la muestra se tomaron 4 mL del tubo, se depositaron en una cubeta y se leyeron a 750 nm en el espectrofotómetro, usando un blanco preparado de la misma manera, sustituyendo el extracto alcalino de la muestra, con 1 mL de NaOH.



**Figura 14.-** Soluciones de BSA teñidas con Folin-Ciocalteu concentrado según la técnica de Lowry *et al.* (1951)

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración (Figura 15).



**Figura 15.-** Curva estándar de calibración para a 750nm con los estándares de BSA.

Considerando los datos de peso de la muestra liofilizada (PS), el volumen total del extracto alcalino (Ve), el volumen de la alícuota calculada utilizado (Vm) para la cuantificación de proteínas, y el

valor de pendiente (m), se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de proteínas totales, usando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\left[ \frac{A_{750} \times V_e}{m} \right]}{\frac{V_m}{PS}} \times 100$$

Donde:

A750: Absorbancia a 750 nm.

m: Pendiente de la curva estándar.

Ve: Volumen del extracto alcalino (mL).

Vm: Volumen de la alícuota calculada (mL).

PS: Peso de la muestra liofilizada (mg).

#### 5.16. Determinación de Lípidos Totales

La determinación y extracción de lípidos totales se realizó mediante el uso de solventes orgánicos, polares y no polares.

La determinación de lípidos totales se obtuvo por gravimetría entre la diferencia del peso del tubo vacío y el peso del tubo con los lípidos totales secos.

Para la limpieza de material, todo el material se lavó con la solución limpiadora Micro 90 (modelo M-9050-12, EUA), el material se sonicó (Bransonic Ultrasonic Bath modelo 2800, EUA) con Micro 90 al 1% por 20 minutos, se lavó con agua hasta eliminar todo rastro de limpiador y se enjuagó una última vez con agua destilada. El material se dejó secar durante 24 horas. Pasadas las 24 horas de secado se realizó un lavado interno del material con metanol (CH<sub>3</sub>OH), en una campana de extracción (FORMALAB<sup>MR</sup>), para remover cualquier sobrante de agua. Se dejó secar por 15 minutos. Evaporado el metanol, se realizó otro lavado con Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), para remover cualquier contaminante o sobrante no polar (restos de lípidos externos). Se dejó secar por 15

minutos. Preparado el material para su uso en la extracción y determinación de lípidos totales, se pesaron 24 tubos sin tapa para registrar su peso vacío, previo al pesado, a cada uno de los tubos se le anotó un código de identificación por cada unidad experimental, se guardan los tubos para su posterior su uso.

Para la extracción de lípidos totales a cada unidad experimental, se le tomaron 10 mg de biomasa liofilizada y se depositaron en un tubo. A cada tubo con biomasa se le agregaron 3 mL de la mezcla  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  en proporción 1:2:0.6. y. 5  $\mu\text{L}$  de Butilhidroxitolueno (BHT) a una concentración de 1 mg/mL para proteger los ácidos grasos de la oxidación (Carreón-Palau *et al* 2017). Se llevaron a sonicación para facilitar la lisis de las células 2 veces, cada vez por 20 minutos en agua fría (refrigerada con geles congelados). Las muestras se dejaron extrayendo en reposo a 4 °C por 24 h. Cumplidas las 24 h, se añadió a cada tubo 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  y 1.2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se mezclaron con un vortex y se centrifugaron a 1500 rpm con 5°C, por 20 minutos en una centrifuga (BECKMAN COULTER modelo ALLEGRA X-15R, EUA). Como resultado de la centrifugación, las muestras en los tubos se separan en 3 fases: la fase del fondo contiene el cloroformo con los lípidos: la fase intermedia contiene los residuos de las células (proteínas y carbohidratos) y la fase superior que contiene agua y metanol, la cual puede contener compuestos hidrofílicos como los carbohidratos. Se recuperó la fase del cloroformo con los lípidos totales atravesando las primeras dos fases con una pipeta Pasteur mediante burbujeo, con cuidado de no tomar muestras de las otras fases. Se depositó el cloroformo recuperado en los tubos pesados con antelación para la determinación de los lípidos totales. Se llevaron los tubos con cloroformo a secado en una plancha de secado (STANDARD HEATBLOCK VWR Scientific Products Cat. No. #13259-032, EUA) a 30 °C con un multi-evaporador. En la plancha de secado, a cada tubo de manera individual se le inyectó nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) para acelerar el proceso de evaporación. Una vez secados los tubos, se pesaron sin tapa para registrar su peso con los lípidos totales. Los lípidos totales se determinaron por gravimetría, considerando la diferencia entre el peso de los tubos vacíos y el peso de los tubos con lípido. La diferencia entre estos pesos se consideraron los lípidos totales.

Para determinar el peso de los lípidos totales se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{Lípidos Totales (mg)} = \text{Peso del tubo vacío (mg)} - \text{Peso del tubo seco con los lípidos (mg)} \quad (8)$$

Para determinar el porcentaje de los lípidos totales se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de Lípidos Totales (\%)} = \frac{\text{Lípidos totales (mg)} * 100}{\text{Biomasa seca utilizada (mg)}}$$

### 5.17. Determinación de Ácidos Grasos

Con los lípidos totales extraídos y pesados, a cada tubo con muestra se le agregaron 700  $\mu\text{L}$  Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), de los cuales 200  $\mu\text{L}$  se destinaron para la determinación de ácidos grasos totales (TFA) y el sobrante se destinó para la separación de los ácidos grasos por clases lipídicas (lípidos neutros (Neutral lipids, NL); lípidos polares; glucolípidos (glycolipids, GL) y fosfolípidos (Phospholipids, PL) mediante el uso de columnas de gel de sílica y solventes afines a la clase a separar (Hooper y Parrish (2009) modificado por Rojas *et al.* 2019).

Para la separación, transesterificación y determinación del perfil de ácidos grasos por clase lipídica, se prepararon las mezclas de solventes para la separación de clases en una campana de extracción FORMALAB.

- NL.- Cloroformo:Metanol:Ácido Fórmico ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$ ) en proporciones 98:1:0.05.
- Segunda solución para extraer los GL.- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ).
- Tercera solución para extraer los PL.- Cloroformo:Metanol ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ ) en proporciones 5:4.

Con las soluciones preparadas se montó un sistema de soporte donde se pudiera colocar en posición vertical, una columna de separación con gel de sílica Strata SI-1 Silica (55  $\mu\text{m}$ , 70 A) 1 g/12 mL, marca Phenomenex Part No. 8B-S012- JDG, USA), encima de una gradilla donde se pudieran colocar tubos de 15 mL para la recolección de la muestra, el soporte debía tener la versatilidad de poder subir o bajar la columna para retirar y remplazar el tubo cada que existía un cambio de solvente en la columna. Montado el soporte con una columna, se preparan 4 tubos de 15 mL para recolectar muestras de la columna:

- El primer tubo recolectó el solvente inicial  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05) con el que se hidrata la columna Strata SI-1 Silica, no contiene ninguna muestra de lípidos.
- El segundo tubo recolectó el solvente  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05) con los lípidos neutros (LN) de la muestra.
- El tercer tubo recolectó el solvente  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$  con los glucolípidos de la muestra (GL).
- El cuarto tubo recolectó el solvente  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (5:4) con los fosfolípidos de la muestra (PL).

Con la columna y 4 tubos preparados se colocaron los solventes, la muestra y los tubos en la columna Strata SI-1 Silica en el siguiente orden. Todo el proceso se realizó en una campana de extracción de aire (FORMALAB SA de CV, Monterrey, NL, México).

- **Nota:** En todo el proceso se evitó que se secase la columna de gel de sílica Strata SI-1 Silica, por lo tanto, antes de terminarse un solvente se le agregaba el siguiente solvente.

Se agregaron lentamente 3 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05). Se colocó el primer tubo para recolectar el solvente. Se agregaron los 500  $\mu\text{L}$  de lípidos totales para la separación de la muestra por clases lipídicas. Se retiró el primer tubo una vez se filtraron los 3 mL de la solución  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05) y se sustituyó por el segundo tubo. Se agregaron lentamente 6 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05). Se retiró el segundo tubo una vez filtrado los 6 mL de la solución  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$  (98:1:0.05) y se sustituyó por el tercer tubo. El segundo tubo se etiquetó con el código “NLX” donde X corresponde al código de identificación de la unidad experimental (por ejemplo, el tratamiento OACF1 se etiquetó como LNOACF1). Se agregaron lentamente 6 mL de  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ . Se retiró el tercer tubo filtrados los 6 mL de la solución  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$  y se sustituyó por el cuarto tubo. El tercer tubo se etiquetó con el código “GLX” donde X corresponde al código de identificación de la unidad experimental (por ejemplo, el tratamiento OACF1 se etiquetó como GLOACF1). Se agregaron lentamente 9 mL de la solución  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (5:4). Se retiró el cuarto tubo una vez se filtrados los 9 mL de la  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (5:4). El cuarto tubo se etiquetó con el código “PLX” donde X corresponde al código de identificación de la unidad experimental (por ejemplo, el tratamiento OACF1 se etiquetó como PLOACF1). Al finalizar, se retiraron las columnas del soporte y se dejaron dentro de la campana de extracción durante 30 minutos para eliminar los solventes restantes. Una vez separados los 500  $\mu\text{L}$  de lípidos totales de cada unidad experimental, quedaron en total 72 muestras de las cuales 24 fueron la extracción de los NL, 24 fueron la extracción de los GL y 24 corresponden a la extracción de los PL.

Las 72 muestras de la separación por clases lipídicas y las 24 muestras de 200  $\mu\text{L}$  de lípidos totales (TFA) se llevaron a secado total en una plancha de secado (STANDARD HEATBLOCK, marca VWR Scientific Products Cat. No. #13259-032, EUA) a 30 °C con multi-evaporador. En la plancha, a cada tubo se le inyectó nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) para acelerar el proceso.

Con las 96 muestras secadas (24 de TFA, 24 de NL, 24 de GL y 24 de GL), a cada una se le realizó una transesterificación para separar los ácidos grasos del resto de lípidos mediante la sustitución de un metilo en el corte del enlace éster que une al ácido graso con el glicerol, obteniendo así los ácidos grasos metil esterificados (Fatty acids methyl ester: FAME). Esta ruptura de enlace se realiza mediante el intercambio del grupo hidroxilo (OH) de un éster por el metilo de un alcohol (metanol) con el uso de un catalizador ácido a altas temperaturas.

Para la transesterificación, a cada muestra seca de TFA/NL/GL/PL se le agregaron 2.5 mL de Ácido Clorhídrico:Metanol (HCl:CH<sub>3</sub>OH) en una proporción de 5:95, se sellaron las tapas con teflón y se llevaron a termo baño a 85 °C durante 150 minutos.

- Nota: Durante la transesterificación, se debe estar revisando cada 20 minutos que los tubos permanezcan sellados con tapas apretadas, las cuales se pueden aflojar por la acumulación de gases.

Pasadas las 2.5 horas, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente. Alcanzada la temperatura ambiente, a cada muestra transesterificada, se le agregó 1.5 mL de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) para recuperar únicamente los ácidos grasos (FAME), se mezclaron con un vortex (Fisher Analog Vortex modelo 9454FIALUS, EUA) por 30 segundos. Se dejó reposar hasta observar una separación clara entre el hexano y el HCl:CH<sub>3</sub>OH. Se recuperó el hexano dejando una capa de 5 mm para evitar la contaminación con la fase inferior que contiene restos de metanol y ácido clorhídrico además de agua producto de la reacción. El hexano con los FAMEs se depositaron en otro tubo anotando el mismo código de identificación de la muestra. Se realizó una segunda recuperación de los FAME que pudieran quedar en el HCl:CH<sub>3</sub>OH, se agregó de nuevo 1.5 mL de hexano, se mezcló con un vortex por 30 segundos y se dejó reposar hasta observa la separación para volver a recuperar el hexano en el mismo tubo de recuperación. Al tubo de separación de hexano con FAMEs se le agregó aproximadamente 10 mg de sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para eliminar residuos de H<sub>2</sub>O. Las 96 muestras con 3 mL de hexano con FAMEs se llevaron a evaporación a la termo-placa a 30 °C con la inyección individual de nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ).

Secadas las muestras con FAMEs, se resuspendieron en un volumen calculado de hexano según

fuera la clase de ácidos grasos que contuviera:

- FAMEs con TFA , se disolvieron en 1 ml de hexano.
- FAMEs con NLFA , se disolvieron en 1 ml de hexano.
- FAMEs con GLFA , se disolvieron en 1 ml de hexano
- FAMEs con PLFA , se disolvieron en 0.5 ml de hexano

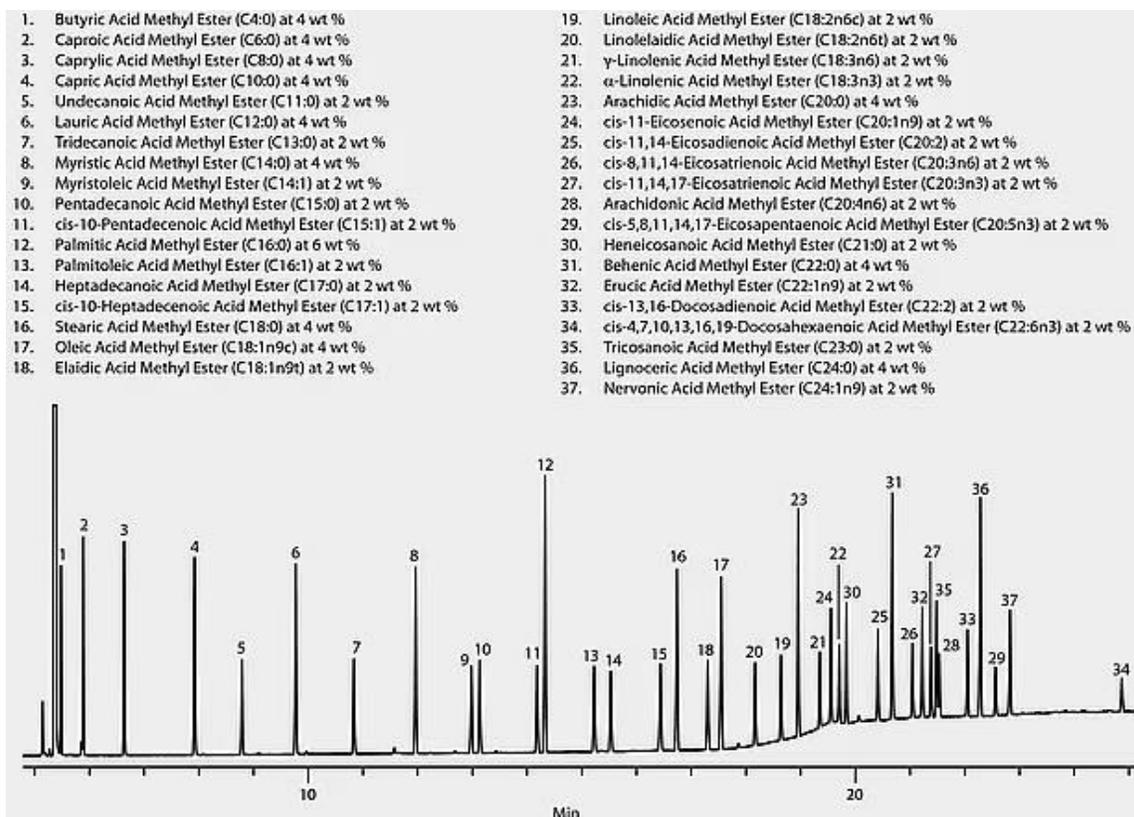
Cada muestra disuelta en hexano se depositó en un vial ámbar de 2 mL para inyectar en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama GC-FID (Agilent 7820A, EUA) con una columna capilar (J&W DB 23 122-2332, 250 °C, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm), el gas portador fue helio, los cromatogramas resultantes se procesaron mediante el uso del software OpenLab de Agilent Technologies (Versión A.01.03, EUA).

- Nota: Hasta el momento de la publicación de la tesis, solo se pudieron analizar las muestras de TFA, por lo tanto, solo se abarcó los datos obtenidos de los TFA.

El método cromatográfico (DB23FAME2) se desglosa a continuación:

- Temperatura inicial: 50 °C durante un minuto.
- Primer gradiente: 25 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 175 °C.
- Segundo gradiente: 4 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 230 °C.
- Postcorrida a 230 °C durante 10 min

Los ácidos grasos se identificaron por sus tiempos de retención en comparación con una mezcla de estándares Supelco 37-Component FAME Mix (Figura 16). La cuantificación se realizó mediante la integración del área bajo el pico de las muestras y su interpolación con una curva de calibración entre las áreas de los estándares y cinco concentraciones conocidas (5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL) de cada ácido graso presente en la mezcla de estándares. El factor de corrección (FC) se refiere a la pendiente de la curva de calibración de cada ácido graso en el rango lineal. El porcentaje de cada ácido graso se calcula con respecto a la suma de las concentraciones que es el 100%.



