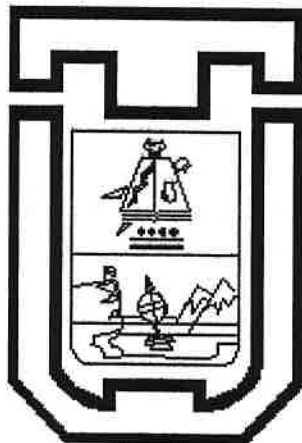


UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE MICROALGAS
DUNALIELLA SALINA Y *DUNALIELLA TERTIOLECTA***

INFORME FINAL ACTIVIDAD DE TITULACIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
QUÍMICO

ALUMNOS:

**ALBERTO ANDRÉS GARAY FORNÉS
ÉRIC ALEJANDRO PARRA OLIVARES**

PROFESORES GUÍA:

**LIBERTAD VIRGINIA CARRASCO RÍOS
LEONARDO FERNANDO FIGUEROA TAGLE**

ARICA-CHILE

2012

RESUMEN

En el siguiente trabajo, se determinó la composición proximal química de dos microalgas, *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta* en condiciones de estrés salino. Las microalgas fueron cultivadas en sistemas cerrados y con una solución nutritiva elaborada en base a agua mar (0,5 M NaCl) para *D. tertiolecta*. En *D. salina* se empleó la misma solución nutritiva elaborada en agua de mar, y además se agregó NaCl hasta una concentración final de 2,0 M. Las cepas fueron cultivadas durante 20 a 30 días hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento. Los análisis químicos, expresados en base seca, muestran un alto contenido de lípidos en ambas especies respecto a condiciones no salinas informadas bibliográficamente. El bajo contenido de proteínas que presentan estas microalgas indican la tendencia que poseen estas microalgas a disminuir la producción de proteínas en condiciones de estrés salino, siendo la más afectada la *D. salina*, debido a que se cultiva a una mayor concentración de sal. El contenido de carbohidratos en ambas especies fue bajo, atribuible a la utilización de estas moléculas para la producción de glicerol. El contenido de cenizas obtenido para la *D. salina* fue mayor que la *D. tertiolecta*, debido principalmente a que la *D. salina* utilizaría sales para realizar ajuste osmótico al estar sometida a estrés salino.

Palabras claves: *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, estrés salino, lípidos, proteínas, carbohidratos totales, cenizas.

<i>Solución nutritiva</i>	18
Preparación de las muestras de microalgas para el análisis químico.	19
<i>Parámetros de crecimiento</i>	19
<i>Recuento de células en cámara de Neubauer (Biomasa)</i>	20
<i>Materia seca de la biomasa</i>	20
<i>Determinación del contenido de Carbohidratos Totales</i>	20
<i>Determinación del contenido de Proteínas</i>	21
<i>Determinación del contenido de Cenizas</i>	21
<i>Determinación del contenido de Lípidos</i>	21
Unidad experimental	21
CAPITULO V	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Contenido de biomasa en <i>Dunaliella salina</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	22
Contenido de Proteínas en <i>Dunaliella salina</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	23
Contenido de Cenizas en <i>Dunaliella salina</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
Contenido de Lípidos en <i>Dunaliella salina</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	25
Contenido de Carbohidratos Totales en <i>Dunaliella salina</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	25
CAPITULO VI	26
CONCLUSIONES	27
CAPITULO VII	28
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Nombre de reactivos, marca y grado de pureza.	16
Tabla 2: Lista de materiales e instrumentos, indicando cantidad, descripción y marca	17
Tabla 3: Composición de la solución nutritiva de Guillard (1975) modificada.	19
Tabla 4: Cantidad de biomasa obtenida por las especies <i>D. salina</i> y <i>D. tertiolecta</i>	22
Tabla 5: Composición química proximal de las especies <i>D. salina</i> y <i>D. tertiolecta</i>	23

Dunaliella sp. es una de las más tolerantes a la contaminación de aceites del petróleo comparados con otras algas planctónicas (Brown y Borowitzka, 1979). Así, estos organismos son únicos en sus habilidades para adaptarse a las más severas condiciones de los hábitats globales.

