

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de *Chaetoceros muelleri* y su patrón electroforético

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Ricardo Iván González Vega

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Ricardo Iván González Vega**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico Biólogo Clínico**

Dr. José Antonio López Elías

Director de Tesis

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Secretario

Dr. Enrique Márquez Ríos

Vocal

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por permitirme obtener el grado de licenciatura como Químico Biólogo Clínico.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

Al laboratorio LIA.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA).

En el momento de culminar de manera exitosa una nueva meta en la vida siempre hay personas que ayudan a que esta sea una realidad. Con gran alegría doy cita al nombre de personas que han sido importantes:

Un agradecimiento especial al Dr. José Antonio López Elías quien fungió como director de tesis y guió durante toda la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Márquez del DIPA, un profundo agradecimiento por el apoyo desinteresado que me brindó durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda y al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores.

A la Dra. Ana Gloria por los conocimientos brindados durante la realización del presente trabajo.

Al profesor Antonio Alcantar por su apoyo incondicional brindado durante la carrera y su amistad brindada.

Un profundo agradecimiento a la Dra. Casanova por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A los profesores, compañeros y amigos del laboratorio de Acuicultura: Dr. Fernando, profesor Lauro y profesor Álvaro. A Diana, Dabith y Angélica, quienes me ayudaron, apoyaron académicamente y brindaron su amistad.

A mis compañeros frikies y no frikies de la carrera quienes se convirtieron en mis mejores amigos: A carretas (por enseñarme a reusar el potenciómetro), Emma, Machuy, Rosa, Samara, Raquel, Claudia, Encinas, Sr. Rueda, Walter, Santa, David, Álvaro y Ale, quienes impactaron mi vida de forma trascendental y estuvieron conmigo para salir adelante y quienes me apoyaron no sólo académicamente.

A mis mejores amigos con los que he pasado grandes momentos (la banda): A Rocío, Sergio, Brisa, Lili (Manuel Lizárraga) y Magda, por estar conmigo en los mejor momentos, quienes estuvieron al pendiente de mí y apoyaron en cada paso que di.

A cada profesor que mostrando interés o en contra de su voluntad, me asesoraron y ayudaron a cumplir con mi trabajo; por su conocimiento, experiencia y amistad, M en C Tequida, M en C. Rascón y M en C. Moisés Navarro.

A cada compañero y amigo, mencionado y no mencionado por brindarme su apoyo moral y conocimiento.

ॐ *Dankeschön*

DEDICATORIA

A Dios por permitirme terminar mi carrera y prestarme vida

A mis padres José Luis y Mayela por ser guías incansables e incomprensidos, y a quienes
quiero y admiro profundamente.

A mi tío Juan Vega Favela†, por mostrarme el valor de la vida y de los seres humanos

A mi tía Juana Castañeda† por enseñarme la bondad que existe en las personas

A mi tío Jorge Favela†

A mis hermanos José Luis y Nidia Ivette

A mi abuela Petra Vega Favela

A mi sobrina

A todos mis amigos que me acompañaron en momentos buenos y malos durante toda mi
carrera

"Nunca olvides que basta una persona o una idea para cambiar tu vida para siempre, ya sea
para bien o para mal"

Brown, J.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
OBJETIVOS.....	12
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	17
Descripción de las Microalgas.....	17
Importancia Comercial de las Microalgas	18
Nutrición Humana	20
Alimentación Animal	20
Microalgas en Cosméticos	21
Descripción de la Curva de Crecimiento.....	21
Fase Lag o de Inducción.....	22
Fase Logarítmica o de Crecimiento Exponencial.....	22
Fase de Lento Crecimiento.....	23
Fase Estacionaria o Crecimiento Nulo.....	23

Fase de Muerte.....	23
Sistemas de Cultivos de Microalgas.....	24
Nivel Cepario.....	24
Nivel Masivo.....	24
Cultivos Intensivos.....	25
Cultivos Extensivos.....	25
Cultivos Discontinuos.....	26
Cultivos Continuos.....	26
Cultivos Semi-continuos.....	26
Medios de Cultivos para Microalgas.....	26
Medios Enriquecidos	27
Medios Químicamente Definidos.....	27
Importancia de los Nutrimientos del Medio de Cultivo.....	29
Macronutrientes.....	29
Oxígeno.....	29
Hidrógeno.....	30
Fósforo.....	30
Micronutrientes.....	30
Investigaciones con microalgas.....	31
Nitrógeno como constituyente del organismo.....	32
Nitrato.....	33
Urea.....	34

Asimilación de nitratos y Nitritos.....	34
Asimilación de Urea como Compuesto de Nitrógeno Orgánico.....	36
Efectos de la Deficiencia de Nitrógeno en Microalgas.....	38
Metabolitos de Interés que Producen las Microalgas.....	38
Proteínas y péptidos.....	38
Carotenoides.....	39
Pigmento.....	40
Lípidos (Ac. Grasos).....	40
Vitaminas.....	41
MATERIALES Y METODOS.....	42
Selección de la especie.....	42
Aclimatación.....	42
Preparación de los medios de cultivo.....	42
Diseño del experimento.....	43
Determinación de la concentración celular.....	43
Determinación de la biomasa.....	45
Peso seco.....	45
Materia Orgánica.....	45
Cenizas.....	45
Floculación del alga.....	46
Extracción y Determinación de Proteína.....	46
Perfil Electroforéticos.....	47

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
Tratamiento estadístico.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
Curva de Crecimiento de <i>Chaetoceros muelleri</i> en Dos Fuentes de Nitrógeno a Tres Concentraciones (f/2, 2f y 4f).....	49
Concentración Celular al Momento de la Cosecha, Tasas de Crecimiento Máxima, Acumulada y Promedio de los Cultivos de <i>Chaetoceros mulleri</i> en las Dos Fuentes de Nitrógeno en los Tres Medios de Cultivo.	52
Evaluación de Biomasa de los Cultivos de la Microalga <i>Chaetoceros mulleri</i> en las Dos Fuentes de Nitrógeno en los Tres Medios de Cultivo.	53
Peso Seco.....	53
Materia Orgánica.....	54
Cenizas.....	54
Proteína (%).....	55
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Importancia de las algas en humanos.....	19
2. Medio Guillard f/2.....	28
3. Tasas de crecimiento de algunas algas en diversas fuentes de nitrógeno.....	33
4. Diseño experimental.....	43
5. Concentración celular promedio final, tasa de crecimiento máxima, acumulada y promedio de los cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> con las dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a las tres concentraciones (f/2, 2f y 4f).....	53
6. Evaluación de Biomasa de peso seco, materia orgánica, cenizas y proteína en dos fuentes de nitrógeno, nitratos y urea	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de <i>Chaetoceros spp.</i>	18
2	Curva de Crecimiento de una Microalga.....	22
3	Cultivos Masivos de Microalgas en Tanques de Fibra de Vidrio.....	25
4	Estructura de la Nitrato Reductasa de <i>Chlorella</i> conforme a Solomonson...	35
5	Diseño del Experimento. Cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> con dos fuentes de nitrógeno diferentes (NO ₃ y Urea) por triplicado.....	44
6	Curvas de Crecimiento de los cultivos de los <i>Chaetoceros muelleri</i> con NO ₃ como fuente de Nitrógeno en cel/mL.....	50
7	Curvas de Crecimiento de los cultivos de los <i>Chaetoceros muelleri</i> con urea como fuente de Nitrógeno en cel/mL.....	51
8	Electroforesis con SDS-PAGE de muestras de microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> , con NO ₃ como fuente de nitrógeno y urea (tinción con plata).....	58

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de dos fuentes de nitrógeno (urea y NO_3) a tres concentraciones (f/2, 2F y 4F) en la producción de proteínas de cultivos masivos de *Chaetoceros muelleri* en condiciones controladas de laboratorio.

Objetivos Particulares

- 1) Estimar el crecimiento y producción de biomasa de cultivos masivos de *Chaetoceros muelleri* en dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a tres concentraciones (f/2, 2F y 4F).
- 2) Cuantificar la concentración de proteínas de cultivos masivos de *C. muelleri* en dos fuentes de nitrógeno a tres concentraciones (f/2, 2F y 4F).
- 3) Determinar el patrón electroforético de las proteínas de los cultivos masivos de *C. muelleri* en los cultivos con las dos fuentes de N a las tres concentraciones de los medios de cultivo.

RESUMEN

Las proteínas son uno de los principales metabolitos dentro de la dieta de los organismos marinos cultivados en acuicultura, ya que son imprescindibles para su crecimiento. Las microalgas marinas y en específico las diatomeas como *Chaetoceros* sp. son una fuente rica de proteínas. La cantidad producida de este componente es influenciada por los nutrimentos, temperatura, fotoperiodos, salinidad e intensidad luminosa. Por lo que en este trabajo se estudió el crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*, con dos fuentes nitrógeno (nitratos y urea) diferentes a distintas concentraciones, utilizando el medio f/2 de Guillard como control. Los tratamientos fueron los medios f/2, 2F y 4F con NO₃, y los medios f/2, 2F y 4F con urea. La microalga se aclimató a cada una de las fuentes de nitrógeno (urea y NO₃), para posteriormente llevar a cabo el experimento en garrafones de 20 L con 15 L de cultivo por triplicado. El crecimiento fue monitoreado diariamente, realizando conteos celulares diarios y al final se determinó la biomasa de forma gravimétrica y contenido de proteínas con el método de Lowry modificado (1972). Se realizó un perfil electroforético en SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Se encontró que el crecimiento máximo se registró en el medio 4F con urea con un valor de 2.83×10^6 cél/mL. La tasa máxima, promedio y acumulada con 2.48 div/día, 1.50 div/día y 6.01 divisiones, respectivamente. El cultivo en el medio 2F de urea presentó la mayor producción de biomasa en peso seco, materia orgánica y cenizas (0.0044, 0.0162 y 0.0274 g; respectivamente), La mayor proporción de proteínas se presentó en el medio f/2 de urea, con un valor del 23.74%. El perfil electroforético presentó bandas en los medios con NO₃, Los pesos moleculares oscilaron entre los 6.5 k y 90 kDa aproximadamente. El patrón de bandeo en el tratamiento con NO₃ se vio influenciado por el porcentaje de proteínas. La incorporación de urea al medio de cultivo fue mejor que en los medios con NO₃, ya que contribuyó a un aumento en la producción de la concentración celular, biomasa y proteína.

INTRODUCCIÓN

El fitoplancton está constituido de microalgas (Tacon, 1999), las cuales son organismos fotosintéticos, que contienen clorofila "a" y varios tipos de carotenoides y metabolitos, desprenden oxígeno a la atmosfera beneficiando a los humanos y capturando el CO₂ de la atmosfera, pueden ser utilizadas para la producción de biodiesel, para su utilización como nuevo combustible ecológico (Graham y Wilcox, 2000). Tienen movilidad limitada gracias a que algunas poseen flagelos (Espinoza, 2005), son organismos unicelulares que crecen de forma individual, habitan en ambientes húmedos como el mar, lagunas entre otros. Pueden llegar a ocupar una gran extensión superficial donde exista el paso de luz solar para su fotosíntesis, gracias a que poseen organelos llamados cloroplastos como las plantas, que en la mayoría de los casos les confieren el color o pigmento verde. Contienen otros organelos llamados cromatóforos, y una variabilidad de enzimas que le ayuda a la síntesis de energía (González, 2000).

Las microalgas juegan un papel importante como productores primarios de varios consumidores, (Seyfabadi, 2010). Son utilizadas en muchos laboratorios para la producción de larvas para su uso en acuicultura (Richmond, 2004). Las cuales no deben ser tóxicas y deben tener una pared celular digerible, ya que son productores de una gran cantidad de materia. Debido a su alto contenido nutricional han tenido gran importancia comercial (Richmond, 2004), mismas que se han ido desarrollando en los últimos años (Jensen, 2001). Se destacan en la utilización como fuente de alimento ya sea directo o en complemento de dietas (Grobbelaar, 2010), se pueden utilizar como parte de los cosméticos gracias a que son una fuente de pigmentos y tintes naturales (Stolz y Obermayer, 2005). Son cultivados como fuente de moléculas de alto peso molecular como los ácidos grasos y aceites esenciales, son utilizados para los suplementos nutricionales (Certik y Shimizu, 1999). Son organismos productores de una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos (Carlucci, 1999), esta composición bioquímica depende, en mayor grado, de la concentración de los nutrimentos en el medio de cultivo y del estado fisiológico (Myklestad y Haug, 1972). Por ello son parte de la dieta en el desarrollo de organismos acuáticos, ya que es el alimento esencial durante las primeras etapas de su desarrollo especies como crustáceos y moluscos, que son importantes para la economía (Riley y chester, 1989).

Las microalgas como la *Chaetoceros sp.*, son empleadas en muchos laboratorios de producción de larvas para su uso en acuicultura (Richmond, 2004), la cual es una diatomea marina de vida solitaria, de forma rectangular, mide de 4 a 6 micras, su pared celular está compuesta por sílice, y está compuesta de dos valvas las cuales se separan en la reproducción durante su división vegetativa (González, 2000).

El crecimiento de las microalgas en general está constituida por 5 fases: lag, logarítmica (o exponencial), lento crecimiento, estacionaria y muerte. La curva de crecimiento se utiliza para saber el momento al cual se debe tomar el inóculo y sea más factible su estudio, además de tener su punto máximo de aprovechamiento (Paniagua y col., 1993) (Fogg y Thake, 1987).

Para ello se toman medidas para mantener los cultivos de microalgas. Se utilizan recipientes de plástico o vidrio, como tubos de ensaye, matraces, garrafones, columnas y estanques. Para mantenerlos se toman en cuenta varios factores como son: iluminación, nutrientes, temperatura y salinidad. Proporciona el medio ambiente del organismo, se deben tomar en cuenta porque provocan cambios en su composición química (Fulks y Main, 1991). Los cultivos de microalgas al interior son mantenidos bajo condiciones controladas de luz y temperatura (Ukeles, 1980), los cambios de pH son regulados por el CO₂ que entra al medio por medio de la aeración inducida en los cultivos. La iluminación es provista por lámparas de luz fría y los cultivos se mantienen desde repisas pequeñas, estantes, hasta mesas de trabajo de material diverso (concreto, plástico o madera) (Espinoza, 2005).

