

Estudio de la Evolución de Pigmentos y Lípidos en Células Intactas de *Chlorella vulgaris*

Cristian Alejandro Blanco Combariza

Trabajo de Grado para Optar al título de Químico

Directora

Inés Hernández Celi

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Codirector

Luis Miguel Díaz Sánchez

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2021

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	8
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo General	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Marco Teórico.....	13
2.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	13
2.1.1.1. Condiciones de crecimiento durante análisis metabolómicos en <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.1.1.2 Evaluación de crecimiento en <i>Chlorella vulgaris</i>	17
2.1.2 Pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos	19
2.1.3 Lípidos	21
2.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	23
2.2.1 Matrices MALDI	24
3. Antecedentes	25
4. Metodología	27
5. Resultados y Discusión	32
5.1. Establecimiento del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	32
5.2. Curva de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	34
5.3. Análisis de células intactas de <i>C. vulgaris</i> mediante MALDI-TOF MS.....	38
5.4. Cambios composicionales a lo largo de la curva de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> mediante MALDI-TOF MS.....	46

6. Conclusiones	53
7. Recomendaciones.....	55
Referencias Bibliográficas	57

Lista de Tablas

Tabla 1. Cálculos de precisión en la masa de algunas señales características de *C. vulgaris*..... 46

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustración de la célula de <i>Chlorella vulgaris</i> . Fuente: Autor.	13
Figura 2. Cámara de Neubauer con detalle de cuadrícula para conteo celular (el camino rojo ilustra una técnica de conteo comúnmente usada).	17
Figura 3. Tabla de composición de <i>Chlorella vulgaris</i> . Naranja: Carotenoides; Verde: Clorofilas; Morado: Lípidos; Azul: Ácidos Grasos.	19
Figura 4. Actividades asociadas con la Etapa 1.	27
Figura 5. Montaje utilizado para el crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	29
Figura 6. Pasos iniciales para la preparación del pre-inóculo de <i>C. vulgaris</i> a partir de un cultivo existente.	33
Figura 7. Gráfica de curva de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> basada en peso seco	35
Figura 8. Gráfica de curva de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> basada en Densidad Óptica a 682nm.	36
Figura 9. Variables consideradas en el protocolo de preparación de muestras de <i>C vulgaris</i> para el análisis MALDI MS.	38
Figura 10. Efecto de la relación M:A en el análisis MALDI de células intactas de <i>C. vulgaris</i> . .	40
Figura 11. Efecto de la matriz en el análisis MALDI de células intactas de <i>C. vulgaris</i>	42
Figura 12. Rangos esperados de señales MALDI. (Naranja: Carotenoides, Verde: Clorofilas, Violeta: TAGs).	43
Figura 13. Señales de interés en el espectro MALDI de <i>C. vulgaris</i> (15 días) usando DCTB como matriz	44
Figura 14. Señales de interés en el espectro MALDI de <i>C. vulgaris</i> (15 días) usando DHB como matriz.	45
Figura 15. Evolución del subgrupo clorofilas durante el desarrollo de <i>C. vulgaris</i>	47

Figura 16. Rutas biosintéticas de carotenoides en *C. vulgaris*, tomada de (Gouveia, y otros, 1996
..... 50

Figura 17. Evolución de carotenoides y xantofilas durante el desarrollo de *C. vulgaris*..... 51

Figura 18. Evolución de las abundancias de Carotenoides y Xantofilas durante el desarrollo de *C.*
vulgaris..... 52

Resumen

Título: Estudio De La Evolución De Pigmentos Y Lípidos En Células Intactas De *Chlorella*
*Vulgaris**

Autor: Cristian Alejandro Blanco Combariza**

Palabras Clave: *Chlorella Vulgaris*; Pigmentos; Carotenoides; Clorofilas; Maldí; Espectrometría De Masas; Curva De Crecimiento.

Descripción: El aumento de aplicaciones científicas y tecnológicas que involucran cultivos de microorganismos ha aumentado las necesidades de los investigadores en cuanto a monitoreo de cultivos en tiempo real. Tradicionalmente, estos monitoreos han involucrado una serie de procesos de extracción de diferentes fracciones a partir de los cultivos, los cuales son posteriormente analizados por medio de cromatografía. Todos estos procesos tardan tiempo, lo cual puede resultar problemático si se trata de un cultivo de evolución rápida. Con el fin de hallar metodologías más eficientes para el seguimiento de microorganismos, en este trabajo se ha utilizado espectrometría de masas MALDI-TOF para realizar un monitoreo de un cultivo de *Chlorella vulgaris* por medio del análisis de las distribuciones de pigmentos de estos organismos fotosintéticos. A partir de los datos obtenidos, se ha logrado evidenciar los cambios composicionales de estos pigmentos en los microorganismos a medida que el cultivo envejece, lo cual podrá actuar como una alternativa analítica para el monitoreo de cultivos de microorganismos.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Inés Hernández Celi. Magister en Ciencias Básicas Biomédicas. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Químico.

Abstract

Title: Study Of Pigment And Lipid Evolution In Intact *Chlorella Vulgaris* Cells* .

Author: Cristian Alejandro Blanco Combariza**

Keywords: *Chlorella Vulgaris*; Pigments; Carotenoids; Chlorophyll; Maldi; Mass Spectrometry; Growth Curve.

Description: An increase in scientific and technological applications involving cultures of microorganisms has also increased researcher's needs for real time cell culture monitoring. These analyses have traditionally involved a series of extractions, culminating in a set of fractions obtained from the cultures. These fractions are then analyzed, typically by chromatographic methods. These analytical processes take time, which can be problematic for time-sensitive or rapidly evolving cell cultures. In order to help develop more time-efficient analytical methodologies, this study has used MALDI-TOF mass spectrometry to monitor the growth of a *Chlorella vulgaris* culture through the analysis of pigment distributions in the photosynthetic cells. Using the data obtained, we have been able to observe the compositional changes of these pigments in the aging cell culture, which could lead to an alternative analytical solution for cell culture monitoring.

* Degree work

** College of Science. School of Chemistry. Director: Inés Hernández Celi. MSc. in Biomedical Science. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Chemist.

Introducción

Sentado sobre la cubierta de su barco de la armada británica en 1816, John Thompson se encontraba encantado con las luces casi mágicas que producían los pequeños crustáceos que

parecían seguir el rastro de su navío. Curioso por entender el fenómeno que observaba, el cirujano, biólogo, zoólogo, botánico e historiador natural, diseñó una red con materiales regados por el buque para atrapar la fuente de luz. Aunque Thompson nunca logró la captura de estos organismos brillantes, su invento le permitió atrapar los primeros especímenes recordados de plancton (Damkaer, 2016). Nombrados por primera vez en 1887 por Victor Hensen (Smetacek, 1999), el plancton, proveniente del griego *planktos* (que significa vagabundo o errante), es un grupo de organismos microscópicos que habitan en cuerpos de agua. El plancton lo constituye todos aquellos organismos que, ya sea por su tamaño o su baja motilidad, son incapaces de nadar contra la corriente y, por lo tanto, son arrastrados sin rumbo. Esta categoría de organismos incluye diversos géneros de casi todos los filos del reino animal, junto con especies de algas, archaeas y protozoos (Falkowski, 2012).

Descubiertas en 1890 por un microbiólogo holandés, las *Chlorellas* son un género de microalgas fitoplanctónicas unicelulares que se caracterizan por su forma esférica, reproducción asexual rápida y alto contenido de proteínas, pigmentos, lípidos, polisacáridos, vitaminas y minerales (Chia, Chew, & Zaid, 2019). Tras su descubrimiento, el género *Chlorella* se ha prestado para un gran número de aplicaciones en el mundo industrial. Desde la primera guerra mundial, cultivos de *Chlorella* han sido usados como suplementos dietarios gracias a las altas concentraciones de proteínas, grasas, minerales y clorofilas (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014). También se han empleado como materia prima en la industria cosmética, tanto en cremas rejuvenecedoras como en bloqueadores solares aprovechando su composición pigmentaria. Aplicaciones en biotecnología, incluyen el uso de cepas de *Chlorella* en biorreactores para la producción industrial de biomoléculas relevantes entre ellas; triacilglicéridos (TAGs) para

la producción de biocombustibles (Stephenson, Dennis, Howe, Scott, & Smith, 2010). Además, se han realizado estudios para el uso de *Chlorella* en limpieza de aires y secuestro de carbono en la atmósfera, ya que estos microorganismos fitoplanctónicos presentan mayor eficiencia fotosintética que algunas plantas macroscópicas (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014)

De igual manera, el estudio del fitoplancton marino ha sido de gran interés debido a que este lleva a cabo diferentes funciones biológicas indispensables en los ecosistemas acuáticos, incluyendo la remoción de contaminantes incluyendo nitratos, sulfatos y fosfatos (Ajala & Alexander, 2020; Falkowski, 2012). La caracterización de pigmentos fotosintéticos en estos microorganismos constituye actualmente una herramienta útil para reconocer grupos taxonómicos, dado que estos pueden servir como biomarcadores moleculares. Este método de identificación se basa en el reconocimiento de pigmentos diagnósticos; únicos en ciertos grupos taxonómicos o compartidos por dos o más grupos que permiten la tipificación de géneros de fitoplancton (Schlüter, Møhlenberg, Havskum, & Larsen, 2000).

El análisis de pigmentos en microorganismos requiere de procesos de preparación extensiva de muestras, largos tiempos de análisis y múltiples etapas consecutivas en las cuales debe incluirse: lisis celular, separación de pigmentos por polaridad, adecuación de muestra para cromatografía para obtener resultados confiables a partir de las técnicas tradicionales como HPLC o TLC. La preparación y manipulación de las muestras requerido para realizar este tipo de pruebas, junto con largos tiempos de análisis hacen que estas estrategias metodológicas para el monitoreo de pigmentos no sean particularmente eficientes (Barbano, et al., 2015; Singhal, Kumar, Kanaujia, & Viridi, 2015; Vembadi, Menachery, & Qasaimeh, 2019). De esta manera con el fin de reducir la carga preparativa de los análisis de distribución biomolecular y fortalecer la caracterización

metabólica de estos organismos, en esta investigación se utilizó la espectrometría de masas con ionización MALDI para realizar el monitoreo de biomoléculas (lípidos y pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores) a lo largo de la curva de crecimiento de la *Chlorella vulgaris*. Nuestra hipótesis de trabajo se basó en que es posible establecer la composición pigmentaria y lipídica a partir del cultivo de células intactas de *C. vulgaris* de manera rápida y eficiente mediante análisis directo por MALDI-TOF-MS.

Los resultados de la investigación muestran que las matrices DHB y DCTB permiten observar pigmentos fotoprotectores (carotenoides) y fotosintéticos (clorofilas) en muestras de células intactas de *Chlorella vulgaris* con buen desempeño analítico en términos de S/N, resolución y precisión en la masa. Los análisis MALDI-MS permitieron establecer diferencias composicionales a lo largo de la curva de crecimiento del microorganismo. Las etapas iniciales de desarrollo de la *Chlorella vulgaris* se caracterizan por abundantes pigmentos fotosintéticos de tipo clorofila, que van decreciendo a expensas de un incremento en pigmentos fotoprotectores de tipo carotenoide. No se observaron en los análisis señales correspondientes a lípidos (TAGs o DAGs).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Estudiar los cambios composicionales, en términos de pigmentos y lípidos, durante las fases de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.2 Objetivos Específicos

- Analizar la composición pigmentaria y lipídica durante las etapas de crecimiento de células intactas de *Chlorella vulgaris* en medio BBM modificado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF .
- Identificar las variaciones composicionales de pigmentos y lípidos de *Chlorella vulgaris* a lo largo de la curva de crecimiento.

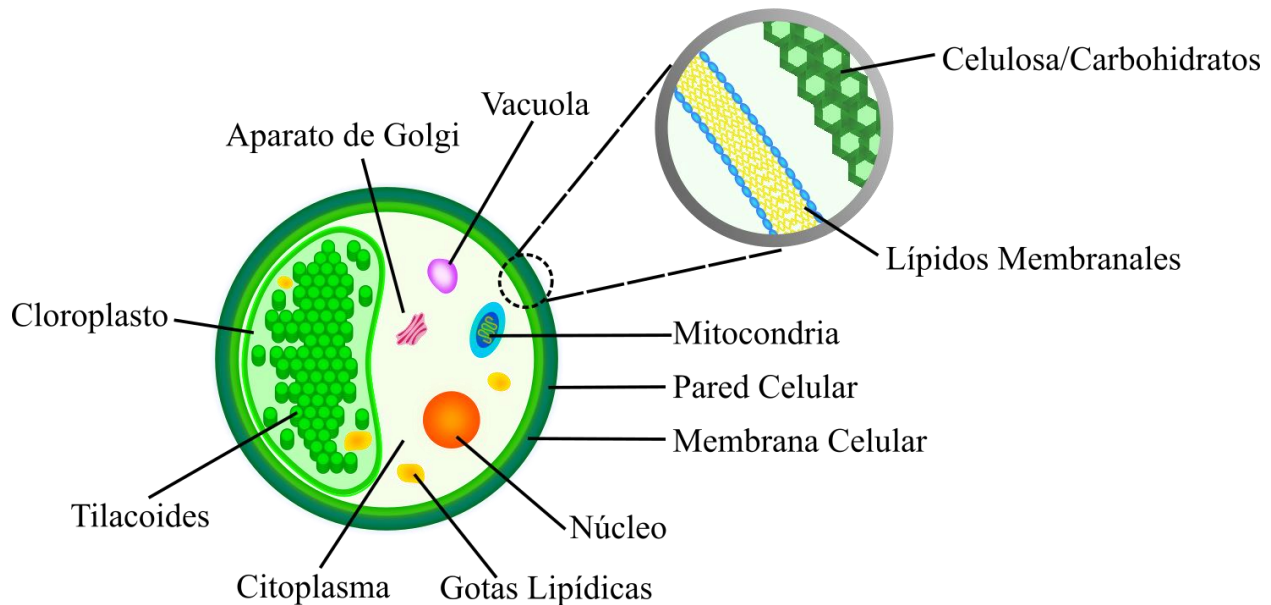
2. Marco Teórico

2.1 *Chlorella vulgaris*

La *Chlorella vulgaris* es una microalga eucariota perteneciente a la familia Chlorellaceae que se caracteriza por su forma esférica pequeña (5-10µm) y su color verde intenso (Nickelsen, 2017; Safi, 2014). Esta alga posee una pared celular compuesta por celulosa y otras moléculas asociadas. Entre estas se encuentran sustancias estructurales como el quitosano o la glucosamina. Esta estructura rodea la membrana celular de la microalga, la cual contiene un número de lípidos tanto señalizadores (esfingolípidos) como estructurales (fosfolípidos y glucolípidos) (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018). También posee un cloroplasto único protegido por una bicapa lipídica como se muestra en la Figura 1. Dentro del cloroplasto, los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (carotenoides y clorofilas) se encuentran almacenados dentro de sacos membranales llamados tilacoides (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014). Entre las clorofilas, se pueden encontrar tanto clorofila a y b como algunos pigmentos derivados de estos, como lo son las feoforbidas, clorofilidas y feofitinas. Estos pigmentos pueden ser identificados midiendo las longitudes de onda de máxima absorción. En términos de peso seco, estas microalgas son compuestas de 5-40% lípidos, 12-55% carbohidratos, 42-58% proteínas, 1-2% pigmentos y trazas de minerales y vitaminas (Ren X. C., 2016; Ren X. D., 2019).