Se han realizado estudios para *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta* bajo condiciones de estrés salino y se ha encontrado que pueden tolerar concentraciones hípersalinas, cuyos valores son 5,5 M y 3,0 M de NaCl, respectivamente. También existen otros factores abióticos que condicionan su crecimiento como luz, aire, nutrientes, etc.

Siendo el estrés salino una de los factores limitantes en el cultivo de las microalgas, este estudio persiguió determinar la composición proximal química de las especies *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta*, y la producción de biomasa bajo condiciones salinas con el propósito de ser cultivadas en este tipo de medio que resulta ser restrictivo para el crecimiento de otros organismos depredadores de las microalgas.

responden a la diferencia de calidad y cantidad de luz. Se ha encontrado que la inducción de carotenoides es independiente de la longitud de onda, sin embargo, su dependencia a la luz es alta (Ben-Amotz y Avron, 1989b).

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la *Dunaliella sp.*

El incremento de la temperatura puede afectar la absorción de nutrientes como los nitratos, sin embargo, la absorción de amonio es ligeramente insensible a las variaciones de temperatura (Reay y cols., 1999), dado que las altas temperaturas producen cambios cinéticos en la toma de otros nutrientes limitantes. Estos cambios en los procesos metabólicos podrían explicar mejor el menor contenido de carotenoides. Se sabe que a altas temperaturas producen la liberación de compuestos orgánicos al medio circundante. Así mientras más se incrementa la temperatura del cultivo, mas se incrementa la probabilidad de que las células excreten sustancias orgánicas (Giordano y cols., 1994). El aumento de esas sustancias y las altas temperaturas incrementan el número de bacterias. Se sabe que las bacterias inducen a la nucleación y precipitación de las sales disueltas pudiendo provocar condiciones de deficiencia nutricional (Ventosa y cols., 1998).

La *Dunaliella* posee la habilidad de crecer en amplios rangos de temperatura sobre los 0°C rodeando los 45°C. En cultivos de laboratorio, la temperatura óptima para el crecimiento de la *Dunaliella* es sobre 32°C con una óptima promedio entre 25°C y 35°C (Ben-Amotz, 1995). Debido a las limitaciones técnicas que posee el cultivo en estanques al aire libre, no es posible controlar la temperatura. Borowitzka y Borowitzka (1987) demostraron que las bajas temperaturas en la noche, estudiadas en el lago Hutt (Australia) disminuyen la tasa de crecimiento, afectado negativamente el rendimiento celular. Por otra parte, temperaturas cercanas a los 40°C y superiores promueven la inducción de carotenoides, pero al mismo tiempo disminuyen la tasa de crecimiento (Borowitzka y Borowitzka, 1989). Además, temperaturas sobre los 40°C causan una fuga dramática de glicerol a través del medio (Wegmann y cols., 1980), el cual puede servir como fuente de carbón orgánico para bacterias y hongos que se vuelven dominantes (Ben-Amotz, 1995). Este debe ser uno de los mayores problemas de cultivar *D. salina* en sistemas externos, particularmente en zonas no-áridas con veranos calientes. La alta tasa de evaporación que se da en zonas áridas, puede conducir a una mayor reducción en la temperatura de los estanques, por lo que esas zonas son las más sustentables para el crecimiento exterior de cultivos de *D. salina* y otras microalgas. Al contrario, en biorreactores la temperatura es controlada exactamente usando un termostato.

fuerza de nitrógeno puede producir efectos tóxicos en el crecimiento de la *D. salina* (Borowitzka y Borowitzka, 1987).

La incorporación de fósforo en forma de KH_2PO_4 o NaH_2PO_4 es la más empleada en los cultivos de microalgas, por los buenos resultados que se obtienen en cuanto a producción de biomasa. Se ha determinado que la concentración óptima de fosfato para un buen crecimiento está alrededor de los 0,2 $\mu\text{g/L}$ de KH_2PO_4 (Gibor, 1956). En estanques abiertos, altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento por la presencia de contaminantes de calcio y fosfato, especialmente sobre pH 8,0; que produce la precipitación del Ca_3PO_4 y floculación de algas (Sukenic y Shelef, 1984).

