

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**



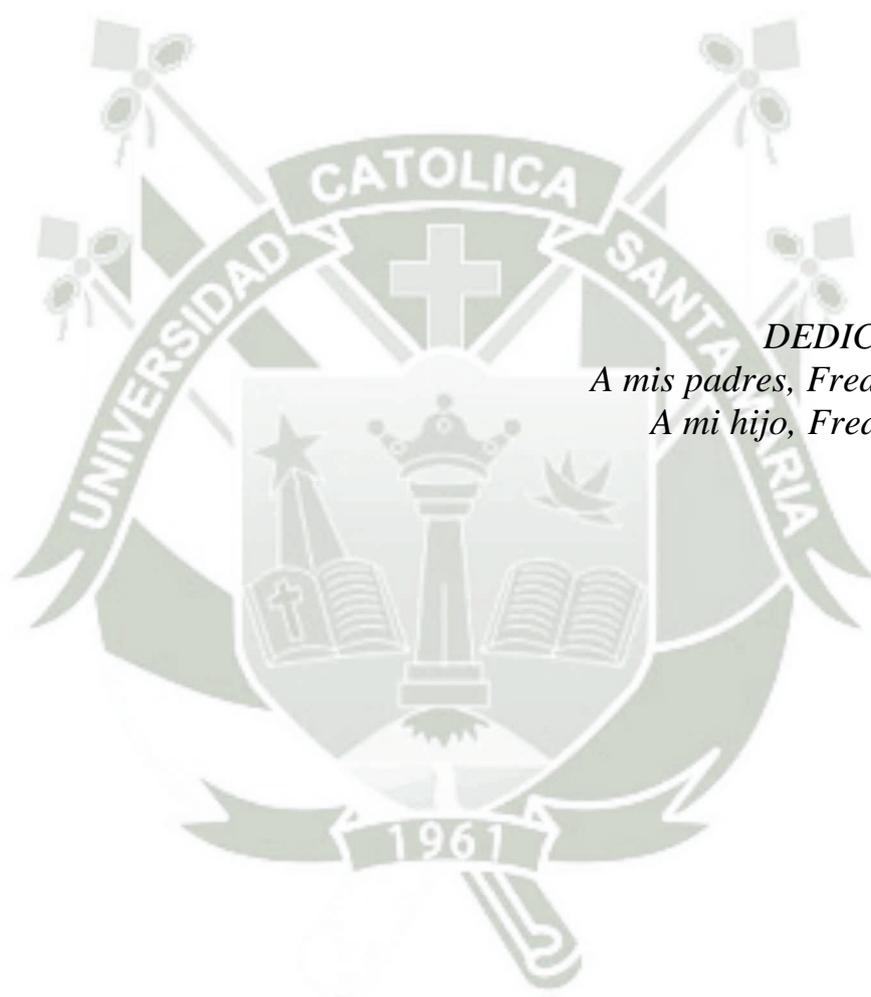
**“EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO (AG3) Y TIPO DE  
FOTOBIORREACTOR (TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN  
AIR-LIFT) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  $\beta$ -CAROTENO  
UTILIZANDO *Dunaliella salina*.”**

*Tesis presentada por la bachiller:  
Mónica Meylín Yugra Condori*

*Para optar el Título Profesional  
de:  
Ingeniero Biotecnólogo*

*Asesor:  
Ing. Javier Roque Rodríguez*

**AREQUIPA – 2016**



*DEDICATORIA:  
A mis padres, Fredy y Nelly.  
A mi hijo, Fredy Matías.*

**AGRADECIMIENTOS:**

*Gracias a Dios y a la Santísima. Virgen de Copacabana por bendecir mi camino; a mis padres, quienes me apoyaron y alentaron para culminar satisfactoriamente; y a Fredy Matías por su paciencia y comprensión.*



## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIACIONES .....  | vii       |
| RESUMEN .....   | ix        |
| ABSTRACT .....  | xi        |
| <b>CAPÍTULO I.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>  |
| OBJETIVOS .....   | 4         |
| HIPÓTESIS .....   | 4         |
| VARIABLES.....  | 5         |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>MARCO TEÓRICO .....</b>  | <b>7</b>  |
| 2.1. Biología de <i>Dunaliella salina</i> (Teodoresco, 1905).....   | 7         |
| 2.2. Requerimientos para el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> .....   | 11        |
| 2.3. El $\beta$ -caroteno .....   | 14        |
| 2.4. Bioquímica y biosíntesis del $\beta$ -caroteno en microalgas.....  | 17        |
| 2.5. Biotecnología de <i>Dunaliella Salina</i> .....  | 20        |
| 2.6. Factores que estimulan la acumulación de carotenoides. ....  | 27        |
| 2.7. Sistemas de Cultivo .....  | 34        |
| 2.8. Aspectos claves en el diseño de un FBR.....  | 43        |
| 2.9. Recomendaciones para el diseño de un FBR .....   | 46        |
| 2.10. Producción de compuestos de alto valor agregado.....  | 47        |
| 2.11. Perspectivas .....  | 50        |
| <b>CAPÍTULO III.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>52</b> |
| 3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....   | 52        |
| 3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN.....  | 52        |
| 3.3. MATERIALES .....   | 52        |
| 3.4. MÉTODOS.....   | 54        |
| 3.4.1. Obtención de muestras de <i>Dunaliella salina</i> .....  | 54        |
| 3.4.2. Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> para la obtención de biomasa como inóculo.....   | 54        |
| 3.4.3. Construcción del fotobiorreactor tubular y panel con aireación air lift, para el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> .....   | 55        |
| 3.4.4. Evaluación del crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> bajo condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift previa a la fase de inducción de $\beta$ -caroteno.....                      | 58        |
| 3.4.5. Determinación de la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3. .... | 60        |
| 3.4.6. Análisis y procesamiento de datos .....  | 62        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5. Flujograma de actividades.....  | 63         |
| <b>CAPÍTULO IV .....</b>   | <b>64</b>  |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>64</b>  |
| 4.1. CULTIVO Y ADAPTACIÓN DE <i>Dunaliella salina</i> EN CONDICIONES CONTROLADAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA COMO INÓCULO. ....   | 64         |
| 4.2. MONTAJE Y OPERACIÓN DE LOS FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, PARA EL CULTIVO DE <i>Dunaliella salina</i> .....  | 66         |
| 4.3. EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Dunaliella salina</i> BAJO CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT.....  | 68         |
| 4.4. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES TOTALES DEL CULTIVO DE <i>Dunaliella salina</i> EN CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, PREVIA A LA FASE DE INDUCCIÓN DE $\beta$ -CAROTENO..... | 70         |
| 4.5. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $\beta$ -CAROTENO DEL CULTIVO DE <i>Dunaliella salina</i> EN CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, EN LA FASE DE INDUCCIÓN CON AG3.....                                   | 77         |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>116</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

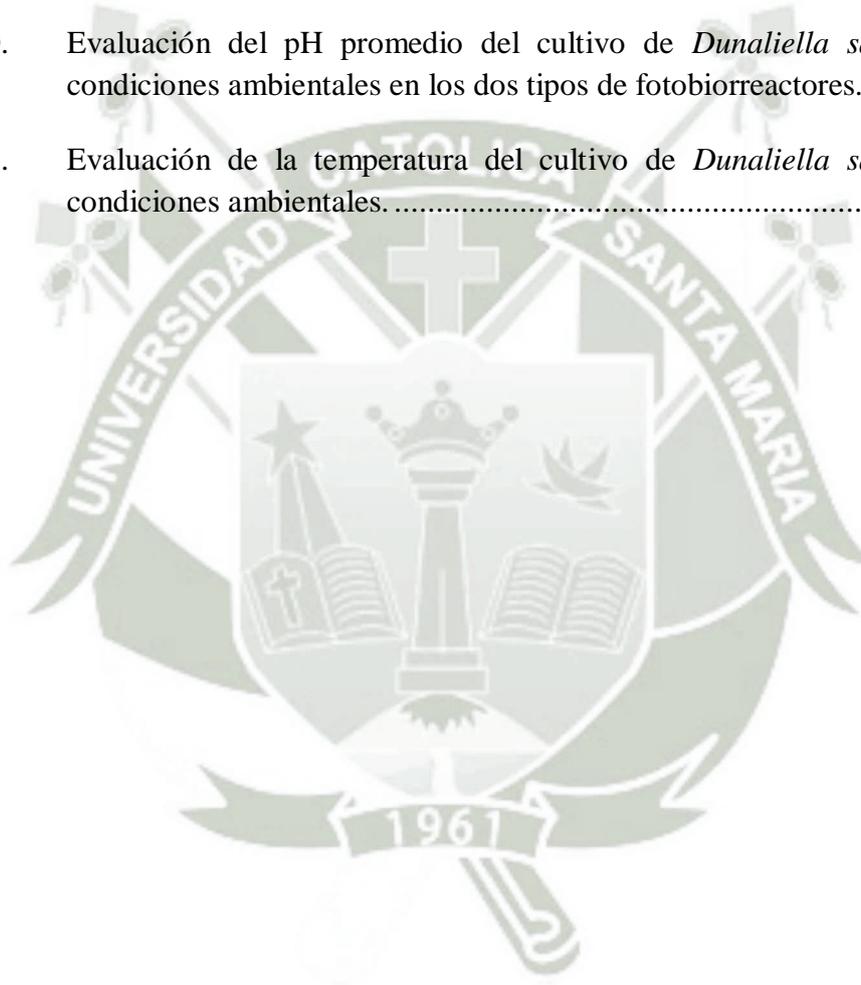
|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabla 1. | Descripción de Variables Independientes y Dependientes .....  | 5  |
| Tabla 2. | Aplicaciones propuestas para especies de <i>Dunaliella</i> por diferentes autores.....  | 49 |
| Tabla 3. | Comparación de la concentración de clorofila y carotenoides totales en el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de $\beta$ -caroteno..... | 71 |
| Tabla 4. | Determinación de la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.....                                   | 79 |
| Tabla 5. | Comparación de la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.....                                     | 80 |
| Tabla 6. | Determinación de la productividad de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.....                                   | 84 |
| Tabla 7. | Comparación de la productividad de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air lift, en la fase de inducción con AG3.....                                     | 85 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1.  | Estructura de <i>Dunaliella salina</i> . A) Célula vegetativa con sus componentes celulares; B) Zoosporas en división celular; C) Fusión de gametos; D) Zigospora madura; E) Zigospora en germinación. (Modificado de Ben-Amotz y Avron, 1987)..... | 8  |
| Figura 2.  | Diagrama del mecanismo celular de respuesta por <i>Dunaliella salina</i> frente al estrés abiótico como deficiencia de nutrientes, alta salinidad e iluminación (Raman et al., 2011).....   | 11 |
| Figura 3.  | A) Estructura de $\beta$ -caroteno; B) Biosíntesis de $\beta$ -caroteno en <i>Dunaliella salina</i> (Li y Li, 2008)).....   | 20 |
| Figura 4.  | Diferentes estados de <i>Dunaliella salina</i> . A) En estado verde en fase móvil, B) Inicio de la formación de $\beta$ -caroteno. C) Quistes conteniendo $\beta$ -caroteno. D) Planta de cultivo en Australia (Ami Ben-Amotz et al., 2009).....    | 21 |
| Figura 5.  | Numerosas cepas de <i>D. salina</i> aisladas de diversos hábitats marinos, como lagos salobres, marismas y lagunas salinas artificiales alrededor del mundo (Preetha et al., 2012).....   | 24 |
| Figura 6.  | Estructura básica de los AGs, están constituidas por un anillo giberelano, algunos de los cuales poseen actividad hormonal (AG3) (Talón, 2000).....   | 34 |
| Figura 7.  | Fotobiorreactor tipo panel (Fuente: Ami Ben-Amotz et al., 2009).....  | 37 |
| Figura 8.  | Fotobiorreactor tubular. (Fuente: Ami Ben-Amotz et al., 2009).....  | 38 |
| Figura 9.  | Sistema abierto de cultivo que muestra una estanque con rueda de paletas (Ami Ben-Amotz et al., 2009). ....   | 41 |
| Figura 10. | Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos luz oscuridad (Contreras-Flores y col., 2003) .....   | 44 |
| Figura 11. | Esquema del fotobiorreactor tubular que muestra la adición de un mezclador (placa con poros). ....  | 56 |
| Figura 12. | Esquema de fotobiorreactor tipo panel air-lift que muestra separadores horizontales (deflectores) para mejorar la circulación. ....   | 57 |
| Figura 13. | Cultivo y adaptación de <i>Dunaliella salina</i> en condiciones controladas para la obtención de biomasa como inóculo. A) implementación de la cámara de cultivo. B) Cámara de cultivo antes del inicio de cultivo. C) Inóculo de                   |    |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | <i>Dunaliella salina</i> . D) Escalamiento de 1 L del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> . .....   | 65 |
| Figura 14. | Partes de fotobiorreactor tubular y burbujas creadas por la placa porosa. ....  | 66 |
| Figura 15. | A) Partes del fotobiorreactor tipo panel con circuito y dirección del flujo a través de las divisiones horizontales y verticales. ....  | 67 |
| Figura 16. | Crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift. ....  | 69 |
| Figura 17. | Concentración de clorofila a y b en el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de $\beta$ -caroteno. ....   | 72 |
| Figura 18. | Concentración de clorofila total y carotenoides totales en el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de $\beta$ -caroteno. ....                            | 73 |
| Figura 19. | Evaluación del pH del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> según condiciones de laboratorio. ....  | 75 |
| Figura 20. | Evaluación de la temperatura del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> según condiciones de laboratorio en los dos tipos de fotobiorreactores. ....   | 76 |
| Figura 21. | Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en fotobiorreactor tubular a condiciones ambientales para la inducción de la producción de $\beta$ -caroteno mediante AG3. A) Antes del proceso de inducción. B, C y D) Después del proceso de inducción a diferentes concentraciones de AG3. ....  | 77 |
| Figura 22. | Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> en fotobiorreactor tipo panel a condiciones ambientales para la inducción de producción de $\beta$ -caroteno mediante AG3. A) Antes del proceso de inducción. B, C y D). Después del proceso de inducción a diferentes concentraciones de AG3. .... | 78 |
| Figura 23. | $\beta$ -caroteno extraído del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> obtenida de los dos tipos de fotobiorreactores (tubular y panel) a diferentes concentraciones de AG3. ....   | 78 |
| Figura 24. | Comparación de la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift. ....  | 81 |
| Figura 25. | Comparación de la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según concentraciones de AG3. ....   | 82 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 26. | Interacción de la concentración de AG3 y el tipo de fotobiorreactor en la concentración de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> . ....                        | 83 |
| Figura 27. | Comparación de la productividad de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air lift. .... | 86 |
| Figura 28. | Comparación de la productividad de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> , según concentraciones de AG3.....   | 87 |
| Figura 29. | Interacción de AG3 y el tipo de fotobiorreactor en la productividad de $\beta$ -caroteno del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> .....   | 88 |
| Figura 30. | Evaluación del pH promedio del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> según condiciones ambientales en los dos tipos de fotobiorreactores. ....                                       | 89 |
| Figura 31. | Evaluación de la temperatura del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> según condiciones ambientales.....  | 90 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AG3:** Ácido giberélico

**a:** Ancho del fotobiorreactor tipo panel (m)

**A<sub>sp</sub>:** Área superficial iluminada del fotobiorreactor tipo panel (m<sup>2</sup>)

**A<sub>st</sub>:** Área superficie iluminada fotobiorreactor tubular (m<sup>2</sup>)

**B *D. salina*:** Biomasa de *Dunaliella salina*

**C<sub>β-carot</sub>:** Concentración de β-caroteno

**C<sub>AG3</sub>:** Concentración de AG3

**C<sub>2</sub>:** Concentración celular final (organismos.mL<sup>-1</sup>)

**C<sub>1</sub>:** Concentración celular inicial (organismos.mL<sup>-1</sup>)

**Chl a:** Clorofila a

**Chl b:** Clorofila b

**Chl total:** Clorofila total

***D. salina:*** *Dunaliella salina*

**FBR:** Fotobiorreactor

**FBRP:** Fotobiorreactor tipo panel

**FBRT:** Fotobiorreactor tipo tubular

**h<sub>p</sub>:** Altura del fotobiorreactor tipo panel (m)

**h<sub>t</sub>:** Altura del fotobiorreactor tubular (m)

**L/O:** Luz y oscuridad

**MJ:** Jasmonato de metilo

**MVA:** Mevalonato

**Pr:** Productividad g L<sup>-1</sup> .día<sup>-1</sup>.

**Pr<sub>β-carot</sub>:** Producción de β-caroteno

**PDS:** Fitoeno desaturasa

**PSY:** Fitoeno sintasa

**r:** Radio del fotobiorreactor tubular(m)

**SA:** Ácido acetil salicílico

**$\mu$ :** Tasa de crecimiento específico de las células (día<sup>-1</sup>)

**t:** Tiempo requerido para el aumento de la concentración de C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> (días)

**t<sub>c</sub>:** Tiempo en días de la fase de carotenogénesis.

**Y:** Producción en g.L<sup>-1</sup>.



## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la concentración del ácido giberélico (20 y 40 mg.L<sup>-1</sup>) y el tipo de fotobiorreactor (tubular y de tipo panel con aireación air-lift) sobre la producción de  $\beta$ -caroteno por la microalga *Dunaliella salina*.

El  $\beta$ -caroteno es la principal fuente de vitamina A, ayuda a desarrollar el sistema inmunológico, y la visión; además tiene propiedades antioxidantes que pueden neutralizar los radicales libres que dañan a las células.

El cultivo de *Dunaliella salina* se realizó en fotobiorreactores tubulares y de tipo panel por triplicado, el medio de cultivo utilizado fue Guillard suplementado con agua de mar.

La investigación se realizó en dos fase; en la primera fase se evaluó el crecimiento de la microalga en condiciones de laboratorio por 29 días mediante el recuento celular, también se determinó espectrofotométricamente el contenido de clorofila a, b, total y carotenoides; cuyas condiciones fueron 26 °C y fotoperiodos largos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; mientras que la segunda fase tuvo una duración de 14 días, se indujo la síntesis de  $\beta$ -caroteno añadiendo AG3 al cultivo y se evaluó espectrofotométricamente la concentración y productividad de  $\beta$ -caroteno en condiciones ambientales de la ciudad de Arequipa.

Los resultados mostraron mayor crecimiento en biomasa de *Dunaliella salina* en el cultivo realizado en el fotobiorreactor tipo panel, obteniéndose un crecimiento final de  $3,85 \cdot 10^6$  organismos.mL<sup>-1</sup> en comparación al fotobiorreactor tubular con  $2,80 \cdot 10^6$  organismos.mL<sup>-1</sup> hasta los 29 días de evaluación. Mientras que la mayor productividad

de  $\beta$ -caroteno promedio en el cultivo de *Dunaliella salina*, se presentó con la interacción de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor tipo panel con un promedio de  $7,05 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno, seguido de la interacción de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor tipo tubular con la interacción de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG3 se obtuvo  $5,43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno promedio.

Por lo que se concluye que la inducción de AG3 en el medio de cultivo de *Dunaliella salina* realizada en fotobiorreactor tipo panel presenta una aplicación potencial para la producción de  $\beta$ -caroteno.

**Palabras clave:** Ácido giberélico, AG3, fotobiorreactor, *Dunaliella salina*,  $\beta$ -caroteno.



## ABSTRACT

In this research, the concentration effect of gibberellic acid (20 and 40 mg.L<sup>-1</sup>) and photobioreactor type (tubular and panel with air-lift aeration) was assessed to the production of  $\beta$ -carotene by the microalgae *Dunaliella salina*.

$\beta$ -carotene is the main source of vitamin A, it helps develop the immune system, and vision; also it has antioxidant properties that can neutralize free radicals which damage cells.

*Dunaliella salina* cultivation was performed in tubular and panel photobioreactors by triplicate, medium used for cultivation was Guillard supplemented with seawater.

The research was conducted in two phases; in the first phase the growth of microalgae was evaluated under laboratory conditions for 29 days by cell count, also the content of chlorophyll a, b, total and carotenoid was determined spectrophotometrically; whose conditions were 26 °C and long photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness; while the second phase lasted 14 days, the synthesis of  $\beta$ -carotene was induced by adding GA3 to cultivate, concentration and productivity of  $\beta$ -carotene was evaluated spectrophotometrically in environmental conditions of Arequipa city.

The results showed higher growth in biomass of *Dunaliella salina* performed in panel photobioreactor, resulting in a final growth of 3,85·10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> compared to the tubular photobioreactor with 2,80·10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> up to 29 days of evaluation. While the increased productivity of  $\beta$ -carotene average in the cultivation of *Dunaliella salina*, was presented with the interaction of 20 mg.L<sup>-1</sup> of GA3 and under conditions of panel photobioreactor with 7,05 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> of  $\beta$ -carotene average, followed by the interaction of 40 mg.L<sup>-1</sup> of GA3 and under conditions with tubular photobioreactor with the interaction of 20 mg.L<sup>-1</sup> of GA3 in cultivate was 5,43 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> of  $\beta$ -carotene average.

So it is concluded that the induction of GA3 in the *Dunaliella salina* growth in panel photobioreactor presents a potential application for the production of  $\beta$ -carotene.

**Keywords:** Gibberellic acid, GA3, photobioreactor, *Dunaliella salina*,  $\beta$ -carotene.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El pigmento  $\beta$ -caroteno es un compuesto de alto valor económico y es conocido como pro-vitamina A y además de ser un nutriente esencial saludable se usa como un agente colorante de alimentos naturales y como aditivo para cosméticos. El  $\beta$ -caroteno es un compuesto lipofílico de alta demanda en el mercado, también tiene diversos efectos fisiológicos importantes, como eliminador de radicales peróxido (Burton y Ingold, 1984), estimulante de la respuesta inmune, (Williams et al., 2000), potenciador de las uniones celulares tipo GAP (Stahl y Sies, 1997), agente anti-tumoral (Leach et al., 1998) y de prevención contra enfermedades del corazón.

Una gran parte del mercado disponible en  $\beta$ -caroteno se sintetiza químicamente, sin embargo, no ha habido un interés considerable en la producción de  $\beta$ -caroteno natural a partir de organismos vivos que poseen biodisponibilidad superior, como capacidad antioxidante y los efectos fisiológicos sobre su contraparte sintética. La microalga *Dunaliella salina* es la fuente principal de  $\beta$ -caroteno natural. Esta microalga puede producir y acumular  $\beta$ -caroteno en condiciones de estrés; tales como alta intensidad de luz, alta salinidad y deficiencia de nutrientes. Es por eso que el interés central de los productores e investigadores recae sobre la gran cantidad de  $\beta$ -caroteno que acumulan estas células en condiciones de estrés y la manera de optimizar su producción. *Dunaliella salina* es un alga marina unicelular, que se ha cultivado intensamente en los últimos años como una fuente comercial de  $\beta$ -caroteno natural (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Ben Amotz y Avron, 1990; Ben-Amotz, 1993).

El alga verde unicelular *Dunaliella salina* produce una alta cantidad de  $\beta$ -caroteno cuando se expone a estrés abiótico y esta acumulación ha demostrado ser un

mecanismo para hacer frente a condiciones ambientales adversas (Jin et al., 2006; Li et al., 2008).

Hay evidencias que indican que el jasmonato de metilo (MJ) juega un papel clave en la regulación del estrés abiótico inducida por expresión de genes en plantas superiores (Schaller, 2001). También se ha informado que la hormona vegetal denominada AG3, desempeña un papel en la respuesta de estrés en plantas (Navarro et al., 2008). Sin embargo hay pocas investigaciones sobre los efectos de AG3 en la respuesta al estrés para la producción de carotenoides en microalgas (Czerpak et al., 2006).

Las plantas superiores y algas verdes comparten la misma ruta biosintética para  $\beta$ -caroteno (Cunningham y Gantt, 1998). Por lo tanto es posible que las vías de señalización mediada por AG3 sobre las enzimas  $\beta$ -caroteno hidroxilasa y  $\beta$ -caroteno cetolasa (Linden, 1999) están involucradas en la acumulación de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina*.

Los sistemas de cultivo abiertos como estanques presentan baja eficiencia en la productividad debido a la incapacidad de control de los factores ambientales como la temperatura, intensidad de la luz y fácil contaminación del cultivo (Borowitzka, 1992; Chaumont, 1993). Todas estas desventajas conducen a una baja productividad debido a la incapacidad de controlar los factores ambientales.

Para esto es necesario desarrollar métodos de cultivo alternativos, como fotobiorreactores cerrados; que permitan mayor rendimiento del cultivo y bajo costo de fabricación para el cultivo a gran escala. Para hacer más rentable la producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* se deben buscar nuevos enfoques hacia la mejora de su rendimiento y productividad a través de la optimización de los medios y las condiciones de crecimiento. Al respecto, de esto el AG3 se ha destacado como un inductor de estrés en las plantas que podría ser potencialmente valioso para intensificar la producción de  $\beta$ -caroteno en microalgas. Es por lo anteriormente mencionado que el presente estudio de investigación toma

importancia, ya que plantea evaluar el efecto del estrés que ocasionaría las concentraciones del ácido giberélico (AG3) y dos tipos de fotobiorreactor (tubular y panel con aireación air-lift), sobre la producción de  $\beta$ -caroteno en la microalga *Dunaliella salina*.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del ácido giberélico (AG3) y el tipo de fotobiorreactor tubular y panel con aireación air-lift, sobre la producción de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar y adaptar *Dunaliella salina* en condiciones controladas para la obtención de biomasa como inóculo.
- Diseñar y construir fotobiorreactores tipo tubular y de panel con aireación air-lift.
- Evaluar y comparar el crecimiento de *Dunaliella salina* bajo condiciones de laboratorio en fotobiorreactor tubular y panel con aireación air-lift.
- Determinar y comparar la concentración de clorofila y carotenoides del cultivo de *Dunaliella Salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de  $\beta$ -caroteno.
- Determinar y comparar la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella Salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.

## HIPÓTESIS

Es probable que la aplicación de ácido giberélico y los tipos de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, puedan inducir mayor estrés en el cultivo de *Dunaliella salina* conduciendo a una mayor producción de  $\beta$ -caroteno.

## VARIABLES

La siguiente tabla muestra las variables e indicadores que se evaluaron en la presente investigación:

**Tabla 1. Descripción de Variables Independientes y Dependientes**

| <i>Variables independientes</i>                             | <i>Indicadores</i>   | <i>Categorías/Unidad</i>  | <i>Tipo de variable/escala</i>     |
|---|--|---|------------------------------------|
| -Concentración de AG3 ( $C_{AG3}$ )                         | $C_{AG3}$ en el cultivo de <i>Dunaliella salina</i> ,  | Control<br>- 20 mg.L <sup>-1</sup><br>- 40 mg.L <sup>-1</sup> . | Cuantitativa<br>Continua/<br>Razón |
| - Tipo de fotobiorreactor (FBR)                             | Fotobiorreactor tubular (FBRT)<br>Fotobiorreactor tipo panel (FBRP)  | - FBRT<br>- FBRP.   | Cualitativa/<br>Nominal            |
| <i>Variables dependientes</i>                               | <i>Indicadores</i>   | <i>Categorías/Unidad</i>  | <i>Tipo de variable/escala</i>     |
| - Biomasa de <i>Dunaliella salina</i> (B <i>D. salina</i> ) | Densidad celular de <i>Dunaliella salina</i>   | Nº organismos.mL <sup>-1</sup>                                  | Cuantitativa<br>Discreta/<br>Razón |
| - Concentración de clorofila y carotenoides                 | Concentración de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofila total y carotenoides totales, del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> | mg.L <sup>-1</sup>  | Cuantitativa<br>Continua/<br>Razón |

|  |   |   |                                    |
|--|---|---|------------------------------------|
| -Concentración de $\beta$ -caroteno ( $C_{\beta\text{-carot}}$ ) | Concentración de $\beta$ -caroteno ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de <i>Dunaliella salina</i> | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$                     | Cuantitativa<br>Continua/<br>Razón |
| -Producción de $\beta$ -caroteno ( $Pr_{\beta\text{-carot}}$ )   | Concentración de $\beta$ -caroteno por día del <i>Dunaliella salina</i> .                         | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ | Cuantitativa<br>Continua/<br>Razón |



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. **Biología de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905)**

*Dunaliella salina* es una microalga verde unicelular, fotosintética, biflagelada y móvil que se distingue morfológicamente por la falta de una pared celular rígida (Ben-Amotz y Avron, 1987). Las células de *Dunaliella* son células ovoides, esféricas, piriformes, elipsoides o fusiformes con un tamaño que varía de 5 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud y de 3 a 13  $\mu\text{m}$  de ancho. Las células presentan un solo cloroplasto en forma de copa, que en su mayoría tiene un pirenoide central rodeado de gránulos de almidón (Ben-Amotz, 1980). Además de las clorofilas “a” y “b”, los miembros de *Dunaliella* pueden contener valiosos pigmentos carotenoides como  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina y luteína. Las células de *Dunaliella* tienen otros orgánulos propios de las algas verdes: membrana del núcleo, mitocondrias, vacuolas, aparato de Golgi y una mancha ocular que le permite migrar hacia la luz (Ben-Amotz y Avron, 1989b). La célula está cerrada por una membrana plasmática elástica cubierto por una capa superficial de mucopolisacárido que se encoge o se hincha rápidamente cuando se exponen a condiciones hipertónicas e hipotónicas, respectivamente (Ben-Amotz y Avron, 1990; Ben-Amotz, 1993).