Generalmente las microalgas se cultivan en dos niveles: Nivel cepario, el cual se cultiva en laboratorios, generalmente de 1 a 5 L y nivel masivo donde se levanta a cabo en volúmenes de 1 L a 20 L como en garrafones y columnas de 80 a 250 L y ocasionalmente cultivos en tanques de 1000 – 5000 L (Espinoza, 2005). Pueden llevarse a cabo cultivos en estanques al aire libre, controlando variables físicas y químicas, como la luz, temperatura y pH en ambos casos, para obtener una mejor reproducibilidad de los datos que se obtengan en ambos sistemas de producción (Louren, y col., 1997). También existen diferentes tipos de cultivos de microalgas como lo son: cultivos semi continuos y continuos en bolsas de polietileno, cultivos masivos y cultivos estático (FAO, 2003).

Los nutrimentos son provistos a través de medios de cultivo preparados a base de una fuente de nitratos, fosfatos, metales y vitaminas, uno de los medios más utilizados para el cultivo de la microalga *Chaetoceros sp.* es el medio f/2 de Guillar (López y col., 2004; López y col., 2003b).

Uno de los componentes orgánico principales de la biomasa obtenida durante la cosecha, son las proteínas (Catherin *et al.*, 2003, López y col., 2004 y López y col., 2003b) que están constituidas por nitrógeno formando sus estructuras. El nitrógeno es vital para la síntesis de proteínas, formación de genes, formación de DNA y RNA, y para el crecimiento de las microalgas (Richmond, 2004). Es de los nutrientes principales en el crecimiento de las microalgas (Serpa y Calderón, 2006), cuantitativamente uno de los elementos más importantes que constituyen la estructura celular de las algas y microalgas (Richmond, 2004).

Los nitratos son la principal fuente de nitrógeno para muchas especies, mientras que pocos compuestos orgánicos, como la urea, son utilizados como fuente de nitrógeno. Las microalgas utilizan enzimas como las nitrato reductasa y nitrito reductasa que participan en la asimilación de nitratos. Mientras que cuando se utiliza urea como fuente de nitrógeno participan las enzimas urea amidoliasa (UALasa) y ureasa. (Richmond, 2004).

En la actualidad se han estudiado a las microalgas como una fuente de compuestos bioactivos que pueden ser empleados como fuente farmacéutica (Certik & Shimizu, 1999). Uno de los compuestos que se han encontrado contra el cáncer son los polipéptidos, es por ello que en esta investigación se evaluó el efecto de las principales fuentes de nitrógeno (NO_3 y urea) en el crecimiento para una especie de microalga marina con el fin de obtener las proteínas y así poder aislar posteriormente los polipéptidos de este organismo fitoplanctónicos, así como su producción de proteína y su perfil electroforético.

ANTECEDENTES

Descripción de las Microalgas

Las Microalgas juegan un papel importante como productores primarios de varios consumidores, tales como rotíferos, copépodos, artemia, que a su vez alimentan a las larvas tardías y juveniles de peces y crustáceos (Seyfabadi, 2010). Están involucradas en ciclos biogeoquímicos que proveen servicios ecológicos esenciales, desprenden oxígeno a la atmosfera beneficiando a los humanos. Son moduladores del clima ya que capturan el CO₂ de la atmosfera y pueden ser utilizadas para la producción de biodiesel para su utilización como un nuevo combustible ecológico (Graham y Wilcox, 2000).

Las algas son plantas, organismos fotosintéticos, que contienen Clorofila "a". Tienen movilidad limitada gracias a que algunas poseen flagelos la mayoría de éstas son microscópicas llamadas microalgas (Espinoza, 2005). Se piensa que las microalgas fueron los organismos que dieron origen a plantas más complejas, ya que son plantas unicelulares que crecen de forma individual, habitan en ambientes húmedos como el mar, lagunas entre otros. Pueden llegar a ocupar una gran extensión superficial donde exista el paso de luz solar para su fotosíntesis. Los cloroplastos son unos de los organelos que poseen las microalgas, en la mayoría de los casos les confieren el color o pigmento verde. Otros organelos son los cromatóforos, y una variabilidad de enzimas que le ayuda a la síntesis de energía (González, 2000).

La taxonomía de varios géneros y especies de algas conocidas que producen compuestos bioactivos importantes han sufrido grandes reordenamientos. Estos reajustes tienen implicaciones prácticas importantes que afectan a la interpretación de muchos estudios acerca de las actividades biológicas de algas. (Guiry y Guiry 2011).

El cultivo de *Chaetoceros sp* (figura 1) y de otras microalgas son empleados en muchos laboratorios de producción de larvas para su uso en acuicultura, por su contenido nutricional (Richmond, 2004). Es una diatomea marina de vida solitaria, tiene una forma rectangular, mide de 4 a 6 micras sin contar las setas. Su pared celular está compuesta por sílice, a la que se le llama frústula, que está compuesta de dos valvas las cuales se separan en la reproducción durante su división vegetativa (González, 2000).

Estas algas se cultivan en estanques al aire libre o en laboratorios, las variables físicas y químicas como la luz, temperatura y pH deben estar controladas para obtener una mejor reproducibilidad de los datos que se obtengan en ambos sistemas de producción (Louren, y col., 1997).

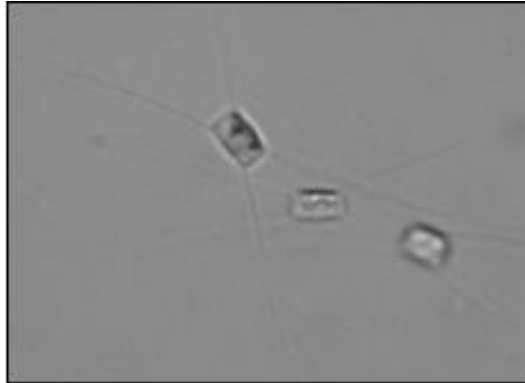


Figura 1. Fotografía de *Chaetoceros sp.* (Paz, 2013)

Importancia Comercial de las Microalgas

Las algas son organismos productores de una gran cantidad de materia que son utilizados por los humanos (oxígeno y materia orgánica: pueden ayudar directamente e indirectamente) (Richmond, 2004) (Tabla 1). Las aplicaciones comerciales de las microalgas se han desarrollado en los últimos años (Jensen, 2001). Entre las aplicaciones comerciales se destacan la utilización como fuente de alimento ya sea directo o en complemento de dietas (Grobbelaar, 2010). Se pueden utilizar como parte de los cosméticos gracias a que son una fuente de pigmentos y tintes naturales (Stolz y Obermayer, 2005). Son cultivados como fuente de moléculas de alto peso molecular como los ácidos grasos y aceites esenciales que se añaden y son utilizados para los suplementos nutricionales (Certik y Shimizu, 1999). Se ha obtenido luteína, compuesto carotenoide amarillo, gracias al rápido crecimiento de las microalgas verdes, *Chlorella protothecoides*, desencadenando un papel de interés comercial muy importante para su producción (Dong, 2008).

Tabla 1. Importancia de las algas para el humano

Aspectos Benéficos	Ejemplos
Alimento para humanos.	<i>Spirulina, Laminaria, Undaria.</i>
Alimento para invertebrados y peces, en maricultura.	Varias especies de fitoplancton.
Alimento para animales.	Varias macro algas.
Fuentes químicas.	B-caroteno de <i>Dunaliella</i> .
Fertilizantes de tierra y acondicionadores de agricultura.	Algas de tierra, especialmente cianobacterias.
Tratamiento de agua.	Varias microalgas.
Tierras de diatomeas (diatomita) Drogas	Depósitos de frústulas de diatomea.
Sistema modelo de investigación	Agar y carragenanos de algas rojas, alginatos de algas cafés.
Ficolipoproteínas por fluorescencia microscópica.	Varias macro y microalgas (estudios genéticos). <i>Prophyra</i>

Fuente. Moroyoqui & Romero, 2007

A principios de los años 50's, se evaluó la posibilidad de una disminución de alimento rico en proteína debido a un aumento de la población mundial, debido a esto se planteó la búsqueda de nuevas fuentes no convencionales con producción de proteína, como lo son las microalgas (Becker, 2004). Las investigaciones iniciaron en Stanford (EE.UU.) (Burlew, 1953), a gran escala y la producción masiva de microalgas comenzó alrededor de 1960 en Trebon en República Checa (Grobbelaar, 2010).

Varios autores clasifican a las microalgas comercialmente en: Nutrición Humana, Nutrición animal, Microalgas en cosméticos, compuestos de alto peso molecular y pigmentos.

Nutrición Humana

Las microalgas tienen un alto potencial para el mejoramiento del contenido nutricional de los preparados alimenticios convencionales, tienen capacidad de actuar como probiótico, influyendo así positivamente en la alimentación de humanos (Richmond, 2004). Se comercializan en diferentes presentaciones como tabletas, cápsulas y líquidos. Se pueden incorporar en las pastas, en bocadillos, dulces y bebidas, hasta en chicles (Yamagushi, 1997). Debido a la diversidad de su química pueden actuar como suplementos nutricionales o se puede utilizar como colorante natural en ciertos alimentos (Borowitzka, 1999).

La *Arthrospira* es usada en la nutrición humana porque tiene un alto valor nutricional y un alto contenido proteico (Soletto, y col., 2005). Este tipo de microalga tiene varios efectos en las personas: evita la hiperlipidemia, baja la presión arterial, protege de daños renales, baja los niveles séricos de glucosa y eleva los *Lactobacillus* en intestino (Yamagushi, 1997; Liang y col., 2004; Vilchez y col., 1997).

Alimentación animal

Al igual que en los alimentos humanos, las microalgas también se le adicionan al alimento de los animales tanto domésticos, de granja y en acuicultura. Un 30% de su producción es para la alimentación de animales, y más del 50% de la producción actual de *Arthrospira* se utiliza en suplementos alimenticios (Yamagushi, 1997).

Son utilizadas como alimento vivo para todas las etapas de bivalvos y moluscos (ostras, mejillones, almejas entre otros.) poseen características que las hacen especiales para el consumo, fácil digestión, nutritivas y carecen de toxinas dañinas para los animales marinos (Brown, 2000).

La producción de microalgas para la acuicultura comprende el 62% para los moluscos, 21% para los camarones y el 17% para peces (Miranda & Esquer, 1999). La importancia en este campo es la fuente natural de alimento para estos animales, su principal aplicación es la nutrición y se aplica como aditivo alimenticio o como único componente, es utilizado en fresco

para la coloración de la carne de salmónidos. Se alimentan a las larvas con microalga durante un periodo breve ya sea por consumo directo como los moluscos y camarones o indirectamente. (Brown y col., 1997; Mueller, 2000).

Las especies más utilizadas para la alimentación de larvas de moluscos, bivalvos y alimento directo de crustáceos especialmente camarones son: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, y *Skeletonema Thalassiosira* (Yamagushi, 1997; Behrens, 1999; Mueller, 2000; Brown, 2002; Borowitzka, 1997). La producción en los laboratorios comerciales del noroeste de México está basada en un número reducido de especies (Brown, 2002).

Microalgas en Cosméticos

Las principales especies de microalgas para el cuidado de la piel son *Arthrospira* y *Chlorella*. En productos para el cuidado facial y de la piel se encuentran extractos de microalgas en crema, productos para el cuidado del cabello, también se presentan en bloqueadores para protección solar (Stolz y Obermayer, 2005).

Descripción de la curva de crecimiento

Dentro de la curva de crecimiento de las microalgas que está constituida por 5 fases: lag, logarítmica (o exponencial), lento crecimiento, estacionaria y muerte (Figura 2). Esta curva de crecimiento se utiliza para saber el momento al cual se debe tomar el inóculo y sea más factible su estudio, además de tener su punto máximo de aprovechamiento (Paniagua y col., 1993) (Fogg y Thake, 1987).

Fase lag o de inducción

Es la fase de aclimatación de las células donde no hay un aumento en la producción celular. Su crecimiento depende del tamaño del inóculo que se aplique, según estudios realizados los inóculos frescos son mejores, ya que cuando se trata de un cultivo viejo, las enzimas pueden estar inactivas y se verá reflejado en la producción de metabolitos y puede causar una insuficiente nivel de división celular (Paniagua y col., 1993) (Fogg y Thake, 1987).

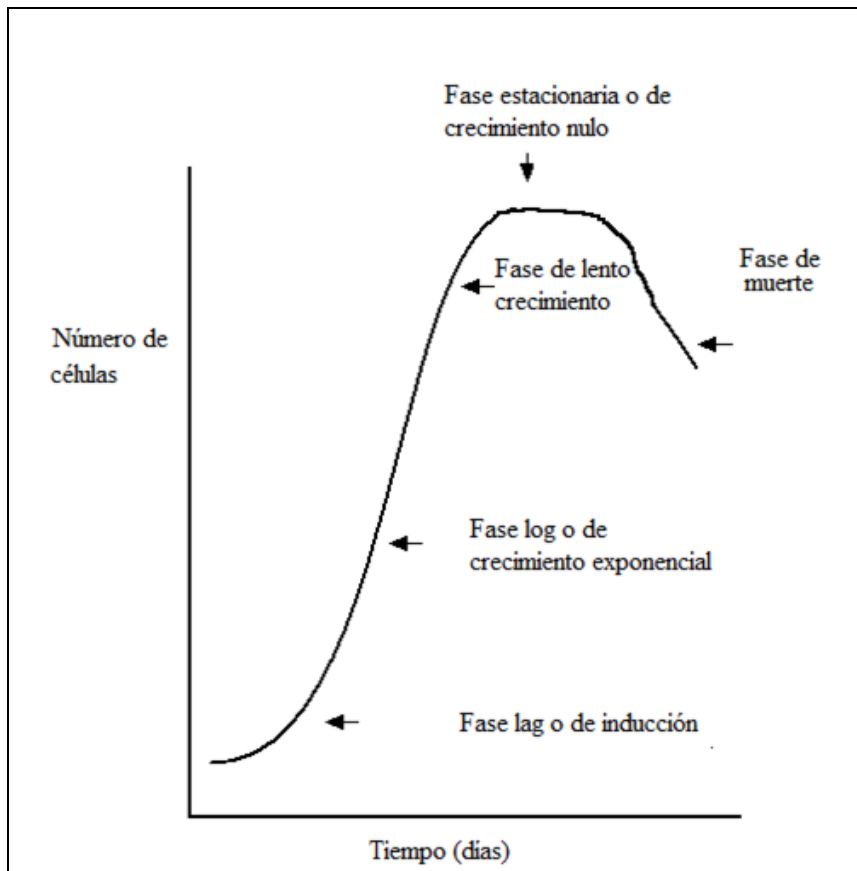


Figura 2. Curva de Crecimiento de una microalga (Espinoza, 2005).