**Figura 16.-** Listado de FAMES en el perfil de ácidos grasos de la mezcla estándar Supelco 37-Component FAME Mix inyectada en una columna SP-2560, 100 m x 0.25 mm I.D., 0.20 μm. Se inyectó 1 μL del estándar a 250 °C, con las temperaturas de horno de 140 °C (5 min), 8 °C/min to 180 °C, 4 °C/min to 210 °C, 20 °C/min to 250 °C (7 min). Se utilizó hidrogeno como gas de arrastre (40cm/seg) y se detectaron los picos con un detector FID. Imagen recuperada de (GC Analysis Of A 37-Component FAME Mix On SPTM-2560, s. f.)

Para determinar la concentración de cada ácido graso se utilizó la fórmula:

$$\text{Concentración AG} = \frac{\frac{\text{Área}}{FC} * \text{Vol. Hexano} * \text{Vol. Muestra total}}{\text{Vol. alícuota} / \text{Peso seco}}$$

Donde:

Concentración AG: Concentración de ácido graso a determinar (mg/g).

Área: El área del pico en el cromatograma (mA/s).

FC: Factor de corrección es la pendiente de la curva de cada ácido graso ( $\text{mA s}^{-1} / \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Vol. Hexano: Concentración de muestra en hexano inyectada a la muestra (mL) - para TFA [1 mL/2]; para NLFA/GLFA [1 mL/1]; para PLFA [0.5 mL/1].

Vol. Muestra total: Volumen al que se diluyó la muestra de lípidos totales ( $\mu\text{L}$ ) - [700 $\mu\text{L}$ ]

Vol. Muestra alícuota: Volumen de la muestra separada ( $\mu\text{L}$ ) – para TFA [200  $\mu\text{L}$ ]; para NLFA/GLFA/PLFA [500  $\mu\text{L}$ ].

Peso seco: Cantidad de muestra utilizada para la extracción (mg) – [10 mg].

Para determinar el porcentaje de cada ácido graso se utilizó la fórmula:

$$\text{Porcentaje de AG} = \frac{\text{Concentración de AG} * 100}{\text{Total de concentración de AG}}$$

Donde:

Porcentaje de AG: Porcentaje del ácido graso con respecto al total de ácidos grasos (%).

Concentración de AG: Concentración del ácido graso (mg/g).

Total de concentración de AG: La sumatoria de todos los ácidos grasos presentes en la muestra (mg/g)

#### 5.18. Concentración, Porcentaje, Rendimiento y Producción de DHA

A partir de los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento, determinación del volumen celular, determinación del peso seco y la determinación de ácidos grasos; se determinó la concentración, el porcentaje en células, el porcentaje en el perfil de ácidos grasos, el rendimiento y la productividad de DHA por tratamiento. A continuación, se desglosan las fórmulas implementadas para obtener cada valor:

### 5.18.1. Concentración de DHA

$$\text{Concentración DHA} = \frac{\frac{\text{Área RT 14.7}}{\text{FC 22:6 n3}} * \text{Vol. Hexano} * \text{Vol. Muestra total}}{\frac{\text{Vol. alícuota}}{\text{Peso seco}}}$$

Donde:

Concentración DHA: Concentración de DHA por gramo de Peso Seco (mg/g).

Área del pico en el tiempo de retención 14.7 minutos: El área del pico con tiempo de retención 14.7 – [12.386].

FC 22:6 n3: Factor de corrección del DHA determinado a partir de los estándares.

Vol. Hexano: Concentración de la muestra en hexano inyectada a la muestra (mL) - [0.5].

Vol. Muestra total: Volumen al que se diluyó la muestra de lípidos totales (µL) - [700 µL]

Vol. alícuota: Volumen de la muestra separada (µL) – [200 µL].

Peso seco: Cantidad de muestra para la extracción (mg) – [10 mg].

### 5.18.2. Porcentaje de DHA en el Perfil de Ácidos Grasos

$$\text{Porcentaje de DHA} = \frac{\text{Concentración de DHA} * 100}{\text{Total de concentración de AG}}$$

Donde:

Porcentaje de DHA: Porcentaje de DHA con respecto al perfil de ácidos grasos (%).

Concentración de DHA: Concentración de DHA por gramo de Peso Seco (mg/g).

Total de concentración de AG: La sumatoria de todos los ácidos grasos presentes en la muestra (mg/g).

### 5.18.3. Peso de Cada Célula

$$\text{Peso de cada célula} = \frac{\text{Rendimiento Peso Seco}}{\text{Densidad celular}}$$

Donde:

Peso de cada célula: El peso seco aproximado de cada célula en el cultivo (mg).

Rendimiento Peso Seco: La cantidad de peso seco producidos por mililitro de medio de cultivo (mg/mL).

Densidad celular: La cantidad de células que hubo por mililitro (células/mL).

### 5.18.4. DHA por Célula

$$\text{DHA por célula} = \text{Peso de cada célula} * \text{Concentración DHA} * 0.001$$

Donde:

DHA por célula: La cantidad de DHA que hay por célula (mg).

Peso de cada célula: El peso seco aproximado de cada célula en el cultivo (mg).

Concentración de DHA: La concentración de DHA que hay por miligramo de peso seco ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

### 5.18.5. Porcentaje de DHA por Célula

$$\text{Porcentaje de DHA por célula} = \frac{\text{DHA por célula} * 100}{\text{Peso de cada célula}}$$

Donde:

Porcentaje de DHA por célula (%).

DHA por célula: La cantidad de DHA por célula (mg).

Peso de cada célula: El peso seco aproximado de cada célula (mg).

#### 5.18.6. Rendimiento de DHA

$$\text{Rendimiento de DHA} = \text{Rendimiento Peso Seco} * \text{Concentración DHA}$$

Donde:

Rendimiento de DHA: La cantidad de DHA producidos por litro de medio de cultivo (mg/L).

Rendimiento Peso Seco: La cantidad de peso seco producidos por litro de medio de cultivo (g/L).

Concentración de DHA: La concentración de DHA que hay por gramo de peso seco (mg/g).

#### 5.18.7. Producción de DHA

$$\text{Producción de DHA} = \frac{\text{Rendimiento Peso Seco} * \text{Concentración DHA}}{\left(\frac{\text{Hora de recolección}}{24}\right)}$$

Donde:

Producción de DHA: La cantidad de DHA producidos por litro de medio de cultivo por día (mg/L/día).

Rendimiento Peso Seco: La cantidad de biomasa en peso seco producidos por litro de medio de cultivo (g/L).

Concentración de DHA: La concentración de DHA que hay por gramo de peso seco (mg/g).

Hora de recolección: El tiempo que duró el cultivo, desde su siembra hasta su cosecha (h).

## 5.19. Pruebas Estadísticas

A cada variable de respuesta se le realizó un estadístico que se ajuste a los supuestos de una distribución normal de los residuales, todos los estadísticos se realizaron considerando un nivel de significancia de 0.05. A continuación, se especifica el estadístico utilizado para cada variable de respuesta:

La densidad celular (células/mL), el rendimiento del peso húmedo (mg/mL), el rendimiento del peso seco (mg/mL), el porcentaje de carbohidratos totales (%) y el porcentaje de proteínas (%), se analizaron con un ANOVA de dos vías, considerando los factores temperatura y fotoperiodo.

La tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ), debido a que es una pendiente, se analizó con la prueba estadística ANCOVA de dos vías, considerando los factores temperatura y fotoperiodo.

El porcentaje de lípidos totales (%), la concentración de DHA (mg/g), el porcentaje de DHA por célula (%), el rendimiento de DHA (mg/L), la productividad de DHA (mg/L/día) y el porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales (%) se analizaron con una ANOVA de dos vías para diseños desbalanceados, considerando los factores temperatura y fotoperiodo. Se realizó el ajuste del diseño desbalanceado debido a la pérdida de los resultados de la unidad experimental "OBSF2".

El volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ ) se analizó con un ANOVA de tres vías (nivel de confianza del 95%), considerando los factores temperatura, fotoperiodo y tiempo. Se tomó en cuenta las medidas repetidas debido a que los niveles del factor tiempo se presenta en dos momentos distintos (120 y 136 horas) dentro de las mismas unidades experimentales.

En las respuestas donde se encontraron diferencias significativas se realizaron análisis *post-hoc* con la prueba TUKEY LSD, para identificar los tratamientos que resultaron con efectos significativos.

Para disminuir el error experimental producido por el análisis de cada variable, en dos grupos separados, se realizaron análisis estadísticos Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). Uno analizó el efecto y la interacción de los factores temperatura y fotoperiodo sobre la productividad de DHA, utilizando los resultados de concentración de DHA (mg/g), rendimiento de DHA (mg/L) y el porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales (%). En otro PERMANOVA se analizó el efecto y la interacción de los factores temperatura y fotoperiodo sobre la composición bioquímica, utilizando los resultados porcentaje de carbohidratos totales (%),

porcentaje de lípidos totales (%) y el porcentaje de proteínas (%) como variables de respuesta.

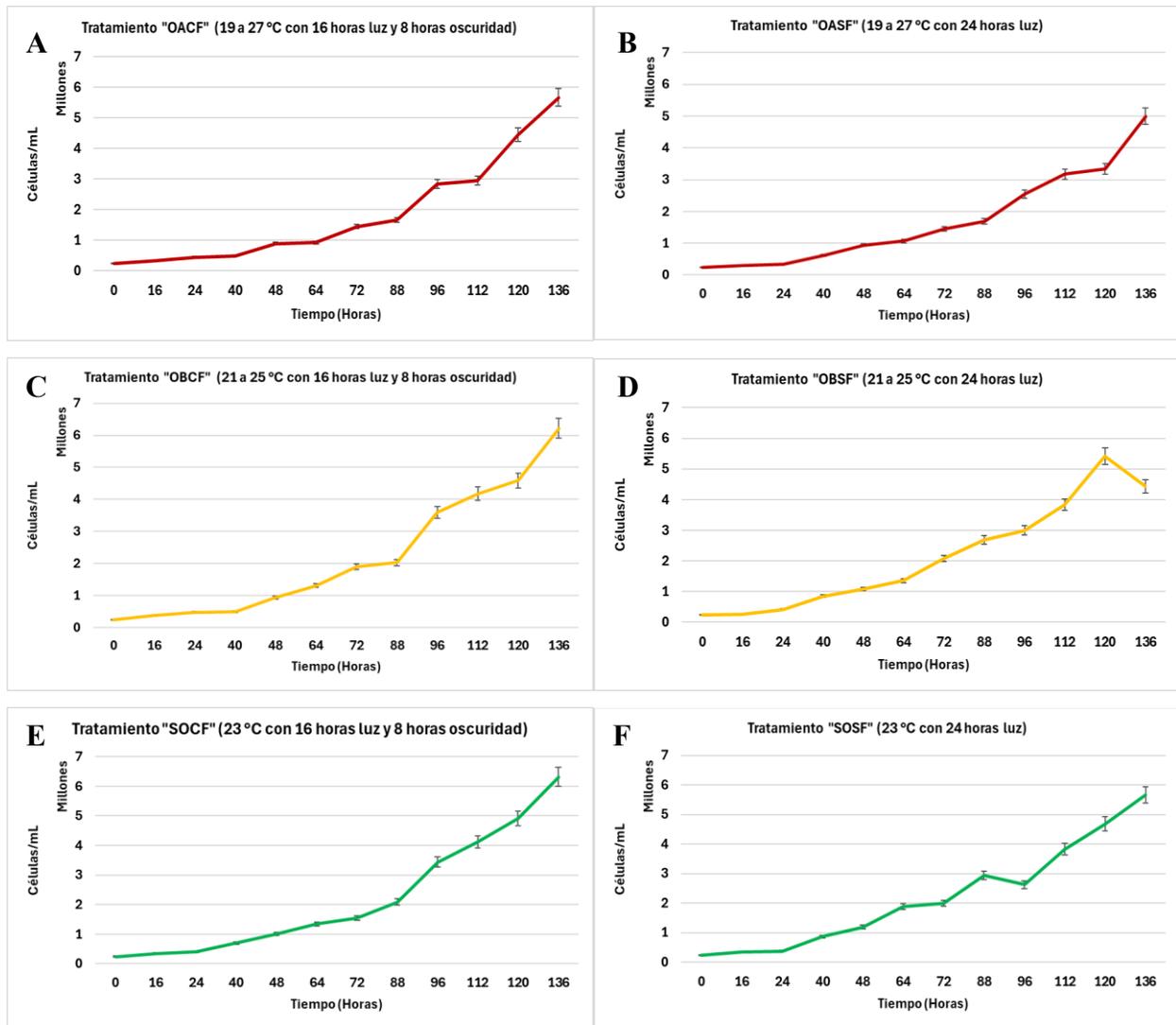
Los análisis de varianza (ANOVA de dos vías, ANCOVA de dos vías, ANOVA de 3 vías y PERMANOVAS) se realizaron en R V4.0.0 implementado en RStudio Desktop (versión: 2023.09.0+463).

Para determinar la influencia de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta, se realizó una regresión múltiple no lineal con ajuste al modelo de superficie de respuesta, cuya ecuación es:  $Y = a + bx_1 + cx_1^2 + dx_2 + ex_2^2 + fx_1x_2$ , donde  $Y$  es la respuesta de interés;  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  y  $e$  son los coeficientes estimados por la regresión;  $x_1$  y  $x_2$  son los factores de interés (temperatura y fotoperiodo). Para corroborar el efecto de cada uno de los factores, se realizó una prueba  $t$  (diagrama de paretos) entre los tratamientos por separado y en combinación, con una significancia de  $P < 0.05$  (Bradley, 2007); estos fueron realizados en el programa STATISTICS 7 (StatSoft, Inc., 2004).

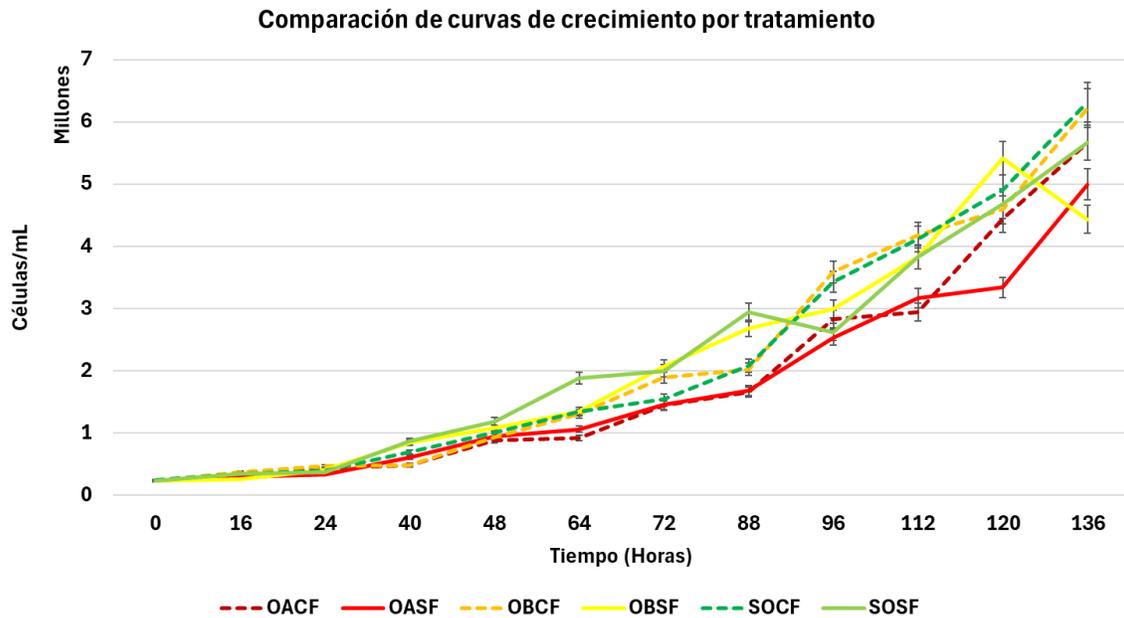
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Cinética de Crecimiento

Las curvas de crecimiento (Figura 17) indican que los tratamientos tuvieron una fase adaptativa de 24 horas para los tratamientos SOCF, SOSF, OBSF y OASF. Por otro lado, los tratamientos con OBCF y OACF indicaron una fase adaptativa más larga de 40 horas. La fase exponencial de la mayoría de los cultivos se observa de las 40 a las 136 horas. Únicamente el tratamiento OBSF presentó una fase exponencial de las 40 a las 120 horas. En ninguno de los tratamientos se observó un crecimiento exponencial continuo. Solamente en el tratamiento OACF se observó un crecimiento asociado a la fase cálida de 27 °C en 8 horas de oscuridad desde las 40 hasta las 112 horas; pasadas las 112 horas el crecimiento del cultivo no se detuvo. El tratamiento OBSF fue el único que presentó una fase de muerte pasadas las 120 horas.

