



UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ.

Facultad de Ciencias e Ingeniería
Escuela Profesional de ingeniería ambiental.

**Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de
ácidos grasos de tres especies de microalgas
oleaginosas amazónicas.**

Tesis Presentado por:

LIZ KATERINE LOPEZ SULLA.

Tesis presentada para optar el título profesional de

INGENIERO AMBIENTAL.

SAN JUAN – PERU

2016

DEDICATORIA

A Dios, por guiar siempre mi camino y permitir que día a día pueda cumplir con las metas que me propongo; A mi madre por su apoyo constante a lo largo de mi vida en lo moral, cariño y comprensión en lo económico a un amigo y compañero por sus sabios consejos, para formarme como profesional, también va dedicado a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me brindaron su valioso tiempo e información necesaria para la realización de la presente tesis.

A mis hijos, Adrián Franklin Merino López e Isis Anahí Merino López, por regalarme su sonrisa cada mañana y demostrarme que no debemos rendirnos cuando el deseo de vivir es muy grande.

A mis hermanos y cuñado, Stefani Juset Huerta Sulla, Juan José Huerta Sulla y Norber Randy Merino Meza, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

LIZ KATERINE LOPEZ SULLA

AGRADECIMIENTO

Al proyecto de investigación: “Secuenciamiento y anotación de transcriptomas de microalgas oleaginosas de la amazonia peruana promisorias para la producción sustentable de biodiesel: descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas” subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTEC y la Universidad Científica del Perú (UCP) por el apoyo financiero brindado para la realización de la presente tesis.

A mi asesora y consejera, la Dra. Marianela Cobos Ruiz por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis a través del proyecto ya mencionado y su paciencia, dedicación y conocimiento que me brindó durante todo el proceso. Dra. Marianela Cobos Ruiz mi más sincero agradecimiento.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirnos el uso de sus equipos, materiales y reactivos.

Al Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila, Coordinador de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana que a través del investigador el Dr. Juan Carlos Castro Gómez.


A la Lic. Jae Diana Paredes, por su apoyo brindado durante el proceso de ejecución y redacción de la tesis en el laboratorio

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todos ellos MUCHAS GRACIAS.

FIRMA DE LOS JURADOS Y ASESOR.



Ing. Ulises Octavio Trigoín Cabrera
PRESIDENTE



Blgo. Carlos Roberto Dávila Flores, Mgr.
MIEMBRO



Dr. Jorge Luis Marapara del Águila
MIEMBRO



Dra.: Mariánela Cobos Ruiz.
ASESORA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 11:00 horas del día viernes 24 de febrero del año 2017, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación de la bachiller en Ingeniería Ambiental:

LIZ KATERINE LOPEZ SULLA

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

"Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas"

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

| Indicador | Examinador 1 | Examinador 2 | Examinador 3 | Promedio |
|---|--------------|--------------|--------------|----------|
| A) Dominio del Tema | 17 | 15 | 15 | 16 |
| B) Calidad de Redacción de la Tesis | 17 | 15 | 15 | 16 |
| C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia) | 17 | 15 | 15 | 16 |
| D) Calidad de Respuestas | 17 | 15 | 15 | 16 |
| E) Uso de Terminología Especializada | 17 | 15 | 15 | 16 |
| Calificación Final: | | | | 16 |

Aprobado Por: UNANIMIDAD

Calificación Final (en letras): DIECISEIS

Presidente: Ing. Ulises Octavio Irigoín Cabrera M.Sc.

Miembro: Dr. Jorge Marapara Del Águila

Miembro: Blgo. Carlos Roberto Dávila Flores M.Sc.

| 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 mas puntos |

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-------------|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR | iv |
| ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS | v |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| CAPÍTULO I | 12 |
| Introducción | 12 |
| CAPÍTULO II | |
| Objetivos. | 14 |
| 2.1 Objetivo General | |
| 2.2 Objetivos Específicos | |
| CAPÍTULO III | |
| Marco Teórico y Conceptual. | |
| 3.1 Marco Teórico | 15 |
| 3.1.1. Generalidades. | 15 |
| 3.1.2. Clasificación taxonómica de las microalgas en estudio | 16 |
| 3.1.3. Principales nutrientes para el crecimiento microalgal | 17 |
| 3.1.4. Composiciones de ácidos grasos en microalgas | 20 |
| 3.1.5. Ácidos grasos | 22 |
| 3.1.6. Importancia de los ácidos grasos | 23 |
| 3.1.7. Clasificación de lípidos | 23 |
| 3.2. Antecedentes | 24 |
| 3.3 Definición de términos básicos | 27 |
| CAPÍTULO IV | |
| Materiales y Métodos | |
| 4.1. Lugar y desarrollo de la investigación | 30 |
| 4.2 Recursos utilizados | 30 |
| 4.2.1 Materiales | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2. Equipos | 31 |
| 4.2.3. Reactivos | 31 |
| 4.3. Tipo y Diseño de la Investigación | 32 |
| 4.4. Población y muestra | 33 |
| 4.4.1. Población | 33 |
| 4.4.2 Muestra | 33 |
| 4.5 Técnicas, Instrumentos y Procedimientos de recolección de datos | 33 |
| 4.5.1 Técnica de recolección de datos | 33 |
| 4.5.2 Instrumento de recolección de datos | 33 |
| 4.5.3 Procedimiento Experimental | 33 |
| 4.5.3.1 Cultivo y cosecha inicial de microalgas | 33 |
| 4.5.3.2 Ensayos en medios de cultivo | 34 |
| 4.5.3.3 Cosecha microalgal | 34 |
| 4.5.3.4 Extracción y análisis de lípidos totales | 34 |
| 4.5.3.5. Determinación de ácidos grasos | 35 |
| 4.5.3.6 Procesamiento de la información | 35 |
| CAPITULO V | |
| Resultados | 36 |
| CAPITULO VI | |
| Discusión | 43 |
| CAPITULO VII | |
| Conclusión | 47 |
| CAPITULO VIII | |
| Recomendaciones | 48 |
| CAPITULO IX | |
| Referencias bibliográficas | 49 |
| ANEXO | 53 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Nº | Título | Pág. |
|----|---|------|
| 1 | Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia | 16 |
| 2 | Clasificación de lípidos | 24 |
| 3 | Acumulación de lípidos totales y productividad de biomasa en <i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Ankistrodesmus</i> sp. en tres medios de cultivo | 38 |
| 4 | Perfil de ácidos grasos de <i>Ankistrodesmus</i> sp cultivadas en diferentes medios de cultivo | 41 |
| 5 | Perfil de ácidos grasos de <i>Chlorella</i> sp cultivadas en diferentes medios de cultivo | 41 |
| 6 | Perfil de ácidos grasos de <i>Scenedesmus</i> sp cultivadas en diferentes medios de cultivo | 42 |
| 7 | Solución stock de macronutrientes del medio de cultivo Beijerinck. | 57 |
| 8 | Solución stock de micronutrientes del medio de cultivo Beijerinck. | 57 |
| 9 | Solución stock de micronutrientes del medio de cultivo Bold Basal (pH 6,6) o solución Bristol. | 57 |
| 10 | Stock de soluciones del medio de cultivo BG-11: | 58 |
| 11 | Composición del medio BG11. | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Nº | Título | Pág. |
|----|---|------|
| 1 | Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas | 22 |
| 2 | Perfil de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp, en tres medios de cultivo. (BB= Bold Basal, BEIJ= Beijerinck) | 37 |
| 3 | Perfil de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp, en tres medios de cultivo (BB= Bold Basal, BEIJ= Beijerinck) | 38 |
| 4 | Perfil de crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp, en tres medios de cultivo. (BB=Bold Basal, BEIJ=Beijerinck) | 39 |
| 5 | Acumulación de lípidos totales entres especies de microalgas cultivadas en medio de cultivos diferentes | 40 |
| 6 | Flujograma del procedimiento experimental de tres especies de microalgas Amazónicas (<i>Chlorella</i> sp., <i>Ankistrodesmus</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp). | 54 |
| 7 | Cepas y cultivo microalgal en matraz de 250 ml. | 54 |
| 8 | Alicuota 0,50 mg. Lectura diaria en Nanodrop | 55 |
| 9 | Sellando el matraz y trasladándolo al sistema de aireación | 55 |
| 10 | Incorporación de biomasa a cada medio de cultivo (Bold Basal, BG11, CHU N° 10, y Beijericnck) | 56 |
| 11 | Peso y centrifugación para la obtención de biomasa | 56 |
| 12 | Cosecha de biomasa microalgal y adición en placas | 57 |
| 13 | Raspado de biomasa de las tres especies. | 57 |

RESUMEN

Una de las ventajas más importantes que ofrecen las microalgas es la capacidad para producir biodiesel debido a su elevado contenido de lípidos, especialmente de ácidos grasos, cuyas productividades son mayores de 10 a 100 veces que los cultivos convencionales. Por lo que el objetivo de la investigación fue determinar el efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de los géneros de microalgas oleaginosas amazónicas (*Scenedesmus* sp, *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp). Se contó con dos grupos de trabajo: un grupo problema y un grupo control constituido por cuatro medios de cultivos diferentes: CHU N° 10, BEIJERINCK, BOLD BASAL, Y BG11. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. La evaluación de crecimiento microalgal se realizó diariamente por un periodo de 7 días. Se procedido a la determinación de producción de biomasa, lípidos totales y análisis del perfil de ácidos grasos. Los resultados indican que *Ankistrodesmus* sp., obtuvo mayor crecimiento en medio CHU N° 10 Y *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. en medio Bold Basal. La productividad de biomasa microalgal fue mayor en *Chlorella* sp. en medio Cada uno de los medios utilizados. el contenido de lípidos totales fue menor en *Scenedesmus*, sp. En general se indica que las tres especies evaluadas presentan ácidos grasos saturados desde 20 a los 75% en los distintos medios de cultivo, ácidos grasos monosaturados (de 10 a 50%), poliinsaturados (de 5 a 47 %). Asimismo, existe un porcentaje mínimo de ácidos grasos no identificados. Los ácidos grasos presentes en las tres especies nos indican que estas microalgas pueden ser usadas como potencial para la producción de biodiesel en la amazonia peruana.