Figura 1.

Ilustración de la célula de Chlorella vulgaris.



Chlorella vulgaris tiene la capacidad de reproducirse de manera veloz (con una tasa específica de crecimiento de 0.279 d^{-1}) (Wong, 2017), lo cual la hace una opción popular para el estudio y aplicaciones industriales. Estas células se reproducen por auto esporulación, una forma de reproducción asexual en donde cuatro células hijas con pared celular propia se forman dentro de la pared celular de la célula madre. El crecimiento de la *Chlorella vulgaris* depende de la disponibilidad de nutrientes, en particular el nitrógeno (de la forma NO_3), condiciones lumínicas (pruebas de iluminación muestran que luz con longitudes de onda alrededor de 650 y 420nm generan la mejor respuesta en microalgas verdes en conjunto con horarios de 16:8 horas luz: oscuridad), valores de pH, y temperatura (Jeon, Cho, & Yun, 2005; Stephenson, Dennis, Howe, Scott, & Smith, 2010; Harwood, 2006). La referencia taxonómica del NCBI de esta microalga es NCBI:txid 3077.

2.1.1.1. Condiciones de crecimiento durante análisis metabólicos en Chlorella vulgaris

En los cultivos de microorganismos en particular los cultivos fotosintéticos se pueden clasificar según las fuentes de carbono utilizadas (Nichols & Bold, 1965). Estos pueden ser autotróficos (utilizan carbono inorgánico), heterotróficos (carbono orgánico y ausencia de luz), mixotrófico (con fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas) y fotoheterotróficos (en presencia de luz y fuente orgánica de carbono) (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017).

De igual manera los medios también se clasifican según la exposición del cultivo al ambiente: i. los cultivos pueden ser cerrados (el medio se encuentra aislado completamente del ambiente), ii. funcionalmente cerrado (un sistema que puede ser rutinariamente abierto, pero regresa a un estado cerrado a través de un proceso de esterilización) o iii. abierto (medios de cultivo abiertos al medio ambiente). Cabe destacar que los medios cerrados ofrecen mayor control sobre el cultivo, aunque el intercambio gaseoso permitido por medios abiertos los hace atractivos para el crecimiento de *Chlorella* (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017).

Los medios de cultivo para microorganismos como *Chlorella vulgaris* son los responsables de determinar las características que expresaran metabólicamente (Wong, 2017). Dado que cambios de nutrientes y condiciones de temperatura, iluminación y agitación pueden generar variaciones dramáticas en las composiciones celulares (Wong, 2017; Stephenson, 2010; Ren X. C., 2016; Ren X. D., 2019). Estas variaciones afectan tanto el tamaño de las células, como su producción pigmentaria y reproducción. Se ha encontrado en la literatura que nutrientes como el nitrato aumentan la reproducción de células y la formación de biomasa, pero reducen la producción

de lípidos de interés industrial. A su vez, fuentes de carbono aumentan el crecimiento celular, siempre y cuando no excedan un límite de concentración (17 veces la concentración de nitratos) (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017).

El medio basal de Bold es un medio de cultivo muy utilizado para el crecimiento de algas de agua dulce. Este se basa en soluciones de micro- y macronutrientes como fuente de alimento, junto con soluciones ácidas y alcalinas para regulación del pH. La naturaleza inorgánica de este medio de cultivo resulta difícil para la vida de organismos contaminantes, por lo tanto, también garantiza la naturaleza axénica del cultivo. El medio basal de Bold original fue creado a partir de una serie de soluciones estándares de sales. Estas soluciones estándar fueron producidas en volúmenes de 400 mL. Cada una de ellas contenía una de las siguientes sales en las concentraciones mencionadas: NaNO_3 (10.0g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.0g); K_2HPO_4 (3.0g); KH_2PO_4 (7.0g); NaCl (1.0g). Para la preparación final del medio, 940 mL de agua destilada fue mezclada con 10 mL de cada una de las soluciones estándar mencionadas junto con 1.0 mL de las cuatro soluciones descritas a continuación (Nichols & Bold, 1965).

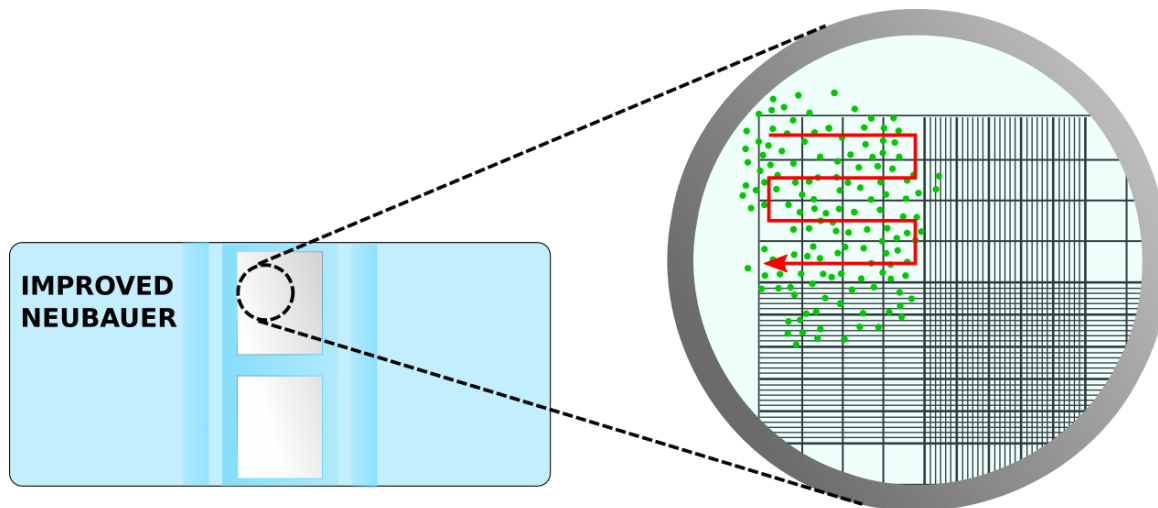
- (1) 50g EDTA y 31g de KOH disueltos en 1 L de H_2O .
- (2) 4.98g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 1 L de agua acidificada (Agua acidificada: 1.0 mL H_2SO_4 añadido a 999 mL de H_2O).
- (3) 11.42g de H_3BO_3 disuelto en 1 L H_2O .
- (4) Las sales descritas, todas disueltas en 1 L de H_2O : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8.82g); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.44g); MoO_3 (0.71g); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.57g); $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

2.1.1.2 Evaluación de crecimiento en *Chlorella vulgaris*

Normalmente, el monitoreo del crecimiento celular se realiza utilizando una técnica tradicional: la hemocitometría de Neubauer, empleada para conteo de diferentes clases de células (Vembadi, Menachery, & Qasaimeh, 2019). La herramienta principal para este conteo es la cámara de Neubauer: un portaobjetos diseñado específicamente para realizar conteos (**Figura 2**). Una placa de cristal con una cuadrícula fina (con más de 400 cuadros) es cubierta de muestra líquida con una población de microorganismos. Colocándolo bajo un microscopio, se utilizan los cuadros de guía para realizar un conteo del número de células por unidad de área.

Figura 2.

Cámara de Neubauer con detalle de cuadrícula para conteo celular (el camino rojo ilustra una técnica de conteo comúnmente usada).



Existen múltiples técnicas para el conteo celular con este tipo de cámara. Por lo general, estas se basan en contar un número reducido de recuadros, la cantidad de células que contiene 1 μ l del medio de cultivo y utilizar esos valores para calcular la cantidad de células de toda la muestra (Vembadi, Menachery, & Qasaimeh, 2019). Esto permite que los conteos sean estadísticamente válidos. Estas mediciones son utilizadas para generar la curva de crecimiento del cultivo (Vembadi, Menachery, & Qasaimeh, 2019). Las curvas de crecimiento fueron desarrolladas con el fin de representar el crecimiento del cultivo de células (Micha & Corradini, 2011). Estas representaciones cumplen la función de ilustrar de una forma visual el crecimiento de alguna variable en función del tiempo. En el ámbito de cultivos celulares, esta curva puede representar el aumento de la biomasa realizando mediciones de peso seco, número de individuos mediante conteo celular, la evaluación de absorbancia por UV-Vis o alguna característica individual como tamaño de células (Wong, 2017). Estas curvas de crecimiento suelen encontrarse divididos en cuatro fases claras, correspondientes a etapas de vida de los microorganismos (Micha & Corradini, 2011). La primera fase de la curva de crecimiento, llamada la fase de latencia, se caracteriza por una baja tasa de reproducción y crecimiento de las células en el medio. La segunda fase o fase exponencial, trae consigo un rápido crecimiento poblacional donde las células ya adaptadas al medio comienzan a reproducirse de manera acelerada. La tercera fase de la curva de crecimiento muestra una detención de la reproducción y un estancamiento de la población debido al número de células alcanzando los límites permitidos por el sistema, razón por la cual es llamada fase estacionaria. La fase de muerte es el último paso en una curva de crecimiento e implica la muerte de las células en el medio debido a la no división celular de estos microorganismos. Es importante notar que estas muertes no son causadas por falta de nutrientes (Micha, 2011; Wong, 2017).

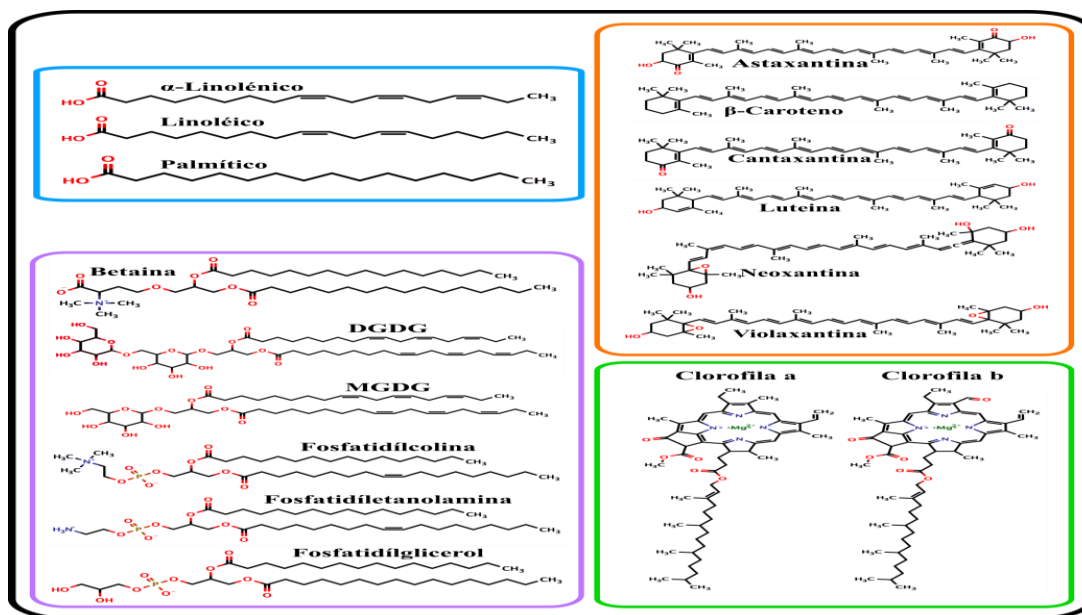
2.1.2 Pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos

Siendo un organismo fotosintético, la *Chlorella vulgaris* sintetiza pigmentos de una manera eficiente, produciendo en promedio un 8% más de ftopigmentos que las plantas terrestres (Schlüter, Møhlenberg, Havskum, & Larsen, 2000). Las condiciones del cultivo afectan dramáticamente las distribuciones de pigmentos, en particular las variaciones de luz y contenido de nutrientes (Stephenson, Dennis, Howe, Scott, & Smith, 2010). Sin embargo, los pigmentos principales tienden a ser similares a pesar de las condiciones del cultivo. Los pigmentos más comunes en las *Chlorellas* son aquellos de las familias de las clorofilas y los carotenoides, entre los cuales se encuentran la clorofila a y b, la luteína, la violaxantina, y el β -caroteno (ver **Figura 3**) (Gouveia, et al., 1996).

Figura 3.

Tabla de composición de *Chlorella vulgaris*. Naranja: Carotenoides; Verde: Clorofilas; Morado:

Lípidos; Azul: Ácidos Grasos.