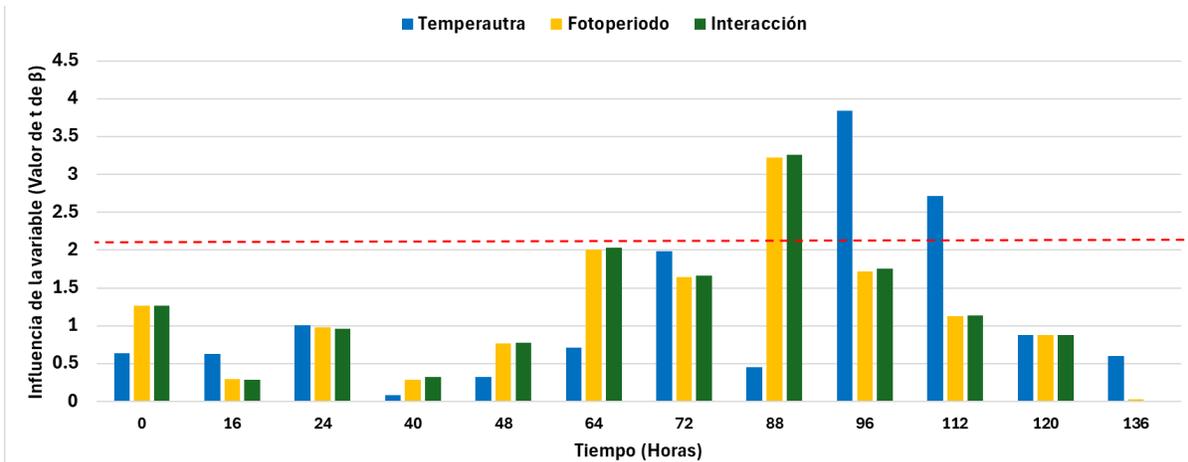


**Figura 17.-** Curvas de crecimiento por tratamiento desde la siembra (0 h) hasta la cosecha (136 horas). Los tratamientos a la izquierda (A, C, E) estuvieron bajo fotoperiodo (CF) de 16 h luz con 8 h oscuridad. Los tratamientos a la derecha (B, D, F) estuvieron bajo iluminación continua (SF). Los tratamientos en rojo estuvieron bajo temperatura oscilatoria de 19 a 27 °C (OA). Los tratamientos en amarillo estuvieron bajo temperatura oscilatoria de 21 a 25 °C (OB). Los tratamientos en verde estuvieron a 23°C en todo momento (SO).



**Figura 18.-** Curvas de crecimiento de los tratamientos. Líneas rojas tratamientos con oscilación de 19 a 27 °C; líneas amarillas tratamientos con oscilación de 21 a 25 °C; líneas verdes tratamientos a 23 °C contante. Líneas planas los tratamientos SF = Iluminación continua; líneas con guiones tratamientos CF = Fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

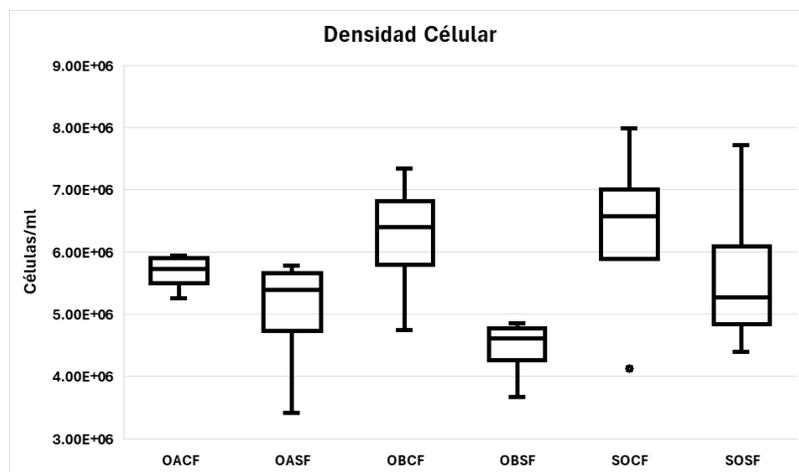
Al comparar las curvas (Figura 18) se observó que los tratamientos con mayor densidad celular a las 136 horas fue el SOCF, seguido de OBCF. Los tratamientos con menores densidades celulares alcanzadas fueron los tratamientos OASF y el tratamiento OBSF. Sin embargo, hay que considerar que el tratamiento OASF aún se encontraba en fase exponencial. Por su parte, el tratamiento OBSF había alcanzado una mayor densidad celular a las 120 horas en comparación a todos los cultivos. Los diagramas de Pareto de efectos estandarizados de la densidad celular por hora (Figura 19), nos indican que los factores solo tuvieron una influencia significativa desde las 88 hasta las 112 horas. El arreglo de la matriz de oscilaciones térmicas y el fotoperiodo permitió calcular los modelos de superficie de respuesta para cada tiempo y comparar los coeficientes (a-f), que representaron la importancia relativa de cada factor en la ecuación de regresión múltiple. La figura 19 muestra que, a las 88 horas, los factores fotoperiodo y la interacción (temperatura y fotoperiodo) tuvieron una influencia significativa ( $p < 0.05$ ) sobre la densidad celular, sin embargo, a partir de las 96 horas solo el factor temperatura tuvo influencia ( $p < 0.05$ ) sobre la densidad celular, influencia que mantuvo hasta las 112 horas. Pasadas las 112 horas los diagramas indican que los factores dejaron de tener un efecto significativo sobre el crecimiento celular



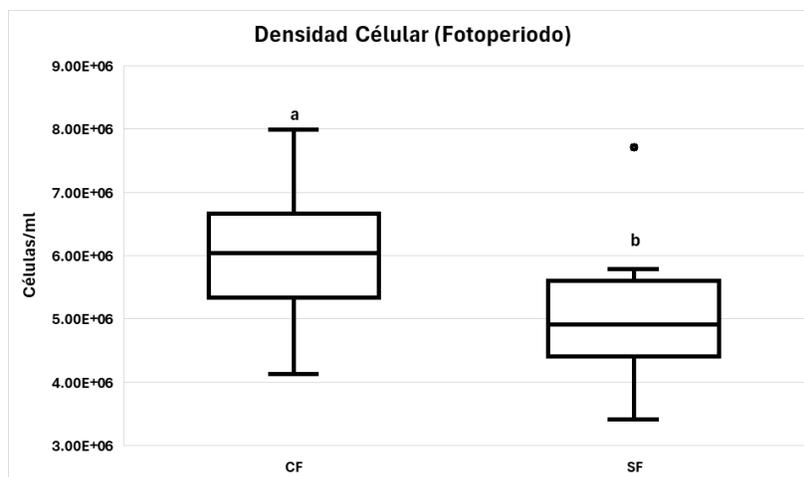
**Figura 19.-** Diagramas de Pareto del T-Valor para Coeficientes. DF= 18. Variable: Densidad Celular (dividido por hora). Parametrización con restricción SIGMA. La línea roja representa el límite del p-valor ( $p = 2.093024$ ).

## 6.2. Densidad Celular

La temperatura y la interacción de los factores no presentaron efectos significativos (temperatura  $p = 0.409$ ; interacción  $p = 0.519$ ) en la densidad celular a las 136 horas, tiempo de toma de muestra (Figura 20). Sin embargo, los tratamientos con 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) presentaron mayores densidades celulares que los tratamientos con iluminación continua (SF) (Figura 21), debido al fotoperiodo ( $p = 0.035$ ).



**Figura 20.-** Densidad celular registrada a las 136 h por cada tratamiento.



**Figura 21.-** Densidad celular registrada a las 136 h separado por fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) o iluminación continua (SF).

### 6.3. Volumen Celular

Se encontraron mayores volúmenes a las 120 horas que a las 136 horas ( $p = 9.53176e^{-07}$ ). Los mayores volúmenes celulares se encontraron en los tratamientos OASF y SOSF a las 120 h. Los menores volúmenes celulares se encontraron en los tratamientos SOSF y OACF a las 136 horas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Volúmenes celulares ( $\mu\text{m}^3$ ) (promedio  $\pm$  intervalo de confianza;  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 30$ ) de los tratamientos a las 120 y 136 horas. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos obtenidas en la prueba POST HOC Tukey LSD.

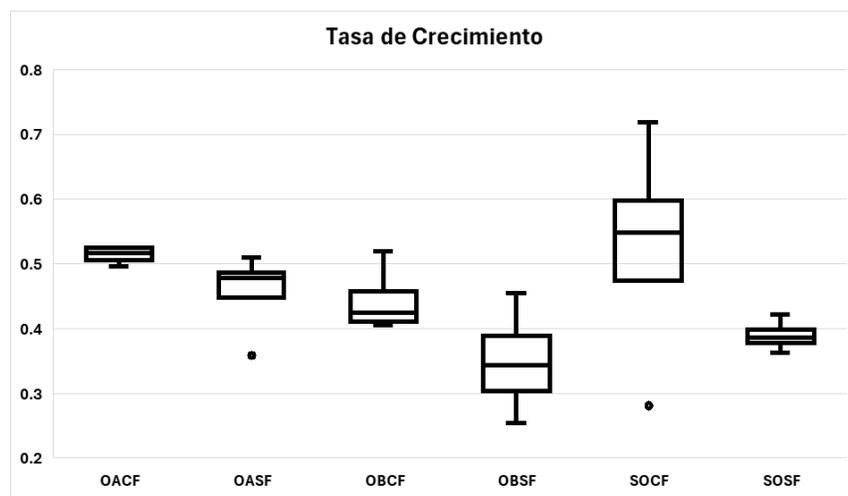
Hora de muestreo	OACF	OASF	OBCF	OBSF	SOCF	SOSF
<b>120 h</b>	68.67 $\pm$ 3.98 bcd	78.39 $\pm$ 4.35 a	65.95 $\pm$ 3.41 cd	70.41 $\pm$ 5.52 abc	68.25 $\pm$ 4.12 bcd	76.19 $\pm$ 4.66 ab
<b>136 h</b>	55.09 $\pm$ 2.86 e	56.25 $\pm$ 3.21 e	60.69 $\pm$ 3.30 de	62.29 $\pm$ 4.46 cde	62.27 $\pm$ 3.71 cde	55.62 $\pm$ 4.11 e

La temperatura y la interacción de los tres factores, el tiempo, la temperatura y el fotoperiodo, no tuvieron efecto significativo ( $p = 0.78$  y  $p = 0.131$ , respectivamente). El fotoperiodo tuvo un efecto significativo ( $p = 1.07e^{-2}$ ) en el volumen celular, donde, los tratamientos con iluminación continua

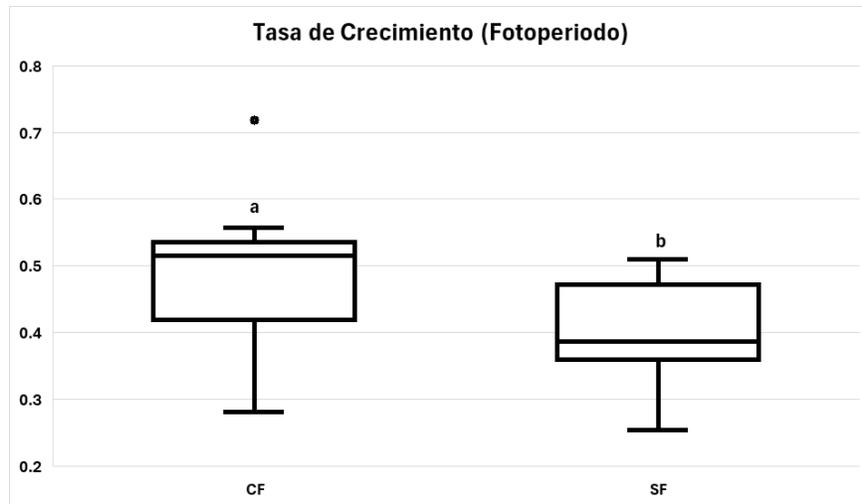
(SF) tuvieron volúmenes significativamente mayores ( $p = 2.73e^{-4}$ ) que los tratamientos con fotoperiodo (CF). Considerando su interacción con el tiempo, a las 120 horas los tratamientos OACF, OASF y SOSF obtuvieron mayores volúmenes de manera significativa ( $p = 6.14e^{-4}$ ) que a las 136 horas. Por su parte, la interacción de la temperatura con el tiempo tuvo un efecto significativo ( $p = 6.28e^{-4}$ ), los tratamientos OACF, OASF y SOSF tuvieron mayores volúmenes celulares a las 120 h (Tabla 1).

#### 6.4. Tasa de Crecimiento Poblacional

La temperatura y la interacción de los factores no presentaron efectos significativos (temperatura  $p = 0.156$ ; interacción  $p = 0.694$ ) en la tasa de crecimiento poblacional (Figura 22). Los tratamientos con 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) presentaron mayor tasa de crecimiento comparado a los de iluminación continua (SF) (Figura 23), debido al fotoperiodo ( $p = 0.017$ ).



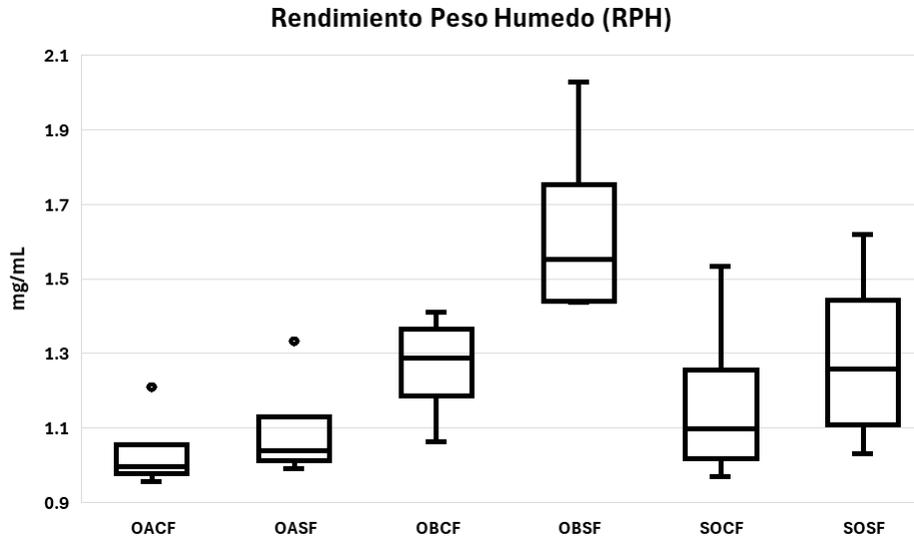
**Figura 22.-** Tasa de crecimiento poblacional ( $d^{-1}$ ) alcanzadas por cada tratamiento.



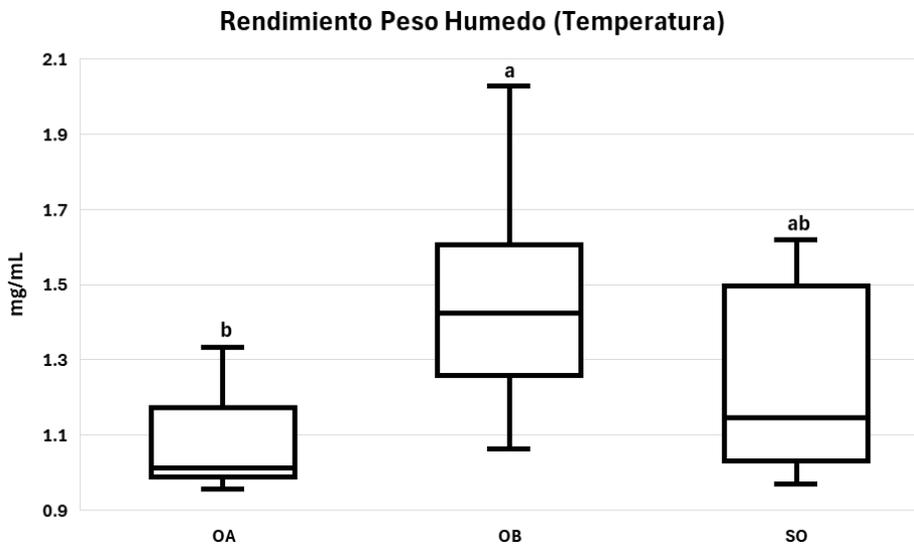
**Figura 23.-** Tasa de crecimiento poblacional ( $d^{-1}$ ) separado por fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) o iluminación continua (SF).