ABSTRACT

One of the most important advantages of microalgae is their ability to produce biodiesel due to its high content of lipids, especially of fatty acids, which contain higher productivity of 10 to 100 times than conventional crops. So the aim of the research was to determine the effect of three culture media in the fatty acid profile of the Amazonian oil microalgae (*Scenedesmus* sp, *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp). There were two working groups: a problem group and a control group consisting of four different crops: CHU N° 10, Beijerinck Basal Bold and BG11.

Each treatment was performed in triplicate. Growth assessment microalgal was carried out daily for a period of 7 days. We proceeded to the determination of biomass production, total lipids and the analysis of fatty acid profile.

The results obtained indicate that *Ankistrodesmus* sp fastest growing medium is CHU10 Y *Scenedesmus* sp and *Chlorella* sp amid Bold Basal. Microalgal biomass productivity was higher in chlorella amid among the means used. The total lipid content was lower in *Scenedesmus* sp., Generally it indicates that the three species evaluated saturated fatty acids have from 20 to 75% in different types cultivation, monounsaturated fatty acids (10 to 50%), polyunsaturated (5 to 47%). There is also a small percentage of unidentified fatty acids. The fatty acids present in the three species indicate that these microalgae can be used as potential for the production of biodiesel in the Peruvian Amazon.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una dependencia mundial a los combustibles fósiles como proveedores de energía. Sin embargo, esta dependencia se ve afectada no solo debido a la rápida disminución de sus reservas mundiales sino también por el nocivo efecto ambiental que estos producen. Por lo que, los biocombustibles se caracterizan por ser renovables, biodegradables, producen menos emisiones y no contribuyen al incremento del dióxido de carbono en la atmósfera (1).

Por ende, la obtención de biodiesel a partir de aceites de origen vegetal posee algunos problemas asociados a la necesidad de tierras, agua y gran cantidad de fuerza de trabajo para su siembra, cultivo y cosecha (2)(3). En ese sentido, el cultivo de microalgas surge como una alternativa ya que además de ser una fuente renovable de aceites, se pueden desarrollar en aguas residuales con el doble beneficio de la biorremediación, mayor eficiencia fotosintética, eficacia superior en la asimilación de nutrientes, y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas. Los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo, condición que posibilita prescindir de herbicidas y pesticidas y además, permite emplear territorios marginales e inclusive zonas no aptas para la agricultura, ganadería, industria y turismo (4).

Una de las ventajas más importantes que estas ofrecen para la producción de biodiesel, es su gran productividad de ácidos grasos por hectárea, con respecto a los cultivos agrícolas, la productividad de las microalgas es 30 veces superior al maíz o la soja (4). En cultivos cuyo contenido de ácidos grasos sea solo de un 30% de su peso seco, su productividad con respecto al cultivo de la palma africana (la reina de las oleaginosas) llega a ser unas 10 veces superior (5). Así mismo, la

producción de lípidos al igual que su composición en las microalgas, a pesar de depender principalmente de la especie, y en última instancia de su constitución genética, son afectados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, el tipo, periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos. Sin embargo, existen varias limitaciones, entre ellas el cultivo de microalgas en diferentes medios de cultivos óptimos que garanticen una buena producción de biomasa y acumulación de lípidos. La variación del perfil de ácidos grasos entre grupos algares diversos es considerable y variable que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo (6); (7); (8), ya que pueden variar desde menos de 1% hasta más del 40% del peso seco. Dependiendo principalmente de la especie y posteriormente la relación carbono: nitrógeno (C: N) que presentan las composiciones de los medios de cultivos, las microalgas presentan variaciones en el perfil de lípidos celulares y entre otros de los factores que pueden influir son la iluminación, ciclo luz-oscuridad, temperatura, pH, fase de crecimiento y estado fisiológico (9); (10).

Por lo que, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de los géneros de microalgas oleaginosas amazónicas (*Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. General

Determinar el efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de los géneros de microalgas oleaginosas amazónicas (*Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.)

2.2. Específicos.

✓Evaluar la influencia de los tres medios de cultivos en el perfil de crecimiento de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas (*Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.)

✓Conocer el efecto de los tres medios de cultivos en la producción de biomasa y lípidos totales de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas (*Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.)

✓Determinar que ácidos grasos están presentes en las tres especies de microalgas cultivadas en tres medios de cultivo (*Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.)

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

3.1. MARCO TEÓRICO

3.1.1. Generalidades

Existen tres principales clases de microorganismos que utilizan la energía de la luz: a) Las cianobacterias, que presentan fotosíntesis isoxigénica, en la cual se produce oxígeno (O_2) y presentan fotosistemas I y II y fijan el CO_2 , b) Eubacterias fotosintéticas, que realizan fotosíntesis anaerobia, no producen O_2 y solo presentan el fotosistema I. y c) Halobacterias, no presentan clorofila ni transporte fotosintético de electrones. Poseen una bomba de protones dependiente de la luz, la cual produce energía, pero no poder reductor. Requiere de una fuente orgánica de carbono. Las 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 (23). Diversas especies crecen con fuentes orgánicas de carbono y en ausencia de una fuente lumínica, estas condiciones son propias de cultivos heterótrofos (26). A pesar de que se han reportado altas productividades de biomasa y contenido lipídico en la estructura celular, los sistemas heterótrofos son susceptibles a contaminación (25), promueven la instauración de los ácidos grasos sintetizados (27) y los costos de las fuentes orgánicas de carbono tienden a complicar la factibilidad de escalamiento del proceso a nivel industrial.

Por otro lado, existen microalgas con metabolismo autótrofo, las cuales requieren únicamente compuestos inorgánicos como CO_2 , sales, agua y una fuente de energía lumínica para su crecimiento (29). La historia evolutiva de las microalgas se puede categorizar por la pigmentación,

ciclo de vida y estructura celular (30). Así, las microalgas procariontes se clasifican en dos divisiones: Cyanophyta y Prochlorophyta y las eucariontes en nueve: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (28). Sin embargo, según (17) la clasificación de microalgas se realiza en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas doradas (tabla 1). Esta diversidad muestra un gran potencial de explotación de éstos microorganismos para la producción de productos de alto valor agregado y biocombustibles (31).

Tabla 1. Grupos más importantes de microalgas en términos de abundancia.

| Microalga | Especies conocidas (aprox.) | Material almacenado | Hábitat |
|--|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Diatomeas (<i>bacillariophyceae</i>) | 100 000 | Quirsolaminarin | Océano, agua dulce, Dulce y salobre |
| Algas verdes (<i>chlorophyceae</i>) | 8 000 | Polímeros y TAGs | Agua dulce |
| Algas verde-azules (<i>cyanophyceae</i>) | 2 000 | Almidón y TAGs | Diferentes hábitats |
| Algas doradas (<i>chrisophyceae</i>) | 1 000 | Almidón y TAGs | Agua dulce |
| TAGs = triacilgliceroles. | | TAGs y carbohidrato | |

Fuente: (Khan *et al.*,2009)

3.1.2. Clasificación taxonómica de las microalgas en estudio (Bold y Alexopoulos, 1987.)

Dentro de la clasificación de algas verdes se encuentran estas especies:

Scenedesmus sp.

| | | |
|----------|---|-----------------------|
| Reino | : | Plantae |
| División | : | Chlorophyta |
| Clase | : | Chlorophyceae |
| Orden | : | Sphaeropleales |
| Familia | : | Scenedesmaceae |
| Género | : | Scenedesmus |
| Especie | : | <i>Scenedesmus sp</i> |

Ankistrodesmus sp.

| | | |
|---------|---|---------------------------|
| Reino | : | Plantae |
| Filo | : | Chlorophyta |
| Clase | : | Chlorophyceae |
| Orden | : | Sphaeropleale |
| Familia | : | Ankistrodesmaceae |
| Género | : | Ankistrodesmus |
| Especie | : | <i>Ankistrodesmus sp.</i> |

Chlorella sp.

| | | |
|----------|---|----------------------|
| Reino | : | Protista |
| División | : | Chlorophyta |
| Clase | : | Chlorophyceae |
| Orden | : | Chlorococcales |
| Familia | : | Oocystaceae |
| Género | : | Chlorella |
| Especie | : | <i>Chlorella sp.</i> |

Fuente: López – Adrian, S & Barrientos-Medina, R,2007

3.1.3 Principales nutrientes para el crecimiento microalgal.

Las células microalgales requieren elementos en proporciones relativamente fijas para poderse reproducir (32). La diversidad de especies en un ambiente acuático se encuentra determinada por la proporción que existe entre los nutrientes disponibles en el medio y los requerimientos nutricionales de cada especie. De esta forma, diferentes especies creciendo en una misma comunidad pueden estar limitadas por diferentes recursos (33). La composición química de las algas se encuentra directamente determinada por la toma de material inorgánico (cationes y aniones) del medio acuático circundante. La asimilación de nutrientes inorgánicos por las algas es importante ya que estos organismos representan la principal fuente de nutrientes en ecosistemas

acuáticos continentales y marinos. La entrada de químicos inorgánicos en las células algales constituye la principal ruta de entrada en la cadena alimenticia con la subsecuente transformación en biomasa de herbívoros y carnívoros (11).

Los nutrientes inorgánicos pueden dividirse en dos grupos: macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluye compuestos de nitrógeno, fósforo, silicio y azufre) son componentes fundamentales de macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular. El silicio difiere de los demás macronutrientes por tener un limitado rol biológico, su importancia es estructural (no metabólica) y limitada al grupo de las diatomeas y de las crisofíceas (silicoflagelados) ya que necesitan de grandes concentraciones para la formación de sus frústulos. Por su parte, los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas. (29); (34); (35).

El concepto de factores limitativos desarrollado por Liebig es conocido como la ley del mínimo, la cual establece que el crecimiento es limitado por aquel nutriente cuya concentración esté cerca al mínimo nivel requerido. Cuando la concentración del nutriente limitante se incrementa, aumenta el crecimiento hasta que otro nutriente llega a ser limitante (16). Conforme la población celular aumenta, más del nutriente limitante llega a ser incorporado en las células y menos está disponible para soportar crecimiento posterior. Por lo tanto, si no hay un reabastecimiento del nutriente, su concentración declina hasta que eventualmente es muy baja para soportar aumentos de biomasa y la población llega a su máximo.

