

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Carrera Profesional de Ecología



TESIS

**PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *Ankistrodesmus* sp.,
Scenedesmus sp., *Chlorella* sp. SOMETIDAS A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO**

Presentado por:

KATIA ALEJANDRA AMASIFUEN DEL AGUILA

Tesis para optar el Título Profesional de:

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

SAN JUAN – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera profesional, por ser mi fortaleza en todo momento de mi vida y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencia y sobre todo felicidad.

A mi madre

Amada del Aguila por apoyarme en todo momento, por los valores que me ha inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mi esposo e hijos

Junior Saldaña, Anahy y Gianluca por brindarme días llenos de amor y lucha constante.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto de investigación “Secuenciamiento y anotación de transcriptomas de microalgas oleaginosas de la amazonia peruana promisorio para la producción sustentable de biodiesel: descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas” subvencionado por el programa Nacional de Innovación para la Competitividad y productividad (PNICP) y la Universidad Científica del Perú (UCP) por el apoyo financiero brindado para la realización de la presente tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirme el uso de sus equipos, materiales y reactivos que nos ayudaron con el crecimiento de las microalgas oleaginosas que fueron empleadas en este proceso de experimentación.

Al Dr. Jorge Marapara Del Águila, coordinador de la Unidad Especializada de Biotecnología del centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por facilitarnos el uso de equipos necesarios en todo ese tiempo.

Al Químico Leenin Flores Ramos, investigador del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) por el apoyo con el análisis de lípidos totales y ácidos grasos.

Un agradecimiento especial a mi asesora, la Dra. Marianela Cobos Ruiz por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis a través del proyecto ya mencionado y a su vez por depositar su confianza e invertir su tiempo y conocimiento durante todo el proceso de estudio. A usted mis más sinceros agradecimientos.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 11:00 horas del día viernes 19 de mayo del año 2017, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación de la bachiller en Ecología:

KATIA ALEJANDRA AMASIFUEN DEL ÁGUILA

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**

"Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp, *Scenedesmus* sp, *Chlorella* sp, sometidas a diferentes concentraciones de nitrato"

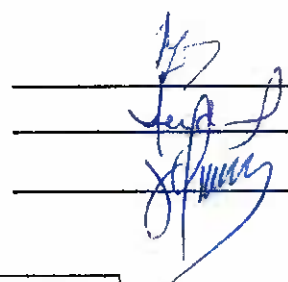
Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

Indicador	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3	Promedio
A) Dominio del Tema	16	17	17	17
B) Calidad de Redacción de la Tesis	16	17	17	17
C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia)	16	16	16	16
D) Calidad de Respuestas	16	16	16	16
E) Uso de Terminología Especializada	16	17	17	17
Calificación Final:				17

Aprobado Por: *Unanimidad*

Calificación Final (en letras): *Distinto*

Presidente: Dr. Álvaro Tresierra Ayala
Miembro: Dra. Carmen Patricia Cerdeña Del Águila
Miembro: Dr. Jorge Marapara del Águila

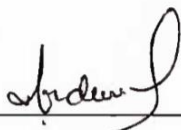


INDICADOR	PUNTAJE
Desaprobado	Menos de 13 puntos
Aprobado por Mayoría	De 14 a 15 puntos
Aprobado por Unanimidad	De 16 a 17 puntos
Aprobado por Excelencia	De 18 a más puntos

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Dr. Álvaro Tresierra Ayala
PRESIDENTE



Ing. Carmen Patricia Cerdeña del Aguila
MIEMBRO



Dr. Jorge Luis Marapara del Aguila
MIEMBRO



Dra. Marianela Cobos Ruíz
ASESORA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
JURADO CALIFICADOR	4
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO III	
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	17
3.1 Marco Teórico	17
3.1.1. Generalidades de las microalgas	17
3.1.2. Microalgas Oleaginosas	18
3.1.3. Inducción del aumento de la productividad de lípidos	19
3.1.4. Ácidos grasos	22
3.1.4.1. Propiedades de los ácidos grasos	22
3.1.4.2. Clasificación de los ácidos grasos	23
3.1.4.2.1. Ácidos grasos Saturados	23
3.1.4.2.2. Ácidos grasos insaturados	23
3.1.5. Utilidades de cada uno de los ácidos grasos	24
3.1.5.1. Ácidos Grasos Saturados	24

3.1.5.1.1. Ácido Caproico	24
3.1.5.1.2. Ácido Caprílico	25
3.1.5.1.3. Ácido Cáprico	26
3.1.5.1.4. Ácido Láurico	26
3.1.5.1.5. Ácido Mirístico	27
3.1.5.1.6. Ácido Palmítico	28
3.1.5.1.7. Ácido Esteárico	28
3.1.5.1.8. Ácido Araquídico	29
3.1.5.1.9. Ácido Lignocérico	29
3.1.5.2. Ácidos Grasos Insaturados	30
3.1.5.2.1. Ácido Palmitoleico	30
3.1.5.2.2. Ácido Olíco	31
3.1.5.2.3. Ácido Linólico	31
3.1.6. Biosíntesis de lípidos en microalgas	32
3.1.7. Nitrógeno	34
3.1.7.1. Propiedades del Nitrógeno	35
3.1.7.2. Propiedades atómicas del Nitrógeno	35
3.1.7.3. Nitrógeno y su importancia para las microalgas	36
3.1.7.4. Nitrógeno Kjeldahl (4500)	36
3.2. Definición de términos básicos	37
3.3. Antecedentes	40

CAPÍTULO IV

MÉTODOS Y MATERIALES	44
4.1. Lugar y desarrollo de la investigación	44
4.2. Recursos utilizados	44

4.2.1. Materiales	44
4.2.2. Equipos	45
4.2.3. Reactivos	45
4.2.4. Programas	46
4.3. Diseño de la Investigación	46
4.4. Población y muestra	48
4.4.1. Población	48
4.4.2 Muestra	48
4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos	48
4.5.1. Técnicas de recolección de datos	48
4.5.2. Instrumentos de recolección de datos	48
4.5.3. Procedimiento experimental	49
4.5.3.1. Cultivo y cosecha microalgal	49
4.5.3.2. Evaluación de los bioensayos con diferentes concentraciones de nitrato	49
4.5.3.3. Evaluaciones de perfil de crecimiento	50
4.5.3.4. Cosecha de biomasa microalgal	50
4.5.3.5. Extracción de lípidos totales	50
4.6. Perfil de Ácidos graso	51
4.7. Análisis de datos	52

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1. Evaluación del perfil de crecimiento de las tres especies de microalgas cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.	53
5.2. Producción de biomasa y contenido de lípidos totales en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002 cultivadas en medios sin N (-), N (I) y con N (+).	55

5.3. Perfil de ácidos grasos de <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrógeno.	57
--	----

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN	60
------------------	----

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES	64
---------------------	----

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES	65
---------------------	----

CAPÍTULO IX

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	66
---------------------------------	----

ANEXOS	70
---------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Título	Pág.
01	Clasificación de ácidos grasos.	24
02	Producción de biomasa en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002, cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.	55
03	Contenido de acumulación de lípidos totales en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002 Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.	56
04	Perfil de ácidos grasos de <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0001. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrógeno.	59
05	Composición del medio Chu Nro.10, con distintas concentraciones de nitrato.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
01	Modelo Esquemático de ácidos grasos.	23
02	Estructura química del ácido hexanoico	24
03	Estructura química del ácido octanoico	26
04	Estructura química del ácido cáprico	26
05	Estructura química del ácido láurico	27
06	Estructura química del ácido mirístico	27
07	Estructura química del ácido palmítico	28
08	Estructura química del ácido esteárico	29
09	Estructura química del ácido araquídico	29
10	Estructura química del ácido lignocérico	30
11	Estructura química del ácido palmitoleico	31
12	Estructura química del ácido oleico	31
13	Estructura química del ácido linoleico	32
14	Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas	34
15	Flujograma de inducción de ácidos grasos de tres especies de microalgas, sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.	47
16	Perfil de crecimiento de las microalgas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato: N+ = 8,5 g/100ml H ₂ O, NI = 4,0 g/100ml H ₂ O y N- = 0 g/100ml H ₂ O. <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001 (A), <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002, (B) y <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003 (C).	54
17	Producción de Lípidos Totales en tres especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.	57

RESUMEN

En la actualidad las microalgas son las que representan la alternativa más viable para la producción de biocombustibles porque producen hasta 30 veces más lípidos por hectárea que las mismas plantas terrestres usados con efectos fines. El objetivo fue determinar el Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, sometidas a diferentes concentraciones de nitrato. Se cultivaron las especies microalgales en medio Chu Nro.10 y sometidas a distintas concentraciones de nitrato: (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O). La evaluación se realizó por triplicado cada concentración en un periodo de 7 días. Los lípidos totales y perfil de análisis fueron realizados por métodos estándares. Los resultados indican que el perfil de crecimiento de cada una de las tres especies de microalgas mostró un crecimiento gradual, donde *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 en cultivo sin nitrato (N-) tuvo un menor crecimiento con respecto a los cultivos con concentración intermedia de nitrato (NI). Respecto a la producción de biomasa, en este estudio se reporta que *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 fue la especie con más producción de biomasa (> 5mg/l) que *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 (4.9 mg/l). *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 fue la especie que reportó menor producción de biomasa microalgal (<0.1 mg/l). Es importante mencionar que en la presente investigación se registraron los ácidos grasos (palmitoleico (0.7%) y palmítico (13.6%).). Concluyendo que las tres especies utilizadas presentan en su composición lipídica ácidos grasos que son importantes para producir biodiesel de alta calidad, lo cual las posiona como promisorias para la producción sustentable de biodiesel en la amazonia peruana.

Palabras claves: Biodiesel, lípidos totales, nitrato, microalgas oleaginosas.

ABSTRACT

Today microalgae are those that represent the most viable alternative biofuel production because they produce up to 30 times more lipids per hectare land plants that they used with effect ends. The objective was to determine the fatty acid profile of *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002. Subjected to different concentrations of nitrate. Microalgal were cultured in Chu Nro.10 medium and subjected to different concentrations of nitrate: (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O). The evaluation was performed in triplicate for each concentration over a period of 7 days. The total lipid profile analysis were performed by standard methods. The results indicate that the growth profile of each of the three species of algae showed a gradual increase, where *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 in culture without nitrate (N) had a lower growth compared to crops with intermediate concentration of nitrate (NI). Regarding the production of biomass, in this study reported that *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 species was more biomass production (> 5mg / l) *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 (4.9 mg / l). *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 was the species reported lower production of microalgal biomass (<0.1 mg / l). It is noteworthy that in this investigation the (palmitoleic (0.7%) and palmitic (13.6%.) Fatty acids were reported. Concluding that the three species present in the composition used lipid fatty acids that are important to produce high quality biodiesel, which the possession as promising for the sustainable production of biodiesel in the Peruvian Amazon.

Keywords: Biodiesel, total lipids, nitrogen, algae oil.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de combustibles más limpios y nuevas fuentes de energía de baja emisión de carbono, como los biocombustibles, entre otras; las cuales están siendo evaluados y se encuentran en diferentes fases de estudio y aplicación, cada una con sus propias ventajas y desventajas. En este escenario, se espera que los biocombustibles líquidos, biodiesel y bioetanol puedan sustituir al gasóleo y la gasolina respectivamente (1), promuevan nuevas fuentes de empleo en las zonas rurales, reduzcan las emisiones de gases efecto invernadero y aumenten la seguridad de abastecimiento energético (2). El biodiesel es un combustible sustituto del gasóleo o diésel de petróleo, compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga (C_{14} - C_{22}), obtenidos por trans esterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas (3).

Aunque desde hace más de veinte años se han venido realizando investigaciones para obtener biodiesel a partir de aceite microalgal (4). Actualmente en el mundo se están invirtiendo muchos recursos para investigación, dirigidas a minimizar los costos de la materia prima para la obtención de biodiesel (5). Algunos estudios recientes se han inclinado en el uso de semillas de diversas plantas oleaginosas, contribuyendo a la deforestación de los bosques y afectando a la seguridad alimentaria, además de microalgas como fuente de lípidos. Sin embargo, para que cualquiera de ellas pueda sustituir eventualmente los combustibles fósiles debe tener características como ser competitiva en cuanto a su precio con respecto a los combustibles derivados del petróleo, requerir poca cantidad de suelo y agua, que contribuya a mejorar la calidad del aire (por ejemplo, que en su proceso de producción se utilice CO_2), que exista en

cantidad suficiente para que dicha producción tenga un impacto significativo en la demanda y que proporcione una ganancia neta de energía sobre la demandada para producirlo (6). Por ende, el uso de microalgas podría cumplir estas condiciones, y por lo tanto, contribuir de manera significativa a la resolución de la demanda de energía primaria y al mismo tiempo, proporcionar beneficios ambientales a través de la captura de CO₂ (7). Pero aún no se ha definido una cepa ideal, dada la diversidad de factores que influyen en la productividad de los lípidos y por ende en el costo de producción del biodiesel.

