



**Universidad Autónoma de Chiriquí  
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas  
Departamento de Química  
Programa de Maestría en Ciencias Químicas con Énfasis en  
Inocuidad Alimentaria  
Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología  
(CIPNABIOT)**

**“Producción de biomasa microalgal como alimento vivo y fuente de  
compuestos de alto valor agregado para su uso en acuicultura”**

Presentado por:

Isaac Omar Lisondro Gracia  
4-751-1289

Tesis de grado para  
Optar por el título de

**Magister Scientiae en Química con Énfasis en Inocuidad Alimentaria**

David, Chiriquí, República de Panamá

2020

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a dos mujeres maravillosas que han sido mi soporte incondicional en diferentes momentos.

En primera instancia, a mi madre, la señora Omayra de Lisondro.

Gracias mami por ser mi Norte y mi Sur, mi inspiración y mis ganas de seguir adelante. Todo te lo debo en gran proporción a ti, ya que has luchado incansablemente, me has apoyado e impulsado en diversos instantes de mi vida. Sin lugar a duda, mis palabras se quedan cortas para expresar mi agradecimiento eterno a tu constancia y dedicación, es por ello que esto te lo dedico mami, ¡Muchas gracias por todo! ¡Te adoro!

Y por último, pero no menos importante a mi compañera sentimental, Diana Staff.

Quiero agradecerte por tu apoyo incondicional, desinteresado y constante, que me has ofrecido desde nuestros inicios. Realmente, he aprendido muchas cosas bellas de ti, me has enseñado tantas cosas que me hacen sentirme orgulloso de tenerte. Gracias por todo mi amor, y ésto también va para ti... ¡Te amo!

RJJ 7 45 61

## AGRADECIMIENTO

A Dios gracias por darme salud, mi familia, amigos, fortaleza, sabiduría para llevar a cabo este proyecto.

Gracias a mis padres y familiares por ser mis promotores y mi inspiración durante toda mi vida. En este punto, agradezco a mi madre y mi padre por creer siempre en mí, apoyarme incondicionalmente y sobre todo ser mi sustento. Adicionalmente, extendiendo mi agradecimiento a mi hermano, Saidd, por todo su amor fraternal.

Agradezco a mi pareja, Diana Staff, la cual me ha apoyado en diferentes momentos especiales ratificando su gran amor incondicional.

A mi directora-asesora de tesis y madre académica, la Dra. Ariadna Batista por su apoyo, constancia, dedicación, paciencia, conocimientos, consejos desde que empezamos a trabajar con las microalgas en UNACHI. Igualmente, a mis coasesores la Dra. Laura Patiño Cano y el Dr. Heriberto Franco Ávila, por su apoyo, esmero, sacrificio y tiempo invertido en la asesoría de este proyecto.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación-SENACYT y UNACHI por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. Al igual que deseo extender mis agradecimientos al programa de Maestría en Ciencias Químicas con Énfasis en Inocuidad Alimentaria y sus colaboradores.

Gracias al Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT), a los profesores Roberto de Guevara, Vielka de Guevara y administrativos por facilitarme los medios para investigar desde mi afiliación al grupo, de igual manera agradezco a la Escuela de Química y su grupo de trabajo.

Agradezco a la Universidad de Almería y a la Fundación Cajamar, propietarios de la Estación Experimental Las Palmerillas, Almería, España, por recibirme y abrirme las puertas durante mi pasantía. Mis agradecimientos especiales al Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández, de la Universidad de Almería. A Cinthya, Alicia, Peña, Ismael, Ainoa, Martha y en especial a mi amiga Martina, por apoyarme durante mi estancia en Almería.

Agradezco a mis amigos y hermanos, el profe Luis Montero, Kyriam, Miguel, Eduardo, Eira, Anibal, Diana Sánchez, Raúl, Rolando y demás.

Mis agradecimientos a mi papá Universitario, el Lic. Oscar Guillermo Pinzón, a la Lic. Dayra Icaza, y demás colaboradores de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

## INDICE GENERAL

PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. ASPECTOS GENERALES.....</b>	<b>2</b>
1.1. Antecedentes del problema.....	2
1.2. Situación Actual o estado actual del problema.....	7
1.2.1. Planteamiento del problema.....	7
1.3. Supuesto (s) General (es) o Hipótesis.....	9
1.4. Objetivos.....	9
1.4.1. Objetivo General.....	9
1.4.2. Objetivo (s) Especifico (s).....	9

1.5. Delimitación, Alcance o Cobertura.....	9
1.6. Restricciones y/o Limitaciones.....	10
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>11</b>
2. Marco Teórico.....	12
2.1. ¿Qué son las microalgas?.....	12
2.2. Las microalgas: Fuente de nutraceuticos y alimento.....	14
2.3. <i>Isochrysis</i> o <i>Tisochrysis</i> .....	15
2.4. Microalgas en acuicultura.....	16
2.5. La luz como nutriente esencial.....	18
2.6. Nutrientes y composición bioquímica de las microalgas.....	19
2.7. Lípidos en microalgas.....	20
2.8. Fotobiorreactores (PBR).....	22
2.9. Modalidades de cultivo.....	24
2.10. Análisis económico de la producción de microalgas a gran escala..	25
2.11. Parámetros de importancia en los cultivos de microalgas.....	26
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>27</b>
3. Marco de Aspectos Metodológicos .....	28

3.1. Tipo de Investigación.....	28
3.1.1. Definición.....	28
3.1.2. Justificación.....	28
3.2. Definición, conceptual, instrumental y operacional de variables.....	28
3.3. Población.....	29
3.3.1. Muestra y tipo de muestreo.....	29
3.4. Métodos e instrumentos de investigación.....	29
3.4.1. Métodos.....	29
a) Establecimiento de las condiciones para el cultivo biotecnológico de la microalga <i>Tisochrysis lutea</i> en fotobiorreactores.....	29
b) Determinación de la concentración de biomasa.....	31
c) Determinación de la irradiancia promedio (lav).....	31
d) Mediciones de fluorescencia.....	32
e) Análisis de la composición bioquímica a la biomasa producida.....	32
f) Análisis de ácidos grasos.....	33
3.5. Software de control y tratamiento de la información.....	34
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>35</b>
4. Análisis e Interpretación de Resultados.....	36

4.1. Cultivo de <i>Tisochrysis lutea</i> en un fotobiorreactor tubular (PBR-T)...	36
4.1.1. Parámetros monitoreados durante el cultivo de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) en el fotobiorreactor tubular (PBR-T).....	37
4.1.1.1. Concentración (Cb), productividad (Pb) de biomasa, velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de nutrientes respecto al tiempo.....	37
4.1.1.2. Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia promedio (lav), eficiencia fotosintética respecto al tiempo.....	40
4.1.1.3. Comparación entre la modalidad de cultivo batch y continuo en el fotobiorreactor tubular.....	43
4.1.1.4. Análisis de Ácidos grasos a la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) en PBR tubular.....	48
4.2. Cultivo de <i>Tisochrysis lutea</i> empleando columnas de burbujeo (PBR-BC).....	58
4.2.1.1. Parámetros monitoreados durante el cultivo de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) en columnas de burbujeo (PBR-BC).....	59
4.2.1.1.1. Concentración (Cb), productividad (Pb) de biomasa, velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de nutrientes respecto al tiempo.....	59
4.2.1.1.2. Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia promedio (lav), eficiencia fotosintética respecto al tiempo.....	62
4.2.1.1.3. Comparación entre la modalidad de cultivo batch y semicontinuo (20 y 30%) en columnas de burbujeo.....	65
4.2.1.1.4. Análisis de Ácidos grasos a la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) en Columnas de burbujeo.....	72
4.3. Análisis de la composición bioquímica a la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) cultivada en fotobiorreactores tubulares (PBR-T) y columnas de burbujeo (PBR-BC) .....	83