La *Dunaliella* necesita también de altas concentraciones (aprox. 2 mmol/L) de ión sulfato para su máximo crecimiento, pero rara vez es necesario agregar en estanques comerciales porque las fuentes naturales de agua (mar y de pozo) contienen concentraciones mucho más altas de sulfato, alrededor de 30 mmol/L (Ben-Amotz and Avron, 1989a).

Otros requerimientos nutricionales para un buen crecimiento de la *D. salina* incluyen K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ , hierro quelado y trazas. La relación $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Cl}^-:\text{SO}_4^{2-}$ en el medio también puede afectar el crecimiento y síntesis de carotenos (Ben-Amotz y Avron, 1983). La *Dunaliella* puede tolerar relaciones $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ bastante amplias, desde los 0,8 hasta 20,0 (Borowitzka, 1990). La mejor relación $\text{Cl}^-:\text{SO}_4^{2-}$ para un crecimiento óptimo de *D. salina* es de 3,2; la relación óptima para una carotenogénesis es sobre 8,6 (Massyuk, 1956). El Hierro quelado es agregado a los cultivos en la forma $\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$ o citrato férrico-EDTA. Borowitzka y Borowitzka (1987) mostraron que, comparado con el citrato férrico, el cloruro férrico incrementa rápidamente la tasa crecimiento inicial de la *D. salina*; sin embargo, el citrato férrico entrega un mayor rendimiento celular. Los microelementos, manganeso, zinc, cobalto y cobre también son necesarios para un óptimo crecimiento de la *Dunaliella*, sin embargo, no es necesario agregar estos elementos al medio cuando se trabaja con aguas de mar o mineralizadas (Ben-Amotz y Avron, 1989a).

Control de depredadores

Sólo una pequeña cantidad de microorganismos tienen la habilidad de proliferar a altas concentraciones de NaCl , este es el caso de la *Dunaliella salina*, bacterias halotolerantes y halofilicas, ciliados, artemias, amebas y hongos (Post y cols., 1983; Butinar y cols., 2005). De estos, algunas amebas y zooplancton ciliados son peligrosos depredadores de la *Dunaliella*, principalmente a temperaturas sobre los 38°C (Ben-Amotz y Avron, 1989a). Por ejemplo, un depredador ciliado taxonómicamente no

Proceso de cosecha de microalgas

Aislar las células del medio salino al final de la etapa de cultivo es uno de los procesos más críticos y difíciles en la obtención de biomasa a partir de *Dunaliella*. La etapa de cosecha requiere ciertas consideraciones por varios motivos: *i)* la *Dunaliella* carece de una pared celular rígida y está solamente protegida por una membrana plasmática con material mucoso; *ii)* la salinidad de los cultivos es muy alta; *iii)* los cultivos poseen una baja densidad celular.

Estos factores, acompañados del pequeño tamaño que poseen las células, excluyen varios métodos de cosechas rutinarios que se utilizan frecuentemente en la biotecnología de microalgas. A modo de ejemplo, existen muchos métodos de filtración de biomasa, pero debido al tamaño de las células los poros del material filtrante se tapan debido a la mucosa que protege la microalga, evitando posteriores filtraciones (Ben-Amotz y Avron, 1989a). Además, tratar de eliminar esto removiéndolo con repetidos lavados (Naghavi y Malone, 1986) o por presión al vacío (Mohn, 1980) resulta muchas veces en gran pérdida de material. La única filtración descrita como exitosa por Ruane (1977) se obtuvo pasando los cultivos de *Dunaliella* sobre tierra diatomea y luego filtrando directamente para la extracción de β -caroteno con solventes orgánicos.

Otros métodos son la floculación en los cuales se utilizan agentes químicos como lo son sales de metales multivalentes como sulfato férrico, cloruro férrico, sulfato de aluminio, sales de metales pre-polimerizados, polielectrolitos y floculantes poliméricos como el quitosano, cual entrega resultados positivos (Gríma y cols., 2003), pero en la mayoría de los casos este método no está libre de impurezas. Existen métodos de precipitación con hidróxido para aumentar el pH del medio, el cual es un método muy eficaz para la *D. tertiolecta* (Horiuchi y cols., 2003), pero no ha sido probado con *D. salina*.