Para iniciar el cultivo de microalgas con fines acuiculturales y biotecnológicos, primero se debe tener un medio nutritivo adecuado para la especie sometida a cultivo. Existen dos tipos de medios para el cultivo de microalgas: medios enriquecidos y medios químicamente definidos o sintéticos. Los primeros, están basados en agua de mar (medio *Guillard* f/2 para algas de los grupos Haptophyta, Bacillariophyta y Dinophyta) o agua dulce (medio para algas Chlorophyta), los cuales aportan la mayoría de nutrientes requeridos por las microalgas y son suplementados con algunas sales minerales de grado químico o fertilizantes agrícolas. Los segundos, se preparan con agua destilada y nutriente con grado analítico de pureza, y éstos a su vez, pueden dividirse en medios generales y medios específicos. Los medios generales son usados para un grupo de microalgas (e.g. medio Provasoli para algas Haptophyta, Bacillariophyta y Dinophyta), mientras que los medios específicos son utilizados con una determinada microalga (e.g. medio Zarrouk para *Spirulina* sp).

Los medios sintéticos, definidos o artificiales, se usan para la producción algal a nivel laboratorio y para las investigaciones en ficología, porque permiten determinar los requerimientos específicos para el crecimiento y formación de productos algales. Otras ventajas incluyen su reproducibilidad, baja tendencia a formar grumos y translucidez y relativa facilidad de reconversión y purificación del producto. Sin embargo, desde los puntos de vista práctico, económico y funcional, se utilizan los medios enriquecidos o complejos más que los sintéticos. Los medios de agua de mar o agua dulce enriquecidos con algunos nutrientes nitrógeno(N), fosforo (P), hierro (Fe), potasio (K), han llegado a cubrir los requerimientos nutricionales de varias especies microalgales de interés comercial.

Los medios que se utilizan generalmente para multiplicación de microalgas son los medios f/2, Bold Basal, BG11, Beijerinck. La elección de un medio en especial, está condicionada por los

requerimientos nutricionales de la especie algal elegida, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de cultivo.

Desde hace mucho tiempo, en USA, Japón e Israel se vienen usando con relativo éxito, desechos de diverso origen como medios no definidos para el cultivo de microalgas. Los efluentes líquidos de destileras (pre-tratados con proceso anaeróbico anaeróbico-aeróbico) se han evaluado como medios de cultivo para *Chlorella vulgaris* (35). Los efluentes líquidos de la porcinoicultura, pretratados por procesos anaeróbicos, se han usado en el cultivo de *Spirulina* sp. (36) y *Chlorella* sp. (37). Los efluentes líquidos de la digestión anaeróbica de desechos de ganado vacuno y de aves de corral se han utilizado como medios de cultivo de *Parlova lutheri* (38) y los biodigeridos de *Macrocystis pyrifera* y *Zoostera marina* para el cultivo de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* (28).

Se ha propuesto un medio de cultivo para producción de biomasa de *Dunaliella* sp salina usando agua de mar y harina de pescado (0,2 – 0,3 g l⁻¹). Alternativamente, se usa el extracto acuoso del ensilado de pescado en el cultivo de microalgas como *Tetraselmis* sp y *Chaetoceros* sp con resultados satisfactorios. Es necesario manifestar que los cultivos microalgales toman una coloración amarillenta, debido a que las células acumulan los lípidos presentes en la harina y el ensilado de pescado, utilizados como principal insumo para preparar los medios de cultivo.

En otros casos, se han usado los efluentes de la industria alimentaria (e.g. azúcar, aceite y maíz) y los desechos domésticos para el cultivo de microalgas.

3.1.4. Composición de ácidos grasos 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 (29). 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 (Fig. 1). La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, formando protones, electrones y O_2 molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido-Fosfato (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 Adenosin Trifosfato (ATP) mediante la vía ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP son sustratos del ciclo de Calvin (30); 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 acetyl-CoA (31).

Las moléculas de acetyl-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetyl-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA (31), molécula que es transferida a la proteína acarreadora de grupos acil (ACP) del complejo multienzimático 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(32). 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 (33).

Asimismo, la formación de triacilglicerol se llevó 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 (4). La primera reacción para la síntesis de triacilglicerol (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) (34); (21).

Posteriormente, PA puede ser desfosforilado por la enzima ácida 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 (39)(40), los cuales son la materia prima para obtener biodiesel.

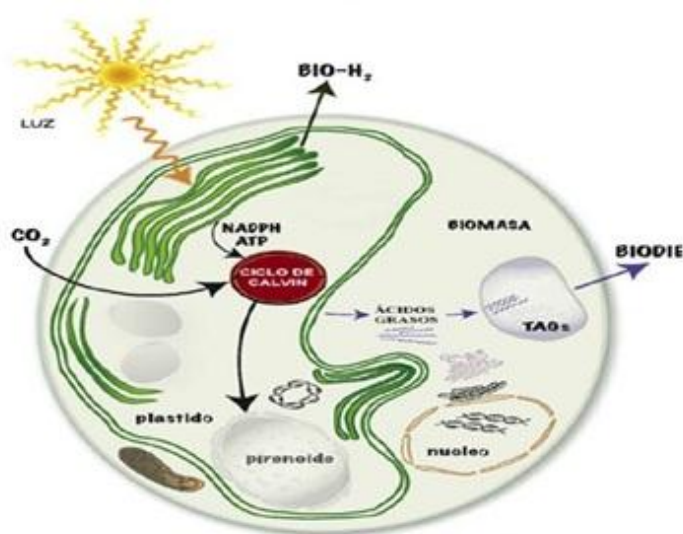


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de lípidos en microalgas (Beeret al. 2009).

3.1.5. Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales con un grupo metil (CH₃) y un grupo carboxilo al final (41). 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 (42). Los ácidos grasos poliinsaturados, se clasifican en n-6(n-6) y n-3 (n-3) según la posición del doble enlace con respecto al medio terminal de la molécula. El principal ácido graso n-6 es el ácido linoléico (18:2 n-6), presente en los aceites vegetales de maíz,

girasol y soya. El ácido γ -linolénico (18:3 n-3) predomina en las plantas; y aquellos ácidos grasos n-3 de cadena más larga, como el eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) y el decosahexanoico (DHA, 22:6 n-3) abundan en los pescados, mariscos y aceites marinos (43).

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 hidroxilos, entre otros (7),(44),(45)

3.1.6. Importancia de los ácidos grasos.

Las importancias de los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados y es justamente la presencia de ácidos grasos; los saponificables como aceites, ceras, grasa a partir de ellas se obtiene energía de ATP en las plantas, las plantas tienen montículos de ceras no se mojan se comportan como moléculas protectoras. En cambio, en los humanos y animales les sirven de barreras físicas de protección contra aspectos mecánicos como los golpes sirven de defensa, siendo también material de reserva en el cuerpo de los animales, como inductores hormonales, las grasas de origen animal son generalmente ricas en ácidos grasos saturados.

3.1.7. Clasificación de lípidos.

Los lípidos son un grupo de compuestos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas alifáticas o aromáticas, aunque en ocasiones también contienen fósforo y nitrógeno. Debido al gran número de sustancias consideradas como lípidos, existen diferentes métodos para clasificarlos en tres grupos de acuerdo a su estructura química (40) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los lípidos.

-
- A. Lípidos simples. Esteres de ácidos grasos y alcoholes.
 - 1. Grasas y aceites: Esteres glicerol y alcoholes con ácidos monocarboxílicos.
 - 2. Ceras: Esteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.
 - B. Lípidos compuestos. Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas.
 - 1. Fosfolípidos: esterres que contienen ácidos fosfóricos en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.
 - 2. Glucolípidos: compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrosidos.
 - 3. Lipoproteínas: compuestos de lípidos y proteínas.
 - C. Compuestos asociados.
 - 1. Ácidos grasos (derivados de lípidos simples).
 - 2. Pigmentos.
 - 3. Vitaminas liposolubles.
 - 4. Esteroles: entre los esteroides más destacados se encuentran las hormonas sexuales, las corticosteroides, el colesterol.
 - 5. Hidrocarburos.
-

Fuente: BADUI, S. (1993).

Las grasas y los aceites son los lípidos más abundantes e importantes para la aplicación industrial. Químicamente son mezclas de triglicéridos, con cantidades menores de otros lípidos. Los triglicéridos están constituidos por una molécula de glicerol (alcohol) a la cual se encuentran unidos tres ácidos grasos (46).

3.2. Antecedentes

Son organismos cosmopolitas autótrofos o heterótrofos que utilizan principalmente la energía proveniente del sol para crecer y multiplicarse. Actualmente representan la alternativa con mayor viabilidad para la producción de biocombustibles por el hecho que sintetizan 30 veces más aceite por hectárea que las plantas terrestres usadas para la fabricación de biodiesel (11). Las microalgas también pueden cultivarse en áreas sumergidas, tierras infértiles e incluso con agua de mar. Aunado a eso, el cultivo de biomasa microalgal aparte de proveer materia prima de biocombustibles, tiene un impacto ambiental favorable al reducir la concentración de gases de efecto invernadero, debido a que utiliza grandes cantidades de anhídrido carbónico (CO₂) durante su cultivo (9).

De acuerdo con Donaldson (10), la producción de las microalgas en Estados Unidos. Tiene un costo equivalente al 18% de su precio; por lo cual, actualmente uno de los objetivos principales de las investigaciones sobre el cultivo de microalgas es intentar maximizar los beneficios de los cultivos, bajando los costos de operación. El factor más estudiado es el del precio elevado de los productos químicos empleados para la producción de los medios de cultivo para microalgas (15). Los cultivos de microalgas han sido estudiados por numerosos investigadores, observándose que bajo condiciones de medios de cultivo adecuadas, son mucho más productivos que las plantas superiores o las células fotoautotróficas aisladas de la misma (8). existen actualmente un grupo de investigadores en España que se han dedicado a obtener medios de cultivos optimizados y así conseguir un medio en que la carga bacteriana sea menor y además producir 100g de biomasa por cada 100g de medio de cultivos (12).