<b>CAPITULO V</b> .....	88
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	89
5.1. Conclusiones.....	89
5.2. Recomendaciones.....	90
<b>ANEXOS</b> .....	91
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	97

## INDICE DE CUADROS

No.	Descripción	Pág.
1	Especies de microalgas ricas en compuestos de alto valor y sus aplicaciones .....	13
2	Ventajas y limitaciones de sistemas abiertos y fotobiorreactores.....	23
3	Composición del medio de cultivo empleado para el cultivo de T-Iso en PBR-T.....	36
4	Ácidos grasos (% peso seco) presentes en la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) cosechada en el estado estacionario en la modalidad batch y continuo en PBR-T. ....	54
5	Composición del medio de cultivo empleado para el cultivo de T-Iso en PBR-BC.....	58
6	Ácidos grasos (% peso seco) presentes en la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso) cosechada en el estado estacionario en la modalidad batch y semicontinuo en PBR-BC.....	79
7	Composición bioquímica (%) de la biomasa obtenida de los diversos reactores empleados para el cultivo de la microalga <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso).....	83

## INDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1	<i>Tisochrysis lutea</i> CCAP 927/14.....	15
2	Crecimiento de T-Iso en un fotobiorreactor tubular, (a) Inicio del experimento, (b) fin del ensayo .....	36
3	Concentración de biomasa (a), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y productividad de biomasa (Pb) para la microalga T-Iso (b).....	38
4	Concentración de biomasa y consumo de nutrientes durante la fase de cultivo batch.....	39
5	Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) de <i>Tisochrysis lutea</i> en un sistema de cultivo tipo batch.....	40
6	Irradiancia promedio y Eficiencia fotosintética de la microalga T-Iso.....	42
7	Correlación entre concentración de biomasa respecto a la irradiancia promedio, y productividad de biomasa respecto a la tasa de crecimiento .....	43
8	Concentración y productividad de biomasa en estado estacionario en batch y continuo de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso).....	45
9	Parámetros de cultivo del estado estacionario en batch y continuo de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso).....	46
10	Irradiancia promedio (Iav) en el estado estacionario en cultivos batch y continuo de <i>Tisochrysis lutea</i> (T-Iso).....	48
11	Concentración (mg/mL) de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados detectados en la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> en batch y continuo .....	50
12	Crecimiento de T-Iso en columnas de burbujeo de 100 L, a) Batch, b) y c) Semicontinuo.....	58

13	Concentración de biomasa a), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y productividad de biomasa (Pb) b) para la microalga T-Iso en columnas de burbujeo .....	61
14	Concentración de biomasa y consumo de nutrientes (N-NO <sub>3</sub> y P-PO <sub>4</sub> , mg/L) durante la fase de cultivo batch para la microalga T-Iso .....	62
15	Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) en sistema de cultivo tipo batch para la microalga T-Iso .....	62
16	Irradiancia promedio (Iav) (a), y Eficiencia fotosintética (b) de la microalga T-Iso .....	63
17	Correlación entre, a) concentración de biomasa (Cb) y la irradiancia promedio (Iav), y b) productividad de biomasa (Pb) respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ).....	65
18	Concentración de biomasa (Cb), fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) y relación nitrógeno-fosforo (N/P) en el estado estacionario en la modalidad batch y semicontinuo.....	68
19	Concentración y productividad de biomasa en estado estacionario de los tratamientos semicontinuo .....	69
20	Parámetros de cultivo (Fv/Fm y Ka) del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.....	70
21	Eficiencia fotosintética del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.....	71
22	Irradiancia promedio (Iav) del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.....	71
23	Concentración (mg/mL) de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados detectados en la biomasa de <i>Tisochrysis lutea</i> en batch y semicontinuo (20 y 30%).....	73

## RESUMEN

Las microalgas son organismos fotosintéticos capaces de aprovechar la luz, el dióxido de carbono y los nutrientes para producir biomasa rica en compuestos de interés biológico como proteínas, lípidos, ácidos grasos, carbohidratos, entre otros, ampliamente utilizados en la alimentación humana y animal, especialmente en la acuicultura. Hoy en día, el cultivo biotecnológico de microalgas ha dado paso al empleo de estrategias de cultivos a través de fotobiorreactores, los cuales permiten optimizar y controlar las condiciones de cultivo de las microalgas, mejorar la producción de biomasa y metabolitos, aprovechar eficientemente la luz y los nutrientes, y favorecer el cultivo de microalgas al interior o al exterior. En el presente estudio se evaluó el crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en un fotobiorreactor tubular y columnas de burbujeo instalados en invernaderos en la Estación Experimental Las Palmerillas, Almería, España. La microalga empleada en esta investigación es una microalga marina flagelada ampliamente utilizada como alimento vivo en la acuicultura y nutrición humana, debido a la presencia de compuestos de alto valor agregado como proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, pigmentos y otros. Para el cultivo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en el fotobiorreactor tubular (PBR-T) y fotobiorreactores de columna de burbujeo (PBR-BC) se empleó un medio de cultivo fertilizante en volúmenes de aproximadamente 3000 L y 100 L respectivamente, aprovechando la luz solar, control de pH a 8.0 y temperatura a 25 °C. Se monitoreó principalmente la concentración y productividad de biomasa, consumo de nutrientes, fluorescencia de clorofilas, irradiancia promedio dentro del reactor (lav), composición bioquímica y ácidos grasos presentes en la biomasa producida, entre otros parámetros. Los principales resultados obtenidos tras el cultivo de T-Iso en PBR-T muestran que la microalga alcanzó en ~8 días de cultivo concentraciones de biomasa (Cb) cercanas a ~1 g/L, una velocidad máxima de crecimiento 0.4 días<sup>-1</sup>, productividad de biomasa (Pb) próxima a los 0.16 g/L-día y valores de fluorescencia de las clorofilas (Fv/Fm) ~0.6 en la modalidad batch. Sin embargo, tras el cultivo de la microalga en continuo se observaron mejoras en la Cb y Pb, Fv/Fm, eficiencia fotosintética e incrementos en los valores de lav. Se reportaron incrementos y las cantidades máximas de lípidos (~37%) y proteínas (~45%) en continuo, en comparación con el cultivo estático o batch. Adicionalmente, se detectaron incrementos en el contenido de ácidos grasos saturados (SFA), e insaturados (USFA) en cultivos continuos. Por otro lado, entre los principales resultados alcanzados tras el cultivo de T-Iso en PBR-BC se reporta que la microalga alcanzó en aproximadamente 8 días de cultivo concentraciones de biomasa (Cb) cercanas a ~0.8 g/L, una velocidad máxima de crecimiento 0.1 días<sup>-1</sup>, productividades de biomasa (Pb) próximas a los 0.1 g/L-día y valores de fluorescencia de las clorofilas (Fv/Fm) cercanos a los 0.6 en la modalidad batch. Sin embargo, se observaron mejoras en los valores de Cb y Pb, Fv/Fm, eficiencia fotosintética e incrementos en los valores de irradiancia promedio dentro del reactor (lav) cuando la microalga se cultivó en la modalidad semicontinuo empleando tasa de dilución en PBR-BC. Se reportaron incrementos en las cantidades máximas de lípidos (~34%) y carbohidratos (~23%) en comparación con cultivo estáticos o batch. Por otro lado, se detectaron incrementos en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), e insaturados (USFA) en cultivos semicontinuos. Estos resultados demuestran el efecto de la modalidad de cultivo sobre el crecimiento de *Tisochrysis lutea* (T-Iso), parámetros de cultivo (Fv/Fm, lav, otros), producción de biomasa, lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, siendo una herramienta de gran utilidad para el aprovechamiento de la biomasa microalgal.

