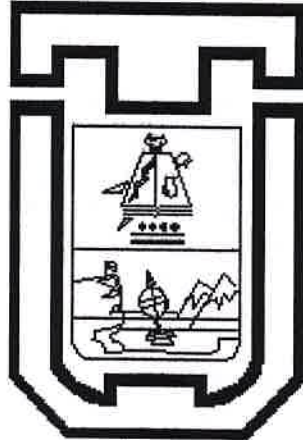


UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**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.

fuentes de nitrógeno pueden 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 de 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 halofílicas, 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.

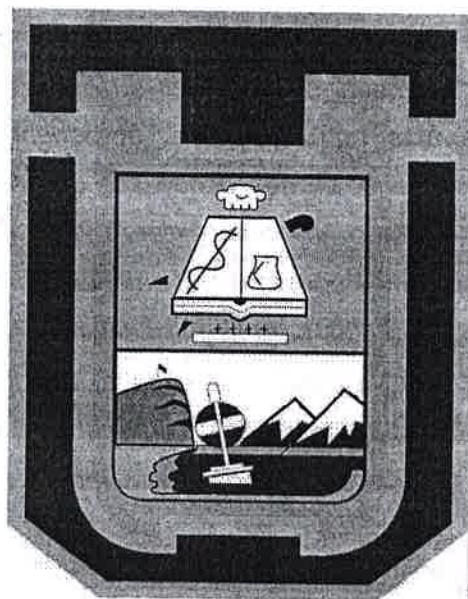
- Borowitzka M.A. (1999) Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70, 313–321.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1987) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunalella salina*. In *Algal Biotechnology*. ed. Stadler, 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.

- Fried A., Tietz A., Ben-Amotz A., Eichenberger W. (1982) Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochim. Biophys. Acta* 713: 419–426.
- Fuentes M.M.R., G.G.A. Fernandes., J.A.S. Perez., J.L.G. Guerrero (2000). Biomass nutrient profiles of the microalgae *Porphyridium cruentum*, *Food Chem*, 70: 345-353.
- Gibor A. (1956) The culture of brine algae. *Biol Bull (Woods Hole)* 3, 223–229.
- Giordano M., Davis J., Bowers G. (1994). Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO₂, nitrogen and salinity. *J. Phycol.* 30: 249-257.
- Goyal A. (2007). Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol Biochem* 45:705–710.
- Greenwell H. C., Laurens L. M. L., Shields R. J., Lovitt R. W., Flynn K. J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface* 7:703-726.
- Grima E., Belarbi E., Fernandez F.G., Medina A., Christi Y. (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv* 20, 491–515.
- Guillard R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Hatate H., Ohgai M., Murase N., Miyake N., Suzuki N., (1998). Accumulation of fatty acids in *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae) during stationary growth phase. *Fish. Sci.* 64, 578–581.
- Horiuchi J.I., Ohba I., Tada K., Kobayashi M., Kanno T., Kishimoto M. (2003) Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. *J Biosci Bioeng* 95, 412–415.
- Hosseini T., M. Shariati (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications *Journal of Applied Microbiology* 107, 14-35.

- Mansour M.P., Volkman J.K., Blackburn S.I., (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate. *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry* 63, 145–153.
- Martinez G. Cifuentes., A.S. Gonzalez., M. Parra (1995). Efecto de la salinidad en la actividad sexual de *Dunaliella salina* (dunal) teodoreco, cepa conc-006. *Revista chilena de historia natural*. 131-138.
- Massyuk N.P. (1956) Effect of Na, Mg, Cl and SO₄ ions on growth, reproduction, and carotene production in *D. salina* Teod. *Ukr Bot Zh* 22, 3–11.
- Mayfield S. P., Manuell A. L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D., Muto M., Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:126-133.
- Mckersie B.D., F.A. Hoekstra., L.C. Kreg (1990). Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1030: 119–26.
- Mendoza Héctor., Martel Antera., Jiménez del Río Miguel., García-Reina Guillermo (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, February 1999, vol. 11, no. 1, p. 15-19.
- Michel Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, Fred Smith.(1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
- Milko, E.S. (1963) Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya* 32, 299–307.
- Mishra A., Mandoli A., Jha B. (2008). Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:1093-1101.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 9: 405–410.
- Mohn F.H. (1980). Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. In *Algae Biomass: Production and Use* ed. Shelef, G. and Soeder, C.J. pp. 547–571 Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Moreno-Garrido I., Canavate J.P. (2001) Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*. *Aquac Eng* 24, 107–114.

- Reay D.S., Nedwell D.B., Priddle J., Ellis-Evans J.C. (1999). Temperature dependence of inorganic uptake: Reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Applied Environm. Microbiol.* 65:2577-2584.
- Rhodes D., A.D. Hanson. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357–384.
- Rijstenbil J.W., (2002). Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UV-A and UV-B radiation. *J. Plankton Res.*, 12: 1277–88.
- Ruane M. (1977) Extraction of Caroteniferous Materials from Algae. Australian Patent 7239574.
- Sadka A., Himmelhoch S., Zamir A. (1991). A 150 Kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 95:822–831.
- Sadzawka A, Grez R, Carrasco M, Mora M. (2004). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de normalización y acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del suelo.
- Shariati M., Lilley R.McC. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant Cell Environ* 17, 1295-1304.
- Su W.W., Li J., Xu N.S. (2003). State and parameter estimation of microalgal photobioreactor cultures based on local irradiance measurement. *J Biotechnol* 105, 165–178.
- Sukenik A., Shelef G. (1984). Algal autoflocculation: verification and proposed mechanism. *Biotechnol Bioeng* 26, 142–147.
- Tafreshi., M. Shariati (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications *Journal of Applied Microbiology* 107, 14-35).
- Tang H., Abunasser N., Garcia M.E.D., Chen M., Simon N.K.Y., Salley S.O. (2010). Potential of Microalgae Oil from *Dunaliella tertiolecta* as a Feedstock for Biodiesel. *Appl Energy* in press. doi:10.1016/j.apenergy.2010.09.013.
- Teodoresco E. C. (1905). Organisation et developpement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacee-Polyblepharidee. *Beih. z. Bot. Centralbl.* 18:215-232. thesis. Ocean University of China. Shangdong. China.

UNIVERSIDAD DE TARAPACA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA



**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN
DUNALIELLA SALINA**

**INFORME FINAL DE ACTIVIDAD DE TITULACION
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**

QUIMICO

ALUMNA:

ANNABEL MUÑOZ GONZÁLEZ

PROFESOR GUIA:

LIBERTAD CARRASCO RIOS

**ARICA-CHILE
2012**

INDICE DE MATERIA

RESUMEN	3
CAPITULO 1	4
INTRODUCCION	4
OBJETIVOS	5
CAPITULO 2	6
MARCO TEORICO.....	6
<i>Dunaliella sp.</i>	6
<i>Dunaliella salina y sus condiciones fisicoquímicas para su cultivo.</i>	7
<i>Efecto de la luz</i>	7
<i>Efecto de la temperatura</i>	8
<i>Efecto del pH</i>	9
<i>Efecto de la salinidad</i>	9
<i>Estrés oxidativo en microalgas.</i>	10
Clorofilas	12
Carotenoides (<i>carotenos y xantófilas</i>)	13
Ácido Ascórbico.....	14
Polifenoles.....	15
CAPITULO 3	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Reactivos.....	17
Soluciones.....	17
Equipos y materiales de laboratorio	19
Localización de estudio	20
<i>Material microalgal</i>	20
<i>Condiciones de crecimiento</i>	20
<i>Solución nutritiva</i>	20
Parámetros de crecimiento.....	21
<i>Recuento de células en cámara de Neubauer (Biomasa)</i>	21
Preparación de las muestras de las distintas cepas de microalgas de <i>Dunaliella salina</i> y su posterior análisis.....	22
<i>Materia seca de la biomasa</i>	22
<i>Contenido de ácido ascórbico (ASA)</i>	22
<i>Contenido de clorofilas a, b y carotenoides (carotenos y xantófilas)</i>	22
<i>Contenido de polifenoles</i>	23

RESUMEN

El presente estudio, tuvo como objetivo determinar la producción de compuestos antioxidantes en cuatro cepas de microalgas, *Dunaliella salina*: Tang, Conc-007, Yucatán y UTEX crecidas en condiciones salinas. Las microalgas fueron cultivadas en sistemas cerrados, con una solución nutritiva elaborada en base a agua mar (0,5 M NaCl) a la que se le suministró además NaCl hasta llegar a una concentración final de 2,0 M. Las cepas fueron cultivadas durante 20 a 30 días hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

De las cuatro cepas en estudio, la cepa Yucatán presentó la mayor productividad en función de células/mL, demostrando su capacidad para adaptarse a la actividad osmótica producida por las sales, característica de esta microalga halófila. No obstante, las cuatro cepas en estudio (Tang, Conc 007, Yucatán y UTEX) alcanzaron la misma biomasa expresada como g/L, lo que daría cuenta de la posible síntesis de osmolitos y/o acumulación de sales que realizarían estas microalgas con el propósito de contrarrestar el efecto osmótico de la salinidad.

La producción de compuestos antioxidantes hidrofóbicos tales como carotenoides y clorofilas, fue mayor en la cepa UTEX, mientras que la cepa Conc-007 fue la de mayor producción de compuestos antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico y polifenoles)

Palabras Claves: microalga, *Dunaliella salina*, compuestos antioxidantes

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el contenido de antioxidantes presentes en *Dunaliella salina*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el contenido de antioxidantes hidrofóbicos (carotenoides y clorofilas)
- Determinar el contenido de antioxidantes hidrofílicos (ascorbato y polifenoles)

como ovoides, esféricas, piriforme, fusiformes o elipsoides, son biflageladas, fotosintéticas y se distinguen, morfológicamente, por carecer de una pared rígida de polisacáridos. La célula está encerrada por esta delgada membrana plasmática o periplasto, que permite los cambios rápidos en la forma celular y volumen en respuesta a los cambios osmóticos (Gimmler, 1992). Se encuentra cubierta por una superficie de mucus, la que se hincha o encoge rápidamente cuando se expone a condiciones hipotónicas o hipertónicas respectivamente (Ben-Amotz y Avron, 1990; Ben-Amotz 1993). Para sobrevivir, estos organismos tienen una alta concentración de β -caroteno para proteger contra la luz intensa y alta concentración de glicerol para proporcionar protección contra la presión osmótica; además acumula grandes cantidades de carotenoides en condiciones de crecimiento adecuadas. La especie se encuentra en la naturaleza tanto en aguas dulces como en hipersalinas (Suárez y cols., 2002).

***Dunaliella salina* y sus condiciones fisicoquímicas para su cultivo.**

Efecto de la luz

Dunaliella, es un género de microalgas muy estudiado para su cultivo en masa. Una especie de dicho género que particularmente destaca, es *D. salina* una alga fotosintética que convierte el dióxido de carbono de la atmósfera en energía y material celular debido a la clorofila de la célula (Borowitzka y Borowitzka, 1988). En microalgas se ha demostrado que el incremento de la densidad celular está en función de la intensidad luminosa hasta un nivel determinado (Kaplan y cols., 1986; Richmond, 1986). Como la *Dunaliella* es un organismo fotoautótrofo obligado, la luz es la única fuente de energía para su metabolismo (Borowitzka y Borowitzka, 1989). La mayoría de los organismos fotosintéticos ajustan su contenido pigmentario como respuesta a los cambios de irradiación, con el propósito de optimizar la utilización de la luz para la fotosíntesis, fenómeno que ha sido denominado fotoaclimatación (Sukenic y cols., 1990). Sin embargo, se sugiere que los fenómenos pueden ser a nivel morfológico (volumen celular) o fisiológico (fotosíntesis y velocidad de crecimiento) (Algarra y Rüdiger, 1993).

La fotoaclimatación además de ser importante desde el punto de vista fisiológico y ecológico, es fundamental para el crecimiento y supervivencia de las algas (Levy y Gantt, 1988), y debe tenerse en cuenta para el desarrollo de cultivos masivos. La intensidad de la luz, tiene también un efecto marcado sobre la composición bioquímica de las microalgas. La *Dunaliella salina*, multiplica su potencial como respuesta a la

(Australia), disminuyen la tasa de crecimiento de *Dunaliella salina*, afectando negativamente el rendimiento celular. Por otra parte, temperaturas cercanas a los 40°C y superiores promueven la producción 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 al medio (Wegmann y cols., 1980), el que puede servir como fuente de carbón orgánico para bacterias y hongos que se vuelven dominantes (Ben-Amotz, 1995). Al contrario, en biorreactores cerrados es posible mitigar algunos de los efectos causados por la temperatura, controlando este parámetro de crecimiento por medio de termostatos.

Efecto del pH

Dunaliella tolera los pH de entre 5.5-10, siendo 7 el óptimo (López-Elías y cols., 2004), sin embargo el pH óptimo para la producción de β -caroteno por *Dunaliella salina* es pH=9 y presenta una amplia tolerancia a la temperatura, siendo la óptima entre 20 y 40° C (Sánchez-Varo, 2000). Esta especie se considera como un alimento adecuado para moluscos, algunos peces de agua dulce y crustáceos.

En cultivos de algas autótrofas el pH se eleva, porque la fijación fotosintética del CO₂ junto con la captación de NO₃⁻ contribuye a una mayor liberación de OH⁻ (Ben-Amotz y Avron, 1989a). Sin embargo a pH altos se puede producir la precipitación de sales de calcio y la floculación de biomasa, especialmente cuando las concentraciones de Ca²⁺ son altas, condición que se encuentra usualmente en muchas fuentes naturales de agua (Ben-Amotz y Avron, 1989a). Esto puede promover también la disminución de la tasa de crecimiento y, por lo tanto, es necesario evitar el crecimiento sobre pH 8 en los cultivos (Ben-Amotz y Avron, 1989a). En estanques abiertos, el pH es mantenido regularmente entre 7,5 ± 0,2 mediante un doble control de CO₂ y HCl, donde el primero es suministrado sistemáticamente hacia el cultivo y el segundo se adiciona ocasionalmente por un control superior (Ben-Amotz, 1995). En algunos estanques exteriores y fotobiorreactores donde la mayor fuente inorgánica de carbón es el ión bicarbonato, el pH sólo es controlado por la adición de HCl.

Efecto de la salinidad

Por otro lado, la concentración de sales inorgánicas disueltas afecta el crecimiento de las microalgas en función de la actividad osmótica, que a su vez varía según la especie. Existen microalgas que sólo toleran concentraciones milimolares, mientras

El estrés biótico es aquel causado por patógenos como bacterias, hongos y virus. A diferencia del estrés abiótico causado por radiaciones, hiperoxia, anoxia, deficiencia mineral, frío, calor, sequía, NaCl, choque osmótico y por especies reactivas de oxígeno (EROs). El estrés abiótico es la principal causa de daño a cultivos junto con el problema de la salinidad, que es el más severo (Mahaja y Tuteja, 2005).

Aunque para la habilidad de *Dunaliella salina*, y otros taxa halofílicos del género, adaptarse a altas salinidades, que van desde un poco superiores a la del agua de mar hasta niveles de saturación (Gibor 1956, Brown & Borowitzka 1979, Loeblich 1982, Roubicek y cols., 1986) ha permitido su mantención en medios de cultivo con alto contenido de sal, libres de especies potencialmente competitivas y de otros contaminantes biológicos.

Pro-oxidantes y Antioxidantes en microalgas.

Muchos autores han comprobado que los extractos de algas marinas presentan actividad antioxidante explicada por varios mecanismos de acción; entre estos se encuentran la capacidad atrapadora de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica (Dutra F y cols., 2007; Jimenez-Escrig y cols., 2001; Chen H y cols., 2006). Adicionalmente se ha comprobado que extractos de vegetales, con compuestos químicos también presentes en las algas, son capaces de inducir enzimas relacionadas con la inactivación de EROs (Yeh CT y Yeh GC., 2005; Yeh CT y Yen GC., 2006)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son pro-oxidantes que se compone de moléculas como los radicales anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) son subproductos que surgen como resultado de reacciones metabólicas normales y como respuesta al estrés. De esta manera, las EROs funcionan como mediadores primarios del daño oxidativo (Thompson y cols., 1987; Del Río y cols., 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999). La producción y remoción de las EROs debe ser estrictamente controlada, realizando su eliminación principalmente por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen los principales amortiguadores celulares redox ascorbato y glutatión (GSH), así como ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, alcaloides, clorofilas y carotenoides. Los mecanismos enzimáticos en plantas incluyen enzimas secuestradoras de EROs como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión

La síntesis de clorofilas depende de la concentración de carbono y la intensidad de la luz de forma lineal (Maloney y cols., 1989), además de la concentración y fuente de nitrógeno (Piorreck y cols., 1984).

La clorofila, reconocida como principio colorante vegetal (Cook y Martin, 1953), no sólo es inocua, sino que es útil desde el punto de vista industrial en el campo alimentario, farmacéutico y cosmético.

En el campo de aplicaciones de las microalgas, se conoce la existencia de un preparado férrico en alcohol absoluto, elaborado a partir de clorofila obtenida de *Spirulina sp.*, patentado como un poderoso desodorante (Yamaguchi, 1981).

Carotenoides (carotenos y xantófilas)

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides poliénicos muy hidrofóbicos, derivados del licopeno. En contraste con las plantas superiores, numerosas especies de algas, exceptuando la mayoría de las clorofíceas, acumulan en el cloroplasto una gran variedad de carotenoides, característicos e inusuales (Goodwin y Britton, 1988).

Las xantofilas, por su parte, son también muy diversas y sus características dependen de la naturaleza del caroteno que les da origen (epoxi, ceto o hidroxilo), ya que no son más que derivados oxigenados de estos pigmentos (Benemann y Weissman, 1984).

Las *Chlorophyta* generalmente contienen los mismos carotenoides mayoritarios que las plantas superiores: α -caroteno, β -caroteno, luteína, neoxantina y los componentes del ciclo de las xantofilas: violaxantina, zeaxantina y anteraxantina (Rowan, 1989); sin embargo, algunas especies acumulan xantofilas inusuales como la lodoxantina o pyrenoxantina (*Chlorella pyrenoidosa*), fritschiellaxantina (*Fritschiella tuberosa*) y sifonaxantina (Goodwin y Britton, 1988). No obstante, de todos los carotenoides mencionados es el β -caroteno, específicamente el isómero 9-*cis*, el de mayor importancia en la industria médico-farmacéutica y cosmética.

El posible papel del β -caroteno en la prevención de la carcinogénesis ha sido ampliamente estudiado. Aunque su mecanismo de acción específico es desconocido se sabe que, de forma experimental, inhibe el cáncer oral (Schwartz y cols., 1988). Asimismo, actúa de forma positiva sobre la reproducción y el desarrollo corporal (Nagasawa y cols., 1989), es importante para la visión (Mathews y Van Holde, 1990),

El ácido ascórbico es el antioxidante más eficaz para evitar la peroxidación lipídica en cualquier tipo de membrana celular, pero éste es muy sensible a la presencia de hierro disuelto al cual puede degradarlo (Kurata y Sakuri., 1967). Uno de los factores fisicoquímicos se incluyen en el proceso de oxidación de ácido ascórbico son influidos por la temperatura, la concentración de sales y azúcares. El pH es muy importante en este caso. También la presencia de oxígeno, catalizadores metálicos, aminoácidos, oxidantes y los reductores inorgánicos influyen en su degradación (Huelin, 1971). Con los desplazamientos de equilibrio entre ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico es importante mencionar que el primer es susceptible a formar complejos con metales de transición (Kurata y Sakurai., 1967) y el segundo a degradación enzimática (Weinberg., 1997).

Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras y propiedades químicas. En plantas vasculares se han identificado más de 8.000 compuestos fenólicos y polifenólicos. Su interés radica, en la actualidad, en la capacidad para actuar como antioxidantes y también, en el hecho de que, varios estudios epidemiológicos han demostrado que su consumo reduce el riesgo de sufrir enfermedades coronarias y cáncer (Hertog y cols., 1993). Estructuralmente, los polifenoles o compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen uno o varios grupos bencénicos sustituidos por uno o más grupos hidroxilo (Souquet y cols., 1996), siendo los flavonoides el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana. Estos compuestos, en función de su estructura química, pueden clasificarse en dos grandes grupos: flavonoides y no-flavonoides, según sean o no derivados del fluoroglucinol (esqueleto de dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado; C₆-C₃-C₆)

Además la presencia de grupos donadores de electrones en las posiciones orto (o) o para (p) del fenol, aumentan su actividad antioxidante. Sin embargo, la actividad antioxidante depende de muchos factores, siendo el más importante la estabilidad o reactividad del radical antioxidante formado después de la eliminación del hidrógeno (Madhavi y cols., 1995). Como antioxidantes, los polifenoles puede proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (EROs) (F.S Martínez y cols., 2002; A. Scalbert y cols., 2005)

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

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

REACTIVOS	MARCA	GRADO DE PUREZA
Bicarbonato de amonio	Merck	99%-101%
Fosfato Monopotásico	Merck	
Sodio fosfato bibásico	Merck	
Ácido metafosfórico	Mallinckrodt Baker	34,0%-36.0%
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	≥99% (titration) ≥ 98%.
N-etilmaleimida	Sigma-Aldrich	98% HPLC.
Acido trifluoroacético	Sigma-Aldrich	99 %
Acido Ortofosfórico	Merck	99,0%
2,2 bipyridina	Merck	
Etanol	Merck	99,9%
Tricloruro de Hierro	Scharlau Chemie	Min. 99%
Acetona	Merck	99,8%
Metanol	Merck	99,8%
2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich	≥98%
Alcohol Metílico	Merck	98%.
Folin Ciocalteu (FRC)	Merck	
Carbonato de Sodio	Merck	99% -102%

Soluciones

I. Ácido Metafosfórico 5% p/v

Se masa 2,5 g de Ácido Metafosfórico y se le adicionó 50 mL de agua destilada.

II. Ácido Ortofosfórico 44% p/v

Se toma 2,2 mL de Ácido Ortofosfórico concentrado y se disuelve con 5 mL de agua destilada.

III. Ácido Trifluoroacético 10% p/v

Equipos y materiales de laboratorio

Tabla 2: Lista de materiales e instrumentos, cantidad, descripción y marca.

Cantidad	Material e Instrumento	Descripción/Marca
1	Balanza analítica	Denver InstrumentCompany AA-200
1	Bureta de 25 mL	Brand AS KPG
1	Centrífuga	
1	Centrífuga eba 20 (8 plazas x 15 ml)	Hettich Zentrifugen
6	Cubetas de vidrio y plástico de 1cm de paso óptico	
1	Espectrofotómetro de absorción molecular	Genesis 6.
1	Estufa	Kottermann 2718
1	Espátula metálica	
10	Matraz Erlenmeyer 250 y 2000 mL	
1	Mortero con pistón	
1	Termorregulador	
1	Pipeta de aforo de 25 mL	
1	Pipeta de embolo de 100-1000 uL	Brand
1	Pipeta de embolo de 20-100 uL	Brand
1	Pipeta graduada de 10 y 5 mL	Brand
1	Pisceta	
1	Probeta de 1000 mL	Le max
30	Tubos de polipropileno de 50 mL y 15mL	Pyrex
7	Vasos precipitados de 50 y 250mL	Pyrex
5	Vasos precipitados de 1000 mL	Pyrex
5	Vidrio de reloj	
1	Vortex	HeidolphReax Top.

suministraron los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (Tabla 3). Finalmente se esterilizaron los bidones en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Tabla 3: Composición de la solución nutritiva de Guillard (1975) modificada.

Macronutrientes		Micronutrientes		Vitaminas	
Compuesto	M (mol/L)	Compuesto	M (mol/L)	Compuesto	M (mol/L)
KNO ₃	8,82x10 ⁻⁴	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,17 x10 ⁻⁵	Tiamina (Vit B ₁)	2,96 x10 ⁻⁷
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,62x10 ⁻⁵	Na ₂ EDTA·H ₂ O	1,17 x10 ⁻⁵	Biotina (Vit H)	2,05 x10 ⁻⁹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	1,06 x10 ⁻⁴	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3,93 x10 ⁻⁸	Vitamina B ₁₂	3,69 x10 ⁻¹⁰
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,60 x10 ⁻⁸		
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7,65 x10 ⁻⁸		
		CaCl ₂ ·6H ₂ O	4,20 x10 ⁻⁸		
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,10 x10 ⁻⁷		

La solución nutritiva empleada para las distintas cepas de *Dunaliella salina* en estudio contenía además una concentración final de 2,0 M de NaCl. Se emplearon éstas concentraciones salinas para generar en cada caso una condición de estrés y así inducir una mayor cantidad de compuestos químicos encargados de regular la presencia excesiva de sales (por ejemplo: antioxidantes).

Parámetros de crecimiento

Recuento de células en cámara de Neubauer (Biomasa)

Este método consiste en colocar 10 µL de cultivo en un portaobjeto especial llamado cámara de Neubauer o hematocitómetro.