Otros estudios en microalgas como las diatomeas *Actinocyclus normanii*, *Neodelphineis* pelágica y *Cyclotella glomerata* presentan tasas de crecimiento diferentes dependiendo del medio de cultivo. Para las tres especies se presentó crecimiento altamente significativo ($p < 0,05$) en F/2 comparado

con el medio Conway *et al.*, (13), quienes trabajando con dos microalgas marinas en tres diferentes medios de cultivo, describen tasas de crecimiento altamente significativa para la diatomea *C. calcitrans* en agua intersticial diluida (DIW) comparadas con medio Conway (CM) y agua intersticial extraída de estanques de camarón (PIW). Uno de los aspectos importantes que presentan las microalgas, es su contenido lípido el mismo que puede ser controlado en función de las condiciones del medio de cultivo, además ofrece las posibilidad de obtener subproductos (biopolímeros, pigmentos, biogás, antitoxinas, fármacos y nutraceuticos) de alto valor agregado, una vez extraído la fracción lipídica de la biomasa (9).

Aproximadamente el 90% del peso seco de las microalgas se conforman de proteínas, carbohidrato, y lípidos, los porcentajes dentro de las células pueden variar dependiendo de las cepas, las condiciones del cultivo y el tipo de medios en las que se cultivan las microalgas. Se han reportado composiciones de las cepas de *chlorella* como *Chlorella protothecoides* y *Chorella sp.*, las cuales contienen 15,2% y 25,6% de ácidos grasos, 11% y 16,1% de carbohidratos y 11,4% y 18,4% de lípidos en peso seco. Asimismo, la biomasa obtenida de las microalgas contiene hidrocarburos en formas de lípidos, tales como los ácidos grasos libres, triglicéridos (TAG), fosfolípidos y glucolípidos que son materia prima para la producción de biodiesel.

Por lo que, el crecimiento de las microalgas puede ser limitado por bajos niveles de nutrientes inorgánicos, y estas alteraciones en la concentración de nutrientes altera la composición bioquímica de las microalgas (12). La composición y concentración de nutrientes, la composición bioquímica de las microalgas puede ser alterada sustancialmente por la manipulación de las condiciones de cultivo tales como intensidad de luz (16), fotoperíodo o temperatura (14). Los cambios en las células de microalgas, como las células de *Scenedesmus*, puede ser efectuado por el

medio de cultivo, las condiciones de crecimiento, y composiciones de nutrientes, además de gen tecnología de transformación (16). Asimismo, (17) determinaron que el nuevo medio, KEP I, al que se había tratado con orina porcina podría aumentar el crecimiento y la calidad de las microalgas del género *Scenedesmus* y alterar la composición bioquímica de sus células. Las cepas de microalgas ensayadas revelaron una máxima concentración de biomasa durante los 10 días de evaluación. De las 147 cepas evaluadas, 24 de ellas tenían la mayor tasa de crecimiento durante los días 8 y 12. Además, observaron que los valores máximos de biomasa seca se obtuvieron en el octavo y Décimo día, con valores de 50 y 21.7 g L⁻¹, respectivamente. Por lo que, el suplemento de nutrientes es un factor crucial para el rendimiento del crecimiento de los microalgas (18). Y uno de los parámetros de crecimiento más importante es la densidad celular. Parámetro que contribuye significativamente con la posibilidad de iniciar el cultivo a gran escala con fines de producción de biodiesel y productos farmacéuticos (20).

El crecimiento de las microalgas puede ser limitado por bajos niveles de nutrientes inorgánicos, y estas alteraciones en la concentración de nutrientes altera la composición bioquímica de las microalgas (22). Además de la composición y concentración de nutrientes, la composición bioquímica de las microalgas puede ser alterada sustancialmente por la manipulación de las condiciones de cultivo tales como intensidad de luz (21);(24), fotoperiodo o temperatura (19).

3.3. Definición de términos básicos.

Lípidos: Son el conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría de ellas biomolecular, compuestas de carbono e hidrógeno, en menor medida de oxígeno y también por fósforo, azufre y nitrógeno y cuya principal característica resulta ser que son hidrofóbicas, es decir, insolubles al agua y sí

plausibles de ser disueltas en sustancias orgánicas como el alcohol, la bencina, el benceno y el cloroformo.

Microalgas: Son microorganismos fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En general son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilización de la energía solar para producir biomasa. Están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditados solo al agua. Se encuentran presentes en el suelo y la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos, lo cual permite encontrarlas ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones.

Medio de cultivo: Solución u otro substrato utilizado para cultivar microorganismos.

Biodiesel: La ASTM (American Society for Testing and Materials) define biodiesel como el éster monoalquílico de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos renovables, como por ejemplo aceites vegetales o grasas animales, para utilizarlos en motores Diesel.

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

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 (-COOH).

Tasa de crecimiento: implica un aumento ordenado de todos los componentes celulares de un organismo y así aumentar el tamaño del mismo (estado adulto).

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

***Scenedesmus* sp. :** Especies cosmopolitas, es un género que ha conquistado las aguas del todo el planeta, tanto las aguas dulces como las saladas, su sencillez y su fácil acomodación cualquier tipo de ambiente le han abierto las puertas de la vida

***Ankistrodesmus* sp.:** El género *Chlorococcales* agrupa a las denominadas algas verdes, estas son algas unicelulares o cenobiales provistas de una membrana bien definida. Este orden está constituido por 10 familias, entre ellas la familia *Oocystaceae* se caracteriza por multiplicarse por autoesporulacio, no existe la división vegetativa ni la formación de zoosporas en su ciclo. El género *Ankistrodesmus* forma parte de dicha familia, se caracteriza por sus células fusiformes y largas. La multiplicación se realiza por la producción de 2,4 u 8 autosporas que presentan la misma forma que la célula madre.

***Chlorella* sp.:** Es una microalga unicelular, inmóvil, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto que presenta forma de copa. Su reproducción se da mediante la formación de autosporas y forman grupos irregulares o colonias. Esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluso en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos. Para llevar a cabo investigaciones con esta microalga es necesario estandarizar los métodos de cultivo que permitan disponer de suficiente biomasa de la misma, así como implementar técnicas y desarrollar medios de cultivo apropiados para lograr los fines deseados.

Efecto: Resultado de la acción de una causa, implicado en uno de los principios fundamentales de la filosofía y de la ciencia: no hay efecto sin causa.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, ubicado en la Av. Abelardo Quiñones Km 2.5 del distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. El secado de la biomasa se llevó a cabo en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA) ubicado en el AA.HH San Lorenzo s/n Psje. Los pajiles distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Y el análisis de perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en el Instituto del Mar del Perú-IMARPE.

4.2. Recursos utilizados.

4.2.1. Materiales.

- ✓ Gorro
- ✓ Mandil y guantes de laboratorio.

- ✓ Placas Petri (15x 100 mm, Duran).
- ✓ Frascos Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- ✓ Láminas porta objetos y cubreobjetos
- ✓ Gradillas
- ✓ Papel de Aluminio
- ✓ Probetas
- ✓ Tips de 200 y 1000 μ l
- ✓ Alcohol (70% y 96%)
- ✓ Microtubos (5 ml)
- ✓ Tubos de 15ml
- ✓ Matraces de 100 ,250, 500 ml

4.2.2. Equipos.

- ✓ Computadora
- ✓ Balanza analítica marca Sartorius
- ✓ Centrifuga refrigerada modelo Universal 320R
- ✓ Autoclave
- ✓ Cámara fotográfica celular.
- ✓ Microscópio de fluorescência marca Zeiss.
- ✓ Microscópio óptico marca Alphapotica, modelo N-800M.
- ✓ Estufa.
- ✓ Cabina de flujo laminar marca Telstar.
- ✓ Pastillas magnéticas

4.2.3. Reactivos.

- ✓ $\text{Na}_2\text{MG EDTA}$
- ✓ Citrato Férrico de Amonio
- ✓ Ácido Cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- ✓ K_2HPO_4
- ✓ H_3BO_3
- ✓ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ MoO_4 (85%)
- ✓ Na_2CO_3
- ✓ NaNO_3
- ✓ $\text{NO}_3 \text{ Na}$
- ✓ $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot \text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{K}$
- ✓ $\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{K}$
- ✓ ClNa
- ✓ EDTA Na_2
- ✓ KOH
- ✓ $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ SO_4H_2
- ✓ BO_3H_3
- ✓ $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$
- ✓ Mo O_3
- ✓ $\text{SO}_4 \text{ Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $(\text{NO}_3)_2 \text{ Co} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{NO}_3 \text{ Na}$
- ✓ $\text{PO}_4 \text{ HK}_2$
- ✓ $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- ✓ $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{PO}_4 \text{HK}_2$
- ✓ $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$
- ✓ BO_3H_3
- ✓ $\text{SO}_4\text{CU} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$
- ✓ $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- ✓ $\text{Mo}_7\text{O}_{24} (\text{NH}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4.3. Tipo y Diseño de investigación.

El tipo de investigación fue descriptiva, porque nos permitió describir el efecto de tres medios de cultivo en la producción de ácidos grasos de tres especies de microalgas. El diseño fue de tipo experimental, porque se utilizaron grupos de trabajo: un grupo problema y un grupo control. Se determinaron la producción de biomasa, lípidos totales y análisis del perfil de ácidos grasos, tal como se observa en la presente (ver en anexo 1).

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población

Constituidas por tres especies de microalgas de la amazonia peruana.

4.4.2. Muestra

La muestra fue presentada por las especies de microalgas Amazónicas (*Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp.) Las mismas que fueron proporcionadas por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética – UCP. (Ver en anexo 2).

4.5. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos.

4.5.1 Técnica de recolección de datos:

Observación directa y microscópica. Se tomaron registros de resultados de crecimiento diario, registrándose los datos en el programa Excel. La biomasa se midió por diferencia de peso de la

placa Petri con y sin biomasa seca y mientras que para la tasa de crecimiento microalgal se realizó por conteo directo utilizando el Nanodrop 2000, anotándose los datos en Excel (ver en anexo 3).

4.5.2. Instrumento de recolección de datos:

Se emplearon formatos en excell para el registro de los datos de crecimiento microalgal, microscopio de fluorescencia, Nanodrop 2000, láminas cubreobjetos, cabina de flujo laminar, agitador horizontal, entre otros.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Cultivo y cosecha inicial de microalgas

Se cultivaron tres especies de microalgas (*Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp., y *Chlorella* sp.) en condiciones normales utilizando el medio CHU N° 10, hasta obtener la saturación de los cultivos, posteriormente se cosecharon la biomasa por centrifugación, biomasa que se utilizaron en los ensayos correspondientes. (Ver en anexo 4).