Las clorofilas son pigmentos de color verde compuestos por un anillo de calorina (un tetrapirrol que contiene un átomo de magnesio) unido a una cadena alifática larga llamada fitol. La clorofila *a* difiere de la clorofila *b* en que el grupo funcional de la posición 3 del grupo tetrapirrónico es -CH₃ (metilo) en lugar de -CHO (grupo funcional de los aldehídos) (Chen, 2015). La función principal del anillo de porfirina y de la cadena hidrofóbica de fitol es absorber luz y mantener anclada la clorofila a la membrana tilacoidal respectivamente (Chen, 2015). De las clorofilas se derivan otras moléculas asociadas a estas conocidas como feofitinas, clorofilidas y feofoforbidas (Begum, Yusoff, Banerjee, Khatoon, & Shariff, 2016). Las feofitinas tienen la misma estructura molecular que las clorofilas con ausencia del magnesio en la calorina central. Las clorofilidas carecen únicamente de la cadena de fitol y las feofoforbidas corresponden a moléculas que han perdido tanto el magnesio central como el fitol (Chen, 2015). Por lo general, estas familias de moléculas absorben longitudes de onda definidas, entre 430-460 y 660-700 nm, en la región azul y roja del espectro (Schlüter, Møhlenberg, Havskum, & Larsen, 2000). Esta habilidad de absorción las vuelve atractivas para actividades cosméticas, en particular como bloqueadores solares.

Por otro lado, los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se caracterizan por sus colores, principalmente amarillos y anaranjados, y por sus estructuras, las cuales incluyen hasta 40 carbonos ramificados enlazados con enlaces dobles conjugados (Buskirk, et al., 2011). El número de estos enlaces dobles determina las longitudes de onda a las cuales absorberá el pigmento (absorbiendo en el visible de 400 a 550 nm, correspondiente a violeta-verde) y, por lo tanto, su color. De acuerdo con la estructura química, los carotenoides se clasifican en carotenos (que son hidrocarburos y no contienen oxígeno) y xantofilas (que contienen oxígeno)

(Schlüter, Møhlenberg, Havskum, & Larsen, 2000). En la literatura se reporta la neoxantina, violaxantina, luteína, β -caroteno, astaxantina y canthaxantina como los carotenoides principales en la *Chlorella* (Gouveia, et al., 1996).

2.1.3 Lípidos

La *Chlorella* contiene una cantidad significativa de lípidos, hasta un 40% de su masa seca (Harwood, 2006). Estos se hallan principalmente en la membrana celular, la pared celular y en las membranas tilacoidales (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018). Los lípidos de las microalgas muestran similitudes con aquellos de las plantas superiores en cuanto a sus distribuciones y abundancias relativas (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018). Por lo general, microalgas verdes como la *Chlorella vulgaris* se clasifican según sus distribuciones lipídicas de acuerdo con sus condiciones de origen, ya sean de agua salada o dulce. El fitoplancton de agua dulce suele tener mayores concentraciones de fosfatidilcolinas en comparación con los aislados de agua salada, que contienen más betaínas (Stephenson, Dennis, Howe, Scott, & Smith, 2010).

Los lípidos hallados en las células de *Chlorella vulgaris* suelen categorizarse según su estructura. Para poder demostrar sus propiedades estructurales, los lípidos dependen de una composición química específica. Estos suelen poseer secciones polares y apolares, comúnmente llamados “cabezas” polares y “colas” apolares o alifáticas, las cuales suelen estar unidos por “cuellos” de glicerol. Estas colas alifáticas son conformadas por ácidos grasos, mayoritariamente linoleico, palmítico y α -linolénico. El principal carácter diferenciador de los lípidos encontrados en células entonces es la naturaleza de las cabezas polares.

Los fosfolípidos son aquellos que tienen un grupo fosfato enlazado al glicerol. Por lo general suelen encontrarse en las membranas externas de las células (Fosfatidilcolina,

fosfatidíletanolaminas, fosfatidílglicerol). La *Chlorella vulgaris*, al ser una microalga de agua dulce, tiene una proporción elevada de fosfatidílcólinas (casi el 10% de sus lípidos totales) (Harwood, 2006). La categoría principal de lípidos en las membranas tilacoidales son los fosfatidílgliceros. Las fosfatidíletanolaminas, un lípido comúnmente visto en los espacios extra-tilacoidales, se encuentra en concentraciones muy bajas.

Los glucolípidos, en cambio son lípidos cuyas cabezas polares incluyen azúcares en lugar de fosfatos. Este grupo incluye los galactolípidos como el Monogalactosildiacilglicéridos (MGDG) y Digalactosildiacilglicéridos (DGDG). Las microalgas de la familia *Chlorella* suelen tener una proporción de MGDG: DGDG (lípidos de la familia de los glucolípidos) de 0.7/1.

Los glicéridos son algunas de las estructuras más interesantes en términos lipídicos, gracias a sus aplicaciones industriales. Estos lípidos se caracterizan por ser simplemente cadenas de ácidos grasos enlazados a un corazón de glicerol. Estos lípidos incluyen los mono-, di- y triacilglicéridos (MAG, DAG y TAG respectivamente). Esta familia de lípidos tiene aplicaciones como precursores de biodiesel.

También existen estructuras azufradas, llamadas sulfolípidos. El azufre en estas estructuras también actúa como cabeza polar, permitiendo la formación espontánea de bicapas lipídicas (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018). Las células también presentan una categoría particular de lípidos en la envoltura externa de las membranas llamadas esfingolípidos. Estos lípidos se caracterizan por solo tener una cadena alifática y una cabeza polar que contiene esfingosina. Estos lípidos suelen participar en la señalización celular.

Las cantidades de estas categorías de lípidos son similares a aquellas halladas en los cloroplastos de las plantas. Ilustraciones de ejemplares de estas familias de lípidos pueden ser observados en la **Figura 3** (Harwood, 2006).

2.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la medición de la relación masa/carga (m/z) de una especie cargada. Todo espectrómetro de masas consta de tres componentes principales: Fuente de ionización, analizador de masas, sistema de detección de iones (El-Aneed, Cohen, & Banoub, 2009). En la fuente de ionización las moléculas son convertidas a iones en fase gaseosa, las cuales pueden ser afectadas por campos magnéticos. El analizador de masas es el encargado de separar a los iones generados en la fuente de ionización según su relación m/z (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017). Los iones separados son detectados y catalogados por el detector de iones, el cual registra la relación m/z y las abundancias relativas o absolutas de cada ion (Singhal, Kumar, Kanaujia, & Viridi, 2015).

MALDI-TOF-MS es una abreviación de Espectrometría de Masas de Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz con un detector de Tiempo de Vuelo por sus siglas en ingles (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) (El-Aneed, Cohen, & Banoub, 2009). En la técnica MALDI los analitos se mezclan con una matriz, que es típicamente un compuesto orgánico capaz de absorber fotones en la longitud de onda del láser. Los procesos de adquisición de carga por parte del analito son variados (e.g., protonación, cationización, transferencia o captura de electrones) y dependen de las propiedades fisicoquímicas de matriz. (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017).

El analizador de masa de tiempo de vuelo TOF se basa en la ley de la conservación de la energía. Sencillamente, todos los iones que se forman en la fuente de ionización se someten a una diferencia de potencial (V) de tal forma que la energía eléctrica adquirida por los iones se convierte en energía cinética. Aunque todos los iones tienen la misma energía cinética, sus velocidades son diferentes porque dependen de la masa del ion. Bajo estas condiciones, los iones de masas bajas tienen velocidades mayores que los iones de masas altas, y por consiguiente tienen un menor tiempo de vuelo en el área libre de campo del analizador TOF (Murphy, 2011; Hosseini, 2017).

2.2.1 Matrices MALDI

Las matrices MALDI son por lo general compuestos de bajo peso molecular con grupos cromóforos que les confieren absorptividades molares altas en la región del espectro donde emite el láser (IR, UV) y funcionalidades ácidas o básicas, dependiendo del modo mediante el cual transfieran/tomen carga del analito (Castellanos-García L. , et al., 2017). Algunas de las matrices más comúnmente utilizadas en MALDI son ácidos orgánicos como el dihidroxibenzóico (DHB), hidroxicinámico (CHCA), nicotínico, y ferúlico capaces de transferir protones (protonar) o cationes (cationizar) analitos como péptidos, proteínas, ácidos grasos y azúcares, entre otros (Zenobi & Knochenmuss, 1998). También existen matrices altamente básicas que pueden deprotonar analitos ácidos como del diaminonaftaleno (DAN) o el dimetilamino naftaleno (DMAN) (Hosseini & Martinez-Chapa, 2017; Lu, Lee, Lee, & Ni, 2015). Las matrices de transferencia electrónica, por otra parte, son compuestos de potenciales de ionización altos (8-9 eV) que se fotoionizan formando un catión radical (ion primario) que puede abstraer un electrón de una molécula del analito neutro (con potencial de ionización menor que el de la matriz) para

formar un catión radical del analito o ion secundario (Ramírez-Pradilla, Blanco-Tirado, & Combariza, 2019). Debido a la gran aplicabilidad de la técnica MALDI constantemente se realizan estudios para desarrollar nuevas matrices MALDI con el fin de adaptar la técnica a grupos de analitos nuevos o más específicos (El-Aneed, Cohen, & Banoub, 2009).

Los diversos mecanismos de adquisición de carga por parte del analito en el proceso MALDI hacen que esta herramienta sea muy selectiva a la hora de analizar muestras complejas, ya que el uso de una matriz en particular puede afectar particularmente a una categoría de analitos. Tradicionalmente, la técnica MALDI de transferencia electrónica es utilizada para el análisis de pigmentos, complejos organometálicos, nanomateriales y polímeros, mientras que la transferencia catiónica y protónica facilita la determinación de lípidos y proteínas.

3. Antecedentes

Desde que fue descubierto, el plancton ha sido de gran interés para la comunidad científica, gracias a su facilidad y velocidad de crecimiento, factores que promueven sus aplicaciones científicas y tecnológicas (Nickelsen, 2017). Se han reportado en la literatura varios estudios de análisis lipídicos utilizando GC acoplado a MS de diversos microorganismos fitoplanctónicos como en el trabajo de (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018), donde se reporta la composición lipídica en cultivos de *Chlorella vulgaris* utilizando técnicas de extracción con solventes como hexano y metanol. También se ha reportado el análisis de pigmentos en microorganismos, aunque no necesariamente microalgas, utilizando MALDI-MS (Buskirk, et al., 2011). En este estudio, se utilizó MALDI para hallar los pigmentos en especies micóticas y se discutieron algunos inconvenientes encontrados al analizar células con capas externas fotoprotectoras. MALDI se ha

utilizado ventajosamente para el estudio de microorganismos en métodos como el *Biotyping* en donde se utilizan señales características de proteínas ribosomales para identificar organismos (Murugaiyan, 2012).

Existe un gran número de estudios realizados acerca de la composición del medio de cultivo ideal para el crecimiento de microorganismos, en particular de la *Chlorella vulgaris* (Wong, 2017; Stephenson, 2010; Ren X. C., 2016; Ren X. D., 2019). En el trabajo realizado por Wong, et al. se realizó un estudio comparativo de diferentes medios de cultivo y condiciones para diferentes fines. Ese estudio midió el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en 13 medios diferentes, incluyendo el medio Basal de Bold, el medio de Johnson, el medio M-8 y el medio de Fogg bajo condiciones atmosféricas e iluminación artificial blanca constante (Wong, 2017). Debido a la popularidad y aplicabilidad de este microorganismo para el estudio y la industria, no es una gran sorpresa que este tipo de estudios sean comunes. El consenso general hallado en estos estudios suele encontrarse a favor del medio Basal de Bold como medio de cultivo para las *Chlorellas*.

Por otra parte, existen pocos reportes relacionados con el uso de la técnica MALDI MS para investigar cambios composicionales durante el crecimiento de microalgas, particularmente metabolitos de bajo peso molecular en células intactas. Típicamente, los análisis metabolómicos de cultivos de microorganismos mediante la técnica MALDI se realizan en extractos de pigmentos, lípidos, proteínas, etc. En 2015 Andrade et al. reportaron el uso de varias mezclas de matrices (CA, DHB, HCCA y sDHB) y solventes (THF, ACN, isoProp) para el análisis de microalgas liofilizadas, entre ellas *C. vulgaris*, mediante MALDI-MS. Los autores enfocaron el análisis MS a la detección de proteínas exclusivamente (Andrade, 2015). En la misma línea, el análisis MALDI-MS ha sido utilizado como herramienta de identificación taxonómica (Biotyping) de

microorganismos completos, entre ellos *C. vulgaris* (Murugaiyan, 2012). Más recientemente, la técnica MALDI MS fue utilizada para el análisis de oligosacáridos (N-glicanos) en *C vulgaris* usando DHB como matriz (Mócsai, 2019). Adicionalmente una exploración más profunda de la variabilidad de N-glicanos en *C vulgaris* usando MALDI-TOF se reportó en 2020 (Mócsai R. F., 2020).

4. Metodología

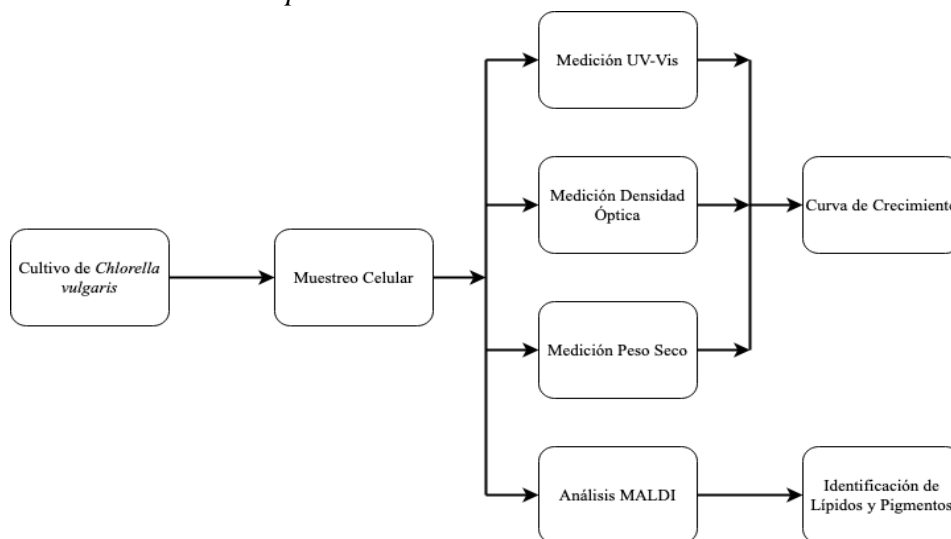
Etapa 1.