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:

Ec.1

$$\boxed{N^{\circ}\text{células} / \text{mL} = X \text{cél} * 10000}$$

- X cél: Promedio de células presentes en varios cuadrados grandes.
- 10000: al multiplicar el promedio por 10000, se obtiene el n° de células en un cm³).

fotooxidación de los pigmentos fueron agitadas durante 1 minuto y luego se procedió a centrifugar los tubos por 2 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante resultante, se empleó para la cuantificación de los pigmentos por espectrofotometría de absorción molecular (Spectronic, modelo Genesys 6). Las longitudes de ondas utilizadas en este análisis fueron 750, 662, 645, y 470 nm, efectuando correcciones (Lacuesta y cols., 1992) cuando las medidas de absorbancia a 750 nm fueron mayores a 0,005 unidades se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = F (\text{Abs. } 750 - 0,002)$$

donde:

F = 1, para la absorbancia a 662 nm y 645 nm

F = 2, para la absorbancia a 470 nm

La concentración de clorofilas, carotenos y xantófilas fueron calculadas mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila A } (\mu\text{g/mL}) = (11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645})$$

$$\text{Clorofila B } (\mu\text{g/mL}) = (20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662})$$

$$\text{Carotenoides (carotenos + xantófilas) } (\mu\text{g/mL}) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,90 \text{ Chl a} - 63,14 \text{ Chl b}}{214}$$

Contenido de polifenoles

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales siguiendo el método de Folin-Ciocalteu Dora Marina Gutierrez y Christopher Alberto Ortiz García (2008) a partir de mediciones espectrofotométricas UV- VIS. Se extrajeron 0,5 mL del extracto metanólico proveniente del ensayo del radical libre DPPH medio que permite la liberación de los compuestos fenólicos de la muestra. Dicha alícuota fue depositada en un tubo recubierto en aluminio y se adicionaron 25 mL de H₂O destilada, se agita para homogenizar. A continuación se tomaron 0,5 mL de la dilución y se añadieron 0,75 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, se homogenizó y dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 0,75 mL de Na₂CO₃ al 20% p/v para poder generar la transferencia de electrones a pH básico y se dejó reposar por 90 min. Luego se midió la absorbancia 760 nm en un espectrofotométrico de ultravioleta-visible. Los valores obtenidos se expresaron en mg/g p.F de la planta, se relacionaron con la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término "Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o material vegetal desecada".

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Producción de biomasa de las 4 cepas de *Dunaliella salina*

La producción de biomasa obtenida en las 4 cepas de *Dunaliella salina* en estrés salino se registró en la **Tabla 4**. Dichas mediciones de biomasa (cél/mL) y materia seca (g/L) fueron realizadas en la fase estacionaria de su crecimiento.

A pesar de que se trata de la misma especie de alga, se observa que la biomasa (cél/mL) es diferente para cada una de las cepas, lo cual podría ser debido a la capacidad que tiene cada una de ellas para adaptarse, en esta zona, a un estrés abiótico (las condiciones salinas empleadas en este estudio).

Tabla 4: Cantidad de biomasa obtenida por las 4 cepas de la *D. salina*.

<i>Dunaliella salina</i>	Biomasa (cél/mL) x 10 ⁵	Materia Seca (g/L)
<i>Cepa Tang</i>	3,98 ± 0,22 ^b	0,19 ± 0,04 ^a
<i>Cepa Conc 007</i>	3,93 ± 0,08 ^b	0,21 ± 0,01 ^a
<i>Cepa Yucatán</i>	5,33 ± 0,57 ^a	0,15 ± 0,02 ^a
<i>Cepa Utex</i>	4,68 ± 0,50 ^{ab}	0,21 ± 0,03 ^a

Los resultados son expresados como el promedio del análisis correspondiente a 5 repeticiones ± el error estándar de la medición.

Las letras distintas señalan diferencias significativas entre las cepas, de acuerdo a Fisher (LSD) con un nivel de significancia $P \leq 0,05$.

Para las microalgas, un ambiente salino rompe la estabilidad de cada célula viva y por tanto el equilibrio se vuelve un foco necesario para evitar la muerte celular.

En el caso de estas cepas, la mayor biomasa expresada como células/mL (Tabla 4) resultó ser de la cepa Yucatán. La diferencia de biomasa registrada en función del número de células podría deberse a que esta microalga, *Dunaliella salina*, sintetizaría osmolitos (ejemplo: carotenoides, glicerol, etc.) para contrarrestar el efecto osmótico de la salinidad, debido a lo cual aumenta el requerimiento energético para generar estas moléculas en desmedro del crecimiento y replicación celular.

evitar la oxidación de los fotosistemas. (MacIntyre y cols., 2002). Esto último explicado corresponde a los resultados de Ben-Amotz y Avron, 1988; Bar y cols., 1995; El-Baz y cols., 2002 en la cual la *D. salina* contiene hasta un 10% β -caroteno en peso seco cuando se cultivan bajo condiciones de estrés, incluyendo: alta concentraciones de sales, alta intensidad lumínica y limitación de nitrógeno.

Hay que tener presente que en los cultivos de microalgas, el efecto de la luz y la temperatura o la interacción de ambos juegan un papel fundamental sobre la capacidad fotosintética, los parámetros de crecimiento y la densidad celular, debido a que las reacciones que en cada una de ellas ocurren están reguladas por enzimas (Richmond, 1986). En especial la intensidad luminosa es importante porque influye sobre el esquema de síntesis macromolecular (Mortain-Bertrand y cols., 1987) y por ende en el metabolismo celular del cual depende la tasa de fijación de carbono.

La importancia que tiene tal acumulación de clorofila en estas condiciones, vinculan la descripción de sustancia anti-oxidante característica de las clorofilas. La clorofila es uno de los mejores neutralizadores de los efectos negativos de los radicales libres en el organismo. Previene de la degeneración celular y orgánica, siendo utilizada como terapia anti-envejecimiento (Kumar SS y cols., 2001).

Por otro lado, los resultados también concuerdan con la pigmentación de las cepas en estudio. El color verde reflejado nos indica la característica innata de la clorofila (a) en absorber los demás colores del espectro electromagnético y por lo tanto, podemos decir que, el espectro de acción de la fotosíntesis se convierte en la eficiencia relativa en la generación de una respuesta biológica en función de la longitud de onda, de los diferentes colores, como por ejemplo la liberación de oxígeno. Cabe destacar que la clorofila (b), es menos abundante que la clorofila (a) en los resultados, lo cual reafirma la definición de clorofilas al inicio de este estudio, que es un pigmento accesorio presente en las microalgas y por lo tanto cumple con las mismas características que los carotenos: en absorber fotones de luz a longitudes de onda diferente, permitiendo la transferencia de energía hacia la clorofila (a), para transformarla en energía química. Además recordar que estamos en presencia de estrés salino y por lo tanto, que la cantidad de clorofila (b) sea menor que la carotenoides totales, respondería a la actividad que presenta la *Dunaliella salina* en acumular grandes cantidades de β -caroteno en respuesta al estrés osmótico (Cowan y cols., 1992; Pick 1998)

Cabe mencionar que el ácido ascórbico es un compuesto hidrosoluble, el cual tiene como principal función actuar como un antioxidante frente al estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (EROs). Algunos estudios (Gossett y cols., 1994; Hernández y cols., 1995; Burdon y cols., 1996; Shalata y Neumann, 2001; Aktas y cols., 2003) indican que las EROs están involucradas en daños a tejidos de plantas inducidos por salinidad. De esta manera, las EROs funcionan como mediadores primarios del daño oxidativo en la senescencia de las plantas (Thompson y cols., 1987; Del Río y cols., 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999). En las plantas, la producción y remoción de las EROs debe ser estrictamente controlada, realizando su eliminación principalmente por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

En este caso, la producción del antioxidante hidrofílico, revelaría que el alto contenido de ácido ascórbico en la cepa Conc 007 respecto de las otras cepas podría proteger a esta microalga de especies reactivas de oxígeno en respuesta a estrés salino.

Además, como antecedente, entre las procariontas, sólo las algas verdes y azules se han notificado por tener una pequeña cantidad de ácido ascórbico, en condiciones no salinas. Tal definición podría sustentar también que las condiciones de salinidad empleadas en este estudio pudo ser factor de aumento del ácido ascórbico (en cepas Conc-007 y Tang). Por el contrario, la baja cantidad de este antioxidante en las cepas UTEX y Yucatán podrían indicar la susceptibilidad al daño celular que pudiese ocasionarse por los radicales libres o bien la baja defensa no enzimática de la microalga en previo estrés salino.

Tabla 6: Contenido de compuestos antioxidantes hidrofílicos en cuatro cepas de *D.salina*.

<i>Dunaliella salina</i>	ASA (mg /g PF)	Compuestos Polifenoles (mg /g PS)
Cepa Tang	24.46 ± 3.44 ^b	1.99 ± 0.22 ^c
Cepa Conc 007	48.22 ± 9.54 ^a	4.66 ± 0.21 ^a
Cepa Yucatán	1.21 ± 0.28 ^c	3.44 ± 0.55 ^b
Cepa UTEX	2.07 ± 0.55 ^c	4.70 ± 0.45 ^a

Los resultados son expresados como el promedio del análisis correspondiente a 5 repeticiones ± el error estándar de la medición.

Las letras distintas señalan diferencias significativas entre las cepas, de acuerdo a Fisher (LSD) con un nivel de significancia $P \leq 0,05$.

CONCLUSIONES

Biomasa:

- De las cuatro cepas en estudio, la cepa Yucatán presentó la mayor productividad en función de células/mL, demostrando su capacidad para adaptarse a la actividad osmótica producida, por el estrés iónico, característica de esta microalga halófila. No obstante, las cuatro cepas en estudio (Tang, Conc 007, Yucatán y UTEX) alcanzaron similar biomasa expresada como g/L, lo que daría cuenta de la posible síntesis de osmolitos y/o acumulación de sales que realizarían estas microalgas con el propósito de contrarrestar el efecto osmótico de la salinidad.

Compuestos antioxidantes hidrofóbicos:

- La cepa UTEX fue la que presentó una mayor cantidad de compuestos antioxidantes hidrofóbicos (carotenoides y clorofilas).

Compuestos antioxidantes hidrofílicos:

- La cepa Conc-007 fue la de mayor producción de ácido ascórbico, contenido que fue significativamente superior a lo producido por las otras cepas de *D. salina*, mientras que el mayor de contenido de polifenoles lo presentaron las cepas Conc-007 y UTEX.

Becker, E.W. (1988). Micro-algae for human and animal consumption. En: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 222-256.

Ben-Amotz, A and M. Avron, (1988). The wavelength dependence of massive of carotene synthesis in *Dunaliella bardawil*. J. Physiol., 18: 529-37.

Ben- Amotz A., Avron M. (1989a) The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. In algal and cyanobacterial biotechnology. Ed. Cresswell, R. C., Ress, T.A.V. and Shain, N. pp. 90-114. London: Longman Scientific and Technical Press.

Ben- Amotz A., Avron M. (1989b) The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J Phycol 25, 175-178.

Ben-Amotz A., Avron M. (1990) the biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. Tibtech 8, 121-126.

Ben-Amotz, A. & Shaish, A. (1992). β -carotene biosynthesis. En: *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Fress Inc. Boca Raton, Florida. pp: 205-214.

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 R-carotene production. J. Appl. Phycol. (7): 65-68.

Benemann, J.R. y Weissman, J.C. (1984). Chemicals from microalgae. En: Bioconversión Systems. Wise, D.L. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 59-70.

Bermudez, J.L., Lodeiros, C. y Morales, E. (2002). Biomass production of the marine microalga *Chroomonas* sp. as a function of pH, lumínic intensity, and salinity. Bol. Invemar. 31(1): 167-185.

Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1987). Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunaliella salina*. In Algal Biotechnology.ed.

Del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Update on Biochemistry. Plant Physiol.* 116: 1195-1200.

Dunal F. (2006). *Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens.* *Ann Sc Nat Bot 2 Sér;*9:172.

Dutra F, Crespo R, Coelho MA, Laneuville V, (2007). *Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante.* *Braz J Pharmacogn.*17(4);631-9.

El- Baz, F.K., M.A Aboul-Enein, G.S. El-Baroty, A.M. Youssef and H.H. Abd El-Baky, 2002. *Accumulation of antioxidant vitamins in Dunaliella salina.* *Online J. Biol. Sci.,* 2: 220-3

F.S. Martínez, G.J. González, J.M. Culebras, M.J. Tuñón, (2002). *Los Flavonoides, propiedades y acciones antioxidantes,* *Nutrición Hospitalaria,* Vol. 17 No 6; 271-278.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). *Growth of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations.* *Aquaculture* 42 : 207-245.

Fábregas, J; Herrero, C; Cabezas, B; Liaño, R. y Abalde, J. (1986). *Response of the marine microalga Dunaliella tertiolecta to nutrient concentration and salinity variations in batch culture.* *J. Plant Physiol.* 125: 475-484.

Fennema, Owen R. (1976). *Principles of Food Science.* Marcel Dekker, Inc. v 1: p. 402-409.

Fookes, J.R. & Jeffrey, S.W. (1989). *The structure of chlorophyll c3, a novel marine photosynthetic pigment.* *J. Chem. Soc. (Chem. Commun.)* : 1827- 1828.

Gantt, E. (1990). *Pigmentation and fotoacclimation.* En: *Biology of Recll Algae.* Cole, K.M. 8s Sheet, R.G. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 203.

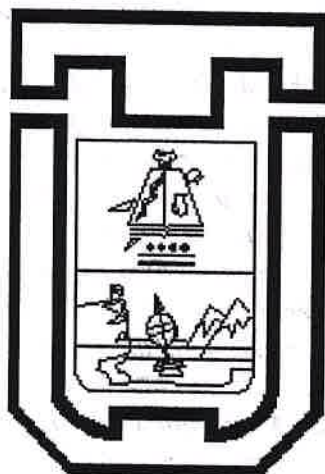
García M, Quinterio R, López A. *Biología alimentaria.* México: Limusa; (2000).

- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman P, Katan M, Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*; 342:1007-11.
- Hong, B., R. Barg and T.H. Ho. (1992). Developmental and organ specific expression of an AB-A and stress-induced protein in barley. *Plant Mol. Biol.* 18: 663-674.
- Hu, G., Y. Zhang and O. Kitts. (2000). "Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. Henonis leaf extract in vitro". *J. Agric. Food. Chem.* 48:3170-3176.
- Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R, Saura-Calixto F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric*;81:530-4.
- Jin, H., Kim, S.-L., Kwon, S.-G., Yoon, J.-H., Lee, C.-U., Lee, D.-J., & Kim, K.-S. (2003), *A&A*, 404, 621.
- Kaplan, D; Cohen, Z. y Abellovich, A. (1986). Optimal growth condition for *Isoch. ysis galbana*. *Biomass.* 9:37-48.
- Kumar SS, et al. (2001). Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. *Free Rad Res* 35:563-74.
- Kurata, T y Sakuri, Y. (1967). *Agri. Biol. Cem* v. 31, p.101.
- Levy, I. & Gantt, E. (1988). Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis and phycobilisomes. *J. Phycol.* 24 : 452-458.
- Leighton, F. 2004. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. (<http://www.antioxidantes.com.ar/I2/FrArtI26.htm>)
- Liaaen-Jensen, S. (1977). Algal carotenoids and chemosystematics. En: *Marine Natural Products Chemistry*. Faulkner, D.J. & Fenical, W.H. (eds.). Academic Press. New York. pp: 521.
- Linden, H. (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim Biophys Acta.* 1446:203-212.

- Mokady, S. (1992). Nutritional, toxicological and therapeutic aspects. En: *Dunaliella* Physiology, Biochemistry and Biotechnology. Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 217- 230.
- Mortain-Bertrand, A., C. Descolas-Gross & H. Jupin. (1987). Stimulating effect of light to dark transitions carbon assimilation by a marine diatom. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112: 11-26.
- Nagasawa, H., Konishi, R., Yamamoto, K. y Ben-Amotz, A. (1989). Effects of carotene rich algae *Dunaliella* on reproduction and body growth in mice. *In vivo* 3: 79-82.
- Nilsen, E.T. and D.M. Orcutt. (1996). *Physiology of Plants Under Stress. Abiotic Factors*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Ochoa C, Ayala A (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad: Revista de Divulgación del Desarrollo Científico y Tecnológico*; 6 (2): 93 -104
- Pick U. (1998). *Dunaliella*: a model extremophilic alga. *Israel J. Plant Sci.* 46:131-139.
- Piorreck, M., Baasch, K.H. & Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem* 23 (2): 207-216.
- Reay D. S., Nedwell D.B., Priddle J., Ellis- Evans J. C. (1999). Temperature dependence of inorganic uptake: Reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Applied Environm. Microbiol.* 65:2577-2584.
- Rema, P., Gouveia, L. (2005). Effect of Various Sources of Carotenoids on Survival and Growth of Goldfish (*Carassius auratus*) Larvae and Juveniles. *J. Anim. Vet. Adv.* 4(7):654-658.
- Rhodes, D. and A.D Hanson. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Richmond, A. (1986a). Cell response to environmental factors. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. A., R. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 69-99.

- Teodoresco EC (1905). Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. *Beih z Bot Centralbl*; Bd. XVIII: 215-232.
- Terlizzi, D.E.J. & Karlander, E.P. (1980). Growth of a coccoid nanoplankton (Eustigmatophyceae) from the Chesapeake Bay as influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *J. Phycol.* 16 : 364-368.
- Thomas, W. H., D. Siebert, M. Alder, A. Neori & P. Eldridge. (1984). Yields, photosynthetic efficiencies and approximate composition of dense marine microalgal cultures. *Biomass*, 5:181-209.
- Thompson JE, Ledge RL, Barber RF (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105: 317-344.
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 504-544.
- Wegmann K., Ben-Amotz A., Avron M. (1980) The effect of temperature on glycerol retention in the halotolerant algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. *Plant Physiol.* 66, 1196-1197.
- Yamaguchi, T. (1981). Strong Deodorant. *Patente N° 116131*. Japan.
- Yaşar, Durmaz, Şevket, Gökpınar. (2006). α -tocopherol and Fatty acids of *Spirulina platensis* Biomass in Glass Panel Bioreactor. *Pak. J. Biol. Sci.* 9(15):2901-2904.
- Yeh CT, Yen GC, (2005). Effect of vegetables on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity and total phenolics. *Free Radical Research*;39(8):893-4.
- Yeh CT, Yen GC (2006). Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. *J Nutritional Biochemistry*;17(8):561-9.
- Zhu, J. K. (2001). "Plant salt tolerance". *Trens Plant Sci.*, 6: 66-71.

**UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS PROVENIENTES DE
DISTINTAS CEPAS DE MICROALGA *DUNALIELLA SALINA***

**INFORME FINAL ACTIVIDAD DE TITULACIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
QUÍMICO(A) LABORATORISTA**

ALUMNOS:

EILYN JARA ALEGRE

FREDDY PEÑARANDA GONZALEZ

PROFESORA GUÍA:

LIBERTAD CARRASCO RÍOS

ARICA-CHILE

2013

Quiero empezar a agradecer a una persona que ya no está en mi vida pero si en mis recuerdos y mis pensamientos, mi madre este es un logro que es dedicado en especial a ti, a mi padre, hermana Pamela, cuñado Esteban , Marlen mi amada pupita y amigos por el apoyo brindado en esta larga etapa que fue la formación académica a través de estos años, al Eric Parra y en especial a la Dra. Libertad Carrasco por el apoyo brindado en la realización de la tesis, por los retos, los consejos, que en verdad se agradecen.

Freddy Peñaranda

Queremos dar el agradecimiento a nuestros profesores presentes y a quienes ya no están con nosotros por dotarnos de conocimiento y enseñanzas de vida, como también a los funcionarios de bodega como Luis Castillo, Goyo y Rubén por tener una buena relación de trabajo y ayudarnos. Agradecer al proyecto FIC P86, "Desarrollo de tecnología de producción masiva de microalgas para obtención de biocombustibles y materias primas de alto valor agregado para creación de un nuevo polo de desarrollo sustentable en la región de Arica y Parinacota".

Muchísimas Gracias.

Análisis multivariado de componentes principales (AMCP), para evaluar la producción de ácidos grasos saturados e insaturados con cada cepa de <i>Dunaliella salina</i>	31
CAPÍTULO V	33
CONCLUSIÓN	33
CAPÍTULO VI.....	34
REFERENCIAS	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Reactivos, marca y grado de pureza.....	15
Tabla 2: Materiales e instrumentos, indicando cantidad, descripción y marca.....	16
Tabla 3: Composición de la solución nutritiva de Guillard (1975) modificada.....	19
Tabla 4. Cantidad de Biomasa y lípidos obtenidos por las cuatro cepas de <i>D. salina</i>	25
Tabla 5. Índice de saponificación y Fracción insaponificable de lípidos extraídos de 4 cepas de <i>D. salina</i>	26
Tabla 6. Índice de acidez e índice de yodo de lípidos extraídos de 4 cepas de <i>D. salina</i>	28
Tabla 7. Contenido de ácidos grasos saturados e insaturados en 4 cepas de <i>D. salina</i>	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cuatro cuadrados grandes de Cámara Neubauer	20
Figura 2. Análisis multivariado de componentes principales para los distintos parámetros de crecimiento y de caracterización lipídica de cuatro cepas de <i>D. salina</i>	29
Figura 3. Análisis multivariado de componentes principales para el contenido de ácidos grasos saturados e insaturados provenientes de cuatro cepas de <i>D. salina</i>	31

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Recuento de células.....	20
Ecuación 2: Porcentaje de lípidos.....	20
Ecuación 3: Índice de saponificación	21
Ecuación 4: Fracción Insaponificable.....	22
Ecuación 5: Índice de Acidez.....	22
Ecuación 6: Índice de Yodo	23

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las microalgas son empleadas en la industria de la acuicultura como fuente de nutrición para moluscos, crustáceos y larvas de peces. Así mismo se han utilizado para la producción comercial de aditivos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos, que se encuentran actualmente en investigación y su uso depende en gran parte, del avance en los estudios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular del cultivo de estos microorganismos (Borowitzka, 1995; López-Ellas y cols., 2004; Raja y cols., 2007).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos oxigénicos con variadas formas y tamaños, capaces de sobrevivir en diferentes hábitats (Rodríguez y Guerrero, 1992). Están presentes en el medio acuático con una gran diversidad de especies, constituyendo el principal alimento primario de la cadena trófica. Son organismos productores que sintetizan nueva materia orgánica a partir de sustratos inorgánicos, lo cual les permite obtener altos rendimientos de biomasa con elevado valor nutritivo (Margaleff, 1977).

Las microalgas son fuente de macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos), micronutrientes (vitaminas y minerales) y sustancias específicas como ácidos grasos y pigmentos como carotenoides. Es por ello que a partir de algunas especies se han obtenido productos químicos con gran valor comercial. No obstante, aún existe un gran número de especies que no han sido estudiadas en cuanto a su capacidad para producir compuestos químicos (Radmer, 1996). Las microalgas son organismos microscópicos que poseen una maquinaria fotosintética capaz de convertir la energía solar en biomasa con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que las plantas superiores (Thomas y cols., 1984). Estos microorganismos presentan tasas altas de producción y adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y se encuentran presentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con los márgenes apropiados de temperatura (Shelef y Soeder, 1980).

Existen también otros factores abióticos que condicionan su crecimiento como luz, aire, nutrientes, etc. (Ben-Amotz y Avron, 1983; Ben-Amotz y Shaish, 1992). Las microalgas por su capacidad fotosintética pueden alcanzar grandes rendimientos solamente con

La *Dunaliella salina*, es uno de los géneros más estudiados en cultivos a nivel masivo, dado su capacidad de acumular β -caroteno y glicerol (Ben-Amotz, 1980; Borowitzka y Borowitzka, 1988). Carece de pared celular rígida lo que facilita su digestión. Es una fuente de proteína unicelular, vitaminas y se utiliza como complemento para alimentos de peces (Fábregas y Herrero, 1985; 1986). La composición celular aproximada de este género es de 50% de proteínas, 20% de carbohidratos y 8% de lípidos (Spectorova y cols., 1982). Bajo ciertas condiciones de cultivo puede llegar a acumular hasta el 80% de carotenos respecto a su peso seco (Ben-Amotz y cols., 1982), esto se favorece en condiciones de alta salinidad, temperatura e intensidad luminosa.

D. salina es un alga fotosintética que convierte el dióxido de carbono de la atmósfera en energía y material celular debido a la clorofila de la célula, pigmento que esta enmascarado por la coloración anaranjada del b-caroteno presente (Borowitzka y Borowitzka, 1988). En los cultivos de microalgas, el efecto de la luz y la temperatura o la interacción de ambos juegan un papel fundamental sobre la capacidad fotosintética, los parámetros de crecimiento y la densidad celular, debido a que las reacciones que en cada una de ellas ocurren están reguladas por enzimas (Richmond, 1986).

Calidad nutricional de la biomasa microalgal

Dunaliella es uno de los géneros más estudiados en cultivos, a nivel masivo, dado su capacidad de acumular β -caroteno y glicerol (Ben-Amotz, 1980; Borowitzka y Borowitzka, 1988). Esta microalga, carece de pared celular rígida lo que facilita su digestión. Es una fuente de proteína unicelular, vitaminas y se utiliza como complemento para alimentos de peces (Fábregas y Herrero, 1985; 1986).