4.5.3.2. Ensayos en tres medios de cultivos.

Los ensayos se llevaron a cabo en tres medios de cultivos (Bold Basal, Beijerinck y BG-11) en matraces de 1L en las cuales se adicionó 50ml de la biomasa obtenida, se cultivaron a una temperatura de 26°C, 32% humedad relativa, intensidad luminosa de 100 $\mu\text{E. m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 h. La evaluación de crecimiento microalgal se realizó diariamente por un periodo de 7 días. (Ver en anexo 5)

4.5.3.3. Cosecha microalgal.

Se centrifugaron las tres especies de microalgas en los tres medios de cultivos, se colocaron en placas Petri. El pellet obtenido se dejó secar a 50 °C en una estufa por 24 horas, luego se procedió al raspado de las placas y el pesado de las mismas para la obtención de biomasa seca (ver en anexo 6).

4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípidos totales se realizó según Yu *et al.*, (45), que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL y se añadió 100 µL de NaCl 0,9% por cada 1000 µL de extracto. La solución se homogenizó en vortex por 30 seg y centrifugó a 23000g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se realizó con filtros para jeringa de 0,45 µm y transfirió a vasos de precipitado de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes se retuvieron en la fase intermedia (entra fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado. Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un hotplate a 50°C por 4 horas. Luego los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado se secaron a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atempero a 25°C y determinó su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinó la cantidad de lípidos totales obtenidos. Con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100$$

Donde PL es el peso seco de los lípidos totales y PM es el peso seco de las microalgas.

4.5.3.5. Determinación de ácidos grasos.

Esta determinación se realizó en el Instituto del Mar del Perú de la siguiente manera; se usó 1mg 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 formar los metil esterres de los ácido grasos presentes en la muestra y luego se usó cromatografía gaseosa para su cuantificación bajo las siguientes condiciones : método de infección splitless (0.5 min), volumen de inyección 1ul, columna WCOT sílice fundida de

30mx0.25mmx0.25um, temperatura del infector 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 sector 260°C.

4.5.3.6. Procesamiento de la información.

Se determinó si existen diferencias significativas de la densidad de microalgas oleaginosas se utilizó el ANOVA con prueba HSD de Tukey. Los análisis estadísticos mencionados se realizaron con el programa PASW Statistical v 20 y los gráficos fueron diseñados en el programa Excel de Microsoft office.

CAPÍTULO V RESULTADOS

5.1. Perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp. cultivadas en tres medios de cultivos.

El perfil de crecimiento de *Chlorella* sp. que fue evaluado en cuatro medios de cultivo, muestra crecimiento diferencial y gradual durante los días de evaluación. Asimismo, en el medio Bold Basal se obtuvo un mayor crecimiento celular de 0.65×10^6 célula/ml al sexto día de evaluación, siendo esta el final de su fase exponencial. Sin embargo, en el medio BG11 mostró el menor

crecimiento

microalgal

(Figura

3).

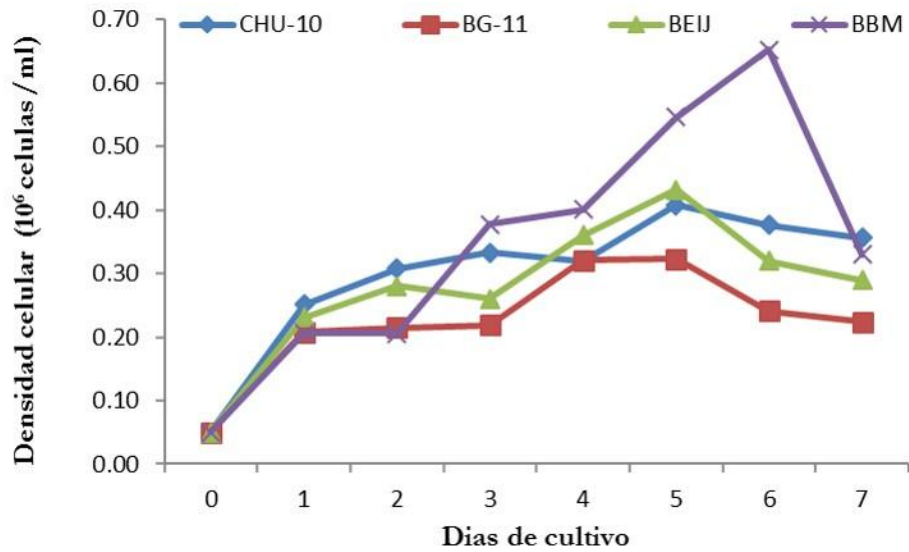


Figura 2. Perfil de crecimiento de *Chlorella* sp, en tres medios de cultivo. (BB=Bold Basal, BEIJ=Beijerinck)

Asimismo, la mayor densidad celular de *Scenedesmus* sp. se obtuvo en los medios de cultivos Bold Basal al sexto día (0.58×10^6 célula/ml) y Beijerinck, al séptimo día (0.57×10^6 célula/ml) siendo estas el término de sus fase exponencial. Sin embargo, en los medios de cultivos CHU10 y BG-11 se evidenció un bajo perfil de crecimiento, teniendo en el medio CHU10 un período de latencia al sexto día de cultivo, probablemente por la disminución de algunos de los nutrientes, tal como se muestra en la figura 4.

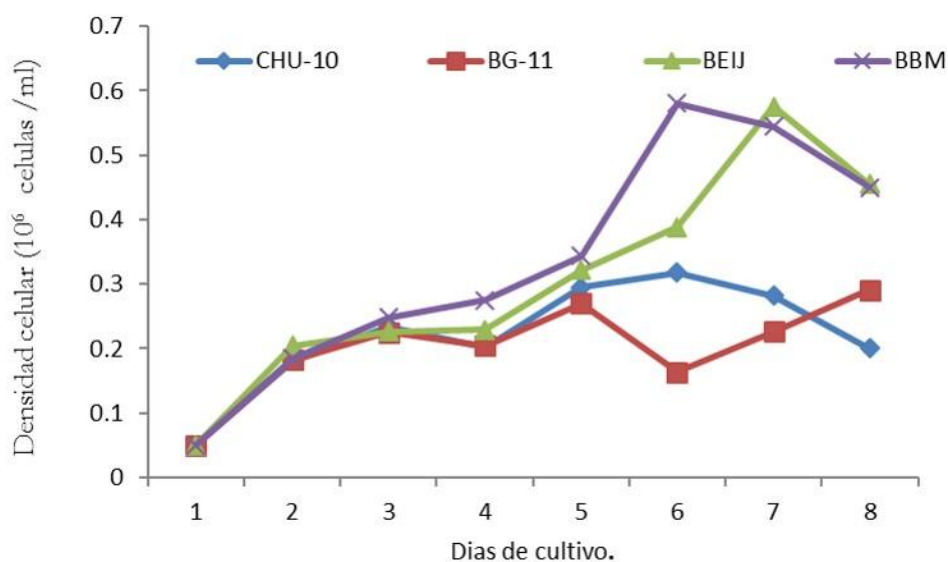


Figura 3. Perfil de crecimiento de *Scenedesmus* sp, en tres medios de cultivo. BB=Bold Basal, BEIJ=Beijerinck.

En la figura 5 se muestra el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. donde se evidencia que tres medios de cultivos tuvieron un período de crecimiento exponencial hasta el tercer día de evaluación con 0.26 (CHU10) , 0.21 (BG-11) y 0.17 (BBM) x 10⁶ célula/ml respectivamente, sin embargo el medio Beijerinck obtuvo al cuarto día su fase exponencial con 0.23 x 10⁶ célula/ml. Posteriormente los cultivos sufrieron una fase de latencia hasta el sexto día, luego incrementando su densidad celular hasta el último día de cultivo, siendo el medio Bold Basal quien evidenció la mayor densidad celular al último día de cultivo.

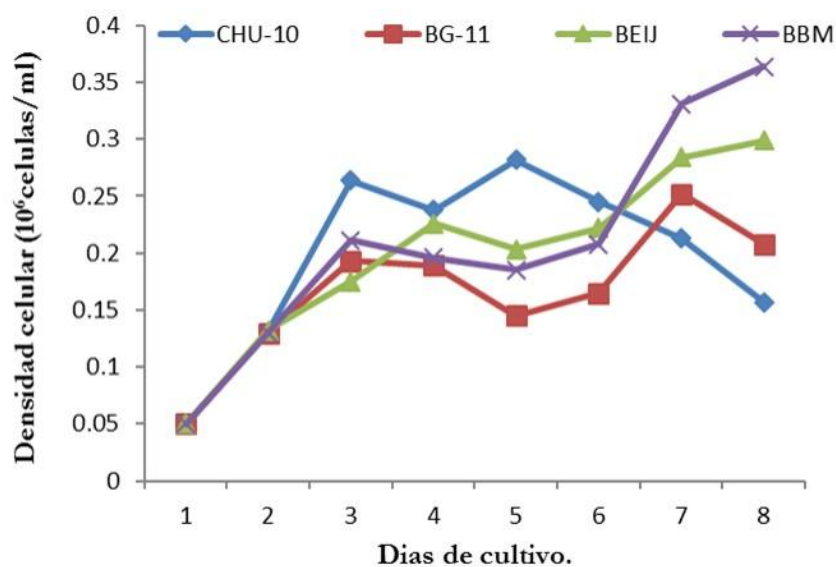


Figura 4. Perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp, en tres medios de cultivo. (BB=Bold Basal, BEIJ=Beijerinck).

5.2. Efecto de tres medios de cultivos en la producción de biomasa y lípidos totales en tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas.