# CAPÍTULO

# I

## CAPÍTULO 1. ASPECTOS GENERALES DE LA TESIS

### 1.1 Antecedentes del problema.

Existe un creciente interés global por nuevas fuentes alternativas de alimento que no compitan con los existentes, con lo cual conlleva a enfocar nuestra atención hacia especies de organismos con potencial biotecnológico y que pueda ofrecer mayores beneficios. Entre el grupo de organismo capaz de hacerle frente a problemas actuales están las microalgas, debido a que poseen ventajas sobre otros organismos tales como plantas (Hannon, Gimpel, Tran, Rasala y Mayfield, 2010), bacterias y hongos (Andrade Domínguez y otros, 2012).

Las microalgas son catalogadas como una fuente prometedora de compuestos de interés biológico con diversas aplicaciones. Éstas representan la primera base nutricional en la cadena alimentaria acuática, debido a su capacidad para utilizar luz solar, dióxido de carbono y nutrientes para producir moléculas orgánicas de interés (Vinayak y otros, 2015; Fuentes-Grünwald, Garcés, Alacid, Rossi y Camp, 2012). Actualmente, se conoce que las microalgas contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos, muchos de los cuales tienen aplicaciones comerciales en productos farmacéuticos, cosméticos, nutracéuticos, alimentos para humanos o animales (Kelman y otros, 2012). El uso de microalgas para el consumo humano se ha incrementado en las últimas décadas (Sun, Wang, Guo, Pu y Yan, 2014), debido a su impacto positivo sobre la salud humana (Rajasekaran, Sivagnanam y Xavier, 2008), lo cual se refleja en la tendencia de los consumidores, que han intensificado el uso de productos derivados de microalgas dirigidos a la promoción de la salud, así como al tratamiento frente a enfermedades crónicas (Bishop y Zubeck, 2012).

El cultivo de algas inició aproximadamente en el año 531, a partir de los primeros registros de colecta de *Porphyra* (Pulz y Gross, 2004). Existen reportes que indican que las microalgas fueron empleadas como alimento en México durante la civilización azteca (Koru, 2012). Bernal Díaz del Castillo, miembro de las tropas de Hernán Cortez, recolectó *Spirulina* del lago de Texcoco en México (Sánchez, Castillo, Roza y Rodríguez, 2003). De acuerdo con Hallmann (2007), alrededor de  $10^7$  toneladas de algas se cosechan cada año por las industrias de biotecnología de algas para diferentes propósitos, y alrededor de 60 empresas comerciales están vendiendo algas o productos de algas en todo el mundo, lo

que indica que las microalgas han ganado la atención del mundo científico, como se muestra en diversos estudios, por su capacidad bioquímica y fisiológica (Barra, Chandrasekaran, Corato y Brunet, 2014).

La mejora de las técnicas de cultivo de microalgas permitió la expansión y el desarrollo de éstas para su uso en la acuicultura (Stottrup y McEvoy, 2003). Las microalgas se utilizan ampliamente en la acuicultura, en la producción biotecnológica de productos de alto valor, para camarones y peces (Borowitzka, 1992). Se sabe que algunas especies de microalgas que contienen alto contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos, son considerados como ingredientes alimenticios de gran importancia (Sen Roy y Pal, 2015). El contenido de proteínas y vitaminas es un factor importante que determina el valor nutricional de las microalgas (Hemaiswarya, Raja, Kumar, Ganesan y Anbazhagan, 2011), al igual que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) derivados de microalgas, como por ejemplo, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA),  $\alpha$ -ácido linolénico (ALA) y ácido araquidónico (AA), se han reportado que son esenciales para diversas larvas (Hemaiswarya y otros, 2011; Sargent, McEvoy y Bell, 1997), sin embargo, existen especies de microalgas que son ampliamente utilizadas en acuicultura debido a la composición de su biomasa. Dentro de las microalgas, se ha informado que las diatomeas poseen un gran potencial biotecnológico en la acuicultura, debido a la capacidad de ciertas especies de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (por ejemplo, EPA y DHA) (Xing, Wang, Cao y Chang, otros, 2007; Guedes, Amaro y Malcata, 2011a). Se ha encontrado que el EPA, juega un papel importante, como precursor de un grupo de eicosanoides que son cruciales en el desarrollo y regulación de muchos procesos fisiológicos (Hemaiswarya y otros, 2011).

Dada la situación que atraviesa la población mundial, existe un creciente interés por la inclusión de recursos marinos en la dieta del hombre, por lo cual es necesario incrementar la producción de éstos, a fin de suplir los requerimientos de la población mundial (García García, Rouco y García, 2001). La pesca de captura y la acuicultura proporcionan a unos 3 000 millones de personas, cerca del 20 % de la ingestión media de proteínas de origen animal per capita y a otros 1 300 millones de personas constituye el 15 % de su ingestión per capita (HLPE, 2014). Recientes reportes indican que la proporción de personas que se dedicaban a la pesca de captura disminuyó del 83% en 1990 al 68% en 2016, mientras que la de las personas que se dedicaban a la acuicultura aumentó en consecuencia del 17% al 32% (FAO, 2018).

Según estadísticas recopiladas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA, o más conocida como FAO, en 2018, la producción mundial de pescado de la acuicultura alcanzó 82,1 millones de toneladas, 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26 000 toneladas de conchas marinas ornamentales y perlas ornamentales, lo que eleva el total a un máximo histórico de 114,5 millones de toneladas (FAO, 2020). Éste reporte informa en valores per cápita, el consumo de pescado comestible aumentó de 9,0 kg (equivalente en peso vivo) en 1961 a 20,3 kg en 2017, a una tasa media de alrededor del 1,5% anual, mientras que el consumo total de carne creció un 1,1% por año en el mismo período. Las estimaciones preliminares del consumo de pescado per cápita en 2018 se sitúan actualmente en 20,5 kg (FAO, 2020).

En Panamá, la acuicultura constituye una práctica que data de décadas y se percibe como una actividad sostenible para la seguridad alimentaria y la nutrición. De acuerdo a cifras preliminares del Instituto de Estadística y Censo (INEC) de la Contraloría General de la República de Panamá en 2017, existían 22 fincas destinadas al cultivo de camarones marinos en las provincias de Coclé (15), Herrera y Los Santos (4), Panamá y Veraguas (3). Según el reporte, por motivos de confidencialidad estadística no se pueden separar los datos de las provincias de Herrera y Los Santos, Panamá Oeste y Veraguas. Adicionalmente este informe detalla la evolución del sector acuícola en la República para el 2017, reportándose un aumento de 8.5 % (9,376,733 kilos) en los camarones cosechados en relación con el 2015 (8,646,014 kilos). Las ventas fueron de 8,928,330 kilos, de los cuales el 13.2 % fueron locales y 86.8 % al exterior, mientras que el gasto realizado en remuneraciones fue de 7,440,586 millones de USD y en otros gastos 41,529,962 millones de USD, lo que reflejó un aumento de 1.2 % y 11.3 %, respectivamente. Por otro lado, el cultivo de peces fue realizado por 54 fincas, de las cuales se cosecharon 1,671,940 kilos de peces, la venta de los mismos fue de 907,602 kilos, correspondiente a 6.3 % a la venta local y 93.7 % a ventas al exterior. Los ingresos obtenidos fueron de 12,696,948 millones de USD, lo que representó un descenso de 22.5 % con relación al 2015.