La cantidad de proteínas de todas las microalgas es alta, mientras que la cantidad de azúcar es variable (Salazar, 2010). La composición celular aproximada de este género es de 50% de proteínas, 20% de carbohidratos y 8% de lípidos (Spectorova y cols., 1982).

Bajo ciertas condiciones de cultivo puede acumular hasta el 80% de carotenos respecto a su peso seco (Ben-Amotz y cols., 1982), esto se favorece en condiciones de alta salinidad, temperatura e intensidad luminosa.

Las distintas clases de microalgas poseen diferencias apreciables en su contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos. En cultivos no aireados, se ha reportado a la proteína como mayor componente orgánico (6-34% peso total seco), seguido por lípidos (7-23%) y carbohidratos (5-23%). No hay una clasificación específica para diferenciar microalgas productoras de proteínas de productoras de lípidos, pero *Chlorophytes* (ejemplo: *Dunaliella tertiolecta*) y *Prasinophytes*, presentan un mayor contenido de carbohidratos que otras especies (Salazar, 2012).

La microalga *D. salina* es la mejor fuente comercial de β -caroteno natural, alrededor del 10% del peso seco además de glicerol (20-40 %). Adicionalmente, diferentes especies de *Dunaliella* pueden acumular cantidades significantes de químicos como carotenoides, glicerol, lípidos, vitaminas, minerales y proteínas. También posee un alto potencial para los procesos biotecnológicos como la expresión de proteínas foráneas y en el tratamiento de residuos.

Biosíntesis de lípidos en microalgas

Los efectos en los cultivos microalgales dependientes de la luz son de gran relevancia, ya que están relacionados directamente con el proceso de fotosíntesis (Harwood y Guschina., 2006).

Mejoramiento de la producción de lípidos en microalgas

La producción de lípidos depende de la especie de microalga y de parámetros ambientales tales como la intensidad y el tipo de luz, la composición del medio de cultivo, temperatura, pH y la asociación con otros microorganismos (Beer y cols., 2009). Los cultivos de microalgas presentan la ventaja de que el contenido lipídico puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Chisti, 2007). Numerosos estudios reportan que las algas verdes triplican su contenido lipídico durante los primeros 4 a 9 días de ausencia de nitrógeno en el medio, ésta condición también modifica el perfil lipídico, ya que se han documentado situaciones en las cuales esta insuficiencia incrementa la proporción de triglicéridos y reduce los lípidos polares (Hu y cols., 2008).

El alto contenido de lípidos está asociado a la síntesis de triacilgliceroles (TAG), lípidos con alto porcentaje de ácidos grasos y ausencia de fosfato, que son ideales para la producción de biodiesel por su baja sensibilidad a la oxidación (Pruvost y cols., 2009). Hasta el momento la estrategia de limitación de macronutrientes ha sido el método más empleado para direccionar el flujo metabólico de lípidos (Courchesne y cols., 2009).

Se han reportado estudios donde la deficiencia de nutrientes como hierro y fósforo induce la producción de lípidos y cesa el crecimiento celular; sin embargo la limitación de nitrógeno es el factor nutricional más documentado debido a que no solo promueve la producción de lípidos en microalgas, sino también su acumulación en cuerpos de aceites (Li y cols., 2008).

Se han estudiado diferentes especies de microalgas con elevado contenido lipídico, principalmente con la capacidad de acumular TGA en su estructura celular. Entre las especies de mayor interés se encuentra *Neochlorisoleo abundans*, cuyo porcentaje lipídico alcanza hasta el 65% de peso seco y tiene la capacidad de acumular TGA en condiciones de limitación de nitrógeno, los grupos de investigación de Pruvost y cols., (2009) y Li y cols., (2008) observaron que la fuente de nitrógeno más favorable para el crecimiento celular y producción de lípidos en *N. oleoabundans* es nitrato de sodio, mostrando mejores rendimientos que urea y bicarbonato de amonio; también observaron un aumento en la concentración lipídica conforme disminuía la concentración de nitrato de sodio en el intervalo de concentración 3-20 mM. Sin embargo, una gran desventaja de la estrategia de flujo metabólico inducido es que la limitación de nutrientes o el estrés fisiológico requerido para la acumulación de lípidos en la célula está asociado con la reducción del proceso de división celular y la baja velocidad de crecimiento (Ratledge, 2002).

Las microalgas contienen ácidos grasos en los componentes de sus membranas y en sus fuentes de reserva. La mayor parte de los ácidos grasos acumulados por diferentes cepas de microalgas son especies poliinsaturadas (Cardona Alzate- 2009). La producción de ácidos grasos poliinsaturados a partir de microalgas presenta grandes ventajas alimenticias frente a otras fuentes: hace posible alcanzar niveles de producción elevados en condiciones altamente controladas y con un bajo riesgo de contaminación; es una actividad de una baja demanda de energía que no requiere suelo fértil ni agua de calidad, no compite, por tanto, con otras actividades agrarias. Los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales en la nutrición, pues estos no son sintetizados por las células animales. Los ácidos grasos más importantes en nutrición son los ácidos α -linolénico, ácido graso omega-3 (ω -3) y linoleico (ω -6), y sus derivados, los ácidos araquidónico (AA), eicosapentanoico (EPA) y docohexadecanoico (DHA). (Cardona Alzate- 2009).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos monoenoicos, que se encuentran presentes en las grasas, raramente libres, y casi siempre esterificando al glicerol y eventualmente a otros alcoholes. Son generalmente de cadena lineal y tienen un número par de átomos de carbono. La razón de esto es que en el metabolismo de los eucariotas, las cadenas de ácido graso se sintetizan y se degradan mediante la adición o eliminación de unidades de acetato. Los ácidos grasos como tales ácidos grasos libres son generalmente producto de la acción lipolítica. Sin embargo, son constituyentes fundamentales de la gran mayoría de los lípidos.

Los ácidos grasos son componentes importantes de varios tipos de lípidos: las grasas que explicamos antes y las ceras, por ejemplo. Los ácidos grasos son fundamentales para la vida y muchos de ellos son esenciales, es decir, nuestra bioquímica no puede generarlos y es necesario obtenerlos de la dieta. Por ejemplo, el ácido linoleico y el ácido linolénico.

Los ácidos grasos se dividen en ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados.

Los **ácidos grasos saturados o monoinsaturados**, suelen dar lugar a grasas sólidas y ellos mismos suelen ser sólidos de bajo punto de fusión y aspecto céreo. Ejemplo el ácido esteárico, ácido palmítico o el ácido mirístico. Estas grasas saturadas deben consumirse en la menor cantidad posible, porque nuestro hígado las convierte en

utilizarse para producir otros ácidos grasos (como el ácido araquidónico que se obtiene del ácido linoleico). Sin embargo, como la conversión en ciertos ácidos grasos es limitada, se recomienda incluir fuentes de ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA).

Clasificación general de los lípidos

Lípidos Saponificables

Los lípidos saponificables pertenecen a los grupos de los acilgliceroles, fosfoacilgliceroles, esfingolípidos. Los acilgliceroles o triglicéridos, son los compuestos saponificables por excelencia, son con los que se hace el jabón y el biodiesel. Además, son los compuestos comunes de almacenamiento energético en células eucariontes.

Estos lípidos se hidrolizan en medio alcalino produciendo ácidos grasos, que están presentes en su estructura. Este grupo se dividen en:

Simples: acilglicéridos o grasas, cuando los acilglicéridos son sólidos se les llama grasa y cuando son líquidos a temperatura ambiente se llaman aceites y ceras.

Complejos: Contienen en su molécula carbono, hidrógeno y oxígeno, también contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como glúcido. A los lípidos complejos también se les llama lípidos de membrana pues son las principales moléculas que forman las membranas celulares: Fosfolípidos y Glicolípidos.

Lípidos Insaponificables

Los lípidos insaponificables son los que no se hidrolizan en medio alcalino, los que constituyen este grupo son los terpenos, esteroides y prostaglandinas. Dentro de este grupo se encuentran los terpenos, componentes esenciales de las membranas celulares, hormonas, moléculas de aroma, alcaloides, resinas de plantas, metabolitos secundarios, etc. También se encuentran los esteroides que poseen una estructura que es muy diferente de la mayoría de los lípidos. Están formados por cuatro anillos entrelazados formando una molécula policíclica, el ciclopentanoperhidrofenantreno y por cadenas laterales que parten de estas estructuras cíclicas. Estos compuestos se sintetizan a partir del colesterol y son hormonas lipófilas que atraviesan libremente la membrana plasmática, se unen a un receptor citoplasmático, y este complejo receptor-hormona tiene su lugar de acción en el ADN del núcleo celular, activando genes o

La acidez puede expresarse en varias formas. Cuando se expresa como porcentaje, los cálculos se hacen generalmente bajo el supuesto de que el PM del ácido libre es igual al del oleico. Sin embargo no toda la acidez resultante de la hidrólisis es oleína, ni tampoco el PM medio de los ácidos grasos libres es equivalente al ácido oleico. Puede expresarse el % de acidez en el ácido graso que predomine en la grasa.

La presencia natural de la acidez libre en las grasas, es decir la suma de los ácidos grasos no combinados, resultado de la hidrólisis o descomposición lipolítica de algunos triglicéridos. Al contrario que en la determinación del índice de saponificación, no se determinan los ácidos ligados por ejemplo: los glicéridos.

La acidez de las sustancias grasas es muy variable. Generalmente las grasas frescas o recién preparadas no contienen ácidos grasos libres o si los contienen los tienen en muy pequeñas cantidades, al envejecer, especialmente si no han estado protegidos de la acción del aire y la luz su acidez crece lentamente al principio y con cierta rapidez después.

Índice de Yodo

El índice de yodo (I.Y) es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa. Será mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas (Viente, A., Cenzano, M. 2001). Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos no saturados reaccionan con el yodo, o algunos compuestos de yodo, formando compuestos por adición.

El almidón no se adiciona desde el principio, porque si hay mucho yodo se produce coagulación de la suspensión del almidón y descomposición de esta y al titular con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se espera a que torne a amarillo para colocar el almidón. (FAO, 1999).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Tabla 1: Reactivos, marca y grado de pureza

REACTIVOS	MARCA	GRADO DE PUREZA
Bicarbonato de amonio	Merck	99-101.0 %
Etanol	Merck	96 %vol.
Cloroformo	Merck	p.a.
Éter Dietílico	Merck	p.a.
Hidróxido de potasio	Merck	99% Pellets p.a.
Ácido Clorhídrico	Merck	37 %
Fenolftaleína		
Almidón		
Yoduro de Potasio	Merck	99.7%
Tiosulfato de sodio pentahidratado	Merck	99.5-101.0% p.a.
n-Hexano	Merck	>99.0%p.a.

Soluciones

Ácido Clorhídrico 0,5 M. estandarizado con carbonato de sodio.

Disolución de Almidón 1%. Se pesan 5 g de almidón soluble +/- 0,1 g transferir a vaso pp, agregar agua hasta lograr una pasta libre de grumos, en un matraz de 500mL calentar 400 mL de agua agregar la pasta y llevar a 500 mL, enfriar y guardar.

Disolución Etanólica de Hidróxido de Potásico 2 M, en etanol al 90%.

Disolución de Hidróxido potásico en etanol: unos 0,5 M en etanol.

Disolución de Hidróxido de Potasio 0,01 M. estandarizado con tritisol de HCl 0,1 N.

Centrifuga	MSE
Desecadora	
Embudo de decantación	500 mL
Embudo de decantación	Schott Duran 500 mL
Estufa	Kottermann 2718
Manguera	Para bomba de vacío y refrigerante
Manto calefactor	Tempra modelo 98-I-B
Matraz de fondo plano	Schott Duran esmerilado 500 mL
Papel Filtro	N° 2 ADVANTEC
Perlas de vidrio	
Pinza de embudo	
Pinza de refrigerante	
Pipeta de Aforo	Blau Brand 50 mL
Pipeta de Aforo	HBG Germany 25 mL
Pipeta de aforo	HBG Germany 10 mL
Pisceta	
Probeta	Lemax 50 mL
Probeta	Lemax 100 mL
Propipeta	
Refrigerante a reflujo	Esmerilado NS 29
Soporte universal	
Tubos centrifuga	Falcon 50 mL
Tubos de combustión	Schott Duran 50 mL
Varilla de agitación	
Vaso pp.	Lemax 250 mL
Vidrio de Reloj	
Vortex	Heidolph Reax Top

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 fueron realizados en el Laboratorio de Investigación Bioquímica del Departamento de Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Tarapacá, Campus Velásquez.

Tabla 3: Composición de la solución nutritiva de Guillard (1975) modificada

Macronutrientes		Micronutrientes		Vitaminas	
Compuesto	M (mol/L)	Compuesto	M (mol/L)	Compuesto	M (mol/L)
KNO ₃	8,82x10 ⁻⁴	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,17 x10 ⁻⁵	Tiamina (Vit B1)	2,96x10 ⁻⁷
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,62x10 ⁻⁵	Na ₂ EDTA·H ₂ O	1,17 x10 ⁻⁵	Biotina (Vit H)	2,05 x10 ⁻⁹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	1,06x10 ⁻⁴	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3,93 x10 ⁻⁸	Vitamina B12	3,69 x10 ⁻¹⁰
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,60 x10 ⁻⁸		
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7,65 x10 ⁻⁸		
		CaCl ₂ ·6H ₂ O	4,20 x10 ⁻⁸		
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,10 x10 ⁻⁷		

La solución nutritiva empleada para la *Dunaliella salina* se llevó a una concentración final de NaCl de 2,0 M de NaCl.

Preparación de las muestras de microalga *Dunaliella salina* para el análisis químico.

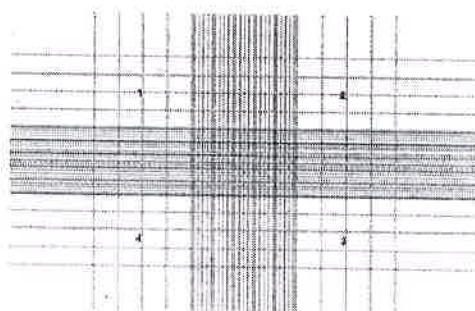
Las distintas cepas de *Dunaliella salina* fueron concentradas por medio de centrifugación a 6000 x g por 5 minutos. Posteriormente, con el propósito de eliminar las sales que pudiesen interferir con la medición del contenido de cenizas, la biomasa microalgal fue lavada con solución de bicarbonato de amonio 2,0 M para así evitar que por efecto osmótico la membrana plasmática se rompa.

Parámetros de crecimiento

Recuento de células en cámara de Neubauer (Biomasa)

Este método consiste en colocar 1 mL del cultivo en un portaobjeto especial llamado cámara de Neubauer o hematocitometro. La muestra queda depositada en un espacio entre el porta y el cubreobjeto.

Se cuentan las células presentes en varios cuadrados grandes indicados como 1, 2, 3 y 4 (Figura 1) y se saca el promedio.



Ecuación 3: Índice de saponificación

$$IS = \frac{(b - a) * C * 56,1}{M}$$

Siendo:

- b: ácido clorhídrico (0,5 M) gastado en el blanco expresado en mL.
- a: ácido clorhídrico (0,5 M) gastados en la muestra expresado en mL.
- C: concentración del ácido clorhídrico en M.
- M: peso de la grasa en g.
- 56,1: masa molar del KOH (g/mol)

Determinación de la Fracción Insaponificable

Saponificación:

Se pesan 0,5 g de biomasa en un matraz redondo, se mezclan con 50 mL de una solución de hidróxido de potasio etanólico. Se saponifican durante 1 hora calentando a reflujo y agitando ocasionalmente. La disolución caliente de jabones obtenida se pasa a un embudo de decantación A y el matraz se lava con un total de 50 mL de agua destilada divididos en fracciones.

Extracción:

Después de enfriar, se pasan 100 mL de n-Hexano al embudo de decantación A, se agita energéticamente y se deja reposar hasta que la separación de fases sea clara. En caso de que se forme una emulsión, esta se rompe añadiendo pequeñas cantidades (< 1-2 mL) de etanol 50% v/v.), que se deja deslizar cuidadosamente por la pared interior del embudo de decantación haciéndola girar.

A continuación, la disolución de jabón (fase interior) se deja caer a un embudo de decantación B. Se añaden 40 mL de agua destilada a la fase de n-Hexano del embudo de decantación A, se agita y la fase acuosa se deja caer al embudo de decantación B. Después se añaden otros 40 mL de agua destilada a la fase de n-Hexano del embudo de decantación A, se agita y se deja reposar.

La disolución de jabón del embudo de decantación B se somete a una segunda extracción con 100 mL de éter de petróleo, se agita hasta la separación de fases sea clara y se pasa la fase acuosa al embudo de decantación C, dejándose la fase hexánica en el embudo de decantación A.

La fase hexánica del embudo de decantación A se lava otra vez con 40 mL de agua destilada, pasándose la fase acuosa tras la separación de fases del embudo de

M: peso de la grasa en g

56,1: masa molar del KOH

Determinación del Índice de Yodo

Se pesan 0,1-1,0 g de biomasa, con una precisión ± 5 mg, se disuelven en matraz erlemeyer con 10 mL de cloroformo y se diluyen con 25,0 mL de la disolución de bromo etanólico. Independientemente de que haya precipitado algo de bromuro sódico, se cierra el matraz y después de agitarlo brevemente se deja reposar durante 30 minutos en oscuridad. Tras añadir 15 mL de disolución de yoduro potásico, el yodo liberado se valora con la disolución patrón de tiosulfato sódico, primero hasta que la disolución adquiera una coloración amarilla (cerca del punto de equivalencia) y después de añadir la disolución de almidón como indicador (el yodo libre y el almidón producen una intensa coloración violeta) hasta que se vuelva incolora (punto de equivalencia). Blanco: Para el ensayo del blanco se procedió de la misma manera, excepto que no se utilizó biomasa (Pardum, 1976).

Ecuación 6: Índice de Yodo

$$I.Y = \frac{(b - a) * C * 129,91}{M * 10}$$

Siendo

b: mL de disolución patrón de tiosulfato sódico (0,1 M) gastados en el ensayo en blanco.

a: mL de disolución patrón de tiosulfato sódico (0,1 M) gastados en el ensayo principal.

C: concentración de la disolución patrón de tiosulfato sódico en M.

M: peso de grasa en g.

126,91: masa atómica del yodo.

Análisis estadístico

La unidad experimental consistió en 1 bidón de 20 L y un número de 5 repeticiones por cada cepa de microalga de *Dunaliella salina*, cepas: *Utex*, *Yucatán*, *007*, y *Tang*.

Los datos obtenidos para cada variable fueron analizados a través de análisis de varianza (ANOVA) para una probabilidad de $\alpha = 0,05$. Cuando fue significativa la

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa y lípidos en 4 cepas de *Dunaliella salina*

La producción de biomasa expresada como cél/mL y como materia seca (g/L) de cada cepa de *D. salina* en estudio, se muestra en la Tabla 4.

En las distintas cepas de microalga *D. salina* se puede observar que la de mayor producción de biomasa (cél/mL) fue Yucatán, seguida por la cepa Tang y entre Utex y 007 aunque estadísticamente no se observan diferencias significativas.

Tabla 4. Cantidad de Biomasa y lípidos obtenidos por las cuatro cepas de *D. salina*.

Cepas de <i>Dunaliella salina</i>	Biomasa (cél/mL) x10 ⁵	Materia Seca (g/L)	Lípidos g/100g
Utex	4,6 ± 0,6 ^{ab}	0,23 ± 0,04 ^a	11,5 ± 1,7 ^b
Yucatán	5,5 ± 0,5 ^a	0,12 ± 0,03 ^c	8,6 ± 0,3 ^b
Conc 007	4,5 ± 0,2 ^{ab}	0,15 ± 0,02 ^{bc}	17,1 ± 2,6 ^a
Tang	3,9 ± 0,3 ^b	0,21 ± 0,03 ^{ab}	8,9 ± 0,8 ^b

Los resultados son expresados como el promedio del análisis correspondiente a 5 repeticiones ± el error estándar de la medición. Las letras distintas señalan diferencias significativas entre las cepas, de acuerdo a Fisher (LSD) con un nivel de significancia $P \leq 0,05$.

Sin embargo, al analizar la biomasa registrada en función de la materia seca (g/L) las cepas que registraron mayor producción fueron obtuvo Utex y Tang y las de menor biomasa en g/L fueron Conc 007 y Yucatán. Como se puede observar en la Tabla 4., la mayor producción de biomasa expresada como cél/mL, no se relacionaría directamente con la producción la materia seca expresada en g/L. Esto puede ser atribuido a que las cepas que presentan mayor materia seca Utex y especialmente Tang, acumularían osmolitos como glicerol para contrarrestar el efecto osmótico de la salinidad en desmedro de la duplicación celular. Este sería un rápido ajuste a la concentración intracelular de glicerol y glicina-betaína (Brown y Borowitzka, 1979). No obstante, a largo plazo puede incluirse además la biosíntesis de lípidos neutros y la acumulación de carotenoides. (Ben-Amotz y Avron 1983; Avron 1986; Chitlaru y Pick, 1991; Mishra y cols., 2008; Chen y Jiang, 2009).

Fracción Insaponificable (F.I) de lípidos extraídos de cuatro cepas de *D. salina*

La Fracción insaponificable registrada en todas las cepas (Tabla 5), no supera el 2%, tal como ha sido informado en distintos estudios sobre microalgas. La Fracción insaponificable dio mucho menor que el índice de saponificación. Los lípidos no saponificables no sufren hidrólisis alcalina. Además, se puede observar que las cepas que obtuvieron mayor F.I fueron la cepa Utex y Yucatán, diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa Conc 007. Esto podría deberse a que las cepas Utex y Yucatán tienen mayor proporción de terpenos, como el β -caroteno y vitamina A, clorofilas, tocoferoles como la vitamina E (que tiene una gran capacidad antioxidante), esteroides (como β -sitosterol el que ayuda a la absorción de colesterol), y compuestos fenólicos.

Índice de Acidez (I.A) de lípidos extraídos de cuatro cepas de *D. salina*

El I.A. se define como el número de miligramos de KOH que se requieren para neutralizar los ácidos grasos libres contenidos en un gramo de grasa.

La acidez de las sustancias grasas es muy variable. Generalmente las grasas frescas o recién preparadas no contienen ácidos grasos libres o si los contienen los tienen en muy pequeñas cantidades. Al envejecer, especialmente si los lípidos no han estado protegidos de la acción del aire y la luz, su acidez crece lentamente al principio y con cierta rapidez después, por esto el índice de acidez se procedió hacerse con la mayor rapidez posible. No obstante, un índice de acidez alto, también puede ser consecuencia del contenido en ácidos grasos libres, provenientes de la hidrólisis de los glicéridos.

Las lipasas microbianas liberan ácidos grasos en mayor o menor grado, muchas veces en función del ajuste osmolito que deben realizar las microalgas crecidas en medios salinos. Para compensar la diferencia de potencial osmótico, aumenta la actividad enzimática de las lipasas, las que cortan los enlaces éster liberando el glicerol, que actúa como osmolito, y aumentando los ácidos grasos libres.

Para compensar la diferencia de potencial osmótico, aumenta la actividad enzimática de las lipasas, las que cortan los enlaces éster liberando el glicerol, que actúa como osmolito, y aumentando los ácidos grasos libres.

Estos resultados, evidenciarían la potenciabilidad del uso de las cuatro cepas más bien con fines nutracéuticos, por el alto contenido de lípidos insaturados. Para ser considerados para la elaboración de biocombustible, se recomienda que los aceites presenten un I.Y inferior a 120 g_l/g lípidos, de esa manera pueden ser competitivos los aceites de microalgas frente a aceites vegetales tradicionalmente empleados para producir biodiesel (Gouveia y Oliveira, 2009).

Análisis multivariado de componentes principales (AMCP), para evaluar las características de los lípidos extraídos con cada cepa de *Dunaliella salina*

En este análisis que resume todos los parámetros analizados anteriormente, permite determinar que de las cuatro cepas de *D. salina* analizadas, la más productora de lípidos es la Conc 007.

Además estos lípidos serían triglicéridos, fosfoacilgliceroles, esfingolípidos, con ácidos grasos insaturados (el vector de lípidos, I.S y I.Y se ordenan en el cuadrante positivo de la Figura 2.), junto a la cepa Conc 007).

La cepa Yucatán se caracterizaría por la alta biomasa (cél/mL), mientras que las cepas Tang y Utex por ser las de mayor acumulación de materia seca.