Análisis de la composición pigmentaria y lipídica durante las etapas de crecimiento de células intactas de *Chlorella vulgaris* en medio BBM modificado, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

En esta etapa se realizaron las actividades descritas en la Figura 4

Figura 4.

Actividades asociadas con la Etapa 1.



Para el establecimiento del cultivo de *C. vulgaris* se utilizó el medio Basal de Bold modificado (BBM) con la siguiente composición: 175 mg/L KH_2PO_4 , 25 mg/L CaCl_2 , 75 mg/L MgSO_4 , 250 mg/L NaNO_3 , 75 mg/L K_2HPO_4 , 25 mg/L NaCl y 11.42 mg/L H_3BO_3 . A estos nutrientes se les adicionó 1 mL de solución de micronutrientes (8.82 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.20 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8.7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 1.57 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.41 g/L CoCl_2), 1 mL de solución ácida (4.98 g/L FeSO_4 , 1 mL/L H_2SO_4) y 3.2 mL de solución alcalina (50 g/L $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, 31 g/L KOH) antes de ser llevados a 1000 mL (Stephenson, 2010; Wong, 2017).

El crecimiento del microorganismo se realizó por un periodo de 45 días para asegurar que las células alcancen todos los estados de desarrollo. Los muestreos se realizaron cada 5 días por triplicado, para reducir la incertidumbre de las mediciones. Se utilizó un tipo de cultivo continuo con muestras por descarte, incubado bajo condiciones controladas de temperatura (30°C), pH (pH=9-10) y ciclos de luz/oscuridad. Los cultivos se realizaron en treinta biorreactores de 250 mL con un volumen de medio basal de Bold de 50 mL en cada uno. Para cada cultivo se agregaron $1.2 \cdot 10^8$ células/mL como se ha reportado en estudios previos (Wong, 2017). Los Erlenmeyer inoculados se incubaron con luz incidente emitida por bombillos fluorescentes de características específicas (5 kLux) (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017). La luz se utilizó para simular fases oscuras e iluminadas, condiciones necesarias para la fotosíntesis. Los cultivos se sometieron a ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El montaje utilizado se muestra en la Figura 5.

Las variables de respuesta del crecimiento celular fueron: recuento celular con cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico; densidad óptica por medio de espectroscopía UV-Vis a 682 nm (Šebela, Jahodářová, Raus, Lenobel, & Hašler, 2018, Tekiner, Kurt, Ak, & Kurt, 2018,

Schlüter, Møhlenberg, Havskum, & Larsen, 2000); y determinación de peso seco llevando la muestra a un horno a 60°C durante 22 horas hasta peso constante (Jeon, Cho, & Yun, 2005).

Figura 5.

Montaje utilizado para el crecimiento de C. vulgaris.



Los muestreos se hicieron en una cabina esterilizada con luz UV. Cada cinco días tres Erlenmeyer fueron seleccionados aleatoriamente del conjunto de 30 preparado inicialmente. Alícuotas de 200 μL de cada Erlenmeyer fueron colocadas por triplicado sobre gradillas de 96 pozos para análisis por espectroscopia UV-Vis. La longitud de onda seleccionada (682 nm) corresponde a la máxima absorción de clorofilas. Una vez determinada la absorción de las muestras, se tomaron alícuotas de 10 μL de cada Erlenmeyer para realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer. Tras realizar el conteo celular, se llevó a cabo el procedimiento de determinación de peso seco de la muestra. Para este procedimiento se utilizaron cajas de Petri

previamente secadas en horno. Alícuotas de 10 mL de medio de cultivo se centrifugaron a 4°C/8000 rpm durante 15 minutos. El pellet resultante luego fue lavado y resuspendido en solución salina, antes de ser introducido en las cajas de Petri y llevado al horno a 60°C durante 22 horas. Estas cajas secadas fueron pesadas nuevamente para determinar el peso seco de la muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso Seco (g/mL)} = \frac{(W_f - W_r)}{V_m}$$

Donde:

- W_f : Peso final de la muestra con el recipiente. (g)
- W_r : Peso del recipiente vacío. (g)
- V_m : Volumen medido de muestra. (mL)

Finalmente, durante la extracción de las alícuotas para determinar el peso seco por volumen, también se extrajeron alícuotas de 15 mL que se congelaron a -20 °C para su posterior análisis por MALDI.

Los análisis por MALDI MS se realizaron en un equipo Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm) Smart Beam con frecuencia de 1 kHz. Los espectros de masas se adquirieron en modo reflectron polaridad positiva en el rango de m/z 100 a 1500 usando voltaje de aceleración de 25 kV, con extracción pulsada de iones (PIE) de 100 ns. El equipo se calibró utilizando clusters de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y una serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

La preparación de la muestra se realizó con soluciones de las matrices (DCTB -clorofilas- y DHB -carotenos y lípidos) 20 mg/mL en ACN:H₂O. Se prepararon soluciones de células de *C vulgaris* (1 mg de muestra seca en 1 mL de H₂O tipo I) que se mezclaron con las matrices para obtener relaciones analito:matriz (A:M) de 1:1, 1:2, y 1:3, respectivamente. Las muestras se prepararon usando el método de dried droplet mezclando 1 µL del analito con un volumen de la matriz (en cada una de las tres relaciones estudiadas) y se agitaron en un vórtex por 2 min a 1500 rpm. Se aplicaron tres spots de cada muestra, para cada una de las relaciones A:M. Cada espectro compuesto corresponde a 3000 espectros, tomados en 6 adquisiciones de 500 disparos cada una. Los análisis de los espectros, calibración, integración, selección de señales, cálculos de S/N, y resolución, se realizaron utilizando el software Data Analysis (Bruker Daltonics, Billerica, MA)

Etapa 2.

Identificación de las variaciones composicionales de pigmentos y lípidos de *Chlorella vulgaris* a lo largo de la curva de crecimiento.

En esta etapa se seleccionaron, a partir de los resultados composicionales de la etapa anterior, las familias de compuestos observadas en los espectros de masas a saber: pigmentos fotoprotectores (carotenoides), pigmentos fotosintéticos (clorofilas y sus derivados) y lípidos (Triacilgliceroles). Se realizó un análisis de abundancias relativas de las familias de compuestos para cada punto de muestreo de la curva de crecimiento del microorganismo. Finalmente, se comparan las variaciones entre las abundancias relativas de familias de compuestos observadas durante todo el proceso de desarrollo de la *C vulgaris*.

5. Resultados y Discusión

5.1. Establecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris*

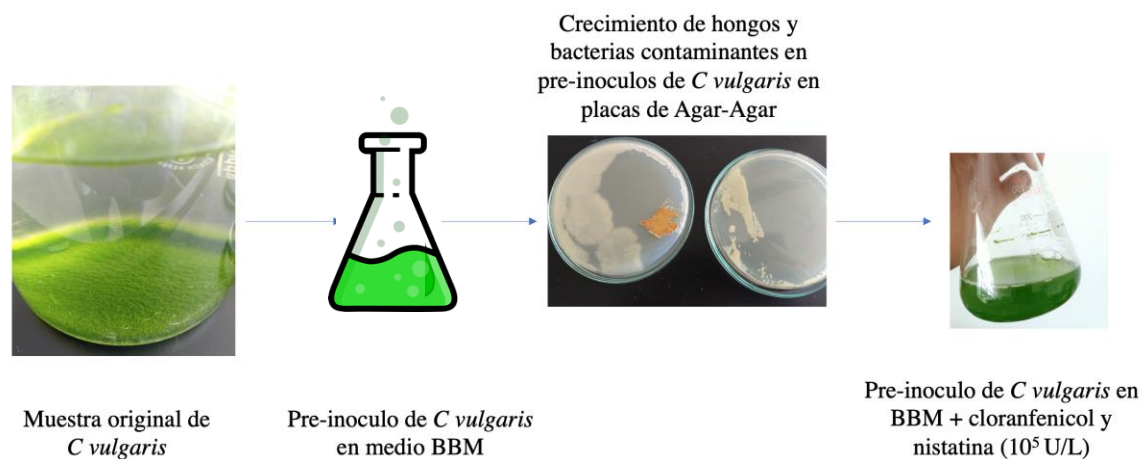
El cultivo de *C. vulgaris* se estableció utilizando muestras de un cultivo del microorganismo existente en el laboratorio. Con el fin de generar una carga celular adecuada para realizar la curva de crecimiento, es necesario como primer paso preparar pre-inóculos derivados del cultivo existente. Se extrajeron alícuotas de 5 mL del cultivo original que se transfirieron a cuatro Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de BBM. Estas mezclas se dejaron crecer durante 10 días bajo condiciones de luz controlada (12h luz/12h oscuridad). Para asegurar el crecimiento adecuado de *C vulgaris* es necesario además verificar la ausencia de microorganismos en el pre-inóculo, que puedan afectar el desarrollo, tales como hongos y bacterias. Por esta razón en el día 8 del experimento se realizaron pruebas de contaminación. Pequeños volúmenes (10-50 μ L) del cultivo fueron sembrados sobre placas de Agar-Agar en cajas de Petri. Estas pruebas fueron almacenadas bajo las mismas condiciones de temperatura que los cultivos de *C. vulgaris*. Una examinación ocular fue suficiente para comprobar la presencia de contaminantes -hongos y bacterias- en el cultivo después de tres días de incubación (Figura 5).

Para eliminar los microorganismos no deseados, alícuotas de 5 mL de los cultivos fueron extraídas y sembradas nuevamente en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de crecimiento aditivado con cloranfenicol (antibiótico) y nistatina (antimicótico) en concentraciones de 10^5 U/L (Unidades Internacionales/Litro). Estos nuevos cultivos fueron crecidos nuevamente durante un periodo de 10 días bajo condiciones lumínicas controladas. Una vez concluido este periodo, se

realizó nuevamente la purificación de estos cultivos repitiendo el tratamiento con antibiótico y antimicótico.

Figura 6.

Pasos iniciales para la preparación del pre-inóculo de C. vulgaris a partir de un cultivo existente.



Al terminar esta etapa inicial de crecimiento, se realizaron nuevamente pruebas en Agar-Agar para determinar la presencia de microorganismos contaminantes que resultaron negativas. El único crecimiento visible correspondía a microalgas, tal y como se comprobó por observación bajo microscopio óptico. A partir de los pre-inóculos purificados, se extrajeron nuevamente alícuotas de 5 mL que se depositaron en seis Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de BBM. Estas muestras se utilizaron como inóculo final para la fase experimental. Finalmente, los cultivos de trabajo que se utilizaron para construir la curva de crecimiento y realizar los análisis composicionales de *C. vulgaris*, fueron establecidos usando alícuotas de 10 mL de los pre-inóculos purificados que se depositaron en 30 Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de BBM.

En simultaneidad con los procesos de purificación, se realizaron también estudios de condiciones de crecimiento, particularmente para determinar el efecto de agitación sobre los cultivos de *C. vulgaris*. Una serie de cuatro Erlenmeyer con cultivos en progreso fueron colocados en una incubadora sin agitación bajo las condiciones de luz mencionadas anteriormente. La misma cantidad de Erlenmeyer con cultivos en progreso fueron colocados bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura, bajo agitación de 200 rpm. Después de 10 días de crecimiento, las dos condiciones de crecimiento fueron comparadas por medio de análisis ocular. Los Erlenmeyer crecidos sometidos a agitación fueron simultáneamente más verdes y mostraron menor variabilidad entre ellos, mientras que los Erlenmeyer sin agitación presentaban variaciones notables de color. Basándonos en estos criterios, se decidió realizar la curva de crecimiento bajo condiciones de agitación. Recientemente, Isiya et al. y Pedruzi et al. reportaron que la agitación del cultivo incrementa la producción de biomasa de *C vulgaris* porque contribuye a mantener las células suspendidas, a una distribución uniforme de nutrientes, y a un intercambio eficiente de gases (CO_2 y O_2); todos estos factores estimulan la actividad fotosintética de la microalga (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017; Wong, 2017).