A pesar de los costos iniciales y los posteriores gastos en energía, trabajo y mantención, la centrifugación sigue siendo uno de los más efectivos métodos de cosecha, por recuperar grandes cantidades de *D. Salina* (Ben-Amotz y Avron, 1989a).

Proceso de secado de la biomasa microalgal

El alga obtenida en forma de pasta, puede ser deshidratada para extender la vida útil de la biomasa. Los métodos de deshidratación descritos son: secado al sol, secado en estufa, secado por soplado o por frío. Cada método tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo del fin que se persiga. Por ejemplo, para la extracción de los

La adaptación de la *D. salina* a estrés salino puede ser dividido en dos etapas: un rápido ajuste a la concentración intracelular de glicerol y glicina-betaína, restableciendo los mecanismos osmoregulatorios comunes en plantas y hongos. A largo plazo puede incluirse la biosíntesis de lípidos neutros y la acumulación de carotenoides. (Ben-Amotz y Avron 1973; Avron 1986; Chitlaru y Pick, 1991; Mishra y cols., 2008; Chen y Jiang, 2009).

Cuando la *Dunaliella* crece bajo altas salinidades, el contenido de glicerol intracelular excede en un 50%, que es suficiente cantidad para lo que requiere la presión osmótica. En estas condiciones, el glicerol actúa como "soluto compatible" que protege a las enzimas de la inhibición e inactivación (Brown y Borowitzka, 1979). También es demostrado que la síntesis del glicerol bajo condiciones hipertónicas y su eliminación bajo condiciones hipertónicas son independientes de la síntesis proteica y puede ocurrir en condiciones de luz y oscuridad (Ben-Amotz y Avron 1989a). Por otro lado, información más actualizada sugiere que la *Dunaliella* tiene una excepcional habilidad de remover iones de sodio en ambientes hipersalinos usando una nueva capacidad de la bomba de sodio que dirige una reacción de oxido-reducción (Katz y Pick, 2001). Otros resultados indican que la *Dunaliella* en respuesta a alta salinidad mejora la tasa asimilación fotosintética de CO₂ (Oren, 2005). El enigma de la aparente incompatibilidad entre una baja concentración intracelular iónica y la necesidad de un equilibrio osmótico de las células con el medio externo fue resuelto con el descubrimiento de que las células acumulaban fotosintéticamente glicerol, compatiblemente soluble para el medio osmótico (Oren, 2005).

Bajo condiciones hiper-salinas, el glicerol funciona en el citoplasma como un soluto compatible para mantener la integridad de la membrana y proteínas. Al parecer las respuestas celulares al estrés salino son reguladas y parecen depender de una diversidad de mecanismos ligados a la modificación en el balance del ácido abscísico (Serpa y Calderón, 2005).

Una respuesta característica de la *D. salina* al estrés por salinidad es el ajuste en la concentración intracelular de glicerol por regulación del flujo de carbono entre la producción de almidón en el cloroplasto y la síntesis de glicerol en el citoplasma. Así, el flujo de carbono es canalizado del almidón hacia el glicerol con un concomitante de incremento en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos (Serpa y Calderón, 2005). El glicerol por lo tanto, actúa como un elemento osmótico efectivo a altas salinidades debido a: *i*) la alta solubilidad del glicerol no puede ser igualada por la mayoría de otros solutos compatibles, *ii*) es químicamente inerte, por lo tanto, no es tóxico, *iii*) es un

Resultados de Al-Hasan y cols., (1987), muestran que el halo-estrés inducido produce cambios en la tasa de crecimiento, pigmentación, estructura de cloroplastos y composición lipídica de la *Dunaliella salina*. La salinidad daña los cloroplastos y eleva la relación caroteno-clorofila, lo que puede verse reflejado en bajas tasas de crecimiento. Sin embargo, la *Dunaliella salina* es capaz de mantener activos distintos componentes del aparato fotosintético en condiciones de alta salinidad, debido principalmente a la síntesis de glicerol que actúa como osmoregulador Al-Hasan y cols., (1987).