### 6.5. Rendimiento de Peso Húmedo

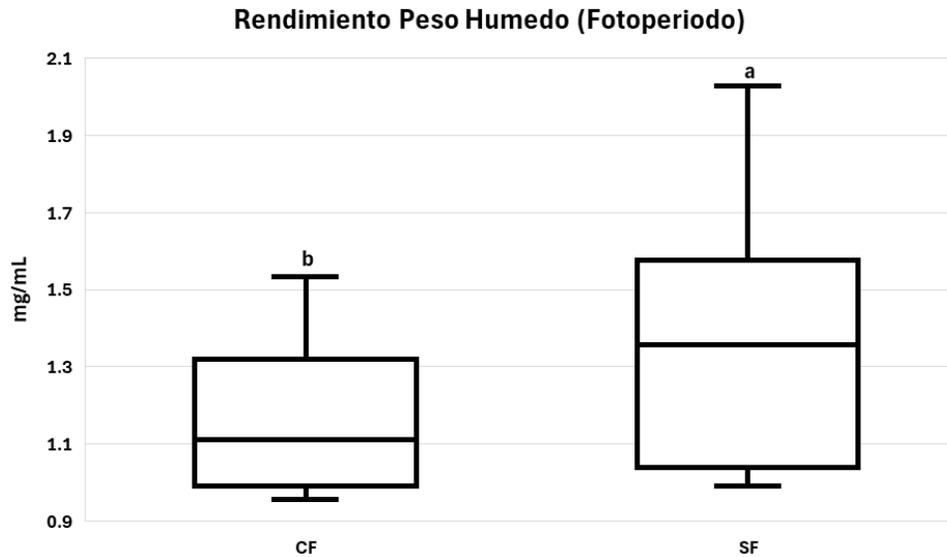
La interacción de los factores no presentó efecto significativo (interacción  $p = 0.30$ ) en el rendimiento de peso húmedo (Figura 24). Los tratamientos con oscilación 21 a 25 °C (OB) presentaron un mayor rendimiento de peso húmedo en comparación a los tratamientos con oscilación 19 a 27 °C (OA) (Figura 25), debido a la temperatura ( $p = 7.65e^{-3}$ ). Los tratamientos con iluminación continua (SF) presentaron un mayor rendimiento de peso húmedo a los tratamientos con 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) (Figura 26), debido al fotoperiodo ( $p = 0.046$ ).



**Figura 24.-** Rendimiento de peso húmedo alcanzadas por cada tratamiento.



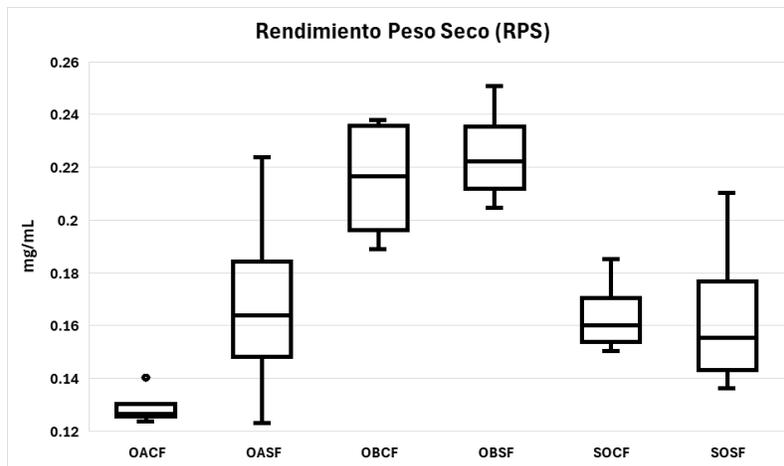
**Figura 25.-** Rendimiento de peso húmedo separado por temperatura: oscilación 19 a 27 °C (OA); oscilación 21 a 25 °C (OB); 23 °C contantes (SO).



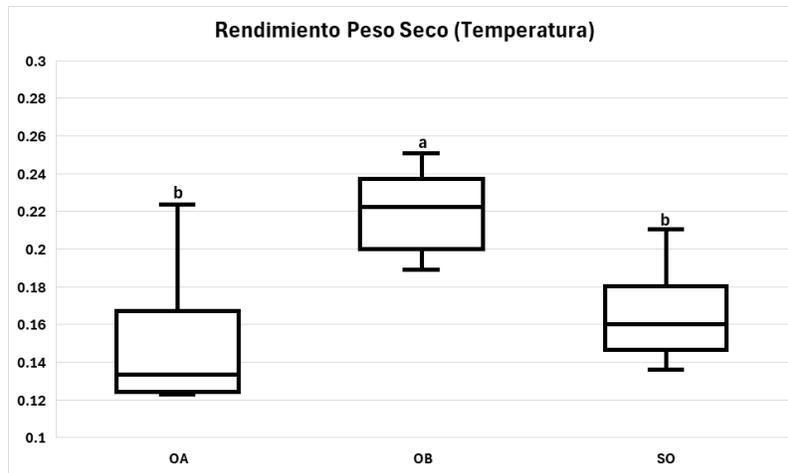
**Figura 26.-** Rendimiento de peso húmedo separado por fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) o iluminación continua (SF).

### 6.6. Rendimiento de Peso Seco

El fotoperiodo y la interacción de los factores no presentaron efectos (fotoperiodo  $p = 0.142$ ; interacción  $p = 0.303$ ) en el peso seco (Figura 27). Los tratamientos con oscilación 21 a 25 °C (OB) presentaron un mayor rendimiento de peso seco en comparación a los tratamientos con oscilación 19 a 27 °C (OA) y a 23 °C constantes (SO) (Figura 28), debido a la temperatura ( $p = 9.64e^{-5}$ )



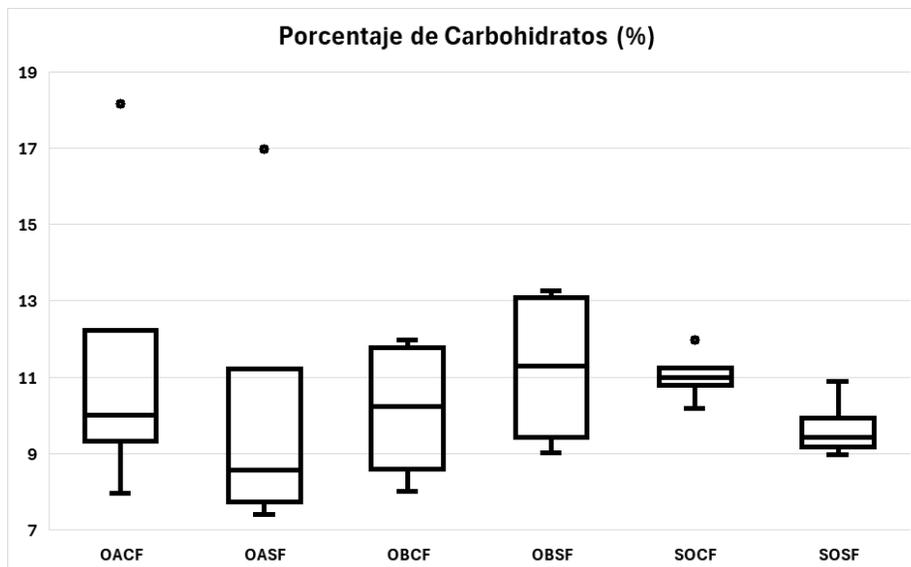
**Figura 27.-** Rendimiento del peso seco alcanzado por cada tratamiento.



**Figura 28.-** Rendimiento de peso seco separado por temperatura: oscilación 19 a 27 °C (OA); oscilación 21 a 25 °C (OB); 23 °C contantes (SO).

### 6.7. Porcentaje de Carbohidratos

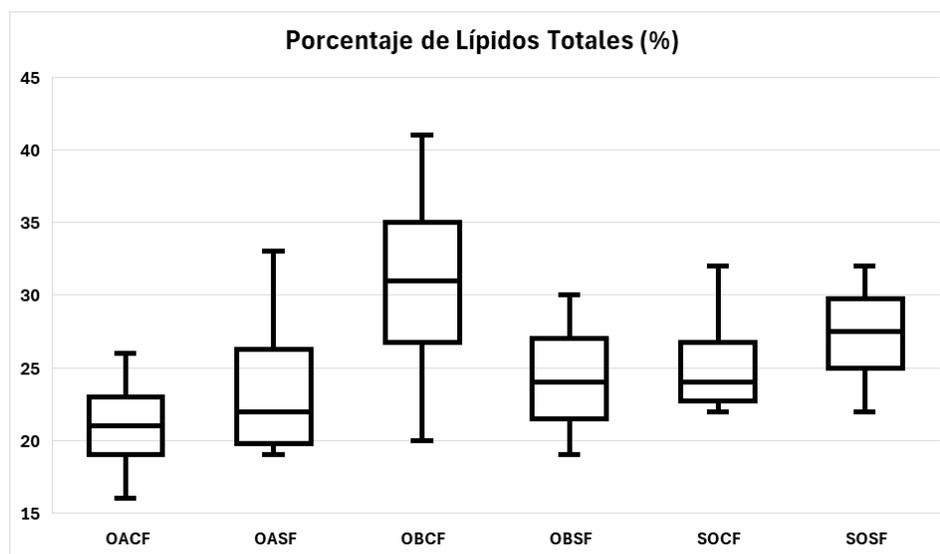
No se presentaron efectos significativos por el efecto de la temperatura ( $p = 0.92$ ); el fotoperiodo ( $p = 0.696$ ); ni la interacción de los factores ( $p = 0.652$ ), en el porcentaje de carbohidratos (Figura 29).



**Figura 29.-** Porcentaje de carbohidratos por cada tratamiento.

## 6.8. Porcentaje de Lípidos Totales

No se presentaron efectos significativos por efecto de la temperatura ( $p = 0.192$ ); el fotoperiodo ( $p = 0.916$ ); ni la interacción de los factores ( $p = 0.277$ ), en el porcentaje de lípidos totales (Figura 30).



**Figura 30.-** Porcentaje de lípidos totales por cada tratamiento. No se observa datos anómalos incluso con el cálculo del cuartil de mediana inclusiva.

## 6.9. Porcentaje de Proteínas

El fotoperiodo y la interacción de los factores no presentaron efectos significativos (fotoperiodo  $p = 0.906$ ; interacción  $p = 0.196$ ) para el porcentaje de proteínas (Figura 31). Los tratamientos con temperatura oscilatoria entre los 21 a 25 °C (OB) obtuvieron un mayor porcentaje de proteínas con respecto a los tratamientos a 23 °C (SO) (Figura 32), debido a la temperatura ( $p = 2.63e^{-3}$ ).

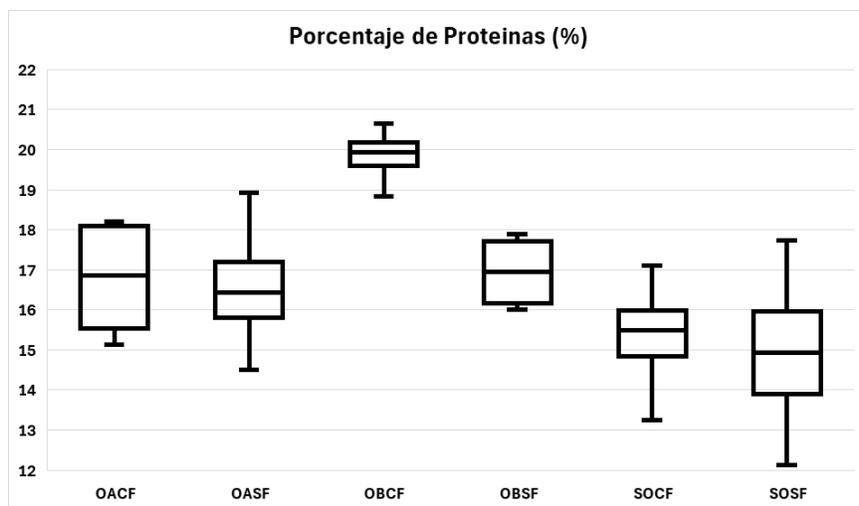


Figura 31.- Porcentaje de proteínas alcanzado por cada tratamiento.

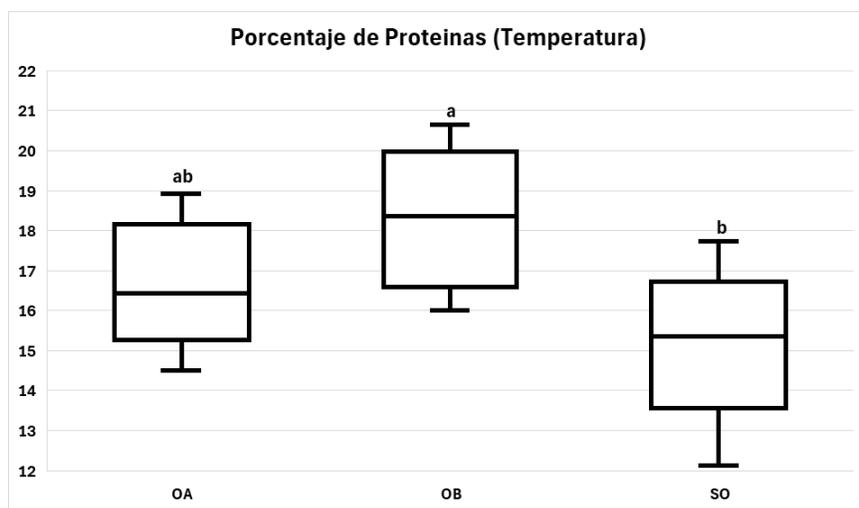


Figura 32.- Porcentaje de proteínas separado por temperatura: oscilación 19 a 27 °C (OA); oscilación 21 a 25 °C (OB); 23 °C constantes (SO).

### 6.10. Concentración DHA

No se presentaron efectos significativos por el efecto de la temperatura ( $p = 0.993$ ); el fotoperiodo ( $p = 0.3187$ ), ni la interacción de los factores ( $p = 0.081$ ), en la variable concentración de DHA (Figura 33).

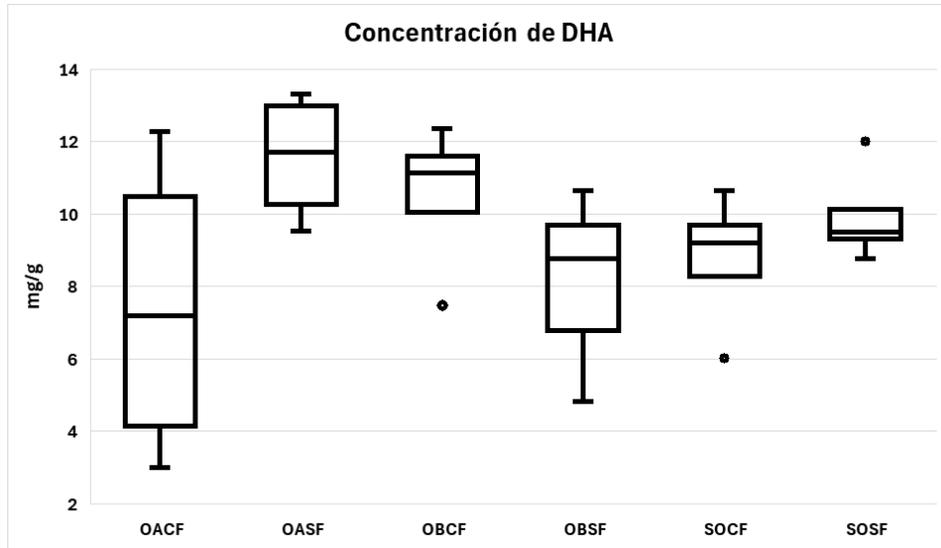


Figura 33.- Concentración de DHA obtenida por cada tratamiento.

### 6.11. Porcentaje de DHA por Célula

La temperatura y la interacción de los factores no presentaron efectos significativos (temperatura  $p = 0.604$ ; interacción  $p = 0.734$ ) para el porcentaje de DHA por célula (Figura 34). Los tratamientos con una iluminación continua (SF) presentaron un mayor porcentaje de DHA por célula con respecto a los tratamientos con 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) (Figura 35), debido al fotoperiodo ( $p = 0.024$ ).