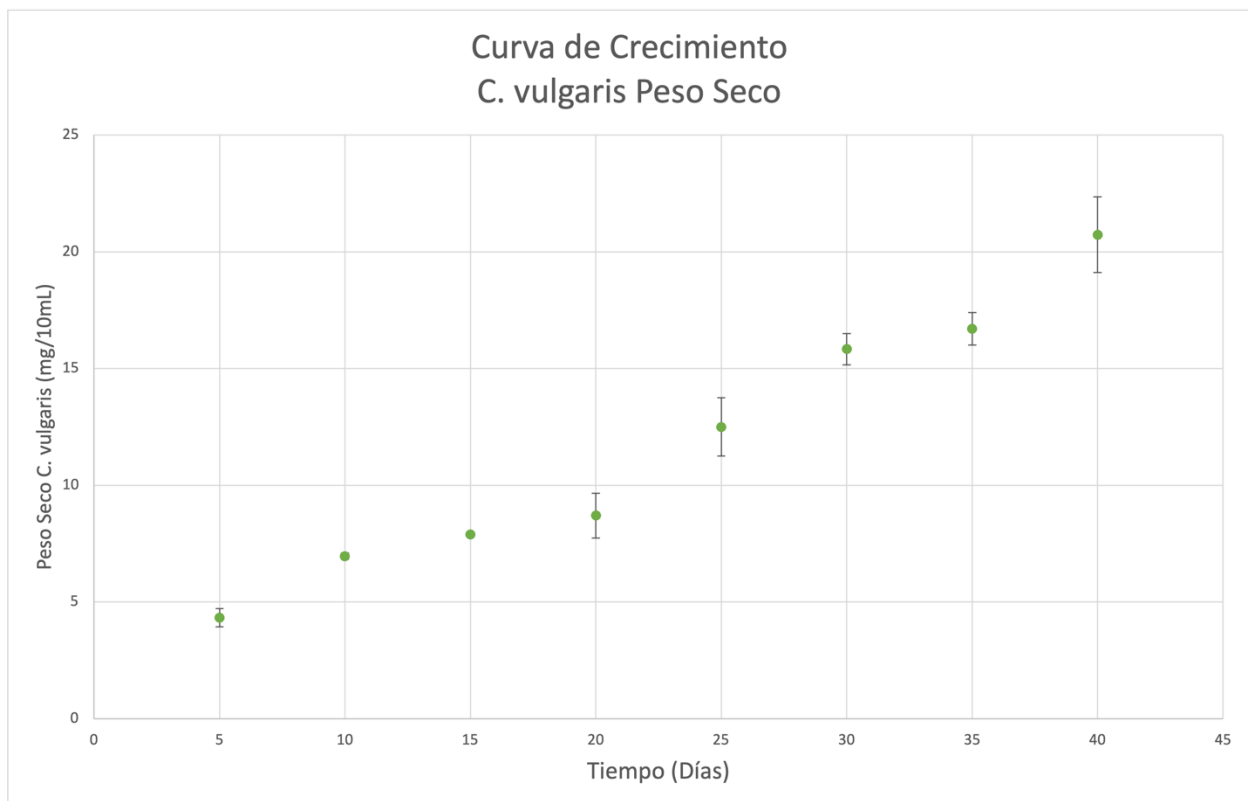
5.2. Curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris*

El seguimiento del proceso de crecimiento de *C. vulgaris* se realizó utilizando datos de conteo celular, densidad óptica y peso seco de las células en un volumen fijo del cultivo (Andrade, 2015). Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. El cálculo de número de células por unidad de volumen se realizó como el promedio de conteos en 5 de los cuadrantes pequeños de la cámara de Neubauer. La densidad óptica de las muestras se

correlaciona con la absorción en la región visible, 682 nm característica de las clorofilas, de una alícuota (200 μ L) del cultivo. La medición de peso se basó en reportes previos de la literatura. (Jay, Kawaroe, & Effendi, 2018; Stephenson, Dennis, Howe, Scott, & Smith, 2010) Alícuotas de 10 mL de los cultivos se depositaron en tubos Falcon y se centrifugaron a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el pellet resuspendido en 2 mL de solución salina y depositado en una caja de Petri que fue puesta en un horno a 60°C durante 22 horas (hasta peso constante).

Figura 7.

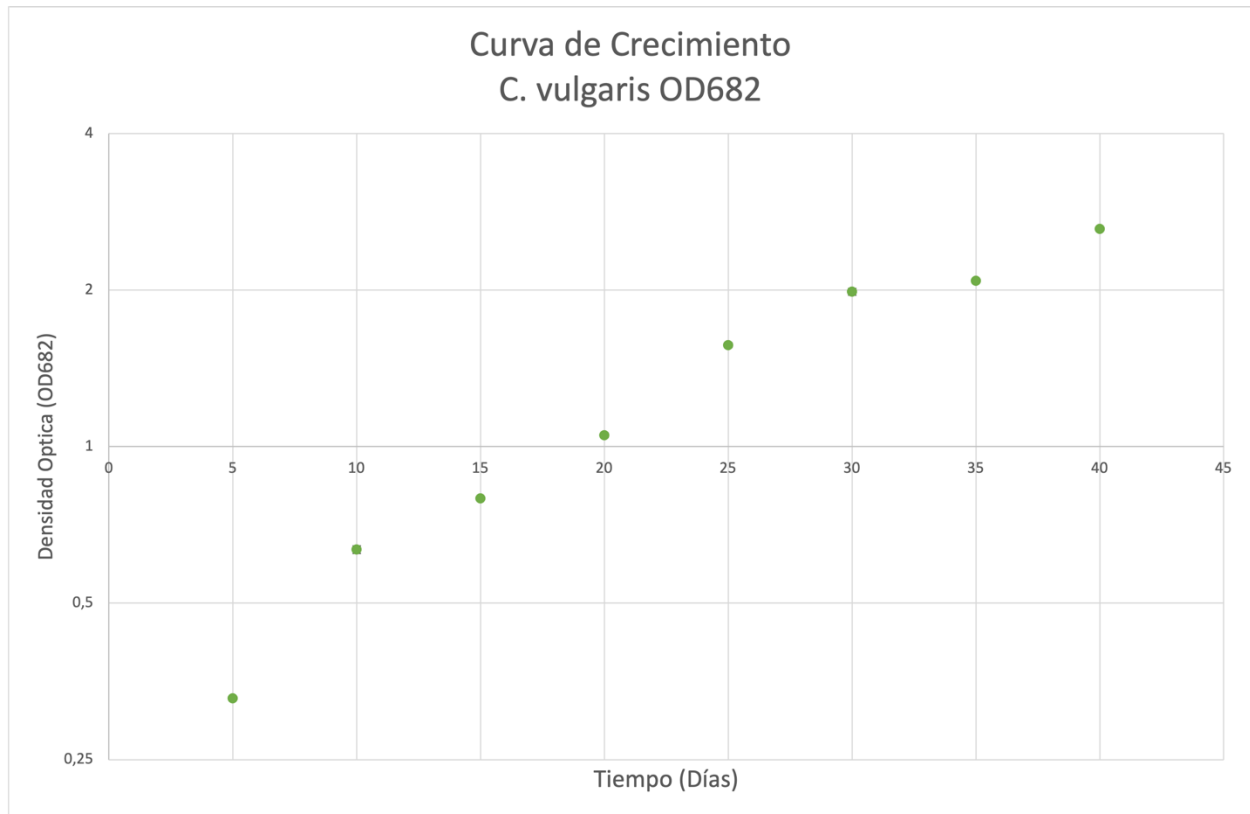
Gráfica de curva de crecimiento de C. vulgaris basada en peso seco



En la Figura 7 se observa la curva de crecimiento de *C. vulgaris* en la que se relacionan el peso seco de las microalgas (mg/10 mL) versus la duración del cultivo (40 días). Los muestreos de biomasa y densidad óptica se realizaron cada cinco días, tal y como se describe en la sección experimental. La curva de crecimiento de un microorganismo típicamente presenta cuatro fases: latencia (adaptación), crecimiento (exponencial), estabilización (estacionaria) y muerte. La curva de la Figura 7 no presenta fase definida de latencia, posiblemente porque el microorganismo fue previamente adaptado al medio (BBM) en la etapa de producción del inóculo. Por otra parte, en la curva se observa un incremento casi constante de la cantidad de biomasa en el cultivo, iniciando en 480 mg/L en el día 5 hasta un promedio de 2100 mg/L en el día 40. Este comportamiento es típico de la fase exponencial que se caracteriza por crecimiento a velocidad constante y el tiempo de generación (tiempo necesario para realizar una división celular) más corto de todo el proceso de desarrollo del microorganismo. Inicialmente, se considero que la ligera disminución en biomasa alrededor del día 15 correspondía al inicio de la fase estacionaria, pues la literatura menciona que la fase exponencial de los cultivos de *C. vulgaris* suele darse hasta el día 14, aproximadamente. Sin embargo, en los muestreos correspondientes a los días 20 y 25 se observa que la fase exponencial continúa. La curva de crecimiento construida con base a la densidad óptica (Figura 8) corrobora el comportamiento observado en la curva de peso seco (Figura 7).

Figura 8.

Gráfica de curva de crecimiento de *C. vulgaris* basada en Densidad Óptica a 682nm



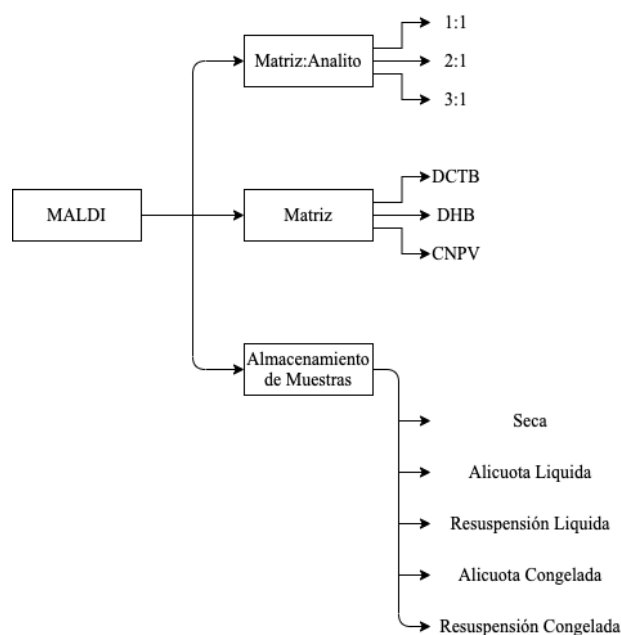
En ninguna de las dos curvas de crecimiento de *C vulgaris* se observa la fase de estabilización, que se caracteriza por ausencia de crecimiento debida a la falta de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos en el medio de crecimiento. La ausencia de esa etapa en la curva de *C vulgaris* en este trabajo indica que probablemente el medio de crecimiento todavía contenía, al día 40, los suficientes nutrientes como para sostener el desarrollo del microorganismo. Al tener exceso de nutrientes limitantes, como por ejemplo el nitrógeno, los medios son capaces de soportar mayores cargas celulares, lo cual lleva a una fase exponencial de mayor duración.

5.3. Análisis de células intactas de *C. vulgaris* mediante MALDI-TOF MS

El protocolo de análisis MALDI MS de las células intactas de *C. vulgaris* requirió inicialmente establecer las condiciones de preparación de muestra que permitieran obtener los mejores descriptores analíticos: S/N y resolución para los analitos de interés. La Figura 7 muestra las variables que se consideraron en esta primera etapa del análisis.

Figura 9.

*Variables consideradas en el protocolo de preparación de muestras de *C. vulgaris* para el análisis MALDI MS.*



Las condiciones de almacenamiento de las muestras pueden influir en el aspecto del espectro de masas. Por esta razón y para evitar errores por manipulación, las muestras (desde el día 0 hasta el día 45 de la curva de crecimiento) se almacenaron de cinco formas y se analizaron todas en conjunto. Los tipos de muestras almacenadas fueron: Muestra seca (recuperada de las cajas de Petri que se usaron para determinar el peso seco) resuspendida en agua a una

concentración de 1 mg/mL; alícuotas extraídas del cultivo guardado en nevera; pellet resuspendido en agua a partir de alícuotas extraídas del cultivo guardado en nevera; alícuotas extraídas del cultivo guardado en congelador; pellet resuspendido en agua a partir de alícuotas extraídas del cultivo guardado en congelador.

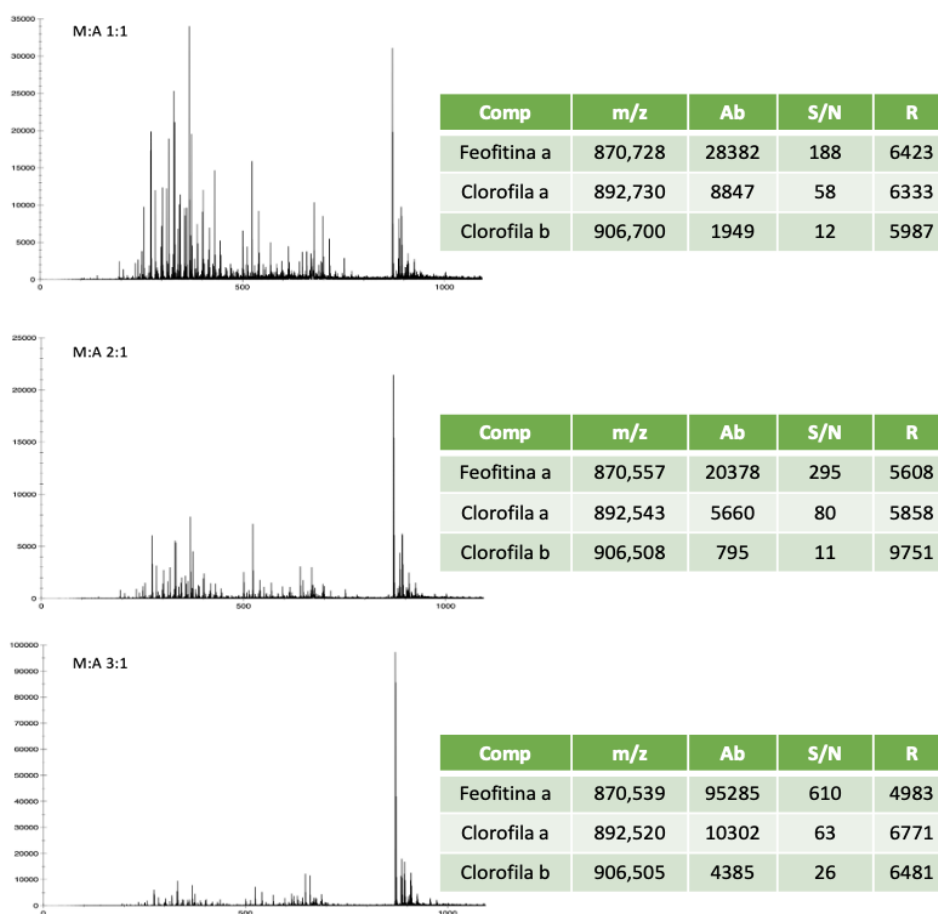
El asilamiento de las microalgas secas en las cajas de Petri, por raspado, fue altamente ineficiente, mientras que las muestras tomadas del cultivo almacenado en la nevera probablemente no representaban al estado de crecimiento correspondiente al día de la toma de muestra porque las microalgas en la solución pueden continuar sus procesos metabólicos a pesar de estar en la nevera. Por esta razón se prefirió utilizar las muestras congeladas. El procedimiento de resuspensión de las muestras después de ser centrifugadas fue establecido para asegurar que las concentraciones trabajadas para todos los análisis fueran iguales. Al tener la medida de peso seco disponible en un volumen fijo, fue posible adicionar la cantidad de solvente necesario para mantener una concentración constante entre las diferentes muestras.