Tabla 3. Acumulación de lípidos totales y productividad de biomasa en *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Ankistrodesmus* Sp. en tres medios de cultivos.

| | CHU10 | BG11 | BOLDBASAL | BEIJERINCK | CHU10 | BG11 | BOLDBASAL | BEIJERINCK |
|---------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--|-------------|-------------|-------------|
| | Lípidos Totales (%) | | | | Productividad de Biomasa (gL ⁻¹ d ⁻¹) | | | |
| <i>Chlorella</i> sp. | 13.99 ± 0.08 | 7.39 ± 0.08 | 7.12 ± 0.08 | 7.25 ± 0.22 | 2.57 ± 0.78 | 2.14 ± 0.48 | 2.21 ± 0.70 | 2.04 ± 0.57 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 15.24 ± 0.06 | 5.7 ± 0.06 | 5.75 ± 0.22 | 12.8 ± 0.05 | 1.24 ± 0.17 | 0.44 ± 0.36 | 0.49 ± 0.44 | 0.23 ± 0.23 |
| <i>Ankistrodesmus</i> sp. | 13.98 ± 0.71 | 21.58 ± 0.85 | 21.03 ± 0.67 | 13.77 ± 0.65 | 0.23 ± 0.37 | 0.23 ± 0.23 | 0.07 ± 0.02 | 0.08 ± 0.02 |

Según la tabla 3 el mayor porcentaje de lípidos totales se reportó con la especie *Ankistrodesmus sp.*, cuando fueron cultivadas en medio BG11 y Bold Basal con 21.58 y 21.03 % respectivamente. Sin embargo, la especie *Scenedesmus sp.* obtuvo el menor porcentaje de lípidos totales en los dos medios ya mencionados con 5.7 y 5.75 %. En cuanto a la productividad de biomasa se reporta un comportamiento diferente con respecto a la acumulación de lípidos totales, ya que la especie que evidencio el mayor porcentaje de lípidos obtuvo menor productividad de biomasa tanto en BG11 y Bold Basal (0.23 y 0.07 gL⁻¹ d⁻¹). Asimismo, la especie *Chlorella sp.* mostro la mayor productividad de biomasa 2.25 gL⁻¹ d⁻¹ y un porcentaje de lípidos de 13.99 %.

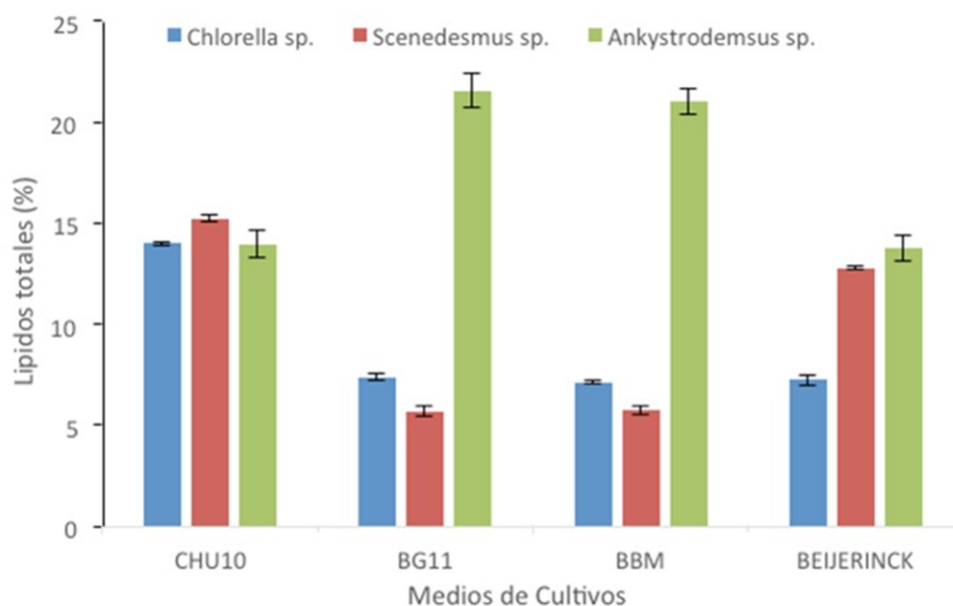


Figura 5. Acumulación de lípidos totales en tres especies de microalgas cultivadas en medio de cultivos diferentes.

En cuanto a las diferencias estadísticas entre la acumulación de lípidos totales de cada especie y los medios de cultivos, se evidencia que existen estadísticas altamente significativas en *Chlorella sp.* cultivada en medio CHU-10 con respecto a los demás medios de cultivos ($p < 0.00$), sin embargo, la especies *Scenedesmus sp* y *Ankistrodesmus sp.* cultivadas en medio CHU-10 y Beijerinck muestran diferencias significativas con respecto a los dos medios de cultivos restantes ($p < 0.00$). (Figura 6).

5.3. Ácidos grasos presentes en tres especies de microalgas cultivadas en tres medios de cultivo (*Scenedesmus sp.*, *Ankistrodesmus sp.* y *Chlorella sp.*)

Las tablas 04, 05 y 06 muestran el contenido de ácidos grasos de tres especies de microalgas cultivadas en tres medios de cultivos diferentes. Asimismo, *Scenedesmus sp* y *Ankistrodesmus sp.* cultivadas en medio Bold Basal obtuvieron mayor porcentaje de ácido palmítico con 64.52 ± 0.83 y 68.56 ± 2.35 respectivamente. Sin embargo, en *Chlorella sp.* obtuvo mayor ácido palmítico cuando fue cultivada en medio BG-11. Otros de los ácidos que resalto fue el ácido láidico en las tres especies microalgales cuando fueron cultivadas en medio BG-11 con 29.08 ± 0.33 , 50.76 ± 0.39 y 41.90 ± 3.83 respectivamente. Sin embargo, existen ácidos grasos que evidenciaron menores porcentajes como el ácido mirístico en *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* cultivadas con los medios CHU10 y Bold Basal con 0.41 ± 0.01 y 0.43 ± 0.00 respectivamente. Asimismo, *Ankistrodesmus sp* mostro menos porcentaje de ácido palmitoléico en el medio BG11 con 0.43 ± 0.05 .

En general, las tres especies de microalgas evaluadas presentan ácidos grasos saturados (desde 15 a 74%), ácidos grasos monoinsaturados (de 12 a 52%) y poliinsaturados (desde 5 a 49%).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp cultivadas en diferentes medios de cultivo.

| ACIDOS GRASOS | | <i>Ankistrodesmus</i> sp. | | | |
|-----------------|----------------------|---------------------------|------------|------------|------------|
| | | BG11 | BBM | CHU-10 | BEIJERINCK |
| 14:00 | Ac. Mirístico | 0.7 ± 0.1 | 1.0 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 16:00 | Ac. Palmítico | 43.5 ± 4.3 | 68.6 ± 2.4 | 18.7 ± 0.3 | 16.1 ± 0.4 |
| 18:00 | Ac. Esteárico | 3.3 ± 0.3 | 5.1 ± 0.2 | 1.0 ± 0.0 | 0.9 ± 0.1 |
| 16:1n-7 | Ac. Palmitoleico | 0.4 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.7 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 |
| 18:1n-7 | Ac. Vaccénico | 0.4 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 1.4 ± 0.1 | 1.4 ± 0.0 |
| 18:1n-9 | Ac. Eláidico | 41.9 ± 3.8 | 21.0 ± 2.0 | 37.0 ± 0.1 | 16.4 ± 0.9 |
| 18:2n-6 | Ac. Linoleico | 3.1 ± 0.2 | 1.7 ± 0.2 | 7.5 ± 0.3 | 5.3 ± 0.1 |
| 18:3n-6 | Ac. Alfa Linolenico | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 0.6 ± 0.0 |
| 18:3n-3 | Ac. Omega Linolenico | 3.6 ± 0.4 | 1.7 ± 0.3 | 14.9 ± 0.1 | 30.8 ± 0.7 |
| 18:4n-3 | Ac. Estearidónico | 0.8 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 6.3 ± 0.0 | 6.2 ± 0.1 |
| No identificado | | 2.9 ± 0.1 | 0.8 ± 0.2 | 21.8 ± 0.3 | 29.4 ± 0.2 |
| | AGS | 47.5 | 74.6 | 20.2 | 16.9 |
| | AGI | 49.5 | 24.6 | 57.9 | 53.6 |
| | AGMI | 42.8 | 21 | 39.1 | 18.3 |
| | AGPI | 7.6 | 3.4 | 29.2 | 43.1 |
| | AGS - AGMI | 90.3 | 53.6 | 53.6 | 53.6 |

AGS = Ácidos grasos saturados, AGI = Ácidos grasos insaturados, AGMI = Ácidos grasos monoinsaturado, AGPI = Ácidos grasos poliinsaturado.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de *Chlorella* sp cultivadas en diferentes medios de cultivo

| ACIDOS GRASOS | | <i>Chlorella</i> sp. | | | |
|-----------------|----------------------|----------------------|------------|------------|------------|
| | | BG11 | BBM | CHU-10 | BEIJERINCK |
| 14:00 | Ac. Mirístico | 0.7 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 16:00 | Ac. Palmítico | 49.5 ± 0.4 | 16.7 ± 0.4 | 23.0 ± 0.2 | 13.0 ± 0.1 |
| 18:00 | Ac. Esteárico | 1.7 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 16:1n-7 | Ac. Palmitoleico | 0.8 ± 0.0 | 0.9 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | 13.0 ± 0.0 |
| 18:1n-7 | Ac. Vaccénico | 1.5 ± 0.0 | 1.7 ± 0.0 | 1.1 ± 0.0 | 1.5 ± 0.0 |
| 18:1n-9 | Ac. Eláidico | 29.1 ± 0.3 | 11.6 ± 0.2 | 27.7 ± 0.2 | 9.7 ± 0.4 |
| 18:2n-6 | Ac. Linoleico | 0.8 ± 0.0 | 24.9 ± 0.3 | 21.6 ± 0.1 | 15.8 ± 0.3 |
| 18:3n-6 | Ac. Alfa Linolenico | 0.0 ± 0.0 | 1.3 ± 0.0 | 0.7 ± 0.0 | 1.3 ± 0.0 |
| 18:3n-3 | Ac. Omega Linolenico | 1.5 ± 0.0 | 15.6 ± 0.3 | 9.6 ± 0.2 | 28.1 ± 0.5 |
| 18:4n-3 | Ac. Estearidónico | 0.0 ± 0.0 | 2.6 ± 0.0 | 1.9 ± 0.0 | 4.2 ± 0.1 |
| No identificado | | 7.2 ± 0.0 | 30.5 ± 0.2 | 21.7 ± 0.1 | 30.7 ± 1.8 |
| | AGS | 51.9 | 16.7 | 24.5 | 13 |
| | AGI | 40.8 | 52.8 | 53.8 | 56.3 |
| | AGMI | 31.4 | 14.3 | 29.2 | 12.5 |
| | AGPI | 9.5 | 44.4 | 33.8 | 49.4 |
| | AGS - AGMI | 83.3 | 30.9 | 53.6 | 25.5 |

AGS = Ácidos grasos saturados, AGI = Ácidos grasos insaturados, AGMI = Ácidos grasos monoinsaturado, AGPI = Ácidos grasos poliinsaturado.