Tal es así que el interés en las microalgas para la producción de biodiesel se debe a su alto contenido de lípidos en algunas especies y al hecho de que la síntesis de estos, especialmente de triglicéridos (TG) no polares (que son el mejor sustrato para la producción de biodiesel), puede ser manipulada por cambios de las condiciones de cultivo. Aun cuando las microalgas tienen tasas de crecimiento superiores y su fotosíntesis es más eficiente que la de las plantas terrestres (8), un obstáculo importante para la producción de su aceite es el costo relativamente elevado y encontrar el medio de cultivo apropiado. Las microalgas bajo condiciones normales de cultivo presentan un contenido lipídico que por lo general varía entre el 20 y el 50 % de su peso seco, sin embargo cuando son sometidas a situaciones de estrés, frecuentemente incrementan. Existen estudios de que en cultivos limitados de nitrato existe una tendencia generalizada a incrementar en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. En tal sentido, no existen estudios sobre el perfil de ácidos grasos en microalgas oleaginosas amazónicas que permiten brindar la información exacta de la estructura lipídica que permitan iniciar cultivos a gran escala para la producción de biodiesel. Por lo que, en esta investigación se pretende determinar el efecto de la concentración de nitrato en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas. Asimismo, evaluar el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato

(8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O), conocer la producción de biomasa y acumulación lípidos totales así como el perfil de ácidos grasos de las tres especies en estudio sometidas a concentraciones de nitrato indicadas.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

3.1. General.

- Determinar el efecto de la concentración de nitrato en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas.

3.2. Específicos.

- Evaluar el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O).
- Conocer la producción de biomasa y acumulación lípidos totales de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O).
- Determinar el perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp, Cepa UCP0001. *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato. (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O).

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1 Marco Teórico

3.1.1 Generalidades de la microalgas

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que comprenden organismos eucariotas y cianofíceas procariotas (cianobacterias). Se consideran un grupo de organismos versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica y se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes (2). De la misma manera que las plantas, ellas convierten la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis (22).

Las clases más importantes de algas son: las algas verdes (*chlorophyta*), las algas rojas (*Rhodophyta*) y las diatomeas (*Bacillariophyta*). Las algas pueden ser autótrofas o heterótrofas, las primeras requieren únicamente compuestos inorgánicos como el CO₂, sales y la luz como fuente de energía para el crecimiento, mientras las segundas son heterótrofas por lo que requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como de nutrientes como fuente de energía. Algunas algas fotosintéticas son mixotróficas, es decir, tienen la capacidad tanto de realizar la fotosíntesis como de utilizar nutrientes exógenos orgánicos. Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es un componente clave de supervivencia, por el que convierte la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos en adenosin trifosfato (ATP) y O₂, utilizable a nivel celular para la respiración y para producir energía en sus actividades de crecimiento (23).

La división Chlorophyta son las más utilizadas en aplicaciones comerciales. Sin embargo, existen grupos de microalgas como las diatomeas o grupos de microalgas ricas en silicio y cianobacterias procariotas que también ofrecen grandes oportunidades en biotecnología e ingeniería metabólica (24). Las microalgas de la división Chlorophyta o también llamadas algas verdes, son consideradas como uno de los grupos más especializados que comprenden una variedad de organismos con alto potencial de estudio. Dentro de este grupo se encuentran microalgas con diversas morfologías y aunque muchas provenientes de agua dulce, un gran número de estas también crecen en hábitat marinos y terrestres (25). Muchas de estas algas son adaptadas a condiciones extremas de temperatura, salinidad y humedad. Esta habilidad para adaptarse a condiciones combinadas y de estrés severos se refleja en el patrón de diversos y a veces inusuales perfiles lipídicos presentes en sus membranas (26).

3.1.2. Microalgas oleaginosas.

Las microalgas contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (2). Estos microorganismos representan una opción viable como materia prima para producir biodiesel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (14), algunas especies pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicéridos (12), no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular y no compiten por alimento humano (6). Para la producción exitosa de biodiesel empleando microalgas como sistemas biológicos para la acumulación de biomasa y lípidos, el primer punto crítico es buscar e identificar cepas híper productoras de lípidos (22). A pesar de que el intervalo de lípidos contenidos en microalgas oscila entre 1-75% (peso seco), algunas especies pueden alcanzar hasta el 90% (peso seco) bajo condiciones específicas de cultivo (3).

Para elegir una cepa se debe considerar una estrategia de selección en base a diversos criterios que sean prácticos a los siguientes problemas: a) velocidad de crecimiento, cuantificado normalmente por biomasa total acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen; b) cantidad y calidad lipídica; c) respuesta a alteraciones del ambiente, se consideran variaciones de temperatura, entrada de nutrientes y fuente lumínica, así como competencia con otras especies de microalgas o bacterianas; d) velocidad de absorción y afinidad por nutrientes, particularmente CO₂, nitrógeno y fósforo; e) cultivo de biomasa sencillo para su posterior procesamiento (16).

3.1.3. Inducción del aumento de la productividad de lípidos

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos, los cuales varían dependiendo de la especie: lípidos polares, lípidos neutrales, ceras, esteroides, fosfo-lípidos, glicolípidos, carotenoides, terpenos, tocoferoles, quinonas (24). Sin embargo, sólo los lípidos neutrales son adecuados para la producción de biodiesel y de éstos, los triacilglicéridos. El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar desde 1 hasta 90% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (25). Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos ambientales químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la composición de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio de cultivo; los físicos son la temperatura y la intensidad luminosa.

La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (26). Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose

un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (25). Con respecto a la fase de crecimiento (27) reportaron que en *Parietochloris incisa* se observó un alto contenido de triacilgliceroles (43% del total de ácidos grasos) en la fase logarítmica, el cual aumentó hasta 77% en la fase estacionaria. La influencia de la deficiencia de nitrógeno sobre la síntesis de lípidos fue descrita primero en algas verdes, aunque estudios posteriores también lo han demostrado con cianobacterias. (19), Reportaron que el contenido de lípidos totales de *Spirulina* sp. Aumentó de 8% a 28.6% del peso seco, cuando se sometió a una limitación por N y además se cultivó a una intensidad luminosa muy baja ($66 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en un medio complejo. En relación a microalgas verdes, en el género *Dunaliella*, se ha descrito que su principal lípido de reserva son los triglicéridos y que bajo condiciones de limitación de nitrógeno y con 1% de CO_2 , éstos aumentaron del 1% al 22%, respecto a los lípidos totales (7). Asimismo, *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 80% de sus lípidos totales en forma de triglicéridos y la mayoría de sus ácidos grasos son saturados en el rango de 16 a 20 carbonos, bajo condiciones de estrés (24), lo cual la coloca como una de las especies con mayor potencial para la producción de biodiesel.

También, se ha reportado que la adición de 2% de CO_2 estimuló la acumulación de ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) en la microalga marina *Nannochloropsis* sp. (13,25). Entre otros estudios relacionados también a la inducción de lípidos del tipo TAG (triacil-glicéridos) bajo condiciones de limitación de nitrógeno, destacan los realizados con *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) por el grupo de Cohen en Israel. En uno de sus trabajos, encontraron que *P. incisa*, acumula ácido araquidónico (AA) (20:4) y que hasta el 90% del total del AA está depositado en forma de TAGs. Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, el contenido de ácidos grasos alcanzó el 35% del peso seco y el AA excedió el 60% de los ácidos grasos (23). Recientemente, se describió que a una alta intensidad luminosa, se alcanzaron los más altos contenidos de ácidos grasos totales y que bajo deficiencia de nitrógeno, aumentó de

manera significativa el contenido de AA respecto al total de ácidos grasos (6). Finalmente, muy pocos estudios sobre la inducción de lípidos por limitaciones de nutrientes se han realizado en condiciones exteriores con reactores a escala piloto. Después de hacer crecer bajo condiciones limitantes de nitrógeno a dos cepas marinas y a dos cepas de agua dulce (26), seleccionaron a *Nannochloropsis* sp. por haber acumulado el 60% de lípidos bajo estas condiciones. En experimentos realizados con fotobiorreactores (FBRs) de 110 litros, se compararon las productividades tanto en medio suficiente de nitrógeno, como en medio deficiente. Se encontró que en el primer medio, esta microalga marina contenía 32% de lípidos, con una productividad de biomasa de $0.36 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y una productividad de lípidos de $117 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$. En contraste, en condiciones limitadas de nitrógeno, el contenido de lípidos aumentó al 60% y la productividad de lípidos a $204 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$, aunque la productividad de biomasa disminuyó a $0.3 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Los autores señalaron que se pueden obtener entre 20 y 30 ton de lípidos por hectárea, aunque estos datos deben considerarse con reserva, dado que la unidad experimental utilizada para generarlos fue de un volumen de 110 litros.

Con respecto a la temperatura, se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, cuando la temperatura aumenta, aumenta la saturación de los ácidos grasos. Con relación al efecto de la intensidad luminosa, ésta influye notablemente en la composición química en general, el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética. Generalmente, una intensidad luminosa baja induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a las membranas celulares (19). En contraste, las altas intensidades luminosas influyen en la disminución del contenido total de lípidos polares (27) con el concomitante incremento de la cantidad de lípidos de almacenamiento, principalmente triglicéridos (28).

3.1.4 Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH_3) y un grupo carboxilo al final (16). Existe un amplio espectro de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadenas de carbonos. Estos ácidos grasos también pueden presentar dobles enlaces, si solo presentan un enlace dentro de la estructura, se denomina ácidos grasos monoinsaturados, si hay dos o más dobles enlaces poliinsaturados y si por el contrario la cadena no presenta dobles enlaces, son designados saturados (16). Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en n-6(ω -6) y n-3 (ω -3) según la posición del doble enlace con respecto al medio terminal de la molécula. El principal ácido graso n-6 es el ácido linolèico (18:2 ω -6), presente en los aceites vegetales de maíz, girasol y soya. El ácido γ -linolènico (18:3 ω -3) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos n-3 de cadena más larga, como el eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3) y el decosahexanoico (DHA, 22:6 ω -3) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos (16).

Los principales componentes de la fracción lipídica en las microalgas son los triglicéridos o triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glucolípidos (predominantes en membranas de los cloroplastos), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos), aunque pueden presentarse compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, entre otros (29).

3.1.4.1. Propiedades de los ácidos grasos.

Su molécula presenta carácter anfipático, esto es, contiene una zona para hidrófila (el $-\text{COOH}$) y una zona apolar hidrófoba (el resto de la cadena) por lo que, al contacto con el agua se orientan formando micela y otras agrupaciones moleculares (que veremos también al estudiar los fosfolípidos). Esta propiedad está mucho más acentuada en sus sales (jabones).

(Figura 01)

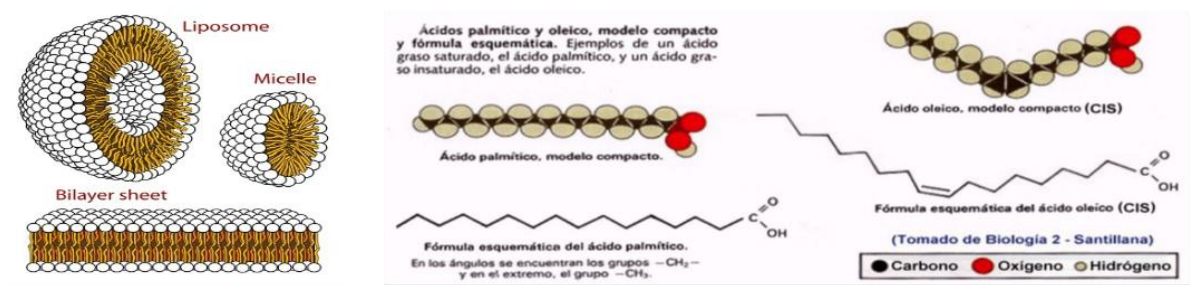


Figura 01. Modelo Esquemático de ácidos grasos (16)

3.1.4.2 Clasificación de los ácidos grasos

3.1.4.2.1 Ácidos grasos Saturados

Se caracterizan por ser: Sin doble enlaces y punto de fusión más o menos elevado por la abundantes fuerzas de van der Waals entre cadenas que favorecen la inmovilidad y empaquetamiento entre moléculas, propios del estado sólido, Origen grasas sólidas (cebos y mantecas), Son frecuentes en animales, Su consumo debe ser moderado (se les relaciona con el “colesterol”). Ejemplo: plasmítico: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$.

3.1.4.2.2 Ácidos grasos Insaturados: MONO, DI Y TRI Con doble enlaces. (1,2 ó 3), Presentan isomería CIS/TRANS por la presencia de doble enlace y Punto de fusión interior a los saturados por las escasas fuerzas de van der Waals entre cadena debido a las formas CIS que dificultan en empaquetamiento de moléculas, (**Tabla 01**). Originan grasas líquidas (aceites), Son más frecuentes en vegetales y animales de sangre fría (ectotermos) como peces, etc. Su consumo es más saludable que los saturados (se les relaciona con el “colesterol bueno”). Ejemplo: oleico: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH= (CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$.

Tabla 01. Clasificación de ácidos grasos.

ÁCIDOS GRADOS SATURADOS		
Ácido	Fórmula	Punto de Fusión (*C)
Caproico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{COOH}$	-1,5
Caprílico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_6 - \text{COOH}$	16,3
Cáprico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_8 - \text{COOH}$	31,4
Láurico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{COOH}$	44,2
Mirístico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{12} - \text{COOH}$	53,9
Palmítico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$	63,1
Estearico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$	69,6
Araquídico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{18} - \text{COOH}$	76,3
Lignocérico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{22} - \text{COOH}$	86,0
ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS		
Palmitoleico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$	-0,5
Oleico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$	13,4
Linoleico	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$	-5

3.1.5. Utilidad de cada uno de los ácidos grasos

3.1.5.1. Ácidos grasos saturados:

3.1.5.1.1. Ácido Caproico: El ácido hexanoico, también llamado ácido Caproico, es un ácido carboxílico derivado del hexanocon, como su nombre lo sugiere, seis carbonos. Es un aceite incoloro, viscoso, olor a cabras u otros animales de granja. Forman sales llamadas hexanoatos o caproatos. Es un ácido graso encontrado naturalmente en las grasas y aceites animales, y es uno de los compuestos químicos que le da a la semilla del ginkgo el característico brillo y mal olor al descomponerse. Además, como su nombre vulgar sugiere, es parte de los sudores de las cabras. El mal olor de los calcetines sucios se debe al ácido Caproico.