Las especies más conocidas de *Dunaliella* son *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bioculata*, *Dunaliella acidophyla* y *Dunaliella parva*. Su clasificación taxonómica es como sigue:

**Reino:** Plantae

**División:** Chlorophyta

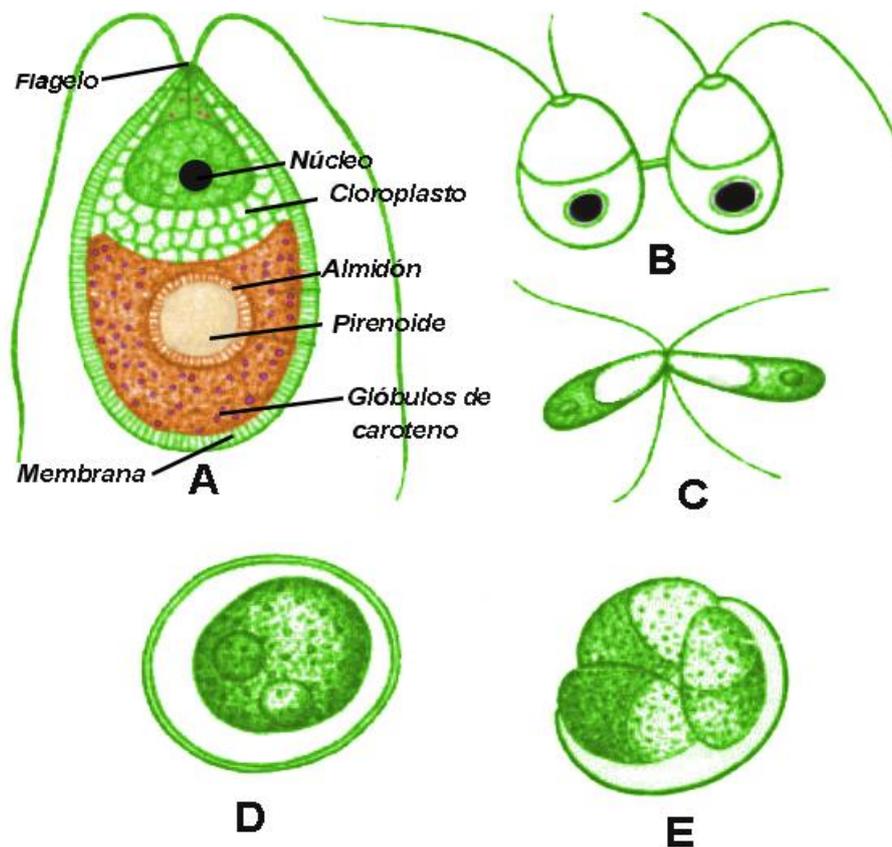
**Clase:** Chlorophyceae

**Orden:** Volvocales

**Familia:** Dunaliellaceae

**Género:** *Dunaliella*

**Especie:** *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905)



**Figura 1:** Estructura de *Dunaliella salina*. A) Célula vegetativa con sus componentes celulares; B) Zoosporas en división celular; C) Fusión de gametos; D) Zigospora madura; E) Zigospora en germinación. (Modificado de Ben-Amotz y Avron, 1987)

*Dunaliella* se multiplica por división longitudinal, pero la reproducción sexual se produce raramente por isogamia con un proceso de conjugación (Figura 1).

Las especies del género están aislados de los hábitats marinos acuáticos como el mar porque habitan en lagos salobres (salares y salinas) con una amplia gama de composiciones químicas y concentraciones de sal que van desde 0 a 5% de saturación comparada al 35% de sal en agua de mar, que la convierte en la microalga eucariota más halotolerante hasta ahora conocida. El mecanismo por el cual las células de *Dunaliella* pueden adaptarse a esta amplia gama de concentraciones de sal, se demostró que se basa en la capacidad del alga para cambiar su concentración intracelular de glicerol (Avron, 1992) (Figura 2).

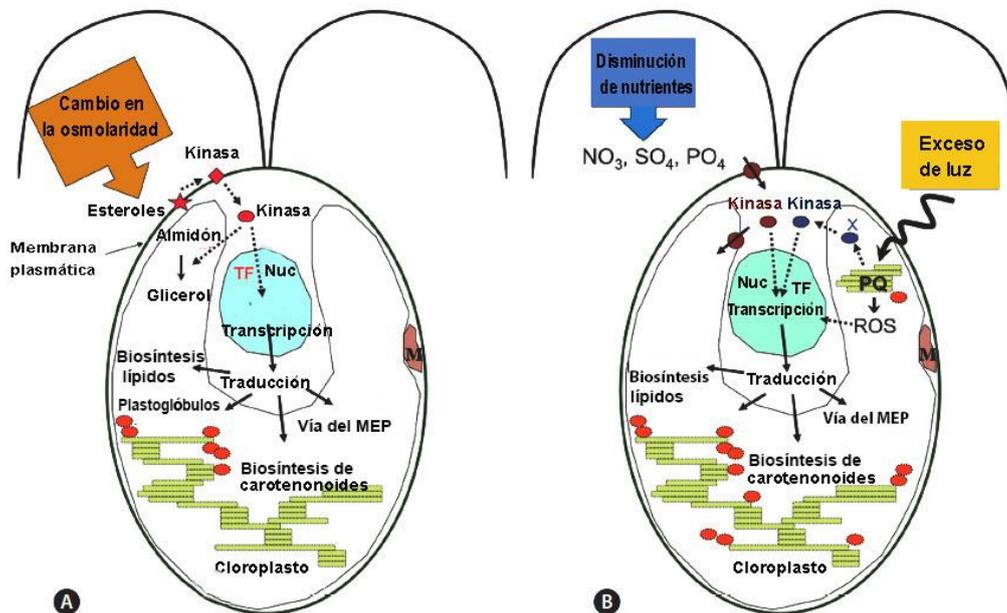
Cuando *Dunaliella* se cultiva en alta salinidad, el contenido de glicerol intracelular supera el 50%, que es suficiente para soportar la mayoría de las presiones osmóticas requeridas. En esta condición, el glicerol actúa como un “soluto compatible” que protege contra las enzimas que inactivan e inhiben el desarrollo celular (Brown y Borowitzka, 1979). También se demostró que tanto la síntesis de glicerol en condiciones hipertónicas y su eliminación en condiciones hipotónica son independientes de la síntesis de proteínas y ocurren en la luz o la oscuridad (Ben-Amotz y Avron, 1989a).

Por otro lado, los datos más recientes sugieren que *Dunaliella* tiene una excepcional capacidad para eliminar iones  $\text{Na}^+$  en ambientes hipersalinos mediante el uso de una bomba de sodio (Katz y Pick, 2001). Los resultados de los enfoques proteómicos también indicaron que, además de los mecanismos anteriores en respuesta a una alta salinidad *Dunaliella* mejora la tasa fotosintética para la asimilación de  $\text{CO}_2$  (Oren, 2005).

Además de esta halotolerancia excepcional de *Dunaliella salina*, *Dunaliella acidophila* puede crecer en un entorno muy ácido (pH 0-1). *Dunaliella antártica* prospera a temperaturas bajo cero y algunas cepas de *Dunaliella salina* pueden

tolerar altas intensidades de luz. Además, *Dunaliella* es más tolerante a la contaminación de aceite combustible en comparación con otras algas planctónicas (Brown y Borowitzka, 1979). Por lo tanto, estos organismos son únicos en su capacidad para adaptarse a algunas de las condiciones más severas de los hábitats globales.

*Dunaliella salina* se encuentra a menudo en los hábitats salinos naturales, donde da un color rojizo o rosado al cuerpo de agua. Por primera vez, también Milko (1963) informó que *Dunaliella* contiene altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno y más tarde también se recomendó como una fuente comercial de glicerol (Ben-Amotz, 1980). Hoy en día, sabemos que *Dunaliella salina* es la mejor fuente comercial de  $\beta$ -caroteno natural de entre todos los organismos en el mundo (Borowitzka, 1995). Esta alga acumula grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno como glóbulos en el cloroplasto para evitar el foto-daño a la clorofila, cuando las condiciones de cultivo incluyen altas intensidades de luz, alta temperatura, alta salinidad y la deficiencia de nutrientes (Ben-Amotz y Avron, 1983; Ben-Amotz y Shaish, 1992). El contenido de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* ha sido reportado de hasta el 14% del peso seco (Aasen et al., 1969).



**Figura 2. Diagrama del mecanismo celular de respuesta por *Dunaliella salina* frente al estrés abiótico como deficiencia de nutrientes, alta salinidad e iluminación (Raman et al., 2011).**

## 2.2. Requerimientos para el cultivo de *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* tiene ventaja de ser capaz de prosperar en entornos con altas concentraciones de NaCl, lo que hace factible el cultivo en estanques abiertos, así como biorreactores cerrados. Sin embargo, en todos los sistemas de cultivo de *Dunaliella salina* se requiere agregar algunos nutrientes y ajustar algunos factores fisiológicos limitantes para el crecimiento y carotenogénesis óptima.

Debido a que *Dunaliella* es un fotoautótrofo obligado, la luz es la fuente de energía única para su metabolismo (Borowitzka y Borowitzka, 1989). En estanques abiertos, la única fuente de luz es el sol, mientras que en fotobiorreactores la luz puede ser proporcionada por el uso de cualquiera de las lámparas fluorescentes blancas o incluso luz solar. El crecimiento y la síntesis de carotenoides responden de manera diferente a la calidad y cantidad de luz. Se encontró que la inducción de

carotenoides es independiente de la longitud de onda, sin embargo, depende en gran medida de la intensidad de luz.

*Dunaliella* tiene la capacidad de prosperar en una amplia gama de temperaturas entre 0 a 45 °C. En cultivos de laboratorio, la temperatura óptima para el crecimiento de *Dunaliella* es de aproximadamente 32 °C, con un rango óptimo entre 25 y 35 °C (Ben-Amotz, 1995). Debido a limitaciones técnicas, la temperatura en estanques abiertos no es controlable. Borowitzka y Borowitzka (1987) mostraron que las bajas temperaturas nocturnas, como las que se encuentran en la planta piloto en el lago Hutt (Australia Occidental) disminuyen la tasa de crecimiento, bajando el rendimiento celular. Por otro lado, las temperaturas alrededor de 40 °C y superiores, promueven la inducción de carotenoides, pero al mismo tiempo ralentizan la tasa de crecimiento (Borowitzka y Borowitzka, 1989).

Las especies de *Dunaliella* tienen un amplio rango de tolerancia de pH de 0 a 11, pero el pH óptimo para *Dunaliella salina* es de entre 9 y 11. En cultivos de algas autótrofos, el pH se eleva debido a la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> con absorción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que contribuye a liberar más OH<sup>-</sup> (Ben-Amotz y Avron, 1989a).

Existe el riesgo de precipitación de varias sales de calcio y floculación de la biomasa de algas a un pH mayor, especialmente cuando la concentración de Ca<sup>2+</sup> es alta, estas condiciones generalmente se encuentran en muchas fuentes naturales de agua. Lo que puede conducir a la reducción en el crecimiento de algas y por lo tanto es necesario para evitar un aumento del pH por encima de 8 (Ben-Amotz y Avron, 1989a). En cultivos intensivos operados en estanques abiertos, el pH generalmente se mantiene a 7,5 ± 0,2 haciendo doble control tanto de CO<sub>2</sub> como de HCl; el CO<sub>2</sub> se hace fluir de forma rutinaria al cultivo y el HCl se añade como control cuando el pH se eleva (Ben-Amotz, 1995). En algunos estanques abiertos y fotobiorreactores donde la principal fuente de carbono inorgánico es el (HCO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>, el pH se controla sólo por la adición de HCl.

Debido a que *Dunaliella* es un organismo fototrófico, se puede utilizar  $\text{CO}_2$  y  $(\text{HCO}_3^-)$ , como fuentes de carbono inorgánico. La falta de una fuente de carbono inorgánico apropiado, es el factor limitante del crecimiento más común en las condiciones presentes en cultivos de *Dunaliella salina* como la alta salinidad, el aumento del pH y la temperatura alta (Borowitzka y Borowitzka, 1989). Existe una amplia variedad de dispositivos de gas burbujeante para inyectar pequeñas burbujas de  $\text{CO}_2$  en los cultivos, los cuales pasan este gas a través de tubos plásticos porosos fijos en el fondo de los estanques y se controla mediante un medidor de flujo para lograr un caudal de gas de aproximadamente  $0,4 \text{ L.mL}^{-1}$  (García-González et al., 2003). Alternativamente,  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  se puede utilizar como fuente de carbono para un buen crecimiento entre pH 7 y 9,5. Aproximadamente  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  se añaden a diario a los biorreactores, después de la esterilización de  $\text{NaHCO}_3$  sólido a  $120^\circ\text{C}$  en un horno bajo la oscuridad y luego se mezcla con agua esterilizada (Hejazi et al., 2003).

En la práctica la mejor fuente de nitrógeno para *Dunaliella salina* es el nitrato,  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  o  $\text{KNO}_3$  se añade al medio para el crecimiento óptimo de las algas. Por otra parte, limitar el nitrato, es una de las formas más comunes para la reducción de la tasa de crecimiento, lo que conduce a la inducción de la producción de carotenoides. Sin embargo, la limitación de nitrógeno prolongada en el cultivo puede conducir eventualmente a la alta mortalidad de las células, así como a la reducción grave de carotenoides por unidad de volumen de cultivo. Otras fuentes de nitrógeno tales como sales de amonio y úrea no son apropiadas, debido a que pueden dar lugar a la muerte de las algas bajo ciertas condiciones (Borowitzka, 1990). También se ha demostrado que el uso de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  como fuente de nitrógeno tiene efectos tóxicos en *D. salina* (Borowitzka y Borowitzka, 1987).

Otros elementos que se requieren para un buen crecimiento de *D. salina* crecimiento incluyen  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , hierro quelado y oligoelementos. Las relaciones de  $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-:\text{SO}_4^{2-}$  en el medio también pueden afectar el

crecimiento y la síntesis de caroteno (Ben-Amotz y Avron,1983). *Dunaliella salina* puede tolerar una amplia gama de  $Mg^{2+}$ : $Ca^{2+}$  en proporción de 0,8 a 20,0 (Borowitzka,1990). La proporción óptima de  $Cl$ : $SO_4^{2-}$  para el crecimiento de *Dunaliella salina* ha resultado ser de 3:2 mientras que la relación óptima para carotenogénesis es de 8:6 (Massyuk, 1956). El Hierro quelado por lo general se añade a los cultivos en forma de  $FeCl_3$ EDTA o citrato férrico-EDTA. Borowitzka y Borowitzka (1987) mostró que, en comparación con el citrato férrico, el  $FeCl_3$  aumentó más rápidamente la tasa de crecimiento inicial de *D. salina*; sin embargo, el citrato de férrico finalmente dio un rendimiento celular más alto que  $FeCl_3$ . Cuatro microelementos, incluyendo el manganeso, zinc, cobalto y cobre también son necesarios para el crecimiento óptimo de *Dunaliella*; sin embargo, no hay necesidad de añadir estos elementos al medio si se compone de agua de mar (Ben-Amotz y Avron,1989a).

### 2.3. El $\beta$ -caroteno

El  $\beta$ -caroteno es miembro de la familia de los terpenoides y son formados por cuarenta átomos de carbono (Figura 3A). Son un tipo de molécula de estructura isoprenoide, tiene un número variable de dobles enlaces conjugados, por lo que cuenta con la propiedad de absorber la luz visible en diferentes longitudes de onda, desde 380 hasta 500 nm, lo que les confiere colores que van desde al amarillo al rojo y son ampliamente empleados como colorantes.

El mayor número de dobles enlaces captan longitudes de ondas más largas (más hacia el rojo). Así, con solamente tres enlaces conjugados, el fitoeno solo puede captar luz ultravioleta (siendo por tanto incoloro), el licopeno (coloración roja del tomate), con once dobles enlaces conjugados, absorbe desde el ultravioleta hasta el rojo.

El  $\beta$ -caroteno aparece de manera natural bajo las formas isoméricas all-*trans*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis* y funciona como un pigmento accesorio recolector de

luz que protege el aparato fotosintético del exceso de irradiancia en todas las plantas verdes, incluyendo las algas (Ben-Amotz et al., 1987), actuando como un filtro de luz (Telfer, 2003).

El  $\beta$ -caroteno es un tipo de pro-vitamina A, responsable de la inhibición de la producción de radicales libres de la luz ultravioleta (Farahat et al., 2011). Están contenidas en los cloroplastos en glóbulos lipídicos (D. Smith et al., 2010).

Se ha sugerido que la acumulación de  $\beta$ -caroteno protege a las células contra los efectos nocivos de la irradiación de alta intensidad mediante la absorción de luz en la región azul del espectro (Ben-Amotz et al., 1987; Ben-Amotz, 1993). Entre las diversas microalgas ricas en carotenoides, *D. salina* tiene la mayor concentración de caroteno que constituyen 10% del peso seco de algas (Shariati M., 2011). Debido a la capacidad para producir pigmentación roja del  $\beta$ -caroteno, la coloración de alimentos naturales es de gran demanda para los productos cosméticos (Oren A., 2005).

El pigmento  $\beta$ -caroteno tiene alta capacidad anti-oxidante y se utiliza como aditivo en la alimentación humana y animal como fuentes de vitaminas A (Farahat et al., 2011). Además, este carotenoide se ha utilizado en productos cosméticos y farmacéuticos como colorante y/o antioxidante (Borowitzka, 1995; Dufosse et al., 2005). La suplementación de la alimentación animal mediante la adición de este pigmento mejora el color de la carne de pescado y la yema de los huevos y la mejora de la salud y la fertilidad del ganado alimentados con granos (Borowitzka y Borowitzka, 1988b).

Además, las preparaciones de  $\beta$ -caroteno han demostrado que inhiben o pueden prevenir diversos tipos de tumores en seres humanos y animales, incluyendo los cánceres de piel tales como melanoma (Comstock et al., 1991), cánceres epidermoides de cabeza y cuello (Shklar et al., 1989), cánceres del tracto gastrointestinal (Stich et al., 1988), carcinomas de glándulas secretoria tales como páncreas (Woutersen y Garderen Hoetmer, 1988), el cáncer de mama (Basu et al.,

1989) y otras condiciones (Van Poppel, 1993).  $\beta$ -caroteno también es eficaz para controlar los niveles de colesterol y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, tales como infarto de miocardio y la angina de pecho, así como enfermedad cardíaca coronaria (Riemersma et al., 1991 y; Tornwall et al., 2004). Parece que estos efectos terapéuticos de  $\beta$ -caroteno, como los de otros carotenoides, pueden estar relacionadas con su capacidad de protección contra los radicales libres potencialmente dañinos y cuyos efectos se simulaban sobre el sistema inmune (Ben-Amotz, 1996; Gotz et al., 1999).

El  $\beta$ -caroteno se puede obtener a partir de fuentes naturales como verduras, frutas, microalgas y el hongo *Blakeslea* (Dufosse et al., 2005) o producido por síntesis totales (Mayer e Isler, 1971). En términos de composición de isómeros, el  $\beta$ -caroteno sintético contiene sólo el isómero all-*trans*. En contraste, el  $\beta$ -caroteno natural es una mezcla compuesta principalmente del isómero 9-*cis*, siendo el resto all-*trans* (Ben-Amotz y Shaish, 1992). Es evidente que el isómero 9-*cis* es un mejor antioxidante que el isómero all-*trans* y que cuanto mayor es la concentración del isómero 9-*cis* la actividad antioxidante y anticancerígena es superior (Chidambara Murthy et al., 2005; Hu et al., 2008).

Aunque el  $\beta$ -caroteno natural, al igual que otros carotenos, está presente en muchos vegetales y frutas como cítricos, zanahorias y tomates; su concentración en estas fuentes es relativamente baja. En comparación, a la célula de *Dunaliella* esta puede acumular miles de veces más  $\beta$ -caroteno que una célula de zanahoria (Klausner, 1986). Además, *Dunaliella* puede tener las mayores cantidades del isómero 9-*cis* entre todas las fuentes (aproximadamente el 50% de todos los isómeros), dependiendo de las condiciones de cultivo. En resumen, *D. salina* es la fuente biológica más conocida de  $\beta$ -caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1983; Borowitzka y Borowitzka, 1988a).

En los últimos años, varios estudios han informado de que el isómero all-*trans* de  $\beta$ -caroteno sintético puede ser cancerígeno (Paolini et al., 1999; Kelloff, 2000; Omenn, 2000). Con estos nuevos hallazgos, además el hecho de que el  $\beta$ -

caroteno natural tiene mejores propiedades físicas que el producto sintético (tales como su solubilidad en grasas), hacen que el  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella* sea mucho más valioso y atractivo para los consumidores. Una amplia gama de productos de  $\beta$ -caroteno están ahora disponibles, incluyendo una solución de  $\beta$ -caroteno al 4% utilizado en las industrias de suplementos dietéticos como relleno para cápsulas blandas de gelatina; una solución de 1,5 - 30 % para aceite (por ejemplo aceite de soja), utilizado como colorante para alimentos (principalmente para la margarina) y suplemento dietético, en una emulsión al 2 % de  $\beta$ -caroteno utilizado en bebidas; polvo de *Dunaliella* enriquecido con 2 -5 % de  $\beta$ -caroteno utilizado como alimento para acuicultura para gambas y otras especies o envasados en cápsulas o tabletas y etiquetado como “ $\beta$ -caroteno natural”, solubles en agua y otros carotenoides mezclados (Ben-Amotz y Avron, 1990; Ben-Amotz, 1993).

Sin embargo, a pesar de las contribuciones positivas de *D. salina*, la producción comercial es limitada debido a la baja productividad de  $\beta$ -caroteno. Farahat et al., estudiaron los efectos de la salinidad para maximizar la producción de  $\beta$ -caroteno y carotenoides demostrando que su concentración aumenta con el incremento de la salinidad. Con el fin de maximizar la producción de  $\beta$ -caroteno, *D. salina* se cultiva en 1,5 M a 3,0 M de concentración de NaCl hasta que se alcanza una densidad celular estable después se aumentó a 4,4 a 5,0 M de concentración de NaCl para la máxima producción de carotenoides (Farahat et al., 2011).

#### 2.4. Bioquímica y biosíntesis del $\beta$ -caroteno en microalgas

El  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella* se compone de una mezcla de isómeros *cis*- y *trans* con una composición típica de 9-*cis* (41%), all-*trans* (42%), 15-*cis* (10%) y otros isómeros (6%) (Borowitzka y Borowitzka, 1989). En contraste al isómero all-*trans*, que es insoluble en aceite y fácil de cristalizar, el isómero 9-*cis*  $\beta$ -caroteno tiene una mayor solubilidad en aceite y es más difícil de cristalizar (Ben-Amotz, 1993).

Los estudios sobre las vías de biosíntesis de isoprenoides y carotenoides en microalgas son todavía escasos y están relacionados con algunos grupos específicos. En los grupos de algas del tipo Chlorophyta, la síntesis de esteroides y carotenoides sigue la vía del mevalonato (MVA). Las diatomeas marinas *Nitzschia sp.* y *Phaeodactylum sp.*, siguen la vía del MVA para la biosíntesis de los esteroides citosólicos, la misma vía se sigue para la biosíntesis de carotenoides, fitol, e isoprenos en algas. En el caso de *Chlorella vulgaris*, la vía del MVA está implicada en la biosíntesis de difosfato de isopentenilo, después de inhibir la formación de brasinoesteroides (Bajguz y Asami, 2004).

En la microalga *Scenedesmus* se corroboraron que la biosíntesis de los isoprenoides plastídicos, así como la de los esteroides procede a través la ruta del mevalonato (Bajguz y Asami, 2004).

Para diferentes rutas biosintéticas; el fitoeno sintasa (PSY) se considera como la enzima de reacción que limita la velocidad en la biosíntesis de carotenoides en organismos fotosintéticos (Schwender et al., 2001). Algunas algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. vulgaris*, *Volvox carteri*), así como diatomeas (*Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum*), se han asociado con una sola clase de gen PSY (Ershov et al., 2002).

Parece que otras copias de genes se perdieron en estas especies. Recientemente la duplicación de genes de PSY ha sido reportada en el alga verde *Dunaliella salina/bardawil*. El descubrimiento de dos clases de la familia de genes PSY en algunas algas sugiere que la biosíntesis de carotenoides se regula diferencialmente en respuesta al desarrollo y el estrés ambiental. PSY fue investigado previamente; por ejemplo, en *C. reinhardtii* y *Haematococcus pluvialis* (Li y Li, 2008). El genoma de *C. reinhardtii* contiene sólo una copia del gen PSY funcional (Ershov et al., 2002). En condiciones de estrés los genes carotenogénicos de *H. pluvialis* a saber son fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), el licopeno ciclasa (LCY),  $\beta$ -caroteno cetolasa (BKT) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CHY) (Schwender et al., 2001). En la biosíntesis de carotenoides, el primer paso

comprometido, es la condensación del geranyl geranyl pirofosfato de fitoeno (GGPP), que está mediada por PSY. Los pasos posteriores de la vía que conduce a la síntesis de los carotenoides se llevan a cabo en las enzimas de las membrana tales como la fitoeno desaturasa (PDS) y el licopeno  $\beta$ -ciclase (LCY) (Massé et al., 2004). La biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus* tiene como intermediario la formación del  $\beta$ -caroteno.

Algunos pasos específicos de la biosíntesis de la astaxantina se encuentran en el citoplasma, pero la maquinaria enzimática de la vía general de carotenoides general parece estar localizada en el cloroplasto (Massé et al., 2004). Entre las cepas carotenogénicas, el alga verde *D. salina* representa un modelo interesante de la fuente natural de  $\beta$ -caroteno de importancia industrial (10% del peso seco de algas) en numerosas aplicaciones en el mercado (Li y Li, 2008). La biosíntesis de carotenoides en *D. salina* depende del suministro de los precursores derivados de metileritritol 4-fosfato (MEP) (Ershov et al., 2002).

Recientemente se han notificado las secuencias de PDSr en la carotenogénesis de especies de *Dunaliella* basado en el PSY. Estas secuencias para esta enzima que lleva a carotenogénesis, PSY de *D. salina* y *D. bardawil*, se puede obtener a partir de datos del Centro Nacional para la Información sobre Biotecnología NCBI; (Ershov et al., 2002). Es bien sabido que la PSY cataliza la reacción dos moléculas de GGPP que conduce a la generación de fitoeno. Una vez que el fitoeno se biosintetiza, los próximos pasos en la carotenogénesis son la desaturación (reacciones de deshidrogenación) que resultan en la conversión de fitoeno (nueve dobles enlaces) a licopeno (13 dobles enlaces y un cromóforo conjugado de 11 dobles ) a través de fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y neurosporeno como productos intermedios. El componente principal de *Dunaliella* es  $\beta$ -caroteno, que contiene un anillo de ciclohexano en cada extremo donde los anillos de ciclohexeno se añaden a uno o a ambos extremos de licopeno y es catalizada por la licopeno ciclase (LYC) que conduce a la formación de  $\delta$ -,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, y  $\beta$ -caroteno (Figura 3B).

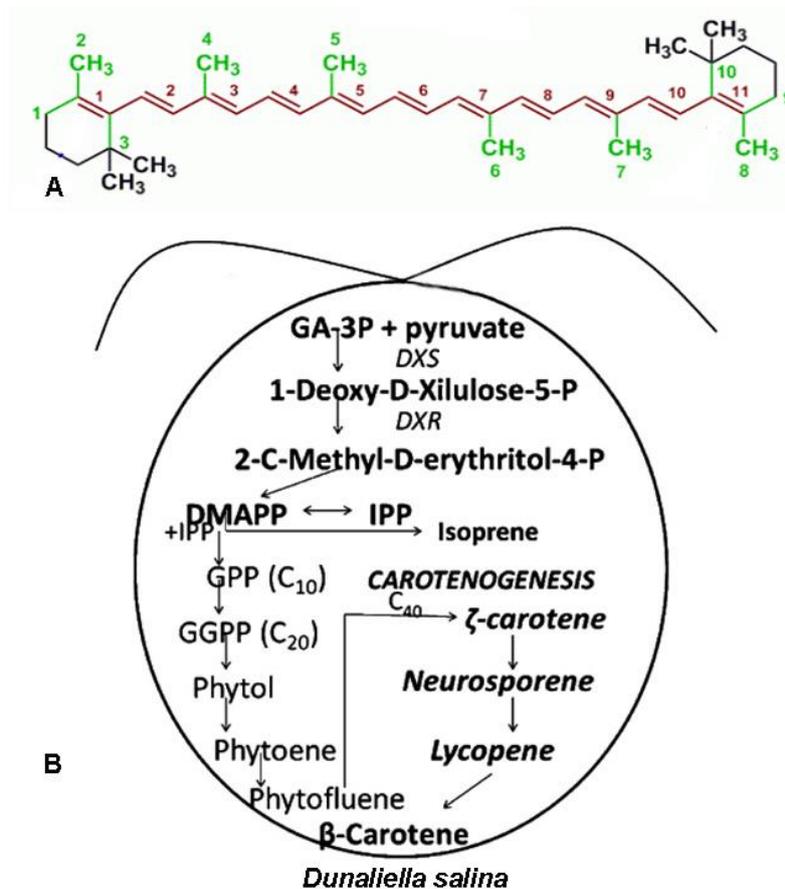
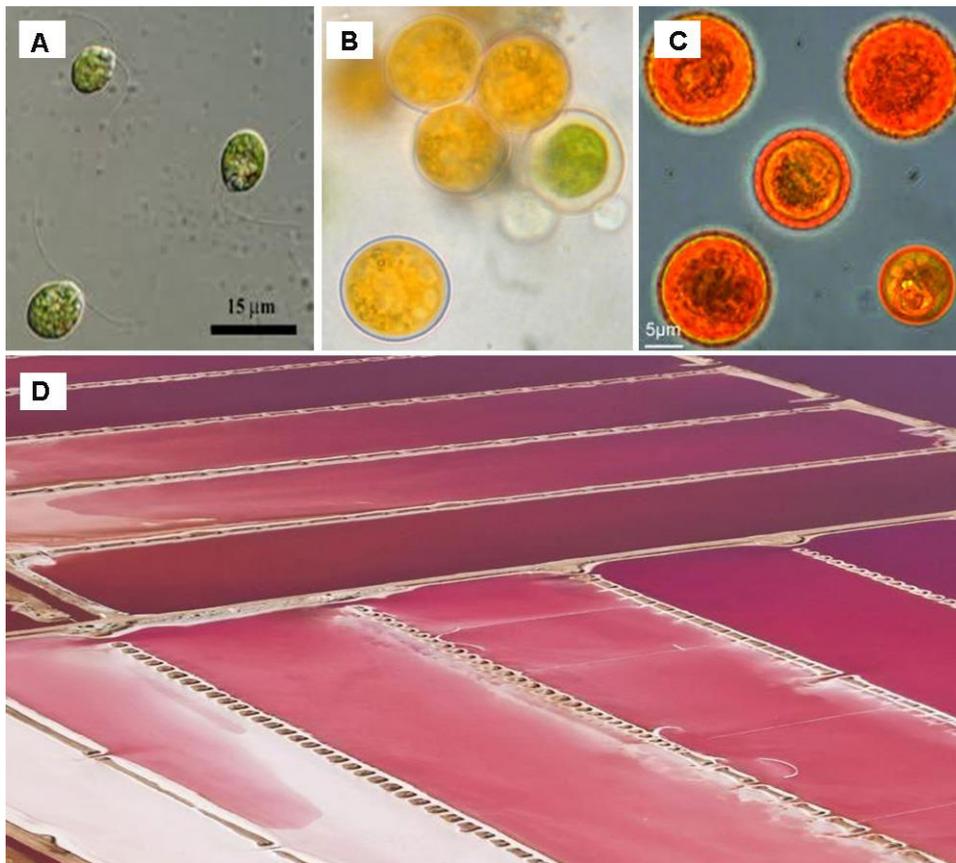


Figura 3. A) Estructura de  $\beta$ -caroteno; B) Biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* (Li y Li, 2008)).