En respuesta al aumento de la salinidad no sólo hay una disminución en la tasa de crecimiento (Ben-Amotz y Avron, 1983; 1989), o en la tasa de fijación de carbono sino una acumulación de carotenoides, clorofila y otros metabolitos de interés nutricional (Brown y Borowitzka, 1979; Cowan y cols., 1992).

Producción de metabolitos de interés nutracéutico

β-caroteno

Milko (1963) reportó que la *Dunaliella salina* es la mejor fuente comercial natural de β-caroteno por sobre todos los organismos en el mundo (Borowitzka 1995). Estas algas acumulan grandes cantidades de β-caroteno en forma de gotas en el cloroplasto para prevenir la fotooxidación de la clorofila, cuando las condiciones son de alta intensidad lumínica, salinidad, temperaturas y deficiencia de nutrientes (Ben-Amotz and Avron, 1983; Ben-Amotz y Shaish, 1992).

Entre las microalgas eucariotas, la única que posee la habilidad relativa para acumular glicerol y β-caroteno en respuesta de un estrés osmótico ha sido la *Dunaliella* (Cowan y cols., 1992; Pick 1998). Este mecanismo no es único para la *Dunaliella*, muchas microalgas expuestas a condiciones de estrés (luz, escases de nitrógeno, etc) acumulan intra- o extra-plastídica cuerpos lipídicos conformado por carotenoides y triacilglicéridos (Ben-Amotz y Avron, 1983; Jiménez y Pick 1994, Thompson 1996, Rabbani y cols., 1998; Boussiba, 2000; Cho y Thompson, 1986; Mendoza y cols., 1999; Abd El-Baky y cols., 2004, Lamers y cols., 2010). El estrés abiótico es capaz de cambiar no solo contenido total de ácidos grasos, sino además la composición de estos.

marcada diferencia entre la tolerancia a la sal entre una y otra (5,5 M y 3,0 M, respectivamente) (Jahnke y White, 2003; Mishra y cols., 2008). En contraste, un aumento extremo de hipersalinidad disminuye la cantidad de enzimas antioxidantes, el cual puede ser causado por la diversión de carbón y los recursos energéticos para la síntesis de glicerol, osmolito de la *Dunaliella* (Liska y cols., 2004; Mishra y cols., 2008).

Estudios realizados por Baz y cols., (2002) han demostrado que la *Dunaliella salina* acumula cantidades significantes de β -caroteno, vitamina C y vitamina E. El incremento de estas vitaminas antioxidantes ocurre como respuesta a la deficiencia de nitrógeno y altas concentraciones de NaCl en la solución nutriente y expuesta a alta intensidad de luz. El α -tocoferol y la vitamina C son acumuladas en la *D. salina* durante los efectos de estrés para proteger el sistema fotosintético de los radicales oxigenados generados por la alta intensidad de luz. Ellos pueden actuar como antioxidantes para aplacar las especies reactivas de oxígeno y romper la cadena de reacción de la peroxidación lipídica (Baz y cols., 2002).

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Tabla 1: Nombre de reactivos, marca y grado de pureza.

REACTIVOS	MARCA	GRADO DE PUREZA
Ácido fórmico	Merck	98-100% p.a.
Carbonato de amonio	Merck	30% p.a.
Ácido tricloroacético	Merck	99,5% p.a.
Fenol	Merck	99,0-100,5% p.a.
Ácido sulfúrico	Merck	95-97% p.a.
Glucosa anhidra	Chemix	99,5%
Hidróxido de sodio	Merck	99,0% p.a.
Tiosulfato de sodio pentahidratado	Merck	99,5-101,0% p.a.
Ácido bórico	Merck	99,5-100,5% p.a.
Rojo de metilo	Merck	
Verde bromocresol	Merck	
Ácido clorhídrico	Merck	Titrisol 0,10 N.
Cloroformo	Merck	99,8% p.a.
Metanol	Merck	99,9% p.a.