Fase logarítmica o de crecimiento exponencial

Esta fase se le llama así por la rápida replicación de las microalgas, el crecimiento es constante lográndose una alta producción de material proteico, ya que no existen factores que limiten su

división. Puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio, dura el tiempo necesario hasta que algún nutriente se termine y tenga un efecto limitante para su replicación (Fogg y Thake, 1987).

Fase de lento crecimiento

En esta fase su crecimiento comienza a disminuir, debido a factores como: la baja de nutrientes en el cultivo por el consumo mismo, cambios de pH, iluminación y un homogeneizado inadecuado, entre otros. Esta disminución causa alteración en las células debido al aumento de las reservas de carbohidratos y lípidos la concentración de proteína se ve disminuida. (Paniagua y col., 1993; Fogg y Thake, 1987).

Fase Estacionaria o Crecimiento Nulo

El contenido celular permanece constante. Hay un aumento de carbohidratos y lípidos, debido a uno o varios factores limitantes, como pueden ser los nutrientes en el medio de cultivo, la intensidad de la luz en el ambiente, metabolitos tóxicos u otros factores. En ocasiones apenas se detecta y puede presentarse en su lugar la fase de muerte (Paniagua y col., 1993) (Fogg y Thake, 1987) (Espinoza, 2005).

Fase de Muerte

En esta última fase la concentración de células viables empiezan a caer y morir de manera rápida debido a la escases de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas, además puede presentarse contaminación por bacterias y hongos. (Espinoza, 2005) (Paniagua y col., 1993) (Fogg y Thake, 1987).

Sistemas de Cultivos de Microalgas

Para mantener los cultivos de microalgas se toman en cuenta varios factores como son: iluminación, nutrientes, temperatura y salinidad. Proporciona el medio ambiente del organismo, se deben tomar en cuenta porque provocan cambios en su composición química (Fulks y Main, 1991). Los cultivos de microalgas al interior son mantenidos bajo condiciones controladas de luz y temperatura (Ukeles, 1980), los cambios de pH son regulados por el CO₂ que entra al medio por medio de la aeración inducida en los cultivos. La iluminación es provista por lámparas de luz fría y los cultivos se mantienen desde repisas pequeñas, estantes, hasta mesas de trabajo de material diverso (concreto, plástico o madera) (Espinoza, 2005).

Los cultivos son realizados en recipientes de 1 L a 20 L, columnas de 80 a 250 L y ocasionalmente cultivos en tanques de 1000 – 5000 L (Espinoza, 2005).

Generalmente las microalgas se cultivan en dos niveles:

Nivel cepario

Son cepas de microalgas que se cultivan en el laboratorio y representan cultivos más puros. Generalmente se cultivan de 1 a 5 L en recipientes de vidrio o plástico, como matraces, garrafones, columnas o tanques, hasta el día en que sean utilizados (Espinoza, 2005).

Nivel Masivo

En este nivel los cultivos se llevan a cabo en volúmenes muy grandes superiores a los 2.5 litros. Se llevan a cabo en garrafones (carboys) de 19 litros de capacidad, en columnas compuestas de acrílico o fibra de vidrio que van de 100 a 500 litros y en tanques de fibra de vidrio que van desde 250 litros hasta 3500 litros de capacidad (Espinoza, 2005) (Figura. 3)

Cultivos intensivos

En estos cultivos los factores de crecimiento se mantienen bajo control, de esta manera se obtiene una mejor producción.

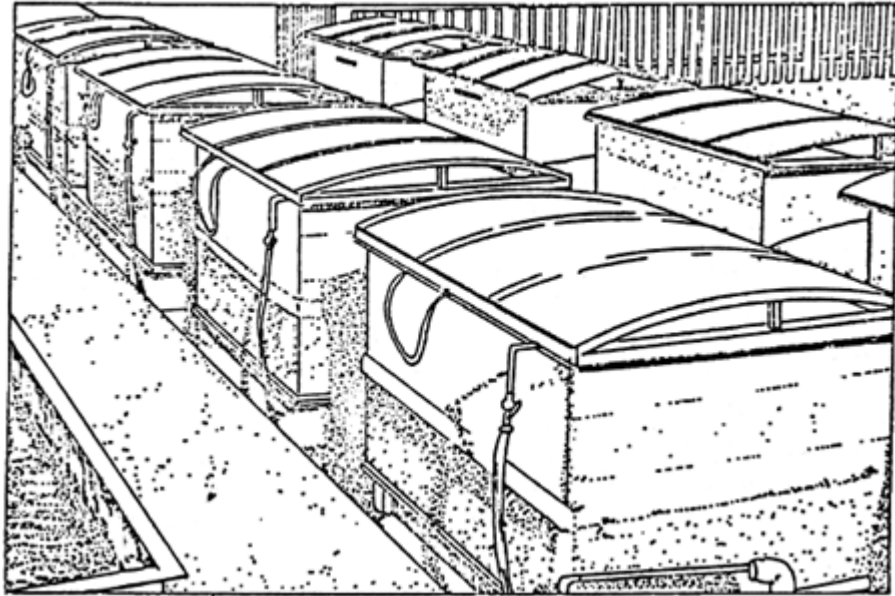


Figura 3. Cultivos masivos de microalgas en tanques de fibra de vidrio.
(<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>)

Cultivos Extensivos

Son los cultivos donde solo se controlan las variables del manejo técnico, como las características químicas del medio y la densidad del cultivo.

Además de esta clasificación, existe la clasificación al momento de cosechar el cultivo:

Cultivos discontinuos

La población celular en este cultivo pasa por varias fases en su crecimiento, son fáciles de manejar. En los cultivos discontinuos es más fácil el estudio de la cinética de crecimiento. Los requerimientos nutricionales necesarios para la célula y factores como luz o iluminación son proporcionados al inicio del cultivo.

Cultivos continuos

En este cultivo se mantienen los factores constantes como la luz, pH y nutrientes incluso se mantienen en la fase exponencial del cultivo por un tiempo. Una de las ventajas del cultivo es su confiabilidad en los datos, ya que en varios tiempos y tomas diferentes las muestras mantienen el mismo conteo celular.

Cultivos semi-continuos

Es una combinación de los dos últimos métodos. Aquí se toman las muestras en la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo nuevo y fresco (González, 2000).

Medios de Cultivos para Microalgas

Para todos los cultivos de microalgas es importante la formulación de los medios de cultivo, ya que proporcionan el medio nutricio necesario para el crecimiento del fitoplancton, y así puedan ser aprovechados y crezcan en concentraciones celulares elevadas. Estos medios de cultivo fueron desarrollados desde finales del siglo antepasado (1800) hasta principios del siglo

pasado (1900), con el principio de que los metales y vitaminas eran componentes esenciales para el crecimiento de los organismos fitoplanctónicos (Allen y Nelson, 1910).

Los medios de cultivo para microalgas son muy variables, la mayoría son modificaciones de las fórmulas ya publicadas y algunos son derivados de los análisis de agua de los hábitats naturales. La minoría es producto de estudios derivados de los requerimientos nutricionales del fitoplancton.

Medios enriquecidos

Estos son aquellos en los cuales sólo se conoce exactamente la cantidad de nutrientes que se le agregaron al agua de mar.

Medios químicamente definidos

Estos medios son preparados con sales sintéticas disueltas en agua deionizada, por lo que se conocen todos los constituyentes que lo conforman (Richmond, 2004)

Uno de los medios más utilizados para el cultivo de la microalga *Chaetoceros sp* es el medio f/2 de Guillard (Tabla 2). Este medio está compuesto por un buffer Tris y por dos soluciones primarias:

TABLA 2. MEDIO DE GUILLARD F/2

Constituyentes	g/L de agua destilada para medio F/2.
1.- Nutrientes mayores.	
1.1 Nitrato de sodio granulado y refinado	75
1.2 Fosfatos de sodio monosódico	5
1.3 Silicatos de sodio meta soluble	30
2.- Metales traza	g/100 mL de agua destilada
2.1 Solución primaria.	
2.1.1 Sulfato cúprico	0.98
2.1.2 Sulfato de zinc	2.2
2.1.3 Sulfato de cobalto	1.0
2.1.4 Cloruro de magnesio	18.0
2.1.5 Molibdato de sodio	.0.63
2.2 Solución secundaria	g/1000 mL de agua destilada
2.2.1 Cloruro férrico	3.15
2.2.2 EDTA disódico	4.36
2.2.3 Metales traza o alternativos	1 ml de c/u de las soluciones 2.1.1 a 2.1.5
2.2.4 EDTA férrico	5
2.2.5 Metales traza	1 ml de c/u de las soluciones 2.1.1 2.1.5
3.- Vitaminas	
3.1 Solución primaria	g/1000 mL de agua destilada
3.1.1 Biotina cristalizada	0.1
3.1.2 Cianocobalamina	1.0
3.2 Solución secundaria	Cantidad en 100 mL de agua destilada
3.2.1 Biotina	1 mL de la solución 3.1.1
3.2.2 Cianocobalamina (B12)	1 mL de la solución 3.1.2
3.2.3 Tiamina clorhídrica (B2)	20 mg
Fuente: Guillard y Ryther (1962).	

Importancia de los nutrimentos del medio de cultivo

Los componentes primordiales que deben ser incluidos en los medios de cultivo son: los macronutrientes, micronutrientes y las vitaminas. Estos componentes son a base de N, P, Si, Fe, secuestrante (EDTA, citrato de sodio y otros), metales (Cu, Zn, Co, Mn, Mo) y vitaminas (cianocobalamina, tiamina y biotina) (Voltolina y col., 1989; Harrison y Berges, 2005 Richmond, A., 2004) (Tabla 2). Estos elementos son constituyentes esenciales para la biomasa de las algas y son necesarios para el crecimiento óptimo del alga.

Macro nutrientes

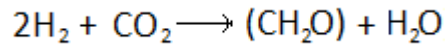
Son aquellos elementos que constituyen a las moléculas que componen la estructura de algas y por lo tanto se requieren en cantidades bastante grandes (Richmond, A., 2004). Todas las algas requieren mayores concentraciones de macro nutrientes (Alexander, 1992) como carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, fósforo, calcio, silicio, magnesio y potasio.

Oxígeno

El oxígeno no es considerado usualmente un nutriente; sin embargo, es requerido para todas las estructuras de las algas y los efectos de metabolismo. El oxígeno es un constituyente de la mayoría de los componentes en la célula y es el receptor final de electrones en las oxidaciones biológicas. Es obtenido directamente por las microalgas de la atmósfera o del oxígeno disuelto en agua. También puede ser utilizado directamente por las algas fijando el CO₂ en ausencia de O₂ usando H₂ como un reductor en entornos pobres en oxígeno o incluso anaeróbicos (Richmond, , 2004).

Hidrógeno

En lugar de la utilización generalizada de H₂O como la fuente de electrones para la fotorreducción de CO₂, algunas algas tienen la capacidad de utilizar otras sustancias. El uso de hidrógeno molecular requiere de una enzima llamada hidrogenasa, la cual cataliza la siguiente reacción:



Fuente. Richmond, 2004.

Más del 50% de las algas presentan actividad de la deshidrogenasa, como lo son las *Cyanobacteria*, *Euglenophyta*, *Chlorela*, *Rhodophyta* y *Pheophyta*. Cuando este proceso es producido durante el periodo de iluminación se denomina fotorreducción. (Richmond, 2004)

Fósforo

El fósforo es uno de los principales nutrientes requeridos para un crecimiento normal de las algas. Este elemento juega un papel importante en los procesos celulares, particularmente aquellos involucrados en la transferencia de energía y en la síntesis de ácidos nucleicos. Las concentraciones de fosfatos orgánicos en el agua a menudo exceden a los fosfatos inorgánicos, siendo éstos la principal forma de suministrar fósforo a las células de microalgas. (Richmond, 2004).

Micro nutrientes

Se administran en pequeñas concentraciones como vitaminas, cobre, fierro, entre otros. Estos elementos son necesarios para la activación de enzimas. Además los compuestos de CO₂

como carbonatos y bicarbonatos son necesarios para el crecimiento óptimo de las microalgas sin excederse en la concentración del mismo. Si se aplican los nutrientes en concentraciones excesivas pueden llegar a ser tóxicas para el organismo por lo que se utilizan concentraciones pequeñas que van desde los miligramos hasta los microgramos (Moroyoqui y Romero, 2007) (Cohén, 2006).

Investigaciones con microalgas

La investigación dentro del campo de la acuicultura es muy demandada ya que muchas especies marinas tales como camarones, peces y bivalvos consumen grandes cantidades de microalgas, la eficiencia de su uso permite el crecimiento de las principales especies en la acuicultura. El costo de producción en la mayoría de los países de sureste de Asia es baja, la importancia debería de abrir más campo a investigaciones para mejorar la comprensión dinámica de la población de las algas, ya que es un factor importante en el crecimiento y la eficiencia de la cadenas alimenticias (Neori, 2010). Diversos tipos de investigaciones como en las investigaciones de Seyfabadi y col., (2010) observaron los efectos de la radiación y el fotoperíodos sobre las tasas de crecimiento, la producción de clorofila a, β -caroteno, proteínas totales, y el contenido de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris*. En el trabajo realizado por Benezra (1995) la temperatura jugó un papel importante en la extracción de proteínas, dado que la pared celular de la microalga se ve afectada, rompiéndose y dejando libre el contenido proteico, observando que a mayor temperatura se obtenía una mayor extracción de proteínas.