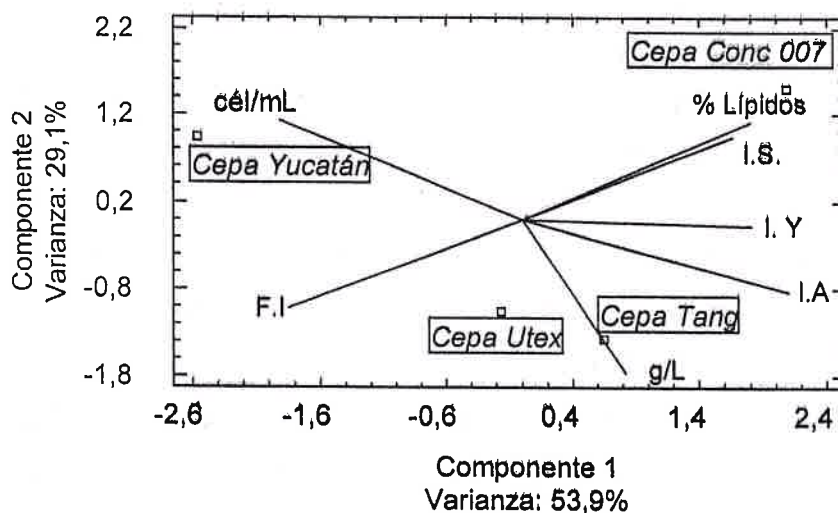


Figura 2. Análisis multivariado de componentes principales para los distintos parámetros de crecimiento y de caracterización lipídica de cuatro cepas de *D. salina*

Análisis multivariado de componentes principales (AMCP), para evaluar la producción de ácidos grasos saturados e insaturados con cada cepa de *Dunaliella salina*

En la Figura 3 se presenta el análisis multivariado de componentes principales (AMCP) para relacionar el contenido de distintos ácidos grasos saturados e insaturados con cada cepa en estudio. Se seleccionaron dos componentes que explican un 96,0% de la variabilidad de la caracterización lipídica, respecto de las cuatro cepas de *D. salina*.

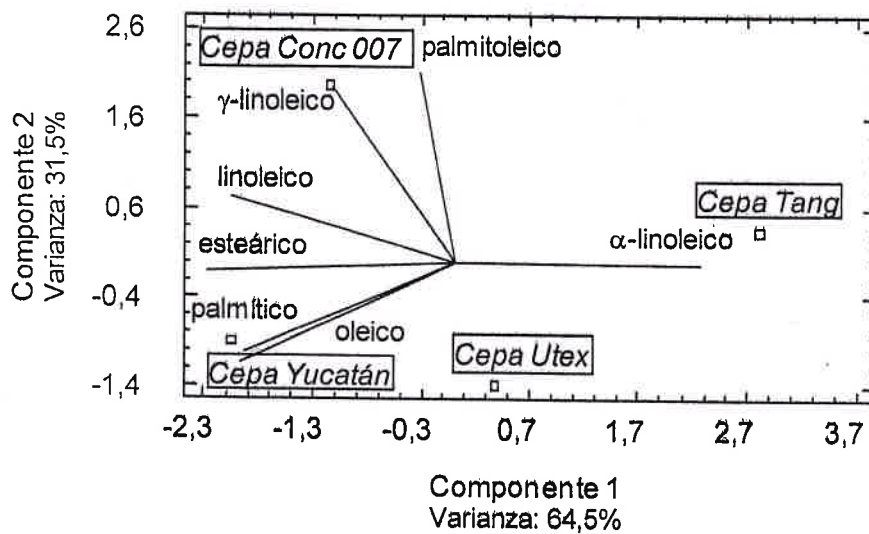


Figura 3. Análisis multivariado de componentes principales para el contenido de ácidos grasos saturados e insaturados provenientes de cuatro cepas de *D. salina*.

En este análisis se observa que entre las 4 cepas de *Dunaliella salina*, la cepa Tang es la más productora del ácido graso insaturado α -linoleico, ácido graso esencial componente importante de las membranas de las células y precursor de muchas otras sustancias del organismo, como las que regulan la presión arterial y la respuesta inflamatoria. Mientras que la cepa 007, se caracterizó por obtener una mayor proporción de ácidos grasos esenciales e insaturados palmitoleico, γ -linoleico y linoleico (cuadrante localizado en el sector negativo del componente 1 y positivo del componente 2). En tanto, la cepa Yucatán se caracterizaría por presentar alto contenido de ácido graso palmítico, esteárico, que son ácidos grasos saturados y que el hígado los convierte en colesterol muy fácilmente. Por esto, un alto consumo de estas grasas se relaciona con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares

CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN

De las cuatro cepas de *Dunaliella salina* en estudio, la de mayor interés debido a su alta producción de lípidos es la Conc 007. Si bien, la cepa Conc 007 no es la de mayor producción de biomasa y materia seca, las características químicas de la fracción lipídica indican que presenta un alto contenido de lípidos saponificables y ácidos grasos insaturados. Además, esta cepa presenta bajo contenido de ácidos grasos saturados que en general no son beneficiosos para la salud, y por el contrario se destaca por el alto contenido de ácidos grasos insaturados y esenciales como el palmitoleico, linoleico, γ -linoleico que le otorgan un interesante y alto valor nutracéutico.

- 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., Avron, M. 1983. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliellabardawil*. Plant Physiol 72, 593-7.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1989a. The Biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. In Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Ed. Cresswell, R.C., Ress, T.A.V. and Shah, N. pp. 90-114. London: Longman Scientific and Technical Press.
- Ben-Amotz, A., Morday, A. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant algae *Dunaliella* for industrial products. Trend in Biotechnol. 8: 121-126.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. 1992. B-carotene biosynthesis. In *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. Ed. Avron, M. and Ben-Amotz, A. pp. 205-216. Boca Raton: CRC press.
- Ben-Amotz, S. Katz, y Avron. M., 1982. Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawill* (Chlorophyceae). J. Phycol. 18: 529-537
- Bligh E.G., Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959 Aug;37(8):911-7.
- Bold, H.C., Wynne, M.J. 1978. Introduction to the algae: structure and reproduction. Prentice-Hall, Inc. EUA. pp. 720.
- Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. 1988. *Dunaliella*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. Microalgal Biotechnol. Cambridge University press. Pp. 27-58
- Borowitzka, M.A. 1981. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. Hydrobiologia, 81: 33-46.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and others biologically active compounds. Journal Applied Phycology 7:3-15
- Borowitzka M.A., 1988. Fats, Oils and Hydrocarbons. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p.257-287
- 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.
- Chen, H., Jiang, J.G. 2009. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. J. Cell Physiol. 219:251-258.
- Cheng, L.H., Lv, J.M., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L. 2010. Enhanced lipid production

- U. y González, M. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo Sonora México.
- Lunn, J., Theobald, H. 2006. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin* 31:178-224
- Manera, M., 2009. Acido esteárico y salud. Los ácidos grasos de los alimentos afectan de manera diferente a los niveles de colesterol en la sangre. Revista impresa, Cuevas, R.. Director de productos, Martínez, A.
- Margaleff, R. 1977. *Ecología*. Editorial Omega. España. 392-400 pp.
- Martinez Rosario, 2011. Microalgas, separación y extracción de lípidos.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from Oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34(1):1-5. 2009.
- Miao, X., Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97:841-846.
- Mishra, A., Mandoli, A., Jha, B. 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:1093-1101.
- Murphy, D.J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*. 40: 325-438.
- Olguin, E. 1984. Microalgae biomass as source of the chemicals, fuels, and proteins. In: Sixth Australian Biotechnology conference. University of Queensland. St. Lucia Brisbane.
- Padmanabhan, A., Stanley, S. 2012. Microalgae as an oil producer for biofuel applications. *Research Journal of Research Sciences*. 1(3):57-62.
- Pardum H. 1976. *Analyse Der Nahrungsfette*, Verlag Paul Parey, Berlin S. pp: 85, 86, 93, 164.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*. 100(23): 5988-5995.
- Radmer, R.J. 1996. Algal University and Commercial Algal Products. *Bioscience* 46: 263-270.
- Raja, R., Shanmugam-Hema, I., Dakshnamoorthy, B., Ramasamy, R. 2007. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiological Research* 162: 168-176.
- Rajakumari, S., Grillitsch, K., Daum, G. 2008. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research*. 47(3): 157-171.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*. 30(6): 1047-1050.

ANEXO

Procesos para la obtención y posterior cultivo de las cepas:



Figura 1-. En el cultivo de las algas se utilizó agua de mar.

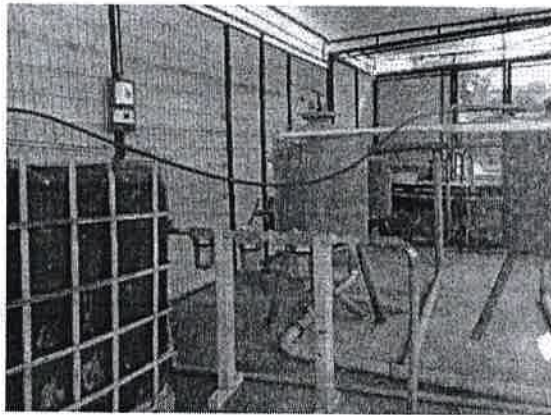


Figura 2-. Se utilizó un sistema de filtración para limpiar.

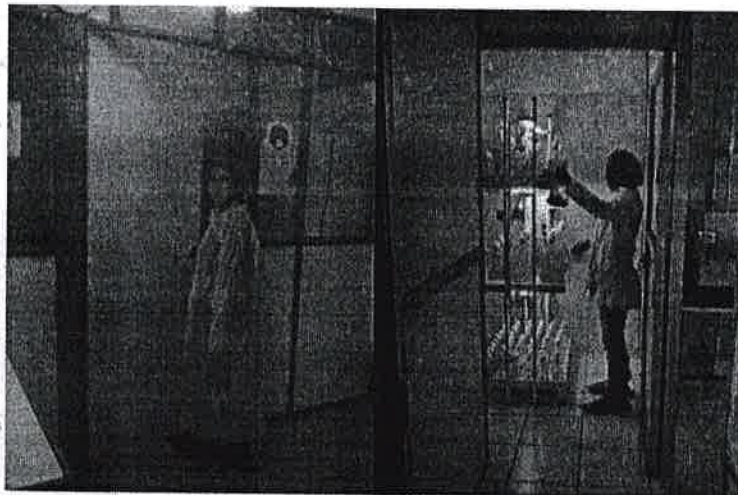


Figura 3 y 4-. A la izquierda sala de proceso y a la derecha sala de cultivo respetando las normas para no contaminar las muestras.

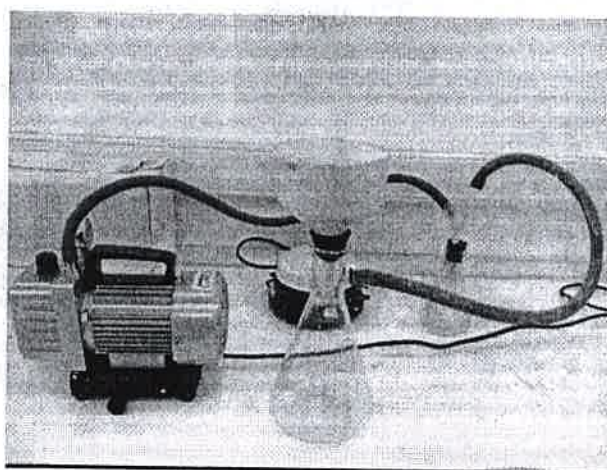


Figura 11-. Bidones con las cepas finalmente.

Concentración de biomasa



Figura 12-. Las microalgas se trasvasian a tubos falcon para concentrarlos posteriormente.



16.- Extracción del lípido mediante una bomba de vacío.

Imágenes de análisis

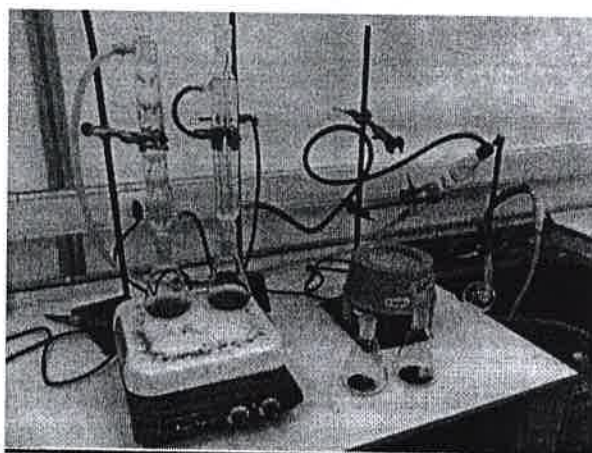


Figura 17.- Saponificando.

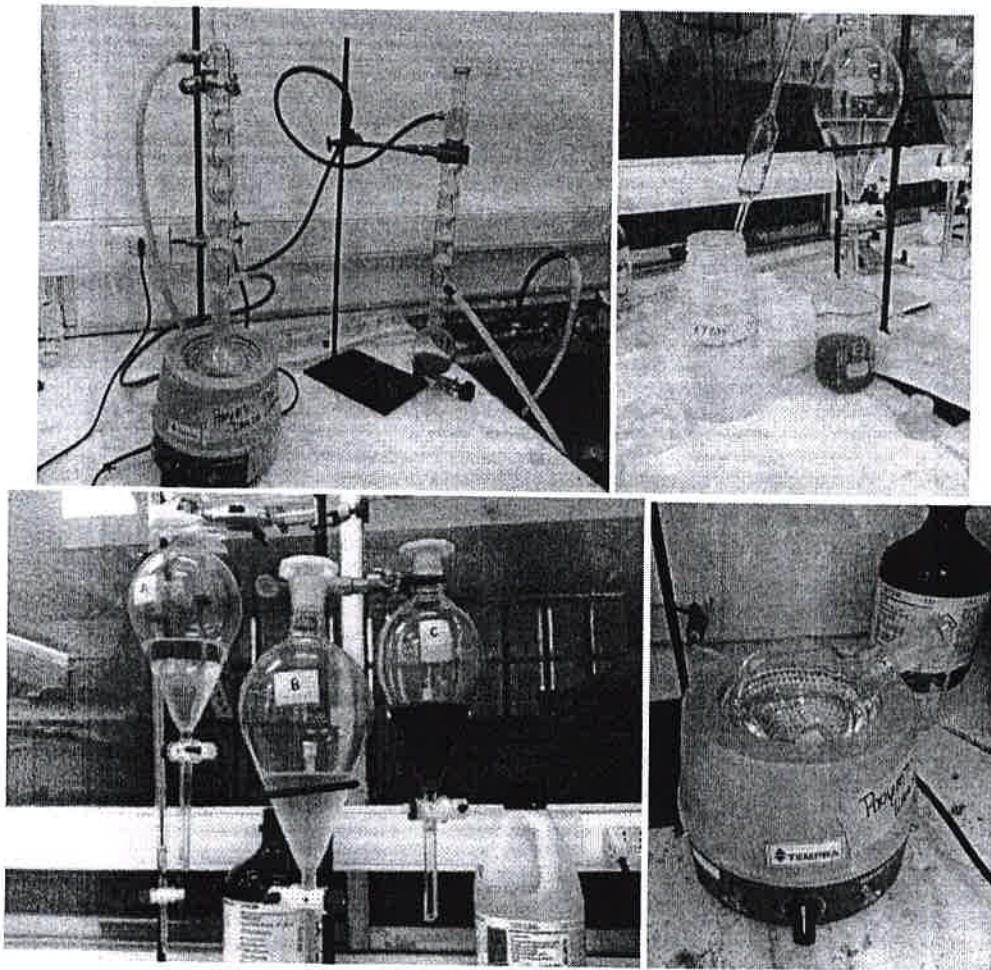


Figura 22,23 24 y 25-. Determinación de la fracción insaponificable.

De: "Graciela Munoz" <edbiotec@ucv.cl>
Asunto: [ejbiotechnology] Submission Acknowledgement
Fecha: Lun, 2 de Diciembre de 2013, 10:40 am
Para: lcarrasc@uta.cl

Dear Dr Libertad Virginia Carrasco,

Thank you for submitting the manuscript, "Effect of temperature and growth phase on the biochemical composition of *Cryptocodium cohnii*" to Electronic Journal of Biotechnology.

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress by logging into the journal web site:

Your manuscript will enter into the editorial process with the ID number: 1690.

Manuscript URL:

<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/author/submission/1690>
Username: libertad

Sincerely,

Electronic Journal of Biotechnology

This message was automatically generated, please do not respond.

Electronic Journal of Biotechnology
<http://www.ejbiotechnology.info>

Electronic Journal of Biotechnology

- User Home
- New issue alert
- Submit a manuscript
- Log Out

[HOME](#) [ABOUT](#) [EDITORIAL BOARD](#) [SEARCH](#) [ARCHIVES](#) [CURRENT](#) [FORTHCOMING](#)

Home > User > Author > Submissions > #1890 > Summary

[SUMMARY](#) [REVIEW](#) [EDITING](#)

Submission

Authors Libertad Virginia Carrasco

Title Effect of temperature and growth phase on the biochemical composition of *Cryptocodinium cohnii*

Original file [1690-6344-1-SM.docx](#) 2013-12-02

Supp. files None [Add A Figure Or Table File](#)

Submitter Libertad Virginia Carrasco

Date submitted December 2, 2013 - 09:40 AM

Section Research Articles

Editor None assigned

Status

Status Queued for review

Initiated 2013-12-02

Last modified 2013-12-02

Submission Metadata

[Edit Metadata](#)

Authors

Name Libertad Virginia Carrasco

Affiliation Universidad de Tarapaca

Country Chile

Bio statement —

Principal contact for editorial correspondence.

Title and Abstract

Title Effect of temperature and growth phase on the biochemical composition of *Cryptocodinium cohnii*

Abstract

Microalgae are able to modify their biochemical composition according to the growing conditions and they can produce potentially beneficial compounds for human health. The aim of this study was to evaluate in *Cryptocodinium cohnii*, the effect of the growth phase and the application of different temperatures on the macromolecules: proteins, carbohydrates, lipids and omega fatty acids (DHA and oleic acids) content with particular emphasis on DHA production. *C. cohnii* was cultivated for 60h at 25°C (exponential growth phase) 96h at 25°C (early stationary phase). *C. cohnii* was subject to three different temperatures: 10°C, 15°C and 20°C at each stage of growth to induce the production of DHA. The results indicate that under the experimental conditions used in this study, the exponential growing phase and a 20°C temperature affect the accumulation of

JOURNAL TOOLS

- Information
- For Readers
 - For Authors
 - For Librarians

Journal Content Search

All

Search

Browse

- By Issue
- By Author
- By Title

Author Submissions

- Active (1)
- Archive (0)
- New Submission

Frequently Asked Question (FAQ)

- General
- Subscription
- Technical support
- Contact
- How to search

THIS JOURNAL IS INDEXED AT :

- SCOPUS
- Web of Science
- Medline
- SciELO
- eQuipu
- PKP

SCIMAGO JOURNAL RANK :

Indicator	2015-2012	Value
SJR		0.31
Cites per doc		0.93
Total cites		208

SHARE

0

UNIQUE VISITORS

5,782	1,175	661
5,140	998	638
3,645	838	613
3,392	799	604
1,588	777	595
1,536	719	523

You: CL Newest: GA

Indexing

Sub-discipline(s) * Marine Biotechnology; Microbial Biotechnology

Keywords DHA, lipids, salinity, microalgae, *Cryptocodinium cohnii*.

Language en

Financial Support

Agencies The Fondo de Innovación para la Competitividad (FIC-2011, P86) of Gobierno Regional de Arica y Parinacota financially supported this work.

ISSN: 0717-3458

Contact: edbiotec@ucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
 Av. Brasil 2950, Valparaíso, Chile
 Copyright © 1997- 2013 by Electronic Journal of Biotechnology

Effect of temperature and growth phase on the biochemical composition of *Cryptocodinium cohnii*

Johana Fernández¹, Libertad Carrasco-Ríos²

1 Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología, Medellín-Colombia

2 Universidad de Tarapacá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Arica-Chile

Corresponding author: johana.fdez@gmail.com, lcarrasc@uta.cl

Financial support: the Fondo de Innovación para la Competitividad (FIC-2011, P86) of Gobierno Regional de Arica y Parinacota financially supported this work.

Abstract Microalgae are able to modify their biochemical composition according to the growing conditions and they can produce potentially beneficial compounds for human health. The aim of this study was to evaluate in *Cryptocodinium cohnii*, the effect of the growth phase and the application of different temperatures on the macromolecules: proteins, carbohydrates, lipids and omega fatty acids (DHA and oleic acids) content with particular emphasis on DHA production. *C. cohnii* was cultivated for 60h at 25°C (exponential growth phase) 96h at 25°C (early stationary phase). *C. cohnii* was subject to three different temperatures: 10°C, 15°C and 20°C at each stage of growth to induce the production of DHA. The results indicate that under the experimental conditions used in this study, the exponential growing phase and a 20°C temperature affect the accumulation of DHA. Furthermore, *C. cohnii* is capable of producing up to 48.96% protein content; which is significantly higher than that one reported in previous studies and 54.13% of total carbohydrates. This makes of *C. cohnii* a source of metabolites of nutraceutical and commercial interest.

Keywords: DHA, lipids, salinity, microalgae, *Cryptocodinium cohnii*.

The different types of marine organisms are capable of generating different types of secondary metabolites and a high level of chemical diversity as a defense strategy to survive in highly competitive environments (Cardozo et al. 2007). However, the type and amount of metabolites produced by marine organisms are influenced by environmental factors such as temperature, light, carbon source, among others. Furthermore, the capability and the type of stress response generated by the environmental conditions varies from one specie to the other (Renaud et al. 2002).

Other alternative sources of DHA have been explored like microorganisms belonging to the *Shewanella*, *Moritella* *Colwellia* genders from the proteobacteria division. However, the productivities obtained are very low to be considered for an industrial process (Hinzpeter et al. 2006). Microorganisms of the *Schizochytrium* and *Thraustochytrium* genders belonging to the family *Thraustochytriaceae* generally considered marine protists have also been investigated, however, they also have a high percentage of EPA (Bowles et al. 1999). A promising source of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6) is *Crypthecodinium cohnii* a marine dinoflagellate, strict heterotrophic (Jiang et al., 1999). Furthermore, due to its unique lipid composition it can accumulate about 20% in lipids. Within this lipid fraction 30-50% correspond to DHA, whereas other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) do not represent more than 1% (De Swaaf et al. 1999). This simplifies and reduces the purification costs of DHA converting it into a productive species of great productive interest (Mendoza et al. 2008).

C. cohnii is able to modify its biochemical composition according to the culture conditions (Mendes et al. 2009) and responds to low temperatures by increasing the proportion of DHA and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in order to maintain functionality and fluidity of the membrane. This is due to that fact while increasing the degree of unsaturation of fatty acids that form part of phosphatidylethanolamine, main phospholipid, that constitutes the membrane, manage to increase its ability to form hexagonal phases and thus to stabilize the membrane at such temperatures. Moreover, low temperatures lead to a high molecular intracellular level of oxygen, which increases the activity of the desaturase and elongase enzymes involved in PUFA biosynthesis (Jiang et al. 2000; Renaud et al. 2002). However, low temperatures affect negatively the biomass production (Oliveiro et

C. cohnii, the culture was submitted to: 60h incubation time at 25°C, incubation time where the strain is in its early growing stationary phase and 96h at 25°C.

To evaluate the effect of the temperature over the biochemical composition of the *C. cohnii*, the culture was submitted to three different temperatures: 10°C, 15°C and 20°C.

Table 1. Treatments applied to *C. cohnii* cultures in seawater medium in 2L flasks.

Treatment	Incubation Time h	Temperature °C
T1	60	10°C
T2	60	15°C
T3	60	20°C
T4	96	10°C
T5	96	15°C
T6	96	20°C

The inoculation was done in a laminar flow chamber, previously disinfected (70% ethanol) and then irradiated with UV light for 15 minutes. The culture media and other materials were sterilized by autoclave at 121°C for 20 minutes.

Determination of cell concentration. The cell concentration was determined by cell counting with a Neubergger chamber, using a CX - 31 model Olympus microscope. The number of cells per mL was obtained according to the following formula:

$$\frac{cel}{mL} = \frac{\text{number of cells}}{4} * 10,000$$

Determining the growth rate. The cell growth rate (μ) was calculated from the slope of the stright line that results from the graphic $\ln (X/X_0)$ vs. time, where x is the number of cells and x_0 corresponds to the initial cell number . The doubling time (g) was determined by the equation $g = (\ln 2/\mu) \text{ day}^{-1}$. The number of divisions was calculated with $K = 1/td$.

Lipid content determination: lipids were determined by the Soxhlet (Official Method Food Analysis- 2000. Association of Official Analytical Chemists (AOAC))

growth phase exponential phase (60 h), early stationary phase (96h) 3 at three temperatures employed (10, 15, 20°C). The data for each variable were analyzed by a variance analysis (ANOVA) for a probability of $\alpha = 0.05$. When the interaction was significant an analysis of simple effects was performed the analysis of simple. For comparison of the averages the Tukey test was used at a level of significance of 95%. A multivariate analysis of the main components for all variables recorded was performed. The statistical program used was the Statgraphic version 5.1 plus.

Results and Discussion

Evaluation of growth in seawater of *C. cohnii*

The growth of *C. cohnii* in seawater was evaluated. Figure 1 shows the growth curve where the standard medium cultures reach the exponential phase after 4 days of incubation, obtaining a maximum biomass of $6.5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$. In the case of cultures in seawater reach exponential phase the second day of incubation and maximum biomass of $12 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$.