Soluciones

- I. Ácido bórico 4% p/v.
- II. Ácido clorhídrico 0,10 N: se vacía la ampolla de HCl 0,10 N en un matraz de aforo de 1L y se completa el aforo con agua destilada.
- III. Ácido tricloro acético 5% p/v.
- IV. Bicarbonato de amonio 2,0 M: se mezclan 314,3 g de carbonato de sodio y 77 mL de ácido fórmico y diluir a 2,0 L, en la preparación se deben mezclar con precaución puesto que se produce liberación de gas al mezclarlos.
- V. Fenol 5% p/v.
- VI. Glucosa anhidra 100 ug/mL.
- VII. Hidróxido de sodio 40% p/v.
- VIII. Mezcla de metanol-cloroformo-agua: Se prepara esta solución en proporciones de 2:1:0,8 respectivamente, tomando 400 mL de metanol más 200 mL de cloroformo y 160 mL de agua.
- IX. Rojo de metilo 0,2% p/v en etanol.
- X. Tiosulfato de sodio 5% p/v
- XI. Verde bromocresol 0,2% p/v en etanol.

Localización de estudio

Los cultivos de microalgas se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, del Departamento de Producción Agrícola en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá, Campus Azapa.

Los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Investigación Bioquímica del Departamento de Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Tarapacá, Campus Velásquez.

Material microalgal

Para el estudio, se utilizó dos microalgas: *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta*. Cada una de estas fue producida a partir de la misma cepa y cultivadas en distintas fechas.

Condiciones de crecimiento

Las microalgas fueron inoculadas en una cámara de flujo laminar, previamente desinfectada (alcohol 70%) y posteriormente irradiada con luz UV durante 15 minutos.

Inicialmente se inocularon en matraces de 250 mL (10% de inóculo y 90% de solución nutritiva elaborada en base a agua de mar.). Luego se pasaron a matraces de 2000 mL, hasta llegar finalmente a bidones de 20 L, repitiendo nuevamente la proporción inóculo-medio.

Las microalgas fueron cultivadas a una temperatura de 20 ± 1 °C con un suministro de luz constante de 3,5 μ Einstein y aire suministrado a partir de bomba de aireación con un flujo de 11 L/min. Todo esto en un sistema cerrado libre de contaminación.

Las microalgas se dejaron crecer durante 20 a 31 días. Luego de transcurrido este tiempo, las muestras fueron retiradas del cepario (Facultad de Ciencias Agronómicas) y trasladadas hasta el Laboratorio de Investigación Bioquímica del Departamento de Química, Facultad de Ciencias para proceder a la etapa de análisis químico proximal.

Solución nutritiva

Se suministraron los micro- y macro-nutrientes de acuerdo a la metodología descrita por Guillard (1975) y Guillard y Ryther (1962) modificada. La solución nutritiva consistió en enriquecer agua de mar con los distintos nutrientes. Para su preparación, se filtró el agua mar para eliminar la presencia de organismos marinos. Luego se suministraron

Parámetros de crecimiento

Recuento de células en cámara de Neubauer (Biomasa)

Este método consiste en colocar una diminuta gota de cultivo en un portaobjeto especial llamado cámara de Neubauer o hematocitómetro. La muestra queda depositada en un espacio de 0,02 mm (1/50) entre el porta y el cubreobjeto.

La excavación completa tiene 25 cuadrados cada uno dividido en 16 cuadrados más pequeños. Para calcular el número de células por mililitro de muestra, se debe hacer la siguiente operación:

- Contar las células presentes en varios cuadrados grandes y sacar un promedio.
- Multiplicar el promedio por 25 (con esto se obtiene el n° de células en un mm²).
- Multiplicar por 50 (esto entrega el número de células en un mm³).
- Multiplicar por 1000, para transformar todo a cm³.

$$\text{N}^\circ \text{células} / \text{mL} = X \text{ cél} * 25 * 50 * 1000$$

Materia seca de la biomasa

Para la determinación de la materia seca o biomasa, las muestras se secaron en estufa a una temperatura de 105°C ± 1°C hasta la obtención de una masa constante.

Análisis Proximal

Determinación del contenido de Carbohidratos Totales

Se tomaron 2-4 mg de biomasa seca y se homogenizaron en mortero. Los carbohidratos totales se extrajeron con 10 mL de ácido tricloroacético al 5%p/v a 90°C en estufa durante 3 h.