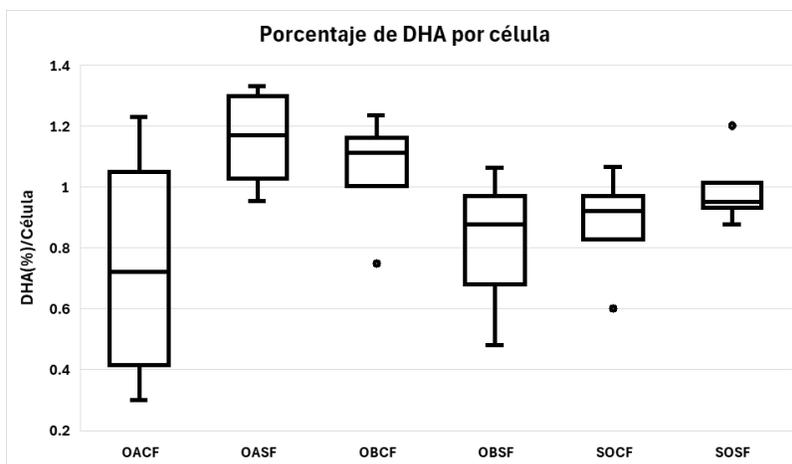
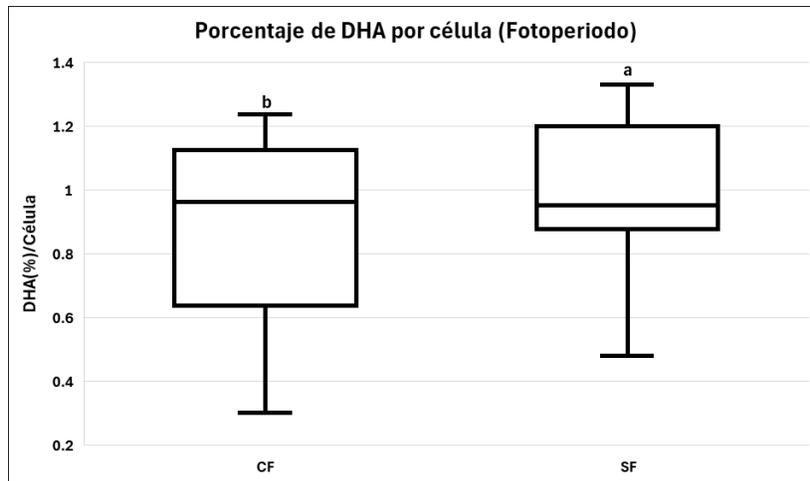


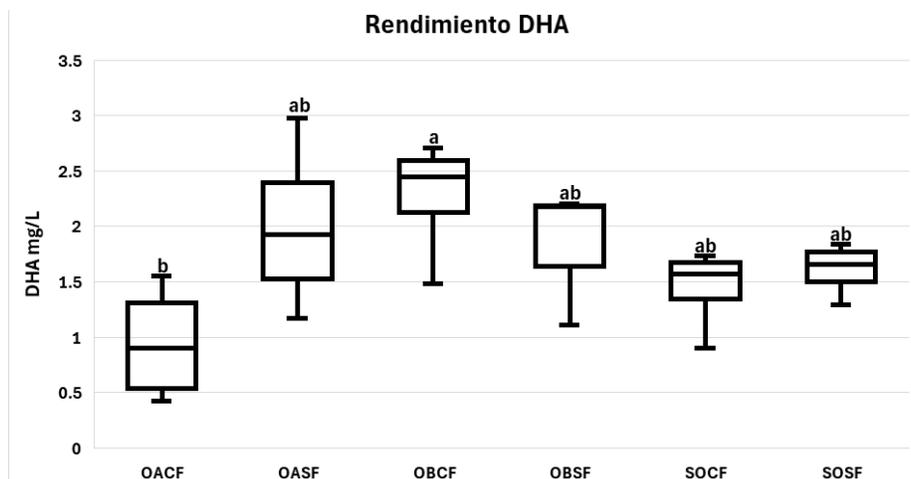
Figura 34.- Porcentaje de DHA por célula en cada tratamiento.



**Figura 35.-** Porcentaje de DHA por célula por fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) o iluminación continua (SF).

### 6.12. Rendimiento del DHA

La temperatura y el fotoperiodo no presentaron efectos significativos (temperatura  $p = 0.085$ ; fotoperiodo  $p = 0.205$ ) para el rendimiento de DHA (figura 36). El tratamiento con oscilación de 21 a 25 °C y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OBCF) obtuvo un mayor rendimiento significativo de DHA en comparación al tratamiento con oscilación de 19 a 27 °C y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OACF) (Figura 36), debido a la interacción de los factores ( $p = 0.047$ ).



**Figura 36.-** Rendimiento de DHA alcanzado por cada tratamiento.

### 6.13. Producción de DHA

La temperatura y fotoperiodo no presentaron efectos significativos (temperatura  $p = 0.085$ ; fotoperiodo  $p = 0.205$ ) para la producción de DHA (Figura 37). El tratamiento con oscilación de 21 a 25 °C y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OBCF) obtuvo una mayor producción significativa de DHA en comparación al tratamiento con oscilación de 19 a 27 °C y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OACF) (Figura 37), debido a la interacción de los factores ( $p = 0.047$ ).

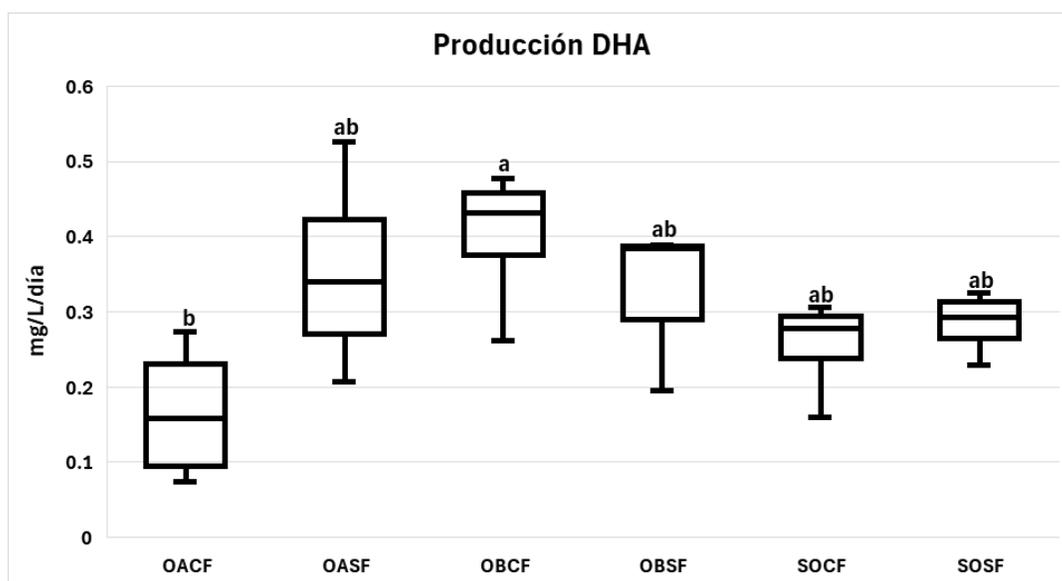


Figura 37.- Producción de DHA alcanzado por cada tratamiento.

### 6.14. Porcentaje de DHA Respecto a los Ácidos Grasos Totales

No se presentaron efectos significativos por el efecto de la temperatura ( $p = 0.096$ ), ni el fotoperiodo ( $p = 0.696$ ) sobre el porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales. El tratamiento con oscilación de 19 a 27 °C con iluminación continua (OASF) obtuvo un mayor porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales (Figura 38) en comparación al tratamiento

a 23 °C contantes con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad (SOCF) debido a la interacción de los factores ( $p = 0.036$ ).

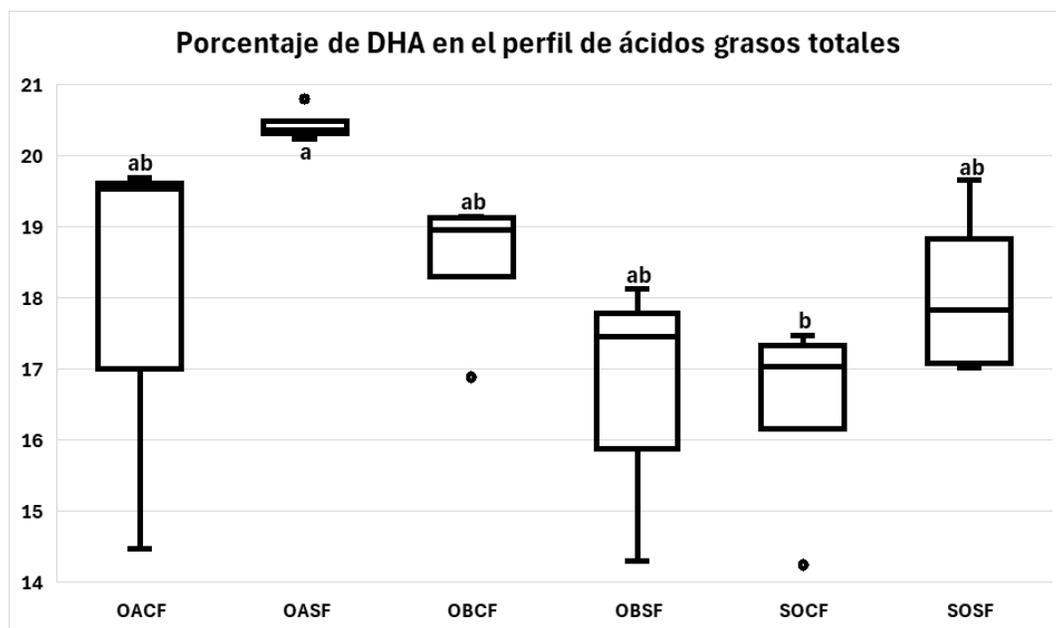


Figura 38.- Porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales en cada tratamiento.

### 6.15. Perfil de Ácidos Grasos Totales

La Cuadro 2 muestra el perfil de ácidos grasos de *I. galbana* en función de los tratamientos de oscilación de temperatura y presencia o ausencia de fotoperiodo. La suma de los ácidos grasos, saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) C<sub>16-18</sub>, PUFA C<sub>20-22</sub>, así como la suma de ácidos grasos n-3 mostraron una alta variación y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la suma de ácidos grasos n-6 fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad (CF) comparado a aquellos con iluminación continua (SF). En contraste, la iluminación continua favorece la síntesis de ácidos grasos omega 3 sobre los ácidos grasos omega 6 ( $\Sigma n-3 / \Sigma n-6$ ), tanto en los tratamientos a temperatura constante (SO), cómo con alta y baja oscilación (OA y OB), con una proporción  $\Sigma n-3 / \Sigma n-6$  de  $16 \pm 2$ , en comparación con los tratamientos con

fotoperiodo con una proporción  $\Sigma n-3 / \Sigma n-6$  de  $10 \pm 1$  (Tabla 2). Los ácidos grasos con mayor proporción son los característicos de *I. galbana* 14:0, 16:0, 18:1 n-9, 18:3 n-3, 18:4 n-3 y 22:6 n-3.

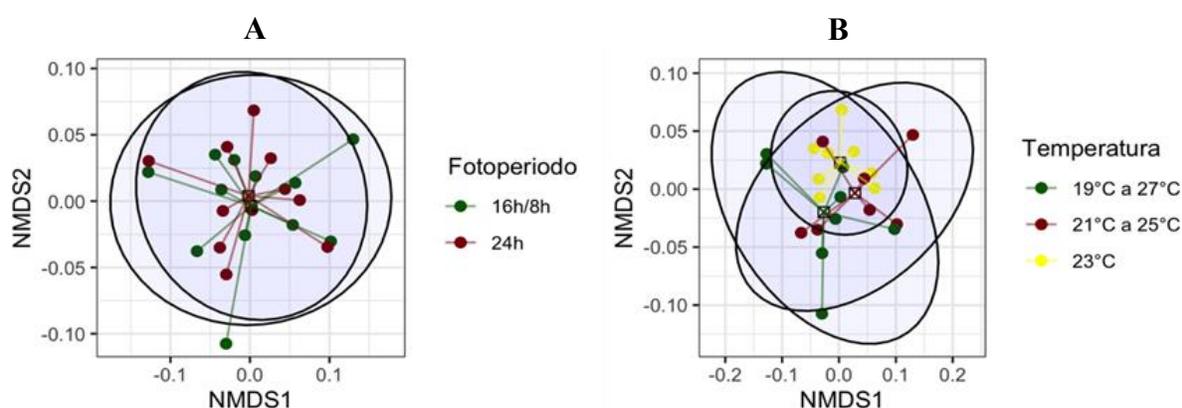
En análisis ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los siguientes ácidos grasos de los tratamientos ( $p < 0.05$ , Tabla 2): 14:1 ( $p = 5.81e^{-03}$ ), 15:1 ( $p = 4.72e^{-02}$ ), 16:1n7 ( $p = 1.20e^{-07}$ ), 16:2 n-6 ( $p = 6.54e^{-03}$ ), 16:3 n-3 ( $p = 9.25e^{-03}$ ), 18:1 n-9 ( $p = 6.95e^{-07}$ ), 18:2 n-6 ( $p = 9.00e^{-03}$ ), 20:0 ( $p = 2.08e^{-02}$ ), 18:5 n-3 ( $p = 2.63e^{-04}$ ), 20:4 n-6 ( $p = 9.82e^{-07}$ ). En el caso del DHA (22:6 n-3) solo se encontró diferencias significativas ( $p = 0.049$ ) en la interacción de los factores, el tratamiento OASF ( $20.44 \pm 0.24$ ) mostró un incremento significativo de DHA sobre el tratamiento SOCF ( $16.45 \pm 1.46$ )

**Cuadro 2.-** Perfil de ácidos grasos totales (% del total de FAMES) de *Isochrysis galbana* obtenidos como resultado de la oscilación de temperatura OA = Oscilación alta, OB = Oscilación baja, SO = Sin oscilación y el fotoperiodo CF = Con fotoperiodo, SF = Sin fotoperiodo. Los valores son el promedio  $\pm$  intervalo de confianza (95%). Las letras de los superíndices denotan diferencias significativas. (\* =  $p < 0.05$ ).