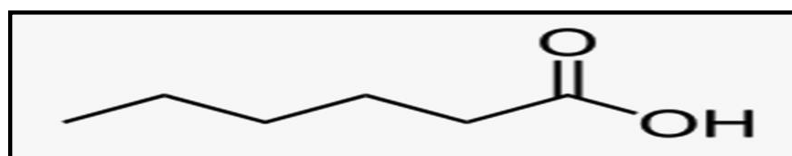


Figura 02. Estructura química del ácido hexanoico

3.1.5.1.2. Ácido Caprílico: El nombre sistemático de ácido caprílico es "ácido octanoico."

El "octo-" prefijo hace referencia a los ocho átomos de carbono. "Octo" se convierte en "octanaje", porque la cadena de carbono se satura. En química orgánica, hidrocarburos saturados se denominan "alcanos" y es la convención estándar de nomenclatura para añadir el prefijo con "ano" para reflejar esto. "Octano" se convierte en "octanol-" porque hay una **(OH)** grupo hidroxilo o un "alcohol" en el extremo de la cadena. Finalmente, "octanol-" se convierte en "ácido octanoico" debido a que el grupo hidroxilo es parte de un grupo carboxilo grande.

Función: Aunque el final de hidrocarburos de ácido Caprílico hace que la molécula sustancialmente no polar y mínimamente soluble en agua, permite que el compuesto soluble en grasas, aceites y lípidos. Esto no repulsión de lípidos permite que la molécula pase a través de las membranas a base de lípidos de la membrana celular de diversos protozoos y estructuras a base de lípidos de hongos y bacterias intracelulares. En el caso de *Staphylococcus aureus*, una bacteria que causa el 80% de las infecciones estafilocócicas graves en humanos, el ácido Caprílico parece ser capaz de entrar en las estructuras fundamentales dentro de la célula, que destruye el grupo carboxílico.

Aplicaciones Industriales: La cadena hidrocarbonada larga saturada de ácido Caprílico, minimiza las fuerzas de atracción entre las moléculas, que hace que sea relativamente volátil (por ejemplo, es fácilmente de líquido a gas). Esto, combinado con su olor característico, ligeramente rancio, hizo un ingrediente muy común en los perfumes. El ácido Caprílico también se utiliza en pequeñas concentraciones en la preparación de alimentos, aunque esto es más por sus propiedades antimicrobianas. El grupo carboxílico terminal, en la presencia del grupo carboxilo de la otra molécula, puede someterse a deshidratación para formar compuesto de tipo éster. En este sentido, el ácido Caprílico potencialmente puede ser útil en la producción de ciertos polímeros.

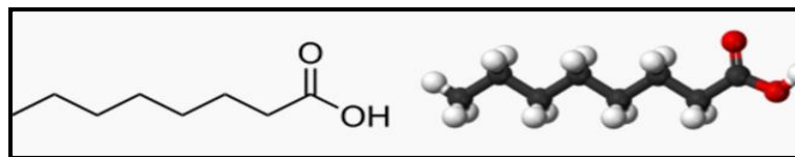


Figura 03. Estructura química del ácido octanoico

3.1.5.1.3. Ácido Cáprico: es un ácido graso saturado. Su fórmula es $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_8 \text{COOH}$.

Las sales y ésteres del ácido decanoico se llaman decanoatos o "Capratos". El término ácido Cáprico deriva del latín, y se refiere al olor que recuerda el de las cabras. El ácido Cáprico se encuentra de forma natural en el aceite de coco (aproximadamente 10 %) y aceite de almendra de palma (aproximadamente 4 %). Se encuentra en la leche de distintos mamíferos y en menor medida en otras grasas animales.

Otros dos ácidos orgánicos se nombran de forma similar: el ácido Cáproico (un ácido graso C6) y el ácido Caprílico (un ácido graso C8). Junto con el ácido Cáprico, forman aproximadamente el 15 % de la grasa de la leche de cabra.

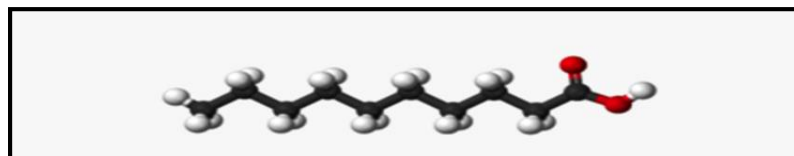


Figura 04. Estructura química del ácido cáprico

3.1.5.1.4. Ácido Láurico: (denominado también **Ácido dodecanóico**) es un ácido graso saturado de cadena de doce átomos de carbono (fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) con un ligero olor a jabón. Suelen proceder de las semillas de diferentes tipos de palmeras. Se encuentra relativamente abundante en el aceite de semillas de palma (no confundir con aceite de palma) y de coco, se cree que posee propiedades antimicrobianas. Se encuentra en cierta proporción en la leche humana (6.2% de la grasa total), la leche de vaca (2.9%), así como la leche de cabra (3.1%).

Uso: Se considera un ácido graso de bajo riesgo en su manipulación, de una vida media larga. A temperatura ambiente presenta una apariencia sólida, pero funde fácilmente en agua hirviendo. Los jabones elaborados con ácido láurico producen Grandes cantidades de espuma y poseen la propiedad de disolver la grasa y el aceite rápidamente.

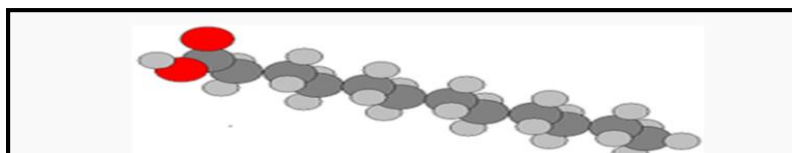


Figura 05. Estructura química del ácido láurico

3.1.5.1.5. Ácido mirístico: es un ácido graso con fórmula química $C_{14}H_{28}O_2$. También llamado **ácido tetradecanoico**, es un ácido graso común saturado, con la fórmula molecular $CH_3(CH_2)_{12}COOH$. Un mirístico es la sal o éster del ácido mirístico. Recibió su nombre por la nuez moscada (*Myristica fragrans*); y su manteca tiene 75 % trimiristina, un triglicérido compuesto por tres moléculas de ácido mirístico. Además de en la nuez moscada, este ácido se encuentra en el aceite de palma, manteca y espermaceti, la fracción cristalizada del aceite de grasa de ballena.

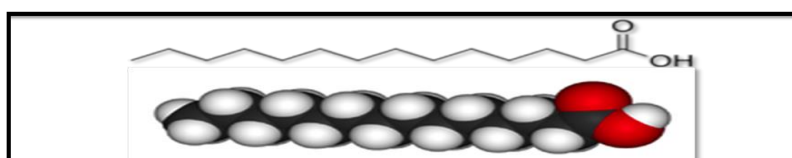


Figura 06. Estructura química del ácido mirístico

3.1.5.1.6. Ácido Palmítico: o ácido hexadecanoico, es un ácido graso saturado de cadena larga, formado por dieciséis átomos de carbono. Es un sólido blanco que se licúa a unos 63,1 °C. Su fórmula química es $CH_3(CH_2)_{14}COOH$.

El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado de la dieta, constituyendo aproximadamente un 60 % de los mismos. Es el más abundante en las carnes (detrás del

ácido oleico, que es monoinsaturado) y grasas lácteas (mantequilla, queso y nata) y en los aceites vegetales como el aceite de coco y el aceite de palma. Es el ácido graso menos saludable pues es el que más aumenta los niveles de colesterol en la sangre, por lo que es el más aterogénico.

Durante la Segunda Guerra Mundial se usaron derivados del ácido palmítico para la producción de napalm. Mezclado con el ácido esteárico se obtiene un compuesto conocido con el nombre de ácido margárico, del cual se dice que se originó el nombre de la margarina.

Biosíntesis: Es el segundo ácido graso que se produce durante la lipogénesis y a partir de él se pueden formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces (insaturaciones). Durante el catabolismo, la oxidación total de 50 mol de ácido palmítico produce, en energía química, 1298 moles de ATP.

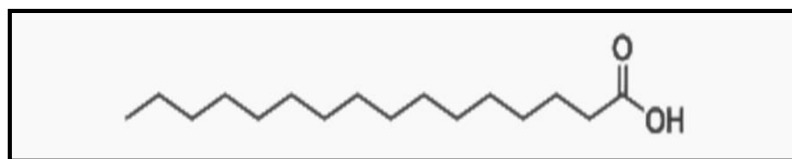


Figura 07. Estructura química del ácido palmítico

3.1.5.1.7. Ácido Esteárico: es un ácido graso saturado de 18 átomos de carbono presente en aceites y grasas animales y vegetales. A temperatura ambiente es un sólido parecido a la cera; su fórmula química es **CH₃ (CH₂)₁₆COOH**. Su nombre IUPAC es **ácido octadecanoico**. Tiene una cadena hidrofóbica de carbono e hidrógeno. Se obtiene tratando la grasa animal con agua a una alta presión y temperatura, y mediante la hidrogenación de los aceites vegetales. Algunas de sus sales, principalmente de sodio y potasio, tienen propiedades como tenso activas. Es muy usado en la fabricación de velas, jabones y cosméticos.

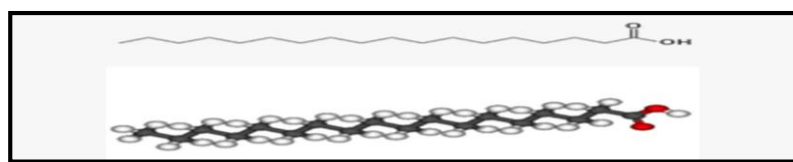


Figura 08. Estructura química del ácido esteárico

3.1.5.1.8. Ácido Araquídico: también denominado **ácido eicosanoico**, es un ácido graso saturado que es un constituyente del aceite de maní (1,1%–1,7%).¹ Su nombre proviene de la raíz latina *arachis* maní. Se puede obtener mediante hidrogenación del ácido araquidónico. La reducción del ácido Araquídico permite obtener alcohol araquídílico.



Figura 09. Estructura química del ácido araquídico

3.1.5.1.9. Ácido Lignocérico: es el ácido graso saturado con la fórmula $C_{23}H_{47}COOH$. Se encuentra en el alquitrán de madera, varios cerebrósidos, y en pequeñas cantidades en la mayoría de las grasas naturales. Los ácidos grasos del aceite de cacahuate contienen pequeñas cantidades de ácido lignocérico (1,1% - 2,2%). Este ácido graso es también un subproducto de la producción de lignina. La reducción del ácido Lignocérico, produce alcohol lignocerílico.

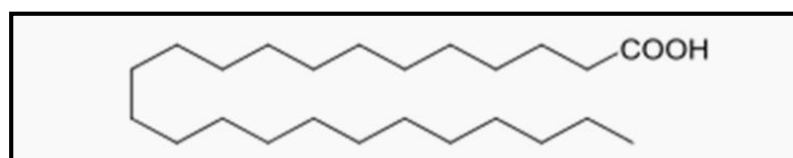


Figura 10. Estructura química del ácido lignocérico

3.1.5.2. Ácidos grasos insaturados

3.1.5.2.1. Ácido Palmitoleico: o ácido delta-9 hexadecénico es un ácido graso omega-7 monoinsaturado. Se trata de un componente común de los acilglicéridos del tejido adiposo humano. Está presente en todos los tejidos, pero Se encuentra en concentraciones más altas en el hígado. Es biosintetizado a través del ácido palmítico por la acción de la enzima delta -9 desaturasa.

Fuentes: El ácido palmitoleico se puede abreviar como 16:1Δ9. Las fuentes dietéticas donde puede ser encontrado el ácido palmitoleico incluyen una variedad de grasas animales, aceites vegetales y aceites marinos. El aceite de nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y el aceite de espinillo (*Hippophae rhamnoides*) presentan elevadas concentraciones de ácido palmitoleico, en torno a un 17% y a un 40%, respectivamente.

Se han llevado a cabo estudios donde se examinaban los efectos de los regímenes de alimentación ricos en diversos ácidos grasos, observándose que las concentraciones de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL, "colesterol malo") eran similares en dietas ricas en ácido palmitoleico y palmítico, y significativamente más altas que en dietas ricas en ácido oleico. Sin embargo, la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, "colesterol bueno") se encontraba significativamente más baja en aquellas dietas ricas en ácido palmitoleico con respecto a las dietas ricas en ácido palmítico. El estudio confirmaba que, por lo menos en los hombres con hipercolesterolemia, un pequeño aumento del ácido palmítico aumentaba los niveles de LDL en relación al ácido oleico, incluso cuando el colesterol dietético era bajo. El ácido palmitoleico se comportaba como un ácido graso saturado y no como un ácido graso monoinsaturado en relación a su efecto sobre el colesterol LDL.

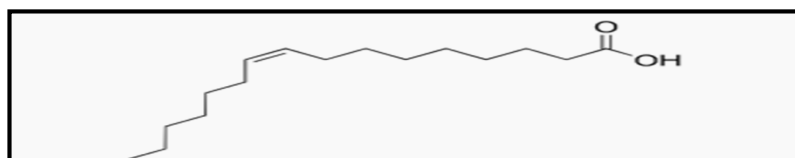


Figura 11. Estructura química del ácido palmitoleico

3.1.5.2.2. Ácido Oleico: es un ácido graso mono insaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el aceite de oliva, del aguacate, etc. Ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Su fórmula química molecular es $C_{18}H_{34}O_2$ o bien, desarrollada, $CH_3 (CH_2)_7CH=CH (CH_2)_7COOH$ ². Su nombre IUPAC es ácido *cis*-9-octadecenoico, y su nombre de taquigrafía de lípido es 18:1 *cis*-9 (también existe el isómero *trans*-9, el ácido eláidico). La forma saturada de este ácido es el ácido esteárico. El aceite de oliva comprende un 55-80 % de ácido oleico y el aceite de semilla de uvas un 15-20 %.