Una vez fría la muestra, ésta fue centrifugada durante 15 minutos a 500 x g. El contenido de carbohidratos fue determinado de acuerdo al método de Dubois y cols., (1956), a 490 nm.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son entregados en la (Tabla 4), la cual presenta la cantidad de biomasa obtenida durante la cosecha de los bidones y la cantidad de análisis proximal por cada muestra analizada (Tabla 5). Estos resultados van a determinar el efecto que tiene una condición de estrés salino sobre las especies *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta* en la composición química y producción de biomasa.

Dado a que son especies distintas, las condiciones para adaptarse a situaciones de estrés salino no son similares y esto se verá reflejado en los resultados que se obtuvieron durante el desarrollo experimental.

Tabla 4: Cantidad de biomasa obtenida por las especies *D. salina* y *D. tertiolecta*.

Especie	Biomasa (cél/mL)	Materia Seca (g/L)
<i>D. salina</i>	393.750 ± 8569,6	0,2 ± 0,1
<i>D. tertiolecta</i>	1.343.437,5 ± 129.515,7	0,2 ± 0,1

Los resultados son expresados como el promedio del análisis ± el error estándar de la medición.

Contenido de biomasa en *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta*.

Los resultados expresados en la Tabla 4 dan a conocer una marcada diferencia en la producción de biomasa cuando es determinada en función de células/mL. Estas mediciones fueron realizadas en la fase estacionaria de crecimiento. La diferencia de biomasa registrada en función del número de células por mL entre las especies, se debería a que crecen en condiciones de estrés salino totalmente distintas, siendo la *Dunaliella salina* la más afectada por someterse a una condición de salinidad (2,0 M NaCl) cuatro veces superior a la condición de crecimiento de la *Dunaliella tertiolecta*. Además, la *Dunaliella salina* empieza a producir osmolitos (ejemplo: carotenoides, glicerol, etc.) para contrarrestar el efecto osmótico de la salinidad, por lo que aumenta el requerimiento energético para generar moléculas que modulen su potencial osmótico en desmedro del crecimiento y replicación celular.

síntesis de una proteína 150 kilodaltons (glicoproteína), la que favorecería la proliferación de células en alta concentración de sal. El rol potencial de esta proteína sería restaurar la proliferación de células luego de choques hipoosmótico, y su localización exclusiva es la superficie de la célula (Sadka y cols., 1990).

Resultados obtenidos en este estudio indican que la *Dunaliella salina* presenta un 32,6% de proteína en base seca (b.s.), y que la especie *Dunaliella tertiolecta* contiene 46,6% en b.s. Estos resultados reflejarían la respuesta diferencial las especies en estudio, ya que la *Dunaliella salina* creció en un medio con 2,0 M de NaCl y la *Dunaliella tertiolecta* en un medio con 0,5 M de NaCl. Debido a esto, la célula empieza a producir proteínas para contrarrestar el choque hipoosmótico, evitando ruptura celular. Como la *Dunaliella tertiolecta* presenta una baja concentración de NaCl en comparación con la otra especie, no genera condiciones de autodefensa y produce cantidades normales de proteína. Otro factor a considerar, es que aunque sean del mismo género, la producción de nutrientes entre ellos durante la etapa de crecimiento no es comparativa, ya que las condiciones de crecimiento de los cultivos son distintos.

Contenido de Cenizas en *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta*.

Cuando los contenidos de cenizas se encuentran altos implica que la acumulación de sal al interior celular es mayor con el fin de compensar la alta presión osmótica externa como respuesta inmediata (Muhaemin y Kaswadji, 2010). Los análisis proximales de cenizas indican una marcada tendencia a retener mayor cantidad de sales en la *Dunaliella salina* en comparación con la *Dunaliella tertiolecta*.

Se ha indicado por citas bibliográficas, que la *Dunaliella salina* es una microalga halotolerante, por lo que puede sobrevivir y crecer a altas concentraciones que van desde los 0,1 M hasta 5,5 M de NaCl y además de mantener una baja concentración iónica interna (Avron, 1986). No obstante, investigaciones más recientes (Muñoz y cols., 2004) proponen variar esta condición indicando que esta especie sería más bien halodependiente. Esta serie de antecedentes la convierten en un excelente modelo para observar los atributos especiales fisiológicos que posee (Aliyevy cols., 2000).