En estudios realizados por Adriana Katz y col. (2007) presenciaron el efecto del estrés salino sobre la composición y organización de *Dunaliella salina* para ver limitaciones en la separación y cuantificación de proteínas de la membrana plasmática mediante electroforesis nativa en do dimensiones, utilizando de coomassie para separar las proteínas de membrana.

Vilches Lobato y col (2010), describieron a las microalgas como eficaces sumideros de CO₂ y exhaladoras de O₂. Se utilizan en depuración de efluentes acuosos, en la industria farmacéutica y alimentaria como suplementos vitamínicos, planteándose su posible uso en la producción de biodiesel, confiando así su producción de un kilogramo a un precio competitivo gracias a la tecnología de cultivos de microalgas.

Dentro de la industria farmacéutica también podremos encontrar investigaciones de Blas y col. (2010,) que trabajan evaluando ficobiliproteínas de *Pseudanabaena. tenuis* y *Spirulina máxima*, las cuales protegen contra el daño hepático y estrés oxidativo que ocasiona el Hg^{2+} , que causa la intoxicación por sus diferentes formas químicas. Este metal causa diferentes efectos tóxicos en diferentes tejidos y órganos, ya que es difícil su excreción del organismo y se bioacumula. Bajo la creencia que la ingesta de *Spirulina* protege contra la citotoxicidad inducida por Hg^{2+} , este mecanismo protector de la ingesta de cianobacterias se debe a que contienen nutrientes como vitaminas, ácidos grasos polinsaturados, y otros fitoquímicos. Por ello evaluaron y compararon las diferentes proporciones de ficobiliproteínas de *Spirulina* máxima y de *Pseudanabena tenuis* ante el daño hepático provocado por el Hg^{2+} ,

Nitrógeno como constituyente del organismo

El nitrógeno, después del carbono sin tomar en cuenta al hidrogeno y el oxigeno, es cuantitativamente el elemento más importante que contribuye en la formación celular de las algas y microalgas (Richomnd, 2004). Es de los nutrientes principales en el crecimiento de las microalgas (Serpa y Calderón, 2006).

Forma parte de un grupo de compuestos bioorgánicos de gran importancia biológica ya que componen proteínas y aminoácidos de todos los organismos vivos al igual que el Carbono, Oxígeno e Hidrógeno (Brandan y Aispura, 2003).

La proporción de nitrógeno en el porcentaje de peso seco variar entre 1 y 10%, aunque dentro de los organismos fitoplanctónicos es bajo en las diatomeas debido a los silicatos en la pared celular de las microalgas. En un crecimiento exponencial, en algunas especies de microalgas el nitrógeno contenido es de 7 a 10% de la materia seca y el carbono está sobre el 50%.

Una variedad de compuestos con nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, sirven como única fuente de nitrógeno para el crecimiento de varias microalgas. El uso de fuentes de nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), o amonio (NH_4^+) es común en todas las microalgas.

En estudio realizado con algunas microalgas marinas se encontró que las tasas máximas de crecimiento son similares con NO_3^- y NH_4^+ como fuente de nitrógeno (tabla 2).

Los nitratos es la principal fuente de nitrógeno para muchas especies, solo en bajas concentraciones, de aproximadamente 1mM ya que en altas concentraciones los nitratos pueden inhibir su crecimiento. En general, algunos compuestos orgánicos como la urea son buenas fuentes de nitrógeno. Las tasas de crecimiento con esta fuente son similares a las obtenidas con NO_3^- y NH_4^+ (Tabla 3) (Richmond, 2004).

Tabla 3. Tasas de crecimiento de algunas algas en diversas fuentes de Nitrógeno

Organismos	Tasas específicas constantes (k) (\log_{10} unidades/día)			Concentración de N (nmol/L)		
	NH_4^+	NO_3^-	Urea	NH_4^+	NO_3^-	Urea
Cyanophyta						
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	3.3	3.0	1.7	0.6	Variable	4.3
<i>Anabana variabilis</i>	0.69	0.69	0.81	3.0	10.0	1.0
<i>Nostoc muscorum</i>	0.48	0.50	0.54	3.0	10.0	1.0
Cholorophyta						
<i>Chlorella elipsoidea</i>	----	0.50	0.40	----	12.0	66.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.5	0.45	0.47	13.0	12.0	66.0
Chrysophyta						
<i>Amphiphora alata</i>	1.14	1.30	1.30	0.1	0.1	0.1
<i>Chaetoceros simplex</i>	1.54	1.58	1.35			
<i>Chaetoceros sp.</i>	0.96	1.30	1.03			
<i>Chrysochromulina sp.</i>	1.12	1.14	1.35			
<i>Cyclotella cryptica</i>	0.57	0.57	0.49		0.9	0.2
<i>Skeletonema sp</i>	1.41	1.66	0.99		0.1	0.1
<i>Stephanopyxis costata</i>	1.23	1.35	1.58			

Fuente. Richmond, 2004.

Nitrato

Es la forma predominante del nitrógeno donde la concentración en las diferentes estaciones del año cambia. Puede ser una fuente importante de regeneración para el crecimiento de los dinoflagelados. El Nitrato es el compuesto más utilizado por la microalgas para sintetizar sus

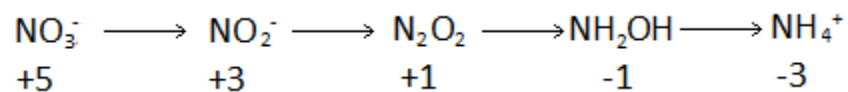
pares de bases en la doble hélice de DNA y a partir de éste se obtiene el nitrógeno necesario para la síntesis de proteína extra e intracelular. El aumento de las concentraciones de nitratos en el medio ocurre a inicio de otoño y en el invierno disminuye (Serpa y Calderón, 2006).

Urea

La urea es el principal producto de excreción de los mamíferos y aves, pero esto no sucede en el zooplancton, peces, y fitoplancton. Las principales formas de desechos de nitrógenos de los peces contienen amonio y óxido de trimetilamonio. Las concentraciones durante el verano son más altas que el amonio pero más bajas que los nitratos. La mala absorción de la urea por el fitoplancton es debido a la presencia del amonio y podría ser uno de los factores que afecten su crecimiento y reproducción (Kevin y Butler, 1986).

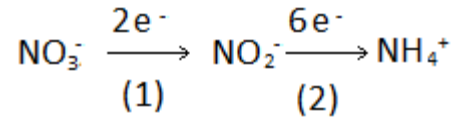
Asimilación de Nitratos y Nitritos

Cuando el nitrógeno se encuentra en una forma oxidada, como nitrato o nitrito, debe ser reducido para que pueda ser incorporado en las moléculas orgánicas. El estado de los electrones en oxidación/reducción de nitratos es +5 y -3 en el amonio, así que se necesitan ocho electrones para la reducción. Existe la hipótesis de que son tres intermediarios entre nitrato y amoníaco asociados, con cuatro pasos reductivos, cada uno donando un par de electrones:



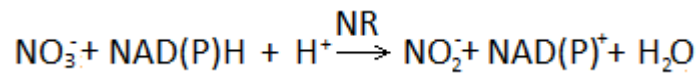
Fuente. Richmond, 2004.

Estudios realizados en plantas superiores (Beevers y Hageman, 1969) y algas (Hattori y Myers, 1966), sugieren que sólo dos enzimas catalizan la reducción total de nitrato a amonio:



Fuente. Richmond, 2004.

Estas enzimas se han logrado purificar en cierta medida de diversas algas, que contienen molibdeno, hemo y flavína adenín dinucleótido (FAD) probablemente dos moléculas de cada una por molécula de enzima.



Fuente. Richmond, 2004.

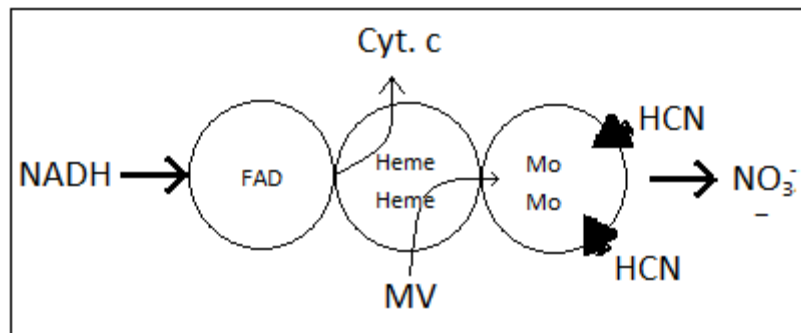
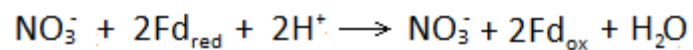


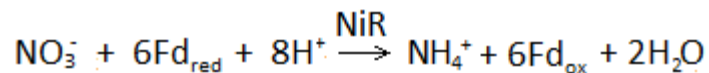
Figura 4. Estructura de la nitrato reductasa de *Chlorella* conforme a Solomonson (De Solomonson L. P., *Nitrogen Assimilation of plants*. Academic Press, New York, 1979. With permission).

La enzima nitrato reductasa (NR) tiene tres actividades que se pueden medir y se distinguen experimentalmente, actividad del cytochromo c reductasa con NAD(P)H; reductores de NO_3^- con donadores de electrones reductores como el metil viologen (MV) o flavina mononucleotido (FMN); y reductores de nitratos como NAD(P)H. Las primeras dos actividades son reacciones parciales, mientras que la última requiere a la enzima plenamente funcional. El segundo tipo de NR se encuentra en cianobacterias y están asociadas a partículas que contienen clorofila. Este tipo de enzima utiliza ala ferredoxina reducida como donador de electrones, y la reacción se cataliza de la siguiente manera:



Fuente. Richmond, 2004.

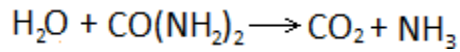
La NiR reduce nitritos a amonio sin ningún tipo de intermediario. La reacción es catalizada por la ferredoxina (Richmond, A., 2004):



Fuente. Richmond, 2004.

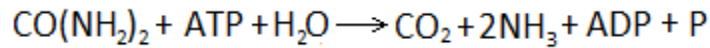
Asimilación de Urea como Compuesto de Nitrógeno Orgánico

La urea está considerada como una buena fuente de nitrógeno orgánico para todas las especies de algas (Tabla 2). La urea es hidrolizada antes de que el nitrógeno sea incorporado dentro de las células de las algas. Existen dos enzimas encargadas de metabolizar a la urea, ureasa y urea amidolasa (UALasa). La ureasa es la encargada de realizar una reacción hidrolítica sencilla:



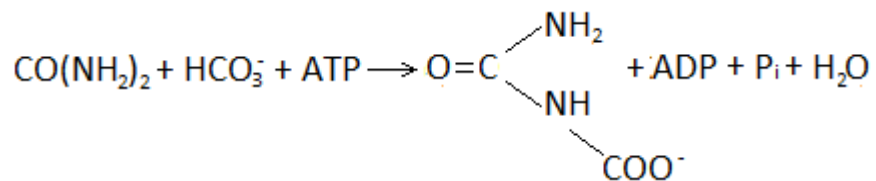
Fuente. Richmond, 2004.

Mientras que la urea amidolasa cataliza una reacción global:



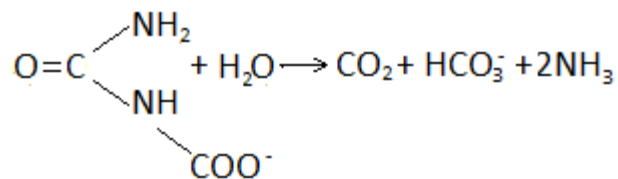
Fuente. Richmond, 2004.

La otra opción consiste en dos reacciones catalizadas por dos enzimas distintas. Una es la urea carboxilasa que cataliza la formación de un compuesto llamado alofanato:



Fuente. Richmond, 2004.

La otra enzima es la alofanato liasa, que cataliza la hidrólisis del alofanato formado en la reacción anterior:



Fuente. Richmond, 2004

Las algas que pueden metabolizar la urea tienen ureasa o UALas, pero no ambas enzimas, las clorofíceas contienen UALasa y otras algas contienen ureasas (Richmond, 2004).

Efectos de la Deficiencia de Nitrógeno en Microalgas

La privación de nitrógeno es un serio problema para la microalga, ya que sufren una disminución en su contenido de una o más macromoléculas, remarcando una disminución en el crecimiento celular y acumulación de compuestos de carbono como los lípidos y polisacáridos. Bajo condiciones deficientes de nitrógeno el contenido de pigmentos fotosintéticos decrecen y la velocidad de fotosíntesis se reduce de igual forma se ve afectada la habilidad de asimilar los reducidos compuestos nitrogenados. (Richmond, 2004).

En cultivos con deficiencia de nitrógeno se han observado cambios en las actividades enzimáticas. La actividad de la nitrato reductasa en especies suministradas con amonio es deficiente en periodos cortos de privación de nitrógeno Enzimas como la nitrito reductasa, glutámico deshidrogenasa, glutamina sintetasa y urea amidolasa resultan afectadas por tal deficiencia (Richmond, 2004)

Metabolitos de Interés que Producen las Microalgas

Las microalgas son una fuente rica de proteínas, hidratos de carbono, y ácidos grasos esenciales (Seyfabadi, 2010) y sobre todo aminoácidos (Richmond, 2004). Su composición química depende de varios factores tales como la especie, la época del año, sus nutrimentos, temperatura, fotoperiodos, salinidad, fuente de carbono, fuentes de nitrógeno, intensidad y color de la luz entre otros (Benezra, 1995) Aparte de que en ellas se pueden encontrar compuestos con actividad antioxidante (Natrah, 2007).

Proteínas y Péptidos

Las proteínas son el componente orgánico principal de la biomasa (Catherin y col., 2003), los aminoácidos constituyen un 90-98% de las proteínas totales. Gracias a estos aminoácidos tiene un valor nutritivo y éstos no varían en diferentes especies de microalgas (Benezra. 1995). Son

fundamentales para la construcción de tejidos de todos los animales que comen microalgas y de las personas que se alimentan de estos animales marinos como el camarón y bivalvos. La proteína se considera generalmente más importante para la etapa de la vida de rápido crecimiento juvenil. Es normalmente el componente bioquímico más importante de las algas (Catherin y col., 2003).