En una entrevista realizada por Tejera (2019) a Flor Torrijos, administradora de la ARAP, se señala que los efectos del cambio climático y la sobrepesca han mermado el recurso marino local, conduciendo a que la producción pesquera registre, en lo que va del año, una caída del 40% y para revertir este descalabro en la actividad pesquera, la industria le apuesta a la acuicultura. Según este reporte, Panamá tiene el agua perfecta para

desarrollar la maricultura y en los próximos ocho años, en el país se invertirán más de 55 millones de USD en el cultivo de cobia, bojalá, tilapia, algas marinas, conchas perlíferas, atún aleta amarilla, pargo de la mancha y pámpano, en granjas marinas. En marzo de 2020, la Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP) informó que las estadísticas de exportación en la industria pesquera y en la acuicultura presentaron resultados positivos en productos como camarones con 4.4 millones de USD con un incremento del 45 %, harina y el aceite de pescado con 13.3 millones de USD con un incremento del 200 % (Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá [ARAP], 2020).

La industria mundial de la acuicultura se ha convertido en una industria importante que produce alimentos saludables y proporciona empleo e ingresos en muchos países desarrollados y en desarrollo (Olsen y Hasan, 2012). Según estadísticas de la FAO en el año 2009, aproximadamente 66 millones de toneladas (70%) de los peces silvestres recolectados se usaron directamente para el consumo humano, mientras que 23 millones de toneladas (30%) se usaron para fines no alimentarios después de convertirse en harina y aceite de pescado (FAO, 2011). La industria de alimentos para acuicultura generalmente depende del uso de harina de pescado, ya que es una fuente importante de proteínas y contiene importantes vitaminas, minerales y nutrientes (ácidos grasos) (Dawood, Koshio, Ishikawa y Yokoyama, 2015). Reportes indican que el precio mundial de la harina de pescado osciló entre 500 USD y 700 USD por tonelada durante el período 2000-2005 (Rana, Siriwardena y Hasan, 2009), pero desde 2002, el precio promedio se duplicó a aproximadamente 1,200 USD por tonelada en 2009 (Olsen y Hasan, 2012). De acuerdo al IndexMundi (2019) (Disponible en: [www.indexmundi.com](http://www.indexmundi.com)) la clasificación de productores de harina de pescado es liderada por Perú (890 TM = toneladas métricas), Vietnam (460 TM), la Unión Europea (UE-27) (450 TM), Chile (360 TM) y China (350 TM). Ésta misma dirección web reporta que el precio promedio mensual de la harina de pescado entre noviembre de 2019 y abril de 2020 osciló entre 1,360.00 y 1,390.00 USD por tonelada métrica, siendo la empresa peruana Tecnológica de Alimentos (TASA) la principal con una producción estimada de 230,000 toneladas por año. Ésta empresa reporta en su dirección web (<http://www.tasa.com.pe/>) para Junio de 2020 una producción acumulada de 3 743,581 TM de harina de pescado y 747,194 TM de aceite de pescado.

En nuestro país, según datos de la Contraloría General, el comportamiento de algunas actividades económicas durante el primer semestre de 2017, en comparación con el mismo período de 2016 registra un decrecimiento en la producción harina de pescado

(14.6%) y aceite de pescado (38.7%). Éstos reportes mostraron para el primer semestre 2016 una producción de 12,514 TM de harina de pescado y 5,675 TM de aceite de pescado, mientras que para el primer semestre 2017 se produjeron 10,684 TM de harina de pescado y 3,480 TM de aceite de pescado de las cuales se emplearon 56,806 TM y 44,867 TM de pescado para la obtención de estos rubros. Resultados similares fueron observados entre el 2014 y 2015, reportándose una disminución en cuanto a la producción de harina de pescado (22.5 %) y aceite de pescado (38.5 %).

Se ha referenciado que el alimento para peces representa principalmente el 60% del costo total del sistema de cultivo (Essa, Mabrouk y Zaki, 2004). Diversos estudios indican que la producción total de piensos compuestos para uso industrial aumentó más de tres veces, de 7.6 millones de toneladas en 1995 a 29.2 millones de toneladas en 2008, de los cuales se estima que el sector de la acuicultura consumió 3.72 millones de toneladas de harina de pescado (60.8 % de la producción mundial de harina de pescado) y 0.78 millones de toneladas de aceite de pescado (73.8 % de la producción mundial de aceite de pescado) pero se espera que para el 2020 este consumo disminuya (Tacon, Hasan y Metian, 2011). Estos autores sugieren que las razones de esta disminución se asocian principalmente a mayor uso de peces de alimentación directamente para el consumo humano y la disminución en la captura de peces de alimentos dedicados debido a ajustes de cuotas más estrictos y controles más estrictos sobre la pesca no regulada, así como al mayor uso de sustitutos de harina de pescado dietéticos más rentables.

La alta demanda de la cantidad limitada de harina de pescado disponible junto con las variaciones naturales en el suministro se ilustra en los aumentos de precios durante las últimas dos décadas (Olsen y Hasan, 2012). Los precios de los alimentos y los ingredientes para piensos han aumentado y es probable que sigan subiendo debido a las crecientes demandas de una población en aumento, el desvío de algunos granos para su uso en biocombustibles, el aumento de los costos de producción, transporte y los cambios en el comercio mundial debido a la demanda de alimentos y materias primas (Tacon y otros, 2011). Numerosos grupos de investigación de todo el mundo están preocupados porque se espera que la producción acuícola continúe aumentando a corto plazo. Esto se traducirá en una mayor presión de la pesca sobre las poblaciones silvestres para suministrar harina de pescado y aceite de pescado, lo que amenaza la sostenibilidad de la actividad acuícola (Taelman, De Meester, Roef, Michiels y Dewulf, 2013). Algunos estudios se han llevado a cabo con el uso de proteínas a partir de organismos como

bacterias, levaduras o microalgas para reemplazar la harina de pescado en la alimentación acuícola (Tacon, Hasan y Subasinghe, 2006).

La producción a escala comercial de biomasa de algas podría ser una alternativa viable a la harina de pescado y al aceite de pescado en la acuicultura ya que el principio de alimentación de pescado a pescado utilizado en la acuicultura es insostenible porque se necesita más de 1 kg de pescado para producir 1 kg de pescado criado en granjas (Taelman y otros, 2013). Es en estos escenarios donde las microalgas juegan un papel fundamental como una fuente de alimento vivo rica en diversos componentes de interés como proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, antioxidantes, vitaminas, entre otros. Las microalgas pueden producirse en serie mediante diversas técnicas y la producción total se estima en alrededor de 10,000 toneladas por año (Richmond, 2004). La producción de microalgas implica la utilización de sistemas de cultivos apropiados que favorezcan la obtención de biomasa. La mayoría de los sistemas de cultivo de algas se pueden describir como fotobiorreactores (FBRs en español, PBRs en inglés) abiertos o cerrados, de los cuales los sistemas cerrados, por ejemplo, fotobiorreactores tubulares (PBR-T), fotobiorreactores de panel plano (Flat-panel) y fotobiorreactores de columna (PBR-BC) son los más conocidos (Taelman y otros, 2013). En la actualidad se emplean diversos sistemas de cultivos de microalgas, entre ellos se encuentran los sistemas de cultivo abiertos (raceways), los cuales en comparación con los fotobiorreactores cerrados, representan una herramienta económica barata para la producción de biomasa de algas a gran escala (Brennan y Owende, 2010). Generalmente, los reactores tubulares son adecuados para cultivos al aire libre, son relativamente baratos, tienen una gran superficie de iluminación y significativas productividades de biomasa (Ugwu, Aoyagi y Uchiyama, 2008). Por ello, la optimización de las condiciones de cultivo de las microalgas son factores de mucha importancia, ya sea para su aplicación a pequeña escala o a gran escala, porque constituye un punto de gran relevancia para la producción de biomasa de calidad y alto perfil nutricional, para su empleo como alimento vivo en acuicultura.