## 2.5. Biotecnología de *Dunaliella Salina*

El cultivo masivo de *D. salina* para la producción de  $\beta$ -caroteno ha sido llevado a cabo en varios países, entre ellos Australia, EE.UU. y China (Borowitzka y Borowitzka, 1989; Borowitzka, 1999), (Figura 4).

Proyectos piloto a gran escala también han sido probados en España, Kuwait, Chile, Irán, etc.(Borowitzka, 1990; García-González et al., 2003; Hosseini Tafreshi y Shariati, 2006). Diferentes aspectos para el cultivo masivo de *Dunaliella* en los diferentes sistemas de cultivo se abordan a continuación.



**Figura 4. Diferentes estados de *Dunaliella salina*. A) En estado verde en fase móvil, B) Inicio de la formación de  $\beta$ -caroteno. C) Quistes conteniendo  $\beta$ -caroteno. D) Planta de cultivo en Australia (Ami Ben-Amotz et al., 2009).**

De otro lado, el primer paso antes del cultivo en masa de *Dunaliella salina* en estanques abiertos o biorreactores es seleccionar las cepas más adecuadas para el cultivo en masa en términos de contenido de  $\beta$ -caroteno y la tasa de crecimiento. Sólo algunas cepas de *D. salina* tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno (hasta 10 - 14% de peso seco), (Aasen et al., 1969). *Dunaliella parva* también puede producir contenidos significativos de  $\beta$ -caroteno (hasta casi 4% de peso seco) pero ninguna otra especie de microalga puede sintetizar grandes concentraciones de  $\beta$ -caroteno (Massyuk, 1973). Según algunos autores, varias cepas de especies de *Dunaliella* reportadas en la literatura han sido mal nombradas

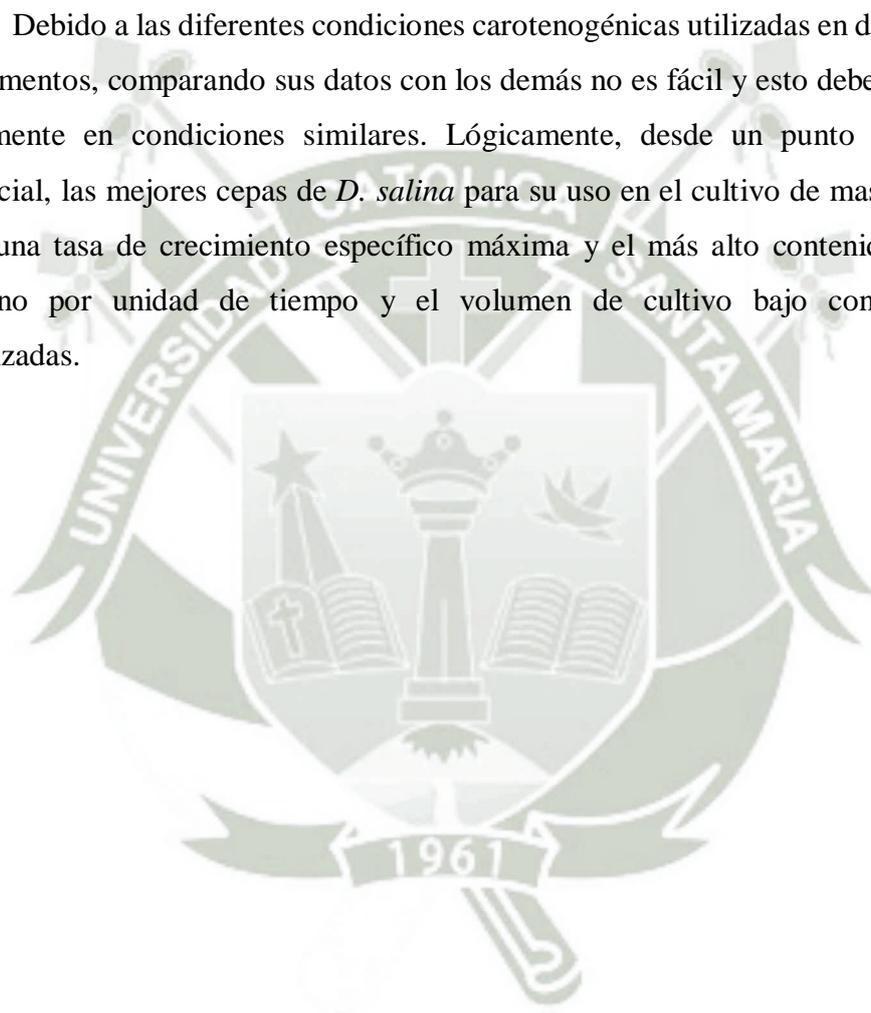
(Borowitzka, 1990). Por ejemplo, la cepa UTEX200/CCAP19/3 de *D. salina* es probablemente *D. viridis*, que no pigmentará de color rojo a salinidades de hasta 25%.

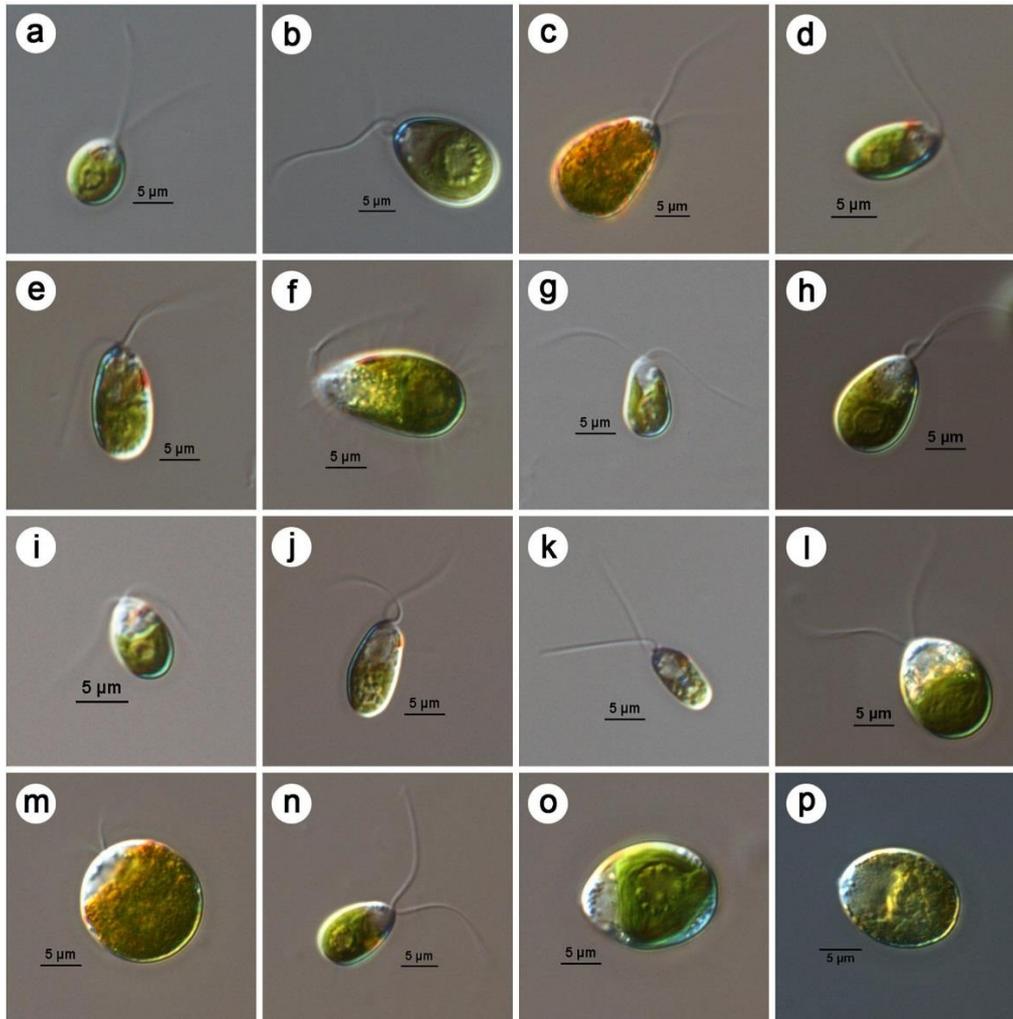
También hay algunas diferencias confusas en la nomenclatura de las cepas entre los diferentes autores. Ben-Amotz y Avron (1990) afirmaron que en condiciones apropiadas algunas cepas de *Dunaliella* sólo pueden acumular aproximadamente 0,3% de  $\beta$ -caroteno, y solamente *D. salina* y *Dunaliella bardawil* (UTEX LB 2538) son capaces de producir grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno más de 10% del peso seco. Estas dos cepas son morfológicamente similares a otras cepas, pero su volumen celular es mayor que la de otras cepas. Ben-Amotz y Shaish (1992) han demostrado varias diferencias entre estas dos cepas en términos de la presencia y el número de manchas oculares o glóbulos de lípidos. También hay algunos informes de las principales diferencias en la regulación de la síntesis de carotenos en respuesta a altas irradiaciones y varias salinidades entre ellos (Gómez et al., 2003). En contraste, Borowitzka (1990) cree que *D. bardawil* es un nombre incorrecto para *D. salina* ya que afirma que se trata de la misma especie.

Numerosas cepas de *D. salina* fueron aisladas de diversos hábitats marinos, como los lagos de salobres, marismas y lagunas salinas artificiales alrededor del mundo donde el agua contiene más de un 10 % de sal (Figura 5). Un enfoque para la identificación de *D. salina* es el método descrito por Butcher (1959) y Loeblich (1982) quien propuso que las cepas de *D. salina* productoras de  $\beta$ -caroteno deben contener mayor contenido de carotenoides que clorofila en proporción de 6:1. Cepas de *D. salina* aisladas o estudiadas por diferentes autores contenían diferentes valores de carotenoides por célula y por unidad de volumen. En un estudio realizado por Cifuentes et al., (1992), el total de contenido de carotenoides de ocho cepas de *D. salina* aisladas de estanques de sal en Chile osciló de 4 - 42 pg.celula<sup>-1</sup> y de 7,2 - 38,2 mg.L<sup>-1</sup>. En otro estudio, la tasa de crecimiento específico y contenido de carotenoides de cinco cepas comerciales de *D. salina* se determinaron en un cultivo discontinuo exterior (García-González et al., 2003). En ese experimento, la tasa de

crecimiento osciló entre 0,16 a 0,20 días<sup>-1</sup>, el valor más alto fue para la cepa UTEX 2538; donde el contenido de carotenoides osciló entre 8,1 a 15,1 mg.L<sup>-1</sup>, una vez más resultó ser el máximo contenido para UTEX 2538. Curiosamente, Powtongsook et al., (1995) aisló una cepa llamada DS91008 que produjo un contenido de carotenoides de hasta 80,3 pg.célula<sup>-1</sup> a 30% de salinidad bajo iluminación continua a 270  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Debido a las diferentes condiciones carotenogénicas utilizadas en diferentes experimentos, comparando sus datos con los demás no es fácil y esto debe hacerse únicamente en condiciones similares. Lógicamente, desde un punto de vista comercial, las mejores cepas de *D. salina* para su uso en el cultivo de masa deben tener una tasa de crecimiento específico máxima y el más alto contenido de  $\beta$ -caroteno por unidad de tiempo y el volumen de cultivo bajo condiciones optimizadas.





**Figura 5. Numerosas cepas de *D. salina* aisladas de diversos hábitats marinos, como lagos salobres, marismas y lagunas salinas artificiales alrededor del mundo (Preetha et al., 2012).**

Además del estudio de las diferencias fisiológicas de las cepas, algunos investigadores más recientes trabajaron sobre la diversidad genética de cepas de *Dunaliella*. Tales estudios pueden permitir la detección de genotipos desconocidos, que podría tener los genes con potencial beneficioso y por lo tanto se puede utilizar para crear un excelente procedimiento para la selección de cepas. Gómez y González (2001) analizaron genéticamente ocho cepas chilenas de *D. salina*

utilizando la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y mostró, por ejemplo, que la cepa CONC-006 aislada de un lago salado alpino tenía similitud más genética a CONC-001 a partir de una laguna costera que otras cepas alpinas. Gómez y González (2004) utilizaron secuencias de ADN para estudiar la variabilidad genética de las siete cepas (tres en Chile y cuatro desde otros lugares). Sus resultados mostraron algún grado de correlación entre las diferencias en las características fisiológicas de las cepas, como la capacidad carotenogénica y la diversidad genética entre ellos. Por este tipo de estudios en el futuro, vamos a ser capaces de reducir eficazmente el riesgo de aseveraciones equivocadas acerca de los rasgos biotecnológicos de las cepas, que resultan principalmente de la plasticidad en el fenotipo.

Varios intentos se han llevado a cabo para mutagenizar diferentes cepas de *Dunaliella* y para aislar mutantes con características especiales mediante el uso de mutágenos químicos y UV. Algunas de estas variantes podrían ser utilizadas en la ciencia básica como herramientas para la obtención de las vías fisiológicas o bioquímicas en el alga. Por ejemplo, varios mutantes con defectos de tolerancia a la sal han sido reportados (Zamir, 1992).

Por otro lado, se ha explotado un procedimiento de mutagénesis para crear mutantes con rasgos biotecnológicos mejorados tanto cualitativos o cuantitativos. Se ha aplicado el uso de la irradiación UV, para crear mutantes de *D. bardawil* con mayor potencial para la síntesis de  $\beta$ -caroteno bajo intensidades relativas de poca luz (Shaish et al., 1991). Recientemente, un nuevo mutante de *D. salina* llamado *zeal* se aisló por tratamiento de mutagénesis con metil etil sulfonato (Jin et al., 2003a), como resultado, carece de un número de las xantofilas neoxantina, violaxantina y anteraxantina, al tiempo que conserva cantidades significativas de zeaxantina, proporcionando una fuente potencial comercial de este bioproducto de alto valor.

Uno de los medios más utilizados para el cultivo de laboratorio de especies de *Dunaliella* es el medio F/2 de Guillard (Guillard y Ryther, 1962), medio

Parvasoli enriquecido con agua de mar (Parvasoli-enriched seawater médium: PES) (Mclachlan y Yentsch, 1959, Mclachlan, 1973) también se han utilizado el medio artificial ART (Ben-Amotz et al., 2009). El medio de PES, que tiene bajos contenidos de nitrato y fosfato, ha sido eficaz para inducir la carotenogénesis (Gómez et al., 2003). El medio ART también contiene un aporte limitado de nitrógeno, pero no de fosfato inorgánico, este medio al ser similar al medio de PSA podría ser útil para inducir la síntesis de carotenoides (Gómez et al., 2003). Los cultivos se mantienen normalmente en medio sólido agar o líquido con un subcultivo cada 1-2 meses. Borowitzka y Borowitzka (1989) también reportaron el mantenimiento exitoso del alga *Dunaliella* en nitrógeno líquido hasta por 12 meses así como la metodología de crioconservación de algas eucarióticas, tales como *Dunaliella* revisados por Taylor y Fletcher (1999). Por tal forma, las muestras biológicas se pueden mantener en un estado de "latencia" a bajas temperaturas.

Es importante conocer las variables ambientales como la calidad e intensidad de luz y temperatura. La radiación fotosintéticamente activa (RFA) comprendida entre los 400 a 700 nm es esencial en la carotenogénesis (Loeblich, 1982; Ben-Amotz, 1987), si bien los máximos niveles de  $\beta$ -caroteno en células de *Dunaliella* se alcanzan dependiendo de la salinidad del medio (Borowitzka y Borowitzka, 1990). El aumento de intensidad de PAR de 50 a 1250  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  incrementa notablemente el contenido de  $\beta$ -caroteno en *D. salina* (Orset y Young, 2000). De manera análoga, las altas intensidades de luz producen en *Haematococcus pluvialis* un notable incremento del contenido en astaxantina cuando el alga se crece en presencia de sal de hierro.

Las algas con un elevado contenido en  $\beta$ -caroteno son más resistentes a la fotoinhibición de la fotosíntesis en comparación con otras con bajo contenido en este pigmento. La protección frente a la fotoinhibición en células de *Dunaliella* con un alto contenido en  $\beta$ -caroteno es muy fuerte cuando se usa exclusivamente el rango azul de visible como factor fotoinhibitorio, menor cuando es la luz visible y no existe cuando se emplea únicamente el rango rojo del visible. Estas

observaciones evidencian que la acumulación masiva de  $\beta$ -caroteno protege el alga frente al daño oxidativo provocado por altas irradiancias a través de la absorción en la región azul del espectro (Ben-Amotz et al., 1989).

Otro tipo de radiaciones más energéticas que las PAR son las radiaciones ultravioleta (UV). Los estudios sobre la influencia de las radiaciones UV en las microalgas han revelado efectos tanto positivos como negativos (Horwitz, 1994). Algunos de los carotenoides de valor comercial producidos por la microalga *Dunaliella bardawil* absorben radiaciones UV (Tsukida et al., 1982).

Considerando la funcionalidad de los carotenoides en la neutralización de radicales libres y el singlete de oxígeno, es en principio coherente vincular a la respuesta antioxidante de la microalga a la posible acumulación de carotenoides en cultivos de *Dunaliella* incubados bajo radiación UV.

La temperatura es una de las variables ambientales más importantes que afectan al crecimiento y al desarrollo de organismos vivos, influyendo en el control de la concentración y actividad enzimática y, por tanto, en el nivel de carotenoides acumulados (Hayman et al., 1975). *Dunaliella* presenta un incremento del  $\beta$ -caroteno intracelular 7,5 veces superior cuando la temperatura desciende de 34 a 17 °C. En *Haematococcus*, el contenido de carotenoides aumenta hasta 3 veces al incrementar la temperatura (Tjahjono et al., 1994).

## **2.6. Factores que estimulan la acumulación de carotenoides.**

Comúnmente se acepta que en condiciones de estrés se ralentiza el crecimiento de la microalga y se activa la producción de carotenoides. Entre tales condiciones se incluirían las ya citadas, de alta intensidad de luz y limitación de nitrógeno y/o otros nutrientes, además de alta concentración de sal, pH extremo, temperatura baja, o presencia de agentes oxidantes como herbicidas. A continuación se describe detalladamente el efecto de algunos de los factores citados sobre la acumulación de  $\beta$ -caroteno.

**A) Factores nutricionales: compuestos químicos, sales y limitación de nutrientes.**

Numerosos agentes químicos afectan a la carotenogénesis en gran número de microorganismos. Entre ellos destacan sales, aminas, alcaloides y antibióticos (Govind et al., 1982).

La máxima acumulación de  $\beta$ -caroteno en la célula es dependiente de la salinidad. La formación de carotenoides es rápida, por ejemplo, cuando la salinidad del medio se incrementa del 15 al 25 % de NaCl, se observa un aumento lineal del contenido en carotenoides totales de 10 a 260 mg.g<sup>-1</sup> de proteína, en 4 o 5 días (Borowitzka y Borowitzka, 1990). *Haematococcus pluvialis* incrementó la producción de astaxantina cuando se incubó en medios suplementados con sal férrica (Tjahjono et al., 1994). *Chlorococcum* también mostró una tendencia hacia la acumulación de carotenoides en presencia de sales inorgánicas (Liu y Lee, 2000).

Por su parte, el efecto de la carencia de algunos nutrientes, como el nitrógeno, fósforo y azufre, sobre la acumulación de carotenoides en *Dunaliella*, está descrito por algunos autores (Mil'ko, 1963). La limitación de nitrógeno ralentiza el crecimiento, lo que implica un incremento de la cantidad de energía absorbida por el alga durante su ciclo de división celular. Cuanto más elevada sea la radiación incidente por célula, menor será su tasa de crecimiento y mayor su contenido en  $\beta$ -caroteno (Ben-Amotz et al., 1989).

**B) Inductores e inhibidores**

Se ha demostrado que el tratamiento con Norflurazón (un herbicida bien conocido) en el cultivo de *D. salina*, bloquea la producción de  $\beta$ -caroteno mediante la inhibición de la fitoeno desaturasa, una enzima unida a la membrana tilacoide que cataliza la oxidación de fitoeno (Ben-Amotz et al., 1987; Breitenbach et al., 2001). Recientemente, León et al., (2005) optimizó la acumulación de fitoeno en cultivos de *D. Bardawil* por el uso combinado de Norflurazón y sistemas orgánicos

acuosos de dos fases. Ellos lograron alcanzar aproximadamente 47 g de fitoeno por litro de cultivo en la fase orgánica.

La zeaxantina y la luteína al igual que otras xantofilas, son también antioxidantes y productos valiosos pero lamentablemente no están disponible comercialmente a través de síntesis química o biológica. Varios intentos se han hecho para producir zeaxantina a partir de bacterias no carotenogénicas y la cianobacteria *Synechocystis* (Albrecht et al., 1999; Lagarde et al., 2000). Las microalgas ofrecen una fuente comercial alternativa para zeaxantina con las ventajas de un crecimiento rápido y de bajo costo y la posibilidad de producción simultánea de otros compuestos valiosos. Varias estrategias se han utilizado para maximizar la producción de  $\beta$ -caroteno por unidad de tiempo y por volumen de cultivo (Borowitzka y Borowitzka, 1990; Ben-Amotz, 1995; García-González et al., 2003).

Estas estrategias se basan en las observaciones de que las condiciones severas, tales como altas salinidades, los niveles de nutrientes bajos y altas temperaturas combinadas con alta irradiación, retardan el crecimiento y, al mismo tiempo, inducen la producción de  $\beta$ -caroteno en la célula. De hecho, cuanto mayor es la intensidad de estrés, más lenta será la tasa de crecimiento del alga y mayor es la cantidad total de la luz absorbida por la célula durante un ciclo de división. Esta situación puede conducir a una mayor acumulación de  $\beta$ -caroteno por célula. Sin embargo, estas condiciones al mismo tiempo disminuyen el número de células por unidad de volumen de cultivo al afectar la viabilidad celular. Ben-Amotz y Avron, (1983) mostraron que la salinidad y la irradiancia tienen un efecto aditivo o sinérgico sobre la carotenogénesis en *D. bardawil*. Por el contrario, la falta de nutrientes prolongada puede llevar a la alta mortalidad de las algas.

Por lo tanto, se recomienda que el ajuste de la luz y la salinidad, probablemente son las mejores estrategias para lograr una producción óptima de  $\beta$ -caroteno en cultivos masivos de *D. salina* (Marin et al., 1998). Además, el aumento de la salinidad puede inhibir el crecimiento de depredadores de *Dunaliella* y de

especies de *Dunaliella* no carotenogénicas que naturalmente habitan en estanques abiertos (Borowitzka y Borowitzka, 1990). Por el contrario, otros autores comentaron que la salinidad no tiene un claro efecto sobre la acumulación de  $\beta$ -caroteno por célula (Gómez et al., 2003). La explicación de estos informes controversiales probablemente está relacionado con el hecho de que el efecto de la salinidad, al igual que otros factores que inducen a la producción  $\beta$ -caroteno en *D. salina*, es dependiente de la cepa. Chen y Chi (1981) propusieron un método de dos etapas para el cultivo de *Dunaliella*; en la primera etapa las células se cultivan en un medio rico en nutrientes y 18% de NaCl; luego se pasa a una segunda para la inducción de carotenoides, en la que el medio de cultivo es deficiente en nutriente y la concentración de sal es de aproximadamente 27%.

Borowitzka y Borowitzka (1990) afirmaron que este procedimiento no era viable debido a que en la primera etapa hay menor salinidad y sería blanco de contaminación por protozoarios y depredadores y otras especies de *Dunaliella* no carotenogénicas que puede conducir a una disminución rápida de la biomasa de algas. Por lo tanto, algunos autores propusieron un modo semi-continuo en el que las células se cultivan en estanques en un medio de salinidad intermedia (Borowitzka y Borowitzka, 1990). Ben-Amotz, (1995) propuso una nueva estrategia de crecimiento de *D. salina* en dos fases para la producción de  $\beta$ -caroteno. En este modo, las células se cultivaron en primer lugar en pequeños estanques de cría para alcanzar la biomasa óptima y luego eran transferidas a grandes estanques de producción y el medio se diluye mediante la adición de un medio deficiente en nitrato y/o mayor concentración de sal, aproximadamente un tercio para la inducción de carotenoides (Ben-Amotz, 1995; Hosseini Tafreshi y Shariati, 2006). Usando esta estrategia, se han reportado productividades de hasta  $450 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  en la primera etapa y  $300 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  en la segunda etapa, en comparación con la productividad baja de  $200 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$ , utilizando un método de una sola etapa de cultivo (Ben-Amotz, 1995).

La técnica de la dilución en la inducción de carotenoides, está de acuerdo con el hecho, de que por encima de la intensidad de la luz y el estrés, un factor más importante para la carotenogénesis en *D. salina* es la densidad o el tiempo de permanencia de las células en los estanques (Grobbelaar, 1995). A mayor densidad, la cantidad de luz absorbida por una célula es baja (debido al efecto de sombreado) y por lo tanto el tiempo de residencia de la célula en estanques requeridos para alcanzar el contenido de  $\beta$ -caroteno máximo es más largo. En consecuencia, la optimización de la densidad en la que se obtendría mayor contenido de carotenoides es un paso importante tanto en estanques y fotobiorreactores. García-González et al., (2003) reportaron que los valores óptimos de la densidad de población, que producen la más alta tasa de producción de  $\beta$ -caroteno en régimen semicontinuo, tenían entre 0 y  $7,9 \cdot 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$  que era similar a los observados por Ben-Amotz (1995) en el modo de dos fases. Los parámetros de funcionamiento de los sistemas de cultivo como la velocidad de mezcla, la profundidad del cultivo, etc., también pueden afectar la velocidad de producción y serán considerados más adelante.

Desde un punto de vista biotecnológico, es deseable aumentar la relación de 9-*cis* a all-*trans* de  $\beta$ -caroteno en la célula porque el isómero 9-*cis* ha demostrado ser mejor antioxidante y preventivo del cáncer (Chidambara Murthy et al., 2005). La información acerca de las condiciones que desencadenan la síntesis de 9-*cis* isómero, así como la acumulación de  $\beta$ -caroteno también es controversial.

Estudios sobre *D. bardawil* han demostrado que la alta radiación (hasta  $2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) favorece la acumulación del isómero 9-*cis* (Ben-Amotz et al., 1988). García-González et al., (2005) también encontró que un enfoque adecuado para la producción de alta calidad de  $\beta$ -caroteno con alto contenido del isómero 9-*cis*, es el cultivo de *Dunaliella* en fotobiorreactores tubulares cerrados, que tienen mayor iluminación en comparación a estanques. Por el contrario, otros autores observaron que la disminución de la intensidad de la luz podría promover una mayor proporción de 9-*cis* a all-*trans* en diferentes cepas de *D. salina* (Orset y Young, 2000). Gómez et al., (2003) encontró que la cepa de Chile CONC-007 de *D. salina* no aumentó la

relación del isómero 9-cis a all- *trans* cuando se cultiva en salinidades más altas. La exposición a baja temperatura en el rango de 10 - 15 °C también podría inducir la síntesis del isómero 9-cis de en *D. bardawil* (Ben-Amotz, 1996).

En consecuencia, existe una gran variabilidad fisiológica en respuesta a diferentes factores de inducción de caroteno entre diferentes cepas de *D. salina*. La respuesta intrínseca de cada cepa a cada factor inductivo junto a las complejas interacciones entre diversas condiciones ambientales demuestra que no hay una única condición predecible para alcanzar el máximo contenido de carotenoide del isómero de 9-cis de  $\beta$ -caroteno por unidad de tiempo y por unidad de volumen. El procedimiento de optimización debe hacerse mediante pruebas de las mejores cepas y las estrategias más eficaces en condiciones óptimas.

Recientemente, Mojaat et al., (2008) estudiaron los efectos de iones de  $Fe^{2+}$  y fuentes de carbono orgánico en el crecimiento y la carotenogénesis de *Dunaliella salina*. En su estudio, se observó un aumento significativo en el contenido de  $\beta$ -caroteno por célula, con un valor máximo de la célula de  $70 \text{ pg.célula}^{-1}$  cuando el cultivo se suplementó con etilo y  $FeSO_4$ . El enfoque podría ser un método alternativo para la producción de carotenoides por algas en fotobiorreactores después de la optimización.