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus* sp cultivadas en diferentes medios de cultivo

| ACIDOS GRASOS | | <i>Scenedesmus</i> sp. | | | |
|-----------------|----------------------|------------------------|------------|------------|------------|
| | | BG11 | BBM | CHU-10 | BEIJERINCK |
| 14:00 | Ac. Mirístico | 0.0 ± 0.0 | 0.4 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 16:00 | Ac. Palmítico | 32.5 ± 0.6 | 64.5 ± 0.8 | 26.3 ± 0.1 | 14.4 ± 0.0 |
| 18:00 | Ac. Esteárico | 3.3 ± 0.0 | 5.5 ± 0.1 | 2.3 ± 0.2 | 0.9 ± 0.0 |
| 16:1n-7 | Ac. Palmitoleico | 0.8 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 0.9 ± 0.0 | 0.6 ± 0.0 |
| 18:1n-7 | Ac. Vaccénico | 1.2 ± 0.0 | 0.7 ± 0.0 | 1.1 ± 0.0 | 1.4 ± 0.0 |
| 18:1n-9 | Ac. Eláidico | 50.8 ± 0.4 | 16.7 ± 0.2 | 35.0 ± 0.1 | 10.3 ± 0.0 |
| 18:2n-6 | Ac. Linoleico | 5.8 ± 0.2 | 4.4 ± 0.1 | 16.3 ± 0.1 | 14.2 ± 0.0 |
| 18:3n-6 | Ac. Alfa Linolenico | 0.6 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.0 | 1.4 ± 0.0 |
| 18:3n-3 | Ac. Omega Linolenico | 3.3 ± 0.3 | 4.0 ± 0.4 | 9.8 ± 0.2 | 28.7 ± 0.0 |
| 18:4n-3 | Ac. Estearidónico | 0.0 ± 0.0 | 0.6 ± 0.1 | 2.3 ± 0.0 | 3.6 ± 0.1 |
| No identificado | | 2.5 ± 0.0 | 3.4 ± 0.0 | 10.9 ± 0.1 | 30.7 ± 0.1 |
| AGS | | 35.8 | 70.5 | 28.6 | 15.3 |
| AGI | | 61.7 | 26.1 | 60.5 | 54 |
| AGMI | | 52.8 | 17.8 | 36.9 | 12.3 |
| AGPI | | 9.8 | 9 | 29.4 | 47.9 |
| AGS - AGMI | | 88.6 | 88.3 | 65.5 | 27.6 |

AGS = Ácidos grasos saturados, AGI = Ácidos grasos insaturados, AGMI = Ácidos grasos monoinsaturado, AGPI = Ácidos grasos poliinsaturados

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

El comportamiento microalgas en cuanto al perfil de crecimiento es diferencial. Por ende, cada especie de microalgal respondió de manera diferente a las condiciones de cultivo. Asimismo, la curva de crecimiento también depende del tiempo de cultivo y la adición de nutrientes al medio. En esta investigación se evidencio que el perfil de crecimiento en *Chlorella sp.* cultivada en medio Bold Basal fue de 0.65×10^6 célula/ml al sexto día de evaluación, del mismo modo que *Scenedesmus sp.* al sexto día (0.58×10^6 célula/ml), mientras que *Ankistrodesmus sp.* obtuvo al tercer día de evaluación con 0.26×10^6 célula/ml respectivamente en el mismo medios de cultivo, comparado con los resultados (47) quienes obtuvieron valores superiores a los 26 millones de células/ml al cultivar *Dunaliella salina* bajo condiciones de salinidad de 35% con agitación continua y empleando el medio de cultivo sintético o conocido como el Medio Johnson (J/1), elaborado con agua destilada más la adición de sales macro y micronutrientes de grado analítico modificado, pero esta productividad en biomasa no fue suficiente para conseguir un elevado contenido de lípidos, lo que si obtuvieron con *Chlorella nativa*, la cual por medio de una alta velocidad de agitación por aireación y un valor de pH inicial de 7.5 lograron inducir un factor de estrés en su crecimiento, lo que se tradujo en una mayor producción de lípidos.

Sin embargo, la composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo: su nutrición, multiplicación, la producción de metabolitos primarios y secundarios (48). Por lo que en medio de cultivo Bold Basal se observó una mayor tasa de crecimiento con respecto a los demás medios, esto probablemente se debe a que el

medio Bold Basal contiene 4 tipos de micronutrientes y vitaminas a diferencia de los demás medios de cultivo que presentan 2 y 3 micronutrientes y no tienen vitaminas en su composición. Estudios realizados por (48), indicaron que el perfil de crecimiento y producción de lípidos de las microalgas puede ser alterado sustancialmente por la manipulación de las condiciones abióticas en el cultivo tales como intensidad de luz, fotoperiodo o temperatura.

También, en esta investigación el mayor porcentaje de lípidos totales se reportó con la especie *Ankistrodesmus* sp, cuando fueron cultivadas en medio BG11 y Bold Basal con 21.58 y 21.03 % respectivamente, Paredes (49) reporta para esta especie un porcentaje de 20.81 % cultivadas en medio CHU10. Sin embargo, la especie *Scenedesmus* sp. obtuvo el menor porcentaje de lípidos totales en los dos medios ya mencionados con 5.7 y 5.75 %. En cuanto a la productividad de biomasa se reporta un comportamiento contradictorio con respecto a la acumulación de lípidos totales, ya que la especie que evidenció el mayor porcentaje de lípidos obtuvo menor productividad de biomasa tanto en BG11 y Bold Basal (0.23 y 0.07 gL⁻¹ d⁻¹). Asimismo, la especie *Chlorella* sp. mostró la mayor productividad de biomasa 2.25 gL⁻¹ d⁻¹ y un porcentaje de lípidos de 13.99 %.

Sin embargo, estudio realizado por Barcia (50) refieren que *Scenedesmus* sp. obtuvieron el mayor porcentaje de lípidos totales en el medio Bold Basal con 25 % y *Ankistrodesmus* sp, en medio BG11 con 19.5 %. Paredes (49), reportó para *Scenedesmus* sp. la mayor producción de biomasa con 155,7 mg/L y un porcentaje de mayor de lípidos en *Ankistrodesmus nannosele* cultivadas en medio CHU10. Otros estudios realizados como el que refiere Thompson (44) reportan que *Chlorella vulgaris* presentó mayores productividades y rendimientos lipídicos al utilizar medios de cultivo con diferentes concentraciones de nitrógeno, evidenciándose que al someter a las

microalgas a condiciones adversas, éstas alteran su metabolismo lipídico, dándose este caso en la presente investigación.

Actualmente, 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 palmitoléico (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 (12). En este sentido, en esta investigación, las tres especies de microalgas evaluadas presentaron ácidos grasos saturados (desde 15 a 74%), ácidos grasos monoinsaturados (de 12 a 52%) y poliinsaturados (desde 5 a 49%).

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. Resultados similares fueron reportados por(17) 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(19), mientras que el contenido de ácido eicosapentanoico se incrementó en un medio rico solo en nitrógeno(20).

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 (21).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- ✓ Las tres especies de microalgas mostraron la mayor densidad celular al sexto día en el perfil de crecimiento cuando fueron cultivadas en medio Bold Basal.

- ✓ La microalga que obtuvo mayor porcentaje de lípidos totales fue *Ankistrodesmus* sp, cultivada en medio BG11 y Bold Basal y la especie que obtuvo la mayor productividad de biomasa fue *Chlorella* sp. cultivada en medio CHU 10.

- ✓ En general, las tres especies de microalgas evaluadas presentaron ácidos grasos saturados (desde 15 a 74%), ácidos grasos monoinsaturados (de 12 a 52%) y poliinsaturados (desde 5 a 49%).

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

Se sugiere que se realicen estudios complementarios a esta investigación, de tal forma que en el futuro se puedan identificar los ácidos grasos desconocidos que fueron reportados, utilizando para ello nuevos estándares que permitan analizar un perfil completo de ácidos grasos en microalgas de agua dulce. Asimismo, asegurarse que los cultivos a utilizar sean axénicos para realizar el análisis de ácidos grasos de las microalgas.

Y finalmente, aplicar las normas de bioseguridad que se requiere para realizar ensayos experimentales en laboratorio.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ Convers Manage.* 2009;50 (1):14-34.
2. Behzadi. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. *J Chem Eng.* 2007;2(5):480-6.
3. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* junio de 2007;25(3):294-306.
4. Markou. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. 2011.
5. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 2011;26(3):126-31.
6. Cohen. Products from microalgae. En: Richmond, A (Ed) *Handbook of microalgal mass culture.* CRC Press Boca Raton Fla P. 1986;421-54.
7. Hu. Microalgal triacyl-glycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008;54:621-39.
8. Singh A. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresour Technol.* 2011;10(1):26-34.
9. Demirbas A. Energy Sources Part A. *Recovery Util Environ Eff.* 2010;32(10):909:910.
10. Albarracín I. La reducción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. *XV Simp Electrónico Int.* 2007;1-16.
11. Li Q. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80.:749-56.
12. Demirbas A. Energy Sources Part A. *Recovery Util Environ Eff.* 2010;32(10):909:910.
13. Chisti Y.) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007;25:294-306.
14. Rodolfi L. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(1):100-12.
15. Garibay-Hernández A. Biodiesel a partir de Microalgas. *Soc Mex Biotechnol Bioingeniería.* 2009;13:38-61.
16. Rodolfi L. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(1):100-12.