Perfil de Ácidos Grasos Totales (TFA)						
Fotoperiodo (h) Luz: Oscuridad	12:8	24:0	12:8	24:0	12:8	24:0
Temperatura (°C)	19 a 27 °C	19 a 27 °C	21 a 25 °C	21 a 25 °C	23 °C	23°C
FAME	OACF	OASF	OBCF	OBSF	SOCF	SOSF
14:0	16.64 $\pm$ 4.24	14.48 $\pm$ 0.27	14.34 $\pm$ 1.55	18.08 $\pm$ 1.51	15.75 $\pm$ 1.61	16.54 $\pm$ 1.5
<b>14:1 n-5*</b>	<b>1.20<math>\pm</math>0.21<sup>a</sup></b>	<b>0.88<math>\pm</math>0.11<sup>ab</sup></b>	<b>1.05<math>\pm</math>0.06<sup>ab</sup></b>	<b>0.92<math>\pm</math>0.08<sup>b</sup></b>	<b>0.89<math>\pm</math>0.04<sup>b</sup></b>	<b>0.85<math>\pm</math>0.12<sup>b</sup></b>
15:0	0.65 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.02
<b>15:1 n-5*</b>	<b>0.69<math>\pm</math>0.13<sup>a</sup></b>	<b>0.53<math>\pm</math>0.07<sup>b</sup></b>	<b>0.61<math>\pm</math>0.04<sup>ab</sup></b>	<b>0.58<math>\pm</math>0.02<sup>b</sup></b>	<b>0.54<math>\pm</math>0.04<sup>b</sup></b>	<b>0.52<math>\pm</math>0.08<sup>b</sup></b>
16:0	12.63 $\pm$ 3.21	10.05 $\pm$ 0.58	10.03 $\pm$ 1.12	12.59 $\pm$ 1.71	11.49 $\pm$ 1.61	11.99 $\pm$ 1.4
<b>16:1 n-7*</b>	<b>3.67<math>\pm</math>0.04<sup>a</sup></b>	<b>3.21<math>\pm</math>0.04<sup>a</sup></b>	<b>3.95<math>\pm</math>0.15<sup>a</sup></b>	<b>3.10<math>\pm</math>0.21<sup>b</sup></b>	<b>3.83<math>\pm</math>0.15<sup>b</sup></b>	<b>3.27<math>\pm</math>0.15<sup>b</sup></b>
<b>16:2 n-6*</b>	<b>0.41<math>\pm</math>0.03<sup>a</sup></b>	<b>0.46<math>\pm</math>0.05<sup>ab</sup></b>	<b>0.35<math>\pm</math>0.01<sup>ab</sup></b>	<b>0.37<math>\pm</math>0.06<sup>ab</sup></b>	<b>0.32<math>\pm</math>0.05<sup>b</sup></b>	<b>0.41<math>\pm</math>0.07<sup>b</sup></b>
17:0	0.83 $\pm$ 0.22	0.96 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.34	1.00 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.24	0.96 $\pm$ 0.1
<b>16:3 n-3*</b>	<b>0.27<math>\pm</math>0.01<sup>a</sup></b>	<b>0.30<math>\pm</math>0.02<sup>ab</sup></b>	<b>0.30<math>\pm</math>0.03<sup>ab</sup></b>	<b>0.33<math>\pm</math>0.02<sup>ab</sup></b>	<b>0.33<math>\pm</math>0.04<sup>ab</sup></b>	<b>0.35<math>\pm</math>0.04<sup>b</sup></b>
18:0	0.34 $\pm$ 0.11	0.30 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.08
18:1 n-11 n-9	11.54 $\pm$ 0.77	13.26 $\pm$ 1.17	12.57 $\pm$ 0.43	13.25 $\pm$ 2.10	14.34 $\pm$ 0.88	13.40 $\pm$ 1.95
<b>18:1 n-9*</b>	<b>0.64<math>\pm</math>0.04<sup>a</sup></b>	<b>0.92<math>\pm</math>0.12<sup>ab</sup></b>	<b>0.73<math>\pm</math>0.01<sup>bc</sup></b>	<b>1.07<math>\pm</math>0.13<sup>c</sup></b>	<b>0.85<math>\pm</math>0.07<sup>cd</sup></b>	<b>1.20<math>\pm</math>0.12<sup>d</sup></b>
<b>18:2 n-6*</b>	<b>3.11<math>\pm</math>0.20<sup>a</sup></b>	<b>2.43<math>\pm</math>0.31<sup>b</sup></b>	<b>3.07<math>\pm</math>0.39<sup>a</sup></b>	<b>2.29<math>\pm</math>0.46<sup>b</sup></b>	<b>3.14<math>\pm</math>0.53<sup>a</sup></b>	<b>2.37<math>\pm</math>0.33<sup>b</sup></b>
18:3 n-3 (ALA)	5.48 $\pm$ 0.27	5.78 $\pm$ 0.24	5.92 $\pm$ 0.35	5.47 $\pm$ 0.15	5.23 $\pm$ 0.54	5.43 $\pm$ 0.31
18:4 n-3	14.49 $\pm$ 1.97	16.21 $\pm$ 1.41	15.69 $\pm$ 0.74	15.01 $\pm$ 1.58	15.61 $\pm$ 1.38	15.25 $\pm$ 1.61
<b>20:0*</b>	<b>0.21<math>\pm</math>0.06<sup>a</sup></b>	<b>0.23<math>\pm</math>0.02<sup>ab</sup></b>	<b>0.19<math>\pm</math>0.04<sup>ab</sup></b>	<b>0.30<math>\pm</math>0.06<sup>ab</sup></b>	<b>0.23<math>\pm</math>0.02<sup>ab</sup></b>	<b>0.28<math>\pm</math>0.03<sup>b</sup></b>
<b>18:5 n-3*</b>	<b>5.95<math>\pm</math>1.02<sup>a</sup></b>	<b>5.01<math>\pm</math>0.38<sup>ab</sup></b>	<b>6.74<math>\pm</math>0.27<sup>abc</sup></b>	<b>3.97<math>\pm</math>0.95<sup>bc</sup></b>	<b>5.50<math>\pm</math>0.61<sup>c</sup></b>	<b>4.26<math>\pm</math>0.61<sup>c</sup></b>
<b>20:4 n-6 (ARA)*</b>	<b>1.16<math>\pm</math>0.35<sup>a</sup></b>	<b>0.31<math>\pm</math>0.04<sup>b</sup></b>	<b>0.68<math>\pm</math>0.15<sup>bc</sup></b>	<b>0.11<math>\pm</math>0.02<sup>bc</sup></b>	<b>0.42<math>\pm</math>0.08<sup>c</sup></b>	<b>0.16<math>\pm</math>0.04<sup>c</sup></b>
20:5 n-3 (EPA)	0.82 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.05	1.39 $\pm$ 0.9	0.84 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.05
22:5 n-3	2.65 $\pm$ 0.38	2.81 $\pm$ 0.03	2.80 $\pm$ 0.14	2.41 $\pm$ 0.15	2.45 $\pm$ 0.18	2.50 $\pm$ 0.21
<b>22:6 n-3 (DHA)*</b>	<b>16.63<math>\pm</math>3.44<sup>ab</sup></b>	<b>20.44<math>\pm</math>0.24<sup>a</sup></b>	<b>18.48<math>\pm</math>1.05<sup>ab</sup></b>	<b>16.63<math>\pm</math>2.31<sup>ab</sup></b>	<b>16.45<math>\pm</math>1.46<sup>b</sup></b>	<b>18.08<math>\pm</math>1.24<sup>ab</sup></b>
$\Sigma$ SAFA	31 $\pm$ 8	26.6 $\pm$ 0.4	26 $\pm$ 3	33 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	31 $\pm$ 3
$\Sigma$ MUFA	17.1 $\pm$ 0.5	18 $\pm$ 1	18.2 $\pm$ 0.4	18 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2
$\Sigma$ PUFA (C <sub>16-18</sub> )	6.2 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.3
$\Sigma$ PUFA (C <sub>20-22</sub> )	42 $\pm$ 7	46 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2	40 $\pm$ 5	41 $\pm$ 3	41 $\pm$ 3
$\Sigma$ n-3	46 $\pm$ 7	51 $\pm$ 2	50 $\pm$ 2	45 $\pm$ 5	46 $\pm$ 6	47 $\pm$ 4
$\Sigma$ n-6	<b>4.7<math>\pm</math>0.4<sup>a</sup></b>	<b>3.2<math>\pm</math>0.3<sup>b</sup></b>	<b>4.1<math>\pm</math>0.5<sup>a</sup></b>	<b>2.8<math>\pm</math>0.4<sup>bc</sup></b>	<b>3.9<math>\pm</math>0.5<sup>b</sup></b>	<b>2.9<math>\pm</math>0.3<sup>c</sup></b>
$\Sigma$ n3/ $\Sigma$ n6	<b>10<math>\pm</math>1<sup>a</sup></b>	<b>16<math>\pm</math>2<sup>b</sup></b>	<b>12<math>\pm</math>1<sup>a</sup></b>	<b>17<math>\pm</math>4<sup>ab</sup></b>	<b>12<math>\pm</math>1<sup>a</sup></b>	<b>16<math>\pm</math>2<sup>b</sup></b>

## 6.16. Composición Bioquímica

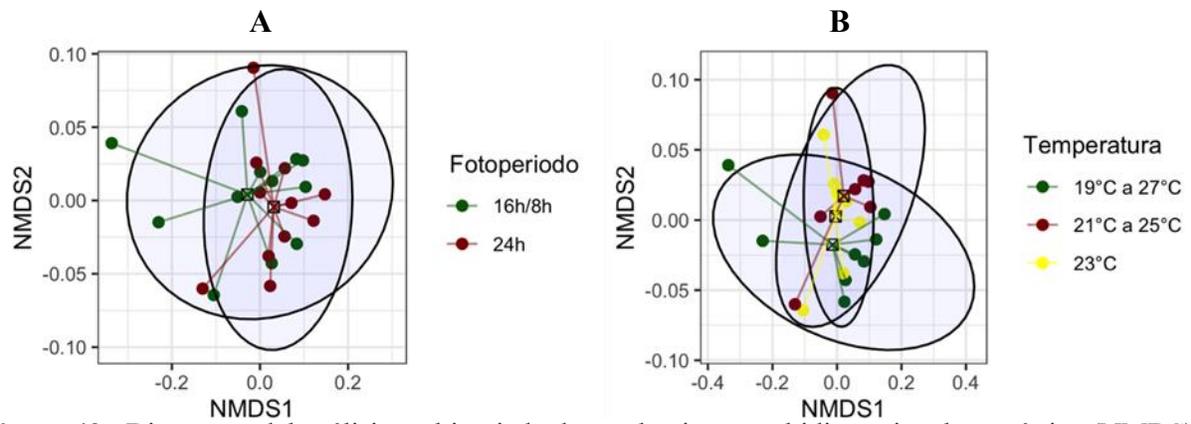
El PERMANOVA de la composición bioquímica proximal no presentó efectos por temperatura ( $p = 0.075$ ), fotoperiodo ( $p = 0.49$ ), ni la interacción de los factores ( $p = 0.227$ ) en las muestras. Se observan ligeras dispersiones no significativas (Figura 39) en los Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).



**Figura 39.-** Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la composición bioquímica, a la izquierda el NMDS del factor Fotoperiodo (A) y a la derecha el NMDS del factor Temperatura (B), considerando los resultados de las variables de respuesta porcentaje de carbohidratos, porcentaje de lípidos totales y porcentaje de proteínas. Se graficó considerando la distancia de Bray-Curtis (1957).

## 6.17. Producción de DHA

El PERMANOVA de la producción de DHA no presentó efectos por temperatura ( $p = 0.75$ ), fotoperiodo ( $p = 0.217$ ), ni la interacción de los factores ( $p = 0.116$ ) en las muestras. Se observan ligeras dispersiones no significativas (Figura 40) en los Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)



**Figura 40.-** Diagramas del análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la producción de DHA, a la izquierda el NMDS del factor Fotoperiodo (A) y a la derecha el NMDS del factor Temperatura (B), considerando los resultados de las variables de respuesta concentración de DHA, rendimiento de DHA y el porcentaje de DHA. Se graficó considerando la distancia de Bray-Curtis (1957).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Cinética de Crecimiento

Los tratamientos OASF, OBCF, OBSF, SOCF y SOSF no presentaron fases de crecimiento asociadas a la oscilación de temperatura acorde al fotoperiodo. Por su parte, el tratamiento con una oscilación de 19 a 27 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OACF), presentó una modificación en el crecimiento relacionado a la oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo, de las 40 hasta las 112 horas, mantuvo una densidad celular similar al inicio y al final de los periodos de 16 horas luz a 19°C e incrementó su densidad celular al finalizar los periodos de 8 horas sin luz a 27 °C.

Las curvas de crecimiento nos indican que todos los tratamientos siguieron una misma tendencia en sus fases de crecimiento en las primeras 120 horas: de 0 a 24 horas una fase adaptativa, de las 24 a las 72 horas una fase de aceleración; de las 72 a las 132 horas una fase exponencial. La fase exponencial fue la etapa más susceptible ante los cambios de temperatura e iluminación, como indican las pruebas *t*, entre las 88 hasta las 96 horas. Al menos uno de los factores tenía una influencia significativa en los resultados. A las 88 horas el fotoperiodo y la interacción de los factores tuvieron una influencia significativa sobre la densidad celular. De las 96 a las 112 horas, la temperatura tuvo una influencia significativa, los tratamientos con oscilación de 19 a 27 °C se vieron perjudicados por la baja temperatura de 19 °C que se presentó por 16 horas con iluminación, por lo que en este periodo la hipótesis describe el comportamiento de *I. galbana* al disminuir la tasa de crecimiento poblacional e incrementando la producción de compuestos necesarios para la división celular se puede suponer una acumulación de compuestos para la división celular debido al incremento de la densidad celular del tratamiento OACF que se presentó de las 112 hasta las 120 horas, periodo a 27 °C con oscuridad, el incremento de la densidad celular en este periodo fue tan alto, que el tratamiento OACF logró los mismos valores de densidades celulares que los tratamientos OBCF, SOCF y SOSF a pesar de haber tenido densidades celulares inferiores de las 0 hasta las 112 horas. Pasadas las 112 horas, los factores dejaron de tener influencia significativa sobre los resultados. Esto se podría asociar a una respuesta metabólica ante los constantes cambios

de temperatura, suposición que se respalda con el análisis multivariado de la densidad celular a las 136 horas donde los factores temperatura e interacción no tuvieron diferencias significativas.

El fotoperiodo tuvo un efecto sobre el crecimiento de *I. galbana*. Los tratamientos con fotoperiodo (CF) superaron de manera significativa en tasa de crecimiento y densidad celular a aquellos tratamientos con iluminación continua (SF). Esto se debe a que la presencia de un fotoperiodo en el cultivo de microalgas mejora la eficiencia en la absorción de la luz (Maltsev *et al.*, 2021), regula el ciclo celular (Lien y Knutser, 1979) y la eficiencia energética mediante la regularización del consumo de compuestos energéticos (León-Saiki *et al.*, 2017; Michels *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con lo reportado por De Winter *et al.* (2013), León-Saiki *et al.* (2017), Che *et al.* (2019) y Shafiq *et al.* (2021) para *I. galbana*.

Los tratamientos OACF, OASF y SOSF presentaron una diferencia significativa del volumen celular, la cual podría deberse al factor fotoperiodo y tiempo de toma de muestra. Esta diferencia de volumen podría suponer una regulación del ciclo celular. Sin embargo, el que se presentaran mayores volúmenes celulares antes de un periodo con iluminación de 16 horas, difiere con la premisa de la regularización del ciclo celular con el fotoperiodo que presentan otras especies de microalgas (León-Saiki *et al.*, 2017; Lien y Knutser, 1979), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo no corroboran que exista una sincronización del ciclo celular en *I. galbana* en relación a una temperatura oscilatoria, la presencia de un fotoperiodo o la oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo.

## 7.2. Composición Bioquímica y Producción de DHA

La oscilación de temperatura asociada a un fotoperiodo modificó el porcentaje del ácido graso 22:6 n-3 (DHA) respecto a los ácidos grasos totales. El tratamiento con una oscilación de temperatura de 19 a 27 °C con iluminación continua (OASF) generó un mayor porcentaje de DHA respecto a los ácidos grasos totales en comparación al tratamiento a 23 °C con fotoperiodo (SOFC). Mientras que, la oscilación de temperatura de 19 a 27 °C asociado con fotoperiodo (OACF) produjo la mayor acumulación de ácidos grasos poliinsaturados n-6. Particularmente, se presentó una mayor acumulación del ácido graso de 20:4 n-6 (ARA), y sus precursores los ácidos grasos 16:2 n-6 y

18:2 n-6. Los tratamientos con fotoperiodo (CF) promovieron la concentración total de ácidos grasos n-6, en especial de 18:2 n-6, en comparación a los tratamientos con iluminación continua (SF). Esto se puede deber a una posible disrupción de la ruta metabólica de los ácidos grasos n-6 a n-3, una modificación que desfavorece la producción de ácidos grasos n-3 y favorece la producción de los ácidos grasos n-6. Existe un incremento en dos de los posibles precursores de la ruta n-6 a n-3 del DHA: el ácido graso 20:4 n-6 y el ácido graso 18:2 n-6. De acuerdo con Maciel *et al.* (2024) y Robertson *et al.* (2013), estos ácidos grasos pueden ser precursores de ácidos grasos n-3 (entre ellos el DHA) mediante la acción de enzimas  $\Delta 15$  y  $\Delta 17$  desaturasas en el retículo endoplasmático de haptófitas. Sin su correcto funcionamiento, la  $\Delta 15$  desaturada no convierte el 18:2 n-6 en 18:3 n-3 y la  $\Delta 17$  desaturasa no convierte el 20:4 n-6 en 20:5 n-3 lo que limita la presencia de ácidos grasos n-3 precursores en la ruta de obtención del 22:6 n-3. El hecho de que no existieran incrementos en los precursores del DHA en la ruta de ácidos grasos n-3 (20:5 n-3, 18:4 n-3 y 18:3 n-3) descarta una posible disrupción de las elongasas y las enzimas  $\Delta 8$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  desaturasas. En el presente estudio no se evaluó la actividad de las enzimas  $\Delta 15$  y  $\Delta 17$ , por lo tanto, no se puede asegurar que las enzimas desaturasas sufrieran algún daño que inhibiera su correcto funcionamiento en la ruta metabólica de los ácidos grasos n-6 a n-3.

Una mayor concentración de DHA respecto a los ácidos grasos totales no implica un incremento en la producción de DHA, debido a la limitación que presenta el rendimiento del peso seco, un tratamiento con alta concentración de DHA, pero bajo rendimiento de peso seco, no obtiene altas producciones de DHA. El tratamiento con mayor rendimiento y producción de DHA fue el tratamiento con una oscilación de 21 a 25 °C con fotoperiodo (OBCF), el cual, a pesar de haber sido el segundo tratamiento con mayores concentraciones y porcentajes de DHA (por debajo del OASF), fue el segundo tratamiento que mayores rendimientos de peso seco tuvo (por encima del tratamiento OASF). La relación entre el rendimiento de peso seco y la concentración de DHA, implicó un mayor rendimiento y producción de DHA. Esta relación que se vio reflejada en el tratamiento OBCF, el cual solo fue mayor significativamente en rendimiento y producción de DHA respecto al tratamiento OACF. Este último tratamiento no tuvo buen rendimiento en peso seco ni en rendimiento de DHA. Los rendimientos en peso seco y DHA obtenidos en el tratamiento OBCF se pueden deber a una mayor actividad metabólica reflejada en la concentración de proteínas significativamente diferente a los tratamientos control SOCF y SOSF. Esta relación entre un incremento en la concentración de proteínas y un incremento en la concentración de DHA se ha

reportado por Wang *et al.* (2022) y Wu *et al.* (2023). Como señala Lien y Knutser (1979), las proteínas son un compuesto primordial en la señalización y función del ciclo celular. Sin embargo, en este estudio no se cuenta con la evidencia para señalar qué proteínas se acumularon y a que rutas metabólicas pertenecen.