Una porción de microalgas que actualmente son cultivadas contienen proteínas no digeribles para las personas, debido a las paredes celulares que poseen, (Shelef y Soeder, 1980). Sin embargo; los aminoácidos y péptidos que constituyen a las proteínas, son productos utilizados en el campo de la alimentación, ya sea humana o animal, como en la salud, la agricultura y la industria. Por esta razón, se han aplicado diferentes métodos para hacer la proteína consumible como la hidrólisis fundamentalmente métodos de hidrólisis química, mediante el uso de bases y ácidos, siendo el principal enfoque para el aprovechamiento de las proteínas. Por otra parte, el uso de esta metodología pueden favorecer la formación de compuestos tóxicos (Jarunrattanasri y col., 2007) o la degradación aminoácidos.

Cuando estas proteínas son para su aplicación en alimentación, salud o biofertilizantes, se utilizan más los métodos enzimáticos, ya que son menos destructivos, se pueden utilizar enzimas con distintos tipos de actividad. Los hidrolizados que son para la alimentación o salud contienen menos concentración de péptidos de bajo peso molecular que aminoácidos. Las enzimas con actividad endoproteasa y exoproteasa son las utilizadas comúnmente (Clemente, 2000).

Carotenoides

El β -caroteno, es un metabolito con un amplio rango de aplicaciones comerciales, el cual puede ser producido por fitoplancton. Se ha utilizado como colorante natural para alimentos, como aditivo alimentario para mejorar el color de algunos productos como la carne de pescado y la yema de huevo. Los compuestos carotenoides son componentes del metabolismo secundario de las plantas, proveniente de la fotosíntesis y de la respiración, conocida también como vía de los terpenos. La oxigenación de β -carotenos, les confiere la coloración naranja de la cantaxantina, después de producirse la hidroxilación de las xantofilas y diversos compuestos

carotenoides. y finalmente astaxantina (Goodwin, 1980; Goodwin, 1984; Young, 1993a y 1993b; Margalith, 1999; Kobayashi y col., 1989).

Pigmentos

Las algas contienen clorofila "a" para su maquinaria fotosintética, produciendo oxígeno y atrapando dióxido de carbono. Sus divisiones son en base a dos propiedades bioquímicas: Tipo de pigmento y su reserva de nutrientes (González, 2000). Un ejemplo de pigmentos son los tetraterpenos, los cuales son pigmentos fotosintéticos o en complejos proteicos en plantas superiores y bacterias fototróficas, incluyendo cianobacterias. La función de la astaxantina en las microalgas es la fotoprotección del aparato fotosintético bajo (Borowitzka y col., 1991; Kobayashi y col., 1999).

Lípidos (ácidos grasos)

La gran mayoría de los lípidos de las microalgas son ésteres de glicerol y ácidos grasos. Diversos factores varían la composición de los lípidos tales como la intensidad luminosa, nutrientes, nitrógeno (nitratos), y temperatura (Benezra, 1995). En un estudio realizado con microalgas marinas se encontró que la deficiencia de fosfatos y nitratos afectó directamente a la composición de los lípidos (Bustillos-hurtado, 1992), se demostró además que son importantes en la gametogénesis (Catherin *et al.*, 2003). Los ac. Grasos como el Omega 3 reducen el colesterol en la sangre y promueve la circulación sanguínea (Caswell & Zilverman 1998). Los peces son ricos en omega 3, estos los obtienen a partir del consumo de microalgas gracias a las cadenas alimentarias que se basan en fitoplancton (Benemann, 1992),

Vitaminas

El contenido de vitaminas varía de especie a especie en las microalgas, dependiendo de estadios de crecimiento, fuente nutricional, intensidad de luz y otros factores. Las principales vitaminas son la tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cobalamina (B12), biotina, colina, inositol, tocoferol y β -carotenos (povenientes de la vitamina a) (Hollick, 1984; citado en Brown, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la Especie

La especie de microalga que se empleó fue la diatomea *Chaetoceros muelleri*, que pertenece a la familia *Bacillariophyceae*, la cual se encuentra aislada en el cepario de microalgas que mantiene el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), ya que es ampliamente utilizada en la región noroeste del país.

Esta especie ha sido muy utilizada en diversos estudios tanto para la investigación como en la industria alimentaria acuícola y consumo humano. Esta especie de microalga ha sido materia de estudio debido a su amplia variedad de metabolitos como los ácidos grasos y proteínas (Fujii y col 1995). Crece con fuentes de N y produce entre 24.72 y 40.24% de proteína (López, col., 2004; Barbarino y Benezra,1995).

Aclimatación

La microalga *Chaetoceros muelleri* se aclimató a cada una de las fuentes de nitrógeno (urea y NO_3), a nivel de tubo de ensaye con 10 mL de medio de cultivo durante una semana, posteriormente se pasaron a matraces de 250 mL por 5 días, para terminar en matraces de 1 L por una semana. Para su posterior estudio a nivel de garrafones con 15 L de cultivo.

Preparación de los Medios de Cultivo

El medio control en el experimental fue el f/2 de Guillard (Tabla 2), La variable que se tuvo en el experimental fue la concentración de la fuente de nitrógeno y el tipo de fuente de nitrógeno (nitratos y urea).

Los medios a experimentar fueron 2F, 4F de nitrato, y los tres medios de cultivos f/2, 2F y 4F con urea como fuente de nitrógeno (Tabla 4).

El resto de los nutrientes del medio f/2 se mantuvieron en las mismas proporciones, como los son los silicatos, minerales y vitaminas (Tabla 2), para ambos casos.

Diseño del experimento

Posteriormente a su aclimatación, se llevó a cabo el experimento en garrafones de 20 L con 15 L de cultivo, por triplicado, empleado como medio control el f/2 de Guillard y como tratamientos los medios 2f y 4f con NO₃ como fuente de nitrógeno, además se llevó a cabo otra corrida con los tres medios de cultivo (f/2, 2f y 4f) con sustitución de la fuente de N a urea (Fig 5 y Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental		
Medio de cultivo	Cantidad	
	NO ₃ g/L	Urea g/L
Control f/2	75	-----
	-----	36.16
2F (x4 Conc. N f/2)	300	144.6
4F (x8 Conc. N f/2)	600	298.3

Determinación de la Concentración Celular

La cosecha de la microalga *Chaetoceros muelleri* se llevó en la fase exponencial antes de la fase de lento crecimiento donde hay mayor producción de proteína gracias a su rápida replicación (Richmond, 2004). El conteo celular se llevó a cabo en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. La concentración celular se determinó con la siguiente fórmula (López y col 1993):

$$\frac{\# \text{ de células contadas}}{\# \text{ de cuadros contados}} \times 1000 =$$

$$\# \text{ cel.} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ cel/ml}$$

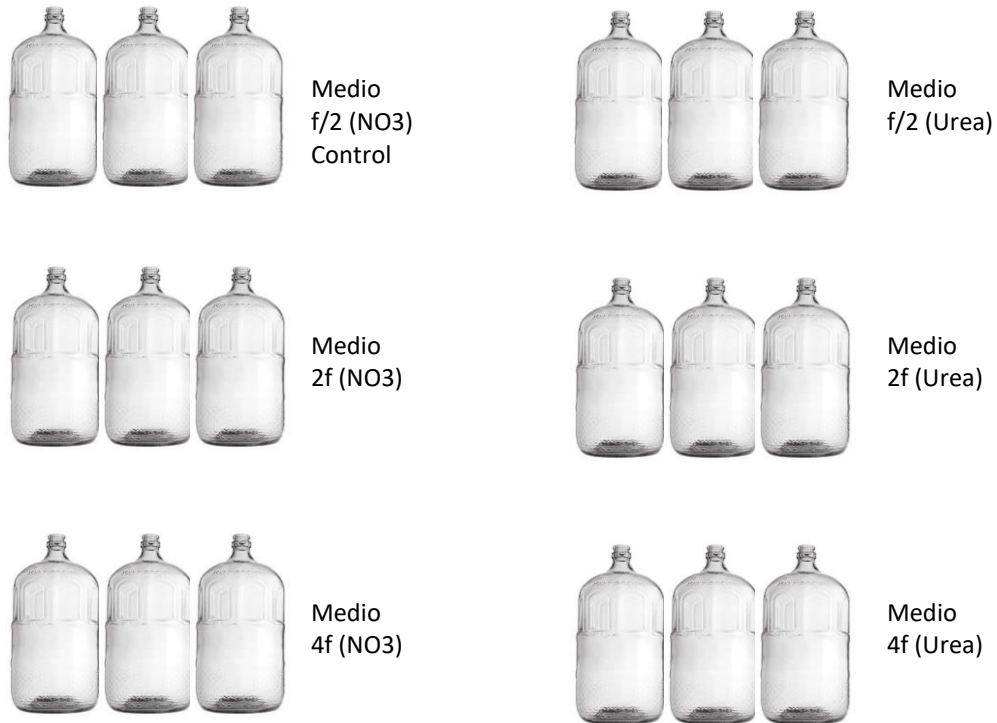


Figura 5. Diseño del experimento. Cultivos de *Chaetoceros muelleri* con dos fuentes de nitrógeno diferentes (NO₃ y Urea) por triplicado.

Los conteos celulares en los cultivos de microalgas se aplican, para estimar la concentración celular de la población, que generalmente es establecido como el No. células total por el cultivo o bien como el No. de células en un determinado volumen. Se realizó un análisis estadístico con el fin de estimar la tasa de crecimiento de la población, el cual fue útil para establecer la velocidad de crecimiento (Guillard y Sieracki, 2005). Se hicieron varias curvas de crecimiento con la finalidad de comparar gráficamente la concentración celular y poder diferenciar su crecimiento.

Determinación de Biomasa

Las muestras de biomasa se filtraron en filtros de vidrio (whatman GFC o equivalentes) previamente lavados y pesados, tomando muestras de 100 ml de cada cultivo antes de flocular los cultivos con ayuda de una bomba de vacío.

Peso Seco

Los filtros se colocaron en papel aluminio, se pasaron a una estufa para eliminar la humedad a 65° C y posteriormente se pasaron a un desecador, se pesaron nuevamente los filtros con biomasa seca en una balanza analítica.

Materia orgánica:

La materia orgánica fue calculada mediante la diferencia del peso seco y las cenizas utilizando una balanza analítica.

Cenizas

Para la determinación de cenizas se introdujeron las muestras en una mufla a 480 °C por 16 horas, posteriormente se sacaron las muestras de la mufla, se dejaron que alcanzaran una temperatura aproximada a la ambiente para pesar en una balanza analítica (López y col., 1993)

Floculación del Alga

Los cultivo de *C. muelleri* fueron floculados catiónicamente (pH 8.4), para lo cual se agregaron 0.15 g/L de $Al_2(SO_4)_3$, posteriormente se agitaron para homogeneizar el medio de cultivo con el agente floculante. La floculación se hizo con el fin de precipitar la microalga separándola del medio acuosa lo mejor posible, drenando el agua marina hasta obtener una pasta oscura, la cual se utilizó para análisis de proteínas con ayuda de electroforesis.

Extracción y Determinación de Proteína

Como primer paso para el estudio de las proteínas se realizó una curva de calibración para medir en que región del espectro absorbe más la muestra y poder tener la mayor cantidad posible.

Las muestras de microalgas se tomaron antes del floculado, 10 mL para la posterior determinación de proteínas. Se filtraron las muestras (filtros chicos whatman GFC o equivalentes) con ayuda de una bomba de vacío, el filtro se trituró con la ayuda de una varilla de vidrio en tubos de 15 mL para la extracción de proteína con dos tratamientos de NaOH al 0.1N, la cantidad utilizada para estos tratamiento fue dependiendo del crecimiento de microalga para cada muestra, se centrifugaron las muestras para decantar el sobrenadante y comenzar con el segundo lavado con NaOH.

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry y col. modificado (1972). Se empleó 1 mL de sobrenadante de cada muestra en diferentes tubos para mezclar con los reactivos de Biuret y Follin, entre otros. Posteriormente se dejaron los tubos por 90 min. A temperatura ambiente (de 22 a 24° C) para permitir que la reacción se lleve a cabo y el color llegue a su punto máximo. Se registró a una densidad óptica de 750 nm en un espectrofotómetro (spectrofotometer, 20D) (López-Elías, y col., 1995).

Perfil Electroforético

Para la caracterización de las proteínas fueron necesarias técnicas como: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidas con nitrato de plata.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El perfil electroforético se determinó empleando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970) en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés). Las proteínas obtenidas de la biomasa se mezclaron en relación 1:1 (v/v) con buffer muestra (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH=6.8), se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos y se enfriaron en un baño de hielo, para su posterior análisis electroforético.

Se aplicaron 20 μ L de proteína a un gel de poliacrilamida al 12%, empleando una unidad para electroforesis Mini PROTEAN[®]3 Cell Multi-casting (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Se utilizó una mezcla de proteínas estándar de amplio rango (Bio-Rad), compuesta por las siguientes proteínas: cadena pesada de miosina (200 kDa), β -Galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa). La corrida de electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente (condiciones de temperatura contralada en el laboratorio), a un voltaje de 180 volts. Finalmente se realizó una tinción con plata, para obtener el número de bandas promedio y la proporción de éstas en cada extracto (Yan, 2000), los geles se analizaron en un densitómetro de imágenes modelo GS-700 (Bio-Rad Laboratories., Hercules, CA). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de imagen con el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories/1998).

Tratamiento Estadístico

Las gráficas de los crecimientos de los diferentes tratamientos con medios de cultivos ricos en nitrógeno fueron generados con datos promedios y desviación estándar de los cultivos crecidos en el laboratorio.