## **1.2 Situación Actual o estado actual del problema**

### **1.2.1 Planteamiento del problema.**

*¿Cómo obtener una fuente alternativa de alimento vivo rica en proteínas y ácidos grasos esenciales para ser empleado en la acuicultura?*

Actualmente, es indudable el impacto provocado por el cambio climático en los distintos ecosistemas. Esto se traduce en una respuesta directa de nuestro entorno a tales condiciones no favorables al desarrollo y conservación del mismo. La búsqueda de fuentes alternativas de recursos alimentarios y energéticos representa una de las grandes tendencias en la actualidad. Desde hace varias décadas, se considera que el uso de microorganismos con gran potencial biotecnológico constituye una fuente alternativa para los requerimientos actuales de la población mundial, y es en este escenario donde surge el papel determinante del uso de las microalgas. Tal vez para muchos poco conocidas, sin embargo actualmente es innegable el rol que juegan este tipo de microorganismos fotosintéticos en la solución de problemáticas globales. Se considera a las microalgas una de las principales productoras de oxígeno del planeta, a la vez poseen la capacidad de fijar gases de efecto invernadero tales como dióxido de carbono de la atmósfera. Estos microorganismos son considerados una gran alternativa a las actuales limitaciones de alimento para animales así como para humanos.

En esa dirección, la producción de microalgas para su uso como alimento vivo en acuicultura es una realidad. Se conoce el potencial que ofrece la biomasa a partir de microalgas en cuanto a composición bioquímica y productos de alto valor agregado, representando una variable en la producción acuícola, debido a la importancia de satisfacer los requerimientos nutricionales de la población que se incrementa velozmente y con ello, surge la necesidad de producir alimento de manera sostenible.

En el ambiente económico, la acuicultura constituye un recurso de gran importancia, debido a que se torna una fuente de empleo y divisas. La acuicultura tiene mucho potencial de disminuir la sobrepesca y de dar ingreso y subsistencia a áreas empobrecidas (Samudio y Heckadon-Moreno, 2009), generando socioeconómicamente un impacto positivo al país. Por otro lado, la producción de harinas y aceites de pescado empleados para la nutrición animal (acuicultura) sufre hoy en día una disminución en la producción debido a las limitaciones que se encuentran a partir de la materia prima. Este hecho ha provocado que diversas investigaciones se enfoquen en la búsqueda de recursos alternativos que no compitan con otros productos básicos de la población como lo son las microalgas. Hoy en día se cuentan con sistemas de producción de microalgas eficientes como los son los fotobiorreactores que permiten la obtención de biomasa microalgal libre de patógenos y con un gran potencial nutricional. Por tal razón, este proyecto planteó producir biomasa de microalgas en fotobiorreactores como una fuente

alimenticia rica en compuestos de gran potencial para su aplicación futura en acuicultura especialmente durante el desarrollo larvario de peces, crustáceos, moluscos u otros organismos.

### **1.3 Supuesto (s) General (es) o Hipótesis.**

¿Constituye la biomasa de *Tisochrysis lutea* producida en fotobiorreactores una fuente de alimento vivo rica en proteínas, carbohidratos y ácidos grasos con aplicaciones en la acuicultura?

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo General.**

- Producir biomasa de *Tisochrysis lutea* en fotobiorreactores como una fuente de alimento vivo para la acuicultura.

#### **1.4.2 Objetivo (s) Especifico (s)**

- Establecer las condiciones para el cultivo biotecnológico de la microalga *Tisochrysis lutea*.
- Evaluar la productividad, acumulación de biomasa y parámetros fotosintéticos de la microalga en los fotobiorreactores.
- Valorar el efecto del empleo de tazas de dilución en la optimización y producción continua del cultivo de la microalga.
- Analizar el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos presente en la biomasa producida.
- Identificar los principales ácidos grasos presentes en la biomasa microalgal por cromatografía de gases/FID.

### **1.5 Delimitación, Alcance o Cobertura.**

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo principalmente en la Estación Experimental Las Palmerillas, Universidad de Almería, España durante una estancia de investigación de tres meses (18 enero al 18 de abril de 2017). Dicha estancia fue auspiciada por la SENACYT a través del proyecto APY-GC-2016-035 correspondiente al programa de Generación de Capacidades Científicas y Tecnológicas. El Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández, catedrático de la Universidad de Almería, supervisó la pasantía. Se realizaron cultivos de microalgas al exterior en fotobiorreactores tubulares y columnas de burbujeo, con la finalidad de producir biomasa con potencial nutricional con aplicaciones futuras en la acuicultura. Esta investigación favoreció la obtención de conocimientos y transferencia de tecnologías lo que sería de gran utilidad para la investigación y el sector acuícola en Panamá.

### **1.6 Restricciones y/o Limitaciones.**

Este proyecto buscaba generar conocimientos y experiencias en la obtención de un nuevo producto de consumo animal en la acuicultura empleando microalgas, debido a que constituyen una alternativa viable para la obtención de productos potenciales. Sin embargo, fue necesario desarrollar este proyecto dentro del marco de colaboración entre Instituciones que estén ensayando tecnologías para la producción de microalgas, como es el caso de la Universidad de Almería, España, que posee una gran trayectoria en el cultivo de microalgas a gran escala empleando fotobiorreactores. En nuestro país resulta escaso encontrar una estación experimental con diversos tipos de fotobiorreactores (tubulares, raceways, capa fina, columnas de burbujeo entre otros) enfocados en la producción de microalgas a escala industrial, lo que representó una de las principales limitantes de este proyecto.

# CAPÍTULO

## II

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ¿Qué son las microalgas?

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos que se encuentran tanto en ambientes marinos como de agua dulce (Priyadarshani y Rath, 2012). Estas son consideradas la base de la cadena alimentaria en los ecosistemas acuáticos y con la ayuda de la energía solar, pueden utilizar el agua y dióxido de carbono para sintetizar compuestos orgánicos, acumularlos y secretar muchos metabolitos de interés (Guedes, Amaro y Malcata, 2011b; Tandeau-de-Marsac y Houmard, 1993; León, Martín, Vígara, Vílchez y Vega, 2003). El mundo de las microalgas presenta una rica biodiversidad caracterizada por diferentes rasgos biológicos, ecológicos y funcionales (Barra y otros, 2014). Las microalgas combinan, de manera equilibrada, algunas propiedades típicas de las plantas superiores (fotosíntesis, simples requerimientos nutricionales) con atributos biotecnológicos (tasas de crecimiento rápido y capacidad de acumular o secretar compuestos de gran importancia) (Guedes y otros, 2011a).