### C) **Ácido giberélico (AG3).**

Entre los compuestos químicos implicados en la respuesta de las plantas al estrés se encuentran las hormonas vegetales o fitohormonas.

La fitohormona GA pertenece a una gran familia de diterpenoides tetracíclicos y están constituidas por un anillo giberelano (Figura 6). Desde su descubrimiento en la década de 1950, muchas variantes estructurales se han identificado en una variedad de plantas, hongos y bacterias. Hacia 1935 se utilizó por primera vez el término giberelina, cuando unos fitopatólogos japoneses descubrieron una sustancia producida por el hongo *Gibberella fujikuroi* que causa

crecimiento excesivo de los tallos y brotes de la planta del arroz, provocando la enfermedad conocida como “bakanae”. A mediados de los años 50, se aisló a partir del filtrado secretado por el hongo, el compuesto inductor del crecimiento del tallo que se denominó ácido giberélico (giberelina A3 o AG3), (Hedden y Proebsting, 1999; Talón, 2000).

Sólo un número limitado de éstos, a saber, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub> y GA<sub>7</sub>, se cree que tienen actividad biológica (Gottgens et al., 2009). En la mayoría de las especies de plantas, GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> son las formas primarias asociadas con la modulación del crecimiento y desarrollo; que son activos durante todo el ciclo de vida de la planta, incluyendo la germinación de las semillas, la elongación del hipocótilo, expansión de la hoja y la inducción floral (Gottgens et al., 2009). Aunque suministro exógeno de AG y los experimentos de injerto han demostrado que tanto el AG bioactivo y algunos de sus precursores pueden ser trasladados a través de largas distancias dentro de la planta.

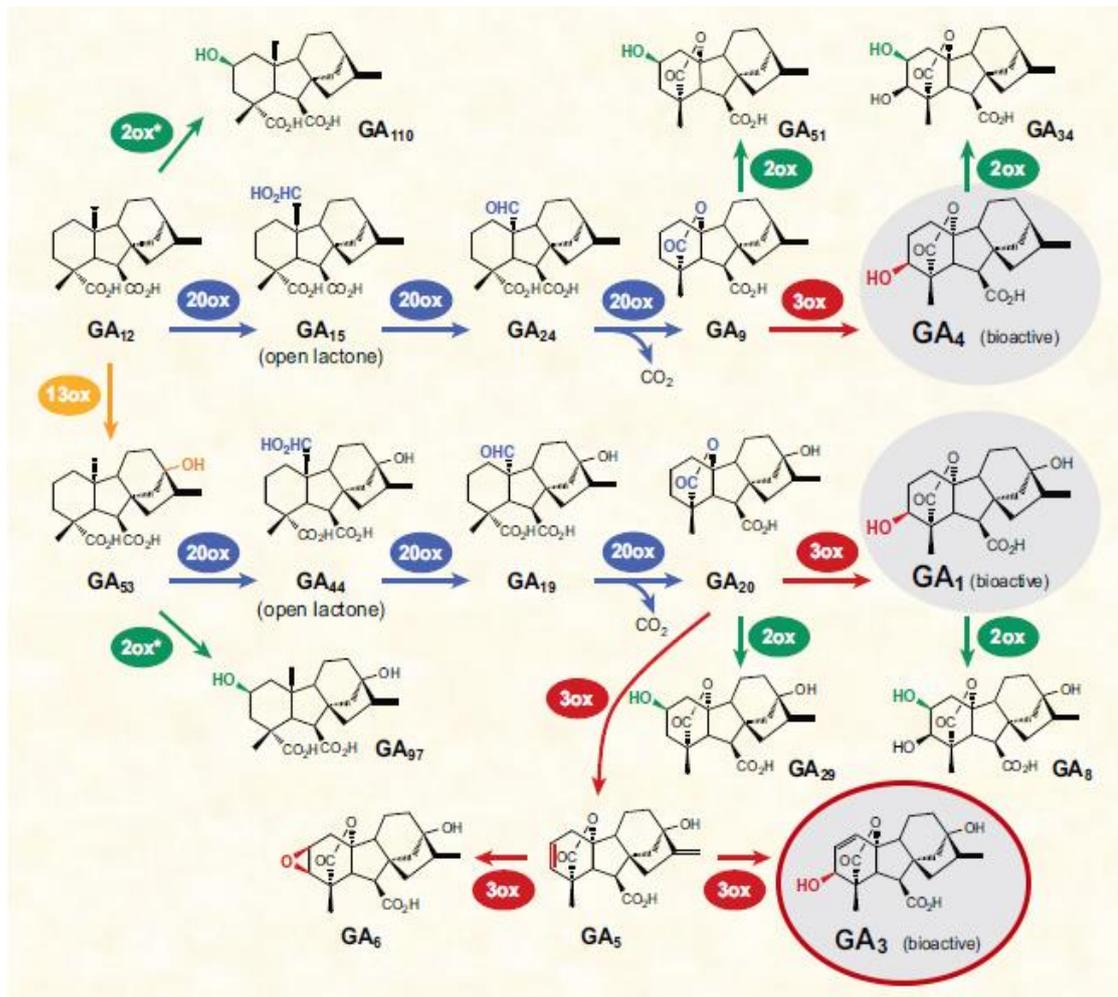


Figura 6. Estructura básica de los AGs, están constituidas por un anillo giberelano, algunos de los cuales poseen actividad hormonal (AG3) (Talón, 2000).

## 2.7. Sistemas de Cultivo

El cultivo en masa de microalgas se han desarrollado en diversos tipos de sistemas, que incluyen grandes estanques abiertos, estanques circulares, estanques de rodadura, estanques en cascada, tanques, fermentadores heterótrofos y varios tipos de fotobiorreactores cerrados (Borowitzka, 1999; Pulz, 2001). Las propiedades intrínsecas de las algas son uno de los factores más importantes a

considerar para la selección de un sistema de cultivo práctico. *Dunaliella*, al igual que otras dos microalgas usadas comercialmente, *Chlorella* y *Spirulina*; pueden crecer bien en un medio altamente selectivo y por lo tanto pueden ser fácilmente cultivadas a altas concentraciones de sal en los estanques al aire libre (Borowitzka y Borowitzka 1988a). Cultivos superintensivos de *Dunaliella* se han desarrollado en diversos tipos de fotobiorreactores (Ben-Amotz, 1993; Su et al., 2003). En comparación con estanques abiertos, tales sistemas son mucho más asépticos y producen una mayor biomasa y mayor concentración de carotenoides.

#### **A) Fotobiorreactores**

Un fotobiorreactor es un dispositivo técnico cerrado diseñado para producir microorganismos fotosintéticos en colaboración con los requerimientos óptimos de luz, mezclado, transferencia masa y calor (Pulz, 2001). Se refiere a un sistema cerrado, ya que este se encuentra asilado del medio ambiente sin intercambio de gases y fuentes de contaminación externas. Los FBR presentan mayores ventajas que los sistemas cerrados siendo el control de las condiciones de cultivo la de mayor importancia. Considerando también los factores económicos, los FBR son hoy en día reconocidos por su alta producción de biomasa y bajo costo comparados a los sistemas abiertos (Chisti, 2007).

El crecimiento de las algas en un fotobiorreactor reduce el riesgo de contaminación, mejora la reproducibilidad de las condiciones de cultivo, brinda un mayor control de las condiciones hidrodinámicas y temperatura, además de permitir un diseño técnico apropiado (Singh y Sharma, 2012). Este diseño puede ser plano o tubular y adoptar una gran variedad de configuraciones y modos de operación, además de ofrecer una mayor productividad y calidad de la biomasa generada. Sin embargo, a pesar de la viabilidad de los FBR, los cuales han estado bajo condiciones de desarrollo durante la década pasada, sólo algunos pueden ser utilizados para la producción de biomasa y metabolitos de interés.

Los fotobiorreactores industriales son excelentes sistemas para controlar múltiples parámetros del cultivo y por lo tanto para el cultivo de microorganismos fotosintéticos, como las células de microalgas, cianobacterias y vegetales. La biomasa de microalgas obtenida de esta manera se puede procesar para producir productos valiosos de tipo nutracéuticos tales como ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides, así como productos químicos especiales tales como los compuestos radiomarcados, o alternativamente como alimento en las industrias acuícolas. Generalmente, se utilizan tres diseños básicos de estos sistemas cerrados desarrollados para el cultivo comercial de microalga: biorreactores de tipo panel delgado, fotobiorreactores tubulares y configuraciones inmovilizadas ultrafinos (Borowitzka, 1996, 1999; Tredici y Zitelli, 1997; Pulz, 2001).

Todos estos reactores tienen como fin distribuir la cantidad de luz y nutrientes de manera uniforme a cada célula y mejora el intercambio de gases con una mezcla óptima del medio y la reducción de la trayectoria de la luz. Otras consideraciones importantes son el control de los parámetros de crecimiento. Por lo tanto, la optimización de estos procesos es una necesidad para optimizar la productividad de *Dunaliella*. En fotobiorreactores cerrados el pH, oxígeno disuelto, temperatura e intensidad de luz son controlados (Li et al., 2002; Su et al., 2003). Recientemente, Zhu Jiang (2008); diseñó y optimizó un fotobiorreactor helicoidal tubular con un volumen de 10 L para el cultivo de *Dunaliella salina*.

### **Fotobiorreactor tipo Panel**

Son fotobiorreactores tipo pantalla delgada (flat panel) que tienen la gran ventaja de permitir un mayor paso de luz (Figura 7), sus características son:

- El paso óptico se puede hacer tan delgado como se quiera.
- Es posible escalar el FBR incrementando su longitud, sin modificar la altura de líquido ni el paso óptico.
- Pueden construirse de manera muy sencilla y económica: es suficiente

un bastidor y un recubrimiento plástico.

- Se pueden construir inclinados y es posible orientarlos hacia el sol, para maximizar así la captación de luz y con ello la productividad.

En la práctica no es fácil construir fotobiorreactores planos demasiado largos por la dificultad que tiene esta geometría para soportar la presión hidrostática. Además, pese a que pueden inclinarse, siguen siendo dispositivos verticales (dependen del burbujeo).



**Figura 7. Fotobiorreactor tipo panel (Fuente: Ami Ben-Amotz et al., 2009)**

### **Fotobiorreactor tubular**

Los fotobiorreactores tubulares son fáciles de construir ya que su forma cilíndrica ayuda a distribuir la luz y soporta bien la presión en la base (Figura 8). Son dispositivos sencillos ya que el burbujeo proporciona la mezcla del sistema que

permite la retirada del  $O_2$  y el aporte de  $CO_2$  que se puede mezclar con la corriente de aireación. Lleva recirculación interna con el objeto de mejorar el flujo y prolongar el contacto de los gases, mejorando así la transferencia de materia. Su principal problema es el escalado.

Es difícil construirlas de gran volumen ya que al aumentar el diámetro se aumenta muy deprisa la proporción de volumen oscuro, disminuyendo la productividad. Tampoco es posible hacerlas muy altas ya que la presión en la base dificulta el burbujeo y causa estrés hidrodinámico. Por su posición vertical, tampoco son buenas captadoras de luz, especialmente a mediodía, que es precisamente cuando la radiación solar es máxima. Es difícil construir columnas inclinadas ya que pierden muchas de sus ventajas.



**Figura 8. Fotobiorreactor tubular. (Fuente: Ami Ben-Amotz et al., 2009)**

Existen diversos factores que influyen ampliamente en el cultivo de microalgas y determinan el diseño del reactor a emplear. La baja densidad celular

origina varios inconvenientes, incluyendo baja productividad, fácil contaminación, costosa recuperación del producto de medios diluidos y dificultad para el control de la temperatura en los sistemas de cultivo cerrados. Estos inconvenientes estimularon el desarrollo de fotobiorreactores construidos con materiales transparentes como vidrio y policarbonato, entre otros materiales. Los primeros FBR fueron propuestos por Gudin y Chaumont (1983), Pirt y col. (1983), y Torzillo y col. (1986). En la última década los fotobiorreactores tubulares y de placas planas han recibido mucha atención ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres o más veces en comparación con los sistemas convencionales. En seguida se enlistan las principales ventajas que ofrecen este tipo de cultivo de microalgas:

1. Facilidad para cosechar la biomasa.
2. Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
3. Mejor control de las condiciones de cultivo.
4. Menor inversión de capital en el fotobiorreactor.

Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de metabolitos secundarios de microalgas. Actualmente existen diversos tipos de fotobiorreactores disponibles, entre los cuales se encuentran las columnas de burbujeo, los reactores air-lift y los tanques agitados, así como los de tipo tubular y cónico. Los FBR son generalmente categorizados de acuerdo a su estructura y su producción de biomasa, de los cuales los tubulares, los de superficie plana (panel) y las columnas verticales son los más comunes.

Los fotobiorreactores de tipo tubular son el diseño más sustentable para temas cerrados tienen un gran área de iluminación con una buena tasa de producción de biomasa y son relativamente económicos puesto que son construidos en vidrio o plástico (Pulz, 2001; Ugwu y col., 2008). El diseño de tipo panel, son generalmente construidos con materiales transparentes con la finalidad de maximizar el empleo de la luz solar. Este diseño permite una mejor trayectoria incidente de la luz en el cultivo facilitando los ciclos de luz-oscuridad, aumentando la producción de

biomasa y otros compuestos en las microalgas. También permite una buena inmovilización de las microalgas y una sustentable utilización de la energía, además de un fácil mantenimiento y limpieza (Reyna-Velarde et al., 2010).

Los diseños de tipo tubular vertical son compactos, económicos y fáciles de operar, lo que los hace factibles al escalamiento (Ugwu et al., 2008). Otro diseño de fotobiorreactores que cuenta con una amplia superficie de iluminación es el denominado flat-panel o fotobiorreactor de superficie plana.

## **B) Otros sistemas de cultivo**

Hoy en día, los sistemas comerciales más comunes para el cultivo masivo de *Dunaliella* son estanques al aire libre (Borowitzka, 1999). Las plantas de producción de *Dunaliella* se encuentran en áreas con un clima cálido y seco, con nubosidad mínima y comúnmente situado en, o cerca de una fuente adecuada de salmuera. Estos sitios también deben estar alejados de la contaminación que afecta a la calidad o cantidad de crecimiento celular o de los productos finales. Hay dos tipos principales de sistemas al aire libre actualmente utilizados para el cultivo de esta alga: primero, grandes estanques de hasta 250 hectáreas, como los que se encuentran en Australia (Borowitzka y Borowitzka, 1990).

La empresa Betatene Ltd (ahora Henkel-Cognis) y Western Biotechnology Ltd fueron las primeras empresas australianas que cultivaron *Dunaliella salina* para la producción de  $\beta$ -caroteno en 1986, utilizando el modo extensivo. Henkel-Cognis, el mayor productor de *D. salina* en el mundo, construyó un gran estanque de algas en Whyalla, Australia del Sur, con una profundidad de aproximadamente 20 cm por la modificación de un lago de sal natural. Western Biotech también construyó un estanque en el río Hutt que fue tomada hace poco por Cognis (Curtain, 2000).

Ambos sitios se basan en que los lagos de sal naturales ya tenían las poblaciones naturales densas de *D. salina*. De manera típica, las algas se cultivan a altas salinidades que se producen en estos lagos naturales saturados de sal. Para

controlar la salinidad, el agua de mar con menor concentración de sal se bombea desde el sitio hacia la laguna y luego se añaden cantidades apropiadas de nutrientes para un crecimiento óptimo. Después de que los estanques alcancen el contenido apropiado de  $\beta$ -caroteno el cultivo se transfiere entonces a la planta de la cosecha en la orilla y se devuelve el medio restante a los estanques (Borowitzka, 1990).

Alternativamente, el estanque se agita con rueda de paletas utilizado en varias áreas del mundo (Ben-Amotz y Avron, 1990; Ben-Amotz, 1995). (Figura 9). Los estanques generalmente se construyen con ladrillo, hormigón, tierra o fibra de vidrio con una superficie de aproximadamente 1000 a 4000 m<sup>2</sup>. El CO<sub>2</sub> gaseoso se utiliza generalmente para proporcionar fuente de carbono inorgánico y para controlar el pH. Los detalles de estos sistemas y sus consideraciones técnicas se pueden encontrar en Oswald (1988); Ben-Amotz y Avron (1989).



**Figura 9. Sistema abierto de cultivo que muestra una estanque con rueda de paletas (Ami Ben-Amotz et al, 2009).**

El cultivo al aire libre se puede operar ya sea en lotes o modos semi-continuos. La mezcla de los cultivos tiene varias ventajas. Se puede prevenir con

eficacia la sedimentación celular y la estratificación térmica y ayudar a la distribución de nutrientes y la eliminación de exceso de oxígeno. La mezcla del cultivo reduce el fotodaño (fotoinhibición) generalmente causada por la exposición de las algas a altas intensidades y concentraciones de oxígeno disuelto.

Los parámetros que afectan a las productividades de las algas en estanques, son la tasa de mezcla, la profundidad del cultivo, tamaño del inóculo, etc. estos deben ser optimizados en cualquier caso porque el resultado puede ser variable de una condición experimental a otro. Por ejemplo, Ben-Amotz (1999), comentó que una velocidad media lineal de al menos  $15 \text{ cm.s}^{-1}$  en la velocidad del flujo es más eficiente, mientras que, estudios reportados por García-González et al., (2003) muestra las más altas productividades en estanques de  $3 \text{ m}^2$  a una velocidad de mezcla de  $55 \text{ cm.s}^{-1}$ . La profundidad del cultivo es otro factor importante. Ben-Amotz y Avron, (1989a) encontraron que no hay diferencia entre las productividades de *D. bardawil* en pequeños estanques en profundidades que varían de 5 a 30 cm porque la luz es totalmente absorbida por las células en menos de 5 cm.

En cultivos extensivos a gran escala de *Dunaliella* se logra una típica concentración de 0,1 a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno y una productividad de aproximadamente 0,05 a  $0,1 \text{ g de Dunaliella salina por m}^2.\text{día}^{-1}$ , con una máxima productividad de  $\beta$ -caroteno de  $10 \text{ mg.m}^2.\text{día}^{-1}$ . En comparación los cultivos intensivos en estanques con ruedas de paletas presentan una concentración de  $\beta$ -caroteno de 10 a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , y de 5,10 g de *Dunaliella* por  $\text{m}^2.\text{día}^{-1}.\text{m}^2$  y una productividad máxima de  $\beta$ -caroteno de 400 a  $750 \text{ mg.m}^2.\text{día}^{-1}$  (Ben- Amotz, 1993, 1995).

La selección de una producción extensiva vs. producción intensiva de cultivo depende en última instancia de los costos de la tierra y el agua, así como las condiciones climáticas de la zona. Por ejemplo, en Australia, los costos de la tierra son baratos y el agua marina es gratuita, la irradiación solar está cerca de un nivel óptimo de casi todo el año y por lo tanto las empresas como Henkel-Cognis cultivan

*Dunaliella* en grandes extensiones, con una capacidad total de 800 ha. Aunque la productividad es más baja en comparación con los sistemas en el modo intensivo, el proceso es económicamente más atractivo para la compañía porque tiene un método de cosecha eficaz y barato para procesar grandes volúmenes de salmuera (Borowitzka, 1990).

Por otra parte, otros productores como los de EE.UU. utilizan el modo intensivo de cultivo para lograr mayores densidades celulares debido a que los costos de la preparación de la tierra y el sitio en una región son significativamente más altas (Borowitzka, 1999).

## **2.8. Aspectos claves en el diseño de un FBR**

### **A) Distribución de la luz**

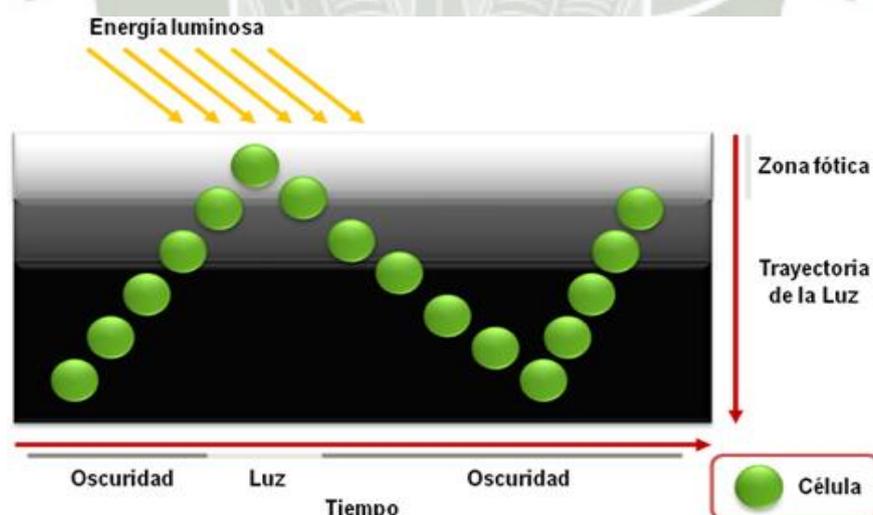
En cultivos de microorganismos fotoautótrofos la disponibilidad de luz determina la velocidad específica a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determina también la tasa específica de crecimiento. Sin embargo, en todos los sistemas de cultivo, las células más cercanas a la superficie iluminada impiden la penetración de la luz hacia el seno del medio de cultivo y producen un efecto de sombreado sobre las células más alejadas de la superficie. En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 cm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa sólo una pequeña fracción (10 – 30 %) del volumen total del cultivo. Debido a que el medio de cultivo está en constante movimiento, las células sólo son expuestas por breves instantes a la luz en ciclos que pueden durar desde milisegundos a unas cuantas décimas de segundo. En condiciones reales el factor que determina la actividad fotosintética es la cantidad de energía disponible para cada célula individual, más que la cantidad de energía luminosa incidente (Lu y Vonshak, 1999; Fernandes y col., 2010).

Los parámetros que pueden considerarse básicos para describir la disponibilidad de energía bajo una iluminación intermitente son dos, la relación de

los periodos luz/oscuridad (L/O) y la frecuencia de los ciclos L/O. Estos establecen en gran medida el régimen de iluminación, el cual es un indicador de la disponibilidad de luz para una célula individual.

La trayectoria de la luz es la distancia transversal que debe recorrer un fotón para pasar a través de un fotobiorreactor (Richmond, 1986), concepto que se ilustra en la Figura 10. Su magnitud es determinada por diferentes medidas en los diferentes tipos de reactores. Así, la trayectoria de la luz es determinada por la profundidad de líquido en un reactor de tipo carrusel, por la separación entre las placas en un reactor de placas (horizontal o vertical) o por el diámetro del tubo en un reactor tubular.

Las rutas luminosas que mejores resultados han dado en diferentes fotobiorreactores están entre 2,6 y 3,0 cm, sin embargo, en cultivos de alta densidad celular, una trayectoria de la luz de 1 cm aumenta la probabilidad de que las células en promedio estén expuestas a un régimen de iluminación óptimo (Javanmardian y Palsson, 1991). En virtud de lo anterior, actualmente no es recomendable utilizar rutas luminosas de más de 10 cm en ningún tipo de fotobiorreactor.



**Figura 10. Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos luz oscuridad (Contreras-Flores y col., 2003)**

**B) Mezclado**

El mezclado en fotobiorreactores es conocido como un factor de mejoramiento de la producción de biomasa (Lou y Al-Dahhan, 2004). El mezclado juega un rol importante en el aseguramiento de la distribución de la intensidad de luz, una suficiente transferencia gaseosa de CO<sub>2</sub> y en el mantenimiento uniforme de pH (Kommareddy y Anderson, 2003).

Un correcto mezclado favorece el intercambio gaseoso, evita la sedimentación celular, la formación de gradientes de las condiciones ambientales y de la concentración de nutrientes; pero su función principal es permitir que todas las células puedan acceder a las zonas iluminadas en un fotobiorreactor. El mezclado puede inducirse de muy diversas formas; sin embargo, los FBR del tipo air-lift se usan comúnmente por su sencillez y porque pueden diseñarse para inducir un esfuerzo de corte pequeño que no cause daño mecánico a las células (Chisti y et al., 2007).

La fragilidad celular es con frecuencia un factor que limita la intensidad de mezclado que puede aplicarse a un cultivo. En virtud de que la fragilidad celular y las características fotosintéticas, entre otros factores, pueden variar de cepa a cepa, los niveles óptimos de mezclado dependerán de cada cepa cultivada.

**C) Inyección del gas**

La introducción de CO<sub>2</sub> por medio del burbujeo dentro del FBR deber ser considerada dentro del diseño. La inyección de CO<sub>2</sub>, se refiere al proceso mediante el cual este gas es suministrado artificialmente al FBR. Varios estudios han demostrado que una aireación rica en CO<sub>2</sub> provee este gas en mayor cantidad a las microalgas, lo que desoxigena el medio y evita la fotooxidación. Sin embargo, desde un punto de vista económico, una velocidad de aireación mayor conlleva mayores costos de producción, por lo cual hace costoso el escalamiento (Zhang y col., 2002). Por otra parte, se ha estudiado la concentración óptima de CO<sub>2</sub> para la

producción de microalgas en fotobiorreactores, mostrando que el uso de aire enriquecido con 5 o 10 % (v/v) es efectivo para el cultivo de biomasa. En reactores de superficie plana (flat-panel), una velocidad de aireación de 0,05 vvm ha resultado suficiente para el mejoramiento del mezclado y la transferencia gaseosa (Sierra et al., 2008).

## 2.9. Recomendaciones para el diseño de un FBR

Para el diseño de un fotobiorreactor en el que se desee una óptima producción de biomasa es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

1. La trayectoria de la luz debe ser pequeña (no mayor a 2,5 cm).
2. Mantener una alta densidad celular (> 8 a 15 gramos de biomasa por litro de cultivo).
3. Un mezclado vigoroso para asegurar ciclos L/O de alta frecuencia.
4. Evitar inhibición del crecimiento por acumulación de O<sub>2</sub>.
5. Mantener temperatura y pH óptimos.

La luz es uno de los factores más importantes que limitan la productividad de los cultivos de microalgas. Sin embargo, algunas microalgas son capaces de crecer tanto en condiciones de fototrófia como en mixotrófia y heterotrófia.

Las fuentes de carbono orgánico más comúnmente citadas son el etanol, el acetato y la glucosa. Se ha reportado que *Haematococcus pluvialis* puede sintetizar astaxantina en heterotrófia y mixotrófia utilizando acetato de sodio como fuente de carbono, en ambos casos la concentración del pigmento es mayor a la obtenida en condiciones de fotoautotrófia, debido en parte a que el acetato promueve la obtención de mayores concentraciones celulares (Ip y Chen, 2005). También se ha estudiado la producción de  $\alpha$ -tocoferol con *Euglena gracilis* usando etanol como sustrato, en donde la producción del antioxidante aumentó hasta 2,9 veces con relación a lo obtenido en fotoautotrófia (Ogbonna y Tanaka, 2000).

La investigación acerca de la capacidad de las microalgas para utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico es importante, debido a que permitiría el cultivo de microalgas en biorreactores más convencionales (air-lift o de columna aireada por ejemplo), en los que el aprovechamiento óptimo de la energía luminosa no es factible ya sea técnica o económicamente; sin embargo éste es un campo de la biotecnología de microalgas que se encuentra en su desarrollo inicial.

## 2.10. Producción de compuestos de alto valor agregado

Las microalgas han sido reconocidas como fuentes de compuestos químicos de alto valor agregado como vitaminas, ficobiliproteínas, pigmentos, ácidos grasos esenciales, etc. Varios de estos productos son obtenidos comercialmente en sistemas en carrusel o en lagunas abiertas. Ejemplos de éstos son la producción de ficobiliproteínas y biomasa por *Spirulina sp.* en países como los Estados Unidos, India, China y Cuba, la producción de  $\beta$ -caroteno utilizando *Dunaliella sp.* en Israel y Australia (Lorenz y Cysewski, 2000) o la producción de  $\alpha$ -tocoferol por *Euglena gracilis*. La producción comercial de astaxantina utilizando *Haematococcus pluvialis* se lleva a cabo en dos fases, una de crecimiento y otra de producción del pigmento.

Una empresa en Hawái (Aquaserch, Inc) ocupa lagunas abiertas para la producción de la biomasa, y reactores tubulares para la inducción de la síntesis del pigmento, mientras que en Suecia otra empresa utiliza fotobiorreactores iluminados artificialmente en ambas fases (Olaizola, 2000). Por otra parte, el uso potencial de las microalgas en la producción de biodiesel a partir de los lípidos derivados del cultivo de microalgas ha sido ampliamente estudiado, sin embargo el proceso de producción es costoso. Se ha logrado disminuir los costos de producción con el empleo de cultivos mixotróficos obteniendo altas concentraciones de ácidos grasos en *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis* (Day y Tsavalos, 1996; Liang y col., 2009).

La producción de estas sustancias a partir de microalgas es costosa, pero se

justifica debido a la mayor aceptación del consumidor por productos naturales en lugar de productos obtenidos por síntesis química. El nicho comercial de productos derivados de microalgas y cianobacterias es altamente cambiante y depende de las regulaciones aplicadas por las agencias de protección al consumidor a los productos sintetizados convencionalmente y al uso final de estos productos, que en varios casos no está aún muy extendido y continúa siendo diversificado (ficobiliproteínas) o bien tienen usos regionales, como por ejemplo en la acuicultura del salmón (astaxantina) (Cysewski, 2004). No obstante, el empleo de fotobiorreactores modernos, sin duda será una contribución importante para reducir el costo de producción de estos compuestos y hacer más competitiva su obtención mediante la utilización de microalgas.