El análisis estadístico fue aplicado con los siguientes parámetros: La concentración celular, biomasa y cantidad de proteínas será un análisis de varianza de dos vía, donde la variable a estudiar son los medios de cultivo (Urea y NO_3) y las concentraciones (F/2, 2F y 4F) (Box, y col. 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Curva de Crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en Dos Fuentes de Nitrógeno a Tres Concentraciones (f/2, 2F y 4F)

El crecimiento obtenido con los cultivos crecidos con NO_3 como fuente de nitrógeno, el crecimiento de microalga en el medio 4F fue superior. En términos generales el crecimiento en los tratamientos de NO_3 fue muy similar hasta el día 3, posteriormente el crecimiento fue exponencial en el medio 4F en el día 4. Al final del cultivo la concentración celular alcanzó 2,530,833 cel/mL, superando ampliamente a los medios f/2 y 2F (Tabla 5) aproximadamente por más de un millón de células; sin embargo hubo mayor dispersión de los datos que en los medios f/2 y 2F. La concentración del medio 4F fue superior a los medios f/2 y 2F probablemente debido a la concentración de nutrientes, ya que fue 8 veces la concentración de los nutrientes. Los medios f/2 y 2F terminaron con densidades celulares muy similares alrededor de 1,500,000 pero con un margen de error muy bajo (Figura 6).

Por otro lado al comparar el crecimiento con los medios enriquecidos con urea como fuente de nitrógeno en los diferentes tratamientos (f/2, 2F y 4F), se observó un crecimiento similar desde el comienzo hasta el final, con una concentración celular promedio entre 2.3 y 2.5×10^6 cél/mL. Por otra parte la dispersión celular fue muy cercana en los tres medios (f/2, 2F y 4F) (fig. 7).

Al comparar las curvas de crecimiento de los cultivos enriquecidos con NO_3 como fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones de este compuesto (f/2, 2F y 4F). La gráfica mostró que en los primeros dos días de cultivo fueron similares con un valor promedio aproximado de 0.5×10^6 cél/mL; sin embargo, a partir del tercer día se apreció un cambio sustancial en el incremento celular, se identificó un mayor crecimiento en los cultivos enriquecidos con la mayor cantidad de NO_3 (medio 4F) hasta llegar a una concentración celular de 2.5×10^6 . En los medios f/2 y 2F se mantuvieron iguales con una concentración de 1.5×10^6 (figura 6).

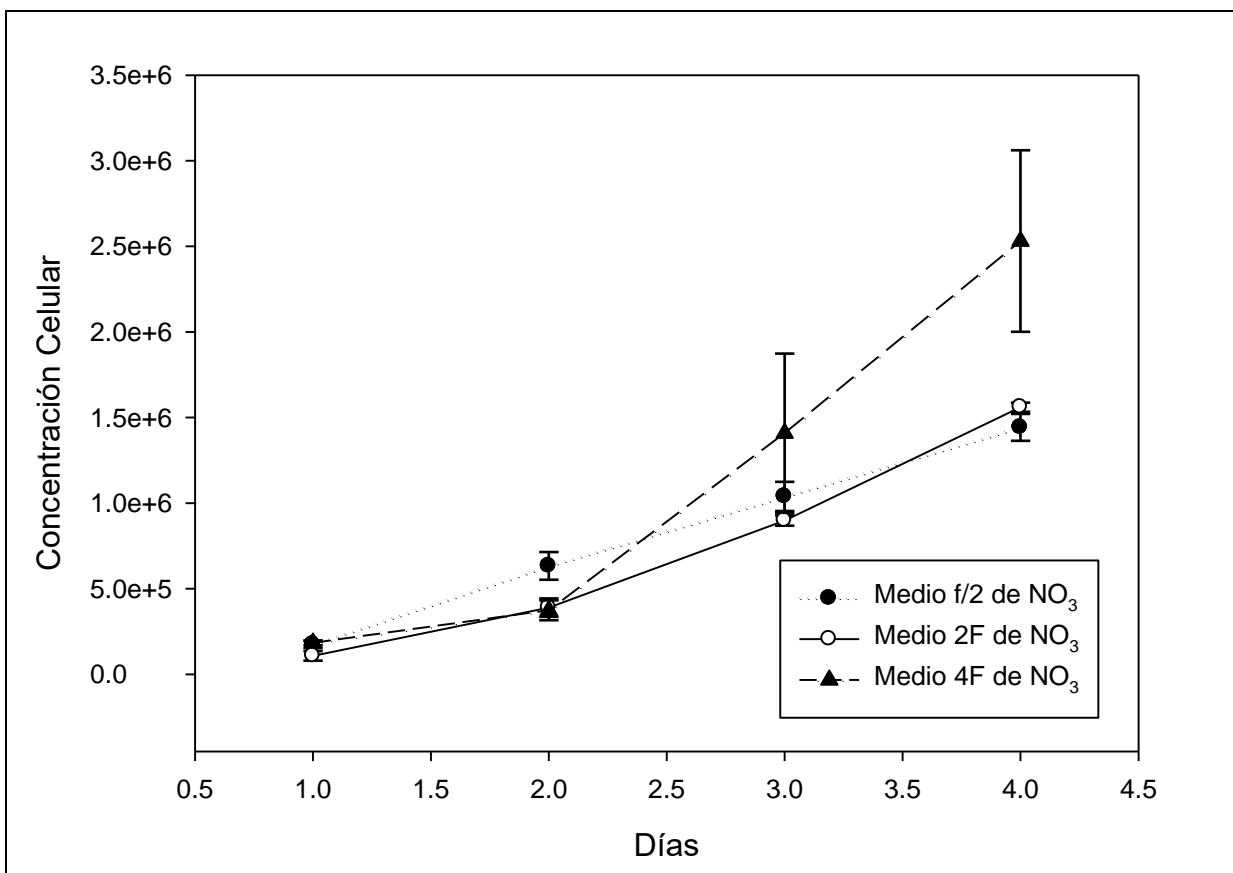


Figura 6. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* con NO₃ como fuente de Nitrógeno en cel/mL.

Por otra parte, el crecimiento con urea como fuente de nitrógeno a las tres concentraciones de este compuesto fue similar desde el comienzo del cultivo hasta el final, alcanzando valores promedios entre 2.3 y 2.5×10^6 cél/mL (figura 7).

Al comparar la densidad celular entre las dos fuente de nitrógeno (NO₃ y urea) estos fueron similares entre si, con excepción de las dos concentraciones menores de NO₃ (f/2 y 2F). Esta microalga tiene la facultad de poder crecer indistintamente de la fuente de nitrógeno con la cual se trabajó, ya que al utilizar nitratos el alga tiene ambas enzimas (nitrato y nitrito reductasa) Estas enzimas participan en la asimilación de nitrato catalizando la reducción de nitratos a nitritos para poder aprovechar los NO₃.

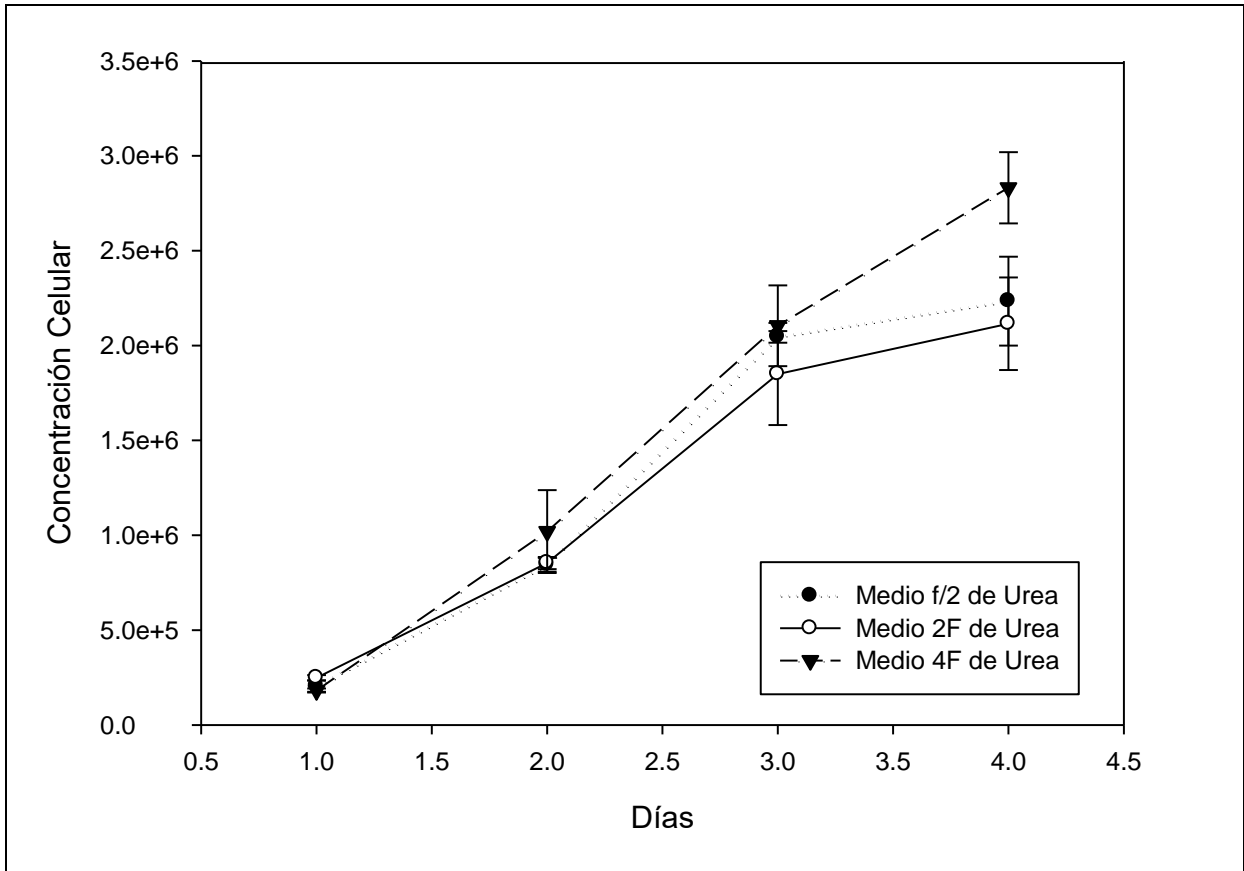


Figura 7. Curvas de Crecimiento de *Chaetoceros muelleri* con Urea como fuente de Nitrógeno en cel/mL.

Mientras que cuando utiliza urea requiere dos enzimas, urea amidoliasa (UALasa) y ureasa. (Richmond, 2004). La producción de las enzimas en particular requieren de un gasto energético, sin embargo esta microalga al ser cultivada con la urea, fue previamente aclimatada por lo que no se ve un efecto marcado en el desarrollo poblacional de la misma.

En investigación realizada por Thomas (1968) y Neilson (1980) se encontró que la urea y otros compuestos orgánicos nitrogenados son buenas fuentes de nitrógeno; por lo tanto, esto indica el aumento de densidad celular en el medio urea en comparación a la fuente con NO_3^- .

(los medios f/2 y 2F con nitratos fueron menores), con excepción del medio 4F, ya que fue similar a los medios con urea.

Concentración Celular al Momento de la Cosecha, Tasas de Crecimiento Máxima, Acumulada y Promedio de los Cultivos de *Chaetoceros muelleri* en las Dos Fuentes de Nitrógeno en los Tres Medios de Cultivo

Al momento de la cosecha se encontró que la concentración celular fue mayor con la fuente de nitrógeno a base de urea, independientemente del medio de cultivo (f/2, 2F y 4F), en comparación con la otra fuente de nitrógeno (nitratos); sin embargo, el medio con mayor concentración (4F) de nitratos, fue mayor que los tratamientos f/2 y 2F preparados con urea. Los valores promedio fluctuaron entre 2.12 y 2.81×10^6 células/mL, mientras que los valores menores se mantuvieron entre 1.44 y 1.56×10^6 células/mL presentes en los medios f/2 y 2f con la fuente de nitratos.

La tasa máxima no presentó diferencias significativas entre las tres concentraciones de los medios (f/2, 2F y 4F) con las dos fuentes de nitrógeno (NO_3 y urea) (Tabla 4). Los medios 4F de nitratos y urea fueron los más altos con valores que oscilan en 5.94 y 6.01×10^6 divisiones (Tabla 5).

La tasa de crecimiento acumulada también fue independiente de las concentraciones de nitrógeno en el medio y de la fuente de nitrógeno, a excepción del medio f/2 a base de NO_3 (4.61 divisiones). Los valores fluctuaron entre 4.96 y 6.01 divisiones (Tabla 5).

Los valores de la tasa promedio fueron semejantes entre las tres concentraciones del medio urea, y los dos tratamientos experimentales (2F y 4F), con valores entre 1.24 y 1.50 div/día, sin embargo el medio control (f/2 con NO₃) fue el más bajo, con 1.15 div/día (Tabla 5).

Al comprar los resultados de N° de células, tasa máxima y acumulada, de Karina-Jiménez (2013), encontró que el número de células/mL son muy cercanos con diferencia promedio de 10 000 a 40 cél/mL.

Tabla 5: Concentración celular promedio final, tasa de crecimiento máxima, acumulada y promedio de los cultivos de *Chaetoceros muelleri* con las dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea) a las tres concentraciones (f/2, 2f y 4f).

Fuente de nitrógeno	Medio	N° de células x10 ⁶ cel/mL	μ Max. div/día	μ Acum. divisiones	μ Prom. div/día
Nitratos	f/2	1.44±0.45 ^a	1.89±0.15 ^a	4.61±0.08 ^a	1.15±0.02 ^a
	2F	1.63±0.14 ^a	1.87±0.14 ^a	4.96±0.02 ^{ab}	1.24±0.01 ^{ab}
	4F	2.81±0.65 ^{ab}	1.12±0.82 ^a	5.94±0.61 ^b	1.49±0.15 ^b
Urea	f/2	2.23±0.28 ^{ab}	2.04±1.07 ^a	5.87±0.63 ^{ab}	1.47±0.16 ^b
	2F	2.12±0.31 ^b	1.84±0.46 ^a	5.69±0.27 ^b	1.42±0.07 ^{ab}
	4F	2.83±0.49 ^b	2.48±1.09 ^a	6.01±0.62 ^b	1.50±0.15 ^b

Evaluación de Biomasa de los Cultivos de la Microalga *Chaetoceros mulleri* en las Dos Fuentes de Nitrógeno en los Tres Medios de Cultivo

Peso Seco

La producción de biomasa seca de la microalga varió de 0.025 a 0.044 g/L. Se presentaron diferencias significativas en el medio 2F de urea frente a los demás medios, incluyendo los medios con nitrato como fuente de nitrógeno, siendo este el medio con un valor máximo de

0.044 g/L. Los medios tanto de urea (f/2 y 4F) como de nitratos (f/2, 2F y 4F) presentaron la cifra mínima, con un valor promedio de 0.029 g/L (Tabla 5).