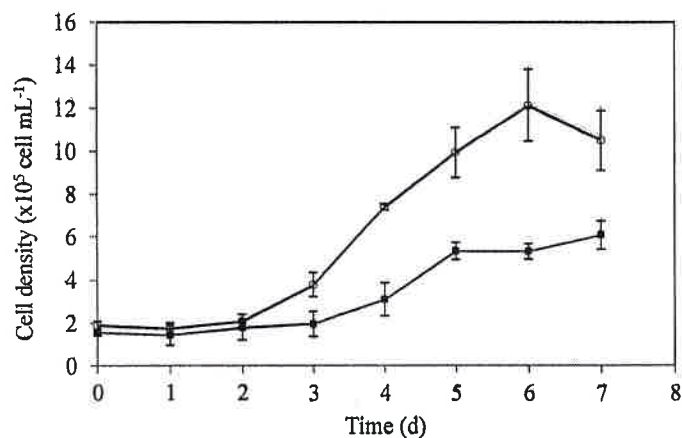


Figure 1. (○) *C. cohnii* cultivated in seawater medium, 9 gL^{-1} glucosa, 2 gL^{-1} yeast extract (■) *C. cohnii* cultivated in standard medium for *C. cohnii* with 30 gL^{-1} of sea salt, 9 gL^{-1} glucose and 2 gL^{-1} yeast extract. Values are the average of three replicates \pm standard error.

whereas De Swaaf et al. (2003) obtained a growing rate of 2.064 days^{-1} using acetic acid as a carbon source.

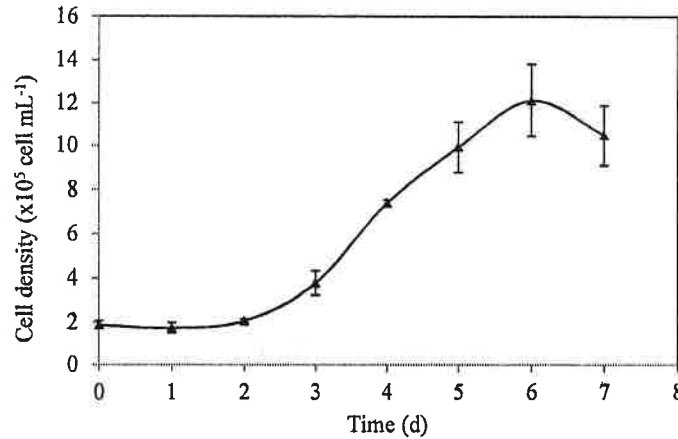


Figure 2. *C. cohnii* growing curve cultivated for 124 hours at 25°C in seawater medium.

Values are the average of three replicates \pm standard error.

Although these results conform to the fact that within microalgae species a rapid growth is considered when μ is close to 2.16 days^{-1} and the duplication time oscillates between 0.29 and 0.625 days (Bumbak et al. 2011). The media used in most studies are expensive and of difficult preparation which makes its industrial application, difficult and this represents one of the main problems of *C. cohnii* industrial scaling (De Swaaf et al. 1999). In the case of the acetic acid, for example, a great part of the culture cost would go to the maintenance of fermentation equipment due to the corrosion caused by the acid and it would require great care in its use to avoid possible injuries when there is skin contact (Mendes et al. 2007).

Table 3. Growing rate, duplication time, number of divisions and number of cells obtained for *C. cohnii* cultivated in 2L flasks at 25°C for 124 hours.

Parameter	Value
$\mu(\text{days}^{-1})$	0.41 ± 0.02
$g(\text{days})$	1.71 ± 0.11

Table 4. Effect of the growing phase and temperature change over the protein contents, ash, DHA, oleic acid, soluble and insoluble carbohydrates, lipids and dry weight.

Exponential Phase								
(°C)	Protein	Ash	Soluble C.	Insoluble C.	Lipids	DHA	Oleic	Dry weight
	g/100 g MS	%	%	%	%	g/100 g lipids	%	g/L
10	48.96 ^{Aa}	6.42 ^{Aa}	5.25 ^{Ab}	32.83 ^{Aa}	6.54 ^{Aa}	6.33 ^{Bb}	6.08 ^{Bb}	0.27 ^{Bb}
15	47.45 ^{Aa}	6.56 ^{Aa}	8.42 ^{Aa}	31.47 ^{Ba}	6.10 ^{Aa}	6.49 ^{Ab}	6.71 ^{Ba}	1.19 ^{Ba}
20	46.39 ^{Aa}	5.21 ^{Aa}	5.46 ^{Ab}	32.66 ^{Aa}	10.29 ^{Aa}	16.59 ^{Aa}	5.09 ^{Bc}	0.99 ^{Ba}
Early stationary phase								
10	38.53 ^{Ba}	6.25 ^{Aa}	11.66 ^{Ba}	37.68 ^{Aa}	5.87 ^{Ab}	8.38 ^{Aa}	8.95 ^{Ab}	1.61 ^{Aa}
15	33.13 ^{Bb}	7.32 ^{Aa}	12.70 ^{Ba}	41.43 ^{Aa}	5.43 ^{Ab}	3.16 ^{Bb}	9.30 ^{Aa}	1.90 ^{Aa}
20	33.56 ^{Bb}	4.42 ^{Ab}	8.38 ^{Ab}	41.74 ^{Aa}	11.89 ^{Aa}	3.54 ^{Bb}	8.14 ^{Aa}	1.59 ^{Aa}

Values correspond to the average of three replicates. Capital letters indicate comparisons between growing phases for the same temperature; lower cases letters indicate comparisons between temperatures of the same growing phase. Different letters denote significant differences among treatments ($P \leq 0.05$).

The highest insoluble carbohydrates percentages were the ones recorded in T5 and T6 treatment (early stationary phase) and they equal 41.43% and 41.74% respectively. Loeblich et al. (1984) established that *C. cohnii* uses the starch as the primary storage molecule and that the cellulose is the main constituent of the teak plates. This would explain the high percentages of insoluble carbohydrates found in *C. cohnii* in this study. The growing phase constituted a significant effect on the dry weight obtained which was higher in the treatments made in the early stationary phase. The greatest amount of dry weight, 1.90 gL⁻¹, was obtained in T5 (early stationary phase, 15°C). *C. cohnii* is recognized as a fast growing dinoflagellate. In this regard, De Swaaf et al. (2002) reported 26 gL⁻¹ of dry weight, in semi-continuous cultures using 20 gL⁻¹ of glucose as a carbon source. While Mendes et al. (2007) reported 46 gL⁻¹ dry weight, also in semi-continuous cultures using carob syrup as carbon source equivalent to a concentration of 8.8 gL⁻¹ of glucose. It has to be noted that the concentration of glucose used in the trials with carob syrup is less than the

(growing phase and temperature). Two components were selected that explain an 88.2% of the variability of the biochemical composition, in relation to the treatments.

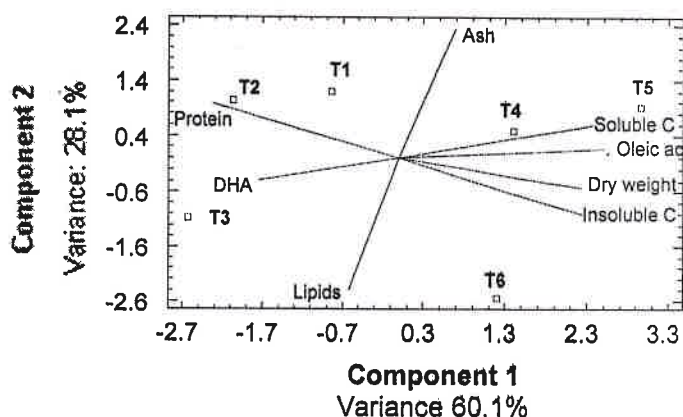


Figure 3. Multivariate analysis of the main components of the temperature effect and growing phase on the protein content, ash, DHA, oleic acid, soluble carbohydrates, insoluble carbohydrates, lipids and dry weight.

Cells generally coordinate synthesis of different macromolecules including proteins, lipids and carbohydrates during cell growth to ensure that they are available and in sufficient quantity at the time of division. However, the influence that environmental conditions has on the distribution of major macromolecules varies from species to species (Renaud et al. 2002). AMCP shows the lipid content, protein and DHA treatments recorded in T1, T2 and T3 (exponential phase), are interrelated and are sorted in the negative field component 1 of the graph (Figure 4). Moreover, the AMCP shows that the content of soluble and insoluble carbohydrates, oleic acid and dry weight recorded in treatments T4, T5 and T6, made in the early stationary phase, relate to each other and are placed in the positive sector component 1 of the graph (Figure 3).

Through this analysis it can be seen that temperature changes made during the exponential phase show higher protein content than those obtained in the treatment in the early stationary phase. This supports that the cells at this growing stage are constantly dividing.

Colombia. We thank the technical staff FIC-R-2011 Project, P86: Eric Parra, Paz Galeno, Patricio Oxa and Camilo Urbina for the continued assistance.

References

- BOWLES, R.D.; HUNT, A.E.; BREMER, G.B.; DUCHARS, M.G. and EATON, R.A. (1999). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *Journal of Biotechnology*, vol. 70, no. 1-3, p. 193–202. [\[CrossRef\]](#)
- BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S. and KOVAR, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91, no. 1, p. 31-46. [\[CrossRef\]](#)
- CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCAO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P. and PINTO, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 146, no. 1-2, p. 60–78. [\[CrossRef\]](#)
- CASTRO, S. and TAVANO, V. (2005). Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, vol. 246, no. 1-4, p. 405-412. [\[CrossRef\]](#)
- DE SWAAF, M.; DE RIJK, T.; EGGINK, G. and SIJTSMA, L. (1999). Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of biotechnology*, vol. 70, no. 1-3, p. 185-192. [\[CrossRef\]](#)

- JIANG, Y.; CHEN, F. and LIANG, S-Z.(1999). Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process biochemistry*, vol. 34, no. 6-7, p. 633-637.[CrossRef]
- JIANG, Y. and CHEN, F. (2000). Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 77, no. 6, p. 613-617.[CrossRef]
- KATSUDA, T.; LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K. and KATOH, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, no. 1, p. 81-86.[CrossRef]
- KWOK, A.C.M. and WONG, J.T.Y. (2005). Lipid biosynthesis and its coordination with cell cycle progression. *Plant & Cell Physiology*, vol. 46, no. 12, p. 1973-1986.[CrossRef]
- LIN, S. (2011). Genomic understanding of dinoflagellates. *Research in Microbiology*, vol. 162, no. 6, p. 551-569.[CrossRef]
- LOEBLICH, A.R., III (1984). *Dinoflagellate Physiology and Biochemistry*. In *Dinoflagellates*. Edited by Spector, D.L. pp. 300-332. Academic Press, Inc., New York.
- LOPES DA SILVA, T.; MENDES, A.; MENDES, R.L. CALADO, V.; ALVES, S.S.; VASCONCELOS, J.M.T. and REIS, A.(2006). Effect of n-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 6, p. 408-416.[CrossRef]
- MENDES, A.; GUERRA, P.; MADEIRA, V.; RUANO, F.; LOPES DA SILVA, T. and REIS, T. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 9, p. 1209-1215.[CrossRef]

RATLEGDE, C.; KANAGACHANDRAN, K.; ANDERSON, A.L.; GRANTHAM, D.J. and STEPHENSON, J.C. (2001). Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *American Oil Chemists Society: Lipids*, vol. 36, no. 11, p. 1241-1246. [\[CrossRef\]](#)

RATLEDGE, C.; ANDERSON, A.J.; KANAGACHANDRAN, K. 2003. Method of culturing of *Cryptocodinium cohnii*. GB Patent 103301.

RENAUD, S.M.; LUONG-VAN, T.; LABRINIDIS, G. and PARRY, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, vol. 211, no. 1-4, p. 195-214. [\[CrossRef\]](#)

SANHUEZA, J.; NIETO, S. and VALENZUELA, A. (2004). Docosahexaenoic acid (DHA), brain development, memory and learning: the importance of perinatal supplementation. *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 31, no. 2, p. 84-92. [\[CrossRef\]](#)

STATGRAPHICS PLUS 5.1 (2001). Statistical Graphics Corporation. Princeton USA.

VALENZUELA, R.; TAPIA, G.; GONZÁLEZ, M. and VALENZUELA, A. (2011). Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 38, no. 3, p. 356-367. [\[CrossRef\]](#)

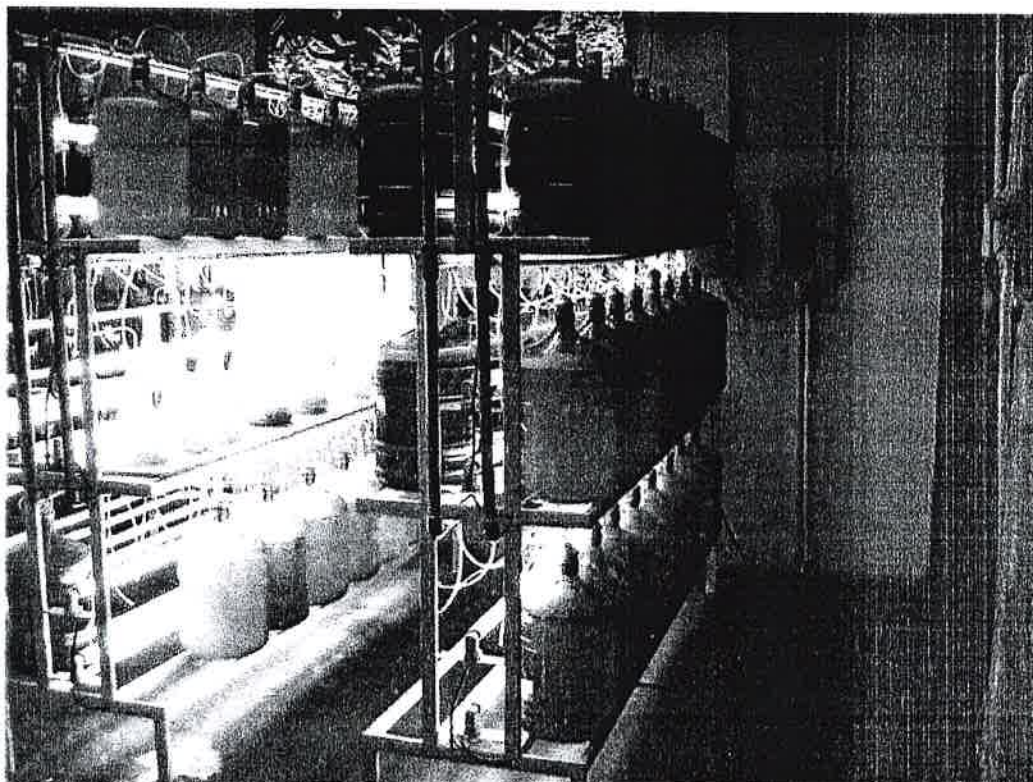
ANEXO 6

Registro Fotográfico

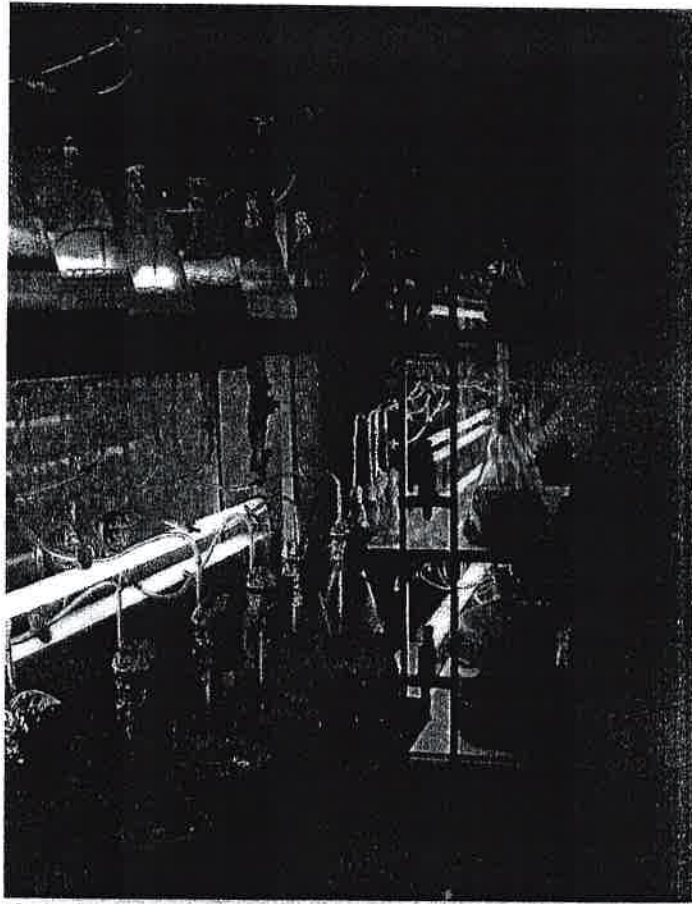
ANEXO

FOTOGRAFÍAS E IMÁGENES DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.

VISITA A TERRENO: Planta Industrial de Producción de microalgas en pampa del Tamarugal (Atacama Bionatural Products S.A.)



Visita a Cepario industrial de D. salina cultivada con medio basado en agua dulce y sal adicionada.



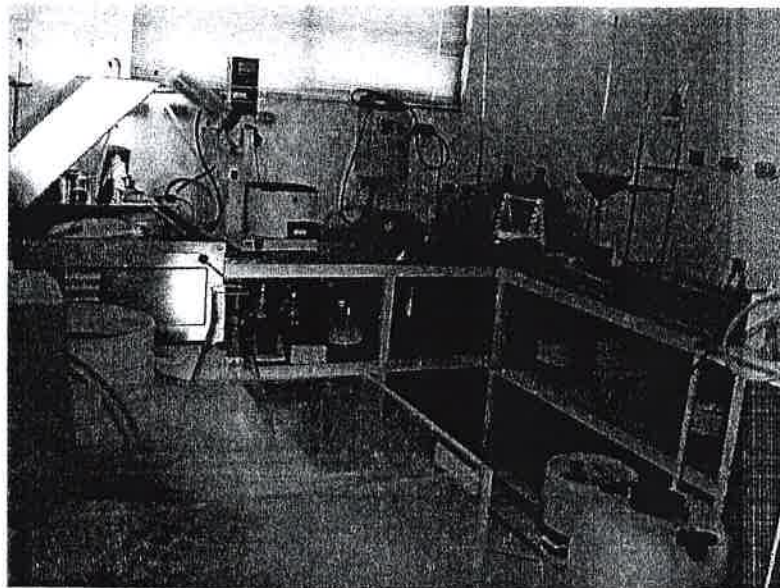
Visita a Cepario Industrial de Dunaliela Salina (Atacama Bionatural Products S.A.)



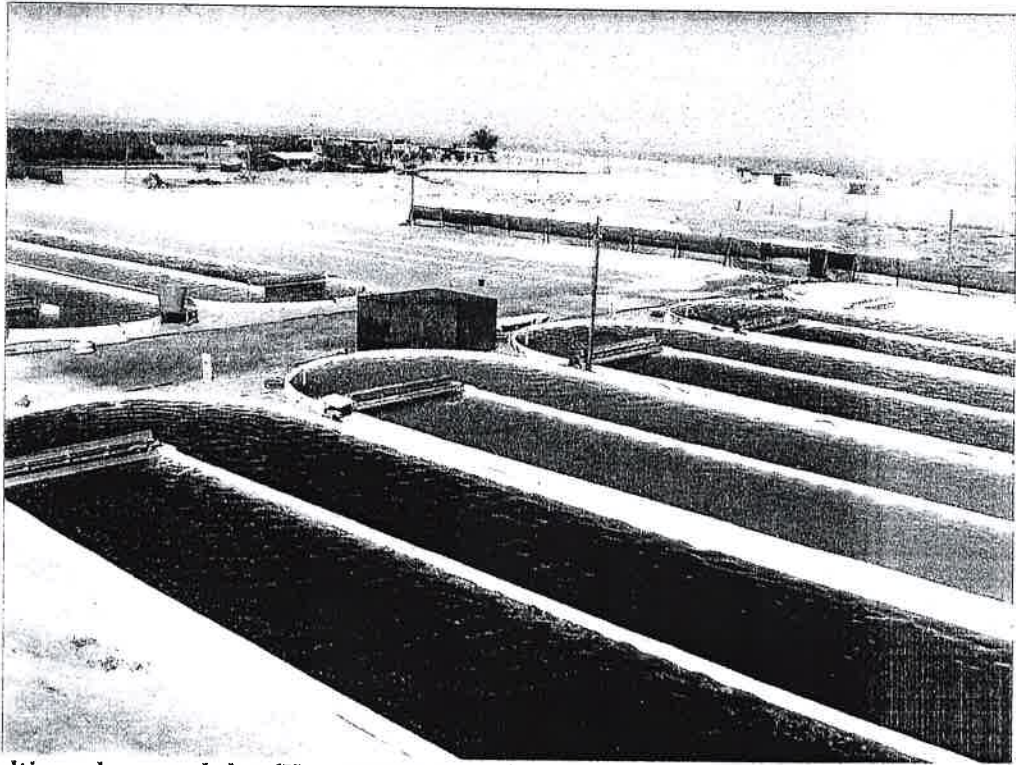
Visita a cultivos de Dunaliela Salina (etapa de crecimiento vegetativo)



Visita a cultivos de Dunaliella Salina (etapa de inducción de pigmentación al aire libre, inicio de acumulación masiva de B caroteno)

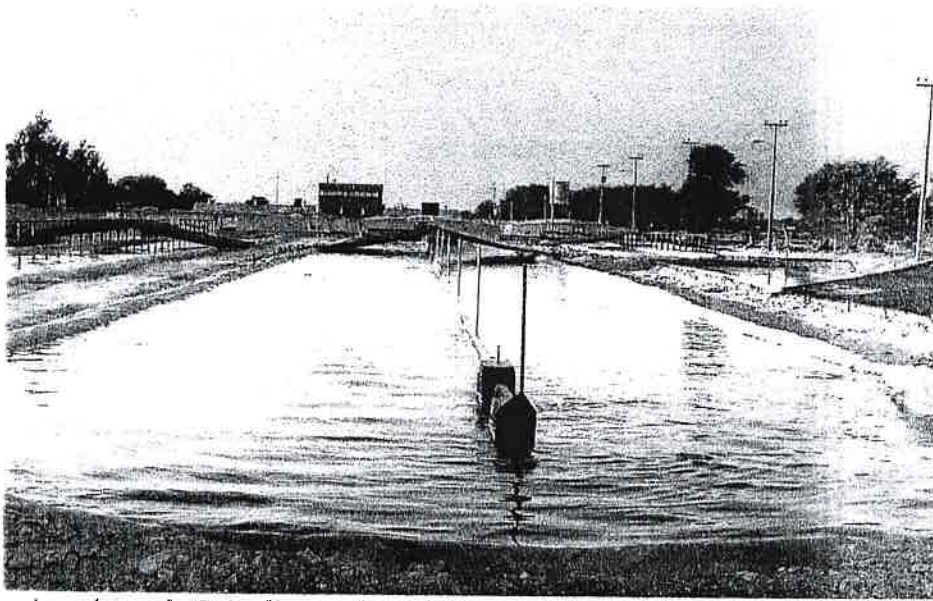


Visita a laboratorio de extracción de Dunaliella Salina.



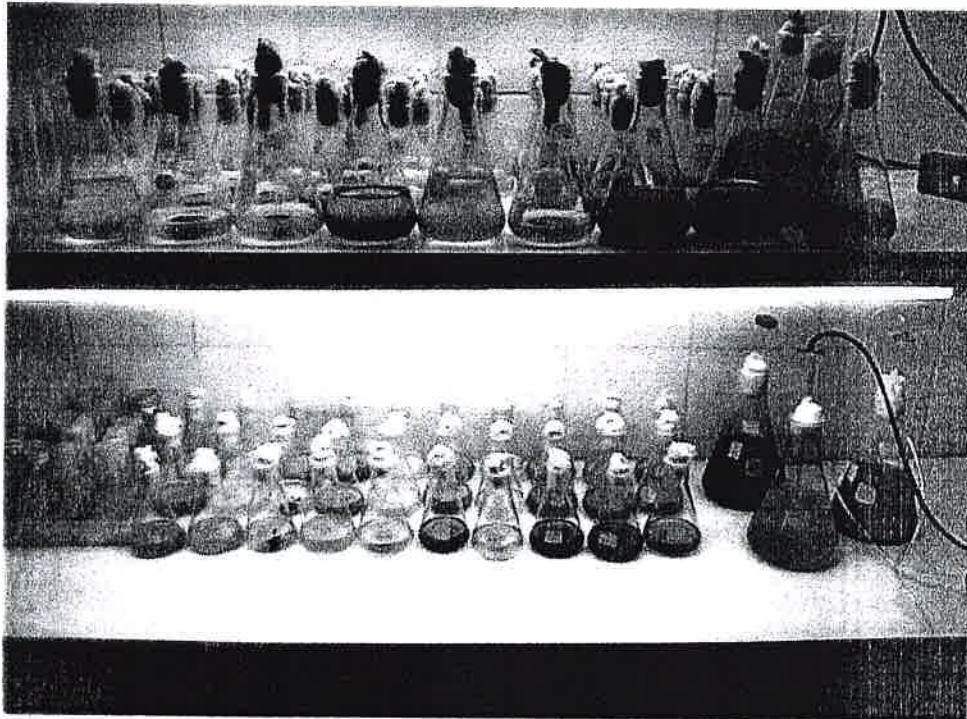
Cultivos de agua dulce (*Haematococcus pluvialis*) de Atacama Bionatural Products S.A. en fase de acumulación de pigmento.