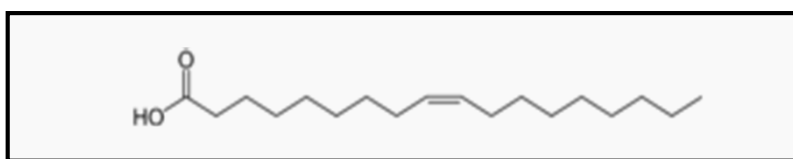


Figura 12. Estructura química del ácido oleico

3.1.5.2.3. Ácido Linoleico: cuya semilla es la linaza y (elaia) aceite de oliva o simplemente aceite) es un ácido graso esencial de la serie omega 6 (ω -6), es decir, el organismo no puede crearlo y tiene que ser adquirido a través de la dieta. Es un ácido graso poliinsaturado, con dos dobles enlaces: $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_4-COOH$.

Configuración: Posee una configuración 18:2 Δ 9,12 (donde el 18 es el número de átomos de carbono, el 2 número de dobles enlaces y las cifras sucesivas al Δ “delta” la posición de los dobles enlaces comenzando a contar desde el extremo carboxílico -COOH de la

molécula) es el precursor de numerosos derivados, que se forman en reacciones de elongación, de saturación o ambas.

Algunos beneficios: Sube las defensas, disminuye los niveles de grasa corporal, disminuye la presión arterial, ayuda a controlar el colesterol y los triglicéridos, reduce el riesgo de enfermedades del sistema circulatorio, ayuda a eliminar las grasas perjudiciales para el organismo, interviene en un buen funcionamiento de los sistemas nervioso y visual.

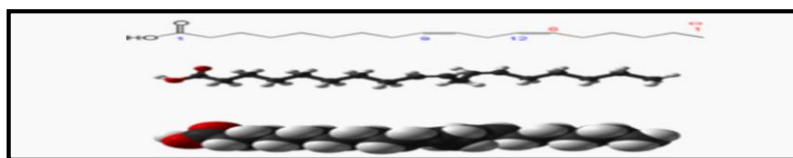


Figura 13. Estructura química del ácido linoleico

3.1.6. 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 (25). En microalgas verdes, la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos empieza por la unión del complejo luz-biomasa, el cual está mediado por la clorofila II y carotenoides, los cuales capturan la energía lumínica en forma de fotones. La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, formando protones, electrones y O₂ molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de NADPH mediante la reducción de ferredoxina. Dentro del lumen tilacoidal se genera un gradiente electroquímico, debido a la liberación de protones después de la oxidación de agua; el cual se emplea para la formación de ATP mediante la ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP son sustratos del ciclo de Calvin (22); donde la enzima Rubisco

cataliza la conversión de CO_2 y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son convertidas subsecuentemente en piruvato y acetil-CoA (25).

Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetil-CoAcarboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA (25), molécula que es transferida a la proteína acarreadora de grupos acil (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (SAG); donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA. El ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (16:0) o esteárico (18:0). La enzima ACP-sintasa abre la cadena acil y libera el ácido graso (23).

La formación de triacilglicerol se lleva a cabo en el retículo endoplasmático, en organelos especializados llamados plástidos, donde se producen lípidos neutros con la finalidad de almacenar energía y liberar espacio dentro de la célula (24). La primera reacción para la síntesis de TAG es la condensación (acilación) de glicerol-3-fosfato (G3P) con acil-CoA para formar lisofosfatido (LPA), el cual es catalizado por acil-CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil-transferasa (GPAT) y otra molécula de acil-CoA para producir fosfatidato (PA) (5). Posteriormente, PA puede ser desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) para formar diacilglicerol. Finalmente, la síntesis de TAG es catalizada por acil-CoA: diacilglicerolacil-transferasa (DGAT), la cual incorpora un tercer grupo acil-CoA a la molécula diacilglicerol, los TAGs resultantes son almacenados en cuerpos de aceites, los cuales son la materia prima para obtener biodiesel. **(Figura 14)**

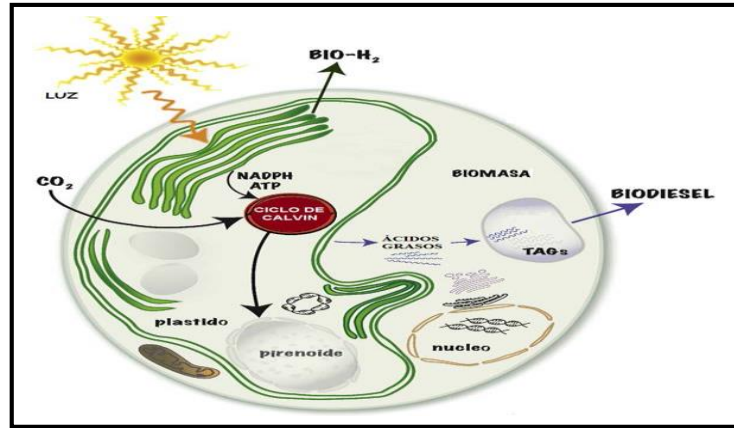


Figura 14. Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas. (Beeret *et al.* 2009).

3.1.7. Nitrógeno.

Se conoce como nitrógeno al elemento químico que se caracteriza por tener como mayor número atómico al 7 y que se simboliza con la letra N. Se trata de un gas sin color ni olor y de carácter insípido que ésta presente en las cuartas quinta partes de aire de la atmósfera (en su versión molecular, reconocida como N_2). Cabe resaltar que el nitrógeno se suele aprovechar como refrigerante y es útil en el proceso de formación del amoniaco que luego permite crear fertilizantes y explosivos, entre otros productos. Con el nitrógeno también es posible fabricar ácido nítrico.

Los iones amonio retenidos de este modo son desplazados fácilmente por otros cationes presentes en el agua intersticial, tales como el calcio, el magnesio o el sodio, ni tampoco son accesibles a las bacterias nitrificantes. Aunque este proceso puede retener una parte de todo el nitrógeno amoniacal aportado a un suelo, sus efectos sobre el balance de nitrógeno no serán importantes a largo plazo.

3.1.7.1. Propiedades del Nitrógeno.

Una de las propiedades de los elementos no metales como el nitrógeno es por ejemplo que los elementos no metales son malos conductores del calor y la electricidad. El nitrógeno, al

igual que los demás elementos no metales, no tiene lustre. Debido a su fragilidad, los no metales como el nitrógeno, no se pueden aplanar para formar láminas ni estriados para convertirse en hilos

El estado del nitrógeno en su forma natural es gaseoso. El nitrógeno es un elemento químico de aspecto incoloro y pertenece al grupo de los no metales. El número atómico del nitrógeno es 7. El símbolo químico del nitrógeno es N. el punto de fusión del nitrógeno es de 63,14 grados Kelvin o de $-209,01$ grados Celsius o grados centígrados. El punto de ebullición del nitrógeno es de 77,35 grados kelvin o de $-194,8$ grados Celsius o grados centígrados.

3.1.7.2. Propiedades atómicas del nitrógeno

La masa atómica de un elemento está determinada por la más total de neutrones y protones que se puede encontrar en un solo átomo perteneciente a este elemento. En cuanto a la posición donde encontrar el nitrógeno dentro de la tabla periódica de los elementos, el nitrógeno se encuentra en el grupo 15 y periodo 2. El nitrógeno tiene una masa atómica de 14,0067u.

La configuración electrónica del nitrógeno es $[\text{He}] 2s^2 2p^3$. La configuración electrónica de los elementos, determina la forma el cual los electrones están estructurados en los átomos de un elemento. El radio medio del nitrógeno es de 65pm, su radio atómico o radio de Bohr es de 56pm, su radio covalente es de 75 pm y su radio de van der Waals es de 155 pm. El nitrógeno tiene un total de 7 electrones cuya distribución es la siguiente: En la primera capa tiene 2 electrones y en la segunda tiene 5 electrones.

3.1.7.3 Nitrógeno y su importancia para las microalgas

El nitrógeno es un componente esencial de los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Vitales más importante para los seres vivos. Las legumbres son capaces de absorber éste

transformado en amoníaco y luego en nitrato por bacterias que viven en simbiosis con la planta en sus raíces. El nitrato es posteriormente utilizado por la planta para formar el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas que finalmente se incorporan a la cadena trófica.

El nitrógeno orgánico se define funcionalmente como nitrógeno ligado orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. No incluye a todos los compuestos orgánicos del nitrógeno. Analíticamente, el nitrógeno orgánico y el amoníaco se pueden determinar juntos y se han denominado *Nitrógeno Kjeldahl*, un término que refleja la técnica utilizada en su determinación. El nitrógeno orgánico incluye productos naturales, como las proteínas y péptidos, ácidos nucleicos y urea, y numerosos materiales orgánicos sintéticos. La concentración típica del nitrógeno orgánico varía desde unos cientos de microgramos por litro en algunos lagos hasta más de 20 mg/l en las aguas residuales brutas.

3.1.7.4. Nitrógeno Kjeldahl (4500 N)

El nitrógeno orgánico se define funcionalmente como nitrógeno ligado orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. No incluye a todos los compuestos orgánicos del nitrógeno. Analíticamente, el nitrógeno orgánico y el amoníaco se pueden determinar juntos y se han denominado *Nitrógeno Kjeldahl*, un término que refleja la técnica utilizada en su determinación. El nitrógeno orgánico incluye productos naturales, como las proteínas y péptidos, ácidos nucleicos y urea, y numerosos materiales orgánicos sintéticos. La concentración típica del nitrógeno orgánico varía desde unos cientos de microgramos por litro en algunos lagos hasta más de 20 mg/l en las aguas residuales brutas.

3.2. Definición de términos básicos.

Aceite: son sustancias que son estructuralmente grasas y que se obtienen a través del prensado de materia prima. Los aceites pueden usarse en diferentes situaciones o para diferentes actividades, aunque en la mayoría de los casos su función (debido a su composición) tiene que ver con la lubricación y la humectación grasa en un espacio o en una combinación de ingredientes.

Ácidos grasos: son los componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$).

Autótrofos: organismo capaz de sintetizar o elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancia inorgánica: plantas que tienen clorofila son seres autótrofos.

Biodiesel : biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo, mediante procesos industriales de esterificación y trans esterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo.

Biomasa: materia total de los seres que viven en un lugar determinando, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Biosíntesis: es el conjunto de miles de reacciones químicas que ocurren continuamente en el cuerpo de un ser vivo en el que las moléculas más sencillas forman biomoléculas (moléculas orgánicas) más complejas producción de los componentes moleculares de las células, que se lleva a cabo a partir de sustancias más sencillas y con aporte de energía; su función es reponer los componentes degradado y mantener la organización y la actividad celular.

Clorofila: la clorofila es el pigmento fotorreceptor responsable de la primera etapa en la transformación de la energía de la luz solar en energía química, y consecuentemente la molécula responsable de la existencia de vida superior en la Tierra. Se encuentra en orgánulos específicos, los cloroplastos, asociada a lípidos y lipoproteínas.

Cloroplasto: es un orgánulo ovoide de las células verdes contenidas en los vegetales, que posee clorofila, gracias a la cual puede llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Los cloroplastos presentan una envoltura conformada por dos membranas concéntricas que contienen vesículas, llamadas tilacoides, con apariencia de sacos aplanados, en las cuales se encuentran organizados los pigmentos y demás moléculas que convierten la energía luminosa en energía química, tal es el caso de la clorofila.

Concentración: desde la perspectiva de la química, concentración es una noción que describe a la relación, asociación o proporción que se puede establecer al comparar la cantidad de soluto (es decir, de sustancia capaz de disolverse) y el nivel de disolvente (es decir, la sustancia que logra que el soluto se disuelva) presentes en una disolución. Cuando más chica será la concentración, y viceversa.

Fotosíntesis: proceso metabólico por el que algunas células vegetales transforman sustancias inorgánicas en orgánicas, gracias a la transformación de la energía luminosa en la química producida por la clorofila. Durante la fotosíntesis, las plantas absorben dióxido de carbono y expulsan oxígeno.

Lípidos: son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrogeno y generalmente, en menor proporción también oxígeno. Además ocasionalmente pueden contener también fósforo, nitrógeno y azufre.

Microalgas: son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontes son frecuentemente incluidas como microalgas.

Microalgas oleaginosas: son aquellas microalgas que contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabólicas y fuente de energía.

Monoinsaturados: son aquellos ácidos grasos de cadena carbonada porque poseen una sola insaturación en su estructura, es decir posee un solo doble enlace carbono – carbono ($-\text{CH}=\text{CH}-$). Un ejemplo de este tipo de ácidos es el ácido oleico presente en casi todas las grasas naturales, llamado comúnmente omega 9.

Nitrato: el nitrato (NO_3^-) es una materia prima útil para plantas dedicadas a la síntesis de proteínas. El nitrato en concentraciones mayores a los 10mg/L, puede ser tóxico para muchos organismos tanto terrestres como acuáticos.

Nitrógeno: de símbolo N, es un elemento gaseoso que compone la mayor parte de la atmósfera terrestre. Su número atómico es 7 y pertenece al grupo 15 (o VA) de la tabla periódica, el nitrógeno es un gas no tóxico, incoloro e insípido. Puede condensarse en forma de un líquido incoloro que, a su vez, puede comprimirse como un sólido cristalino e incoloro.