Materia Orgánica

La porción orgánica de la biomasa fue semejante entre las tres concentraciones de nitrógeno con las dos fuentes (0.0083 a 0.0086 g/L con nitratos y de 0.0127 a 0.0162 g/L con urea); sin embargo fue mayor la producción cuando se empleó urea como fuente de nitrógeno.

Los medios con urea como fuente de nitrógeno fueron los que obtuvieron un valor mayor con respecto a los medios con nitratos como fuente de nitrógeno. El medio 2F de urea fue el más alto, con un valor de 0.0162 g dentro de los tratamientos con urea, mientras que los tratamientos f/2 y 2F de nitratos presentaron las concentraciones mínimas, con un valor promedio de 0.0084 g/L.

Los tratamientos f/2, 2F y 4F con urea como fuente de nitrógeno, presentaron los porcentajes máximos. El medio f/2 de urea fue el mayor valor con 51.71 % y presentó diferencias significativas con respecto a los demás medios. Los porcentajes menores se encontraron en los medios 2F y 4F de nitratos con un valor promedio de 28.78 % (Tabla 5).

Cenizas

La producción de cenizas fue relativamente constante con nitratos, independientemente de la concentración de este compuesto en el medio de cultivo (entre 0.0192 a 0.0232 g/L), mientras que cuando se utilizó la urea como fuente de nitrógeno se tuvieron valores entre 0.0127 y 0.0274 g/L. En general la cantidad de material inorgánico fue mayor con nitratos que con urea.

La cifra máximo estuvo en el medios 2F de urea con un valor de 0.0274 g/L, y el valor mínimo presentado en el medio f/2 de urea con 0.0127 g/L. El medio 4F de nitratos y el 2F de

urea mostraron los valores más altos dentro de sus respectivos medios; sin embargo, los resultados muestran que los medios con nitratos (f/2, 2F y 4F) fueron mayores que los medios con urea, incluyendo el medio f/2 de nitratos que fue el de menor porcentaje de los medios con nitratos. El medio 4F de nitratos presentó el porcentaje máximo con un valor de 73 % y el medio f/2 de urea presentó el porcentaje mínimo con un valor de 48.29 % (Tabla 6).

Parsons (1984) y Cordero-Esquivel (1993) reportaron que para las diatomeas, la mayor porción lo constituyen las cenizas, igual que este estudio, ya que las cenizas constituyeron la mayor parte de su composición bioquímica con un valor máximo aproximado al 73 % en el medio 4F (tabla 6) y un valor mínimo aproximado de 48.29 % en el medio f/2 de urea. Su composición de materia inorgánica fue relativamente alta ya que estas microalgas poseen una pared celular compuesta por sílice.

Proteína (%)

El medio f/2 de urea presentó el valor máximo con un porcentaje de 23.74 %, los valores mínimos estuvieron en los medios 4F de nitratos y 2F de urea cuyos valores oscilan en un promedio de 8.46 %. No presentaron ningún patrón aparente para los porcentajes de proteína dentro de los mismos medios; sin embargo, el porcentaje proteico fue directamente proporcional al porcentaje de materia orgánica obtenido, es decir, los valores menores y mayores de cada fuente de nitrógeno de los porcentajes de proteína, coincidieron con los valores mínimos y máximos de los porcentajes de materia orgánico que se encontraron en la biomasa (Tabla 6).

En general se observó que la composición bioquímica de las microalgas, depende de la concentración de los nutrimentos que se apliquen en el medio de cultivo y del estado fisiológico del mismo (Myklestad y Haug, 1972).

En relación con la materia orgánica se obtuvieron los mayores porcentajes en los medios f/2 y 4F de urea, con valores promedios que oscilan entre 51.71 % y 40.01 % (tabla 6). A la vez el constituyente proteico se vio incrementado en el medio f/2 de urea ya que fue el de mayor porcentaje de materia orgánica con un valor de 23.74% (tabla 6).

El porcentaje de proteína que se recuperó durante la cosecha fue en la fase estacionaria o de lento crecimiento, el cual tuvo un comportamiento similar al estudio realizado por Medina-Reina y Cordero-Esquivel, (1998) en el cual se cosechó en la fase estacionaria y obtuvieron un valor promedio de 21.99 % de proteína. El método de extracción de proteína que utilizaron para ese estudio fue el mismo al que se utilizó en esta investigación.

Tabla 6. Evaluación de Biomasa de peso seco, Materia Orgánica, Cenizas y proteína en dos fuentes de nitrógeno, Nitratos y Urea.

	Nitratos			Urea		
	f/2	2F	4F	f/2	2F	4F
Peso seco (g)	0.028 ^a (0.003)	0.028 ^a (0.003)	0.032 ^a (0.003)	0.025 ^a (0.003)	0.044 ^b (0.008)	0.031 ^a (0.003)
Mat. orgánica (g)	0.0083 ^a (0.0007)	0.0084 ^a (0.0009)	0.0086 ^a (0.0012)	0.0127 ^b (0.0018)	0.0162 ^{bc} (0.0043)	0.0129 ^b (0.0018)
Cenizas (g)	0.0195 ^b (0.0027)	0.0192 ^b (0.0024)	0.0232 ^{bc} (0.0019)	0.0127 ^a (0.0024)	0.0274 ^c (0.0048)	0.0177 ^{ab} (0.0013)
Mat. Orgánica (%)	34.64 ^{bc} (3.45)	30.57 ^{ab} (2.79)	27.00 ^a (2.62)	51.71 ^d (6.67)	36.83 ^{bc} (5.25)	40.01 ^c (4.28)
Cenizas (%)	65.36 ^{bc} (3.44)	69.43 ^{cd} (2.93)	73.00 ^d (2.62)	48.29 ^a (6.67)	63.17 ^{bc} (5.25)	59.99 ^b (4.28)
Proteínas (%)	15.46 ^{ab} (5.90)	18.07 ^{bc} (3.67)	8.10 ^a (3.84)	23.74 ^c (4.21)	8.82 ^a (2.13)	14.16 ^{ab} (2.90)

Nota: a, b, c, y d simbolizan a los literales estadísticos representando si hay diferencias significativas.

Electroforesis con SDS-PAGE

Las proteínas fueron obtenidas tras un proceso de cultivo, extracción y separación de las mismas, para la identificación de su peso molecular (kDa) y posteriormente la identificación de

la proteína correspondiente. Se realizó una Electroforesis con SDS-PAGE y se tiñó con nitrato de plata ya que las muestras no contenían suficiente proteína. De las seis muestras analizadas por electroforesis con SDS-PAGE los medios con NO₃ presentaron más bandas, alrededor de 12, mientras que en los medios urea, sólo se muestran alrededor de 4 bandas, esto puede ser debido al medio, que puede estar interviniendo en la electroforesis.

En la figura 8 se muestra el aislamiento de proteínas de la *Chateceros muelleri* de tres medios diferentes (f/2, 2F y 4F) enriquecidos con NO₃ y tres medios diferentes (f/2, 2F y 4F) enriquecidos con urea como fuente de nitrógeno, con un marcador de amplio espectro, que va desde 6.50 KDa hasta 200 KDa. La mayoría de las bandas se presentaron en los medios de NO₃, principalmente en el tratamiento 2F (b), alcanzando a separarse aproximadamente en 12 bandas, de menor peso molecular hasta las de mayor peso molecular. Se encontraron bandas intensas de 6.5, 14.4, 21.5, 38, 45.5, 62.5 y 87.5 KDa, la banda con mayor peso molecular que se identificó fue de 87.5 kDa aproximadamente, y la banda con menor peso molecular fue alrededor de los 6.5 kDa. El medio f/2 (a) presentó la mayoría de las bandas de bajo peso molecular (figura 8); sin embargo se exhibieron dos bandas tenues de aproximadamente 62.5 y 87.5 kDa. En el medio 4F (c) se alcanzaron a ver bandas que oscilan de 7 a 17.5 kDa, y se aprecian tres bandas alrededor de los 25 a 31 kDa, y una ligera banda de 87.5 kDa, siendo este el medio que presentó menos bandas (figura 8). Esto es debido probablemente a la cantidad de proteína presentada en las muestras ya que el medio 2F de NO₃ contiene mayor porcentaje de proteína aproximadamente 18% (tabla 6), por lo cual hubo más presencias de bandas en este medio. Mientras que los tratamientos con urea se mostraron escasas bandas, de 14, 21 32-34 y 66 kDa, en los tratamientos con f/2 y 2F, el medio 4F se nota una leve banda en el rango de los 66 kDa.

Los resultados de SDS-PAGE mostraron bandas cercanas a 27 y 28 kDa aproximadamente, junto con las bandas que se aprecian entre los 14 y 22 kDa se presume que puedan contener subunidades α y β de ficobiliproteínas encontradas en algas rojas (Guevara, y col 2006) cianobacterias (Swanson y Glazer 1990), y *Spirulina* (Gallardo, y col. 2010), las B-ficoeritrina se encuentra entre los 25 y 30 kDa, en muestras de microalgas rojas, *Rhodorus marinus* (Guevara, y col, 2006) como las encontradas en estos medios de 21.50 a 31.00 kDa. Tanoue,(1992-1996) obtuvo de la separación dos grupos diferentes de bandas, con un peso molecular de 45 y 66 kDa, las cuales pueden coincidir con las bandas encontradas (b). Además, se encontraron bandas marcadas en los tres medios de NO₃ (figura 8) cercanas a los 90 KDa,

que pueden corresponder a proteínas de membranas ya que en las investigación de Adriana Katz y col. (2007) hicieron electroforesis de membranas plasmáticas de *Dunaliella salina* y encontraron 14 bandas aproximadamente de 90 a 600 KDa, ya que podría tratarse de una proteína de membrana de bajo peso molecular. Por ello podría tratarse de algunas bandas encontradas en la electroforesis de la *Chaetoceros muelleri*. Con forme a las investigaciones de Tanoue (1992-1996) con fitoplancton, el perfil electroforético fue similar al obtenido, donde tuvieron bandas similares durante toda la corrida con pesos moleculares de aproximadamente 14, 40, 48, 60 y 72 kDa.

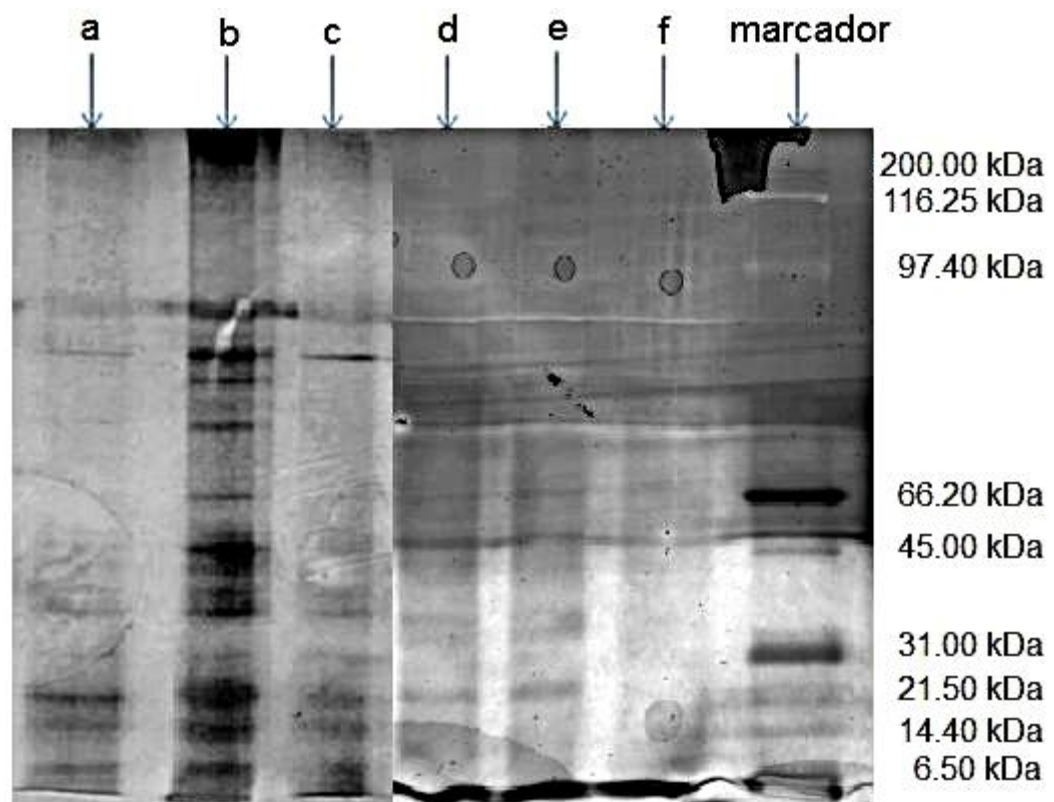


Figura 8. Electroforesis con SDS-PAGE de muestras de microalga *Chaetoceros muelleri*, con NO_3 como fuente de Nitrógeno y urea (teñida con Nitrato de plata): (a) Mezcla total de proteínas extraídas del medio f/2 de NO_3 (b) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 2F de NO_3 . (c) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 4F de NO_3 , (d) Mezcla total de proteínas extraídas del medio f/2 de urea, (e) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 2F de urea y (f) Mezcla total de proteínas extraídas del medio 4F de urea.

CONCLUSIONES

En general se encontró que los parámetros productivos (concentración celular, biomasa y proteínas) de los cultivos masivos de *Chaetoceros muelleri* crecidos con el medio a base de urea como fuente de nitrógeno son significativamente mayores que con los medios formulados a base de nitratos (NO₃) como fuente de nitrógeno, ya que las concentraciones celulares, tasas de crecimiento, biomasa orgánica y proporción de proteínas fueron más altos en los cultivos crecidos a base de urea. Así mismo fue evidente que cuando se emplea una cantidad elevada de nitrógeno, independientemente de la fuente se tiene las concentraciones celulares mayores, así como las tasas de reproducción, lo cual no se refleja en la producción de biomasa y proporción de proteínas.