Visita a Terreno: Planta industrial de Solarium Biotechnology S.A.



Piscina de cultivo de Spirulina, cultivada en medio con agua dulce, planta ubicada en la Huayca (no se permitió tomar más fotografías en la ocasión).

Registro de Cepas aportadas por ASITEC. Ltda.



Colección de cepas recibidas, una vez reactivadas y sembradas en sus medios de cultivo.



proceso de aumento de inoculación de cepas para incrementar el volumen de cultivo.



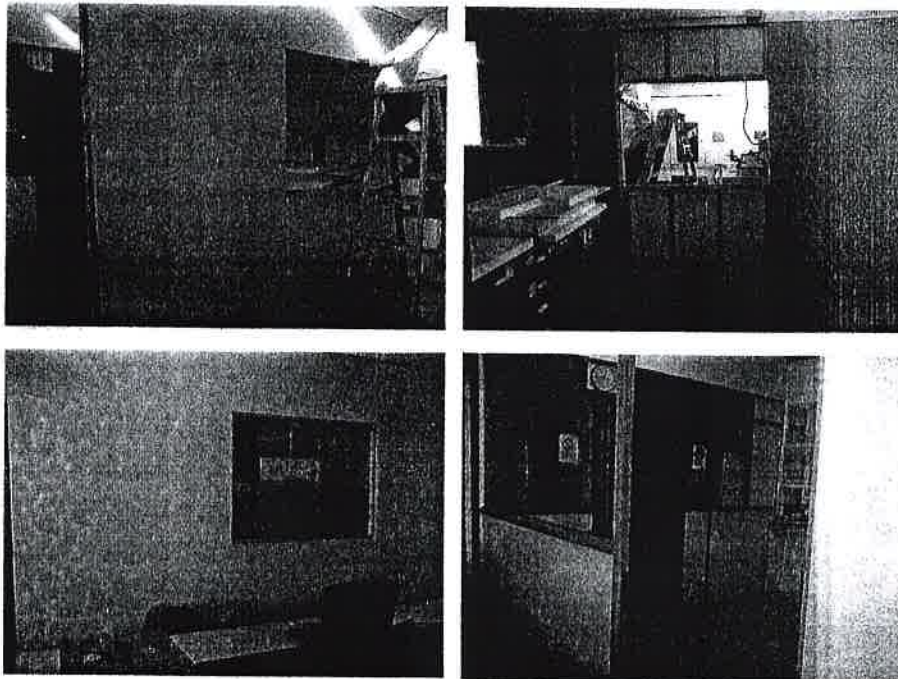
Proceso de conteo de microalgas con Cámara de Neubauer.

Modificación del Laboratorio de cultivo de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Tarapacá (campus Azapa) para el establecimiento del cepario (LCP).

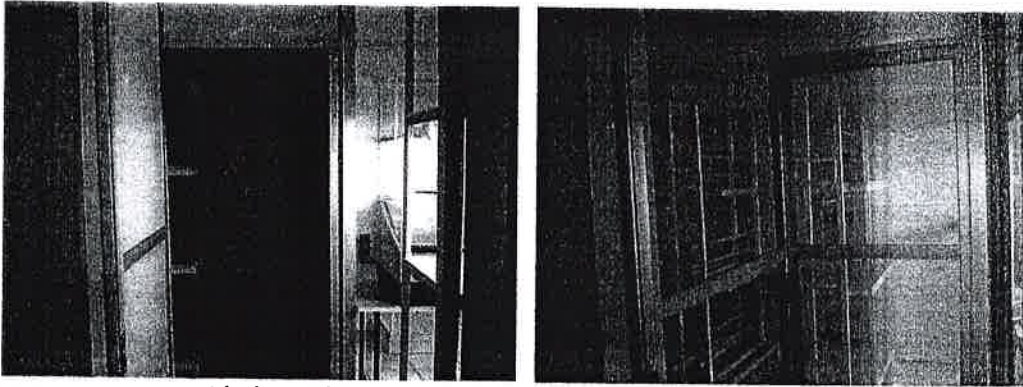
Sala de proceso de asepsia

La sala de asepsia fue implementada adaptando las instalaciones preexistentes del laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas (FADECIA) a cargo del director alterno del proyecto, Dr. Hugo Escobar Araya. Esta sala se acondicionó creando una separación con control de acceso y condiciones herméticas, para trabajar en un ambiente que minimiza el riesgo de contaminación biológica con organismos extraños a los que se desea cultivar. En esta sala se ingresa con ropa de asepsia, material y equipos estériles. Desde esta sala se puede continuar a la sala de cultivo de microalgas, sólo bajo estrictas normas de seguridad y contando con la autorización del personal a cargo. La razón de estas limitaciones es para que las cepas de microalgas no se contaminen en la sala de cultivo.

A continuación algunas imágenes del proceso de implementación de las sala de cultivo.



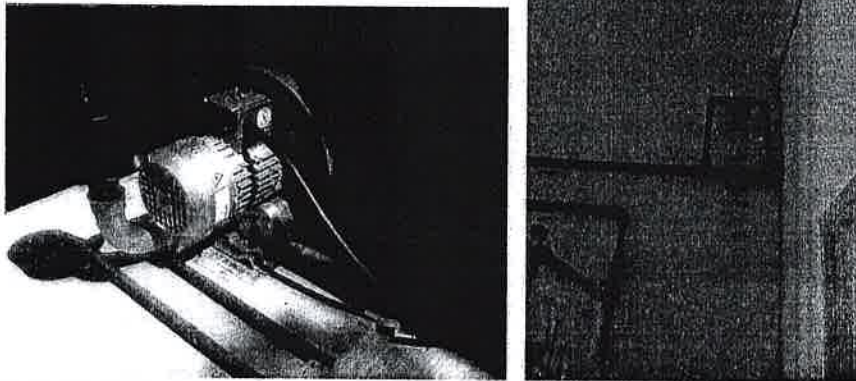
Instalación de tabique separador, y mampara de acceso controlado a sala de preparación de medios de cultivo.



Mampara y separación hermética de sala de cultivos del LCP con los racks para cultivos de hasta 20 litros por contenedor.

Visita de Asesor Juan Morales:

Se contó con 2 visitas del Asesor Juan Morales (Ingeniero de Ejecución en Acuicultura Mg. Sc.) cuyo contacto para cooperación en el proyecto fue provisto por ASITEC Ltda. En estas ocasiones el prestó su asesoría para montar los sistema de control ambiental del LCP, en estas imágenes se le ve ayudando con el diseño y la instalación del sistema de aireación/agitación por aire de la sala Cepario del LCP.



Instalación y conexión de Soplador trifásico, y red de aireación con sistema de pre filtrado.



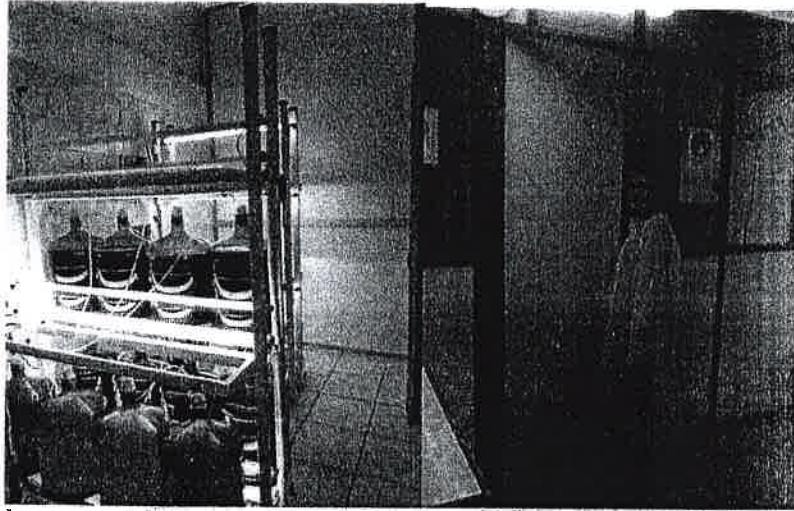
Asesor Juan Morales revisando las conexiones y la regulación del sistema de aireación.

Cultivos de cepas en medio altamente salino a escala de laboratorio en LCP:

El Laboratorio de Cultivos Primarios (LCP) fue diseñado para permitir realizar toda la etapa primaria del cultivo de las microalgas. Como ya ha sido mencionado, aquí sólo se puede ingresar guardando los protocolos establecidos para conservar la esterilidad de los cultivos en estudio. En esta sala se cuenta con control de temperatura por medio de Aire Acondicionado, y sistema de aireación/agitación permanente de los cultivos en botellones, provista por un soplador primario que alimenta la red neumática de la instalación. El LCP, una vez habilitado, fue rápidamente aprovechado para iniciar la serie de actividades de investigación programadas en esta instalación.



Izquierda: Ing. en acuicultura Paz Galeno S. tomando muestras de biomasa desde los cultivos de algas adaptadas a medio hypersalino basado en agua de mar. Derecha: Botellones de 20 litros con distintas cepas y tratamientos durante las evaluaciones efectuadas.



Izq. Muebles porta cultivos con los botellones en proceso de crecimiento exponencial.
Derecha: Vestuario aseéptico para ingresar a sala de observación y conteo con microscopio.



Observación rutinaria del desarrollo de las cepas en el LCP.



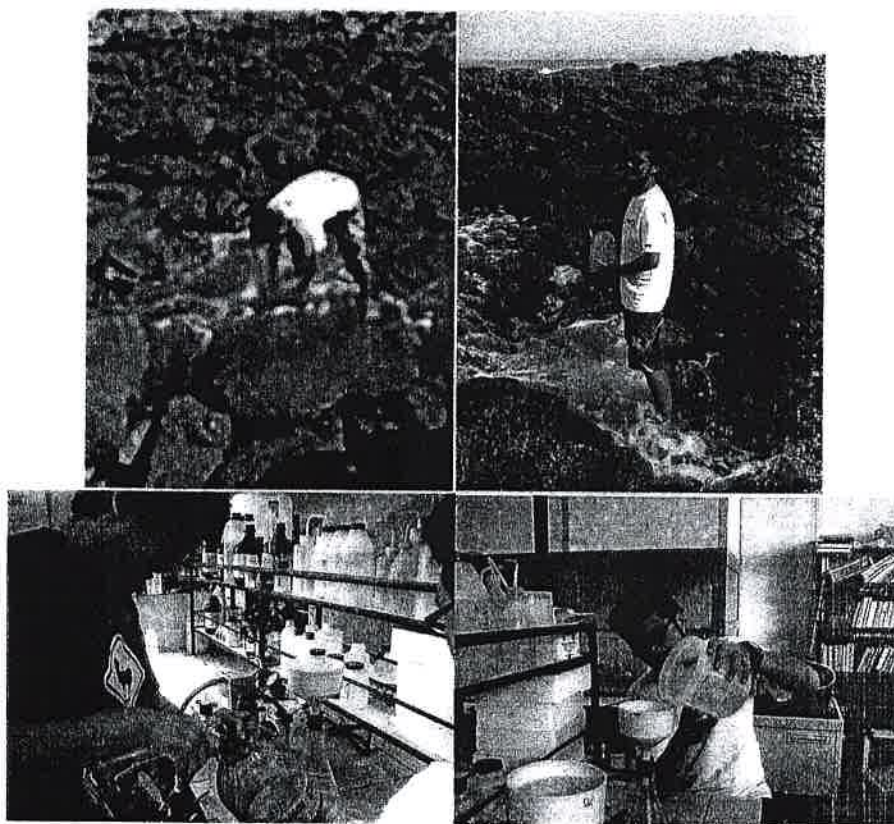
Todo el personal, incluyendo visitas, que ingresa al LCP debe seguir el protocolo de ingreso para evitar contaminación de los cultivos puros.

ACTIVIDADES PROPIAS DEL LABORATORIO DE CULTIVO PRIMARIO

Obtención de agua de mar filtrada para el cultivo de las microalgas

Desde el inicio de las actividades de laboratorio, el agua de mar utilizada en el cultivo de las microalgas fue recolectada desde el sector Playa Corazones por ser el lugar de acceso relativamente fácil con el agua menos contaminada por sedimentos y material orgánico. Esa agua se recolectaba manualmente y luego era sometida a un proceso de filtrado en el Laboratorio de Suelos del Departamento de Química y trasladada finalmente al campus Azapa para su uso en el LCP.

A continuación algunas imágenes que ilustran esta actividad.

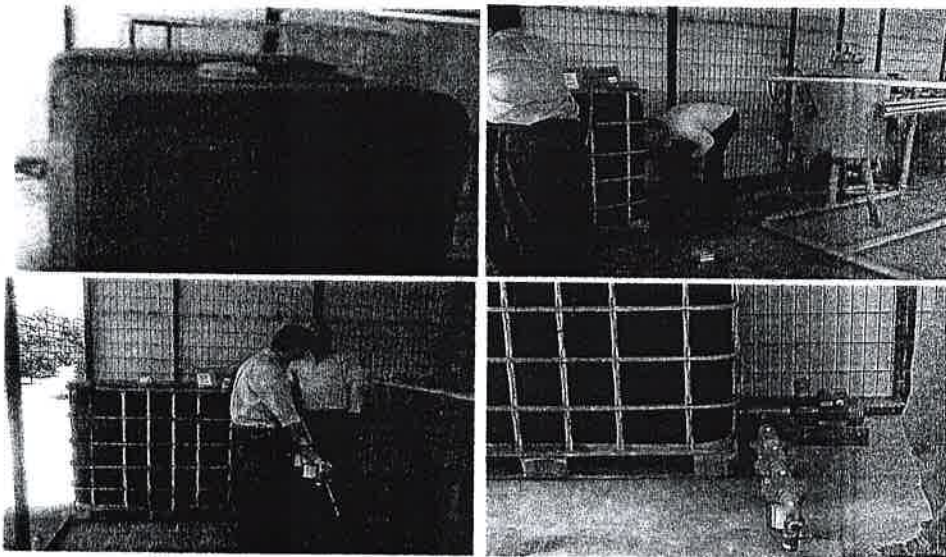


Posteriormente, y como se tenía planificado para poder dotar de agua de mar al LCP y a la Unidad demostrativa, se implementó un sistema de filtración diseñado por el grupo de investigadores que trabajan en este proyecto, que suministra agua de mar filtrada de manera mucho más eficiente y en mayor cantidad.

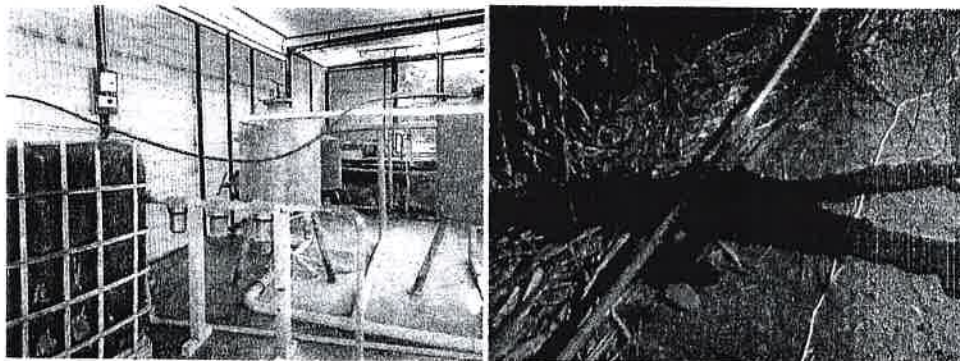
El proceso se inicia con la extracción de agua en la Playa Corazones, la que es trasladada en bidones de 20L hasta las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas en el Campus Azapa.

El agua de mar es depositada en el estanque de cabecera. La mantención del estanque de cabecera requiere también un protocolo estricto de limpieza que se lleva a cabo antes y después del llenado. Una vez llenado este estanque de cabecera (pintado de negro para evitar que la presencia de luz estimule el crecimiento de algas contaminantes en el agua), el agua de mar es trasladada por medio de bombas a un costado del LCP donde son llenados los bidones que se emplearán en el cultivo de las microalgas. Posteriormente, a estos bidones se les incorpora la alícuota de nutrientes que constituyen el medio de cultivo y se lleva a la esterilización en el autoclave.

A continuación imágenes del montaje del sistema de filtración



Instalación de estanque de cabecera, red hidráulica y de bombeo, sistema de filtros en línea.



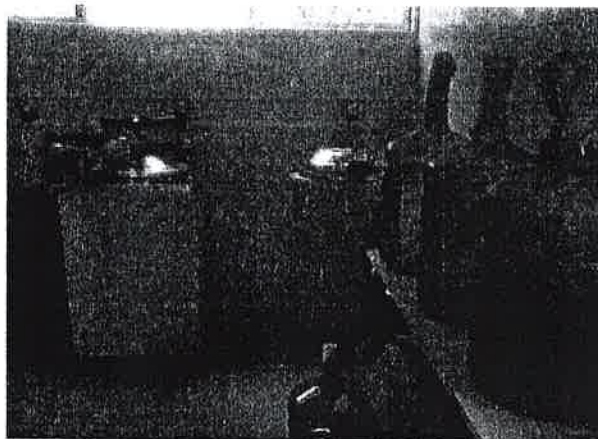
Soporte del sistema de filtración, y conexión de tubería hasta LCP.



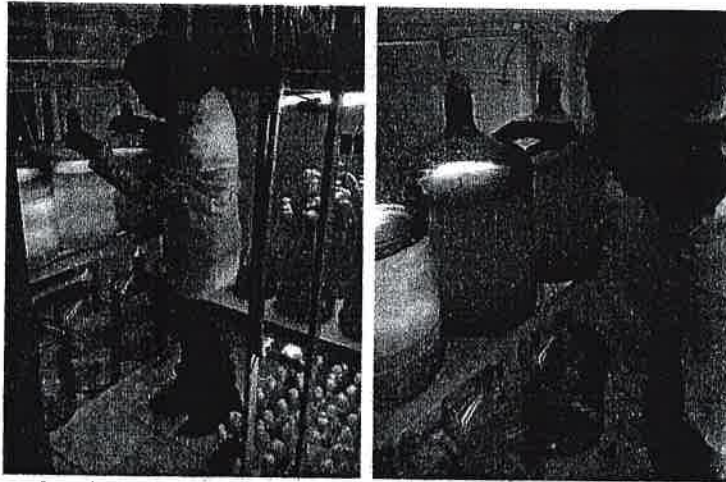
Pintado de tubería para protegerla del quemado por el sol.



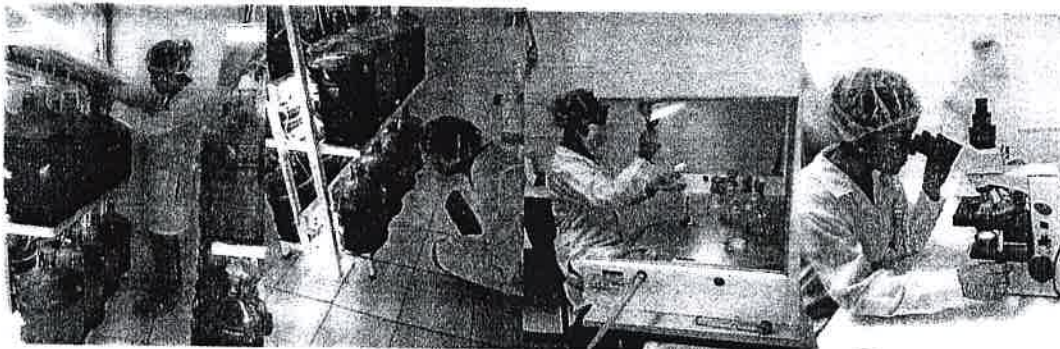
Llenado de los botellones de cultivo con el agua de mar filtrada por el sistema instalado.



Adición de nutrientes y autoclavado (esterilización) de los botellones en el LCP.



Inoculación de botellones con cepas seleccionadas de microalgas.



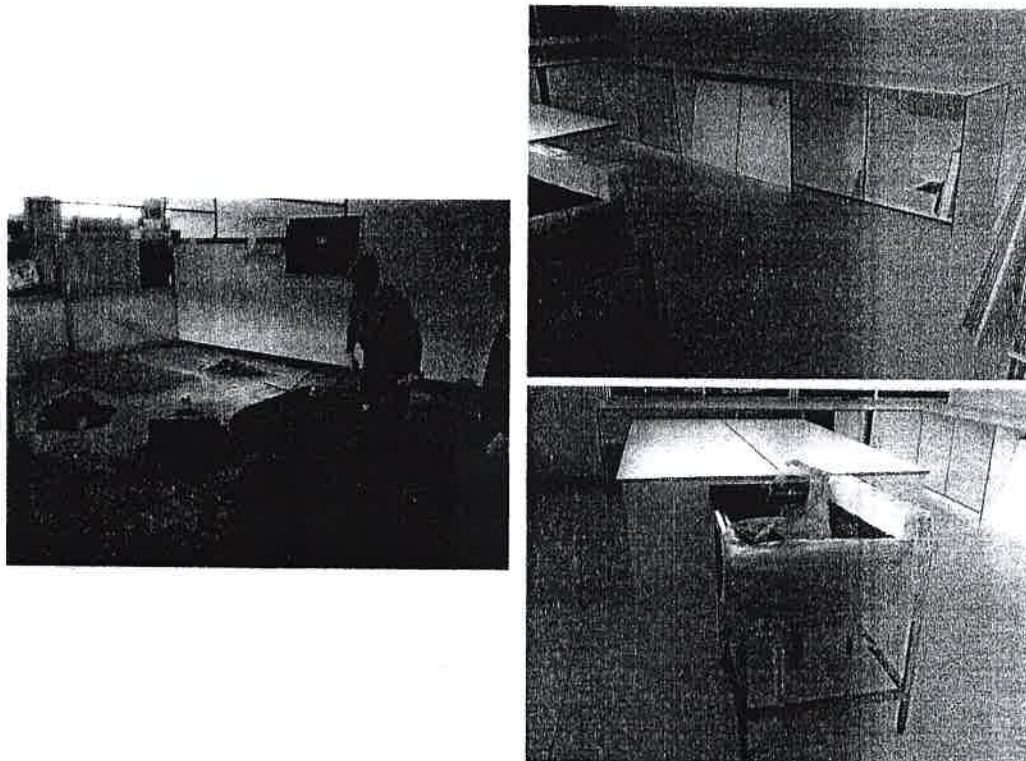
Secuencia rutinaria de muestreo de crecimiento, replicado de cepas puras en cámara de flujo laminar, conteo al microscopio en cámara de Neubauer (trabajo diario y por cada botellón)

La labor del LCP pasó a ser fundamental en la medida que no se pudo contar con la Unidad demostrativa, y a esta escala se logró producir la biomasa que permitió caracterizar el crecimiento y la adaptación de las distintas cepas evaluadas. Desde la **Sala de proceso de asepsia**, el personal se traslada a la **Sala de cultivo** contando con la ropa de asepsia, material y equipos estériles, bajo estrictas normas de seguridad. Las visitas sólo con la autorización del personal a cargo pueden ingresar a la **Sala de cultivo** contando con las normas de seguridad establecidas, de tal manera de minimizar las probabilidades de contaminación de las microalgas en cultivo.