Desafortunadamente, a pesar de que en los sistemas cerrados se obtiene una mayor concentración de biomasa y un mejor control de los parámetros del cultivo, así como todos los demás aspectos beneficiosos, como la reducción del riesgo de contaminación, la reducción de pérdidas de CO<sub>2</sub>, diseño técnico flexible y condiciones de cultivo reproducibles, hasta hace poco los datos indicaron que la productividad volumétrica y coste de producción en estos sistemas no son mejores que los que pueden obtenerse en estanques abiertos (Lee, 2001). En comparación con estanques abiertos, el diseño de fotobiorreactores es más complejo, costoso y difícil de ampliar. Sin embargo, para aplicaciones futuras, los estanques abiertos para la producción a gran escala parecen tener un menor potencial innovador que los fotobiorreactores (Pulz, 2001).

### **Aplicaciones**

Aunque la producción de carotenoides es la principal aplicación de *Dunaliella*, se han propuesto una serie de otras aplicaciones y practicado para otras especies de este género. Estos se elaboran en la siguiente tabla (véase también el resumen en la Tabla 2).

**Tabla 2. Aplicaciones propuestas para especies de *Dunaliella* por diferentes autores.**

| Especies                         | Aplicación propuesta   | Referencias   |
|----------------------------------|--|---|
| <i>Dunaliella</i><br><i>spp.</i> | Fuente de biocombustible<br>glicerol-líquido                         | Ben-Amotz y Avron (1980); Ginzburg<br>y Ginzburg (1993); Grizeau y<br>Navarro(1986); Tsukahara y Sawayama<br>(2005) |
|                                  | Extracción de metales<br>pesados, tratamiento de<br>aguas residuales | Takimura et al. (1996); Thakur y<br>Kumar (1999); Hirata et al. (2001);<br>Tsuji et al.(2002)                       |
|                                  | Alimentos y suplementos  | Kay (1991)  |
|                                  | Fuente de carotenoides,<br>vitaminas y antioxidantes                 | Chidambara Murthy et al. (2005);<br>Milko (1963)  |
| <i>D. salina</i>                 | Fuente de PUFA ( $\omega$ 3<br>ácidos grasos<br>poliinsaturados)     | Abd El-Bakú et al. (2004)   |
|                                  | Reactores Biológicos   | Geng et al. (2003)  |
|                                  | Proteínas unicelulares<br>(SCP), minerales                           | Supamattaya et al. (2005)   |

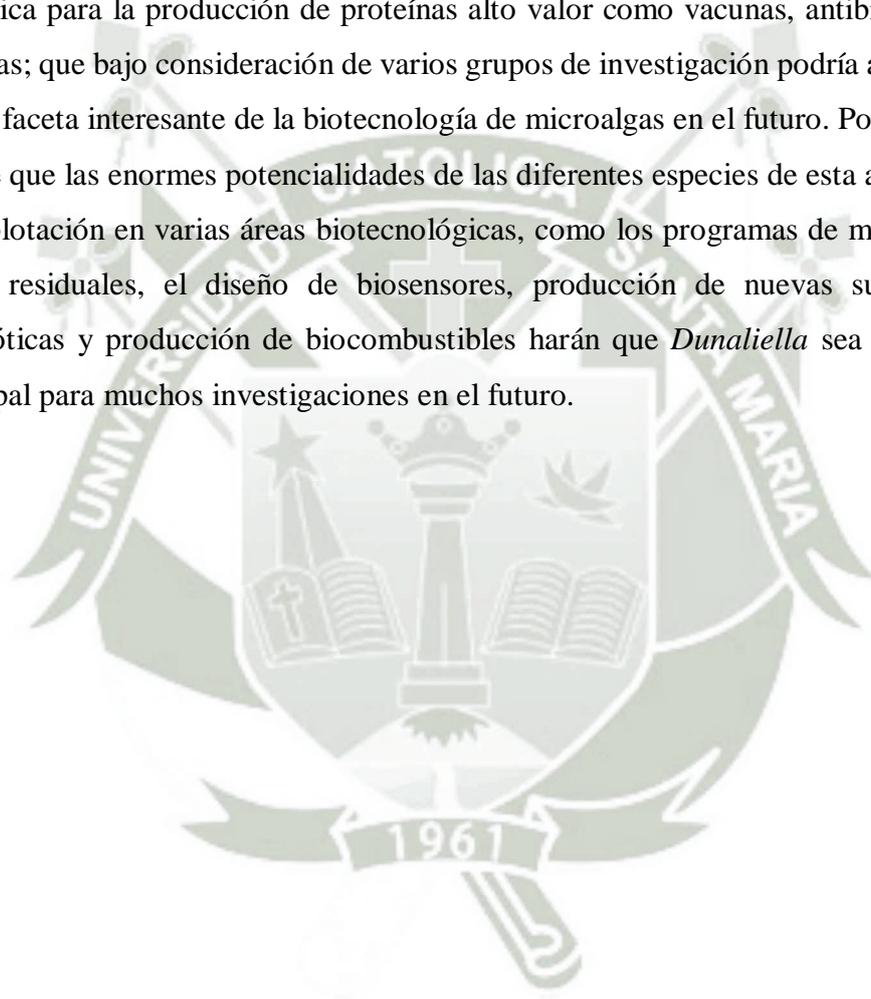
|                       |                                   |                           |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|
|                       | Enzimas                           | Ben-Amotz y Avron (1990)  |
|                       | Minerales                         | Fábregas y Herrero (1984) |
| <i>D. tertiolecta</i> | Indicadores ecológicos            | Hall y Golding (1998)     |
|                       | Fuente de compuestos bioactivos   | Borowitzka (1995)         |
| <i>D. primolecta</i>  | Fuente de sustancias antibióticas | Chang et al. (1993)       |
| <i>D. viridis</i>     | Fuente de carotenoides oxigenados | Moulton y Burford (1990)  |

### 2.11. Perspectivas

Los nuevos conocimientos sobre los efectos cancerígenos de  $\beta$ -caroteno sintético y en particular de las propiedades beneficiosas de  $\beta$ -caroteno natural de *Dunaliella* para mejorar la función del cuerpo humano promoverá la demanda del producto natural. Esto dará lugar a un mayor desarrollo de los fabricantes comerciales tradicionales y es probable atraer a nuevos productores en el cultivo *Dunaliella* para la producción de  $\beta$ -caroteno y otros fines biotecnológicos. Nuevas plantas piloto están en fase de desarrollo en la India, Chile, México, Cuba, Irán, Taiwán, Kuwait y Japón. La capacidad de inducir, modificar y ampliar *Dunaliella* para producir una serie de carotenoides poco comunes de alto valor nutricional y médica, como fitoeno y fitoflueno, también abre un nuevo campo en el área de biotecnología de *Dunaliella*.

El cultivo de *Dunaliella* en fotobiorreactores en diversos modos de cultivos autótrofos, heterótrofos y mixotróficos, así como en sistemas de dos fases son otros enfoques prometedores que requieren un mayor desarrollo para que sean más competitivos económicamente en el futuro.

La explotación de los enfoques fiables para la transformación genética y la ingeniería metabólica de *Dunaliella* combinada con su uso como una fuente biológica para la producción de proteínas alto valor como vacunas, antibióticos y enzimas; que bajo consideración de varios grupos de investigación podría abrir una nueva faceta interesante de la biotecnología de microalgas en el futuro. Por último, parece que las enormes potencialidades de las diferentes especies de esta alga para su explotación en varias áreas biotecnológicas, como los programas de manejo de aguas residuales, el diseño de biosensores, producción de nuevas sustancias antibióticas y producción de biocombustibles harán que *Dunaliella* sea un tema principal para muchos investigaciones en el futuro.



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de estudio corresponde a una investigación experimental por la manipulación de variables de interés (causa – efecto) y longitudinal prospectiva por las evaluaciones periódicas realizadas.

#### 3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

Los cultivos de la microalga *Dunaliella salina* se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio H-303 de la Universidad Católica de Santa María y posteriormente en el laboratorio del área de Biología Acuática de la Escuela Profesional y Académica de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín. El estudio se realizó en dos fases; la primera fase, para la obtención de la mayor cantidad de biomasa de *Dunaliella salina* a condiciones de laboratorio y la segunda fase fue exclusivamente para inducción de la producción de  $\beta$ -caroteno usando como inductor el AG3 en condiciones ambientales (condiciones estresantes).

#### 3.3. MATERIALES

Para la ejecución del trabajo se utilizó material biológico, químico, equipos, entre otros, que a continuación se detalla:

##### A) Equipos:

- Fotobiorreactores en panel de 4000 mL.
- Fotobiorreactores tubulares de 2000 mL.
- Centrífuga 10000 rpm.

- Espectrofotómetro UV/Visible.
- Microscopio óptico con objetivo de 100X.

**B) Material de vidrio:**

- Botellas de vidrio 250, 500 y 1000ml (Marca Boeco).
- Pipetas de 2 y 10ml, (Kyntel).
- Vasos de precipitado de 500ml (Kyntel).
- Pipeta de 10 ml, (Kyntel).
- Pipeta de 1 ml, (Boeco).
- Tubos de ensayo, 12x75 mL borosilicato (Giardino).
- Probeta de 250 ml, (Kyntel).
- Probeta de 500 ml, (Kyntel).
- Matraz de 1000 mL.
- Embudo de vidrio.
- Tubos de ensayo de 75x100 mL.
- Porta objetos y cubre objetos.
- Probetas de 100 mL, 250 mL y 500 mL.

**C) Reactivos:**

- NaCl, KNO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, EDTA·Na<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, I<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, cianocobalamina cristalina (B12), tiamina clorhídrica (B1), biotina cristalina.

**D) Biológico:**

- Microalga *Dunaliella salina* procedente del laboratorio de Biología marina de la Escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

**E) Otros Materiales:**

- Gradilla para 48 tubos de ensayo.
- Aireadores de 5 Watts.
- Mangueras.
- Llaves de paso para flujo de aire.

**3.4. MÉTODOS****3.4.1. Obtención de muestras de *Dunaliella salina***

La Cepa aislada y plenamente identificada de *Dunaliella salina* fue proporcionada por el laboratorio de Biología marina de la Escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

**3.4.2. Cultivo de *Dunaliella salina* para la obtención de biomasa como inóculo**

La obtención de biomasa de *Dunaliella salina* para inóculo se realizó usando escalonadamente fotobiorreactores de 250, 500 y 1000 mL. El cultivo se realizó

bajo condiciones de laboratorio en cámara de cultivo (26 °C, pH 8, iluminación de 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , 5 % de  $\text{CO}_2$ ) y fotoperiodo largo (16 hrs. de luz y 8 hrs. de oscuridad).

Para su propagación se utilizó el medio de cultivo de Guillard (Guillard, 1975) el cual presenta por litro de agua de mar: 37 g de NaCl; 75 mg de  $\text{KNO}_3$ ; 5,65 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 4,360 mg  $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ ; 3,150 mg  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,010 mg  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,022 mg  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,010 mg  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,180 mg  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,006 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . El medio de cultivo fue ajustado a pH 8 y esterilizado a 120 °C y 15 Lb de presión durante 15 min.

### 3.4.3. Construcción del fotobiorreactor tubular y panel con aireación air lift, para el cultivo de *Dunaliella salina*.

Para el cultivo de *Dunaliella salina* se construyó dos tipos de fotobiorreactores tubular y de panel.

El fotobiorreactor tuvo una altura de 26 cm, diámetro interno de 10 cm y un volumen total de 2042 mL. Este fotobiorreactor estuvo provisto de una tapa rosca, un aireador (conducto para el ingreso de aire y  $\text{CO}_2$ ), un desgasificador y una malla de acero con poros de 3 mm ubicada a una distancia de 3 cm de su base como se muestra en el siguiente diagrama (Figura 11).

La superficie ( $S_i$ ) del fotobiorreactor tubular expuesta a la luz se calculó mediante la ecuación:

$$As_t = 2\pi \times r \times h_t$$

Dónde:

$As_t$ : Área superficie iluminada ( $\text{m}^2$ )

r: radio del fotobiorreactor tubular(m)

$h_t$ : altura del fotobiorreactor tubular (m)



**Figura 11. Esquema del fotobiorreactor tubular que muestra la adición de un mezclador (placa con poros).**

Así mismo se construyeron fotobiorreactores tipo panel air-lift de material vidrio de 4050 mL de volumen total, con una altura de 45 cm, 30 cm de ancho y 3 cm de espesor. Estos fotobiorreactores presentaron una tapa impermeable, un aireador (conducto para el ingreso de aire y  $\text{CO}_2$ ) un desgasificador, un orificio para el ingreso del medio de cultivo, 5 divisiones horizontales intercaladas (Listones de material vidrio) y una división vertical ubicada hacia un lado del panel como se muestra en el siguiente diagrama (Figura 12).

La superficie ( $S_i$ ) del fotobiorreactor tubular expuesta a la luz se calculó mediante la ecuación:

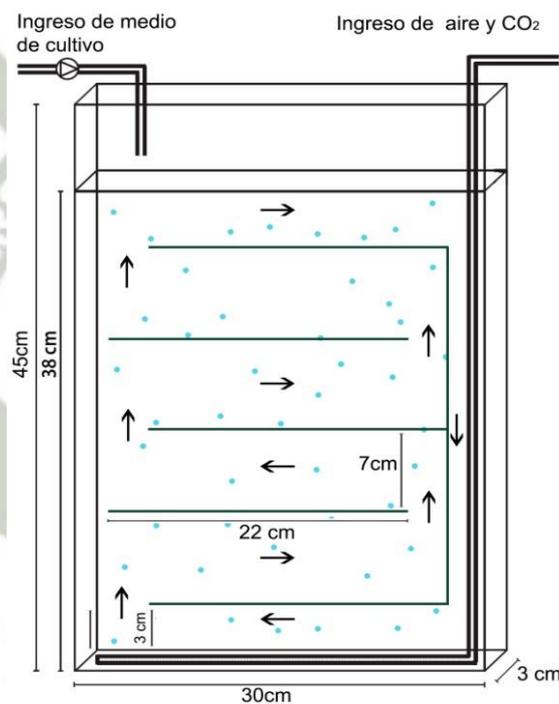
$$As_p = a \times h_p$$

Dónde:

$As_p$ : Área superficial iluminada del fotobiorreactor tipo panel ( $m^2$ )

$a$ : ancho del fotobiorreactor tipo panel (m)

$h_p$ : altura del fotobiorreactor tipo panel (m)



**Figura 12. Esquema de fotobiorreactor tipo panel air-lift que muestra separadores horizontales (deflectores) para mejorar la circulación.**

Los fotobiorreactores tubular y panel antes de su uso fueron lavados y esterilizados con lejía al 5% y alcohol al 70%. Cada fotobiorreactor fue llenado al 90% de su volumen con medio de cultivo y 10% de inóculo de la microalga. La

aireación de los fotobiorreactores se realizó mediante una bomba de aire, modelo ACQ-001; Electromagnetic Air Compress, de la empresa BOYU. La suplementación CO<sub>2</sub> se realizó mediante un balón de CO<sub>2</sub> de 3 Kg de capacidad.

#### 3.4.4. Evaluación del crecimiento de *Dunaliella salina* bajo condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift previa a la fase de inducción de $\beta$ -caroteno.

##### A) Recuento celular y cinética del crecimiento

El crecimiento de *Dunaliella salina* se evaluó cada 24 horas mediante recuento en cámara de Neubauer y microscopio óptico a 10X. Para lo cual se tomó 1 mL de cada unidad experimental a la cual se le añadió 9 mL de agua destilada (dilución 1:10) en tubos de ensayo y se fijó en lugol. El recuento de cada muestra se realizó por conteo de 4 campos de la cámara de Neubauer, a la sumatoria de los campos se multiplicó por 16 (total de campos) y por 10, por ser la dilución utilizada (Serrano B. et al, 2011). El registro se dió en células.mL<sup>-1</sup> del cultivo.

La tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) de las células se calculó a partir de la fase logarítmica inicial de crecimiento como:

$$\mu = \frac{(\ln C_2 - \ln C_1)}{t}$$

Dónde:

C<sub>2</sub>: concentración celular final (organismos.mL<sup>-1</sup>)

C<sub>1</sub>: concentración celular inicial (organismos.mL<sup>-1</sup>)

t: tiempo requerido para el aumento de la concentración de C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> (días)

**B) Contenido de clorofila**

El contenido de clorofila a, b y total en la biomasa se cuantificó por espectrofotometría UV/VIS, de acuerdo con el método propuesto por Ziegler y Egle (1965). Se tomaron muestras de 5 ml de la suspensión celular de cada reactor y se transfirió a tubos de ensayo y se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular de *D. salina* se lavó para quitar las sales, luego se resuspendieron en acetona al 80 % y se incubaron a 80 °C durante 10 min. Los restos celulares se eliminaron del extracto por centrifugación (10 min, 1200 rpm). La absorbancia del extracto se midió a 663 y 647 nm y el contenido de la clorofila a, b y total se calculó mediante el uso de ecuaciones según Harmut y Lichtenthaler (1987).

$$Chl\ a = 5[(12,25\ Abs\ 663\ nm) - (2,73\ Abs\ 647\ nm)]$$

$$Chl\ b = 5[(21,5\ Abs\ 647\ nm) - (5,1\ Abs\ 663\ nm)]$$

$$Chl\ total = Chl\ a + Chl\ b$$

Dónde:

Chl a: concentración clorofila a ( $mg.L^{-1}$ )

Chl b: concentración clorofila b ( $mg.L^{-1}$ )

Chl total: concentración clorofila total ( $mg.L^{-1}$ )

**C) Contenido de carotenoides**

El procedimiento para la extracción de carotenoides se realizó siguiendo la misma metodología usada para la extracción de clorofila. El contenido total de carotenoides se determinó espectrofotométricamente según Harmut y Lichtenthaler (1987) mediante:

$$\text{Carotenoides total} = \frac{[(3000 \text{ Abs } 470 \text{ nm}) - 1,63 (\text{Chl } a)]}{221}$$

**3.4.5. Determinación de la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.**

Para verificar el efecto de la inducción de la AG3 se realizó un diseño experimental completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial de 2x2, mediante la aplicación de:

- **Tratamientos:**

Estuvieron representados por la aplicación de AG3 y el tipo de fotobiorreactor, que fueron expuestos a condiciones ambientales de invernadero.

| FACTOR           | NIVELES               | TRATAMIENTOS                                  |
|------------------|-----------------------|---|
| C <sub>AG3</sub> | 0 mg.L <sup>-1</sup>  | T1: 0 mg.L <sup>-1</sup> + F. TUBULAR         |
|                  | 20 mg.L <sup>-1</sup> | T2: 0 mg.L <sup>-1</sup> + F. PANEL AIR-LIFT  |
|                  | 40 mg.L <sup>-1</sup> | T3: 20 mg.L <sup>-1</sup> + F. TUBULAR        |
| FBR              | FBRT                  | T4: 20 mg.L <sup>-1</sup> + F. PANEL          |
|                  |                       | T5: 40 mg.L <sup>-1</sup> + F. TUBULAR        |
|                  | FBRP                  | T6: 40 mg.L <sup>-1</sup> + F. PANEL AIR-LIFT |

- **Repeticiones:** Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

**A) Determinación de la concentración de  $\beta$ -caroteno**

El contenido de  $\beta$ -caroteno se cuantificó por espectrofotometría UV/VIS. Se tomaron muestras de 50 ml de la suspensión celular de cada reactor y se transfirió a tubos de ensayo, luego se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó para quitar las sales y luego se resuspendieron en acetona al 80 % según el método usado por Ben-Amotz et al., (1982) seguidamente se incubaron a 80 °C durante 10 min. Los restos celulares se eliminaron del extracto por centrifugación (10 min, 1200 rpm).

La concentración de  $\beta$ -caroteno en el sobrenadante se determinó usando las gráficas de calibración para el espectrofotómetro desarrolladas por Kleinegris et al., (2010); Ben-Amotz y Avron, (1983); mediante la ecuación:

$$C_{B-car} = \left( \frac{(Abs\ 453\ nm - Abs\ 665\ nm)}{3,91} \right) \times 3,657 \times 3X (mg \times L^{-1})$$

Dónde:  $(Abs\ 453\ nm - Abs\ 665\ nm)/3,91$ : absorbancia de caroteno corregido para la contaminación por clorofila.

3,657: Factor de calibración derivado del análisis de concentración de caroteno por HPLC.

3: cantidad de mililitros de solvente añadido para la extracción.

X: factor de dilución para medir la absorbancia en espectrofotómetro.

**B) Determinación de la productividad**

La medida de la productividad de  $\beta$ -caroteno se calculó mediante la ecuación:

$$Pr = \frac{Y_a - Y_b}{t_{ca} - t_{cb}}$$

Dónde: Pr: productividad  $\text{g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ .

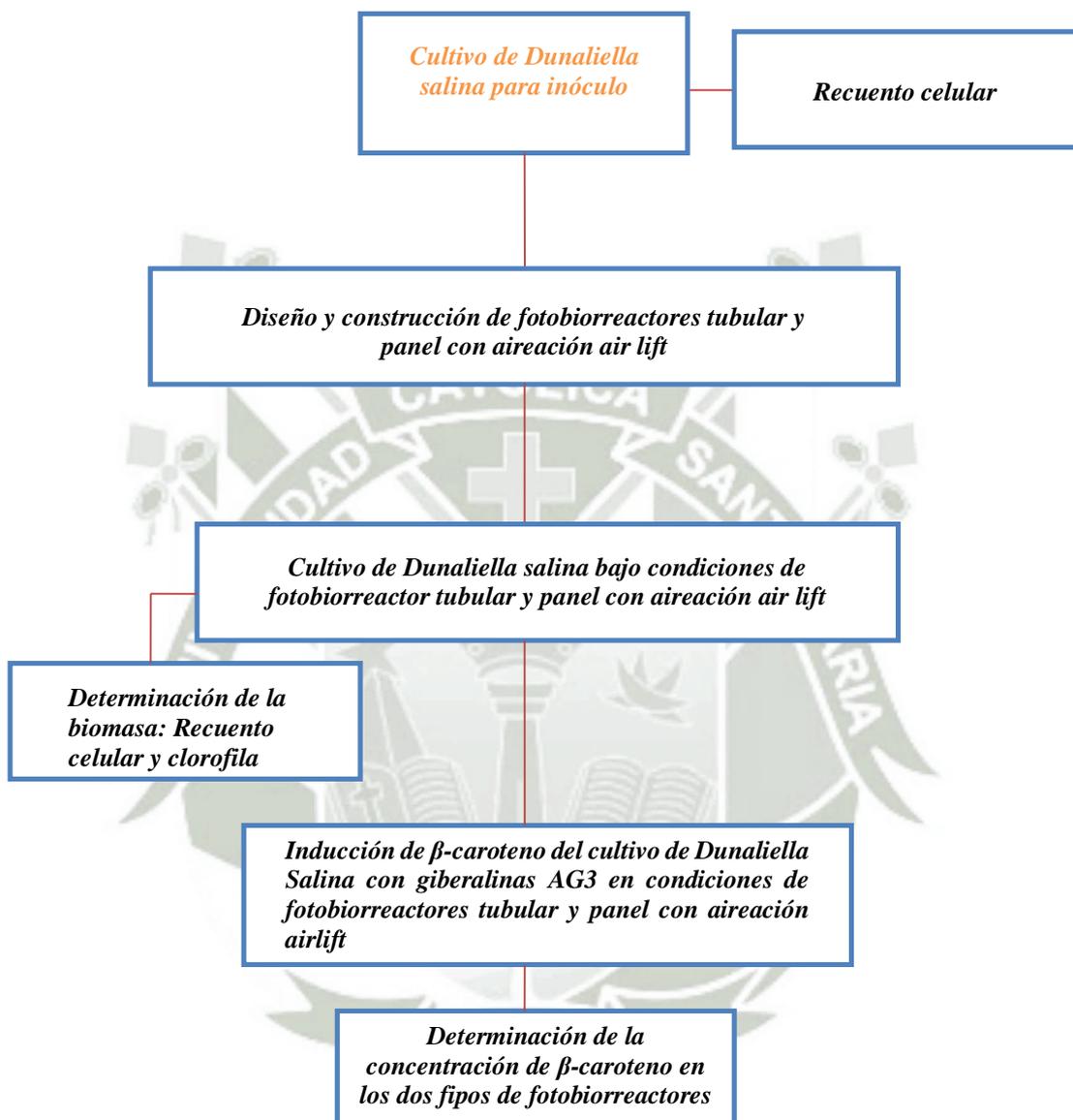
Y: producción en  $\text{g.L}^{-1}$ .

$t_c$ : tiempo en días de la fase de carotenogénesis.

#### 3.4.6. Análisis y procesamiento de datos

Para el procesamiento de datos se consideró los estadísticos descriptivos como medias y desviaciones estándar, y para la comparación de las variables como el crecimiento se utilizó un gráfico de crecimiento según el tiempo, para la comparación de las concentraciones de clorofilas y carotenoides totales producidos en los reactores tubular y panel con aireación air-lift se utilizó la prueba estadística de t de Student para muestra independientes. Para evaluar el efecto del tipo reactor y la concentración de AG3 en la concentración y la productividad de  $\beta$ -caroteno, se empleó la prueba estadística de ANOVA de dos vías, con gráficos de interacción para determinar el mejor tratamiento en las variables evaluadas.

### 3.5. Flujograma de actividades.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. CULTIVO Y ADAPTACIÓN DE *Dunaliella salina* EN CONDICIONES CONTROLADAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA COMO INÓCULO.

Todo el cultivo de *Dunaliella salina* se realizó en una cámara de cultivo (Figura 13A). La cámara de cultivo se implementó con 4 tubos de luz fluorescente colocados en cada esquina a una distancia de 40 cm del cultivo (Figura 13A), mediante esta disposición se pudo obtener una temperatura casi constante de 26 °C que está dentro de la temperatura óptima de crecimiento de *Dunaliella salina*. La obtención de biomasa se inició a partir de dos frascos de 250 mL, al cabo de 2 semanas de crecimiento se obtuvieron 2 L de cultivo de la microalga. (Figura 13D). En las dos semanas posteriores se obtuvo un escalamiento a 4 L de cultivo de *Dunaliella salina* a una densidad de  $1,1 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> que sirvió de inóculo para transferir a cada uno de los fotobiorreactores.

El cultivo en la cámara osciló en un rango de 25 °C y 27 °C de temperatura. El pH estuvo dentro del rango de 7,5 y 9,8 mediante la adición periódica de CO<sub>2</sub>. La iluminación alcanzada fue de 100 μE.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> según las especificaciones obtenidas del fabricante de cada fluorescente (PHYLIPS) y bajo fotoperiodo largo (16 hrs. de luz y 8 hrs. de oscuridad). Los registros de pH, temperatura y recuento celular se tomaron periódicamente (Ver anexo 2).

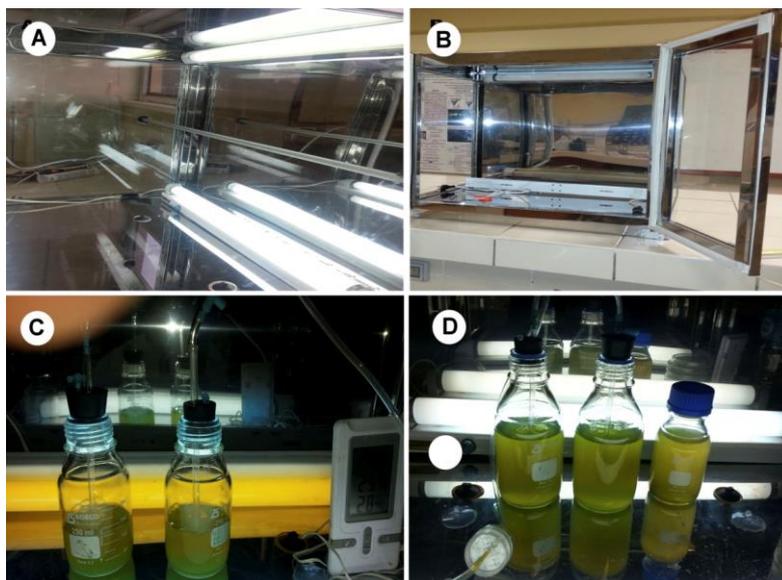
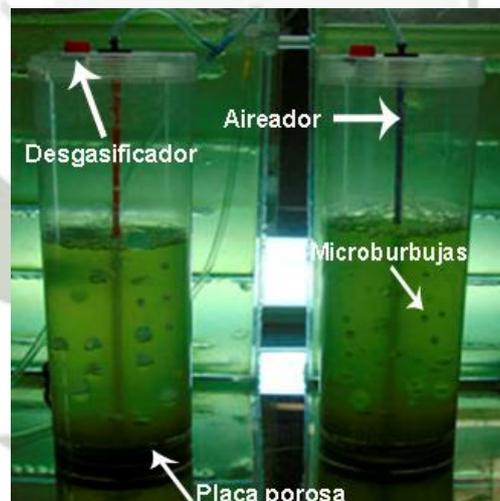


Figura 13. Cultivo y adaptación de *Dunaliella salina* en condiciones controladas para la obtención de biomasa como inóculo. A) implementación de la cámara de cultivo. B) Cámara de cultivo antes del inicio de cultivo. C) Inóculo de *Dunaliella salina*. D) Escalamiento de 1 L del cultivo de *Dunaliella salina*.

#### 4.2. MONTAJE Y OPERACIÓN DE LOS FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, PARA EL CULTIVO DE *Dunaliella salina*.

Los fotobiorreactores tubulares tuvieron una capacidad total de 2042 mL, pero su funcionamiento sólo se hizo con un volumen de 2000 mL de cultivo de *Dunaliella salina*. Cada fotobiorreactor estuvo provisto de una tapa rosca que permitió mantener el cultivo libre de contaminación, un conducto para el ingreso de la mezcla de aire-CO<sub>2</sub> con aproximadamente 100 burbujas por cada segundo, un desgasificador para la salida de gases y una malla de acero con poros de 3 mm para incrementar la aireación así como el mezclado. Ensayos preliminares mostraron que la placa con poros ubicada a 3 cm de la base (Figura 14) provocó el aumento y creación de microburbujas, así mismo permitió uniformizar la distribución de burbujas a lo largo de la columna de ascenso.