Los resultados obtenidos por el perfil electroforético con SDS-PAGE para la microalga *Chaetoceros muelleri* fueron en los medios con NO₃ (f/2, 2F y 4F) los más destacados. Sus pesos moleculares oscilaron entre los 6.50 kDa hasta los 87.50 kDa. La cantidad de bandas que se exhiben en las tres muestras indican verse influenciadas por el porcentaje de proteínas, ya que el 2F de nitratos fue el que presentó mayor porcentaje de proteína y en la electroforesis fue el que mayor número de bandas mostró. Los medios de urea presentaron pocas bandas, esto puede deberse al tipo de muestra que se manejó, ya que probablemente la urea interfirió con el procedimiento y la técnica de electroforesis usada.

RECOMENDACIONES

1. Es recomendable experimentar con el medio urea, las mismas concentraciones con otras especies de microalgas, para así evaluar su crecimiento, biomasa y producción de proteína.
2. Evaluar la composición bioquímica (pigmentos, lípidos, carbohidratos) con el medio urea de *Chaetoceros muelleri*.
3. Diseñar una metodología más adecuada para la electroforesis, como lo es el aumentar la carga de muestra, utilizar muestra liofilizada y modificar su pH.
4. Investigar si el pH de las muestras interfieren con la electroforesis en *Chaetoceros muelleri*.
5. Evaluar la capacidad antioxidante de las proteínas obtenidas de *Chaetoceros muelleri* con los medios NO₃ y urea.
6. Llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular para una mejor separación de proteínas.

REFERENCIAS

- Alexander P., Bahret, M. J., Cavez, J., Courts, G., & D'Alessio, N. S. 1992. *Biología*, Ed. Prentice Hall. U.S.A. Pp. 271-274.
- Apt, K. E. & Behrens, P.W. 1999: Commercial developments in microalgal biotechnology *J. Phycol.* Pp 215–226.
- Barbarino E. & Lourenço S.O. 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro and microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 17: Pp. 447–460
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In Richmond, (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford. Pp. 312–351.
- Beevers, L. & Hageman, R. H., Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant physiol.*, 20, 495, 1969.
- Benemann, J. R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* 4: Pp. 233-245.
- Benezra M. C. 1995. Extracción y cuantificación máxima de proteínas de la microalga marina *Isocrhysis* sp. Tesis Universidad de Sonora. Pp. 14-46.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* Pp, 70, 313–321.
- Borowitzka, L. J. & Borowitzka, M.A. 1989. β -Carotene (provitamina A) production with algae. In: Vandamme, E. J., ed. *Biotechnology of vitamins*. Pigments and Growth Factors. Elsevier Applied Science, London, pp. 15-26
- Borowitzka, M.A. 1999b. Economic evaluation of microalgal processes and products. In: cohen, z., ed. *Chemicals from Microalgae*. Taylor & Francis. London, pp.387-409.

- Box E.P., Hunter S. & Hunter W. G. 2005. *Statistic for experimenter design, innovation and discovery*. Willey Interscience Editorial, Second Ed. Pp. 17-34.
- Brown, M. R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Dunstan, G. A. 1997: Nutritional Properties of Microalgae for Mariculture. *Aquaculture*, Pp. 151, 315–331.
- Brown, M. R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. & Garach, C.D. 1989: Nutritional Aspect of Microalgae used in Mariculture: review. *Aquaculture*, Pp. 205
- Brown, M. R. 2002. Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Pp. 281-289.
- Burlew J.S. 1953: *Algal culture: from laboratory to pilot plant*. Carnegie Institution of Washington Publication, Washington, págs. 357
- Bustillos-Hurtado, C.A. & López-Elías, J. A. 1994. «Composición química de dos especies de microalgas en dos fases de crecimiento, cultivadas en medios simplificados ». *Oceanología* 2:133-148.
- Bustillos-Hurtado, C.A. 1992. Determinación de la composición química de tres especies de microalgas cultivadas en medios simplificados contra uno control F de Guillard y Ryther. *Tesis Centro de investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, México pag 3*.
- Cartron E., Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B. & Leger CL. 2001. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and another natural phenolic compounds: LDL protections against oxidation and decrease in the proinflammatory lisophosphatidilcholine production *J. Nat. Prod.* 64: 480-486.
- Catherine M. Gatenby, M., Orcutt, D.M., Kreeger, D.A., Parker, B.C., Jones, V.A. & Richard J. N: 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology* 15: 1–11.

- Certik, M. & Shimizu, S. 1999: Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.*, pags., 1–14.
- Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Foods Sci. & Technol.* 11, 254-262.
- Espinoza D. G. 2005. Efecto bactericida de las microalga *Chaetoceros mulleri* a tres fases de crecimiento en cultivos de *Vibrio alginolyticus*. *Tesis*. Universidad de Sonora. Pag. 14-17.
- F. M. I. Natrah, F. M. Yusoff, M. Shariff, Abas F. & N. S. Mariana, 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Springer Science + Business Media B.V.* pag. 712.
- Fogg, G.E. & Thake, B. 1987. *Algal cultures and phytoplakton ecology*. The university of Wisconsin press. Madison.
- Fujii, S., Nishimoto N., Notuya A. & Hellebust, J.A. 1995. Growth and osmoregulation of *Chaetoceros mulleri* in relation to salinity. *Plant Cell Physiol.* 36(5): 759-764.
- Fulks, W. & Main, K. L., 1991. Rotifer and micro-algae culture systems. *Proceedings of a US-Asia Workshop*. Honolulu, Hawaii, Junary 28-31, 1991. The oceanic Institute, Hawaii, USA, 3-52 pp.
- González, R. A. 2000. Alternativas en el cultivo de microalgas. Facultad de ingeniarías marítimas y ciencias del mar. *Tesis de Grado*, Guayaquil-Ecuadr. Pag. 21-34.
- Graham, L. & Wilcox, L. 2000. *Algae*, Ed. Pracice Hall. U.S.A pp 6470.
- Grobbelaar, J. U. 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. Received: 12 February 2010 / Accepted: 8 June 2010 / Published online: 26 June 2010 de 2010, Springer Science-Business Media B.V. 2010, págs. 106:135–144.

- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. AlgaeBase. World-wide electronic publication, Galway: National University of Ireland. <http://www.algaebase.org> ; searched on 5 April 2011.
- Goodwin, T.W. 1980. The biochemistry of caroten-oids. Vol. 1, Plants, 2nd. ed. Chapman and Hall, New York.
- Goodwin, T.W. 1984. The biochemistry of caroten-oids. Vol. 2, Animals, 2nd. ed. Chapman and Hall, New York.
- Hattori. A. & Myers, J. 1966. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrical*. I. Reduction of nitrite to ammonia. *Plant physiol (Lancaster)*. 41, 1031.
- Jarunrattanasri, A., Theerakulkait, C. & Cadwallader, K.R. 2007. Aroma components of acid-hydrolyzed vegetable protein made by partial.
- Jensen, G. S., Ginsberg, D. I. & Drapeau, M. S. 2001. Bluegreen algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 3, 24–30
- Kevin J. F. & Butler I. 1986. Nitrogen sources for the growth of marine Microalgae: role of dissolved free amino acids. *MARINE ECOLOGY - PROGRESS SERIES*. Vol. 34: 281304.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Lond.* *Nature*, 227, 680–685.
- Leyva Zapien M. A. 2008. Evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Selaginella lepidophylla* (Doradilla). *Tesis* Universidad de Sonora. Pag. 11, 17, 43 y 44.
- Liang, S., Xueming, L., Chen, F. & Chen, Z 2004: Current microalgal health food R&D activities in China. *Hydrobiologia*, 512, 45–48.
- López-Elías, J. A., Baez-Dueñas, C. & Huerta-Aldaz N. 1993. Manual de Técnicas aplicadas al cultivo de microalgas. C.I.C.T.U.S. Hermosillo Son. 93 pp.

- López-Elías, J. A., Báez-dueñas M del C & Huerta-Aldaz N. 1995. Manual de Técnicas aplicadas al cultivo de microalgas. Departamento del centro de investigación tecnológicas y científicas. Pag. 12-17.
- López-Elías, J.A., Voltolina, D., Chavira-Ortega, C.O., Rodríguez-Rodríguez, B.B., Sáenz-Gaxiola, L.M., Cordero-Esquivel, B. & Nieves, M. 2003. Mass production of microalgae in six commercial shrimp hatcheries of the Mexican northwest. *Aquacultural Engineering*, 29: 155-164.
- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Nieves-Soto, M. & Figueroa-Ortiz, L. 2004. Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. In: Cruz
- Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. & González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México. Pags. 20-25.
- Lourenço S. O., Lanfer-Marquez U. M., Mancini-Filho J., Barbarino E. & Aida E. 1997. *Changes in biochemical profile of Tetraselmis*. universidad de Silon Paulo, Brazil : s.n., Aceptado el 6 de Agosto de 1996 de 1997, Págs. 153-168.
- Margalith P.Z. 1999 Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51:431-438
- Matanjun P, Mohamed S., Noordin-Mohamed M., Kharidah-Muhammad & Cheng Hwee Ming 2008. *Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo*. Springer Science, Business Media B.V. Pag. 367
- Miranda Favela J. L. & Esquer Icedo J. C. 1999. Nutrición de Microalgas. *Tesis*, universidad de Sonora. Pag.12, 14 y 22.

- Moncheva S., Gorinstein S., Shtereva G., Toledo F., Arancibia-Avila P., Goshev I. & Trakhtenberg S. 2003. Biomass, protein- and carbohydrate-composition of phytoplankton in Varna Bay, Black Sea. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Pag. 24
- Moroyoqui G. M. & Romero-Alinsi G. G., 2007. Evaluacion del efecto de seis concentraciones de fierro, en cuatro tratamientos de Fe iónico en el crecimiento y tamaño celular e la microalga marina *Chaetoceros mulleri* Tesis. Universidad de Sonora.
- Muller-Feuga, A. 2000: The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. J. Appl. Phycol., pags, 527–534.
- Myklestad, S. & Haug, A. 1972. «Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* Var». Willei (Gran) Hustedt. I. «Effect of the concentration of nutrients in the culture medium». J. exp. mar. Biol. Ecol. 9:125-136.
- Neori A. 2010. “Green water” microalgae: the leading sector in world aquaculture. Springer Science Business Media B.V. Pag. 1
- Paniagua Chávez, C.G. 1993. Variabilidad y composicion proximal y valor alimenticio de *Dunaliella* sp. Preservada por congelacion. Tesis de maestria en ciencias. Centro de investigaciones cientificas de educacion superior de ensenada, ensenada, B.C., 74 pp.
- Pineda Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G. & Ferro-Luzzi, A. 1999. *Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos*. Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. Instituto nacional de nutrición de Italia. Rev. Cubana de nutrición. Pag. 110.
- Rosales-Loaiza N. 2008. Crecimiento, producción de pigmentos y proteínas. *boletín del centro de investigaciones biológicas* , 323–444
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A.. 2006. Commercial Applications of Microalgae. Châtenay-Malabry cedex.
- Pelegrín, Y. F. 2001. Algas en la "bótica". En *Avance y Perspectiva*. págs. 283-292.

- Randriamahatody Z., Sylla K.S.B., Nguyen H.T.M. & Donnay Moreno, C. 2011. Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from madagascar. Pag. 7
- Reyes Annabel Mireya. 2000. *ALTERNATIVAS EN EL CULTIVO DE MICROALGAS*. González, Guayaquil-Ecuador : s.n., 2000, Tesis de Grado, págs. 21-34.
- Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Science. P. 147-239
- Rikey, J. P. & Chester, R. 1989. Introducción a la Química Marina. 1°. Edicion, AGT Editors, S. A., pp 220-240.
- Seyfabadi J., Ramensapour, Z. & Amini, K., Z., 2010: *Protein, fatty acid, and pigment content of Chlorella vulgaris under different light regimes*. Springer Science-Business Media. Pp. 1.
- Shelef, G. & Soeder, C.J. 1980. Algae biomass production and use. Elsevier/North Holland Biomedical press, Amsterdam., 265-285.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M. & Converti, A. 2005: *Batch and fed-batch cultivations of Spirulina platensis using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources*. Aquaculture, págs. 243, 217–224.
- Stolz, P. & Obermayer, B. 2005: *Manufacturing microalgae for skin care. Cosmetics Toiletries*, págs. 99–106.
- Swanson R.V. & Glazer A.N. 1990. Separation of phycobiliprotein subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. 188: 295–299.
- Tacon, A. 1990. *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimps*. Argent Lab. Press. Redmond, WA. USA. 117 pp.
- Tanoue, E., 1992. Occurrence and characterization of particulate proteins in the Pacific-ocean. Deep-Sea Research Part AOceanographic Research Papers 39: 743–761.

Tanoue, E., 1996. Characterization of the particulate protein in Pacific surface waters. *J. mar. Res.* 54: 967–990

Vílchez, C., Garbayo, I., Lobato, M. V. & Vega, J. M. 1997: Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* págs. 562–572.

Voet Donald, Voet, G. Judith. Pratt. W. Charlotte, 2007. *Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular.* Segunda edición. Editorial médica panamericana. Pag. 98.

Wei D., Chen Feng, Chen Gu, Zhang XueWu, Liu LongJun & Zhang Hao. 2008. Enhanced production of lutein in heterotrophic. no. 12 , 8 de juny de 2008, Springer, Science in China Series C: Life Sciences, Vol. vol. 51. Pp. 1088-1093.

www.fao.org/ocrep/field/003/AB473S02.htm

Yamaguchi, K. 1997: Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.* págs. 8, 487–502.

Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H. & Dunn M.J. A., 2000. Modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry-*Electrophoresis*, 21, 3666-3672.

Young, A.J. 1993a. Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae. In *Carotenoids in Photosynthesis*, A.J. Young and G. Britton, eds (London: Chapman and Hall), pp. 161-205.

Young, A.J. 1993b. Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. In *Carotenoids in Photosynthesis*, A.J. Young