Considerando lo anteriormente mencionado, los resultados apuntan a una refutación de la hipótesis. La oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo no incrementa la producción de DHA. Esto se debe a que no existe una relación adecuada entre el incremento de la biomasa producida por el fotoperiodo con la oscilación de temperatura que favorezca la producción de DHA.

Al momento, solo se ha reportado que, en 15°C, *I. galbana* es capaz de inducir un incremento en el porcentaje de DHA (Zhu *et al.*, 1997) como respuesta de la adaptación homeoviscosa inducida por temperatura. El incremento del porcentaje de ácidos grasos n-6 en *I. galbana* del tratamiento con una temperatura oscilatoria de 19 a 27 °C y con un fotoperiodo (OACF) podría indicar la inducción de esta respuesta. Sin embargo, para corroborar si existió una respuesta de la adaptación homeoviscosa, inducida por la oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo, se requieren los perfiles de ácidos grasos por clases lipídicas. Esta información no se generó en este estudio, la cual pondría en evidencia que, si existió dicha respuesta inducida por la oscilación de temperatura, se observaría un incremento en el perfil de ácidos grasos poliinsaturados presentes en los fosfolípidos en los tratamientos con oscilación (OA y OB) en comparación a los tratamientos con una temperatura constante (SO). Por el contrario, si se observara un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los glucolípidos, se puede deducir que *I. galbana* solo hizo una compensación metabólica ante los cambios físicos constantes a nivel de la membrana tilacoidal.

El tratamiento con una oscilación de 21 a 25 °C y fotoperiodo (OBCF) obtuvo un mayor porcentaje de proteínas en comparación a los tratamientos a 23 °C (SO). El que existiera una mayor acumulación de proteínas en el tratamiento OBCF nos indica que todavía se encontraba en fase exponencial sin llegar a la fase estacionaria (Gnouma *et al.*, 2017), debido a que aún conservaba una alta actividad metabólica y acumulaba proteínas para la división celular (Lien y Knutser, 1979; Sukenik & Wahnon, 1991).

El porcentaje de carbohidratos y el porcentaje de lípidos no presentaron variación significativa en los tratamientos. Estos resultados implican que los retos no generaron ningún daño en el fotosistema II que se pudiera ver reflejado en una acumulación de carbohidratos (Cao *et al.*, 2020; Susan *et al.*, 2002) o una acumulación de lípidos totales (Renaud *et al.*, 2002).

Considerando el panorama completo de la composición bioquímica, los resultados del PERMANOVA apuntan a que la oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo no genera modificaciones en la composición bioquímica. Esto nos indica que, a nivel estructural, *I. galbana* no modifica por completo su estructura y composición en porcentajes de carbohidratos, lípidos totales y proteínas. Si bien, se han observado modificaciones en sus composiciones, los resultados apuntan a que esto se debe a compensaciones metabólicas en vez de una reestructuración completa del metabolismo de la célula.

## 8. CONCLUSIONES

El efecto de un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad en los cultivos de la cepa CIB88, especie *Isochrysis galbana* generó un incremento en las densidades celulares, tasa de crecimiento poblacional y la suma de ácidos grasos n-6, en comparación a los cultivos con iluminación continua. Por su parte, los tratamientos con iluminación continua obtuvieron un mayor volumen celular y un mejor rendimiento del peso húmedo en comparación a los tratamientos con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, debido a la acumulación de agua en las células. Los tratamientos con una temperatura oscilatoria baja de 21 a 25 °C mejoraron significativamente el rendimiento del peso seco, en comparación con las técnicas convencionales de cultivo con temperatura estacionaria a 23 °C, sin la necesidad de llevar el cultivo a oscilaciones altas de 19 a 27 °C.

El porcentaje de carbohidratos y lípidos totales no se ve afectado por el efecto de la oscilación de temperatura y la presencia de un fotoperiodo. Se descarta que la oscilación alta de 19 a 27 °C pueda generar un daño en el fotosistema II ya que no se ve un incremento en el contenido de carbohidratos o lípidos totales, lo que indica que la cepa CIB88 de *I. galbana* se puede llevar a mayores niveles de oscilación, más allá del espectro que presenta la oscilación de 8 °C de 19 a 27 °C.

La oscilación de temperatura de 19 a 27 °C con iluminación continua incrementó el porcentaje del DHA respecto a los ácidos grasos totales en comparación al tratamiento control a 23 °C con 16 horas luz y 8 horas oscuridad, pero esto no implicó un incremento en la producción del DHA.

El tratamiento con oscilación de temperatura de 19 a 27 °C asociado a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad (OACF) produjo la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados n-6. Particularmente el ácido graso de 20:4 n-6 (ARA), y sus precursores los ácidos grasos 16:2 n-6 y 18:2 n-6.

La oscilación de temperatura asociada al fotoperiodo no modificó la composición bioquímica proximal ni la producción de DHA en *I. galbana* de manera significativa, se rechaza la hipótesis planteada. Los datos analizados en este estudio no refutan la posibilidad de que existiera una adaptación homeoviscosa en *I. galbana* debido a la modificación del perfil de ácidos grasos totales, donde el incremento de ácidos grasos n-6 puede ser la respuesta que tuvo el organismo para conservar la fluidez de su membrana.

El cultivo de la cepa CIB 88 de *I. galbana* bajo temperaturas oscilatorias no refleja una mejor alternativa en la producción de DHA a los métodos con temperatura constante. Sin embargo, el fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad presenta una ventaja para los cultivos de alimento vivo que requieran altas densidades celulares con ácidos grasos n-6.

Aunque no era el objetivo de este proyecto, los resultados plantean nuevas estrategias para la industria acuícola. Se ha reportado que, además del EPA y DHA, es necesario proporcionar un nivel adecuado de ARA en la dieta de juveniles del pez dorado *Sparus aurata* para optimiza la eficiencia de la utilización del alimento (Magalhaes *et al.* 2020).

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un análisis exhaustivo en el estudio de la fisiología de *I. galbana* para comprender como es su ciclo celular y su cinética de crecimiento. Comprender la cinética de crecimiento, realizando estudios preliminares cuando se planté cultivar a *I. galbana* con técnicas no convencionales, técnicas que no cuenten con antecedentes o registros de las fases de crecimiento de la microalga, para asegurar que el momento de cosecha, se base en evidencia. La identificación de las fases G1 y G2 del ciclo celular resulta de importancia para comprender en qué momento se deben realizar cambios fisicoquímicos en los cultivos para estimular la producción del DHA en *I. galbana*. Para identificar la cinética de crecimiento y el ciclo celular de *I. galbana* con exactitud, se recomiendan las siguientes técnicas:

- Realizar tomas de muestra bajo fotoperiodo cada hora, en un lapso de 24 horas, en la fase exponencial, para analizar el volumen celular del cultivo y su relación con la densidad celular para identificar si existe algún sistema de regularización en el ciclo celular de *I. galbana* asociada al fotoperiodo como en otras especies de microalgas.
- Analizar los niveles de las enzimas de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs por sus siglas en inglés) y la actividad de los genes CDC28/ cdc2 como los trabajos realizados por Mendenhall y Hodge (1998) y Moser y Russell (2000), para identificar la regulación del ciclo celular a nivel molecular de *I. galbana*.
- Analizar los niveles de ARN, ADN, proteínas y número de células cada hora, por 24 horas, como el trabajo realizado por Lien y Knutser (1979), para comprender como es la acumulación de metabolitos en el ciclo celular de *I. galbana*.
- Medir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) para comprender el nivel de estrés oxidativo (Lobo *et al.*, 2010) que somete una temperatura oscilatoria a distintos niveles asociado a un fotoperiodo; al igual que las enzimas superóxido dismutasa (SOD) para comprender el nivel de soporte que tiene el sistema metabólico antes de sufrir las consecuencias del estrés oxidativo (Wiernsperger, 2003; Birben *et al.*, 2012).
- Analizar la viabilidad económica del uso de fotoperiodos 16 horas luz y 8 horas oscuridad para el incremento de densidades celulares y el uso de temperaturas oscilatorias bajas de 21 a 25 °C para la producción de peso seco en el cultivo de *I. galbana* ante los métodos

convencionales de temperatura constante e iluminación continua. Su viabilidad económica podría presentar una alternativa a nivel industrial, donde la producción del alimento vivo representa un alto costo, tanto económico como de espacio para la empresa.

El presente trabajo revela que existe la modificación de la concentración del DHA en *I. galbana* cuando se cultiva a temperaturas oscilatorias asociadas al fotoperiodo y un incremento del ARA cuando se cultiva con una temperatura oscilatoria de 19 a 27 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Refinar la técnica de temperatura oscilatoria a sus niveles óptimos en el momento de cosecha del cultivo y el momento del estímulo de temperatura oscilatoria según el ciclo celular de la microalga, permitirá establecer una técnica para la producción de ácidos grasos poliinsaturados necesarios para satisfacer la demanda nutricional del alimento vivo en la industria acuícola; además de establecer una fuente alternativa a la producción de suplementos alimenticios ricos en omegas 3 y 6 diferentes al aceite de pescado para su integración en la dieta humana.

## 10. REFERENCIAS

- Ahmmed, M. K., Ahmmed, F., Tian, H., Carne, A., & Bekhit, A. E. (2019). Marine omega-3 (n-3) phospholipids: A comprehensive review of their properties, sources, bioavailability, and relation to brain health. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 19(1), 64-123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12510>
- Alkhamis, Y. A., & Qin, J. (2013). Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions. *BioMed Research International*, 2013, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/983465>
- Arredondo-Vega, B O., Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D. (2017a). Determinación de carbohidratos por métodos espectrofotométricos, en: *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. 2ª. Edición. Editores: B. O. Arredondo Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savin, M. Arce-Montoya y G. Gómez-Anduro. Editorial Pandora. 150 págs.
- Arredondo-Vega, B O., Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D. (2017b). Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos, en: *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. 2ª. Edición. Editores: B. O. Arredondo Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savin, M. Arce-Montoya y G. Gómez-Anduro. Editorial Pandora. 150 págs.
- Avidan, O., Malitsky, S., Pick, U. (2021). Fatty acid production and direct acyl transfer through polar lipids control TAG biosynthesis during nitrogen deprivation in the halotolerant alga *Dunaliella tertiolecta*. *Mar. Drugs* 19. <https://doi.org/10.3390/MD19070368>
- Bai, X., Shao, J., Zhou, S., Zhao, Z., Li, F., Xiang, R., Zhao, A.Z., Pan, J., (2019). Inhibition of lung cancer growth and metastasis by DHA and its metabolite, RvD1, through miR-138-5p/FOXC1 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 38 (1), 479. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1478-3>.
- Balakrishnan, J., D, A., P, V., & S, K. (2020). Nitrogen repletion favors cellular metabolism and improves eicosapentaenoic acid production in the marine microalga *Isochrysis sp.* *CASA CC* 101. *Algal Research*, 47, 101877. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101877>
- Balakrishnan, J., Dhavamani, S., Sadasivam, S. G., Arumugam, M., Vellaikumar, S., Ramalingam, J., & Shanmugam, K. (2019). Omega-3-rich *Isochrysis sp.* biomass enhances brain docosahexaenoic acid levels and improves serum lipid profile and antioxidant status in Wistar rats. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 99(13), 6066-6075. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9884>
- Bandarra, N. M., Pereira, P. A., Batista, I., & Vilela, M. H. (2003). Fatty acids, sterols and  $\alpha$ -tocopherol in *Isochrysis galbana*. *Journal Of Food Lipids*, 10(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2003.tb00003.x>
- Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C., & De Vargas, C. (2013). On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal Of Applied Phycology*, 25(6), 1763-1776. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0037-0>
- Bhattacharjya, R., Singh, P. K., Mishra, B., Saxena, A., & Tiwari, A. (2021). Phycoprospecting the

nutraceutical potential of *Isochrysis sp* as a source of aquafeed and other high-value products. *Aquaculture Research*, 52(7), 2988-2995. <https://doi.org/10.1111/are.15143>

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>

Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S., & Bandarra, N. (2017). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal Research*, 29, 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.035>

Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., Coz, J. L., & Cadoret, J. (2012). Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology And Bioengineering*, 109(11), 2737-2745. <https://doi.org/10.1002/bit.24560>

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325-349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Brody, T (1999). *Nutritional Biochemistry* (2nd ed.). Academic Press. p. 320. ISBN 978-0121348366. Retrieved December 21, 2012.

Caffrey, C., Leamy, A., O'Sullivan, E., Zabetakis, I., Lordan, R., & Nasopoulou, C. (2023). Cardiovascular diseases and marine oils: A focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and polar lipids. *Marine Drugs*, 21(11), 549. <https://doi.org/10.3390/md21110549>

Calder, P. C., (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* 45 (5), 1105–1115. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>.

Carreón-Palau, L., Cazares Salazar A., Galván Álvarez V. A., Arredondo Vega B. O. (2017). Extracción, identificación y cuantificación de pigmentos, lípidos y ácidos grasos de microalgas, en: *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. 2ª. Edición. Editores: B. O. Arredondo Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savín, M. Arce-Montoya y G. Gómez-Anduro. Editorial Pandora 150 págs.

Cao, J., Kong, Z., Ye, M., Ling, T., Chen, K., Xu, J., Zhou, C., Liao, K., Zhang, L., & Yan, X. (2020). Comprehensive comparable study of metabolomic and transcriptomic profiling of *Isochrysis galbana* exposed to high temperature, an important diet microalgal species. *Aquaculture*, 521, 735034. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735034>

Carvalho, A. P., & Malcata, F. X. (2005). Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology*, 7(4), 381-388. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-4047-4>

Che, C. A., Kim, S. H., Hong, H. J., Kityo, M. K., Sunwoo, I. Y., Jeong, G., & Kim, S. (2019). Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system. *Bioresource Technology*, 285, 121323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121323>

COBCM. (2023, 28 noviembre). El Fotosistema II: La Luz que Impulsa la Vida en las Plantas - Blog del COBCM. Blog del Colegio Oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid. <https://cobcm.net/blogcobcm/2023/11/28/fotosistema-2-luz-vida-plantas/>

Convertir TIFF a PNG (Online y Gratis) — Convertio. (s. f.). <https://convertio.co/es/tiff-png/>

- Da Silva Gorgônio, C. M., Aranda, D. A. G., & Couri, S. (2013). Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis*; microalgae. *Natural Science*, 05(07), 783-791. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.57094>
- De Pauw, N., Morales, J. & Persoone, G. (1984). Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia* 116, 121–134. <https://doi.org/10.1007/BF00027650>
- De Quelen, F., Chevalier, J., Rolli-Derkinderen, M., Mourot, J., Neunlist, M., Boudry, G., (2011). N-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J. Physiol.* 589 (17), 4341–4352. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214056>
- De Winter, L., Klok, A. J., Franco, M. C., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2013). The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. *Algal Research*, 2(4), 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.001>
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P.G., Boland, W., Zähringer, U., Heinz, E. (2003). New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. cloning and functional characterization of plastidial and microsomal  $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 131, 1648. <https://doi.org/10.1104/PP.102.018317>.
- Eichenberger, W., Gribo, C. (1997). Lipids of *Pavlova lutheri*: cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry* 45, 1561–1567. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00201-X).
- El-Din, S. M. M. (2019). Accumulation of lipids and triglycerides in *Isochrysis galbana* under nutrient stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(2), 359-373. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02997-0>
- Eltgroth, M. L., Watwood, R. L., & Wolfe, G. V. (2005). Production And Cellular Localization Of Neutral Long-Chain Lipids In The Haptophyte Algae *Isochrysis Galbana* And *Emiliania Huxleyi*. *Journal Of Phycology*, 41(5), 1000-1009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00128.x>
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antonny, B. (2016). Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *J. Mol. Biol.* 428, 4776–4791. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2016.08.013>
- Ewart, J. W., & Pruder, G. D. (1981). Comparative growth of *Isochrysis galbana* parke and *Isochrysis aff. Galbana*, clone t-iso at four temperatures and three light intensities. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 12(1), 333-339. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1981.tb00265.x>
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., & Cabezas, B. (1985). Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50(1-2), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90147-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90147-4)
- Fan, J., Andre, C., Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 585, 1985–1991.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>