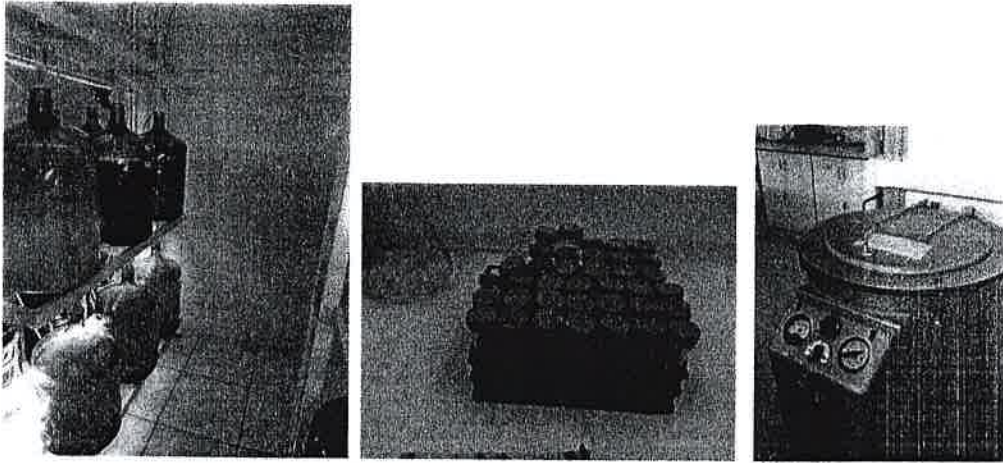
Remodelación del Laboratorio de Estudio Bioquímico y Caracterización (LEBC)

El Laboratorio de Investigación Bioquímica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias fue remodelado y mejorado para realizar la caracterización química y bioquímica del material microalgal

A continuación se presentan imágenes de la implementación y de las actividades propias de este laboratorio:

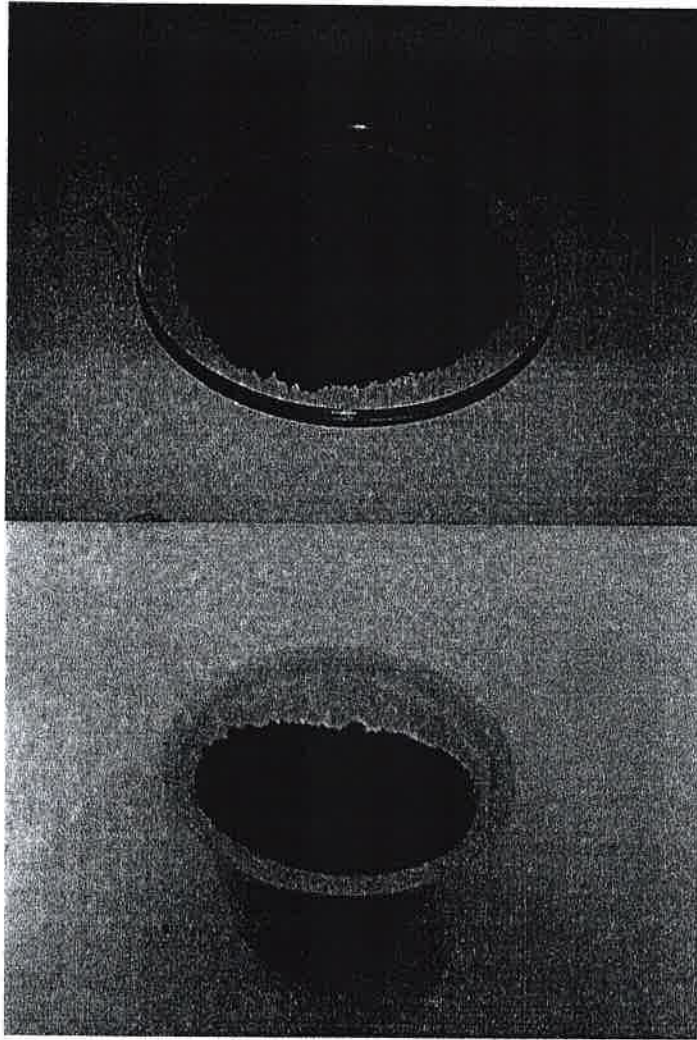


Izq: Remodelación del piso del LEBC. Der. arriba: Instalación de mobiliario. Der. Abajo instalación de equipamiento.



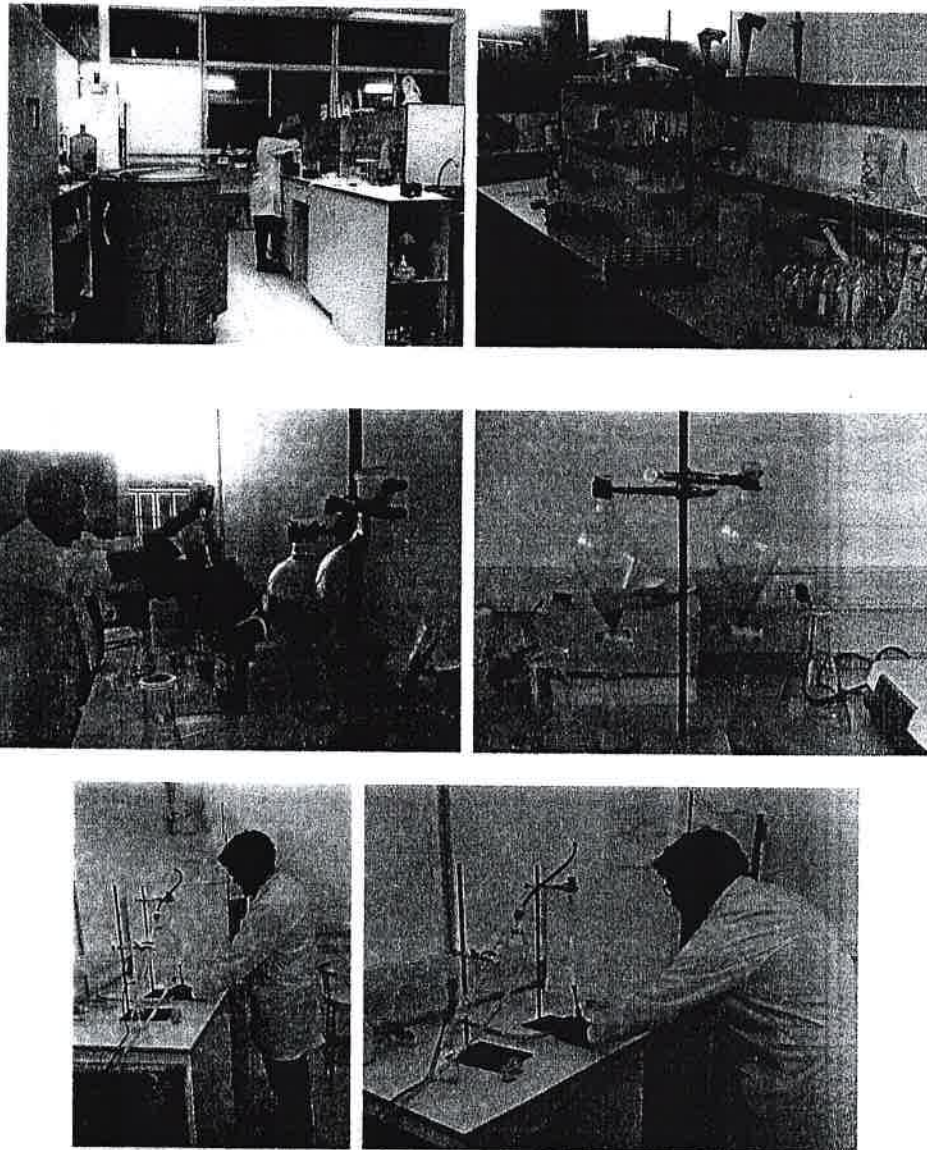
Proceso de cosecha de las microalgas a escala de LEBC.

Izq.: Botellones de microalga alcanzan densidad de células óptima para cosecha. Centro: Las microalgas contenidas en los bidones de 20 L son trasvasiadas en tubos de 50 mL, Derecha: Los tubos de 50 mL son centrifugados para separar las células del medio de cultivo. y centrifugados.



Biomasa de *D. salina* cosechada en estado vegetativo, con un alto contenido de antioxidantes totales y ácidos grasos poliinsaturados.

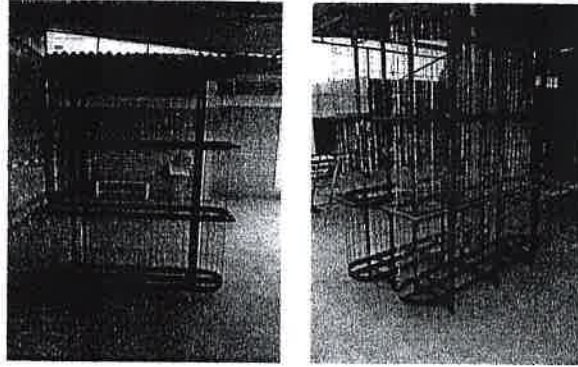
Una vez lavadas las microalgas con agua destilada para sacar el exceso de medio de cultivo salino, se procede a la caracterización química y bioquímica de la Biomasa fresca.



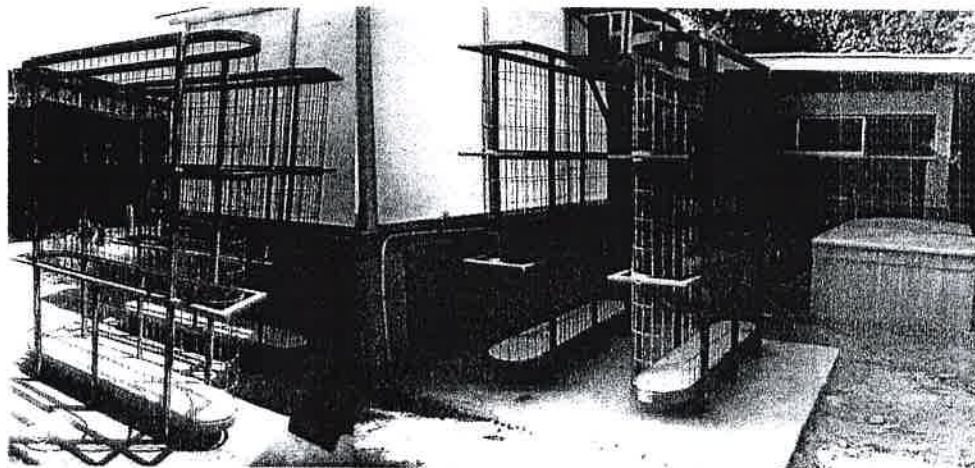
Secuencia de imágenes de procesos de laboratorio en el LEBC para la caracterización de la Biomasa de microalgas obtenida a partir de los protocolos de cultivo del LCP.

Habilitación de Bioreactores producción anticipada a escala piloto, como estrategia alternativa debido a las dificultades para licitar la Unidad demostrativa.

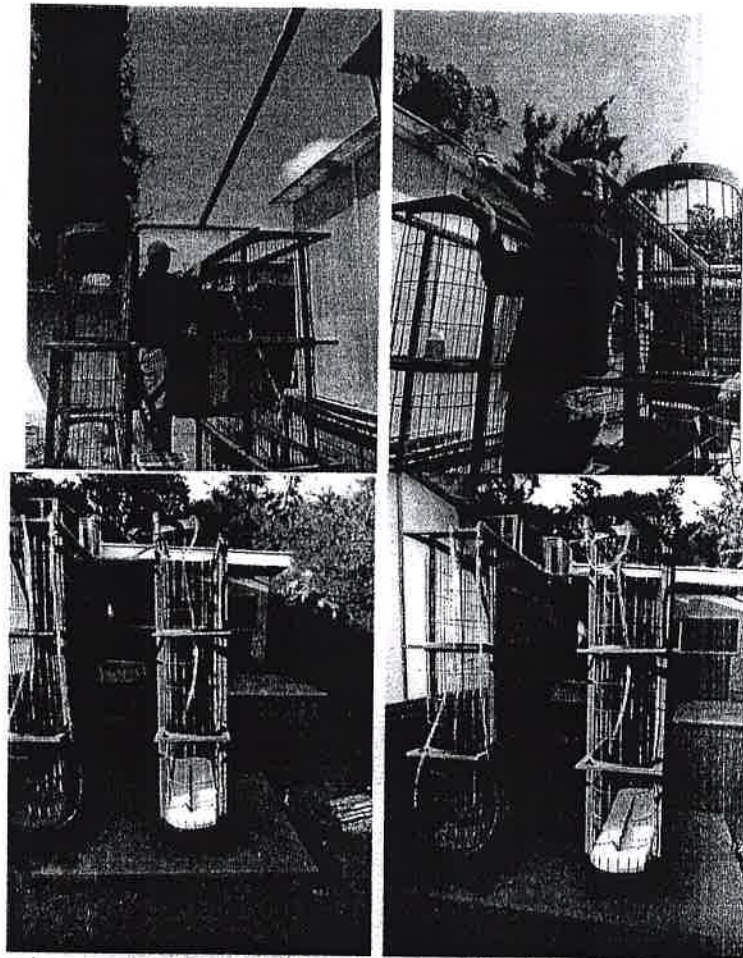
Como consta en el texto del presente informe, se tomó la decisión de ejecutar el cultivo en reactores de 1 m³ de capacidad para poder generar datos cercanos al escalamiento comercial.



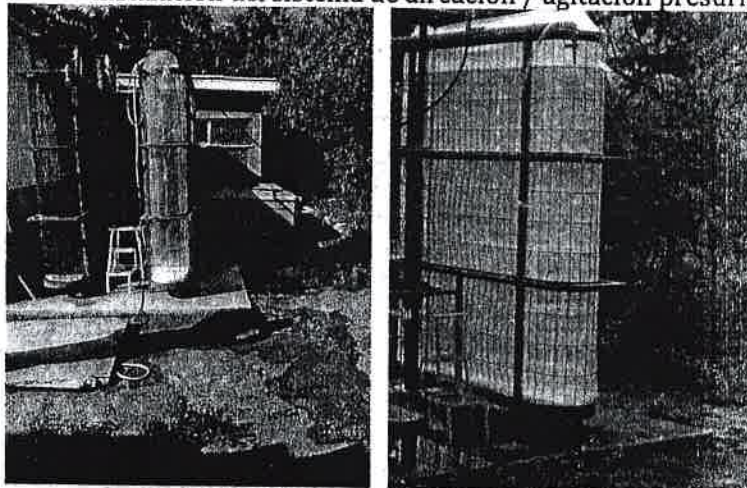
Estructura de acero de los Biorreactores verticales.



Biorreactores con la base completa.



Fases de la instalación del sistema de aireación / agitación presurizado.



Pruena del sistema de agitación con el medio de cultivo en el lugar destinado provisionalmente a estos cultivos.

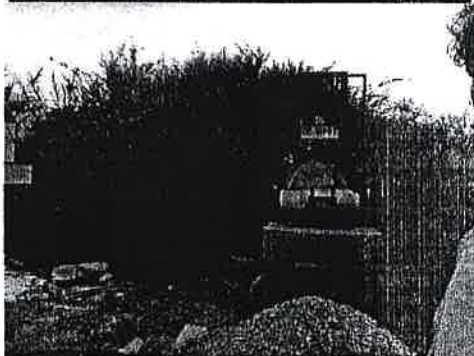
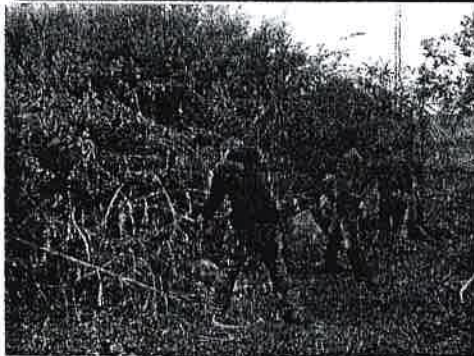
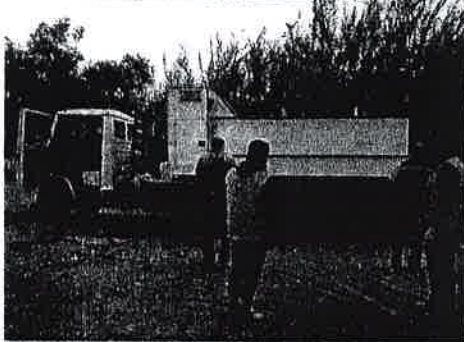
Debido a la limitada capacidad de centrifugación disponible en el LEBC, que estaba solo diseñada a escala de laboratorio, se buscó una alternativa con la red de colaboración formada dentro del marco del proyecto. Se logró contar con el apoyo del investigador de la UNAP Juan Pablo Díaz, que facilitó su laboratorio para centrifugar 300 litros de cultivo proveniente de los reactores verticales.



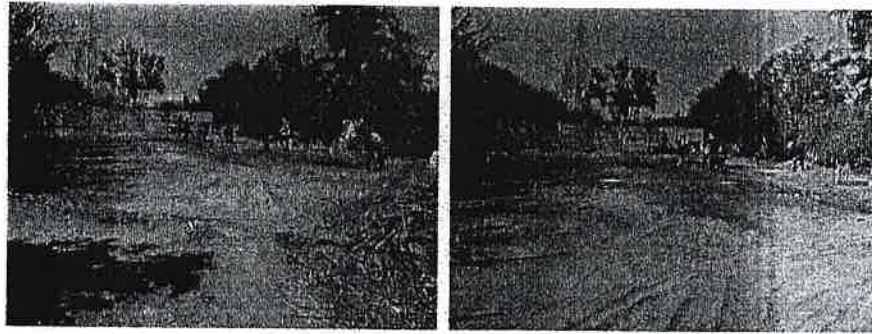
apoyo externo de centrifuga piloto Juan Pablo Díaz UNAP:

Habilitación de la Planta Demostrativa.

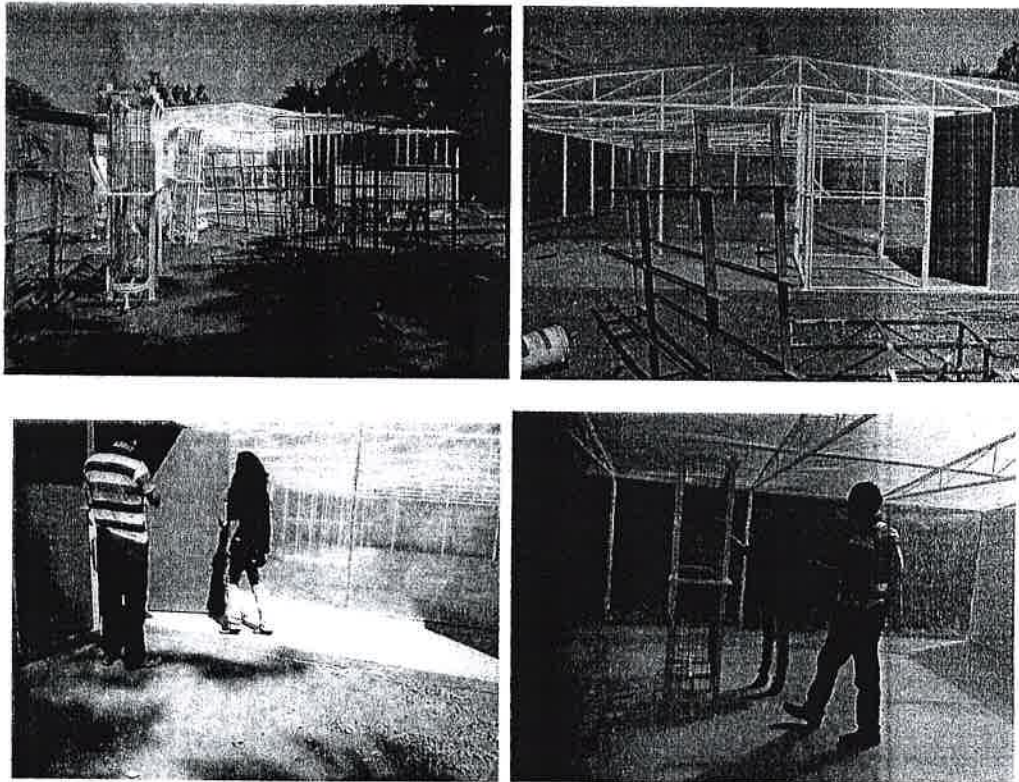
Siendo que se hicieron todos los esfuerzos humanos posibles como se relató en el texto del informe, esta fase del proyecto quedó inconclusa. Sin embargo, se logró un avance significativo en su ejecución, la cual se describe en imágenes a continuación.



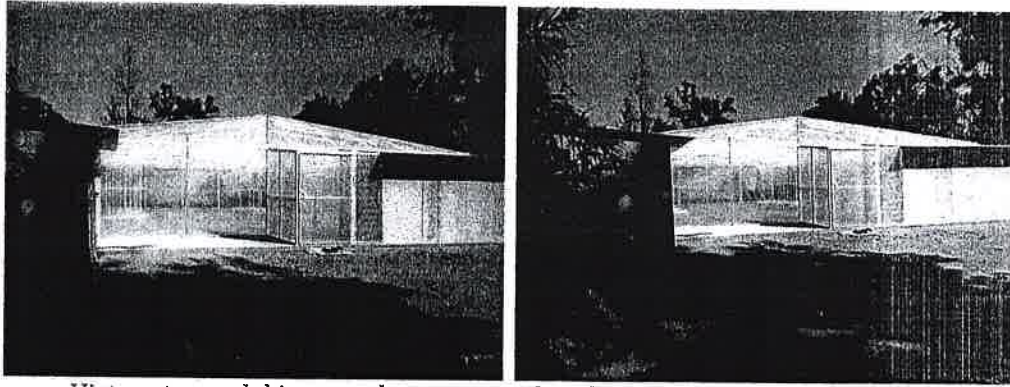
Habilitación y despeje del terreno de FADECIA - UTA para la instalación de la Unidad Demostrativa a Escala Piloto.



Limpieza final del terreno por parte de funcionarios de la Universidad y personal de empresa que se adjudicó la licitación para la habilitación de la planta demostrativa



Unidad demostrativa: Vistas del invernadero bajo plástico y las estructuras metálicas de reactores verticales internos.

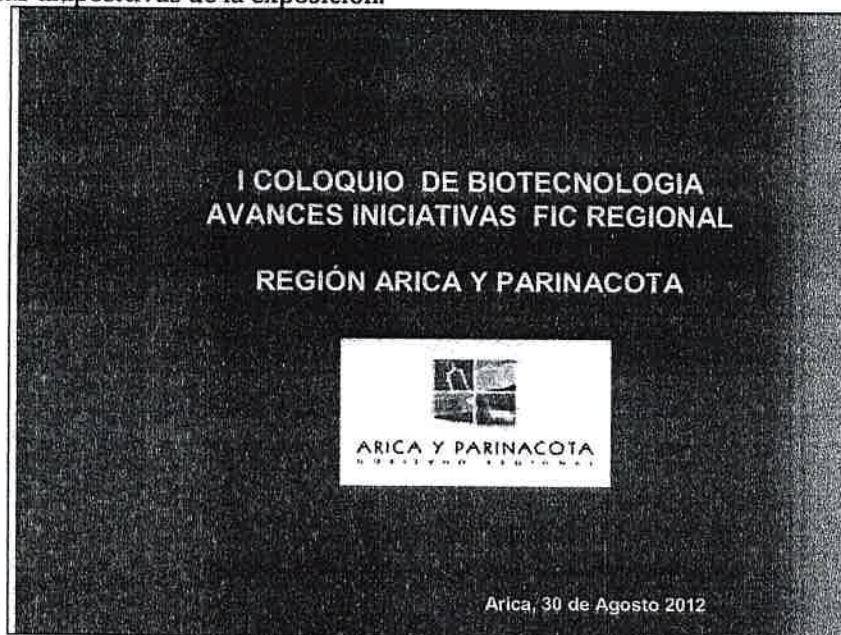


Vista externa del invernadero terminado, y la caseta para equipamientos.
Toda esta instalación deberá ser habilitada en una iniciativa posterior con las redes
hidráulica, eléctrica y neumática.

DIFUSIÓN

1er Coloquio de Biotecnología, Proyectos del Fondo para la Innovación y la Competitividad (FIC 2011-2012, Región de Arica y Parinacota (30 y 31 de Agosto del 2012.

Se participó con una exposición en el primer coloquio de Biotecnología organizado por el Gobierno Regional de Arica y Parinacota. No se capturó la participación en fotografía, se adjuntan las diapositivas de la exposición.





Desarrollo de tecnología de Producción masiva de microalgas para obtención de biocombustibles y materias primas de alto valor agregado para creación de un nuevo polo de Desarrollo sustentable en la región de Arica y Parinacota.

- 1.Sector territorial de Impacto : Regiones XV a III
- 2.Rubro o ámbito temático: Nutracéutico / Biocombustibles
- 3.Entidad ejecutora: Universidad de Tarapacá
- 4.Empleados asociados a la iniciativa: ASITEC Ltda.
- 5.Jefe de proyecto: Libertad Carrasco Ríos
- 6.Fuente de financiamiento: Gobierno Regional
- 7.Periodo de ejecución: Agosto 2011 - Agosto 2013

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar a escala piloto la producción de biomasa microalgal de organismos cultivados bajo condiciones ambientales extremas en la región de Arica y Parinacota, a altas tasas de crecimiento y a un costo que permita su explotación económica y procesamiento para la obtención de diversos compuestos naturales de interés comercial (proteínas, lípidos, carbohidratos y compuestos secundarios), orientados a las industrias farmacéutica, de alimentos o productos cosméticos entre otros; dando principal importancia a la obtención de fracciones lipídicas que podrían ser orientadas a la producción de biocombustible.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selección, estudio y caracterización de diferentes cepas de microalgas marinas aisladas de ambientes de salinidad extrema.
2. Generación de un sistema productivo de microalgas como base para la Validación Técnica y Económica de la producción de Biomasa proyectada a escala industrial.
3. Estudio de la posibilidad de optimizar, Evaluar Técnica y Económicamente a escala piloto de la producción de Biocombustibles, alimento animal y posibles compuestos secundarios de interés a partir de la biomasa microalgal.
4. Generación de un sistema de transferencia de la tecnología y promoción del nuevo emprendimiento por medio de un consorcio entre Universidades y empresas para la explotación del negocio productivo y la transferencia a otros inversionistas por medio de licenciamiento del paquete tecnológico y cepas.