Para los análisis MALDI se consideraron los efectos del tipo de matriz y de la relación Matriz:Analito. Las matrices seleccionadas fueron: DHB, DCTB y α -CNPV. La selección de la matriz se hizo con base en reportes bibliográficos (DHB) y experiencias anteriores en nuestro grupo de investigación (DCTB, α -CNPV). Se consideraron relaciones M:A de 1/1, 2/1 y 3/1, debido a la naturaleza de los analitos que buscábamos trabajar. Las concentraciones de la matriz fueron 20 mg/mL para DHB, DCTB y α -CNPV. En la relación M:A, A corresponde a la concentración de células en la muestra y no a la concentración de los analitos (pigmentos y lípidos). Como ha sido establecido en la literatura (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014), las células de *C. vulgaris* contienen entre 2-5% de pigmentos en peso seco. Los lípidos pueden

variar de forma significativa, entre el 4 y el 40% del peso seco, así que los valores trabajados fueron establecidos con base en las masas esperadas de los pigmentos. Al resuspender las muestras para el análisis, se estableció una concentración estándar para todas las muestras. Las concentraciones de células de *C. vulgaris* empleadas para todos los análisis fueron de 1 mg/mL. Con estas consideraciones, la proporción real M/A en los experimentos es de aproximadamente 1000/1.

Figura 10.

Efecto de la relación M:A en el análisis MALDI de células intactas de C. vulgaris.

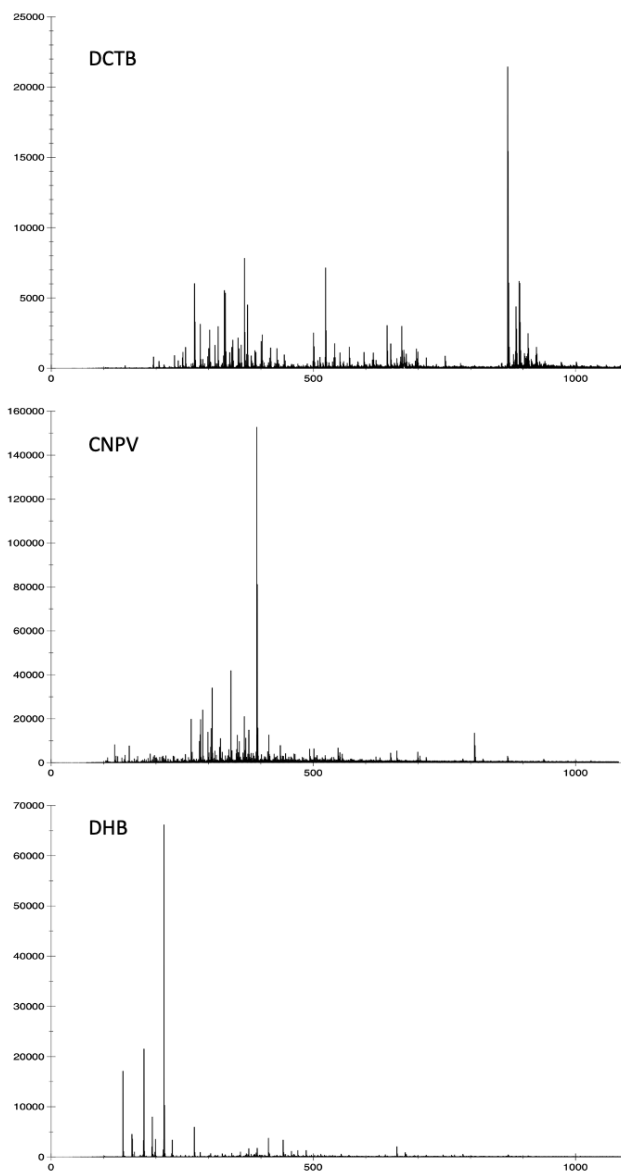


En las pruebas preliminares se utilizaron la relación S/N y la resolución de un grupo representativo de pigmentos (clorofilas y sus derivados) como observables para determinar el desempeño de las condiciones de preparación de muestra anteriormente descritas. En la Figura 10 se observa el efecto de la relación M:A en el análisis MALDI de células intactas de *C. vulgaris* provenientes de una muestra congelada. A partir de los resultados de la Figura 10 se seleccionó la relación M:A 2:1, la cual demuestra mejor desempeño combinado de los descriptores S/N y R. Este mismo análisis preliminar se repitió para las diferentes formas de almacenamiento de las muestras, los espectros correspondientes a la muestra centrifugada y resuspendida presentaron los mejores descriptores analíticos (R, S/N). Por esta razón, las muestras congeladas se utilizaron para realizar los análisis composicionales por MALDI.

Finalmente, se consideraron tres matrices para los análisis MALDI: DCTB y α -CNPV (clorofilas) y DHB (lípidos y carotenoides). Los ensayos preliminares se hicieron con muestras de los primeros días de crecimiento de *C vulgaris* (Figura 11); por esta razón la proporción de lípidos y carotenoides observados fue relativamente baja, esto era de esperarse, ya que los carotenos suelen ser compuestos que presentan mayores concentraciones a medida que la población de células envejece. Los resultados con DCTB fueron satisfactorios, mostrando señales de la familia de las clorofilas de alta abundancia en el rango esperado. En la Figura 11, por ejemplo, se observa una señal en m/z 870,5 asociada con la Feofitina a, un derivado de la clorofila. El α -CNPV mostró un desempeño pobre para el análisis de clorofilas. Por lo tanto, se escogieron el DHB y el DCTB como matrices de trabajo para las pruebas MALDI.

Figura 11.

Efecto de la matriz en el análisis MALDI de células intactas de C. vulgaris.

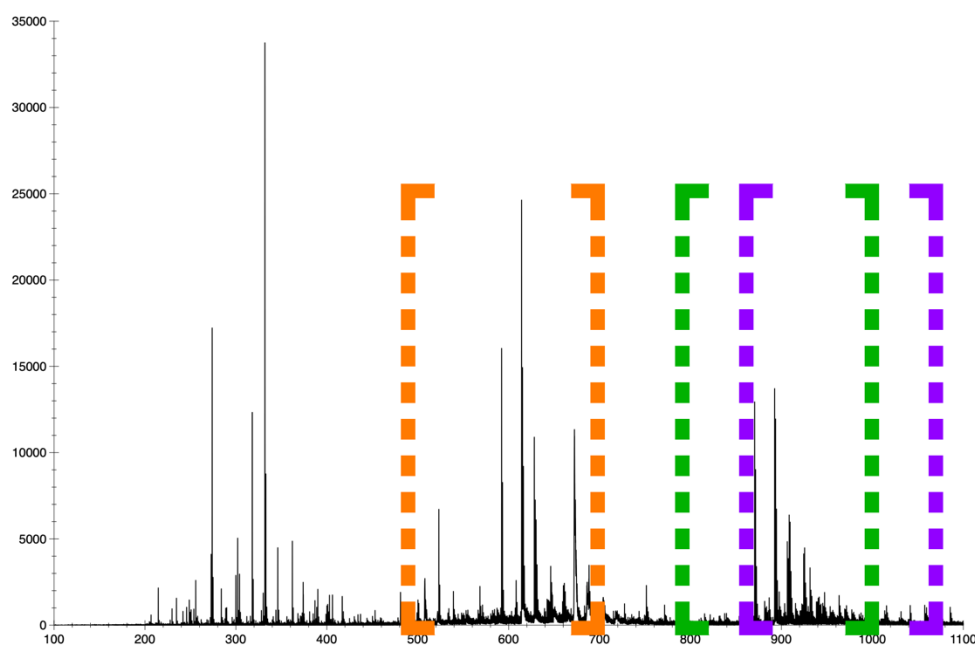


La revisión bibliográfica señala que los metabolitos de bajo peso molecular esperados en las microalgas incluyen pigmentos (carotenos y clorofilas) y triacilglicéridos (TAGs). La Figura 12 muestra un espectro teórico dónde se indican las regiones en las que se observan las señales

características de los carotenoides (región naranja), las clorofilas (región verde) y los TAGs (región violeta). De esta manera, se construyeron bases de datos composicionales con la información correspondiente a familias de compuestos de interés (clorofilas, carotenoides, xantofilas y TAGs) que contenían: masas monoisotópicas, masas de las moléculas protonadas y de sus aductos de sodio y potasio.

Figura 12.

Rangos esperados de señales MALDI. (Naranja: Carotenoides, Verde: Clorofilas, Violeta: TAGs)

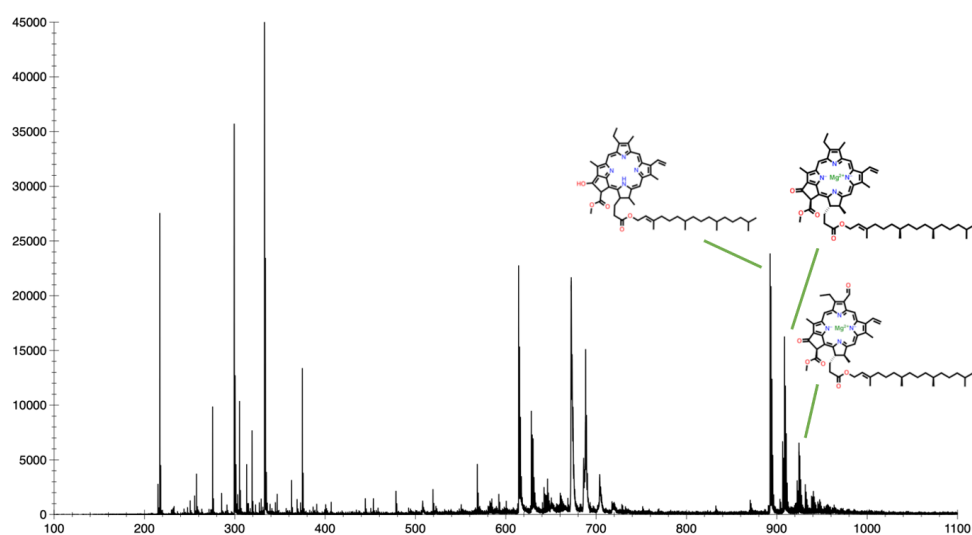


Comparando los valores m/z observados en los espectros MALDI con los valores de masas isotópicas de las bases de datos, se identificaron señales correspondientes a pigmentos (carotenoides y clorofilas) en las muestras. Por ejemplo, las señales entre m/z 500 y 700 en los espectros con matriz DHB corresponden a carotenos y xantofilas, mientras que señales en los rangos de m/z 800-900 con matriz DCTB corresponden a las clorofilas y sus derivados.

Curiosamente, las señales esperadas para TAGs en los rangos superiores a m/z 900 en DHB, no fueron observadas. La ausencia de TAGs en los espectros de DHB fue un resultado inesperado, ya que estudios previos en el grupo de investigación han logrado observar estos compuestos en mezclas de lípidos utilizando la misma matriz. Sin embargo, existe una diferencia fundamental entre este estudio y los anteriores: los análisis que lograron determinar TAGs en muestras de *C. vulgaris* involucran una extracción previa de lípidos utilizando solventes. Ya que este estudio involucra células intactas, es de esperarse que los espectros sean diferentes. En este caso, se sospecha que los pigmentos presentes en las células intactas de *C. vulgaris* causan supresión de las señales de TAGs. La razón mas probable para este fenómeno se asocia posiblemente con una mayor eficiencia de ionización para los carotenos que para los TAGs. Una vez determinadas las señales de interés en los espectros, se inició la fase asociada con el análisis de la evolución de los pigmentos en las muestras.

Figura 13.

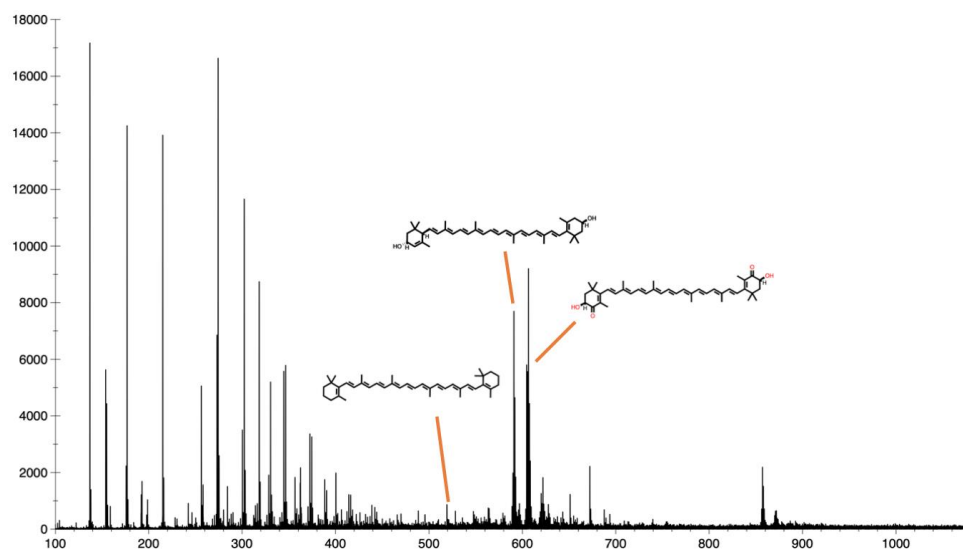
Señales de interés en el espectro MALDI de C. vulgaris (15 días) usando DCTB como matriz



La Figura 13 muestra el espectro de masas correspondiente a la muestra del día 15 del cultivo de *C. vulgaris* utilizando la matriz DCTB. Algunos picos de interés están resaltados en el espectro, como los correspondientes a Clorofilas a, b y Feofitina a, en la Figura 13 también se encuentran sus estructuras. Las señales de las clorofilas y sus derivados se detectan principalmente como cationes radicales en el espectro MALDI debido a que el DCTB actúa como una matriz de transferencia electrónica (Wyatt, 2006).

Figura 14.

Señales de interés en el espectro MALDI de *C. vulgaris* (15 días) usando DHB como matriz.