De esta manera, la *Dunaliella salina* presenta altos contenidos de sal en el medio que se cultiva, generando mecanismos para evitar su apoptosis durante la etapa de crecimiento, donde se puede verificar cuantitativamente los valores obtenidas para cada especie en el valor de cenizas (Tabla 5).

Los bajos porcentajes presentados en *D. salina* (18,7%) y en *D. tertiolecta* (18,3%), se debería a que el almidón es degradado para formar glicerol en respuesta a un ambiente salino. Al menos la *D. salina* hidroliza el almidón al encontrarse en un ambiente salino, cuya concentración es 2,0 M de NaCl (Ben-Amotz y Avron, 1973). Además, la ruptura del almidón contribuye a la formación de glicerol, que es concomitante con la salinidad (Goyal 2007).

El costo energético para la síntesis del glicerol a partir de la glucosa es relativamente bajo, por lo que en condiciones de estrés será la principal fuente de obtención para la célula (Chiharu y Pick, 1991; Pick, 2002).

La sp. *Dunaliella* no presenta una pared celular rígida (Ben-Amotz y Avron, 1987), por esto se debe suponer que el contenido de fibra cruda que existe es bajo o prácticamente nulo. Por lo tanto, se asume que los carbohidratos totales corresponden a glucosa y almidón producido por las células de las microalgas.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Baky, H. H., El-Baz, F. K., El-Baroty, G. S. (2004). Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Biotechnology* 3:102-108.
- Al-Hasan R.H., Ghannoum MA, Sallal A-K., Abu-Eteen K.H., Radwan S.S. (1987) Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. *J. gen. Microbiol.* 133: 2607–2617.
- Avron M. (1986). The osmotic components of halotolerant algae. *Trends Biochem. Sci.* 11:5-6.
- Avron M. (1992). Osmoregulation. In: Avron M, Ben-Amotz A, editors. *Dunaliella: Physiology, biochemistry and biotechnology*. Florida: CRC Press, Boca Raton. pp 135–164.
- Avron M., Ben-Amotz A. (1992). *Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL., 256 pp.
- Barclay, L.R.C., S.J. Locke, J.M. Macneil, (1983). The autoxidation of unsaturated in micelles synergism of inhibitors vitamins C and E. *Canadian J. Chem.*, 61: 1288–90.
- Becker, E.W., (1994), *Microalgae Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben-Amotz A. (1980). Glycerol production in the algae *Dunaliella*. In *Biochemical and Photosynthetic Aspect of Energy Production* ed. San Pietro, A. pp. 91-208. New York: Academic Press.
- Ben-Amotz A. (1993). Production of β -carotene and vitamins by the halotolerant algae *Dunaliella*. In *Marine Biotechnology*. Ed. Ahaway, A. and Zabrosky, O. pp. 411-417. New York: Plenum Press.
- Ben-Amotz A. (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J Appl Phycol* 7, 65–68.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1973). The role of glycerol in osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol* 51:875–878.

- Borowitzka M.A. (1999) Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70, 313–321.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1987) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunalella salina*. In *Algal Biotechnology*. ed. Stadler, T., Molhan, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H.D. pp. 345–402. London: Elsevier Applied Science.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1988a) Algal growth media sources of algal culture. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. pp. 465–465. New York: Cambridge University Press.
- Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka (1988). *Microalgal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, London.
- Boussiba S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108:111-117.
- Brown A.D., Borowitzka L.J. (1979) Halotolerance of *Dunaliella*. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. ed. Levandowsky, M. and Hutner, S.H. pp. 139–190. New York: Academic Press.
- Brown M.R., Dunstan, G.A., Norwood S.J., Miller K.A., (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32, 64–73.
- Butcher R.W. (1959) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. 1. Introduction and Chlorophyceae. *Fish Invest Ser Series 4* 31, 175–191.
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitas A., Gunde- Cimerman, N. (2005) Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Marina* 48, 73–79.
- Chen H., Jiang J. -G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell Physiol.* 219:251-258.
- Chen M., Tang H. Y., Ma H. Z., Holland T. C., Ng, K. Y. S., Salley S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 2011 Vol. 102 No. 2 pp. 1649-1655.
- Chitlaru E., Pick U. (1991). Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol* 96:50–60.