Nutrientes: es un producto químico procedente del exterior de la célula y que ésta necesita para realizar sus funciones vitales. Éste es tomado por la célula y transformado en constituyente celular a través de un proceso metabólico de biosíntesis llamado anabolismo o bien es degradado para la obtención de otras moléculas y de energía.

Polinsaturado: son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos. Dentro de este grupo encontramos el ácido linoléico (omega 3 y el omega 6) que son

esenciales para el ser humano. Tienen un efecto beneficioso en general, disminuyendo el colesterol total. El exceso implica la producción de compuestos tóxicos. Se pueden obtener de pescados azules y vegetales como maíz, soja, girasol, calabaza, nueces.

Tilacoides: son sacos aplanados, o vesículas, que forman parte de la estructura de la membrana interna de cloroplasto; sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación; las pilas de tilacoides forman colectivamente las granas.

Triglicéridos: los triglicéridos son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos que suelen ser distintos.

3.3 Antecedentes.

Debido a que las propiedades del biodiesel se ven influenciadas por la calidad de los lípidos a partir de los cuales se ha producido, para obtener biodiesel de calidad es necesario asegurarse que los lípidos contengan ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación (preferentemente los ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetano, estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo (punto de nube), viscosidad y lubricidad (13). La norma en 14214 limita el contenido de ácido linolénico (C18:3) y de los ácidos poliinsaturados con cuatro enlaces dobles o más, a 12 % y 1 % respectivamente.

Los cultivos limitados en nitrógeno mostraron una tendencia generalizada a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuir los poliinsaturados, mientras que al aumentar la concentración de este nutriente, se observa un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Así, *Nannochloropsis* sp. En un medio limitado en nitrógeno después de cinco días presentó un incremento en los ácidos grasos mirístico (de 0,7 % a 2,9 %), palmítico (de 4,8 % a 19,8 %), palmitoleico (de 3,9 % a 15,1 %) y oleico

(de 0,7 % a 6,8 %)(14) y al evaluar el efecto de la salinidad, la intensidad de luz y la disponibilidad de nitrógeno (15), evidenciaron para la misma microalga la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico en condiciones limitadas de nitrógeno sin importar el grado de luz o salinidad y en condiciones ricas en nitrógeno asociadas a alta intensidad de luz y salinidad; con una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico).

Para *Chlorella vulgaris*, observaron que bajo condiciones fotoautotróficas y fotoheterotróficas, la disminución del nitrógeno en el medio de cultivo tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico y la disminución los ácidos grasos poliinsaturados. En condiciones mixotróficas *Chlorella vulgaris* presentó un perfil de lípidos compuesto principalmente por ácido palmítico y ácido oleico (50 % - 62 %) independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio. Para *Scenedesmus rubescens* la limitación de nutrientes al aumentar el tiempo de cultivo, claramente evidenció un aumento en el ácido oleico (de 16 % a 54 %) y la disminución en los ácidos linoleico y linolénico (17). Resultados similares fueron reportados por (18) y (19), para *Scenedesmus incrassatulus* al observar un aumento del 78,8 % en el contenido de ácido palmítico y de 133,4 % de ácido oleico al pasar de 6 a 11 días de cultivo.

Asimismo, para *Nannochloropsis* sp. Se evidenció un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexaenoico) al aumentar la concentración de nitrato y fosfato en el medio (20), mientras que el contenido de ácido eicosapentanoico se incrementó en un medio rico solo en nitrógeno (21). En otros trabajos se estudió el efecto combinado de la fuente de carbono (bicarbonato o acetato) y los niveles de radiación en el crecimiento y perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Pavlova lutheri* y se encontró que el crecimiento y la composición lipídica fueron más sensibles a las

variaciones en la intensidad de luz que a la fuente de carbono; a una intensidad de luz de 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ el porcentaje de los ácidos grasos saturados fue de 25,8 % y 23,9 % con bicarbonato y acetato respectivamente y al aumentar la intensidad de luz a 340 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ los ácidos grasos saturados alcanzaron un valor de 29 % en el medio con bicarbonato y de 29,7 % el medio con acetato (22). Así mismo, en un cultivo de *Nannochloropsis* sp. Un aumento de la intensidad de luz produjo un incremento en la productividad de la biomasa y el contenido de ácidos grasos, especialmente saturados (mirístico y palmítico) y monoinsaturados (palmitoleico y oleico) (14).

El fósforo ha presentado un efecto similar al nitrato. Al inicio de un cultivo de *Nannochloropsis* sp. Se presentaron principalmente lípidos polares y esteroides y la disminución de la concentración de fósforo en el medio de cultivo provocó un aumento en el contenido lipídico de 13,2 % a 50,1 % de los cuales el 67 % fueron triglicéridos, sin embargo no se presentó un efecto benéfico en la productividad de lípidos debido al bajo crecimiento celular (14). Resultados similares fueron encontrados al crecer *Monodus subterraneus* en diferentes concentraciones de fosfato, donde al disminuir su concentración en el medio de cultivo se incrementó el porcentaje de lípidos totales, principalmente triglicéridos (23).

Con respecto a la temperatura se ha observado una relación inversa entre el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)(20) debido a que la célula necesita mayor cantidad de PUFA para mantener la fluidez de la membrana celular o a que las bajas temperaturas conducen a un alto nivel de oxígeno molecular intracelular, lo cual mejora la actividad de las enzimas desaturasa y elongasa que participan en la biosíntesis de PUFA (21).y (22) en sus investigaciones con *Isobrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, y cuatro especies de microalgas australianas *Isobrysis* sp., *Rhodomonas* sp., *Cryptomonas* sp. y *Chaetoceros* sp. Encontraron altos niveles de PUFA a las temperaturas de crecimiento más bajas

Además, en investigaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología y Bioenergética en la universidad científica del Perú, Paredes *et al.* 2014, reportaron que la tasa de crecimiento en las cinco especies microalgales evaluadas fue mayor en medio de cultivo con nitrógeno con respecto a aquellas cultivadas en medio sin nitrógeno a excepción de *Ankistrodesmus nannoselene* que mostró un resultado diferente. *Chlorella* sp. Y el cambio de coloración en el medio de cultivo fue muy notorio a partir del segundo día de iniciado el cultivo, tal como lo mencionan Millan y Fernández (42) que observaron un cambio de coloración en el medio de cultivo en los sistemas y un aumento en el tamaño celular en los medios con pocos nitratos. De igual manera, la biomasa y el contenido de lípidos totales en cinco especies de microalgas evaluadas fueron variable. Así, en *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannoselene* y *Scenedesmus* sp., se observó que a menor biomasa en condiciones sin nitrógeno hubo un mayor porcentaje de lípidos totales durante el período de evaluación (07 días), observándose un comportamiento diferente en el caso de *Scenedesmus* sp., *quadricauda* y *Chlorella* sp.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, distrito de san Juan Bautista, provincia de Maynas, departamento de Loreto. La extracción de lípidos totales se realizó en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,0 Distrito de san Juan Bautista, Psje Los Paujiles s/n. AA.HH Nuevo San Lorenzo. La determinación de los ácidos grasos se realizó en el Laboratorio de Acuicultura del Instituto del Mar del Perú-IMARPE, ubicado en la Esquina General Valle S/N, Chucuito, Callao.

4.2. Recursos utilizados

4.2.1. Materiales:

- Frascos Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- Mandil y guantes de laboratorio.
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Gradillas
- Mascarilla
- Gorro
- Papel de Aluminio

- Pipetas de 20 hasta 1000 μ l
- Probetas
- Tips de 100,200 y 1000 μ l
- Alcohol (70% y 96%)
- Microtubos (1.5 mL)
- Tubos de 15, 35 mL

4.2.2. Equipos.

- Computadora
- Balanza analítica ABJ-NM/ABJ-N KERN
- Centrifuga refrigerada HETTICH UNIVERSAL 320R
- Autoclave YAMATO SM510
- Nano Espectrofotómetro Nanodrop THERMO SCIENTIFIC ND2000
- Microscopio óptico ZEISS
- Estufa
- Cabina de flujo laminar marca Telstar
- Bombas de aireación.
- Compresora para dar aireación

4.2.3. Reactivos

- Alcohol isopropílico
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- NaHCO_3

- K_2HPO_4
- $NaNO_3$
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
- Citrato férrico ($C_6H_5FeO_7 \cdot XH_2O$)
- NaEDTA
- H_3BO_3
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- Metasilicato de sodio (Na_2SiO_3)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Cloroformo
- Etanol
- NaCl

4.2.4. Programas

- Excel de Microsoft Office

4.3. Diseño de la investigación

El diseño fue de tipo experimental, el mismo que consistió en cultivar tres especies de microalgas, *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 en medio Chu Nro.10, inicialmente en matraces de Erlenmeyer, 500 ml y conforme se fue incrementando su crecimiento microalgal el cultivo se colocó en frascos de

mayor volumen, al conseguir la biomasa necesaria se sometieron a diferentes concentraciones de nitrato (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. Seguidamente, cumplido el tiempo establecido, se cosechó las microalgas por centrifugación para así evaluar, conocer y determinar el perfil de crecimiento, producción de biomasa, acumulación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos.

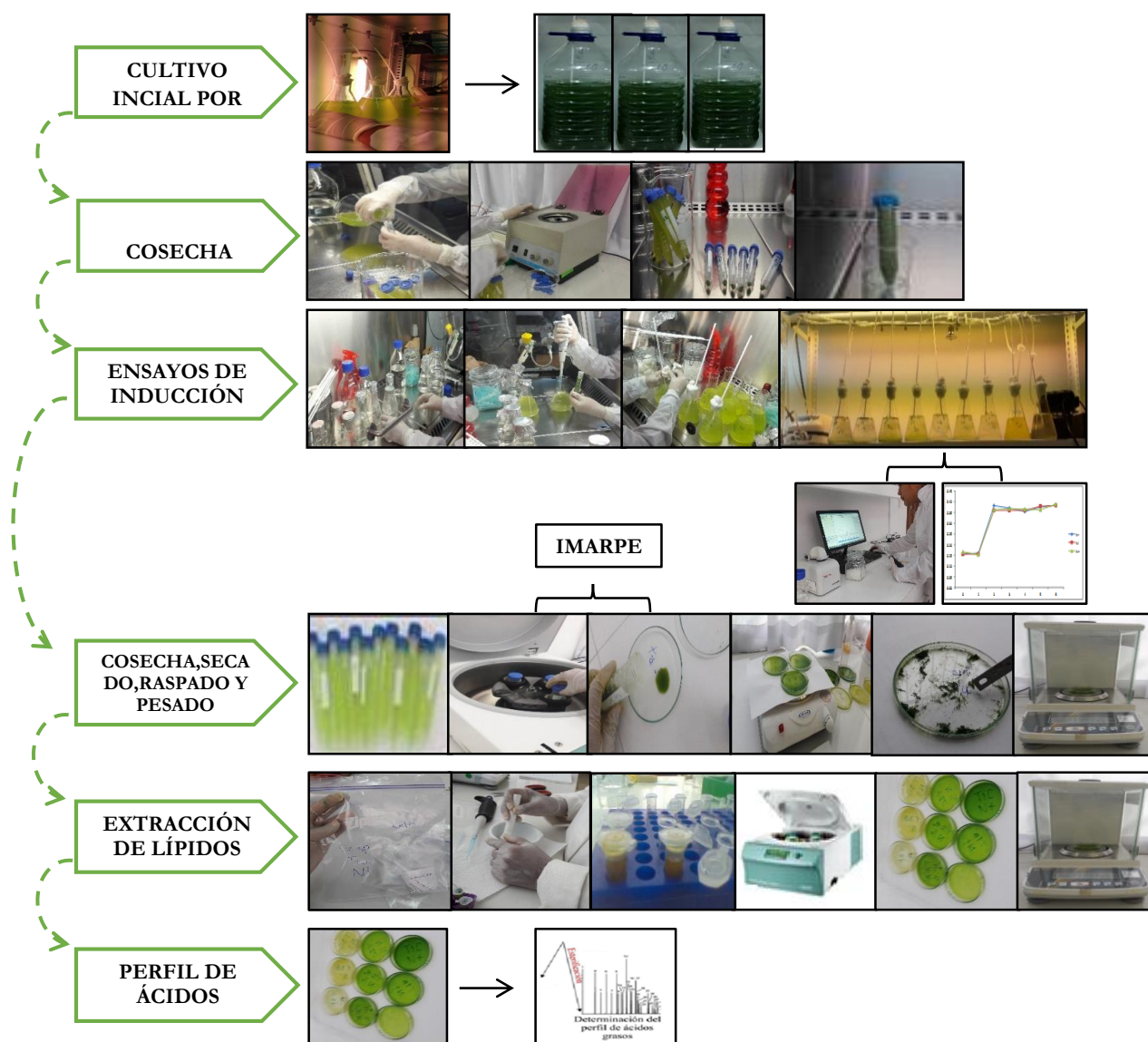


Fig. 15. Flujograma de inducción de ácidos grasos de tres especies de microalgas, sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población

Estuvo constituida por las especies de microalgas de la Amazonia Peruana.

4.4.2. Muestra.

La muestra fue representada por tres especies de microalgas (*Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, y *Chlorella* sp. Cepa UCP0002) que fueron proporcionados por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos

4.5.1. Técnica de recolección de datos:

Los equipos, métodos y técnicas que se utilizaron en el laboratorio fueron de acuerdo a Arredondo y Vázquez (27). Además se procedió a recopilar los datos procediendo de la siguiente manera:

Estuvo dirigida para la obtención de información directa de los resultados sobre el perfil de ácidos grasos en diferentes concentraciones de nitrato en cada uno de las especies microalgales.