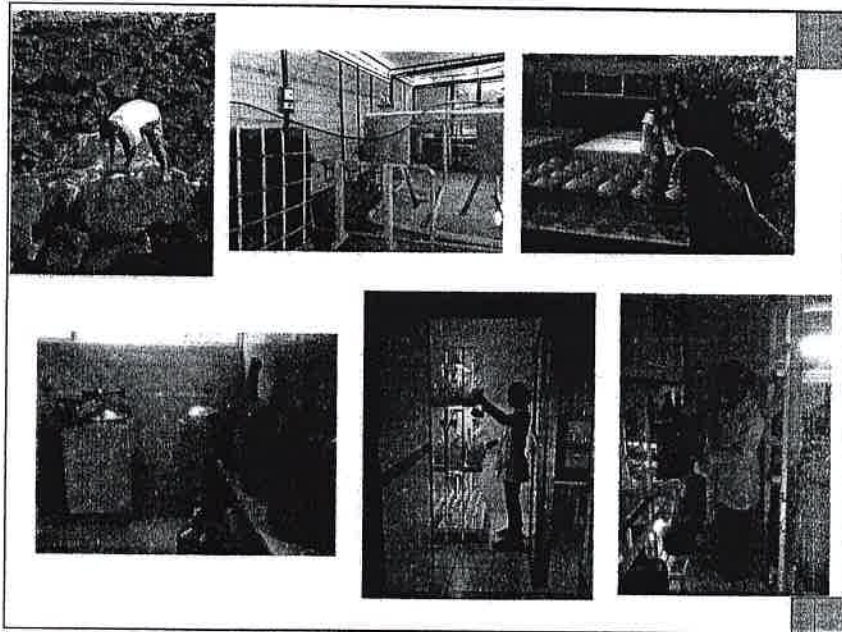
RESULTADOS ESPERADOS	RESULTADOS OBTENIDOS
Base nativa de cepas de microalgas extremófilas con los medios de selección y caracterización.	Logro de crecimiento y replicabilidad del crecimiento de las cepas aportadas en el período previo.
Modelo de cultivo y cosecha que maximice la producción de biomasa al aire libre bajo condiciones selectivas de cultivo por variables ambientales de nulo costo de control (condiciones extremas de salinidad).	Establecimiento de curvas de crecimiento de todas las cepas.
Base experimental del proceso de extracción de aceite y separación de fracciones de interés comercial.	Establecimiento de una rutina de actividades en el cepario instalado.
Evaluación base para la aplicación de la biomasa remanente en nutrición animal y/o humana.	Caracterización productiva y química de las cepas en condiciones extremas de salinidad.
Evaluación de costos y extrapolación de unidad demostrativa (Viabilidad técnico económica del escalamiento, Información clave requerida para los inversionistas potenciales).	Diseño de unidad demostrativa, terreno para su instalación y licitación en proceso de adjudicación.
Planta demostrativa para continuar con la evaluación productiva de otras cepas extremófilas que permitan generar alternativas de producción.	

1) MERITO INNOVADOR :

- **Uso de agua de mar como base para el medio de cultivo. Recurso prácticamente ilimitado y sin costo.**
- **Cultivos de comienzo a fin en reactores expuestos al aire libre. Sistema de menor costo de infraestructura.**
- **Selectividad de la cepa por tolerancia a salinidad extrema. Permite cultivo de cepas sin contaminación por otros microorganismos.**
- **Contenido de aceite hasta 20% de la biomasa como blanco del desarrollo.**
- **Subproducto proteico (commodity de alta demanda) que se llevará el peso de la rentabilidad de la explotación comercial de las microalgas. Otras biomoléculas de alto valor contribuyen a rentabilizar el cultivo en el corto plazo, el biocombustible se obtiene como un subproducto y se puede vender a precio competitivo con los combustibles fósiles.**
- **Permite proyectar el planteamiento de Arica con un Cluster de desarrollo tecnológico de microalgas, debido a las ventajas competitivas de clima y extensiones de terreno desértico sin uso productivo alternativo.**

2) TRANSFERENCIA A LAS EMPRESAS:

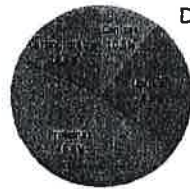
- **Unidad demostrativa genera la información relevante de productividad y costos que permite proyectar la rentabilidad potencial del negocio productivo.**
- **Además se generan parámetros para protección intelectual del desarrollo tecnológico.**
- **Con esta información y mediante el involucramiento de la empresa asociada se genera un proceso de búsqueda de inversionistas que deseen invertir en el desarrollo comercial de la tecnología.**
- **Existe actualmente un gran interés Internacional por desarrollar negocios nutracéuticos en torno al cultivo de microalgas, interés que puede ser canalizado para atraer las inversiones a nuestra región.**
- **Problemas por resolver a nivel regional para posibilitar el desarrollo a mediano y largo plazo de grandes proyectos: Posibilidad de acceder al uso de terrenos cercanos a la costa para establecer los cultivos a gran escala.**



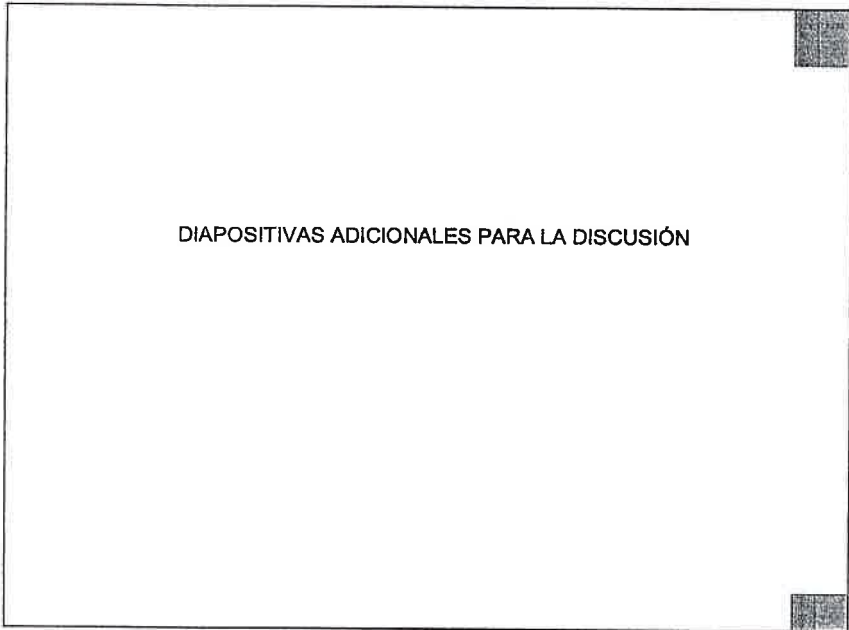
Composición Proximal algas obtenidas en Cepario



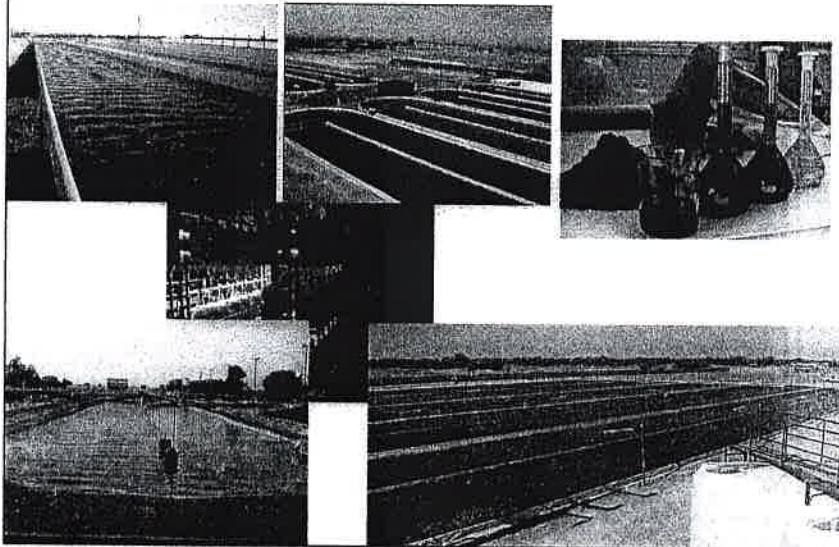
D. salina



D. tertiolecta



Nuestra Experiencia en cultivo Industrial de Microalgas



Nuestra Opinión como grupo técnico y dedicado a la producción industrial de microalgas

- Los aspectos técnicos desarrollados por nuestra parte en base a nuestra experiencia, para dar forma a una estrategia para el desarrollo de biocombustibles microalgales, resultaron coincidentes en varios aspectos con la política de The Carbon Trust, expresada a través de su Algae Biofuels Challenge (ABC, programa de £3000 millones para investigación que permita hacer realidad esto hacia el año 2020).
- De hecho, The Carbon Trust, consideró que en nuestra propuesta para integrarnos al ABC, los resultados solo beneficiaban a Chile y no al Gobierno de UK. Sin embargo, nos han indicado formalmente que nos tienen considerados como potenciales socios estratégicos en la Fase 2 del ABC, para el escalamiento industrial de sus desarrollos.



Nr Urbino
 ASTEC Limited
 P De Jasta 368 07-10
 O'Higgins 930
 Lomas de Maipo
 Atica
 Chile

6 February 2009

Dear Mr Urbino

Algae Biofuels Challenge: Expression of Interest
 Application: 066: Selection of microalgae strains to extreme conditions for industrial culture in Chilean waters.

I am writing to inform you of the results of the initial screening of the Algae Biofuels Challenge call for proposals. All the proposals were subject to a review process by experts in the field of the carbon intensity of the algae biofuels. This involved scoring the proposal against assessment criteria based on our guidelines. The recommendations of the experts were then considered by the Carbon Trust review panel.

We received a high response to this competitive call and all viable proposals were submitted. We regret to inform you that the review panel decided that we should not progress your application to the next stage in the process. In reaching this decision the review panel noted the following points:

- As noted in the proposal, it is not clear how the project would bring demonstrable benefit to the UK given that all activities will be carried out in Chile and all IP is held by Chilean organisations.
- However, the proposal did merit and the Carbon Trust will keep your details on file and keep you in mind when exploring options for Phase 2 of the Algae Biofuels Challenge, which will involve development of an overseas test and demonstration facility.

If you require any further clarification on the above please contact the Carbon Trust by email at carbon@carbontrust.co.uk.

Thank you for your time and interest in the Carbon Trust's Algae Biofuels Challenge.

Yours sincerely

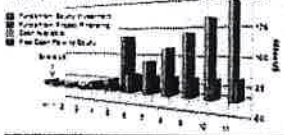

 Clive Greenham
 R&D Manager

The Carbon Trust
 100 Broad Street, London, W1C 1EJ, UK
 Tel: +44 (0)20 7576 5000 Fax: +44 (0)20 7576 5001
 www.carbontrust.co.uk

Numerosas Ofertas se nos han hecho para desarrollar el **negocio** de producción de biocombustibles a partir de microalgas

- Texas Pacific Group (TPG VC).
- Inversionistas Petroleros (Colombia).
- Inversionistas nacionales (Grupo Epysa, Agrícola Santa Carmen, Fitrans, Grupo Polpaico).
- Grupo de Inversionistas del MIT.
- CANTORCO2
- Adelphi Alliances LLC

Cost Paydown, Table 1 (1)



The Team A Multidisciplinary Team of Qualified Specialists

1. Ronald C. Branning, P.E.
Senior and Lead Architect

A multi-phase study is being done over the next 24 months to study the feasibility of building a new 1,000-bed hospital in the Dallas area. The study will be completed by the end of 1984. The study will be completed by the end of 1984. The study will be completed by the end of 1984.

2. Robert M. Hill, P.E.
Senior and Lead Architect

A multi-phase study is being done over the next 24 months to study the feasibility of building a new 1,000-bed hospital in the Dallas area. The study will be completed by the end of 1984. The study will be completed by the end of 1984.



3. Robert M. Hill, P.E.
Senior and Lead Architect

A multi-phase study is being done over the next 24 months to study the feasibility of building a new 1,000-bed hospital in the Dallas area. The study will be completed by the end of 1984. The study will be completed by the end of 1984.

4. Robert M. Hill, P.E.
Senior and Lead Architect

A multi-phase study is being done over the next 24 months to study the feasibility of building a new 1,000-bed hospital in the Dallas area. The study will be completed by the end of 1984. The study will be completed by the end of 1984.

SUMMARY

As the industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow. The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow.

The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow. The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow.

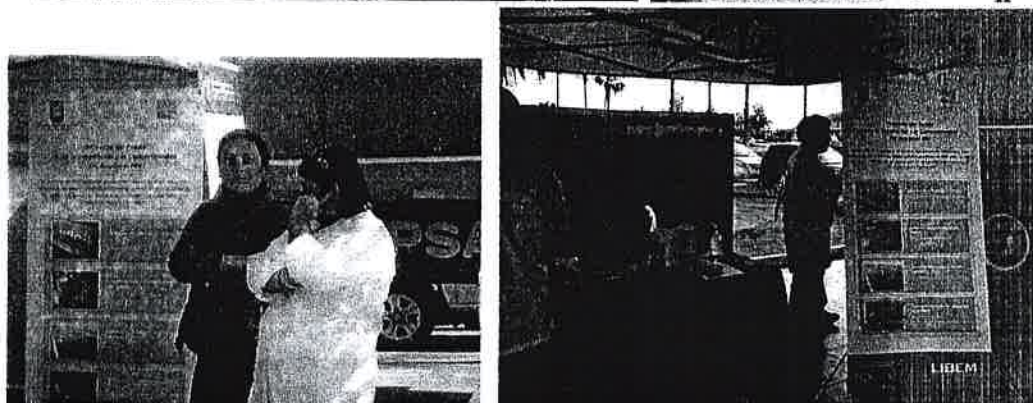
The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow. The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow.

The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow. The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow.

The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow. The industry continues to grow, it is essential that the industry continue to grow.

2: VIII Feria Marítima 7 de Mayo

Se realizó la presentación de un Stand del proyecto en el evento de carácter divulgativo al público en general. Se informó a los asistentes de los objetivos y alcances del proyecto, y su potencial de desarrollo como actividad comercial a futuro. Se tuvo una buena recepción por parte del público asistente.

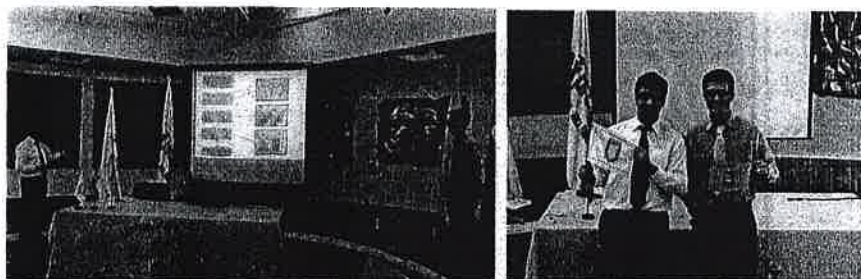


ACTIVIDADES DE TITULACIÓN DE ALUMNOS DE LAS CARRERAS DE QUÍMICO Y QUÍMICO LABORATORISTA

1. "Caracterización química de microalgas *Dunaliella salina* y *Dunaliella terctiolecta*"

Informe final actividad de titulación para optar al título de: Químico

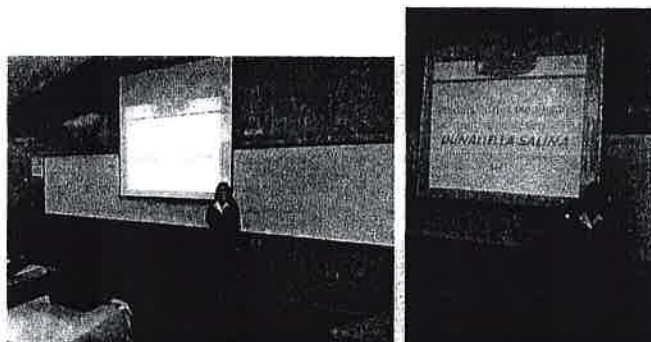
Alumnos: Sr. Alberto Garay Fornés y Sr. Eric Parra Olivares



2. "Producción de compuestos antioxidantes en *Dunaliella salina*"

Informe final actividad de titulación para optar al título de: Químico

Alumna de la carrera de Químico: Srta. Annabel Muñoz González.



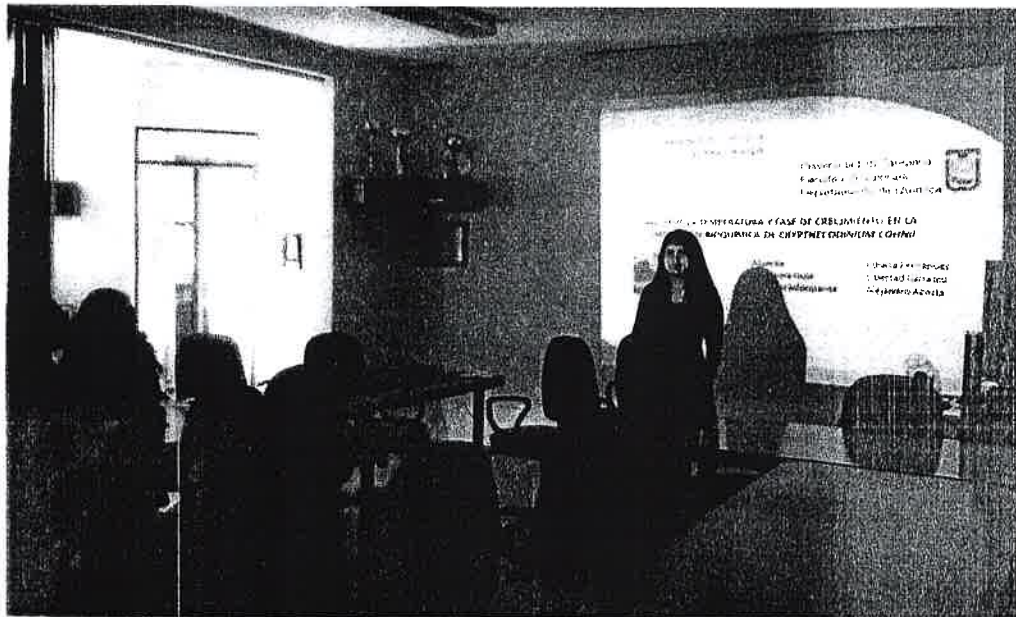
3. "Caracterización de lípidos provenientes de distintas cepas de microalga *Dunaliella salina*",

Informe final actividad de titulación para optar al título de: Químico Laboratorista

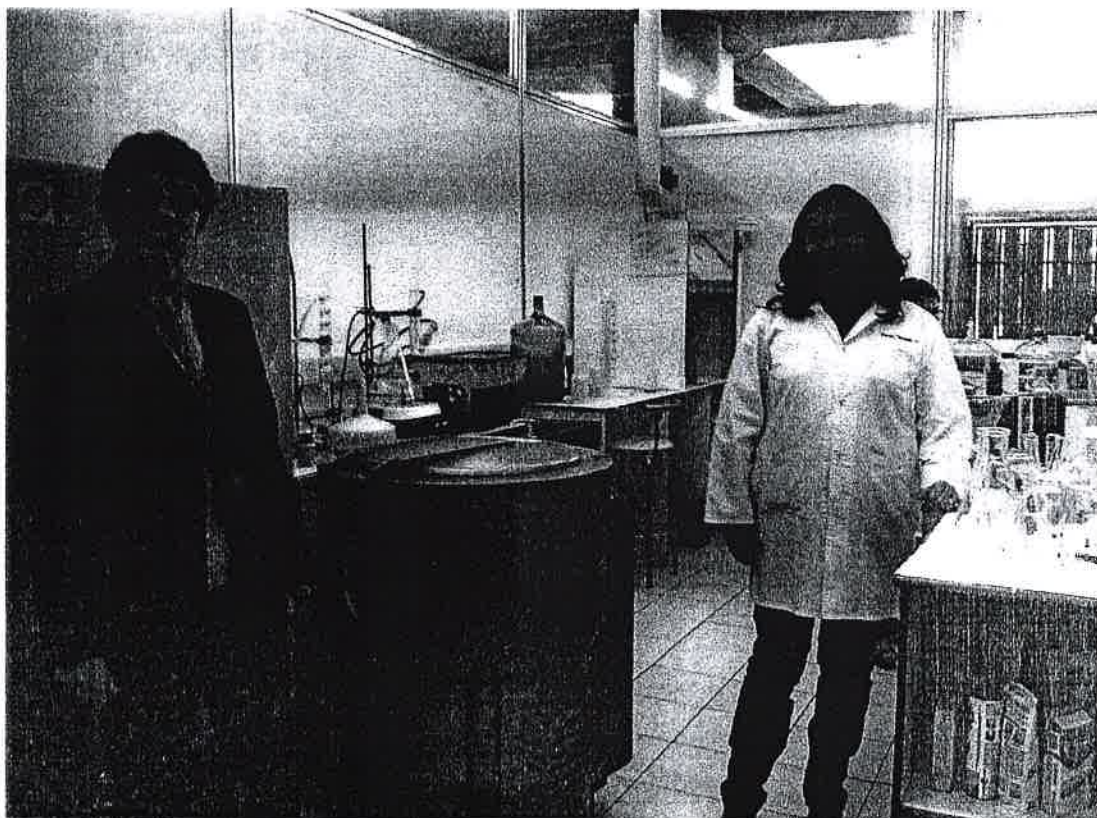
Alumnos: Srta. Eilyn Jara Alegre y Sr. Freddy Peñaranda González



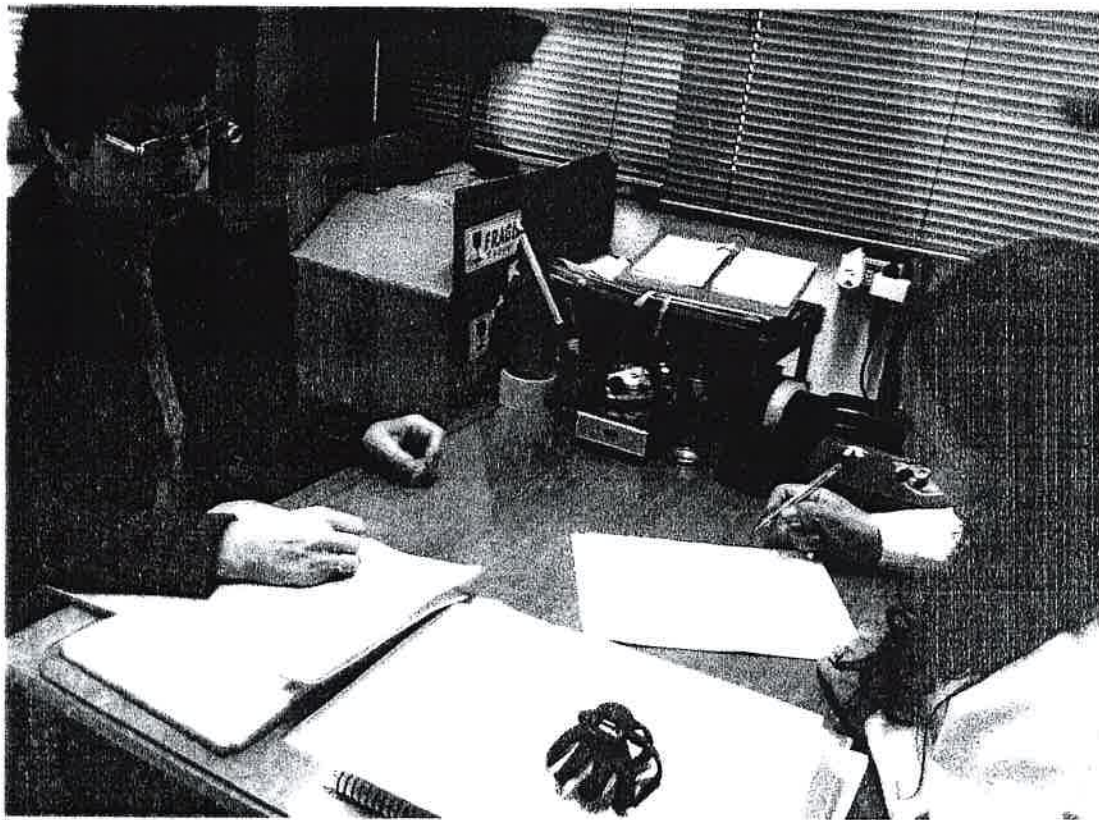
4. Presentación de la Tesis para optar a título de Microbióloga Industrial de la alumna Johana Fernández de la Universidad de Antioquia, Medellín- Colombia, por Video Conferencia.



Reuniones de Coordinación con GORE



Visita de contraparte técnica del GORE a LEBC.



Reunión de coordinación para seguimiento del proyecto entre Dra. Cecilia Matte (GORE) y Directora del proyecto.

RED DE COLABORACIÓN CON SECTOR PRIVADO BENEFICIARIO DE LA INICIATIVA

Durante el proyecto se formó una red de colaboración con el sector privado beneficiario del proyecto. Se adjuntan a continuación las cartas de compromiso de aportes para el proyecto de continuidad que elaboró el equipo técnico en conjunto con los asociados que participarían desde el sector privado, iniciativa que no fue enviada a concurso finalmente por la Universidad de Tarapacá. Estas cartas son el testimonio del interés del sector privado objetivo por involucrarse en la iniciativa al percibir su potencial de negocios.