Las microalgas muestran un alto grado de biodiversidad y se consideran una de las fuentes más prometedoras para nuevos productos y aplicaciones (Pulz y Gross 2004). Las grandes ventajas de las microalgas son que no requieren tierra fértil o alta calidad de agua (Santos-Sánchez y otros, 2016). Además, las microalgas no compiten por los alimentos o el agua destinados al consumo humano, ya que se pueden cultivar en agua salobre (Demirbas, 2008) y agua de mar (Singh y Olsen, 2011). Sin embargo, al obtener compuestos bioactivos, es preferible utilizar un medio de cultivo con una composición química definida y en ausencia de microorganismos que compitan por los nutrientes (Santos-Sánchez y otros, 2016). Las microalgas pueden duplicar su biomasa entre 2 a 5 días en promedio y alcanzar altos rendimientos sin la aplicación de pesticidas, herbicidas o fungicidas (Costa y de Morais, 2011). Éstas a su vez contribuyen significativamente a reducir el efecto invernadero debido a su capacidad de biofijación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Wang, Li, Wu y Lan, 2008; Brennan y Owende, 2010). Además pueden usar la energía solar de manera eficiente para transformar las aguas residuales, el excedente de CO<sub>2</sub> y posiblemente algunos nutrientes adicionales en una biomasa verde rica en lípidos, azúcares, proteínas, carbohidratos y otros compuestos orgánicos valiosos (Batista, Gouveia, Bandarra, Franco y Raymundo, 2013). Estos microorganismos convierten

sustancias inorgánicas como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, hierro y oligoelementos en materia orgánica como verde, azul, rojo, marrón y otros colores de biomasa (Batista y otros, 2013). Por lo tanto, las condiciones de crecimiento podrían optimizarse para maximizar la producción de las biomoléculas de interés (Batista y otros, 2013). Debido a que las algas deben adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones ambientales para sobrevivir, producen una gran variedad de metabolitos secundarios con estructuras que no se pueden encontrar en otros organismos (Gouveia, Marques, Sousa, Moura y Bandarra, 2010). Dependiendo de las especies de microalgas es posible obtener a partir de la biomasa microalgal una gran variedad de compuestos de alto valor agregado como lo son pigmentos, polisacáridos, triaglicéridos, ácidos grasos y vitaminas, que también se utilizan comúnmente como productos a granel y productos químicos especializados en diferentes sectores industriales (por ejemplo, productos farmacéuticos, cosméticos, nutracéuticos, alimentos funcionales, acuicultura, biocombustibles) (Cuellar-Bermudez y otros, 2014) (Cuadro 1).

#### Cuadro 1

Especies de microalgas ricas en compuestos de alto valor y sus aplicaciones (Cuellar-Bermudez y otros, 2014; Batista y otros, 2013; Borowitzka, 2013; Casal y otros, 2011; Guedes y otros, 2011a; Pulz y Gross, 2004; Spolaore y otros, 2006; Sørensen y otros, 2013)

Especies	Producto	Áreas de aplicación
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasa y pigmentos	Comida sana, suplemento alimenticio
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoides, $\beta$ -caroteno	Alimentos saludables, complementos alimenticios, piensos.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenoides, astaxantina, cantaxantina, luteína	Alimentos saludables, productos farmacéuticos, aditivos para piensos.
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos grasos, carotenoides, fucoxantina	Productos farmacéuticos, nutrición, cosmética, nutrición animal.
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Ácido eicosapentanoico (EPA)	Productos farmacéuticos, nutrición.
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Lípidos, ácido eicosapentanoico, ácidos grasos	Nutrición, producción de combustible.
<i>Porphyridium cruentum</i>	Ácido araquidónico (ARA), polisacáridos	Productos farmacéuticos, cosmética, nutrición.
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Luteína, $\beta$ -caroteno	Productos farmacéuticos, nutrición, cosmética.
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina, ácido $\gamma$ -linolénico, biomasa rica en proteínas	Comida sana, cosmética.

## 2.2. Las microalgas: Fuente de nutraceuticos y alimento

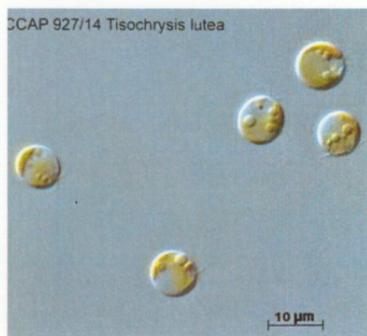
Los nutraceuticos son nutrientes de los alimentos o productos alimenticios que no sólo complementan la dieta, sino también facilitan la prevención o tratamiento de enfermedades y/o trastornos (Kalra, 2003). Hay más de 470 productos alimenticios nutraceuticos y funcionales disponibles en el mercado con beneficios para la salud (Eskin y Tamir, 2006). Actualmente, se considera a este grupo de microorganismos un recurso sin explotar, siendo una importante fuente de compuestos bioactivos de alto valor, además de productos bioquímicos tales como pigmentos, antioxidantes, polisacáridos, esteroides, ácidos grasos y vitaminas (Mata, Martins y Caetano, 2010). Su alto contenido proteico, aminoácidos, hidratos de carbono, pigmentos, ácidos grasos de la familia de los omega 3 y omega 6 y presencia de vitaminas esenciales (por ejemplo, A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico), hacen de las microalgas una fuente no convencional que contribuiría a mejorar el estado nutricional de alimentos y por lo tanto la salud de seres humanos y animales (Becker, 2004; Jin, Polle, Lee, Hyun y Chang, 2003; Cornet, 1998; Soletto, Binaghi, Lodi, Carvalho y Converti, 2005).

Al ser una rica fuente de nutrientes esenciales, son considerados alimentos de gran importancia, especialmente en los países asiáticos como China, Japón y Corea (Priyadarshani y Rath, 2012). Microorganismos tales como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, y *Schizochytrium* son clasificados como fuentes de alimento debido a que se incluyen como categoría GRAS (Generally Regarded as Safe, Generalmente Considerado como Seguro) por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration-FDA) y cada día van ganando una mayor aceptación en el mercado de alimentos saludables (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha llamado a la *Spirulina* uno de los más grandes súper alimentos de la tierra y la NASA la considera como una excelente comida compacta para el viaje espacial, ya que en una pequeña cantidad de esta biomasa es posible encontrar una amplia gama de nutrientes (Khan, Bhadouria y Bien, 2005). Es por ello que hoy en día, se ha incorporado en galletas, barras nutricionales, fideos, y otros productos alimenticios funcionales (Pulz y Gross, 2004). Por otro lado, se ha reportado que células de *Chlorella* contienen 1,3-β-glucano, un inmunoestimulante activo, que actúa como agente depurador de radicales libres y reductor de lípidos en sangre (Becker, 2004). De igual forma se han encontrado algunos polisacáridos extracelulares que poseen actividad antitumoral (Sun, Wang y Zhou, 2012; Iwamoto,

2004). *Dunaliella* es conocida por su capacidad de producir altas concentraciones de carotenoides, especialmente  $\beta$ -caroteno, empleado como nutracéutico o ingrediente alimentario (Vílchez y otros, 2011), debido a su actividad provitamínica A (Graham y Rosser, 2000), mientras que *Haematococcus* produce un carotenoide conocido como astaxantina (Christaki, Bonos, Giannenas, Florou-Paneri, 2013), considerado un potente antioxidante (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010).

### 2.3. *Isochrysis* o *Tisochrysis*

Las microalgas doradas son organismos flagelados unicelulares y al igual que las diatomeas, producen altas cantidades de lípidos (Santos-Sánchez y otros, 2016). Estos microorganismos se encuentran en cuerpos de agua dulce y salada, como ríos, lagos y estanques, y representan un grupo de aproximadamente 1000 especies divididas en 120 géneros (Khan, Rashmi, Hussain, Prasad y Banerjee, 2009).