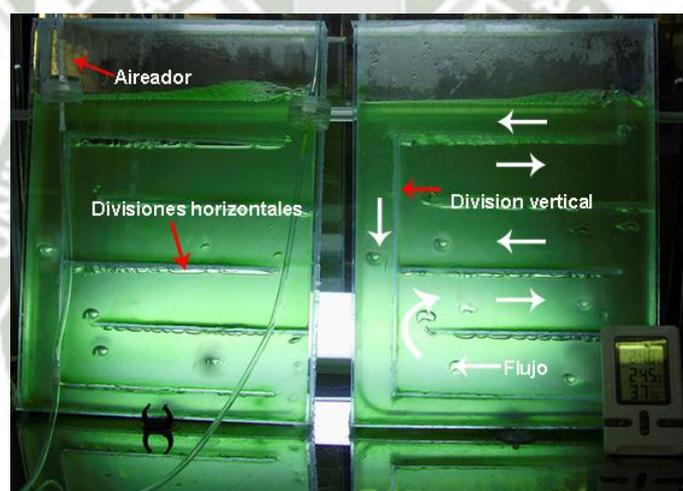


**Figura 14. Partes de fotobiorreactor tubular y burbujas creadas por la placa porosa.**

Los fotobiorreactores tipo panel air-lift construidos de material vidrio de 4050 mL se operaron con un volumen de cultivo efectivo de 3800 mL. Estos

fotobiorreactores presentaron una tapa impermeable donde se instaló un aireador y un desgasificador. El fotobiorreactor estuvo provisto de 5 divisiones horizontales intercaladas (Listones de material vidrio) y una división vertical en lado izquierdo del panel como se muestra en el siguiente diagrama (Figura 12).

Los fotobiorreactores provistos de divisiones horizontales mejoraron el tiempo de retención de las células en contacto con las burbujas de aire y se incrementó la distancia del recorrido de la biomasa permitiendo un circuito cerrado de ascenso y descenso como se muestra en la Figura 15. El área superficial iluminada del fotobiorreactor tubular fue de  $0,08 \text{ m}^2$  mientras que el área superficial iluminada del fotobiorreactor tipo panel fue de  $0,11 \text{ m}^2$ .



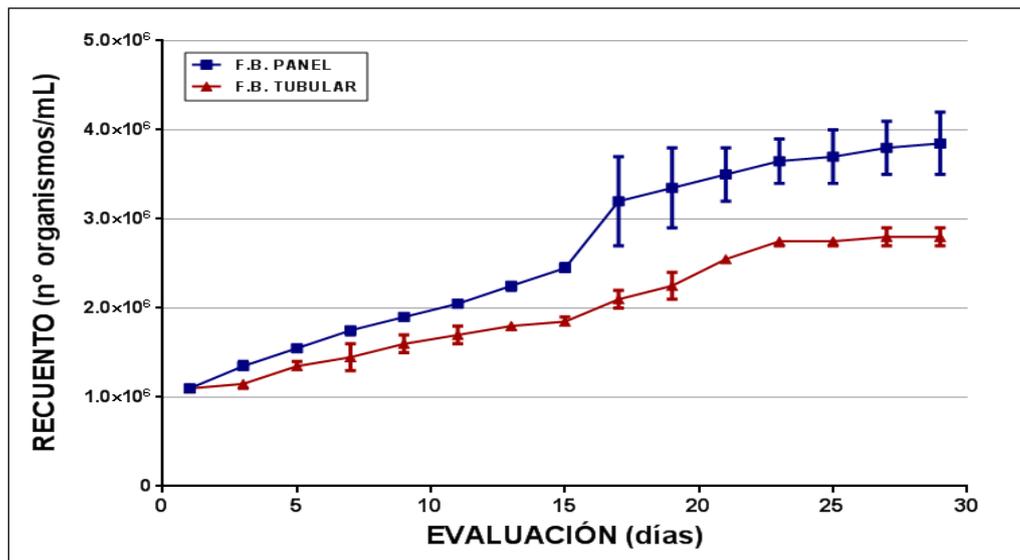
**Figura 15. A) Partes del fotobiorreactor tipo panel con circuito y dirección del flujo a través de las divisiones horizontales y verticales.**

#### 4.3. EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Dunaliella salina* BAJO CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT.

El crecimiento de *Dunaliella salina* en los fotobiorreactores tubular y de panel, se determinó por recuento y se expresó en Organismos.mL<sup>-1</sup>.

La densidad del inóculo del cultivo de *Dunaliella salina* que se transfirió tanto al fotobiorreactor tubular como al de panel fue de  $1,10 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup>. Al cabo de 29 días de cultivo se obtuvo una densidad máxima de  $2,80 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup> para el fotobiorreactor tubular y de  $3,85 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup> para el fotobiorreactor tipo panel. Con los valores de cada recuento en la fase logarítmica que corresponde a los 17 días (Figura 16) se calculó la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), los resultados se muestran a continuación.

La tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) en el fotobiorreactor tubular fue de 0,04 días<sup>-1</sup>, mientras que la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) en el fotobiorreactor tipo panel fue de 0,06 días<sup>-1</sup>, todo esto en condiciones óptimas de crecimiento (pH de 8,0 y temperatura de 26 °C).



**Figura 16. Crecimiento de *Dunaliella salina* según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift.**

En la figura 16 se muestra el crecimiento de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor tipo panel con aireación air-lift, hasta los 29 días de evaluación. Durante este periodo se presentó un incremento en el crecimiento promedio de *Dunaliella salina*, siendo mayor bajo condiciones de fotobiorreactor tipo panel con aireación air-lift. El cultivo en cada tipo de fotobiorreactor se inició con una densidad de  $1,10 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup>. Luego de 29 días de evaluación; se obtuvo un promedio final de crecimiento de  $3,85 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup> en fotobiorreactor tipo panel y de  $2,80 \cdot 10^6$  Organismos.mL<sup>-1</sup> en fotobiorreactor tubular. Desde el día 0 hasta el día 15 se observa un aumento constante en el crecimiento de *Dunaliella salina* en ambos tipos de fotobiorreactores, después del día 15 hasta el día 27 se encontró una marcada diferencia en el crecimiento en ambos tipos de fotobiorreactores mostrando un mayor crecimiento en el fotobiorreactor tipo panel. En el día 27 y 29 se alcanza la fase estacionaria en la cual el crecimiento fue mínimo.

Los fotobiorreactores tienen que ser cuidadosamente optimizados para cada especie de algas, y de acuerdo con su fisiología y características de crecimiento únicas (Richmond y Cheng-Wu, 2001).

En el presente estudio el fotobiorreactor tipo panel al cual se le adicionó deflectores horizontales se ha encontrado adecuado para este fin por varias razones: la circulación se consigue sin partes móviles, permite una mayor circulación y retención del cultivo, esto proporciona un sistema de cultivo robusto con gran potencial. Estos deflectores pueden ser esenciales para prevenir la fotoinhibición ya que estas barreras permiten ocultar las células de la luz permanente; y también podría evitar el daño celular asociado con bombeo mecánico (Chisti, 2007 y Vandanjon et al., 1999). Esta última razón es especialmente relevante en el caso de *Dunaliella*, donde la falta de pared celular rígida puede dar lugar a la fragilidad y la sensibilidad celular a fuerzas mecánicas. (Chisti, 1999 y Vandanjon et al., 1999).

#### **4.4. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES TOTALES DEL CULTIVO DE *Dunaliella salina* EN CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, PREVIA A LA FASE DE INDUCCIÓN DE $\beta$ -CAROTENO.**

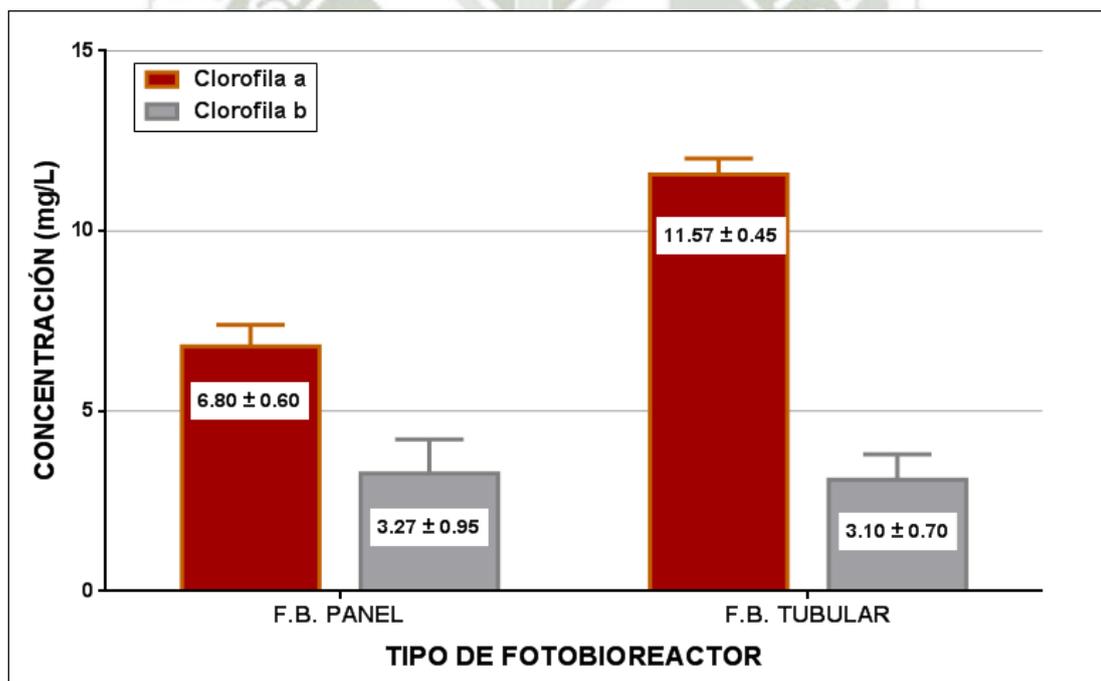
El contenido de clorofila a, b, clorofila total y carotenoides totales, fueron cuantificados mediante espectrofotometría, a partir de la biomasa de *Dunaliella salina* en los fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, obtenida hasta los 29 días de crecimiento, bajo condiciones de laboratorio, a continuación se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 3.

**Tabla 3. Comparación de la concentración de clorofila y carotenoides totales en el cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de  $\beta$ -caroteno.**

| Variable             | Tipo de Fotobiorreactor | $\bar{X} \pm S$<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | t Student | Significancia<br>(p) |
|----------------------|-------------------------|--|-----------|----------------------|
| Clorofila a          | F.B. Panel              | 6,80 ± 0,60                              | 11,00     | 0,000... (**)        |
|                      | F.B. Tubular            | 11,57 ± 0,45                             |           |                      |
| Clorofila b          | F.B. Panel              | 3,27 ± 0,95                              | 0,25      | 0,819... N.S.        |
|                      | F.B. Tubular            | 3,10 ± 0,70                              |           |                      |
| Clorofila total      | F.B. Panel              | 10,07 ± 1,55                             | 4,13      | 0,015.... (*)        |
|                      | F.B. Tubular            | 14,67 ± 1,15                             |           |                      |
| Carotenoides totales | F.B. Panel              | 3,87 ± 0,05                              | 10,13     | 0,001... (**)        |
|                      | F.B. Tubular            | 3,50 ± 0,04                              |           |                      |

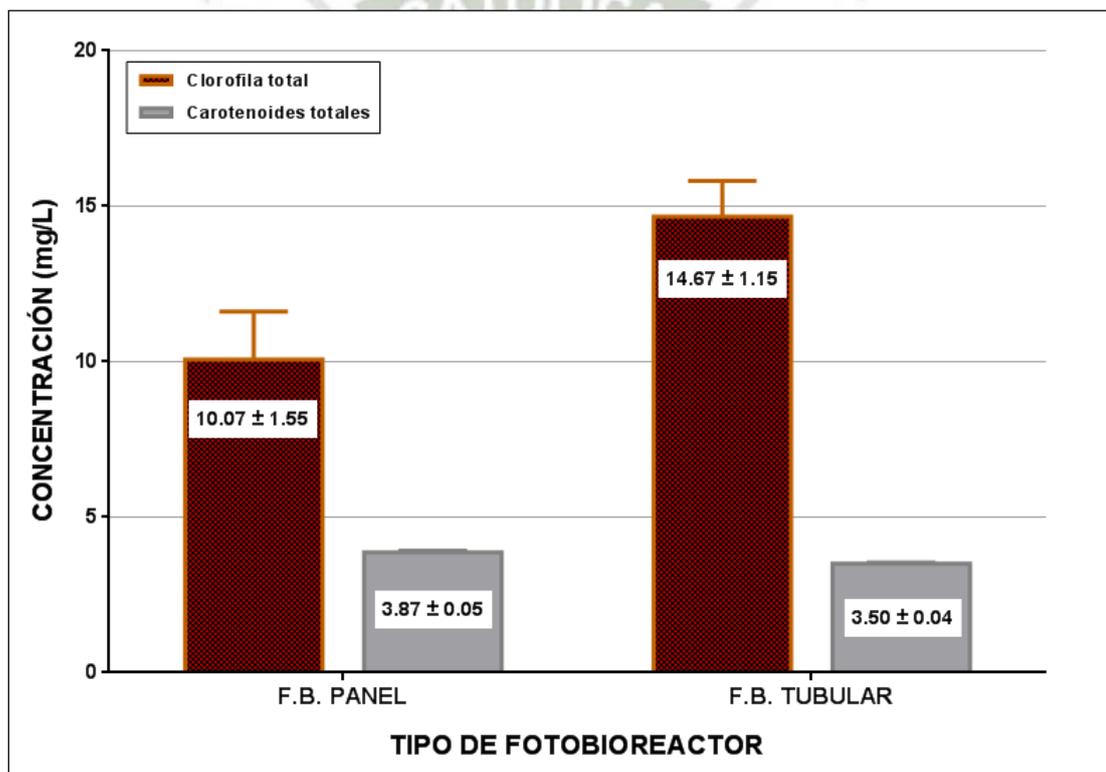
La tabla 3 muestra los promedios y desviaciones estándar de clorofila a, b, clorofila total y carotenoides totales de *Dunaliella salina*, hasta los 29 días de

crecimiento bajo condiciones de fotobiorreactor tubular y tipo panel con aireación air-lift; también se muestra la prueba de t Student, la misma que muestra diferencias significativas (\*) en la concentración de clorofila total de *Dunaliella salina*, siendo mayor la concentración en condiciones de fotobiorreactor tubular con  $14,67 \pm 1,15$  mg.L<sup>-1</sup>, también se muestran diferencias altamente significativas (\*\*) en la concentración de clorofila a, presentándose mayor concentración en condiciones de fotobiorreactor tubular con  $11,57 \pm 0,45$  mg.L<sup>-1</sup>. La concentración de carotenoides totales presentó diferencias altamente significativas (\*\*) con la prueba de comparación de t Student, siendo mayor la concentración de carotenoides totales de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con  $3,87 \pm 0,05$  mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 17. Concentración de clorofila a y b en el cultivo de *Dunaliella salina*, según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de  $\beta$ -caroteno.**

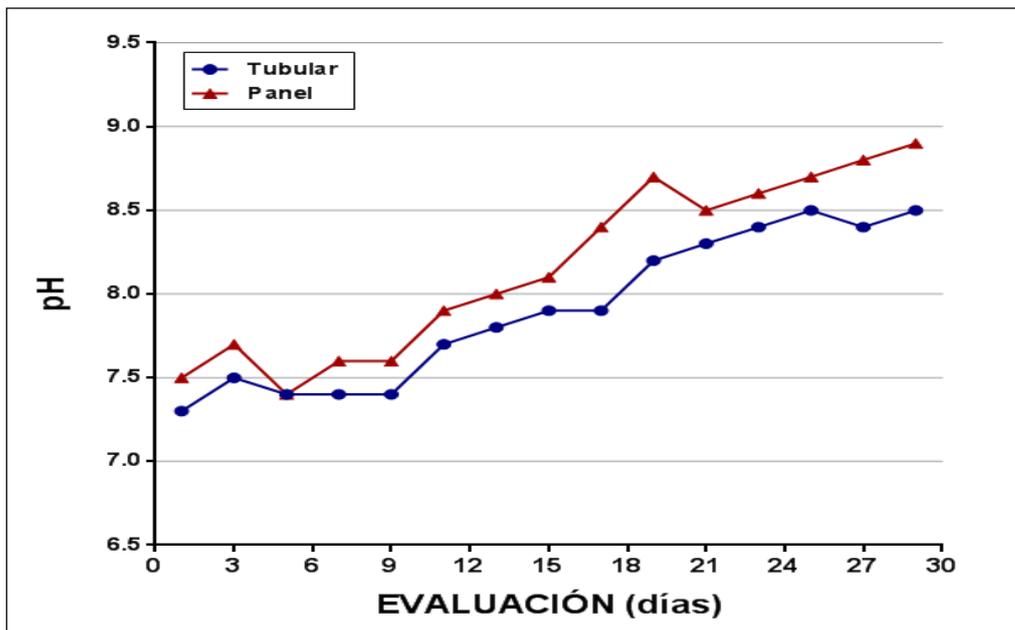
La Figura 17 muestra mayor concentración de clorofila a en comparación con la concentración de clorofila b en *Dunaliella salina*, para la fase previa a la inducción de producción de  $\beta$ -caroteno, siendo mayor en condiciones de fotobiorreactor tubular con  $11,57 \pm 0,45 \text{ mg.L}^{-1}$  en comparación al  $6,80 \pm 0,60 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtenido en condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, mientras que la concentración de clorofila b fue similar bajo ambas condiciones presentándose  $3,27 \pm 0,95 \text{ mg.L}^{-1}$  bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, y  $3,10 \pm 0,70 \text{ mg.L}^{-1}$  bajo condiciones de fotobiorreactor tubular.



**Figura 18.** Concentración de clorofila total y carotenoides totales en el cultivo de *Dunaliella salina*, según condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, previa a la fase de inducción de  $\beta$ -caroteno.

La Figura 18 muestra mayor concentración de clorofila total en comparación a la concentración de carotenoides totales en *Dunaliella salina*, para la fase previa a la inducción de producción de  $\beta$ -caroteno, siendo mayor en condiciones de fotobiorreactor tubular con  $14,67 \pm 1,15 \text{ mg.L}^{-1}$  en comparación al  $10,07 \pm 1,55 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtenido en condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift; mientras que la concentración de carotenoides totales presentó una ligera diferencia bajo ambas condiciones presentándose  $3,87 \pm 0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, y  $3,50 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$  bajo condiciones de fotobiorreactor tubular.

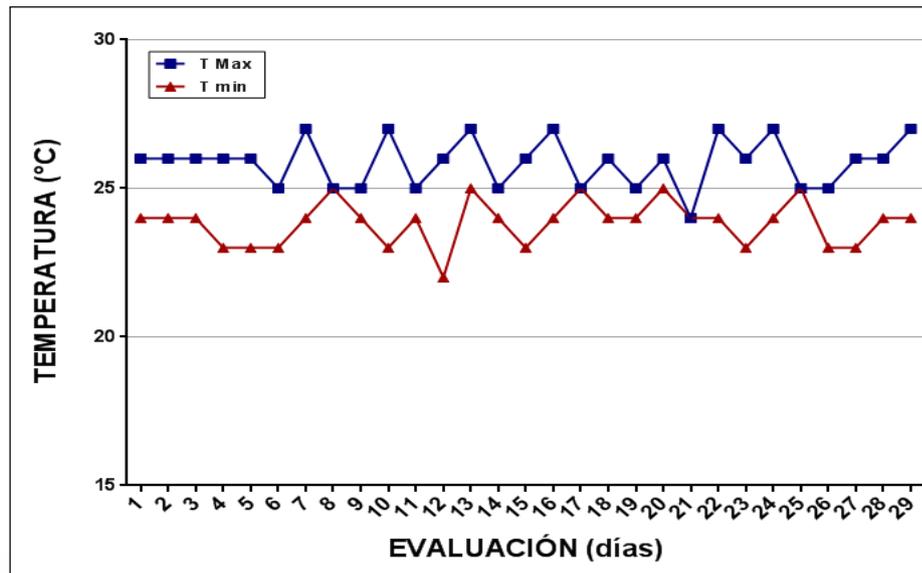
La producción de clorofila fue diferente en los dos tipos de biorreactores, siendo mayor en el fotobiorreactor tubular. En contraste con la producción de carotenoides, la producción de clorofila es mayor en el fotobiorreactor tubular. La configuración circular del fotobiorreactor tubular no permite una distribución uniforme de la luz sobre las células, por lo que el ingreso de luz es menor en comparación al fotobiorreactor tipo panel. Se sabe que el tamaño del fotosistema y la producción de clorofila por las células están influenciadas por la intensidad de la luz; por lo tanto las células producen más clorofila para capturar suficiente energía de la luz cuando la intensidad de la luz es menor (Ben-Amotz, 1993).



**Figura 19. Evaluación del pH del cultivo de *Dunaliella salina* según condiciones de laboratorio.**

Se muestra en la Figura 19 la variación del pH del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio, hasta los 29 días de evaluación. Se presentó un incremento del pH en ambos tipos de fotobiorreactores, siendo en el FTBP el pH inicial 7,5 hasta un valor de 8,9; y en FTBT el pH inicial 7,3 hasta un valor de 8,5.

Este comportamiento tiene relación directa con la degradación de nitratos y fosfatos por la microalga como parte de su metabolismo, lo que se ve reflejado en el incremento ligero de pH como lo demostró Borowitzka (1992); característica importante en el cultivo de microalgas para remediar el fenómeno eutofricación en aguas contaminadas.



**Figura 20. Evaluación de la temperatura del cultivo de *Dunaliella salina* según condiciones de laboratorio en los dos tipos de fotobiorreactores.**

Se muestra en la figura 20, la temperatura del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio hasta los 29 días de evaluación, se presentó un incremento de las temperaturas promedio, desde temperatura mínima inicial de 24°C y valor de temperatura máxima inicial de 26°C, hasta la temperatura mínima final de 24°C hasta un valor de temperatura máxima final de 27°C a los 29 días de evaluación.

#### 4.5. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $\beta$ -CAROTENO DEL CULTIVO DE *Dunaliella salina* EN CONDICIONES DE FOTOBIORREACTORES TUBULAR Y PANEL CON AIREACIÓN AIR-LIFT, EN LA FASE DE INDUCCIÓN CON AG3.

La concentración de  $\beta$ -caroteno fue medida después de la inducción con AG3 a condiciones ambientales en reactores tubulares y tipo panel con aireación air-lift hasta los 14 días de inducción, el experimento se realizó mediante un diseño experimental completamente randomizado (DCR) con arreglo factorial de 3x2, con la concentración  $\beta$ -caroteno se determinó la productividad, presentándose los siguientes resultados:

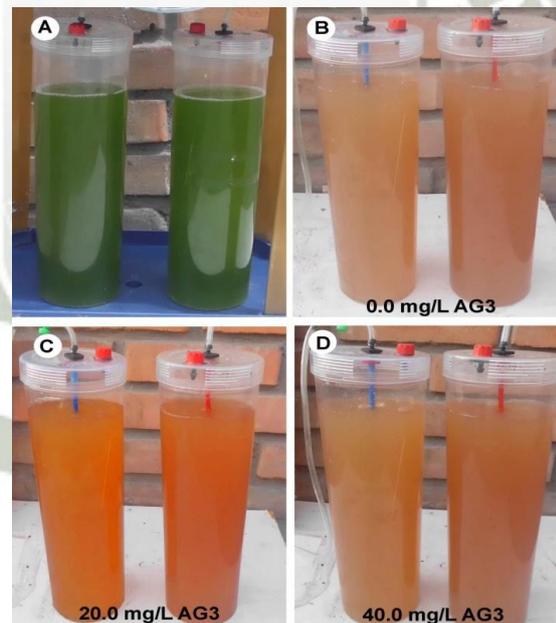


Figura 21. Cultivo de *Dunaliella salina* en fotobiorreactor tubular a condiciones ambientales para la inducción de la producción de  $\beta$ -caroteno mediante AG3. A) Antes del proceso de inducción. B, C y D) Después del proceso de inducción a diferentes concentraciones de AG3.

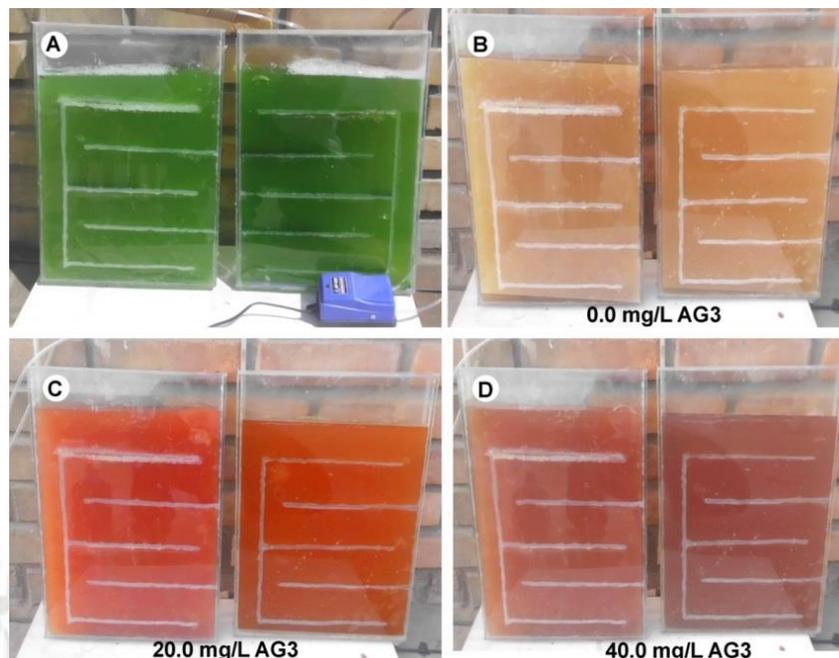


Figura 22. Cultivo de *Dunaliella salina* en fotobiorreactor tipo panel a condiciones ambientales para la inducción de producción de  $\beta$ -caroteno mediante AG3. A) Antes del proceso de inducción. B, C y D). Después del proceso de inducción a diferentes concentraciones de AG3.

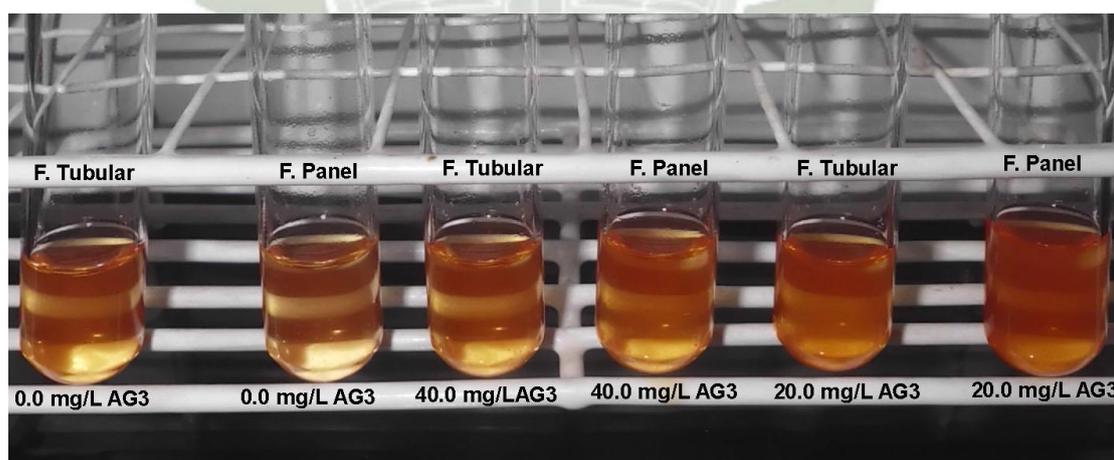


Figura 23.  $\beta$ -caroteno extraído del cultivo de *Dunaliella salina* obtenida de los dos tipos de fotobiorreactores (tubular y panel) a diferentes concentraciones de AG3.

**Tabla 4. Determinación de la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.**

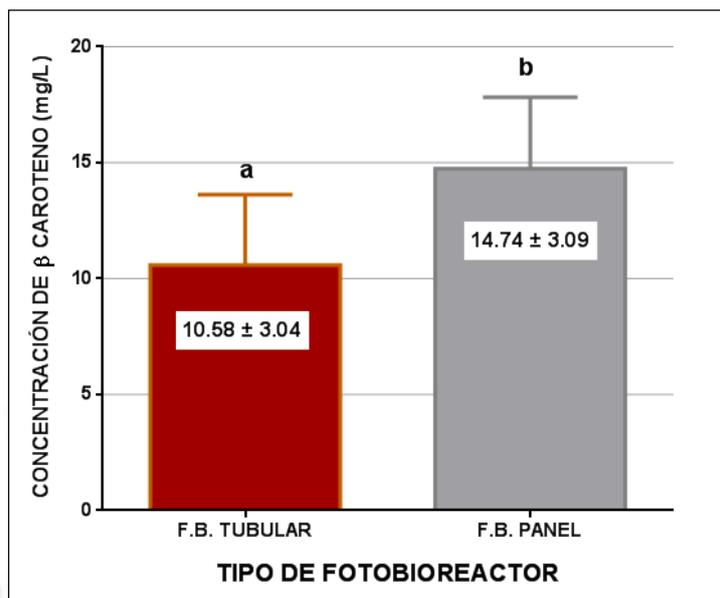
| Concentración de<br>AG3 | Tipo de<br>Fotobiorreactor | Concentración de $\beta$ -Caroteno<br>$\bar{X} \pm S$ (mg.L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|----------------------------|---|
| 0 mg.L <sup>-1</sup>    | F.B. Tubular               | 6,89 $\pm$ 0,46   |
|                         | F.B. Panel                 | 11,81 $\pm$ 0,79  |
| 20 mg.L <sup>-1</sup>   | F.B. Tubular               | 13,69 $\pm$ 0,54  |
|                         | F.B. Panel                 | 18,64 $\pm$ 0,69  |
| 40 mg.L <sup>-1</sup>   | F.B. Tubular               | 11,16 $\pm$ 0,95  |
|                         | F.B. Panel                 | 13,79 $\pm$ 0,25  |

Se observa en la Tabla 4, los promedios de la concentración de  $\beta$ -caroteno por efecto de la inducción con AG3 y en condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, hasta los 14 días de evaluación.