La Figura 14 muestra el espectro de masas correspondiente a la muestra del día 15 del cultivo de *C. vulgaris* utilizando la matriz DHB. En este caso en el espectro de masas de células intactas de *C. vulgaris* se observan principalmente los aductos de sodio de pigmentos de tipo carotenoide y xantofila (Silva, 2016). La presencia de átomos de oxígeno en estos compuestos, con dos pares de electrones libres, posibilita la formación de estos aductos (Weesepeol, 2013). En el espectro de la Figura 14 no se observan TAGs.

En la Tabla 1, se observan las masas teóricas y experimentales de señales representativas de pigmentos (clorofilas y carotenoides) detectados en las células intactas de *C. vulgaris*. Las señales obtenidas tienen una precisión de masa inferior a 20 ppm, valor dentro de los límites esperados para un analizador de media resolución como el TOF. Cabe resaltar que la precisión en las masas de carotenoides es levemente inferior a la de las clorofilas. Esta variación se debe probablemente a errores durante la calibración de los espectros.

Tabla 1.

Cálculos de precisión en la masa de algunas señales características de C. vulgaris

Nombre de Especie	Masa Teórica	Masa Experimental	Precisión de Masa (ppm)
Feofitina A*	870,56592	870,561081	5,56
Feofitina B*	884,54519	884,539023	6,97
Clorofila A*	892,53531	892,544653	10,47
Clorofila B*	906,51458	906,5085	6,69
β -Caroteno + Na ⁺	559,4279	559,4373	16,72
Luteína + Na ⁺	591,4178	591,4266	14,94
Astaxantina + Na ⁺	619,3767	619,3859	15,60
Luteoxantina + Na ⁺	623,4076	623,40183	9,29

* Especies detectadas como cationes radicales (iones moleculares)

5.4. Cambios composicionales a lo largo de la curva de crecimiento de *C. vulgaris* mediante MALDI-TOF MS

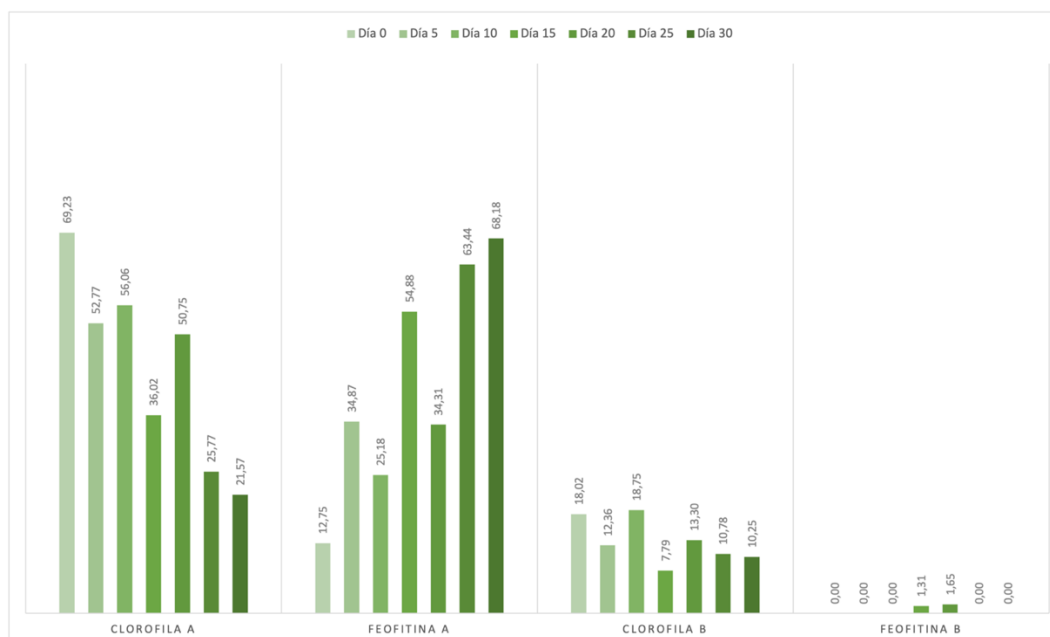
El seguimiento de las variaciones composicionales del cultivo se realizó mediante el análisis de perfiles de dos subgrupos de pigmentos (clorofilas y carotenoides) mediante la técnica

de análisis parcial de la corriente iónica (PIC, *partial ion current*). PIC se utiliza comúnmente para el análisis de perfiles metabólicos en enfermedades como del cáncer. La técnica se basa en la selección de señales de subgrupos correspondientes a familias de compuestos (relacionados estructuralmente). La normalización de las señales del subgrupo se realiza utilizando la corriente iónica parcial (entendida como la sumatoria de las abundancias de las señales del subgrupo). De esta forma es posible observar variaciones de los perfiles composicionales de la familia de compuestos seleccionada. Esta aproximación es útil cuando hay variaciones en el background de los espectros. Además, el hecho de que los análisis se realizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones y sobre la misma placa aumenta aun mas la validez de esta aproximación. Cabe resaltar que esta técnica no genera resultados cuantitativos. Sin embargo, para fines de observar cambios en perfiles de grupos de analitos, es ideal.

Para el análisis de perfiles composicionales de pigmentos, se seleccionaron dos subgrupos de señales correspondientes a carotenoides (entre m/z 500 y 700) y clorofilas (entre m/z 800 y 950) de los espectros MALDI tomados usando DHB y DCTB como matrices, respectivamente. Las PIC se utilizaron entonces para normalizar las señales de los subgrupos. Los porcentajes de abundancia relativa obtenidos de esta manera se usaron para el análisis en los perfiles pigmentarios a lo largo de la curva de crecimiento de la *C. vulgaris*. Los resultados de estos análisis se observan en las Figuras 15 y 16.

Figura 15.

Evolución del subgrupo clorofilas durante el desarrollo de C. vulgaris.



En la Figura 15, se puede observar que las clorofilas a y b son los pigmentos fotosintéticos presentes en las células de *C. vulgaris*. Estas moléculas tienen características coloraciones azul-verdosa (a) y verde brillante (b). Esta observación concuerda la literatura científica, que reporta la presencia de clorofila a y b en *C. vulgaris* en concentraciones altas de hasta 4-5% en peso seco; por esta razón, la *C. vulgaris* se conoce como el “alimento esmeralda” (Silva S. C., 2020). La Figura 15 muestra que a medida que el cultivo envejece (de cero a 30 días) las señales correspondientes a las clorofilas (a y b) tienden a disminuir. Este comportamiento es más marcado en la clorofila a que es el pigmento más abundante del subgrupo. La ruta biosintética de las clorofilas sugiere que la clorofila b se forma a partir de la clorofila a (Beale, 1999) Por otra parte, la proporción de feofitina a, un derivado de la clorofila a libre de Mg aumenta proporcionalmente a la disminución de la clorofila a en la Figura 15. La feofitina hace parte del fotosistema II (PSII) en los cloroplastos y su función es servir como primer transportador de electrones en el proceso de fotosíntesis, pues es capaz de fotoreducirse

(Hou, 2014). Curiosamente, la cantidad de feofitina es directamente proporcional al número de centros de reacción PSII en el organismo fotosintético (Omata, 1984). Lo cual soporta el hecho de que su proporción aumente durante el proceso de crecimiento de la microalga. Las funciones de la feofitina en el proceso fotosintético son muy complejas y se cree, que además de las mencionadas anteriormente, sirve como fotoprotector pues se ha comprobado que su estructura se altera no reversiblemente cuando interactúa con fotones (Hou, 2014).

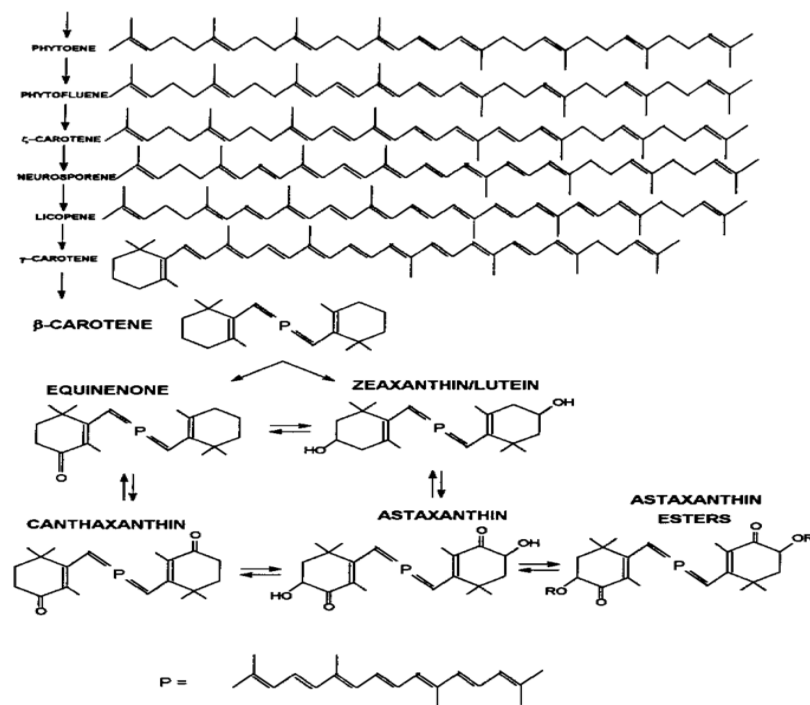
Por otra parte, se han reportado variaciones en las relaciones clorofila/feofitina en *C. vulgaris*. A medida que el microorganismo se desarrolla, la abundancia de ciertos nutrientes, en particular nitrógeno y magnesio, se ve reducida. Esta reducción de clorofila y aumento de feofitina es consistente con resultados hallados en la literatura, en donde poblaciones de microorganismos fotosintéticos experimentan degradaciones de clorofilas bajo condiciones de estrés o senescencia, formando metabolitos de clorofilas (incluyendo feofitinas) a través de una ruta metabólica conocida como SGR (STAYGREEN) (Peng, 2019; Bale, 2015). Esta enzima, conocida como una desquelatasa, es activada cuando las condiciones del medio presentan bajas concentraciones de magnesio (Peng, 2019). Esta enzima y ruta metabólica remueven el magnesio de la estructura pirrólica de la clorofila, produciendo feofitina y dejando el ion de magnesio libre para involucrarse en distintas rutas metabólicas que lo requieran. Esta movilidad permite fomentar el crecimiento de nuevas estructuras fotosintéticas en las células y simultáneamente proteger células senescentes al aumentar la producción de pigmentos fotoprotectores de forma localizada. (Maroneze, 2019)

La biosíntesis de carotenoides en *C. vulgaris* depende de muchos factores como la etapa de crecimiento del microorganismo, las condiciones nutricionales del cultivo (particularmente

nitrógeno) y las condiciones medioambientales (luz/oscuridad). En la especie *Chlorella* los principales carotenoides primarios comprenden α - y β - caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, principalmente. Los carotenoides secundarios, que pueden ser producto de reacciones de esterificación de los primarios, comprenden equinenona, hydroxiequinenona, cantaxantina y astaxantina, entre otros (Gouveia, y otros, 1996; Peng, 2019). La Figura 16 muestra las rutas biosintéticas de producción de carotenoides en *C vulgaris* (Gouveia, y otros, 1996).

Figura 16.

Rutas biosintéticas de carotenoides en *C. vulgaris*, tomada de (Gouveia, y otros, 1996)

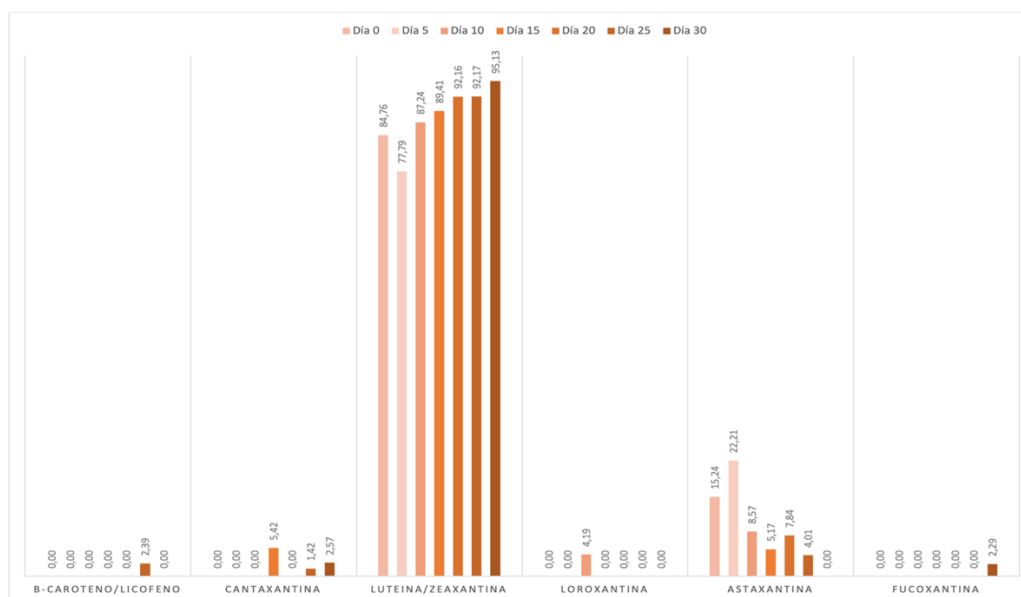


En la Figura 17, se observa que los principales carotenoides detectados mediante MALDI MS en el cultivo de *C. vulgaris* son la luteína/zeaxantina (primario) y la astaxantina (secundario). La literatura reporta la luteína/zeaxantina como el principal carotenoide en *C. vulgaris*, que se

biosintetiza a través de una ruta hidroxilativa a expensas de los α - y β - carotenos, cuyas concentraciones son por consiguiente muy bajas en las células (Gouveia, y otros, 1996). Los resultados de los análisis por MALDI confirman este comportamiento. Ahora, de acuerdo con la ruta biosintética de la Figura 16, la oxidación de la luteína/zeaxantina produce la astaxantina. De acuerdo con la tendencia en el perfil de carotenoides de la Figura 17, a medida que el organismo se desarrolla aumenta la abundancia relativa de la luteína/zeaxantina, mientras la astaxantina disminuye.