**Figura 1.** *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14, Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (Culture Collection of Algae and Protozoa-CCAP, Escocia, Reino Unido).

*Isochrysis galbana* es una de las especies de la orden *Isochrysidales*, perteneciente a la división haptophyta (phylum) y fue identificada por primera vez por Bruce, Knight y Parke en 1939, *Isochrysis galbana* es una célula ovoide bastante pequeña ( $2\text{--}5\ \mu\text{m}$ ;  $40\text{--}50\ \mu\text{m}^3$ ) con dos flagelos apicales lisos (Hubert y otros, 2017). Cepas de *Isochrysis* (T-Iso y Parke) se describieron y estudiaron ampliamente reportando que *Isochrysis affinis galbana*, comúnmente designada como T-Iso, era un clon tahitiano co-específico con *I. galbana* Parke que se origina en las zonas templadas (Hubert y otros, 2017). En relación con su origen, T-Iso es capaz de adaptarse a un rango mucho más amplio de condiciones de

temperatura y luz comparado con *I. galbana* Parke (Ewart y Pruder, 1981; Tzovenis, De Pauw y Sorgeloos, 2003a). Bendif, Probert, Schroeder y Vargas (2013), emplearon genes que codifican una pequeña subunidad ribosomal del ARN (SSU ARNr) como marcadores filogenéticos moleculares, concluyendo que la distancia genética entre T-Iso y *I. galbana* es suficiente para elevar a T-Iso como un nuevo género. Este género se llamó *Tisochrysis lutea* en referencia al nombre anterior de la cepa y al color amarillo de las células (Hubert y otros, 2017), al igual que en la misma área, *Pseudoisochrysis paradoxa* también fue renombrada como *Isochrysis galbana*. Diversos autores han descrito para el caso de T-Iso (*Isochrysis aff. galbana* Green) una cepa ampliamente reconocida en acuicultura (De Pauw y Persoone, 1988; Benemann, 1992; Gladue y Maxey, 1994; Borowitzka, 1997) debido a su biomasa que posee un perfil de lípidos deseados, ya sea para uso directo en acuicultura o para la extracción de lípidos para la industria química (Tzovenis, De Pauw y Sorgeloos, 2003b). Resultados sugieren que particularmente *I. galbana* T-Iso, podrían ser una fuente de biomoléculas para la industria farmacéutica y la producción de aditivos alimentarios funcionales debido a que pueden considerarse una alternativa ventajosa frente a otras microalgas producidas actualmente (Custódio y otros, 2013).

#### 2.4. Microalgas en acuicultura

Las aplicaciones comerciales de microalgas se han ampliado en los últimos años para incluir la producción de una amplia gama de moléculas como suplementos nutricionales, antioxidantes, cosméticos, tintes naturales y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Spolaore y otros, 2006) o biodiesel (Schenk y otros, 2008). Las microalgas son beneficiosas en la acuicultura y su producción para la alimentación se divide en monocultivo intensivo, para fases larvares de los bivalvos, camarones, y algunas especies de peces; y cultivos extensivos, empleados para alimentar otros estadios de bivalvos, carpas y camarones (Priyadarshani, Saku y Rath, 2012). De igual forma las microalgas también se emplean como alimento indirecto, en la producción de zooplancton (es decir, artemia y rotíferos) y alimento esencial para varias larvas carnívoras (Welladsen, Kent, Mangott y Li, 2014). Esto refleja la importancia de las microalgas para la nutrición de las larvas durante un breve período, ya sea para consumo directo en el caso de los moluscos y camarones o indirectamente, como alimento vivo para larvas de peces pequeños (Muller-Feuga, 2000).

El suministro de microalgas vivas es esencial en la acuicultura de mariscos, ya que aún no se ha encontrado una alternativa para la sustitución total de dietas vivas (Marchetti y otros, 2017). En consecuencia, los piensos se suministran como dietas de algas mixtas para proporcionar una dieta equilibrada estimada que cumple con los requisitos nutricionales (Marchetti y otros, 2017). La manipulación de algas puede ser una forma relativamente simple de alterar la composición del alimento sin cultivar varias especies, lo que permite al cultivador de algas centrarse en las especies de algas que se sabe tienen altas tasas de ingestión y digestión por bivalvos (Marshall, McKinley y Pearce, 2010) y que son fáciles de cultivar. La viabilidad económica de los sistemas de criadero de peces depende en gran medida del conocimiento mejorado de los requisitos dietarios de las larvas, como los de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA) (Sorgeloos, Dehasque, Dhert y Lavens, 1995). La importancia de dichos PUFAs en la alimentación de larvas de peces marinos se ha racionalizado (Sargent, Bell, Bell, Henderson y Tocher, 1994; Robin, 1995) sobre la base de la incapacidad de éstos para convertir 18:3 n-3 en 20:5 n-3 a tasas suficientemente altas. Como es sabido que el 20:5 n-3 promueve el crecimiento regular y altas tasas de supervivencia de larvas (Volkman, Jeffrey, Nichols, Rogers y Garland, 1989), se insta a su inclusión en la dieta diaria como requisito nutricional estándar.

De acuerdo con Marshall y otros (2010), la nutrición es el principal factor que influye en la supervivencia y el crecimiento de las bivalvas larvales. Actualmente, el suministro constante de microalgas vivas sigue siendo la única fuente de alimento para la cría de larvas de bivalvos en condiciones controladas, ya que no se han desarrollado alimentos sustitutos (Muller-Feuga, Robert, Cahu, Robin y Divanach, 2003; Spolaore y otros, 2006). Los criterios para seleccionar una dieta algal adecuada para larvas de bivalvos se basan en la morfología (especialmente el tamaño), la facilidad de cultivo, la ausencia de toxicidad y la capacidad de las larvas para atrapar, ingerir, digerir y asimilar las algas (Marshall y otros, 2010). La cantidad y calidad de los lípidos tienen fuertes efectos sobre las larvas de bivalvos y el rendimiento postlarvario en términos de supervivencia y crecimiento (Powell, Bochenek, Klinck y Hofmann, 2002; Delaunay, Marty, Moal y Samain, 1993; Nevejan, Courtens, Hauva, Gajardo y Sorgeloos, 2003).

Actualmente, las microalgas se consideran no solo como fuentes de PUFA para la acuicultura, sino también como fuentes importantes de estos micronutrientes para la nutrición humana (Custódio y otros, 2013). Actualmente, las principales fuentes dietéticas humanas de ácidos grasos omega-3 y omega-6 son los aceites de pescado y vegetales,

respectivamente (Simopoulos, 2008). Sin embargo, la disminución de las poblaciones de peces ha aumentado la demanda de fuentes alternativas, y las microalgas pueden ser un suplemento viable de PUFA para la nutrición humana (Custódio y otros, 2013). La mayoría de los animales acuáticos de granja tienen requisitos dietéticos para los ácidos DHA, EPA, ARA, linoleico (C18:2 n-6) y  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3) (Glencross, 2009) debido a que estos ácidos grasos son considerados de gran importancia para el desarrollo de estos organismos.