- Fidalgo, P., Cid, Á., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166(1-2), 105-116. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00278-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00278-6)
- Frentzen, M., Heinz, E., Mckeon, T.A., Stumpf, P.K. (1983). Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 129, 629–636. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1983.TB07096.X>.
- Garnier, M., Bougaran, G., Pavlovic, M., Berard, J.B., Carrier, G., Charrier, A., le Grand, F., Lukomska, E., Rouxel, C., Schreiber, N., Cadoret, J.P., Rogniaux, H., Saint-Jean, B. (2016). Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Algal Res.* 20, 229–248. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.10.017>.
- GC analysis of a 37-Component FAME mix on SPTM-2560. (s. f.). MERCK. Recuperado 27 de octubre de 2024, de [https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/gas-chromatography/c-analysis-of-a-37-component-fame-mix?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=10193651930&utm\\_content=101663337573&gbraid=0AAAAAD8kLQTKb45aZ5-ekdvO0jGFyyho&gclid=Cj0KCQjwIIG2BhC4ARIsADBgpVTZTtVGUVmDoMYwz3k6OTgJaHNyYaxv3Baji7kqRBL6oe0oeb3gRCIaAp5FEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/gas-chromatography/c-analysis-of-a-37-component-fame-mix?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=10193651930&utm_content=101663337573&gbraid=0AAAAAD8kLQTKb45aZ5-ekdvO0jGFyyho&gclid=Cj0KCQjwIIG2BhC4ARIsADBgpVTZTtVGUVmDoMYwz3k6OTgJaHNyYaxv3Baji7kqRBL6oe0oeb3gRCIaAp5FEALw_wcB)
- Gnouma, A., Sadovskaya, I., Souissi, A., Sebai, K., Medhioub, A., Grard, T., & Souissi, S. (2017). Changes in fatty acids profile, monosaccharide profile and protein content during batch growth of *Isochrysis galbana* (T.ISO). *Aquaculture Research*, 48(9), 4982-4990. <https://doi.org/10.1111/are.13316>
- Guan, Hua H., Chen, F., Wei, D., Wu, ZX., Chen, G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 87:38–46
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M., Malcata, F.X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 791–801. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1559-0>.
- Guihéneuf, F., Stengel, D.B. (2017). Interactive effects of light and temperature on pigments and n-3 LC-PUFA-enriched oil accumulation in batch-cultivated *Pavlova lutheri* using high-bicarbonate supply. *Algal Res.* 23, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.002>.
- Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. En: *Handbook of Phycological Methods*. Stein, J. R. (Ed). Cambridge University Press, Cambridge, 289-312 pp.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En Springer eBooks (pp. 29-60). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: i. *Cyclotella nanahustedt*, and *Detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal Of Microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>

- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2024). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Isochrysis galbana* Parke, 1949. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=573884> on 2024-12-12
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., F.K. (2002). Lipid Biochemistry, 5th ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog. Lipid Res. 45, 160–186. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2006.01.001>
- Han, X., Wang, S., Zheng, L., & Liu, W. (2019). Identification and characterization of a delta-12 fatty acid desaturase gene from marine microalgae *Isochrysis galbana*. Acta Oceanologica Sinica, 38(2), 107-113. <https://doi.org/10.1007/s13131-019-1354-1>
- Harayama, T., Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19 (5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 14(3), 1037-1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- He, Q., Chen, L., Zhang, S., Chen, R., Wang, H., Zhang, W., & Song, J. (2018). Natural sunlight induced rapid formation of water-born algal-bacterial granules in an aerobic bacterial granular photo-sequencing batch reactor. Journal Of Hazardous Materials, 359, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.051>
- Heming, T. A., & Buddington, R. K. (1988). 6 Yolk Absorption in Embryonic and Larval Fishes. En Fish physiology (pp. 407-446). [https://doi.org/10.1016/s1546-5098\(08\)60203-4](https://doi.org/10.1016/s1546-5098(08)60203-4)
- Hooper T and Parrish CC (2009) Profiling neutral lipids in individual fish larvae by using short column gas chromatography with flame ionization detection. Limnology and Oceanography, Methods 7, 411–428. doi:10.4319/lom.2009.7.411
- Huang, B., Marchand, J., Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Moreau, B., Morant-Manceau, A., Bougaran, G., Mimouni, V. (2019). Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). Algal Res. 40 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>.
- Huang, B., Mimouni, V., Lukomska, E., Morant-Manceau, A., Bougaran, G. (2020). Carbon partitioning and lipid remodeling during phosphorus and nitrogen starvation in the marine microalga *Diacronema lutheri* (Haptophyta). J. Phycol. 56, 908–922. <https://doi.org/10.1111/jpy.12995>
- Huerlimann, R., Steinig, E. J., Loxton, H., Zenger, K. R., Jerry, D. R., & Heimann, K. (2014). The effect of nitrogen limitation on acetyl-CoA carboxylase expression and fatty acid content in *Chromera velia* and *Isochrysis aff. galbana* (TISO). Gene, 543(2), 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.022>
- Colombo, S.M., Rodgers, T.F.M., Diamond, M.L., Bazinet, R.P., Arts, M.T., (2019). Projected declines in global DHA availability for human consumption as a result of global warming. Ambio 1–16.
- Hüner, N. P., Szyszka-Mroz, B., Ivanov, A. G., Kata, V., Lye, H., & Smith, D. R. (2023).

Photosynthetic adaptation and multicellularity in the Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas priscuii*. *Algal Research*, 74, 103220. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103220>

- Ji, S., Li, H., Huang, X., Sun, J., Kaneko, G., & Ji, H. (2024). Docosahexaenoic acid (DHA) promotes grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) muscle fiber development by activating MEK/ERK pathway in vitro and in vivo. *Aquaculture*, 579, 740148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740148>
- Jebbar, M., Hickman-Lewis, K., Cavalazzi, B., Taubner, R., Rittmann, S. K. R., & Antunes, A. (2020). Microbial Diversity and Biosignatures: An Icy Moons Perspective. *Space Science Reviews*, 216(1). <https://doi.org/10.1007/s11214-019-0620-z>
- Kaplan, D., Cohen, Z., & Abeliovich, A. (1986). Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9(1), 37-48. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(86\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0144-4565(86)90011-9)
- Kennedy, E.P. (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed. Proc.* 20, 934–940.
- Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. En Springer eBooks (pp. 413-484). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_18)
- LaBrant, E., Barnes, A.C., Roston, R.L. (2018). Lipid transport required to make lipids of photosynthetic membranes. *Photosynth. Res.* 138, 345–360. <https://doi.org/10.1007/S11120-018-0545-5>.
- Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P., & Bernard, O. (2012). neutral lipid and carbohydrate productivities as a response to nitrogen status in *Isochrysis sp.* (t-iso; haptophyceae): starvation versus limitation. *Journal Of Phycology*, 48(3), 647-656. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01154.x>
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L.B., Ciappolino, V., Agostoni, C., (2016). DHA effects in brain development and function. *Nutrients* 8 (1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>.
- Lee, J., Lee, H., Kang, S., & Park, W. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>
- León-Saiki, G. M., Remmers, I. M., Martens, D. E., Lamers, P. P., Wijffels, R. H., & Van Der Veen, D. (2017). The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. *Algal Research*, 25, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.018>
- Li, N., Xu, C., Li-Beisson, Y., Philippar, K. (2016). Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends Plant Sci.* 21, 145–158. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2015.10.011>.
- Li, Y., & Liu, J. (2020). Analysis of light absorption and photosynthetic activity by *Isochrysis Galbana* under different light qualities. *Aquaculture Research*, 51(7), 2893-2902. <https://doi.org/10.1111/are.14628>
- Lien T, Knutsen G (1979) Synchronous growth of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae): a review of optimal conditions. *J Phycol* 15:191–200
- Liu, J., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2013). Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 97(11), 4785-4798. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4749-5>

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews/Bioinformatics Trends/Pharmacognosy Review*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Maciel, F., Madureira, L., Geda, P., Teixeira, J. A., Silva, J., & Vicente, A. A. (2024). The potential of Pavlovophyceae species as a source of valuable carotenoids and polyunsaturated fatty acids for human consumption. *Biotechnology Advances*, 108381. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108381>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*, 10(10), 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Meireles, L.A., Guedes, A.C., Malcata, F.X. (2003). Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2237–2241. <https://doi.org/10.1021/jf025952y>.
- Magalhães, R., Guerreiro, I., Coutinho, F., Moutinho, S., Sousa, S., Delerue-Matos, C., Domingues, V., Olsen, R., Peres, H., & Oliva-Teles, A. (2019). Effect of dietary ARA/EPA/DHA ratios on growth performance and intermediary metabolism of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 516, 734644. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734644>
- Mendenhall, MD., Hodge AE (1998) Regulation of Cdc28 cyclin- dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1191–1243
- Michels, M. H., Camacho-Rodríguez, J., Vermuë, M., & Wijffels, R. H. (2014). Effect of cooling in the night on the productivity and biochemical composition of *Tetraselmis suecica*. *Algal Research*, 6, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.002>
- Molfino, A., Amabile, M.I., Monti, M., Arcieri, S., Rossi Fanelli, F., Muscaritoli, M., (2016). The role of docosahexaenoic acid (DHA) in the control of obesity and metabolic derangements in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (4), 505. <https://doi.org/10.3390/ijms17040505>
- Morales, M., Hélias, A. & Bernard, O. Optimal integration of microalgae production with photovoltaic panels: environmental impacts and energy balance. *Biotechnol Biofuels* 12, 239 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1579-4>
- Moser BA, Russell P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 3:631–636
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M.F., Vadstein, O., Bones, A.M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, co- expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Mar. Drugs* 11, 4662–4697. <https://doi.org/10.3390/MD11114662>.
- National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). (s. f.). f/2 Medium Recipe. ALGAE MEDIA RECIPES. NCMA at Bigelow Laboratory. <https://ncma.bigelow.org/algae-media-recipes>
- Ohi, N., Ishiwata, Y., & Taguchi, S. (2002). Diel patterns in light absorption and absorption

efficiency factors of *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae). Journal Of Phycology, 38(4), 730-737. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01101.x>

- Oostlander, P., Van Houcke, J., Wijffels, R., & Barbosa, M. (2020). Growth and fatty acid content of *Rhodomonas sp.* under day:night cycles of light and temperature. Algal Research, 51, 102034. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102034>
- Parke, M. (1949). Studies on marine flagellates. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 28: 255-288.
- Parzanini, C., Özdemir, N. Ş., Carreón-Palau, L., & Parrish, C. C. (2023). Taxonomy and diet determine the polar and neutral lipid fatty acid composition in deep-sea macrobenthic invertebrates. Marine Biology, 170(2). <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04160-6>
- Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H.R., (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquac. Int. 15, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., & Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis sp.* grown in a semicontinuous system. Aquaculture, 221(1-4), 393-406. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00030-9](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00030-9)
- Kim, J., Carlson, M.E., Kuchel, G.A., Newman, J.W., Watkins, B.A., (2016). Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice. Int. J. Obes. 40 (1), 129–137. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.135>
- Koven, W., Kissil, G., & Tandler, A. (1989). Lipid and n–3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. Aquaculture, 79(1-4), 185-191. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90460-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90460-2)
- Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L., Kuo, C., Padovan, A., & Sammy, N. C. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Journal Of Applied Phycology, 3(1), 43-53. <https://doi.org/10.1007/bf00003918>
- Renaud, S. M., Thinh, L., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Aquaculture (Amsterdam), 211(1-4), 195-214. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00875-4)
- Rojas M., F. Jiménez-Bremont, C. Villicaña, L. Carreón-Palau, B. O. Arredondo-Vega, and G. Gómez-Anduro. (2019). Involvement of OpsLTP1 from *Opuntia streptacantha* in abiotic stress adaptation and lipid metabolism. Functional Plant Biology. <https://doi.org/10.1071/FP18280>
- Robertson, Ruairi & Guihéneuf, Freddy & Schmid, Matthias & Stengel, Dagmar & Fitzgerald, Gerald & Ross, Paul & Stanton, Catherine. (2013). Algae-Derived Polyunsaturated Fatty Acids: Implications for Human Health.
- Rohani-Ghadikolaei, K., Ng, W., Abdulaliam, E., Naser, A., & Yusuf, A. (2011). The effect of seaweed extracts, as a supplement or alternative culture medium, on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana* (Park 1949). Aquaculture

Research, 43(10), 1487-1498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02951.x>

- Rossi, S., Carecci, D., & Ficara, E. (2023). Thermal response analysis and compilation of cardinal temperatures for 424 strains of microalgae, cyanobacteria, diatoms and other species. *The Science Of The Total Environment*, 873, 162275. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162275>
- Sánchez, S., Martínez, M., & Moya, M. (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), 13-18. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(00\)00071-1](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(00)00071-1)
- Sato, N., Tsuzuki, M., Kawaguchi, A. (2003). Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h - I. Existence of a eukaryotic pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1633, 27–34. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00069-6)
- Sayegh, F. A., Montagnes, D. J. (2010). Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology*, 102(3), 3007-3013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.011>
- Sinensky, M., (1974). Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 522–525.
- Schulze, P. S., Barreira, L. A., Pereira, H. G., Perales, J. A., & Varela, J. C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends In Biotechnology*, 32(8), 422-430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>
- Shafiq, Y. N., Sung, Y. Y., Ahamad, Z. H., Abdul, W. M. E., Ab, G. S. N., & Norhayati, Y. (2021). Photoperiod influenced the growth and antioxidative responses of *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chuii*. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/japs.2021.110415>
- Shim, S. J., Hong, M. E., Chang, W. S., & Sim, S. J. (2020). Repeated-batch production of omega-3 enriched biomass of *Chlorella sorokiniana* via calcium-induced homeoviscous adaptation. *Bioresource Technology*, 303, 122944. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122944>
- Smith, R., Jouhet, J., Gandini, C., Nekrasov, V., Marechal, E., Napier, J.A., Sayanova, O. (2021). Plastidial acyl carrier protein  $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant J.*106, 1247–1259. <https://doi.org/10.1111/TPJ.15231>.
- Srinivasan, B., Radhakrishnan, K., Babu, P. A. S., Sivarajan, M., & Sarojadevi, M. (2014). Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. *Biotechnology Letters*, 36(8), 1653-1660. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1517-2>
- Staff, W. (2023, 31 julio). Convert Lux to PPFD - Online Calculator. <https://www.waveformlighting.com/horticulture/convert-lux-to-ppfd-online-calculator>
- Suhaimi, N. B., Kwan, P. P., Banerjee, S., & Shariff, M. (2021). Influence of blue and yellow light-emitting diodes on the lipid and carbohydrate composition of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture Research*, 52(7), 3226-3232. <https://doi.org/10.1111/are.15168>
- Sukenik, A., & Wahnon, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. in *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1), 61-72.

[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90279-g](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90279-g)

- Sun, X., Yang, S., Wang, L., Zhang, Q., Zhao, S., & Meng, Q. (2011). The unsaturation of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane alleviates PSII photoinhibition under chilling stress. *Plant Cell Reports*, 30(10), 1939-1947. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1102-2>
- Sun, Z., Wei, H., Zhou, Z., Ashokkumar, M., & Liu, J. (2018). Screening of *Isochrysis Strains* and Utilization of a Two-Stage Outdoor Cultivation Strategy for Algal Biomass and Lipid Production. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 185(4), 1100-1117. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2717-3>
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E. (1995). Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry* 40, 397-400. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00327-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00327-4)
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61, 15-24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00201-7)
- Velasco, L. A., Barros-Gómez, J., Ospina-Salazar, G. H., & Trujillo, C. (2009). Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/2bd9343a228f49f881235c318a303180>
- Velasco Blanco, G., & Abdo de de la Parra, M. I. (2013). Cultivo de alimento vivo para la maricultura (1.a ed.) [Libro Físico]. Editorial Académica Española. ISSN: 9783659067785. 76 págs.
- Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G., & Garland, C. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, 128(3), 219-240. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4)
- Wang, Y., Xu, S., Cao, J., Wu, M., Lin, J., Zhou, C., Zhang, L., Zhou, H., Li, Y., Xu, J., & Yan, X. (2022). Co-cultivation of *Isochrysis galbana* and *Marinobacter sp.* can enhance algal growth and docosahexaenoic acid production. *Aquaculture*, 556, 738248. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738248>
- Wen, Z.-Y., Chen, F., (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21, 273-294.
- Whyte J.N.C. (1987) Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60, 231-241
- Wiernsperger, N. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & Metabolism*, 29(6), 579-585. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70072-1](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70072-1)
- Wu, M., Cao, J., Xu, Y., Xu, S., Zhou, Z., Shao, M., Wang, Z., Zhang, L., Chen, D., Wu, Y., Xu, J., & Yan, X. (2023). Impact of three phycospheric bacterial strains on the growth and fatty acid composition of *Isochrysis galbana*. *Algal Research*, 74, 103183. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103183>
- Zhu, C. J., Lee, Y. K., & Chao, T. M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal Of Applied Phycology*, 9(5), 451-457. <https://doi.org/10.1023/a:1007973319348>