4.5.2. Instrumento de recolección de datos:

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron son los siguientes:

- a) Fichas o guías de observación. Se utilizó para registrar la información obtenida del perfil de crecimiento microalgal.

- b) Los Equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron el Microscopio de epifluorescencia, el microscopio compuesto, cabina de seguridad, centrifuga, nanodrop 2000 entre otros.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Cultivo y Cosecha microalgal.

Se cultivaron tres especies de microalgas del Banco de cepas de microalgas oleaginosas de la Universidad Científica del Perú (*Ankistrodemus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 y *Chlorella* sp. Cepa UCP0002). Las 3 cepas fueron cultivadas respectivamente en matraces de 500 mL con 200 mL de medio hasta su saturación, por 4 semanas, cada matraz estuvo aireado constantemente, a 26° C y un fotoperiodo (12:12) luz/oscuridad con una intensidad de lumínica de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Las muestras se mantuvieron en cultivo hasta conseguir 5L de medio. Posteriormente se realizó la cosecha, que consistió distribuir 500 mL de cultivo en 9 tubos de 15 mL para centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadieron más cultivo en los mismos tubos, se centrifugó bajo las condiciones indicadas. Estos pasos fueron repetidos hasta obtener todo el precipitado microalgal, seguidamente fueron colocadas en un solo tubo de 15 mL. Obteniendo 14.5 mL de precipitado microalgal para los ensayos experimentales.

4.5.3.2 Evaluación de los bioensayos con diferentes concentraciones de nitrato.

1.6 mL de biomasa obtenida de la cosecha de cada especie de microalga fue colocada en matraces de 250 mL para los ensayos respectivos, contó con nueve tratamientos con tres concentraciones de nitrato (8,5 g/100ml H₂O, 4,0 g/100ml H₂O y 0 g/100ml H₂O). Para cada concentración de nitrato se distribuyó 750 de medio CHU10 en matraces de 250 mL por triplicado y fueron sometidos a condiciones de aireación constante, a temperatura de 26°

C, fotoperiodo de 12:12 h, con intensidad lumínica de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa de 46%. La evaluación tuvo una duración de 7 días.

4.5.3.3. Evaluación de Perfil de crecimiento

El perfil de crecimiento de los cultivos microalgales se evaluaron cada 24 horas por 7 días. Para ello, 5 μL del cultivo fueron transferidos a un Nanodrop 2000 que nos permitió la lectura del número de células por litro de medio de cultivo. Esta lectura fue realizada considerando un mismo horario (por las mañanas) a fin de no alterar los resultados.

4.5.3.4. Cosecha de la biomasa microalgal

Continuo a los 7 días de evaluación, se cosecharon las microalgas distribuyendo 250 mL del cultivo en 4 tubos de 50 mL para centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadieron más cultivo en los mismos tubos, se centrifugó bajo las condiciones indicadas. Estos pasos fueron repetidos hasta obtener todo el precipitado microalgal, seguidamente fueron colocadas en un solo tubo de 50 mL.

4.5.3.5. Extracción de lípidos totales

Se realizó de acuerdo a Yu *et al.*, (33) Que consistió de los siguientes pasos: 1) Se secó la biomasa obtenida en una estufa a 50°C por 48 horas, 2) Se transfirió 50 mg de la biomasa seca a un mortero para su trituración con 8 mL de solución extractora compuesta por cloroformo: metanol (2:1), 3) Se transfirió el extracto lipídico a microtubos de 1.5 mL y se añadió 100 μL de la solución extractora, 4) Se homogenizó la solución en un vortex por 30 segundos y centrifugó a 10000g a 4°C por 5 minutos, 5) Se eliminó la fase acuosa, se filtró la fase clorofórmica (con filtros para jeringa de $0,25 \mu\text{m}$) y se transfirió el filtrado a un vasos de precipitado de peso conocido. Los componentes lipídicos retenidos en la fase intermedia (entre fases acuosa y clorofórmica) se trataron por varias veces con la solución

extractora de lípidos como se indicó previamente. Todos los extractos lipídicos fueron obtenidos fueron transferidos al mismo vaso precipitado, 6) la solución extractora de lípidos se evaporó del vaso de precipitado en un plato caliente a 50°C por 4 horas 7) los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado fueron secados a 50°C por 4 horas adicionales. Finalmente, el vaso de precipitado fue atemperado a 25°C y se determinó su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinaron la cantidad de lípidos totales obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos totales \%} =$$

Donde:

PsLT : *Peso seco de los lípidos totales*

PsBM: *Peso seco de la biomasa microalgal*

4.6. Perfil de ácidos grasos

Se usó 1 mg del extracto de lípidos, se le añadió 0.1mg del estándar interno de tricosanoato de metilo y se aplicó el método de Ichihara y Fukubayashi que consiste en añadir tolueno, metanol y ácido clorhídrico para derivatizar la muestra a metil estrés de ácidos grasos y luego se usó cromatografías gaseosas para su cuantificación bajo las siguientes condiciones: método de inyección splitless (0.5min), volumen de inyección 1 µL, columna WCOT de sílice fundida de 30 m x 0.25 mm x 0.2.25 µm, temperatura del inyector 250°C, programa del horno 120°C durante 1min, luego 30°C/min hasta 160°C, 160°C durante 1min, 4°C/min hasta 240°C y 240°C durante 7min, temperatura del detector 260°C.

4.7. Análisis de datos

Se determinó el promedio, desviación estándar, para conocer si existen diferencias estadísticas significativas en la producción de biomasa, lípidos totales y ácidos grasos, para los cuales se empleó la estadística descriptiva e inferencial mediante el programa IBM SPSS Statistics 20 y los gráficos fueron diseñados en ANOVA con prueba de HSO de Tukey.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Evaluación del perfil de crecimiento de las tres especies de microalgas cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.

En el perfil de crecimiento de las tres especies de microalgas evaluadas cada una de ellas muestra un crecimiento gradual, tal como se evidencia en la **figura 16**. En el que se puede observar que *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 bajo condiciones de cultivo sin nitrato (N-) tuvo un menor crecimiento con respecto a los cultivos con menor concentración (NI) y con concentraciones normales de nitrato (N+). Se inició con una densidad celular de 0.19×10^6 célula/ml con nitrato (N+), 0.09×10^6 células /ml para una menor concentración (NI) y 0.08×10^6 células /ml sin nitrato (N-), posteriormente, conforme transcurrieron los días de evaluación se observó que las microalgas incrementaron gradualmente su densidad celular, alcanzando la mayor densidad celular al séptimo día de evaluación en los tres tratamientos con valores de 0.89×10^6 célula/ml para N+, 0.81×10^6 célula/ml para NI y 0.7×10^6 célula/ml para N-. Asimismo, observamos que la fase de adaptación se presentó en las primeras horas posteriores a su siembra.

En el perfil de crecimiento de *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, al igual que *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, se observa un crecimiento gradual, donde se inició con una densidad celular de 0.05×10^6 célula/ml para N+, 0.5×10^6 célula/ml para NI y 0.05×10^6 célula/ml para N-. La fase de adaptación se presentó a las primeras horas después de la siembra, alcanzando la mayor densidad celular al último día de evaluación en los tratamientos con nitrato, concentración intermedia y sin nitrato (N+, NI y N-) siendo 0.39×10^6 célula/ml, 0.38×10^6 célula/ml, 0.40×10^6 célula/ml respectivamente.

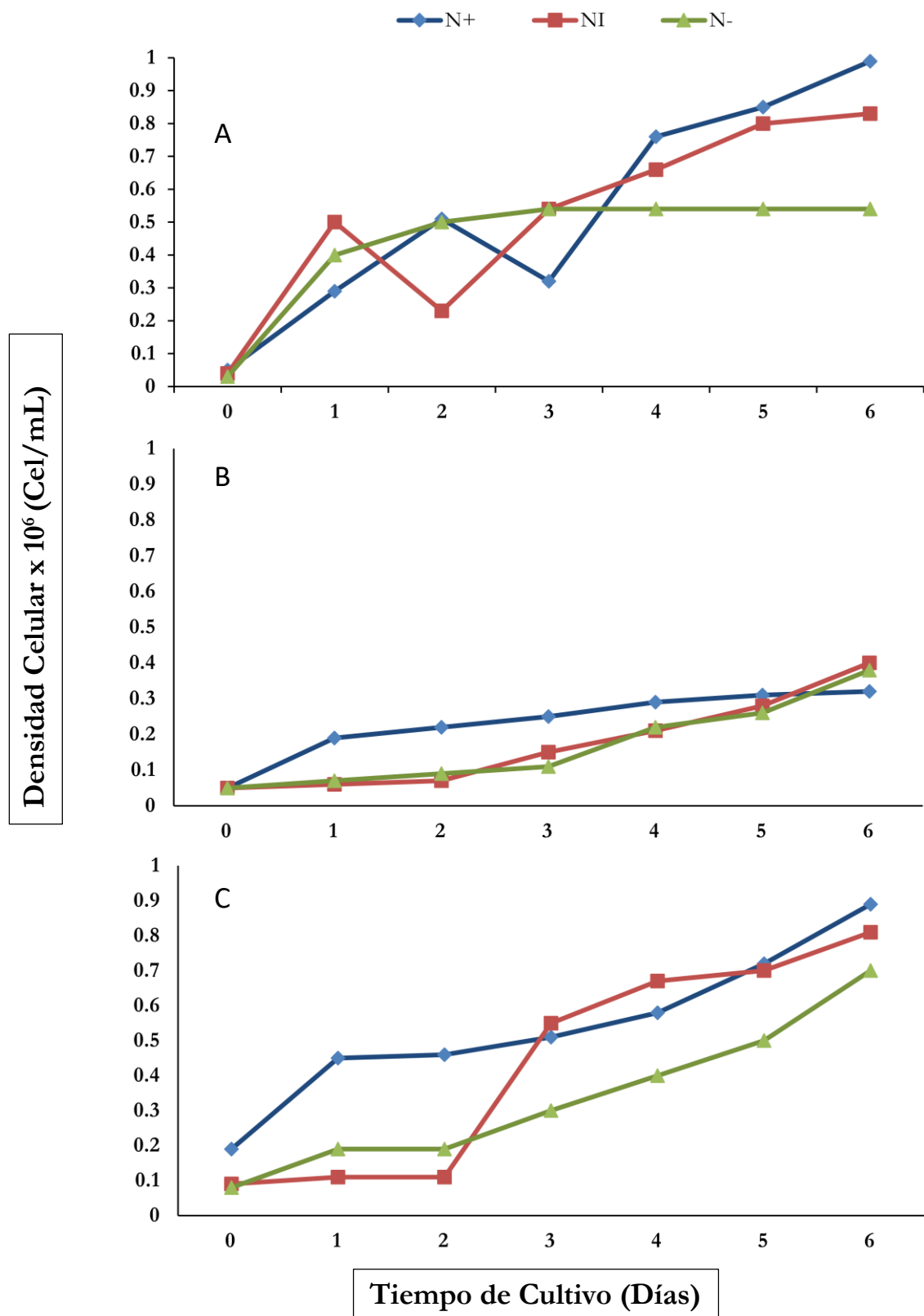


Figura 16. Perfil de crecimiento de las microalgas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato: N+ = 8,5 g/100ml H₂O, NI = 4,0 g/100ml H₂O y N- = 0 g/100ml H₂O. *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 (A), *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, (B) y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 (C).

Respecto a *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 se observa que en cuanto a la fase de adaptación, tuvo un comportamiento similar a las otras especies evaluadas, ocurriendo durante las primeras horas de siembra. Posteriormente se presentó una fase exponencial en el tratamiento sin nitrato (N-) al tercer día de evaluación con una densidad celular de 0.54×10^6 célula/ml, seguida de una pequeña fase de muerte al día 4 y una fase estacionaria hasta el séptimo día de evaluación. Con respecto a los otros tratamientos observamos que presentaron una mayor densidad celular al último día de evaluación siendo 0.99×10^6 célula/ml para N+ y de 0.83×10^6 ml para NI. Cabe resaltar que se observó que todas las especies mostraron un cambio notorio de coloración en el primer día de evaluación, en todos los tratamientos a los que fueron sometidos.

5.2. Producción de biomasa y contenido de lípidos totales en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 cultivadas en medios con N (+), N (I) y con N (-).

En cuanto a la producción de biomasa se determinó que la especie que obtuvo la mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 Sometida a nitrógeno (N+) con $5.68 \text{ (gL}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$, mientras que *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 obtuvo la menor producción de biomasa en medio de cultivo sin nitrato (N-) con $0.06 \text{ (gL}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$ y nitrato intermedio (NI) con $0.04 \text{ (gL}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$.

Tabla 02. Producción de biomasa en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.

Especie	Productividad de Biomasa ($\text{gL}^{-1} \text{ d}^{-1}$)		
	N+	NI	N-
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	0.16 ± 0.17	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.00
<i>Chlorella</i> sp.	4.94 ± 1.78	2.90 ± 1.73	2.36 ± 0.69
<i>Scenedesmus</i> sp.	5.68 ± 0.72	1.68 ± 1.16	5.23 ± 2.17

La especie microalgal que obtuvo la mayor acumulación de lípidos totales fue *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 en condiciones sin nitrato (N-) con (22.94%) con respecto a las otras especies y tratamientos evaluados como se observa en la Tabla 03, mientras que *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, obtuvo la menor acumulación de lípidos en el tratamiento con nitrato (N+) y nitato intermedio (NI) con 9.55 % y 9.95 % respectivamente.

Tabla 03. Contenido de acumulación de lípidos totales en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002, cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.