**Tabla 5. Comparación de la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.**

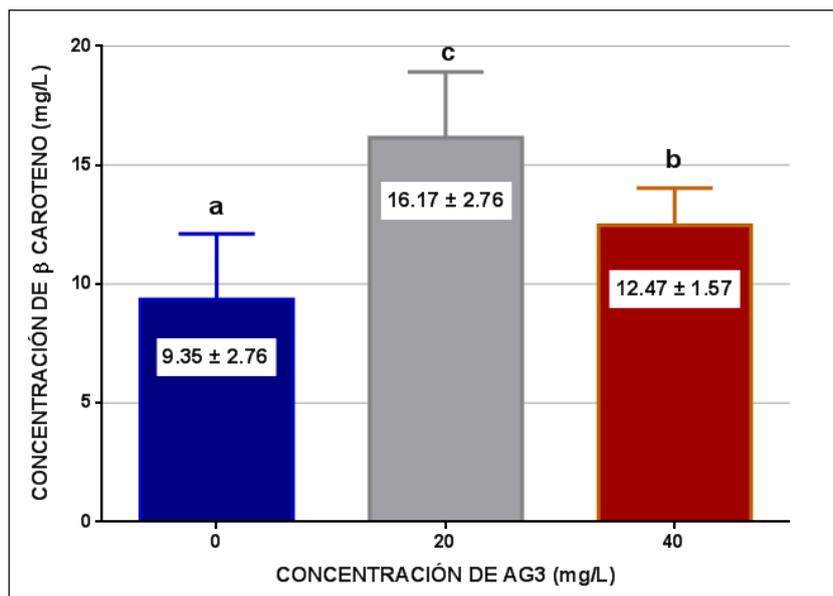
| Fuentes de variabilidad            | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F      | Significancia P |
|------------------------------------|----------------------------|----|------------------|--------|-----------------|
| <b>Concentración de AG3 (A)</b>    | 139,73                     | 2  | 69,86            | 164,15 | 0,000... (**)   |
| <b>Tipo de Fotobiorreactor (B)</b> | 77,96                      | 1  | 77,96            | 183,17 | 0,000... (**)   |
| <b>(A) x (B)</b>                   | 5,31                       | 2  | 2,65             | 6,23   | 0,014... (**)   |
| <b>Error</b>                       | 5,11                       | 12 | 0,43             |        |                 |
| <b>Total</b>                       | 228,09                     | 17 |                  |        |                 |

En la Tabla 5, se muestran los valores del ANOVA de 2 factores para la concentración de  $\beta$ -caroteno, para 3 concentraciones de AG3 y 2 tipos de fotobiorreactores, los valores del estadístico de Fisher (F) para cada factor y la interacción de la concentración de AG3 (A) x Tipo de fotobiorreactor (B), indican la presencia de diferencias altamente significativas (\*\*) ( $P < 0.01$ ) en la concentración de  $\beta$ -caroteno.



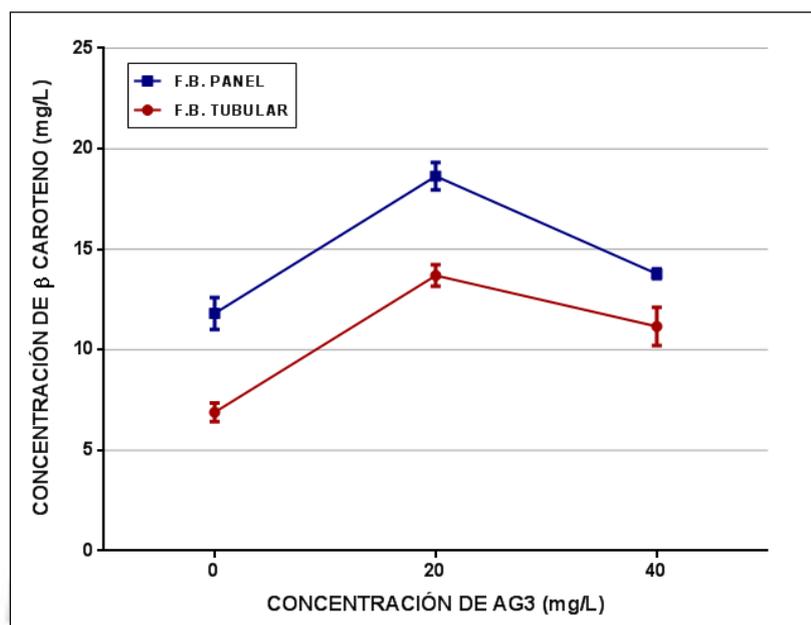
**Figura 24.** Comparación de la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*, según condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift.

Se muestran los promedios y desviaciones estándar en la concentración de  $\beta$ -caroteno, donde la mayor concentración se observa bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con  $14,74 \pm 3,09 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno (b).



**Figura 25.** Comparación de la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*, según concentraciones de AG3.

Se muestra la prueba de Tukey, la misma que indica que con la concentración de 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 se alcanzó la mayor concentración de  $\beta$ -caroteno promedio en el cultivo de *Dunaliella salina*, con 16,17 ± 2,76 mg.L<sup>-1</sup>, seguido de la concentración de 40 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 con 12,47 ± 1,57 mg.L<sup>-1</sup>, mientras que sin AG3 se presentó la menor concentración de  $\beta$ -caroteno promedio con 9.35 ± 2.76 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 26. Interacción de la concentración de AG3 y el tipo de fotobiorreactor en la concentración de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*.**

La figura 26 muestra que la mayor concentración de  $\beta$ -caroteno promedio en el cultivo de *Dunaliella salina*, se presentó con la interacción de 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con 18,64 ± 0,69 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno promedio, seguido de la interacción de 40 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con 13,79 ± 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno promedio.

Los resultados mostraron un efecto positivo en la aplicación de hormonas vegetales sobre la producción de  $\beta$ -caroteno el crecimiento en la microalga debido a la hormona AG3 pero en el presente estudio sólo se aplicó en la fase de inducción (segunda fase donde el crecimiento es casi nulo y sólo ocurre el proceso de carotenogénesis). La respuesta de la aplicación exógena de AG3 fue diferente en los dos tipos de fotobiorreactores utilizados.

**Tabla 6. Determinación de la productividad de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air-lift, en la fase de inducción con AG3.**

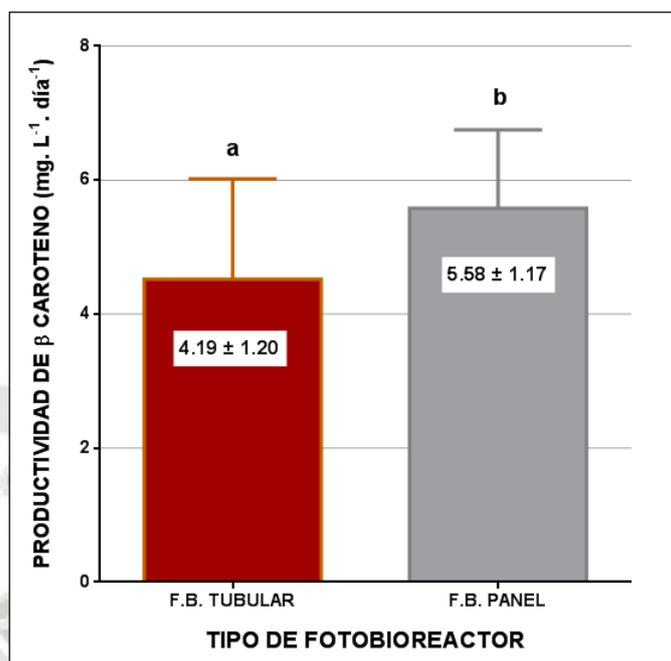
| Concentración de<br>AG3 | Tipo de<br>Fotobiorreactor | Productividad de $\beta$ -Caroteno<br>$\bar{X} \pm S$ (mg.L <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|----------------------------|--|
| 0 mg.L <sup>-1</sup>    | F.B. Tubular               | 2,73 $\pm$ 0,18  |
|                         | F.B. Panel                 | 4,47 $\pm$ 0,29  |
| 20 mg.L <sup>-1</sup>   | F.B. Tubular               | 5,43 $\pm$ 0,21  |
|                         | F.B. Panel                 | 7,05 $\pm$ 0,26  |
| 40 mg.L <sup>-1</sup>   | F.B. Tubular               | 4,43 $\pm$ 0,38  |
|                         | F.B. Panel                 | 5,22 $\pm$ 0,09  |

Se observa en la Tabla 6 los promedios de la productividad por día de  $\beta$ -caroteno por efecto de la inducción con AG3 y en condiciones de fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor en panel con aireación air-lift, hasta los 14 días de evaluación.

**Tabla 7. Comparación de la productividad de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air lift, en la fase de inducción con AG3.**

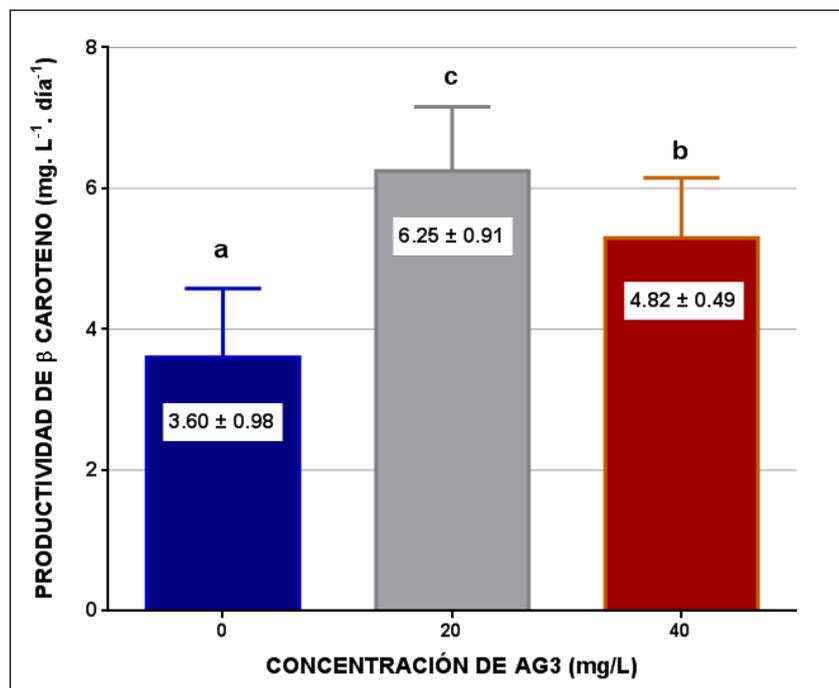
| Fuentes de variabilidad     | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F       | Significancia P |
|-----------------------------|----------------------------|----|------------------|---------|-----------------|
| Concentración de AG3 (A)    | 20,994                     | 2  | 10,497           | 162,988 | 0,000           |
| Tipo de Fotobiorreactor (B) | 8,638                      | 1  | 8,638            | 134,120 | 0,000           |
| (A) x (B)                   | 0,798                      | 2  | 0,399            | 6,197   | 0,014           |
| Error                       | 0,773                      | 12 | 0,064            |         |                 |
| Total                       | 31,203                     | 17 |                  |         |                 |

En la Tabla 7, se muestran los valores del ANOVA de 2 factores para la productividad de  $\beta$ -caroteno, para 3 concentraciones de AG3 y 2 tipos de fotobiorreactores, los valores del estadístico de Fisher (F) para cada factor y la concentración de AG3 (A) x Tipo de fotobiorreactor (B), indican la presencia de diferencias altamente significativas (\*\*) ( $P < 0,01$ ) en la productividad de  $\beta$ -caroteno.



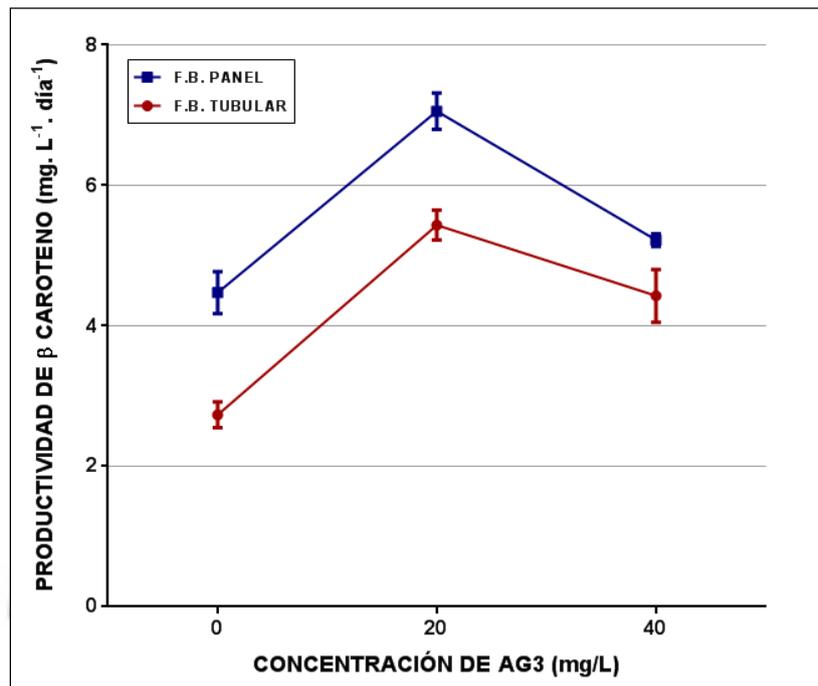
**Figura 27.** Comparación de la productividad de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*, según condiciones de fotobiorreactores tubular y panel con aireación air lift.

Se muestran los promedios y desviaciones estándar en la productividad de  $\beta$ -caroteno, donde la mayor productividad se observa bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con  $5,58 \pm 1,17$  mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno (B).



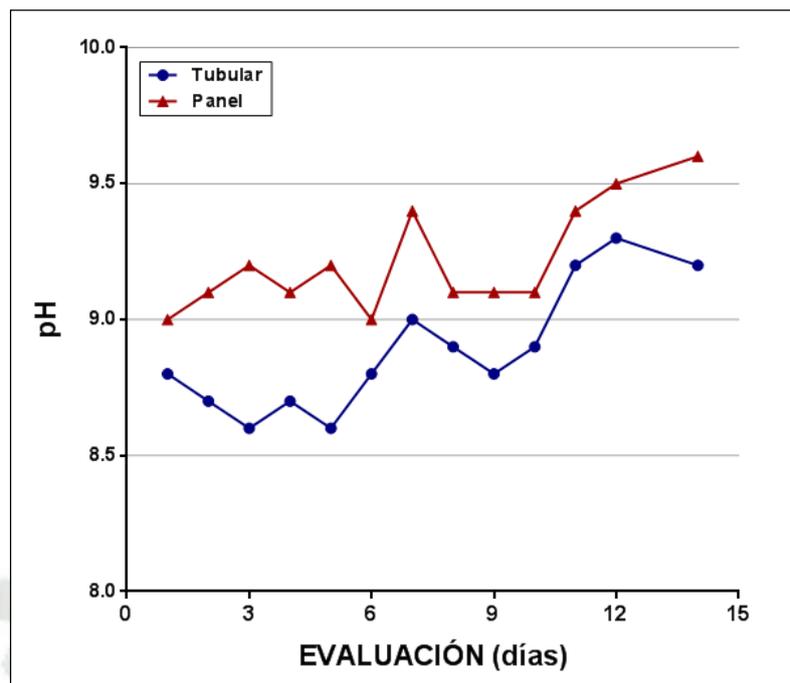
**Figura 28.** Comparación de la productividad de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*, según concentraciones de AG3.

Se muestra la prueba de Tukey, la misma que indica que con la concentración de 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 se alcanzó la mayor productividad de  $\beta$ -caroteno promedio en el cultivo de *Dunaliella salina*, con 6,25 ± 0,91 mg.L<sup>-1</sup>, seguido de la productividad de 40 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 con 4,82 ± 0,49 mg.L<sup>-1</sup>, mientras que sin AG3 se presentó la menor productividad de  $\beta$ -caroteno promedio con 3,60 ± 0,98 mg.L<sup>-1</sup>.



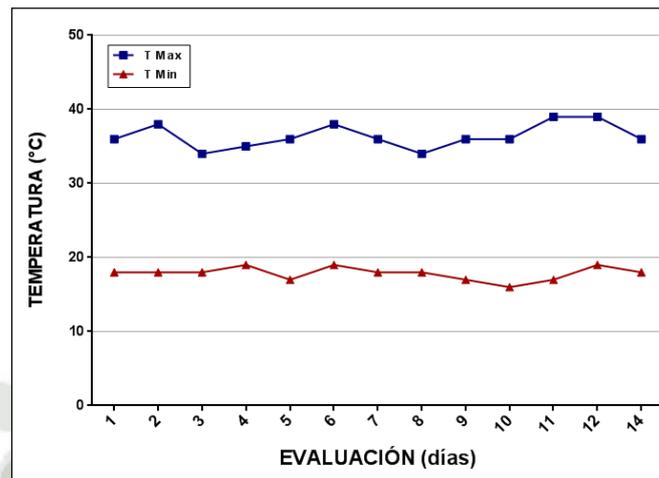
**Figura 29. Interacción de AG3 y el tipo de fotobiorreactor en la productividad de  $\beta$ -caroteno del cultivo de *Dunaliella salina*.**

La figura 29 muestra que la mayor productividad de  $\beta$ -caroteno promedio en el cultivo de *Dunaliella salina*, se presentó con la interacción de 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor en panel con aireación air-lift con  $7,05 \pm 0,26$  mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno promedio, seguido de la interacción de 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor tubular con  $5,43 \pm 0,21$  mg.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno promedio.



**Figura 30. Evaluación del pH promedio del cultivo de *Dunaliella salina* según condiciones ambientales en los dos tipos de fotobiorreactores.**

Se muestra en la figura 30 el pH del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones ambientales, hasta los 14 días de evaluación en ambos tipos de fotobiorreactores. El pH inicial del fotobiorreactor de tipo panel fue de 9 hasta un valor de 9,6 y en el tubular el pH inicial fue de 8,8 hasta un valor de pH de 9,2.



**Figura 31. Evaluación de la temperatura del cultivo de *Dunaliella salina* según condiciones ambientales.**

Se muestra en la figura 31 la temperatura del cultivo de *Dunaliella salina* en condiciones ambientales hasta los 14 días de evaluación, se presentó un incremento de las temperaturas promedio, desde temperatura mínima inicial de 18 °C y un valor de temperatura máxima inicial de 36 °C, hasta temperatura mínima final de 18 °C hasta un valor de temperatura máxima final de 36 °C a los 14 días de evaluación.

En esta investigación, se ha tratado de optimizar el funcionamiento de dos tipos de fotobiorreactores, un fotobiorreactor tubular cerrado con una placa provista de poros que mejora la transferencia de masa y un fotobiorreactor tipo panel que presenta divisiones horizontales que mejora el tiempo de retención de las microalgas hacia la luz, en el cual se obtuvo mayor productividad para para la producción de *D. salina*. En la última década se iniciaron algunos ensayos para el crecimiento de *Dunaliella* en diferentes modelos de fotobiorreactores cerrados para la optimización de  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, ninguno de estos ensayos ha tomado la producción más allá del laboratorio (Ben-Amotz, 1999).

En el presente estudio se halló un incremento de 2,7 veces en el contenido de  $\beta$ -caroteno debido a la suplementación de AG3 frente al grupo control. Esto concuerda con los hallazgos de Salguero et al. (2005), Mogedas et al. (2009), y Huang y Cheung (2011) que reportaron aumentos de aproximadamente dos veces en los niveles de  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina y carotenoides totales en *D. Bardawil*. Hallazgos previos por Fung (2005) y Czerpak et al. (2006); quienes reportaron una disminución del crecimiento debido a la aplicación del ácido acetil salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) en *Chlorella zofingiensis* y *Chlorella vulgaris* respectivamente, mientras Raman y Ravi (2011) reportaron un aumento en el crecimiento debido al ácido salicílico (AS) y metil jasmonato (MJ) de manera dependiente de la concentración y de la intensidad de luz en *H. pluvialis*.

En el estudio actual, las condiciones de intensidad de la luz fueron iguales para todos los tratamientos de manera que podría medirse exclusivamente el efecto de las hormonas. La aplicación de AG3 sobre el cultivo de *D. salina* en fotobiorreactor tipo panel frente al fotobiorreactor tubular obtuvo una mayor productividad de  $\beta$ -caroteno en *D. salina*. Esta diferencia se debe a que la intensidad de la luz que llega a cada tipo de fotobiorreactor es diferente y depende de su configuración. Según Richmond, (1986) la trayectoria de la luz es la distancia transversal que debe recorrer un fotón para pasar a través de un fotobiorreactor donde su magnitud es determinada por diferentes medidas en los diferentes tipos de reactores. Así, la trayectoria de la luz es determinada por la profundidad de líquido. En un fotobiorreactor tipo panel dependerá de la separación entre las placas o por el diámetro del tubo en un reactor tubular (Richmond, 1986). Las rutas luminosas que mejores resultados han dado en diferentes fotobiorreactores están entre 2,6 y 3,0 cm, sin embargo, en cultivos de alta densidad celular, una trayectoria de la luz de 1 cm aumenta la probabilidad de que las células en promedio estén expuestas a un régimen de iluminación óptimo (Javanmardian y Palsson, 1991). Esto puede explicar la diferencia en el contenido de  $\beta$ -caroteno en los fotobiorreactores estudiados, ya que en el fotobiorreactor tipo panel de 3 cm de separación entre

placas (ruta luminosa menor) la intensidad de luz es mayor provocando mayor estrés por luz en induciendo mayor carotenogénesis en comparación al fotobiorreactor tubular de 9cm de diámetro (ruta luminosa mayor).

En general también la alta irradiación solar puede mejorar la acumulación de  $\beta$ -caroteno en células de *Dunaliella* (Phillips et al., 1995 y Orset y Young, 2000). Una alta radiación como existe en la región Arequipa podría ser adecuada para la producción de  $\beta$ -caroteno pero hace falta más estudios para determinar la radiación óptima en las condiciones de esta región.

*Dunaliella salina* acumula  $\beta$ -caroteno en respuesta al estrés abiótico. El contenido de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* tratada con 20 mg.L<sup>-1</sup> de AG3 tuvo mejores resultados en los dos tipos de fotobiorreactores frente al tratamiento control. Por lo tanto, se infiere que las células del alga utilizan la hormona AG3 como moléculas de señal para inducir la acumulación de  $\beta$ -caroteno para hacer frente al estrés por luz y temperatura (condiciones ambientales de Arequipa).

En estudios anteriores se evaluó el efecto de metil jasmonato (MJ) y giberelinas AG3 en la microalga *Haematococcus pluvialis* donde las células acumularon más astaxantina (Czerpak et al., 2006). El tratamiento con MJ y AG3 aumentaron la transcripción de tres genes cetolasa relacionados con la producción de  $\beta$ -caroteno (BKTS) induciendo la acumulación de astaxantina (Czerpak et al., 2006). Estos resultados sugieren la aplicación exógena potencial para la acumulación de otros carotenoides en cultivos a gran escala. Sin embargo poco se sabe acerca de su papel en la respuesta al estrés en microalgas y sólo hay unas pocas investigaciones sobre los efectos de MJ o AG3 sobre el crecimiento o el cambio de componentes de las algas (Czerpak et al., 2006).

Hasta donde se sabe, este es el primer informe sobre el efecto de AG3 sobre la acumulación de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina*. Aunque actualmente no hay datos sobre el AG3 endógeno en *Dunaliella salina*, el presente estudio demuestra

que AG3 puede inducir la iniciación de la acumulación de  $\beta$ -caroteno y sin otros estímulos.

Se infiere que la interacción de AG3 y la intensidad de luz (asociada a la configuración del fotobiorreactor) fueron los contribuyentes al estrés oxidativo. Esto supone que la intensidad de luz provoca estrés ocasionando mayor producción de  $\beta$ -caroteno como respuesta de la célula para proteger el aparato fotosintético (Jahns y Holzwarth, 2012).

No se observó diferencia significativa en la acumulación de  $\beta$ -caroteno mediante el microscopio óptico entre los controles y tratamientos. Las observaciones de microscopía revelaron el cambio de color inicial de verde a rojo en los días 3 y 4 después de la aplicación del AG3. El día 6, hubo una gran diferencia entre los controles y tratamientos. En el día 12, más de 50% de células del alga se volvieron rosado-rojizo en los tratamientos de  $40\text{mg.L}^{-1}$ , y casi el 90% de las células cambio de color verde a rosado-rojizo en los tratamientos de  $20\text{mg.L}^{-1}$ . Al mismo tiempo, aproximadamente el 15% de las células de algas sufrieron despigmentación o se desintegraron permaneciendo en el fondo de los fotobiorreactores.

AG3 es un factor clave en la regulación de la expresión génica abiótico, inducida por el estrés en las plantas superiores. Sin embargo poco se sabe sobre el posible papel de fitohormonas en la fisiología de las microalgas y especialmente sobre su implicación en la regulación del metabolismo secundario en algas (Czerpak, 2002).

Las plantas superiores y algas verdes comparten la misma ruta de biosíntesis de carotenoides de  $\beta$ -caroteno (Cunningham y Gantt, 1998). La enzima  $\beta$ -caroteno cetolasa y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (Linden, 1999) catalizan las reacciones que conducen a la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. Por lo tanto es posible que las vías de señalización mediada por AG3 sobre estas enzimas estén involucradas en la acumulación de  $\beta$ -caroteno en *D. salina*.

## CONCLUSIONES

**PRIMERA:** Se logró adaptar el cultivo de una cepa pura de *Dunaliella salina* hasta la obtención de 4 L de cultivo puro, los que se utilizaron como cultivo inicial para los fotobiorreactores tubular y panel.

**SEGUNDA:** Se diseñó y construyó fotobiorreactores de tipo tubular y panel con aireación air-lift para el cultivo de la cepa de *Dunaliella salina* en medio Guillard suplementado con agua de mar.

**TERCERO:** El mayor crecimiento de biomasa de *Dunaliella salina* se obtuvo en fotobiorreactor tipo panel con aireación air-lift con  $3,85 \cdot 10^6$  organismos. $\text{mL}^{-1}$  en comparación al fotobiorreactor tubular con  $2,80 \cdot 10^6$  organismos. $\text{mL}^{-1}$ .

**CUARTA:** La mayor concentración de clorofila a se dio en el fotobiorreactor tubular siendo  $11,57 \text{ mg.L}^{-1}$ ; el mayor contenido de clorofila b se obtuvo en el fotobiorreactor de panel con  $3,27 \text{ mg.L}^{-1}$  siendo muy cercana la de tubular con  $3,10 \text{ mg.L}^{-1}$  y la producción de clorofila total fue mayor en el fotobiorreactor tubular con  $14,67 \text{ mg.L}^{-1}$ . La producción total de carotenoides previa a la fase de inducción en el fotobiorreactor tubular fue  $3,50 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  y en el fotobiorreactor de panel fue  $3,87 \text{ mg.L}^{-1}$ .

**QUINTA:** El mayor contenido de  $\beta$ -caroteno en el periodo de inducción se obtuvo a la concentración de  $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG3 en condiciones de cultivo de fotobiorreactor tipo panel, siendo la mayor productividad  $7,05 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , seguido de la interacción de  $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG3 y bajo condiciones de fotobiorreactor tubular con  $5,43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ .

## RECOMENDACIONES

- Determinar y comparar la producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* cultivada en fotobiorreactor tipo panel a diferentes condiciones estresantes de sal, iluminación y temperatura.
- Determinar y comparar la producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* con otras fitohormonas o reguladores del crecimiento tales como metil jasmonato, ácido fúlvico y ácido salicílico.
- Realizar estudios sobre la inducción de AG3 en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina*.
- Realizar el cultivo de *Dunaliella salina* en fotobiorreactor tipo panel a mayor escala, utilizando AG3 exógeno como inductor para incrementar la producción de  $\beta$ -caroteno.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. A. Shaish, A. Ben-Amotz, M. Avron Biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella* Methods Enzymol., 213 (1992), pp. 439–444
2. Aasen, A.J., Eimhjellen, K.E. and Liaaen-Jensen, S. (1969) An extreme source of  $\beta$ -carotene. Acta Chem Scan 23, 2544–2545.
3. Abd El-Baky, H.H., El-Baz, F.K. and El-Baroty, G.S. (2004) Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Biotechnology 3, 102–108.
4. Albrecht, M., Misawa, N. and Sandmann, G. (1999) Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin. Biotechnol Lett 21, 791–795.
5. Avron, M. (1992) Osmoregulation. In *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology* ed. Avron, M. and Ben-Amotz, A. pp. 135–159. Boca Raton: CRC Press.
6. Bajguz A, Asami T (2004) Effects of brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, on light and dark grown *Chlorella vulgaris*. Planta 218:869–877
7. Basu, T.K., Hill, G.B., Ng, D., Abdi, E. and Temple, N. (1989) Serum vitamins A and E, beta-carotene, and selenium in patients with breast cancer. J Am Coll Nutr 8, 524–529.
8. Ben-Amotz A (1993) Production of  $\beta$ -carotene and vitamins by the halotolerant alga *Dunaliella*. In Attaway DH, Zaborsky OR (eds), Pharmaceutical and Bioactive Products. Plenum Press, New York:411-417.
9. Ben-Amotz A, Avron M (1990) The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends Biotechnol. 8: 121-126.
10. Ben-Amotz A, Katz A, Avron M. Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich

- globules from *Dunaliella* bardawil (Chlorophyceae) J Phycol. (1982); 18 529–537.
11. Ben-Amotz, A. (1980) Glycerol production in the alga *Dunaliella*. In Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production ed. San Pietro, A. pp. 91–208. New York: Academic Press.
  12. Ben-Amotz, A. (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for  $\beta$ -carotene production. J Appl Phycol 7, 65–68.
  13. Ben-Amotz, A. (1996) Effect of low temperature on the stereoisomer composition of  $\beta$ -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella* bardawil (Chlorophyta). J Phycol 32, 272–275.
  14. Ben-Amotz, A. (1999) *Dunaliella*  $\beta$ -carotene. From science to commerce. In Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments ed. Seckbach, J. pp. 401–410. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
  15. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980) Glycerol,  $\beta$ -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. In Algae Biomass, Production and Use. ed. Shelef, G. and Soeder, C.J. pp. 603–661. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
  16. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1983) On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella* bardawil. Plant Physiol 72, 593–597.
  17. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1987) On the mechanism of osmoregulation in *Dunaliella*. In Energetic and Structure of Halophilic Microorganism. ed. Caplan, S.R. and Gizburg, M. pp. 529–541. Amesterdam: Elsevier/North-Holland.
  18. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1989a) The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. In Algal and Cyanobacterial Biotechnology. ed. Cresswell, R.C., Ress, T.A.V. and Shah, N. pp. 90–114. London: Longman Scientific and Technical Press.

19. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1989b) The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J Phycol* 25, 175–178.
20. Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1990) The biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Tibtech* 8, 121–126.
21. Ben-Amotz, A. and Berman-Frank, I. (2009), Carotenoids provide the major antioxidant defence in the globally significant N<sub>2</sub>-fixing marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Environmental Microbiology*, 11: 1897–1908. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01913.x
22. Ben-Amotz, A. and Shaish, A. (1992)  $\beta$ -carotene biosynthesis. In *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. ed. Avron, M. and Ben-Amotz, A. pp. q205–216. Boca Raton: CRC press.
23. Ben-Amotz, A., Gressel, J. and Avron, M. (1987) Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *J Phycol* 23, 176–181.
24. Ben-Amotz, A., Lers, A. and Avron, M. (1988) Stereoisomers of  $\beta$ -carotene and phytoene in alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 86, 1286–1291.
25. Ben-Amotz, A., Shaish, A. and Avron, M. (1989) Mode of action of the massively accumulated  $\beta$ -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by
26. Borowitzka, L.J. and Borowitzka, M.A. (1989)  $\beta$ -carotene (provitamin A) production with algae. In *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors* ed. Vandamme, E.J. pp. 15–26. London: Elsevier Applied Science.
27. Borowitzka, L.J. and Borowitzka, M.A. (1990) Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. *Bull Mar Sci* 47, 244–252.
28. Borowitzka, M.A. (1990) The mass culture of *Dunaliella salina*. In *Technical Resource Paper. Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds 2. Regional Seafarming Development*

- Demonstration Project pp. 63–80. Bangkok, Thailand: FAO Network of Agriculture Centers in Asia.
29. Borowitzka, M.A. (1995) Microalgae as a source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7, 3–15.
  30. Borowitzka, M.A. (1996) Closed algal photobioreactors: design considerations for large-scale systems. *J Mar Biotechnol* 4, 185–191. CAS
  31. Borowitzka, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70, 313–321.
  32. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1987) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunaliella salina*. In *Algal Biotechnology*. ed. Stadler, T., Molhan, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y. and Morvan, H.D. pp. 345–402. London: Elsevier Applied Science.
  33. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1988a) Algal growth media sources of algal culture. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. pp. 465–465. New York: Cambridge University Press.
  34. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1988b) Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. pp. 153–196. New York: Cambridge University Press.
  35. Borowitzka, M.A., (1992). Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *J. Appl. Phycol.*4, 267–279
  36. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., (1988). *Dunaliella*. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 27–58.
  37. Breitenbach, J., Zhu, C. and Sandmann, G. (2001) Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J Agric Food Chem* 49, 5270–5272.

38. Brown, A.D. and Borowitzka, L.J. (1979) Halotolerance of *Dunaliella*. In Biochemistry and Physiology of Protozoa. ed. Levandowsky, M. and Hutner, S.H. pp. 139–190. New York: Academic Press,
39. Burton GW, Ingold KU (1984) p-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224 569-573.
40. Butcher, R.W. (1959) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. 1. Introduction and Chlorophyceae. Fish Invest Ser Series 4 31, 175–191.
41. Chang, T., Ohta, S., Ikegami, N., Miyata, H., Kashimoto, T. and Kondo, M. (1993) Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. Bioresour Technol 44, 149–153.
42. Chaumont D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: A review of systems for outdoor mass culture. J. Appl. Phycol. 5, 593-605.
43. Chen, B.J. and Chi, C.H. (1981) Process development and evaluation for algal glycerol production. Biotechnol Bioeng 23, 1267–1287.
44. Chidambara Murthy, K.N., Vanitha, A., Rajesha, J., Mahadeva Swamy, M., Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A. (2005) In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*– a green microalga. Life Sci 76, 1381–1390.
45. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25: 94–306.
46. Chisti, Y., Biotechnol. Adv., 17, 689-690 (1999). Bioprocess technology: One stop shopping (book review).
47. Cifuentes, A.S., Gonzalez, M., Conejeros, M., Dellarossa, V. and Parra, O. (1992) Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. J Appl Phycol 4, 111–118.
48. Comstock, G.W., Helzlsouer, K.I. and Bush, T.L. (1991) Prediagnostic serum levels of carotenoids and vitamin E as related to subsequent cancer in Washington County, Maryland. Am J Clin Nutr 53(suppl.), 260S–264S.

49. Cunningham, F.X., Gantt, E., (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49, 557–583.
50. Curtain, C.C. (2000) The growth of Australian's algal  $\beta$ -carotene industry. *J Aust Biotechnol Assoc* 10, 19–23.
51. Curtain, C.C. and Snook, H. (1983) Method for Harvesting Algae. US Patent 511 135.
52. Cysewski, GR, y Todd-Lorenz R. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—species of high potential *Haematococcus*. *Biotechnology and applied phycology*: 281-288.
53. Czerpak R, Bajguz A, Gromek M, Kozłowska G, Nowak I (2002) Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Physiol Plant* 24:45–52
54. Czerpak, R., Piotrowska, A., Szulecka, K., (2006). Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris*. *Acta Physiol. Plant.* 28, 195–203.
55. Day J and Tsavalos A. (1996). An investigation of the heterotrophic culture of the green alga *Tetraselmis*. *Journal of Applied Phycology* 8: 73–77.
56. Donmez, G. and Aksu, Z. (2002) Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochem* 38, 751–762.
57. Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N. and Ravishankar, G.A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Technol* 16, 389–406.
58. E. Mutasa-Gottgens, A. Qi, A. Mathews, S. Thomas, A. Phillips, P. Hedden. Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement *Transgenic Res*, 18 (2009), pp. 301–308.
59. Ershov Y, Gantt R, Cunningham F, Gant E (2002) Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the

- pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. *J Bacteriol* 184:5045–5051 16.
60. FABREGAS, J., ABALDE, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & VEIGA, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
61. Farahat N., Rabhi M., Falleh H., Jouini J., Abdelly C. and Smaoui A. “Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae).” *Phycological Society of America*, 2011. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x
62. Fernandes BD, Dragoner GM, Teixeira JA and Vicente AA. (2010). Light regime characterization in an air-lift. Photobioreactor for production of microalgae with high starch content. *Applied Biochemical and Biotechnology* 61: 218–226.
63. Flores, Coral Contreras, Peña-Castro, Julián Mario, Flores-Cotera, Luis Bernardo, & Cañizares-Villanueva, Rosa Olivia. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8), 450-456.
64. Fung IP (2005) Elicitation of astaxanthin biosynthesis in dark-heterotrophic cultures of *Chlorella zofingiensis*. PhD thesis, The University of Hong Kong, Hong Kong
65. García-González, M., Moreno, J., Canavate, J.P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Folrencia, F.J. and Guerrero, M.G. (2003) Condition for open-air outdoor of *Dunaliella salina* in southern Spain. *J Appl Phycol* 15, 177–184.
66. García-González, M; Moreno, J; Manzano, JC; Florencia, FJ; Guerrero, MG. (2005) Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-

- carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J Biotechnol*, 115, 81–90.
67. Geng, D., Wang, Y., Wang, P., Li, W. and Sun, Y. (2003) Stable expression of hepatitis surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Appl Phycol* 15, 451–456.
  68. Ginzburg, M. and Ginzburg, B.Z. (1993) Effect of light intensity of adaptation of *Dunaliella* to very high salt concentrations. *J Exp Bot* 44, 1561–1567.
  69. Gomez, P.I. and Gonzalez, M.A. (2001) Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biol Res* 34, 23–30.
  70. Gomez, P.I. and Gonzalez, M.A. (2004) Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture* 233, 149–162.
  71. Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S. and Gonzalez, M.A. (2003) Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawill* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biol Res* 36, 185–192.
  72. Gotz, T., Windhovel, U., Boger, P. and Sandmann, G. (1999) Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol* 120, 599–604.
  73. Govind, N.S., Amin, A.R. and Modi, V.V. (1982) Stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by cupric ions. *Phytochemistry*, 21, 1043–1044.
  74. Grizeau, D. and Navarro, J.M. (1986) Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized within calcium alginate beads. *Biotechnol Lett* 8, 261–264.

75. Grobbelaar, J.U. (1995) Influence of areal density on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol* 7, 69–73.
76. Gudin C, Chaumont D (1983) Solar biotechnology study and development of tubular solar receptors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. In Palz W, Pirrwitz D (eds), *Proceedings of the Workshop and E.C. Contractor's Meeting in Capri*. D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, 184–193.
77. Guillard, R.R. and Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8, 229–239.
78. Hall, J.A. and Golding, L.A. (1998) Standard methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report no. MFE80205. Wellington, New Zealand: NIWA report for the Ministry for the Environment.
79. Harmut, A. and Lichtenthaler, K.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes, *Methods Enzymol.*, 148, 350–383 (1987).
80. Hayman Yokoyama, W-J. Hsu and S. M. Poling, (1975). Method for coloring fruits and vegetables, United States Patent 3,911,148, Washington, D. C.
81. Hedden P, Proebsting Y. (1999) Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 431–460
82. Hejazi, M.A., Andrysiewicz, E., Tramper, J. and Wijffels, R.H. (2003) Effect of mixing rate on  $\beta$ -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-Phase bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 84, 591–596.
83. Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H., Zenk, M.H. and Miyamoto, K. (2001) Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *J Biosci Bioeng* 92, 24–29.

84. Horwitz, B.A. (1994) Properties and transduction chains of the UV and blue light photoreceptors. In: Kendrick, K.E. and Kronenberg, G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 327–350.
85. Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. (2006) Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 1003–1009.
86. Hu, C., Lin, J., Lu, F., Chou, F. and Yang, D. (2008) Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem* 109, 439–446.
87. Huang JJ-H, Cheung PC-K (2011) +UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyceae). *Food Chem* 129(3):783–791.
88. Huntley, M.E. and Redalje, D.G. (2007) CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strat Glob Change* 12, 573–608.
89. Ip P and Chen F. (2005). Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry* 40: 733–738
90. Jahns, P. and Holzwarth, A.R. (2012). The Role of the Xanthophyll Cycle and of Lutein in Photoprotection of Photosystem II. *Biochimica Biophysica Acta*, 1817, 182-193.
91. Javanmardian M and Palsson BO. (1991). High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 1182-1189.
92. Jin, E., Lee, C.G., Polle, J.E.W., 2006. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 821–831.

93. Katz, A. and Pick, U. (2001) Plasma membrane electron transport coupled to Na<sup>+</sup> extrusion in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochim Biophys Acta* 1504, 423–431.
94. Kay, R.A. (1991) Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci. Nut* 30, 555–573.
95. Kelloff, G.J. (2000) Perspective on cancer chemoprevention research and drug development. *Adv Cancer Res* 78, 199–334.
96. Klausner, A. (1986) Algaculture: food for thought. *Biotechnology* 4, 947–953.
97. Kleinegris DMM, van Es MA, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. Phasetoxicity of dodecane on the microalga *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol* (2010).
98. Kommareddy AR and Anderson GA. (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). ASAE Paper No. 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan.
99. L. Vandanon, N. Rossignol, P. Jaouen, J.M. Roberts, F. Quéméneur Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 63 (1999), pp. 1–9
100. L.G. Phillips, A.K. Cowan, P.D. Rose, R.R. Logie. Operation of the xanthophyll cycle in non-stressed cells of *Dunaliella salina* Teod in response to diurnal changes in incident irradiation: a correlation with intracellular  $\beta$ -carotene content *J. Plant Physiol.*, 146 (1995), pp. 547–553
101. Lagarde, D., Beuf, L. and Vermaas, W. (2000) Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 66, 64–72.
102. Lee, Y. (2001) Microalgal mass culture system and method: the limitation and potential. *J Appl Phycol* 13, 307–315.

103. Leon, R., Vila, M., Hernanz, D. and Vilchez, C. (2005) Production of phytoene by herbicide-treated microalgae *Dunaliella bardawil* in two-phase systems. *Biotechnol Bioeng* 92, 695–701.
104. Li S, Li L (2008) Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation and beyond. *J Integr Plant Physiol* 50:778–785 19. Tran D, Haven JH, Qiu WG (2009) An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic synthase evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. *Planta* 229:723–729
105. Li, J., Xu, N.S. and Su, W.W. (2002) Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement. *Biochem Eng J* 14, 51–65.
106. Li, J., Xue, L., Yan, L., Liu, H. and Liang, J. (2008) Inducible EGFP expression under the control of the nitrate reductase gene promoter in transgenic *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol* 20, 137–145.
107. Liang Y, Sarkany N and Cui Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters* 31: 1043–1049.
108. Linden, H., (1999). Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochem. Biophys. Acta* 1446, 203–212.
109. Liu, B.H. and Lee, Y.K. (2000) Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum sp.* *J. Appl. Phycol.*, 12, 301–307.
110. Loeblich, L.A. (1982) Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Mar Biol Assoc U.K.* 62, 493–508.
111. Lorenz RT and Cysewski GR. (2000). Commercial potential of *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* 18: 160-167.

112. Lou HP and Al-Dahhan MH. (2004). Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnology and Bioengineering* 85. 382-393.
113. Lu C and Vonshak A. (1999). Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *Journal of Applied Phycology*. 11: 355-359.
114. Marin, N., Morales, F., Loderiros, C. and Tamigneaux, E. (1998) Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J Appl Phycol* 10, 405–411.
115. Massé G, Belt S, Rowland S, Rohmer M (2004) Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4413–4418 15.
116. Massyuk, N.P. (1956) Effect of Na, Mg, Cl and SO<sub>4</sub> ions on growth, reproduction, and carotene production in *D. salina* Teod. *Ukr Bot Zh* 22, 3–11.
117. Massyuk, N.P. (1973) Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. and Prospects for its Potential Utilization. Kiev: Naukora Dumk.
118. Mayer, H. and Isler, O. (1971) Total syntheses. In *Carotenoids* ed. Isler, O. pp. 328–575. Basle: Birkhauser.
119. Mclachlan, J. (1973) Growth-media-marine. In *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement* ed. Stein, J.R. pp. 25–51. London: Cambridge University Press.
120. Mclachlan, J. (1973) Growth-media-marine. In *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement* ed. Stein, J.R. pp. 25–51. London: Cambridge University Press.

121. McLachlan, J. and Yentsch, C.S. (1959) Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture. Biol Bull (Woods Hole) 116, 461–471.
122. McLachlan, J. and Yentsch, C.S. (1959) Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture. Biol Bull (Woods Hole) 116, 461–471
123. Mil'ko, E.S. (1963) Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya*, 32, 299–307.
124. Mogedas B, Casal C, Forjan E, Vilchez C.  $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J Biosci Bioeng.* (2009); 108:47–51. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.022
125. Mojaat M, Foucault A, Pruvost J, Legrand J. (2008) Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina*. *J. Biotechnol.* 2008;133:43–441.
126. Moulton, T.P. and Burford, M.A. (1990) The mass culture of *Dunaliella viridis* (volvocales, chlorophyta) for oxygenated carotenoids: laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiologia* 204/105, 401–408.
127. Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N., Jones, J., (2008). Control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* 18, 650–655.
128. Ogbonna JC and Tanaka H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology.* 12: 207-218.
129. Olaizola M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology.* 12: 499-506.
130. Omenn, G.S. (2000) Chemoprevention of lung cancer is proving difficult and frustrating, requiring new approaches. *J Natl Cancer Inst* 92, 959–960.

131. Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst* 1, 2. doi: DOI: 10.1186/1746-1448-1-2.
132. Orset and Young, (2000) S.C. Orset, A.J. Young Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis  $\beta,\beta$ -carotene in *Dunaliella salina* (Teod) *Plant Physiol.*, 122 (2000), pp. 609–617
133. Oswald, W.J. (1988) Large-scale algal culture systems. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. pp. 357–394. New York: Cambridge University Press.
134. Paolini, M., Cantelli-Forti, G., Perocco, P., Pedulli, G.F., Abdel-Rahman, S.Z. and Legator, M.S. (1999) Co-carcinogenic effect of  $\beta$ -carotene. *Nature* 398, 760–761.
135. Pirt SL, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HH and Bazin MJ. (1983). A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance. *Journal of Chemical and Technological Biotechnology* 33: 35-38.
136. Powtongsook, S., Kittakoop, P., Menasveta, P. and Wisessang, S. (1995) Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand. *J Appl Phycol* 7, 75–76.
137. Preetha, K., John, L., Subin, C. S., & Vijayan, K. K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian *salinas* and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8, 27.
138. Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 287–293.
139. Raman Vidhyavathi , Ravi Sarada (2011) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* *Journal Acta Physiologiae Plantarum* 2011, Volume 33, Issue 3, pp 1043-1049 Volume 33, Issue 3 , pp 1043-1049.

140. Reyna-Velarde R, Cristiani-Urbina E, Hernández-Melchor DJ, Thalasso F and Cañizares-Villanueva RO. 2010. Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel air-lift photobioreactor with high light path. *Chemical Engineering and Processing* 49: 97–103.
141. Richmond, A. (1986) Outdoor mass cultures of microalgae. pp. 285–330. In: A. Richmond (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
142. Richmond, Z. Cheng-Wu. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. *J. Biotechnol.*, 85 (2001), pp. 259–269
143. Salguero A, León R, Mariotti A, de la Morena B, Vega JM, Vílchez C. UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 66:506–511. doi: 10.1007/s00253-004-1711-6.
144. Schaller, F., (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J. Exp. Bot.* 52, 11–23.
145. Schwender J, Gemunden C, Lichtenthaler H (2001) Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* 212:416–423
146. Serrano, L.; Sierra, E.; Álvarez, C.; Narváez, P.; Ramírez, D.; Scott, Ó.; Torres, J. & Godoy, R. 2011 Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella vulgaris* Laun 0019. *Iteckne*, 8:15-22.
147. Shariati M., Hadi M.R. “Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*” *Biomedical Engineering*, 2011. DOI: 10.5772/19046
148. Shklar, G., Schwartz, I., Trickier, D. and Reid, S. (1989) Regression of experimental cancer by oral administration of combined alpha-tocopherol and beta-carotene. *Nutr Cancer* 12, 321–325.

149. Sierra E, Acien FG, Fernandez JM, Garcia JL, Gonzales C and Molina E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal* 138: 136–147.
150. Singh RN and Sharma S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 2347– 2353.
151. Smith D., Lee R., Cushman J., Magnuson J., Tran D. and Polle J.” The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA.” *BMA Plant Biology*, 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-83
152. Stahl, W., Sies, H., 1997 Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. 1997 *Am J Clin Nutr* July 1997 vol. 66 no. 1 116-122.
153. Stich, H.F., Rosin, M.P., Hornby, A.P., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. and Nair, M.K. (1988) Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int J Cancer* 42, 195–199.
154. Su, W.W., Li, J. and Xu, N.S. (2003) State and parameter estimation of microalgal photobioreactor cultures based on local irradiance measurement. *J Biotechnol* 105, 165–178.
155. Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L. (2005) Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248, 207–216.
156. Takimura, O., Fuse, H., Murakami, K., Kamimura, K. and Yamaoka, Y. (1996) Uptake and reduction of arsenate by *Dunaliella* sp. *Appl Organomet Chem* 10, 753–756.

157. Talón, M. and P.C. Oden, (2000). “Giberelinas”. Fundamento de fisiología vegetal, Azcon-Bieto y Talón (Eds.) Interamericana McGraw-Hill. 325-341 pp.
158. Taylor, R. and Fletcher, R.L. (1999) Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies. *J Appl Phycol* 10, 481–501.
159. Telfer Alison, Dmitrij Frolov, Barber James, Bruno Robert, and Andy Pascal (2003) Oxidation of the Two  $\beta$ -Carotene Molecules in the Photosystem II Reaction Center. *Biochemistry*, 2003, 42 (4), pp 1008–1015
160. Teodoresco, E.C. (1905) Organisation et development du *Dunaliella nouveau* genre de Volvocacee-polyblepharidee. *Bot Zentralblatt Beih* 18, 215–232.
161. Thakur, A. and Kumar, H.D. (1999) Nitrate, ammonium, and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina*. *Bull Environ Contam Toxicol* 62, 70–78.
162. Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. and Nagai, S. (1994) Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* 16, 133–138.
163. Tornwall, M.E., Virtamo, J., Korhonen, P.A., Virtanen, M.J., Taylor, P.R., Albanes, D. and Huttunen, J.K. (2004) Effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *Eur Heart J* 25, 1171–1178.
164. Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R and Florenzano G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass* 11: 61-64.
165. Tredici, M.R. and Zitelli, G.C. (1997) Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in flat plate reactors. In *Spirulina Platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology ed. Vonshak, A. pp. 117–130 London: Taylor and Francis.

166. Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M. and Miyamoto, K. (2002) Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 653–659.
167. Tsukahara, K. and Sawayama, S. (2005) Liquid fuel production using microalgae. *J Jpn Petrol Inst* 48, 251–259.
168. Tsukida, K., Saiki, K., Takii, T. and Koyama, Y. (1982) Separation and determination of cis/trans- $\beta$ -carotenes by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 245,
169. Ugwu CU, Aoyagi H and Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99: 4021–4028.
170. Van Poppel, G. (1993) Carotenoid and cancer-an update with emphasis on human intervention studies. *Eur J Cancer* 29, 1335–1344.
171. Williams, A. W., Boileau, T. W. M., Clinton, S. K. & Erdman, J. W., Jr. (2000)  $\beta$ -carotene stability and uptake by prostate cancer cells is dependent upon delivery vehicle. *Nutr. Cancer* (in press).
172. Woutersen, R.A. and Garderen-Hoetmer, A.V. (1988) Inhibition of dietary fat promoted development of (pre)neoplastic lesions in exocrine pancreas of rats and hamsters by supplemental selenium and  $\beta$ -carotene. *Cancer Lett* 49, 79–85.
173. Zhang K, Kurano N and Miyachi S. 2002. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess Biosystems Bioengineering* 25, 97–101.
174. Zhu, Y.H. and Jiang, J.G. (2008) Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene. *Eur Food Res Technol* 227, 953–959.
175. Ziegler, R., Egle, K., (1965). Zur quantitativen analyse der chloroplastenpigmente. I. kritische überprüfung der

spektralphotometrischen chlorophyll-bestimmung. Beitr. Biol. Pflanzen 41,  
11–37.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### PANEL FOTOGRÁFICO

##### I. Inóculo de *Dunaliella salina* para su propagación



II. Preparación de medios de cultivo e inoculación de *Dunaliella salina*.



III. Escalamiento del cultivo de *Dunaliella salina*.



IV. Sistema de suministro de CO<sub>2</sub>.



V. Establecimiento del sistema de cultivo a condiciones ambientales



VI. Extracción de clorofila



ANEXO 2

RECUENTOS Y EVALUACIONES

I. Recuento celular ( Células.mL<sup>-1</sup>)

| Días de cultivo | Reactor en panel |              |              | Reactor tubular |              |              |
|-----------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
|                 | Repetición 1     | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 1    | Repetición 2 | Repetición 3 |
| 1               | 1100000          | 1100000      | 1100000      | 1100000         | 1100000      | 1100000      |
| 3               | 1300000          | 1350000      | 1400000      | 1200000         | 1150000      | 1100000      |
| 5               | 1600000          | 1550000      | 1500000      | 1400000         | 1350000      | 1300000      |
| 7               | 1800000          | 1750000      | 1700000      | 1300000         | 1450000      | 1600000      |
| 9               | 1900000          | 1900000      | 1900000      | 1500000         | 1600000      | 1700000      |
| 11              | 2100000          | 2050000      | 2000000      | 1600000         | 1700000      | 1800000      |
| 13              | 2300000          | 2250000      | 2200000      | 1800000         | 1800000      | 1800000      |
| 15              | 2500000          | 2450000      | 2400000      | 1800000         | 1850000      | 1900000      |
| 17              | 3700000          | 3200000      | 2700000      | 2000000         | 2100000      | 2200000      |
| 19              | 3800000          | 3350000      | 2900000      | 2100000         | 2250000      | 2400000      |
| 21              | 3800000          | 3500000      | 3200000      | 2500000         | 2550000      | 2600000      |
| 23              | 3900000          | 3650000      | 3400000      | 2700000         | 2750000      | 2800000      |

|    |         |         |         |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 25 | 4000000 | 3700000 | 3400000 | 2700000 | 2750000 | 2800000 |
| 27 | 4100000 | 3800000 | 3500000 | 2700000 | 2800000 | 2900000 |
| 29 | 4200000 | 3850000 | 3500000 | 2700000 | 2800000 | 2900000 |



## II. Registro de pH a condiciones de laboratorio

| Registro de pH a condiciones de laboratorio |         |       |
|---|---------|-------|
| Días  | Tubular | Panel |
| 1   | 7,3     | 7,5   |
| 3   | 7,5     | 7,7   |
| 5   | 7,4     | 7,4   |
| 7   | 7,4     | 7,6   |
| 9   | 7,4     | 7,6   |
| 11  | 7,7     | 7,9   |
| 13  | 7,8     | 8,0   |
| 15  | 7,9     | 8,1   |
| 17  | 7,9     | 8,4   |
| 19  | 8,2     | 8,7   |
| 21  | 8,3     | 8,5   |
| 23  | 8,4     | 8,6   |
| 25  | 8,5     | 8,7   |
| 27  | 8,4     | 8,8   |
| 29  | 8,5     | 8,9   |

III. Concentración de  $\beta$ -Caroteno ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y productividad de  $\beta$ -caroteno ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ )

| CONCENTRACION DE AG3             | TIPO DE REACTOR | CONCENTRACION DE $\beta$ -CAROTENO $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | PRODUCTIVIDAD $\beta$ -CAROTENO $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ |
|----------------------------------|-----------------|--|---|
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>TUBULAR | 7,35   | 2,92  |
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>TUBULAR | 6,89   | 2,73  |
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>TUBULAR | 6,43   | 2,55  |
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>PANEL   | 12,60  | 4,77  |
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>PANEL   | 11,81  | 4,47  |
| 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  | F.B.<br>PANEL   | 11,02  | 4,17  |
| 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | F.B.<br>TUBULAR | 13,16  | 5,22  |
| 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | F.B.<br>TUBULAR | 13,70  | 5,43  |
| 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | F.B.<br>TUBULAR | 14,23  | 5,65  |
| 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | F.B.<br>PANEL   | 19,32  | 7,32  |

|                        |                 |       |      |
|------------------------|-----------------|-------|------|
| 20 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>PANEL   | 18,64 | 7,06 |
| 20 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>PANEL   | 17,95 | 6,80 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>TUBULAR | 10,21 | 4,05 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>TUBULAR | 11,16 | 4,43 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>TUBULAR | 12,11 | 4,81 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>PANEL   | 13,54 | 5,13 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>PANEL   | 13,79 | 5,22 |
| 40 mg. L <sup>-1</sup> | F.B.<br>PANEL   | 14,03 | 5,31 |

IV. Concentración de Clorofila a, b, total y carotenoides totales

|            | CLOROFILA<br>A mg. L <sup>-1</sup> | CLOROFILA<br>B mg. L <sup>-1</sup> | CLOROFILA<br>TOTAL mg. L <sup>-1</sup> | CAROTENOIDES<br>TOTALES mg. L <sup>-1</sup> |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| F.B. PANEL | 6,20                               | 2,30                               | 8,50                                   | 3,90  |
| F.B. PANEL | 6,80                               | 3,30                               | 10,10                                  | 3,90  |
| F.B. PANEL | 7,40                               | 4,20                               | 11,60                                  | 3,81  |

|                 |       |      |       |      |
|-----------------|-------|------|-------|------|
| F.B.<br>TUBULAR | 12,00 | 3,80 | 15,80 | 3,47 |
| F.B.<br>TUBULAR | 11,60 | 3,10 | 14,70 | 3,50 |
| F.B.<br>TUBULAR | 11,10 | 2,40 | 13,50 | 3,54 |



## V. Registro de pH a condiciones ambientales

| Registro de pH a condiciones ambientales |         |       |
|--|---------|-------|
| Días                                     | Tubular | Panel |
| 1  | 8,8     | 9,0   |
| 2  | 8,7     | 9,1   |
| 3  | 8,6     | 9,2   |
| 4  | 8,7     | 9,1   |
| 5  | 8,6     | 9,2   |
| 6  | 8,8     | 9,0   |
| 7  | 9,0     | 9,4   |
| 8  | 8,9     | 9,1   |
| 9  | 8,8     | 9,1   |
| 10                                       | 8,9     | 9,1   |
| 11                                       | 9,2     | 9,4   |
| 12                                       | 9,3     | 9,5   |
| 14                                       | 9,2     | 9,6   |