Figura 17.

Evolución de carotenoides y xantofilas durante el desarrollo de C. vulgaris.



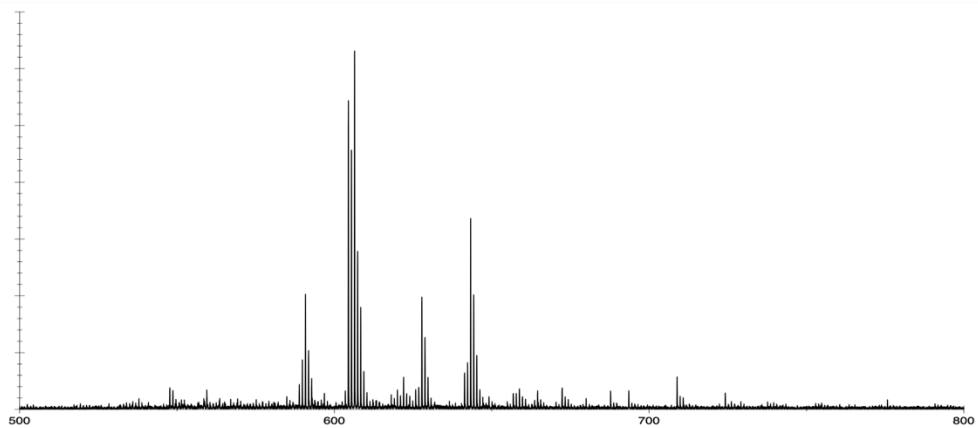
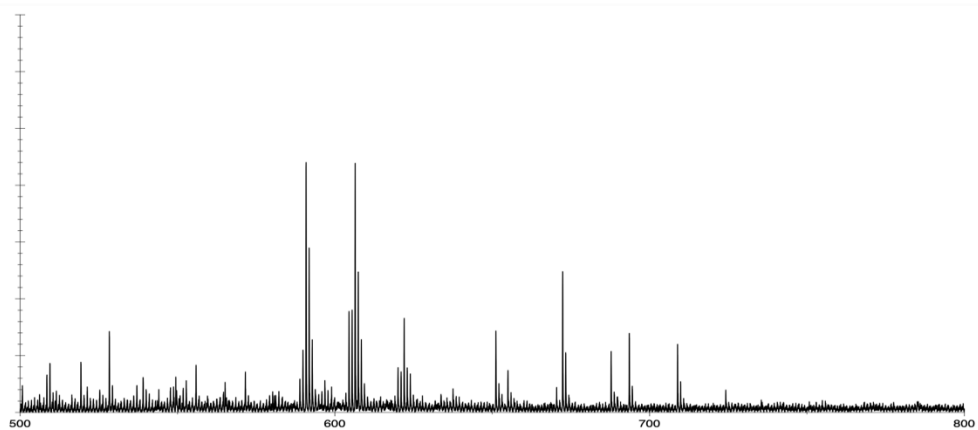
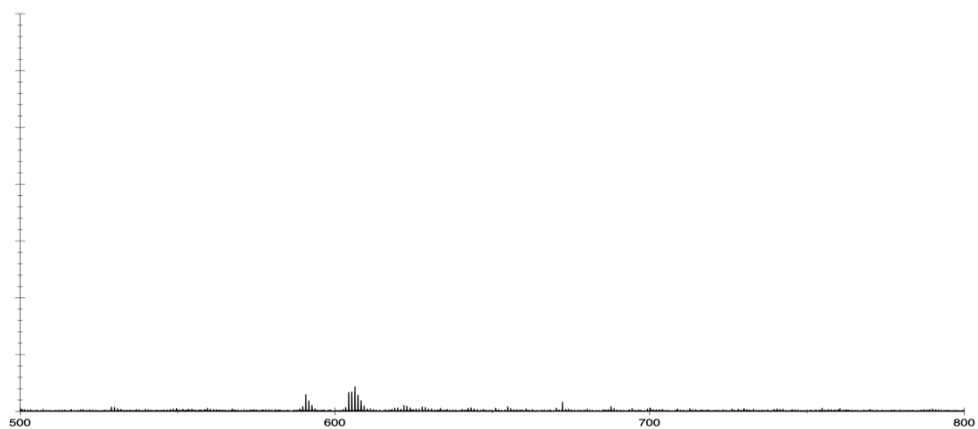
Aunque los análisis de perfiles composicionales dan una idea sobre los cambios moleculares que ocurren durante el desarrollo del microorganismo, como se demostró en la discusión de los párrafos anteriores, no reemplazan la información cuantitativa que también se

requiere para tener una imagen completa de la dinámica de producción de pigmentos de la *C. vulgaris*. Para ilustrar este punto, resulta interesante observar los espectros de masas obtenidos usando como matriz DHB.

La Figura 18 muestra los cambios en la abundancia de las señales de carotenoides en los espectros de masas de células intactas de *C. vulgaris*. El primer espectro ilustra la región asociada con carotenoides durante el día 0 de muestreo. La abundancia de las señales correspondientes a los pigmentos de interés es mínima, lo cual corresponde al comportamiento esperado para cultivos celulares de esta naturaleza. Los espectros siguientes, correspondientes a los días de muestreo 20 y 30, respectivamente, muestran señales con abundancias significativamente mayores. Como ha sido mencionado anteriormente, la cuantificación de estos pigmentos (usando estándares internos o externos) complementarían los análisis de variación en los perfiles que se reportaron en este trabajo de investigación.

Figura 18.

Evolución de las abundancias de Carotenoides y Xantofilas durante el desarrollo de C. vulgaris.



6. Conclusiones

Las técnicas tradicionales de análisis de cultivos celulares, principalmente aquellas que involucran procesos cromatográficos, suelen requerir dedicaciones de tiempo y esfuerzo considerables para realizar los análisis requeridos. Esto puede presentar un problema para cultivos de rápida evolución.

Este estudio establece una posible alternativa a través de los análisis de espectrometría de masas MALDI. Utilizando cultivos fotosintéticos establecidos para el propósito, se realizaron muestreos durante 40 días, los cuales fueron analizados directamente por MALDI sin mayor tratamiento.

El estudio logró evaluar y hacer un seguimiento de los pigmentos principales de los organismos fotosintéticos y observar su evolución durante algunas fases de la curva de crecimiento.

Los resultados obtenidos se alinean de forma satisfactoria con aquellos hallados en la literatura.

Estudios futuros podrán explorar aspectos de cuantificación utilizando esta metodología como base y monitoreo de otras categorías de moléculas, incluyendo lípidos y proteínas.

La curva de crecimiento no siguió las etapas esperadas. Se sospecha que la disponibilidad de nutrientes fue demasiado elevada para generar las presiones ambientales que indujeran cambios asociados con las fases típicas de la curva de crecimiento.

La técnica MALDI implementada produjo información útil, en cuestión de minutos, para determinar los perfiles pigmentarios en *C. vulgaris*. Sin embargo, la presencia de carotenoides produjo interferencia a la hora de identificar lípidos en las muestras.

7. Recomendaciones

1. Es necesario hacer una separación previa de los lípidos con un solvente apropiado, para evitar la supresión de las señales por MALDI. Se recomienda extracción con CO₂ supercrítico.
2. Es importante para cualquier intento futuro reducir la disponibilidad de nutrientes para los cultivos. A pesar de estar planeada para 40 días, la curva nunca realmente logró la fase estacionaria.
3. Pruebas futuras que busquen replicar o mejorar este estudio deberán realizar los análisis por MALDI utilizando estándares internos, para lograr una mejor cuantificación de los resultados.

Divulgación de Resultados

- Los resultados de este trabajo se presentarán el 69th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics en octubre de 2021.

Referencias Bibliográficas

- Ajala, S. O., & Alexander, M. L. (2020). Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*.
- Andrade, L. M. (2015). Comparative study of different matrix/solvent systems for the analysis of crude lyophilized microalgal preparations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 295-303.
- Bale, N. J. (2015). Chlorophyll-a transformations associated with sinking diatoms during termination of a north atlantic spring bloom. *Marine Chemistry*, 23-33.
- Barbano, D., Diaz, R., Zhang, L., Sandrin, T., Gerken, H., & Dempster, T. (2015). Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS ONE*, 10(8), 1-13.
- Beale, S. I. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 43-73.
- Begum, H., Yusoff, F., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2209-2222.
- Buskirk, A. D., Hettick, J. M., Chipinda, I., Law, B. F., Siegel, P. D., Slaven, J. E., . . . Beezhold, D. H. (2011). Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Analytical Biochemistry*, 411(1), 122-128.

- Castellanos-García, L., Agudelo, B., Rosales, H., Cely, M., Ochoa-Puentes, C., Blanco-Tirado, C., . . . Combariza, M. (2017). Oligo p-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2548-2560.
- Chen, C. (2015). Overview of plant pigments. In *Pigments in Fruits and Vegetables* (pp. 1-7). Springer New York.
- Chia, S., Chew, K., & Zaid, H. (2019). Microalgal Protein Extraction From *Chlorella vulgaris* FSP-E Using Triphasic Partitioning Technique With Sonication. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1-13.
- Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 217-230.
- Damkaer, D. M. (2016). John Vaughan Thompson (1779-1847), pioneer planktonologist: a life renewed. *Journal of Crustacean Biology*, 36(2), 256-262.
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210-230.
- Falkowski, P. (2012). Ocean Science: The power of plankton. *Nature*, 483, S17-S20.
- Fogg, G. E. (1990). Our perceptions of phytoplankton: An historical sketch the first founders' lecture. *British Phycological Journal*, 25(2), 103-115.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., & Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57(2), 157-159.

- Harwood, J. L. (2006). Membrane Lipids in Algae. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, 53-64.
- Hosseini, S., & Martinez-Chapa, S. (2017). Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* (pp. 1-19). Springer Verlag.
- Hou, H. J. (2014). Unidirectional photodamage of pheophytin in photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 1-5.
- Jay, M. I., Kawaroe, M., & Effendi, H. (2018). Lipid and fatty acid composition microalgae *Chlorella vulgaris* using photobioreactor and open pond. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 141(1), 0-7.
- Jeon, Y. C., Cho, C. W., & Yun, Y. S. (2005). Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, 127-131.
- Laudicella, V. A., Whitfield, P. D., Carboni, S., Doherty, M. K., & Hughes, A. D. (2019). Application of lipidomics in bivalve aquaculture, a review. *Reviews in Aquaculture*, 1-25.
- Lu, I. C., Lee, C., Lee, Y. T., & Ni, C. K. (2015). Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 21-39.
- Maroneze, M. M.-G. (2019). Chlorophyll oxidative metabolism during the phototrophic and heterotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Antioxidants*.
- Micha, P., & Corradini, M. G. (2011). Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917-945.
- Mócsai, R. F. (2019). N-glycans of the microalga *Chlorella vulgaris* are of the oligomannosidic type but highly methylated. *Scientific Reports*, 2-9.

- Mócsai, R. F. (2020). A first view on the unsuspected intragenus diversity of N-glycans in *Chlorella* microalgae. *Plant Journal*, 184-196.
- Murphy, R. C., & Gaskell, S. J. (2011). New applications of mass spectrometry in lipid analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25427-25433.
- Murugaiyan, J. A. (2012). Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clinical Microbiology and Infection*, 461-467.
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, 34-38.
- Nickelsen, K. (2017). The organism strikes back: *Chlorella* algae and their impact on photosynthesis research, 1920s–1960s. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 39(2), 1-22.
- Omata, T. M. (1984). Quinone and pheophytin in the photosynthetic reaction center II from spinach chloroplasts. *BBA - Bioenergetics*, 403-405.
- Peng, Y. Y. (2019). Magnesium deficiency triggers sgr-mediated chlorophyll degradation for magnesium remobilization. *Plant Physiology*, 262-275.
- Ramírez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2019). Electron-Transfer Ionization of Nanoparticles, Polymers, Porphyrins, and Fullerenes Using Synthetically Tunable α -Cyanophenylenevinylenes as UV MALDI-MS Matrices. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10975-10987.

- Ren, X., Chen, J., Deschênes, J. S., Tremblay, R., & Jolicoeur, M. (2016). Glucose feeding recalibrates carbon flux distribution and favours lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* through cell energetic management. *Algal Research*, *14*, 83-91.
- Ren, X., Deschênes, J. S., Tremblay, R., Peres, S., & Jolicoeur, M. (2019). A kinetic metabolic study of lipid production in *Chlorella protothecoides* under heterotrophic condition. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 1-13.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing, and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265-278.
- Schlüter, L., Møhlenberg, F., Havskum, H., & Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: Testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 49-63.
- Silva, R. L. (2016). Application of MALDI Mass Spectrometry in Natural Products Analysis. *Planta Medica*, 671-689.
- Silva, S. C. (2020). Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules*, 1-23.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, *6*(AUG), 1-16.
- Smetacek, V. (1999). Revolution in the ocean. *Nature*, *401*(6754), 647.
- Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2010). Influence of nitrogen-limitation

- regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, 1(1), 47-58.
- Tekiner, M., Kurt, M., Ak, I., & Kurt, A. (2018). Determination of absorption coefficient of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira maxima* in water. *AIP Conference Proceedings*, 1-5.
- Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN), 1-20.
- Weesepeel, Y. V. (2013). Sodiation as a tool for enhancing the diagnostic value of MALDI-TOF/TOF-MS spectra of complex astaxanthin ester mixtures from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 862-874.
- Wong, Y. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6(1), 1-10.
- Wyatt, M. F. (2006). Characterization of various analytes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile matrix. *Analytical Chemistry*, 199-206.
- Zenobi, R., & Knochenmuss, R. (1998). Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 337-366.
- Šebela, M., Jahodářová, E., Raus, M., Lenobel, R., & Hašler, P. (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Chroococcidiopsis* cyanobacteria for classification purposes and identification of possible marker proteins. *PLoS ONE*, 13(11), 1-21.