Especie	Lípidos totales (%)		
	N+	NI	N-
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	18.03±0.3	18.36±0.23	22.94±0.48
<i>Chlorella</i> sp.	9.54±0.21	9.95±0.08	13.18±0.03
<i>Scenedesmus</i> sp.	15.24±0.06	15.60±0.03	13.18±0.03

La producción de lípidos totales como se evidencia en la **figura 17** observamos que *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 en medio de cultivo sin nitrato mostró diferencias estadísticas altamente significativas ($P=0.00$) en comparación con *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, y *Chlorella* sp. Cepa UCP0002. De igual manera, *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 mostró diferencias significativas muy altas ($P=0.00$) con respecto a *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 y *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 en el tratamiento con concentración intermedia de nitrato (NI), mientras que con *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 Se observó diferencias altamente significativas con *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 ($P=0.00$) y diferencias significativas con *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 ($P=0.024$) en el medio de cultivo con nitrato. Cabe resaltar que la especie *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 mostró una diferencia altamente significativa con respecto a los otros tratamientos y especies evaluadas.

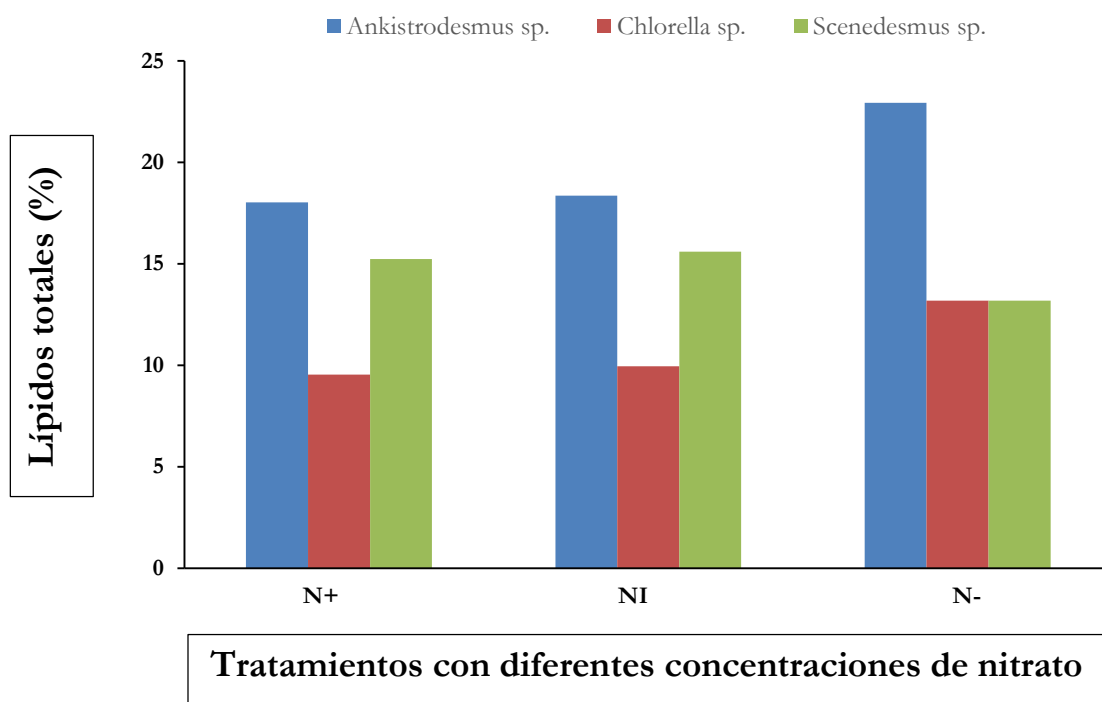


Figura 17. Producción de Lípidos Totales en tres especies de microalgas amazónicas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.

5.3. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrato.

El perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, en condiciones de cultivo con nitrato (N+), el Ácido Elaidico presento el mayor porcentaje con 25.9 ± 0.2 , seguido por Ác. Palmítico con 21.4 ± 0.2 . Así mismo obtuvo un menor porcentaje en Ac. Mirístico y Ac. Omega Linolenico con 0.0 ± 0.0 y 0.4 ± 0.0 respectivamente. También en la misma especie sometida a condiciones de cultivo con concentraciones intermedias de nitrato (NI) el Ac. Alfa Linolenico obtuvo el mayor porcentaje con 22.1 ± 0.1 y el Ac. Palmítico obtuvo el 17.0 ± 0.3 y el menor porcentaje lo obtuvo el Ac. Mirístico y Ac. Palmitoleico con 0.0 ± 0.0

y 0.7 ± 0.0 respectivamente y en cuanto a condiciones sin nitrógeno (N-) el Ac. Elaidico obtuvo el mayor porcentaje con 41.0 ± 0.2 y el Ac. Palmítico 26.3 ± 0.1 , el menor porcentaje obtuvo el Ac. Mirístico y Ac. Palmitoleico con 0.0 ± 0.0 y 0.3 ± 0.0 respectivamente.

Se observa que los ácidos grasos de *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, en condiciones de cultivos con nitrato (N+) presento el ácido Elaidico de 75.0 ± 0.1 , seguido de ácido Palmítico de 56.5 ± 0.1 . Así mismo obtuvo un menor porcentaje en Ac. Mirístico y Ac. Palmitoleico con 0.0 ± 0.0 . También en la misma especie sometida a condiciones de cultivo con concentraciones intermedias de nitrato (NI) que, al igual que en medio de cultivo con nitrato (N+), los Ácidos palmítico y Ácidos Elaidico obtuvieron un mayor porcentaje 56 ± 0.5 y 38.3 ± 0.0 respectivamente, siendo también los Ácidos Mirístico y Palmítico obtuvieron el menor porcentaje con 0.0 ± 0.0 y en cuanto a condiciones sin nitrógeno (N-) el Ac. Mirístico y el Ácido palmítico obtuvieron el mayor porcentaje con 22.8 ± 0.2 y 22.5 ± 0.3 respectivamente.

El perfil de ácidos grasos de *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 en condiciones de cultivo con nitrato (N+) presentó un mayor porcentaje de Ac. Linoelaidico con 25.6 ± 0.1 , seguido por Ac. Alfa Linolenico con un porcentaje de 19.0 ± 0.5 , así mismo observamos que obtuvo un menor porcentaje en Ac. Mirístico y Ac. Estearico con 0.0 ± 0.0 . También en la misma especie sometida a condiciones de cultivo con concentraciones intermedias de nitrato (NI) que, al igual que en medio de cultivo con nitrato (N+), los Ácidos Linoelaidico y Alfa Linolenico obtuvieron un mayor porcentaje 26 ± 0.1 y 18.6 ± 0.1 respectivamente, siendo también los Ácidos Mirístico y Estearico obtuvieron el menor porcentaje con 0.0 ± 0.0 y en cuanto a condiciones sin nitrógeno (N-) el Ac. Linoelaidico y el Ac. Elaidico obtuvieron el mayor porcentaje con 22.8 ± 0.2 y 22.5 ± 0.3 respectivamente, el menor porcentaje en estas condiciones lo obtuvo el Ácido Mirístico y Estearico con 0.0 ± 0.0 y 0.8 ± 0.0 respectivamente.

Tabla 04. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0001. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrógeno

At. de Carbono	Ácidos Grasos	<i>Ankistrodesmus</i> sp.			<i>Scenedesmus</i> sp.			<i>Chlorella</i> sp.		
		N+	NI	N-	N+	NI	N-	N+	NI	N-
14:0	Ac. Mirístico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
16:0	Ac. Palmítico	21.4 ± 0.2	17.0 ± 0.3	26.3 ± 0.1	56.5 ± 0.1	27.2 ± 0.2	29.1 ± 0.2	13.6 ± 0.6	14.1 ± 0.2	20.2 ± 0.1
18:0	Ac. Estearico	1.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.1	5.0 ± 0.5	1.8 ± 0.0	1.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0
16:1n-7	Ac. Palmitoleico	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0	2.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.9 ± 0.0
18:1n-7	Ac. Vaccenico	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
18:1n-9	Ac. Elaidico	25.9 ± 0.2	16.6 ± 0.2	41.0 ± 0.2	75.0 ± 0.1	38.3 ± 0.0	39.6 ± 0.4	8.1 ± 0.5	8.1 ± 0.0	22.5 ± 0.3
18:2n-6	Ac. Linoelaidico	9.3 ± 0.0	11.6 ± 0.2	7.2 ± 0.1	35.0 ± 0.2	15.6 ± 0.2	14.9 ± 0.2	25.6 ± 0.1	26.1 ± 0.1	22.8 ± 0.2
18:3n-3	Ac. Alfa Linolenico	18.7 ± 0.0	22.1 ± 0.1	11.0 ± 0.1	21.0 ± 0.5	8.3 ± 0.1	6.9 ± 0.1	19.0 ± 0.5	18.6 ± 0.1	12.4 ± 0.2
18:3n-6	Omega Linolenico	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	2.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0
18:4n-3	Ac. Estearidonico	5.0 ± 0.0	6.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.0	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.0	2.6 ± 0.0
No identificados		16.6 ± 0.0	22.0 ± 0.0	7.1 ± 0.0	10.9 ± 0.1	3.7 ± 0.0	3.5 ± 0.0	26.7 ± 0.2	26.1 ± 0.1	14.8 ± 0.1
AGS		22.8	18.1	28.3	61.5	29.0	31.0	13.6	14.1	21.1
AGI		60.6	59.9	64.6	142.2	67.3	65.5	59.7	59.8	64.1
AGMI		27.3	18.5	41.8	79.3	40.6	41.3	9.8	9.7	25.3
AGPI		33.4	41.5	22.7	63.0	26.7	24.2	50.0	50.2	38.8
AGS-AGMI		50.0	36.5	70.2	140.6	69.6	72.3	23.4	23.7	46.4

*AGS: Ác. Saturados / AGI: Ác. Grasos Insaturados / AGMI: Ác. Grasos Monoinsaturados / AGPI: Ác. Grasos Poli insaturados.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Las microalgas han adquirido gran importancia en los últimos años ya que representan la solución a diversos problemas en aspectos de alimentación, producción de biomasa y metabolitos de alto valor agregado de origen natural (3). Sin embargo, se ha observado que mientras la concentración de lípidos puede llegar a incrementar significativamente en condiciones de limitación de nitrógeno, la tasa de crecimiento o producción de biomasa es reducida lo cual no es rentable cuando se pretende tener una alta productividad de aceite (39).

En este estudio, el perfil de crecimiento de cada una de las tres especies de microalgas mostró un crecimiento gradual, donde *Scenedesmus* sp. en cultivo sin nitrato (N-) tuvo un menor crecimiento con respecto a los cultivos con concentración intermedia de nitrato (NI) lo que está en buen acuerdo con (10) quien obtuvo un mejor crecimiento de *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. y *Ankistrodesmus* sp. en medio con Nitrato (N+). Estudios realizados por Casuso, 2015, indica que la producción de lípidos totales fue mayor en *Chlorella* sp. a los 6 minutos de exposición al CO₂ con un valor de 47.60% la cual presenta diferencias altamente significativas con respecto a las otras especies y tratamientos evaluados (P=0,17). Asimismo, (9) obtuvieron una mayor producción de lípidos totales en *Chlorella vulgaris* sometida a altas y bajas concentraciones de CO₂ 34.7% y 35.2% respectivamente, esto es debido a que las microalgas reaccionan de manera diferente ante factores estresantes, en este caso *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, los resultados de esta investigación refieren que el contenido total de lípidos fue mayor en *Ankistrodesmus* sp. (23%), seguido de *Scenedesmus* sp y finalmente *Chlorella* sp. Respecto a la producción de biomasa, en este estudio se reporta que *Scenedesmus* sp. fue la especie con más producción de biomasa (> 5mg/l) que *Chlorella* sp. (4.9 mg/l).

Ankistrodesmus sp. fue la especie que reportó menor producción de biomasa microalgal (<0.1 mg/l). De igual manera, (30) indicó que *Ankistrodesmus* sp. fue la especie que reportó una mayor producción de lípidos cuando fue cultivada en medio BG-11.