17. Courchesne NMD, Parisien A, Wang B, Lan CQ. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol.* (20 de abril de 2009);141(1–2):31-41.
18. Takagi M. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54(1):112-7.
19. Isleten M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem Eng J.* 2012;61:11-9.
20. Takagi M. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cell. *J Biosci Bioeng.* 2006;101(3):223-6.
21. Metz J. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science.* 2001;293(5528):291-3.
22. Xin. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol.* 2010;101:5494-500.
23. Chen. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol.* 2011;102:71-81.
24. Fabregas J. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture.* 1996;43:197-204.
25. Brown. Nutritional Aspects of Microalgae Used in Mariculture: a Literature Review. *Csiro Mar Lab Rep 205* Csiro Hobart Tasman. :43.
26. Tzovenis. Optimisation of T-Iso biomass production rich in essential fatty acids. I Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture.* 2003;216:203-22.
27. Greenwell. . Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J Roy Soc.* 2009;10:703-26.
28. Huang. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy.* 2010;87(1):38-46.
29. Amaro. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy.* 2011;88(10):3402-10.
30. Pérez-García. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 2011;45(1):11-36.
31. Brennan. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ.* 2010;14(2):557-77.

32. Mutanda. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol.* 2010;
33. Khan. Chemical Constituents of *Carissa opaca* Extracts and their evaluation as antioxidant and preservative in edible oils. *Asian J Chem.* 22(1):379-88.
34. Hecky. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol Oceanogr* 33 4 Part 2 Comp Ecol Freshw Mar Ecosyst. 1988;796-822.
35. Le Rouzic. Phytoplankton community growth in enrichment bioassays: possible role of the nutrient intracellular pools. *Acta Ecológica.* 1997;18(2):121-33.
36. Baumgarte E. Reduction of the nitrogen and carbón content in swine waste with algae and bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;52:281-4.
37. sigee dc. 2005.freshwater. *Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. (John Wiley and Sons: Chichester, UK)
38. Paniagua J. cultivo en condiciones controladas de *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con extractos de macrofitas marina (fitoplancton). *Inst Cien Mary Limnol Univ Nal Auton Mex.* 1985;12(1):59-70.
39. Badui S. *Química de los alimentos.* 3ª ed.). México D.F : Person; 1993
40. Hernández A. Metabolismo y actividad biológica de los ácidos grasos omega -3. *Nutr Dietética Hosp.* 2004;24(24):49-54.
41. Hu. Microalgaltriacylgly.2008 triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J ;*54(4):621-39.
42. Borowitzka M.A. Fats, Oils and Hydrocarbons. *Micro-Algal Biotechnology.* Camb Univ Press CambidgeUK. 1988;257-87.
43. Arredondo. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Cienc Desarro.* 1991;17:99-111.
44. Thompson. . Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1302:17-45.
45. Yu X. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2012;121:256-2.
46. Metzger P. y Largeau. . C. *Botryococcusbraunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;66:486-961.
47. Liu ZY. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol.* 2008;99(11):4717-22.

48. Leonardos L, Lucas I. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture* 2000; 182: 301-315.
49. Sato, N.; Hagi, M.; Wada, H; Tsuzuki, A.M. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 2000, 28, 912-914.
50. Paredes D, Impacto de la Eliminación de Nitrógeno en la Acumulación de Lípidos Totales en Cinco Especies de Microalgas Oleaginosas Amazónicas. Tesis de pregrado. Universidad Científica del Perú. 2014
51. Barcia E, (2014) efecto de tres medios de cultivo en la producción de biomasa y el contenido de lípidos totales en microalgas amazónicas: Tesis de pregrado. Universidad Científica del Perú. 2014.

ANEXOS



Figura 6. Flujograma del procedimiento experimental de tres especies de microalgas amazónicas (*Chlorella* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Scenedesmus* sp.).



Figura 7. Cepas y cultivo microalgal en matraz de 250ml.



Figura 8. Alicuota 0.50 mg. Lectura diaria en el Nanodrop.



Figura 9. Sellando el matraz y trasladandolo al sistema de aireacion.



Figura 10. Incorporación de biomasa a cada medio de cultivo (Bold Basal, BG11, CHU N° 10, y Beijerinck).

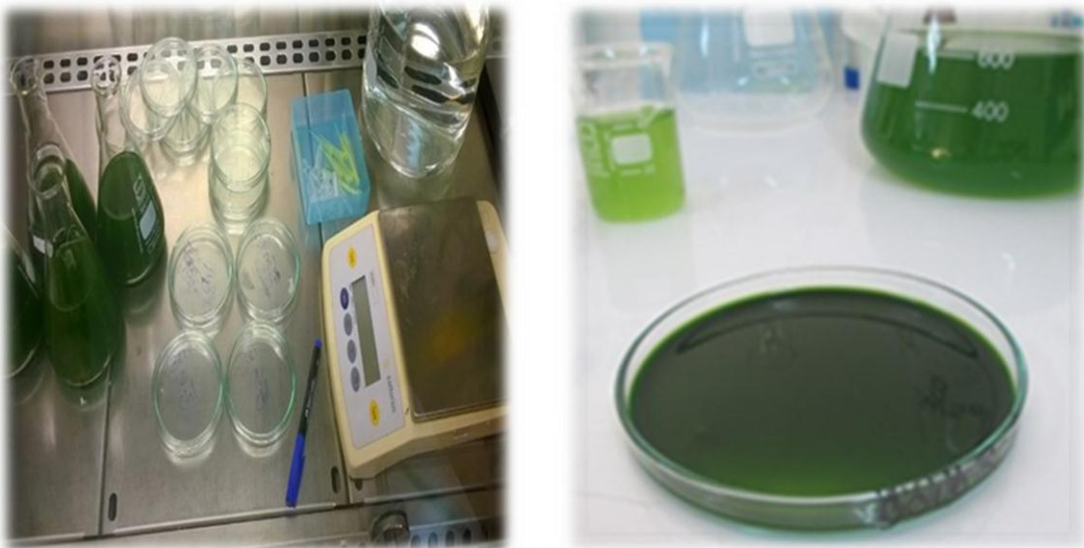


Figura 11. Peso y centrifugación para la obtención de biomasa.



Figura 12. Cosecha de biomasa microalgal y adición en placas.



Figura 13. Raspado de biomasa de las tres especies.

Medios de Cultivos:

Beijerinck (pH 6.8): Se compone de 3 soluciones stock de macronutrientes y una de micronutrientes. Soluciones stock de macronutrientes

Tabla 7. Solución stock de macronutrientes del medio de cultivo Beijerinck.

| Tipo | Cantidad |
|---|---------------|
| Micronutrientes | (para 1 ml/l) |
| BO ₃ H ₃ | 1 g/l |
| SO ₄ Cu.5H ₂ O | 0,15 g/l |
| EDTA.Na ₂ | 5 g/l |
| SO ₄ Zn.7 H ₂ O | 2,2 g/l |
| Cl ₂ Mn.4 H ₂ O | 0,15 g/l |
| Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ .H ₂ O | 0,10 g/l |

Los micronutrientes se disuelven uno por uno en 100 ml de agua tibia, luego el pH se ajusta a 5 con KOH granulado. La solución final debe tener un pH 6,5. El hierro precipita en pH 7

Tabla 8. Solución stock de micronutrientes del medio de cultivo Beijerinck.

| Tipo | Cantidad |
|---------------------------------------|----------------|
| Stock I | (para 60 ml/l) |
| NO ₃ Na | 10 g/400 ml |
| Cl ₂ Ca. 2H ₂ O | 8 g/400 ml |
| SO ₄ Mg. /H ₂ O | 3 g/400 ml |
| PO ₄ H ₂ K | 3g /400 ml |
| PO ₄ H ₂ K | 7 g /400 ml |
| ClNa | 1 g/400 ml |

Bold Basal (pH 6,6) o solución Bristol: Se compone de 1 solución stock de macronutrientes y 4 de micronutriente. Solución stock de macronutrientes

Tabla 9. Solución stock de micronutrientes del medio de cultivo **Bold Basal (pH 6,6) o solución Bristol.**

| Tipo | Cantidad |
|--|---------------|
| EDTA Na ₂ | (para 1 ml/l) |
| EDTA Na ₂ | 50 g/ 1 |
| KOH | 31 g/l |
| HIERRO | (para 1 ml/l) |
| SO ₄ Fe.7H ₂ O | 4,98 g/l |
| SO ₄ H ₂ | 1 g/l |
| Br | (para 1 ml/l) |
| BO ₃ H ₃ | 11,42 g/l |
| Trazas | |
| SO ₄ Zn.7 H ₂ O | 8,8 g/l |
| Cl ₂ Mn.4 H ₂ O | 1,44 g/l |
| Mo O ₃ | 0,71 g/l |
| SO ₄ Cu. 5H ₂ O | 1,57 g/l |
| (NO ₃) ₂ Co. 6 H ₂ O | 0,49 g/l |

MEDIO BG 11:**Tabla 10.** Stock de soluciones del medio de cultivoBG-11:

| | |
|--|--------------|
| Stock 1: | |
| $\text{Na}_2\text{MG EDTA}$ | 0.1g/litro |
| Citrato Férrico de Amonio | 0.6g/litro |
| Ácido Cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$ | 0.6g/litro |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 3.6g/litro |
| En un matraz estilizar en la autoclave | |
| <u>Stock 2:</u> | |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 7.5g/litro |
| En un matraz estilizar en la autoclave | |
| <u>Stock 3:</u> | |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | 4.0g/litro |
| OK_2HPO_4 | 3.05g/litro |
| En un matraz estilizar en la autoclave | |
| <u>Stock 5 (Microelementos):</u> | |
| H_3BO_3 | 2.86g/litro |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.81g/litro |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.222g/litro |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.079g/litro |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.050g/litro |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.391g/litro |
| $\text{OMoO}_4 (85\%)$ | 0.018g/litro |

Tabla 11. Composición del medio BG11

| Stock Solución | Para un litro de medio |
|---------------------------------|------------------------|
| Stock 1 | 10 ml |
| Stock 2 | 10 ml |
| Stock 3 | 10 ml |
| Na ₂ CO ₃ | 0.02g |
| Stock 5 | 1.0 ml |
| NaNO ₃ | 1.5g |