Debido a que las propiedades del biodiesel se ven influenciadas por la calidad de los lípidos a partir de los cuales se ha producido, para obtener biodiesel de calidad es necesario asegurarse que los lípidos contengan ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación (preferentemente los ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetano, estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo (punto de nube), viscosidad y lubricidad (21). Es importante mencionar que en la presente investigación se registraron los ácidos grasos (palmitoleico (0.7%) y palmítico (13.6%). También, de acuerdo a (14) indica que los cultivos limitados en nitrógeno mostraron una tendencia generalizada a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuir los poliinsaturados, mientras que al aumentar la concentración de este nutriente, se observa un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Así, (15) en un estudio con *Nannochloropsis* sp; en un medio limitado en nitrógeno después de cinco días presentó un incremento en los ácidos grasos mirístico (de 0,7 % a 2,9 %), palmítico (de 4,8 % a 19,8 %), palmitoleico (de 3,9 % a 15,1 %) y oleico (de 0,7 % a 6,8 %) al evaluar el efecto de la salinidad, la intensidad de luz y la disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, los resultados en este trabajo muestran que en *Chlorella* sp. existió un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Ácido linoeláidico=25.6%, ácido alfa linolenico=19% y el ácido eláidico=8.1%) con respecto a los ácidos grasos saturados (ácido palmítico y palmitoleico=13.6% y 0.7% respectivamente). En *Ankistrodesmus* sp. se reporta un alto porcentaje del ácido graso Eláidico (18:1n-9=41.10%) en cultivo sin nitrato. Otros estudios (20) evidenciaron para *Chlorella vulgaris* la acumulación de los ácidos grasos palmítico

y oleico en condiciones limitadas de nitrógeno sin importar el grado de luz o salinidad y en condiciones ricas en nitrógeno asociadas a alta intensidad de luz y salinidad; con una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico). También (16) para *Chlorella vulgaris* observaron que bajo condiciones fotoautotróficas y fotoheterotróficas, la disminución del nitrógeno en el medio de cultivo tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico y la disminución los ácidos grasos poliinsaturados. En condiciones mixotróficas *Chlorella vulgaris* presentó un perfil de lípidos compuesto principalmente por ácido palmítico y ácido oleico (50 % - 62 %) independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio. Para *Scenedesmus rubescens* la limitación de nutrientes al aumentar el tiempo de cultivo, claramente evidenció un aumento en el ácido oleico (de 16 % a 54 %) y la disminución en los ácidos linoleico y linolénico (17). Resultados similares fueron reportados por (19) y (18), para *Scenedesmus incrassatulus* al observar un aumento del 78,8 % en el contenido de ácido palmítico y de 133,4 % de ácido oleico luego de 6 a 11 días de cultivo. Asimismo, para *Nannochloropsis sp.* Se evidenció un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexaenoico) al aumentar la concentración de nitrato y fosfato en el medio (34), mientras que el contenido de ácido eicosapentanoico se incrementó en un medio rico solo en nitrógeno (33). En otros trabajos se estudió el efecto combinado de la fuente de carbono (bicarbonato o acetato) y los niveles de radiación en el crecimiento y perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Pavlova lutheri* y se encontró que el crecimiento y la composición lipídica fueron más sensibles a las variaciones en la intensidad de luz que a la fuente de carbono; a una intensidad de luz de 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ el porcentaje de los ácidos grasos saturados fue de 25,8 % y 23,9 % con bicarbonato y acetato respectivamente y al aumentar la intensidad de luz a 340 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ los ácidos grasos saturados alcanzaron un valor de 29 % en el medio con bicarbonato y de 29,7 % el medio con acetato (22). Asimismo, en un cultivo de

Nannochloropsis sp; un aumento de la intensidad de luz produjo un incremento en la productividad de la biomasa y el contenido de ácidos grasos, especialmente saturados (mirístico y palmítico) y monoinsaturados (palmitoleico y oleico) (15).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- La especie que mostró el mayor perfil de crecimiento fue *Ankistrodesmus* sp. cultivada en concentración de nitrato.
- La especie microalgal que mostró la mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus* sp. en condiciones de cultivo de nitrato intermedio.
- La especie microalgal que mostró la mayor producción de lípidos totales fue *Ankistrodesmus* sp., en condiciones sin nitrato.
- El perfil de ácidos grasos en *Scenedesmus* sp. en condiciones con nitrato indican un mayor porcentaje de ácido eláidico.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

1. Dados los resultados de los 7 días de evaluación de la presente tesis, y observar solo una fase de muerte en uno de los perfiles de crecimiento, es posible que si se amplía el tiempo las evaluaciones se pueda obtener mayores resultados.
2. Es importante seguir el protocolo correctamente en el instante de elaborar el medio Chu N°10, considerando las distintas concentraciones de nitrato a utilizar y continuar con otros ensayos para así obtener un mejor resultado con respecto al biodiesel.
3. Modificar otros parámetros a fin de mejorar la producción de biomasa y lípidos totales.
4. Es importante que los cultivos de microalgas sean unialgales para tener buen resultado y buena calidad y evitar la competencia entre ellas mismas.
5. Se debe cumplir todas las normas de bioseguridad antes, durante y después de manipular reactivos, material biológico u otras sustancias químicas peligrosas, al momento de ejecutar los ensayos experimentales en el laboratorio.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Posten C, Schaub G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--a process view. *J Biotechnol.* 2009 Jun 1;142(1):64-9.
2. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(1):217-32.
3. Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol.* 2006 abril;97(6):841-6.
4. Nagle N, Lemke P. Production of methyl ester fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol.* 1990 Mar 1;24-25(1):355-61.
5. Li X, Xu H, Wu Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 2007;98(4):764-71.
6. Demirbas MF, Balat M, Balat H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Convers Manag.* 2009;50(7):1746-60.
7. Wang B, Li Y, Lan N, Lan L. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(5):707-18.
8. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007 Jun;25(3):294-306.
9. Cobos M, Castro JC, Cerdeña LA. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya. Perú. *Ecología Aplicada.* 2014;13(2):169-75.
10. Paredes JD. Impacto de eliminación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas. [tesis]. Iquitos: Universidad Científica del Perú. Facultad de Ciencias e Ingeniería. 2014.
11. Khoo HH, Sharratt PN, Das P, Balasubramanian RK, Naraharisetti PK, Shaik S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. *Bioresour Technol.* 2011 May;102(10):5800-7.
12. Moellering ER BC. Interference silencing of a major lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot.* 2010;9(1):97-106.
13. Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol.* 2005;86:1059-70.

14. Rodolfi L CG, Bassi N PG, Biondi N B.G, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost. 2009;103(1):100–12.
15. Pal D K-GI, Cohen Z BS. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 90(4):1429–41.
16. Chang J-S YK-L. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Bioresour Technol. 2012;105:120–7.
17. Tan Y LJ. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescenslike* microalga. 2011;102(21):10131–5.
18. Cristiani E AM, Cañizares RO MM. Efecto de la edad del cultivo sobre el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus incrassatulus* y su influencia en la producción de biodiesel de calidad. Bol Soc Argent Bot.
19. Arias MT CE, Torzillo G EF, Cañizares RO. Comparación de métodos para la extracción de lípidos totales en la microalga *Scenedesmus incrassatulus*. Bol Soc Argent Bot. 2011;46(2):34–5.
20. Hu H, GK. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. 2006;28(13):987–92
21. Xu F CZ, Cong W OF. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed - batch culture. 2004;26(17):1319–22.
22. Guihéneuf F, Mimoun V UL, Tremblin G. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol. 2009;369:136–43.
23. Khozin-Goldberg I CZ. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochemistry. 2006;67(7):696–701.
24. Rajakumari S, Grillitsch K, Daum G. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast Prog. Lipid Res. 2008 May;47(3):157–71.
25. Hu Q, Sommerfeld, M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert D. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. 2008;54(4):621–39.
26. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng. 2006;101(2):87–96.

27. Arredondo-Vega, B.O, Vásquez-Duhalt, R. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas. Cienc Desarro Xvii. 98 99-111. 1991;
28. De B, Chaudhury S, Bhattacharyya D. Efecto of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. JAOCS. 1999;76(1):156.
29. Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiaba S, Vonshaka A, Cohen Z. Lipid and fatty acid composition of the Green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. 2002;60(5):497-503.
30. Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol. 2008;99(11):4717-22
31. Olguín E, Galicia S, Angulo-Guerrero O, Hernández E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp.* (Arthrospira) grown on digested pig waste. 2001;77(1):19–24.
32. Gordillo FJ, Goutx M, Figueroa F, Niell F. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. 1998;10(2):135–44.
33. Tornabene T., Holzer G, Lien S B, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. 1983;5(6):435–40.
34. Hoshida H, Ohira T, Minematsu A, Akada R, Nishizawa Y. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis sp.* in response to elevated CO₂ concentrations. 2005;17(1):29–34.
35. Khozin-Goldberg I, Bigogno C, Shrestha P, Cohen Z. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae). 2002;38(5):991–4.
36. Solovchenko A., Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak M. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. 2008;20(3):245–51.
37. Renaud SM ZH, Parry DL L-VT, Woo KC. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp.* *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis sp.* 1995;7(6):595–602.
38. Jiang y Chen. Rapid initial removal of chylomicron remnants by the mouse liver does not require hepatically localized apolipoprotein E. J Lipid Res. 2000;41(11):1715-27.
39. Albarracín I. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Int. 2007.p.1- 16.

40. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev.* 2010;14(2):557-77
41. Resenberg J, Oyler G, Wilkinsin L, Betenbaugh M. A Green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(5):430 – 6.
42. Fernández Linares LC, Montiel Montoya J, Millán Oropeza A, Badillo Corona JA. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS. 2012 sep; vol.8. Available from:// [http.redalyc.org/articulo_oa? Id= 46125177011](http://redalyc.org/articulo_oa?Id=46125177011)
43. Casuso MZ. Efecto de diferentes tiempos de exposición de CO₂ en la producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de cuatro especies de microalgas amazónicas. [tesis]. Iquitos: Universidad Científica del Perú. Facultad de Ciencias e Ingeniería. 2015.

ANEXOS

Tabla 05. Composición del medio Chu Nro.10, con distintas concentraciones de nitrato.

Componentes	Concentraciones de Nitrato (100ml H ₂ O)		
	N+	NI	N-
Macronutrientes			
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,67	3,67	3,67
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,69	3,69	3,69
NaHCO ₃	1,26	1,26	1,26
K ₂ HPO ₄	0,87	0,87	0,87
NaNO ₃	8,5	4,0	0
Solución Citrato férrico:			
Ácido Cítrico			
(C ₆ H ₈ O ₇)	3,35	3,35	3,35
Citrato férrico			
(C ₆ H ₅ FeO ₇ *XH ₂ O)	3,35	3,35	3,35
Micronutrientes			
NaEDTA	50,0	50,0	50,0
H ₃ BO ₃	618,0	618,0	618,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,6	19,6	19,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	44,0	44,0	44,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	20,0	20,0	20,0
MnCl ₂ .4H ₂ O	12,6	12,6	12,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,6	12,6	12,6
Solución Silicato:			
Metasilicato de Sodio			
(Na ₂ SiO ₃)			
Ácido			
Clorhídrico(HCL)			

Figura 18. Cultivos iniciales de las 3 especies de microalgas: *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002.



Preparación de Medio Chu N°10 para el cultivo inicial.



Cultivos iniciales

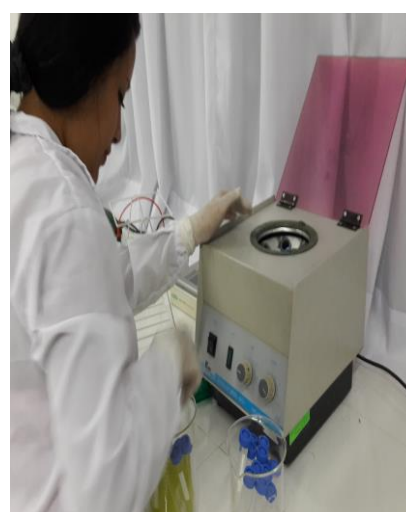


5 litros de Medio de Cultivo

Figura 19. Cosecha microalgal para bioensayos.



Cosecha microalgal en tubos de 15 mL.



Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15 mL



Biomasa obtenida de la cosecha

Figura 20. Bioensayos de las cuatro especies de microalgas oleaginosas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.



Medio Chu N°10 con diferentes concentraciones de nitrato



Insertión de la biomasa para los bioensayos.



Alícuotas de bioensayos

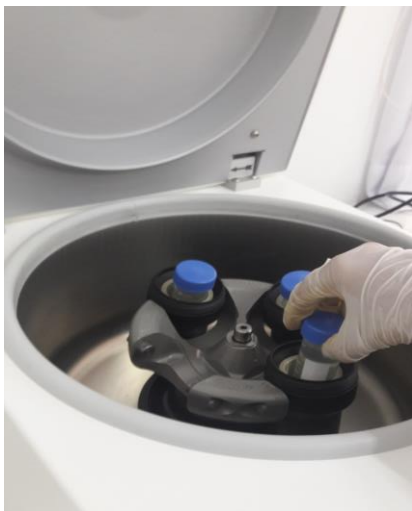


Cultivos de los bioensayos instalados en las condiciones adecuadas.

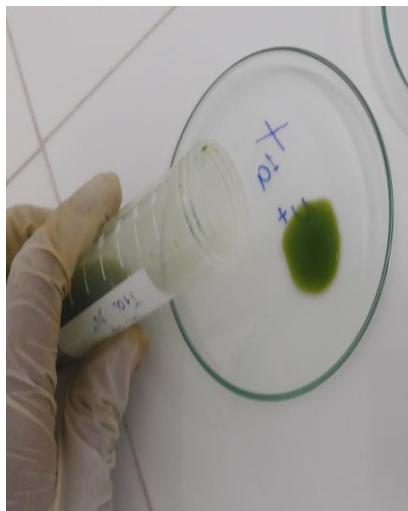


Lectura diaria por 7 días en el Nanodrop.

Figura 21. Cosecha de las microalgas sometidas a tratamiento. (Secado, raspado, Secado y pesado).



Centrifugación para la cosecha de los cultivos de los ensayos



Biomosas en placas Petri



Secado de placas Petri



Biomasa seca raspada



Biomasa seca pesada.

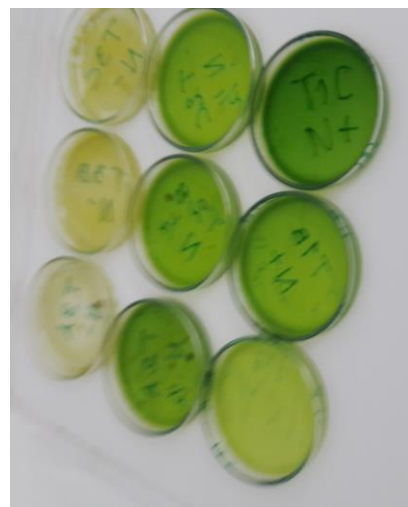
Figura 22. Extracción de lípidos totales de las tres especies de microalgas sometidas a diferentes concentraciones de nitrato.



Trituración de biomasa con la solución extractora cloroformo: metanol



Contenido lipídico colocados en vasos precipitados de peso conocido.



Contenido lipídico de los tres concentraciones de nitrato.