## 2.5. La luz como nutriente esencial

La luz es la fuente de energía durante la fase de crecimiento fotoautotrófico en la que los organismos utilizan el dióxido de carbono para convertirlo en compuestos orgánicos, especialmente azúcares (Juneja, Ceballos y Murthy, 2013). En los cultivos de microalgas fotoautotróficos, la luz es un factor esencial que afecta la fotosíntesis de las microalgas (Posten, 2009), además de estar directamente relacionada con la productividad de los metabolitos derivados de las microalgas (Kim, Park, Ryu y Lee, 2017). La disponibilidad de luz dentro de un fotobiorreactor es a menudo el cuello de botella en el cultivo de microalgas (Barbosa, Hoogakker y Wijffels, 2003). Éstos mismos autores indican que la intensidad de la luz incidente, la trayectoria de la luz y la concentración de la biomasa determinan el grado de auto-sombra, lo que conduce a un gradiente de luz dentro del reactor que determina la productividad del reactor. El proceso de fotoadaptación-fotoaclimatación en algas conduce a cambios en las propiedades celulares según la disponibilidad de luz y un aumento en la eficiencia fotosintética (Dubinsky, Matsukawa y Karube, 1995). Mock y Kroon (2002) afirman que las algas superan la limitante de la luz, mediante la desaturación de las membranas de cloroplastos, sin embargo un aumento de la intensidad de la luz por encima de los límites de saturación provoca la fotoinhibición (You y Barnett, 2004; Gordillo, Goutx, Figueroa y Niell, 1998) que conduce a la inactivación de las enzimas involucradas en la fijación de dióxido de carbono (Iqbal y Zafar, 1993). Estos hechos afirman el impacto de la luz como nutriente, que afecta el crecimiento de las microalgas así como los procesos fotosintéticos que se asocian a la acumulación de ciertos metabolitos. Se ha reportado que la composición de ácidos grasos se ve afectada por el nivel de irradiancia (Guihéneuf, Mimouni, Ulmann y Tremblin, 2008), en donde las condiciones de luz que favorecen la mayor proporción de ácidos grasos esenciales son específicas de cada especie (Thompson, Harrison y Whyte, 1990).

## 2.6. Nutrientes y composición bioquímica de las microalgas

El carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio son elementos necesarios para el crecimiento de las microalgas (Juneja y otros, 2013). Elementos traza o micronutrientes como el hierro, manganeso, cobalto, zinc, boro, cobre y molibdeno se requieren en pequeñas cantidades entre 2.5 a 30 ppm (Walker, 1954). Deficiencias en la cantidad micronutrientes pueden limitar el crecimiento de algas, mientras que altas concentraciones de metales (por encima del umbral de toxicidad) pueden inhibir el crecimiento, deteriorar la fotosíntesis, agotar los antioxidantes y dañar la membrana celular (Juneja y otros, 2013). Numerosos estudios indican que la disponibilidad de nutrientes puede regular el crecimiento y la composición bioquímica de las algas (Qin y Culver, 1996; Johansson y Graneli, 1999). Elementos como nitrógeno (N) y el fósforo (P) son considerados componentes principales que limitan la productividad de biomasa (Villar-Argaiz y Sterner, 2002). Éstos son considerados elementos esenciales para el metabolismo de las algas, ya que su deficiencia puede afectar la síntesis bioquímica en algas (Kilham, Kreeger, Goulden y Lynn, 1997), especialmente el contenido de lípidos (Sharma, Schuhmann y Schenk, 2012). La composición bioquímica y de ácidos grasos de una especie dada de fitoplancton puede modificarse según su fase de crecimiento (Brown, Garland, Jeffrey, Jameson y Leroi, 1993), sistema de cultivo (Ponis y otros, 2006) y condiciones de crecimiento, es decir, nutrientes, temperatura, irradiancia y calidad de luz (Sukenic y Wahnon, 1991; Mortensen, Borsheim, Rainuzzo y Knutsen, 1988; Wikfors, Twarog y Ukeles, 1984). La tasa de crecimiento y la composición bioquímica de los cultivos de microalgas pueden modificarse, dependiendo de la especie de microalga (Correa-Reyes, Sánchez, Siqueiros y Flores, 2001), la técnica de cultivo (Andersen, 2005), tiempo de cultivo (Liang, Beardall y Heraud, 2006) y los factores ambientales, incluidas la irradiancia de la luz y las características espectrales (Dubinsky y otros, 1995; Tzovenis y otros, 2003a), nutrientes (Lourenço, Barbarino, Mancini, Schnke y Aidar, 2002; Reitan, Rainuzzo y Olsen, 1994), salinidad (Ranga Rao, Dayananda, Sarada, Shamala y Ravishankar, 2007) y temperatura (Renaud, Luong-Van, Lambrindi y Parry, 2002).

Los principales grupos orgánicos presentes en la biomasa microalgal son las proteínas, carbohidratos y lípidos (Markou, Angelidaki y Georgakakis, 2012). El contenido de proteínas varía según las diferentes especies de microalgas del 15 al 71% del peso seco (Ren, 2014). Según investigaciones recientes, la proteína algal se considera una fuente

óptima para la alimentación animal, ya que se ha estimado que la proteína algal tiene un perfil considerable de aminoácidos (Gross, 2013). Los carbohidratos de las microalgas se pueden encontrar en forma de almidón, celulosa y otros polisacáridos, como productos de almacenamiento o componentes de la pared celular (Batista y otros, 2013). El contenido típico en peso seco de carbohidratos en algas varía de 20% a 40% de la masa celular total (Hu, 2004). Los carbohidratos de microalgas pueden ser utilizados por varias tecnologías de conversión de biomasa para la producción de biocombustibles (Markou y otros, 2012). El contenido de lípidos es variable en especies de microalgas que varían de aproximadamente 20 a 50% del peso seco en condiciones de crecimiento óptimas (Brennan y Owende, 2010), mientras que algunas especies de microalgas pueden acumular lípidos hasta un 75% del peso cuando se cultivan bajo ciertas condiciones de estrés (Mata y otros, 2010).

## 2.7. Lípidos en microalgas

Los lípidos microalgales han atraído el interés particular de la industria debido a su amplia gama de aplicaciones que van desde suplementos en nutrición humana y animal (Tredici, Biondi, Ponis, Rodolfi y Zitelli, 2009), como bioplásticos (Hempel y otros, 2011) hasta fuente para biodiesel (Schenk y otros, 2008). Las microalgas pueden producir muchas clases de lípidos, los cuales, según la estructura química y la polaridad, pueden dividirse en lípidos polares y neutros (Gong y Jiang, 2011). Entre los lípidos microalgales más conocidos y estudiados presentes en la biomasa se encuentran los ácidos grasos, los cuales son componentes básicos de los lípidos, pero no se distribuyen por igual entre las diferentes clases de lípidos (Hulatt, Wijffels, Bolla y Kiron, 2017). Estos son compuestos orgánicos que contienen un grupo carboxilo hidrófilo unido a una cadena de hidrocarburo que varía de 6 átomos de carbono a 32 átomos de carbono con un grupo metilo terminal adicional (Zárate, el Jaber-Vazdekis, Tejera, Pérez y Rodríguez, 2017).

Los ácidos grasos generalmente se pueden clasificar en dos categorías según la polaridad del grupo de la cabeza: (i) lípidos neutros que comprenden acilgliceroles y ácidos grasos libres y (ii) lípidos polares o lípidos anfipáticos que pueden ser subcategorizados en fosfolípidos y glicolípidos (Cuellar-Bermudez y otros, 2014). Los acilgliceroles están formados por ésteres de ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol y, según su número de ácidos grasos, se clasifican en triacilglicéridos (TAG),

diacilgliceroles, monoacilgliceroles (Halim, Gladman, Danquah y Webley, 2011). Sin embargo, los ácidos grasos también pueden clasificarse de acuerdo al número de carbonos y el número de insaturaciones en la cadena de acilo. Los ácidos grasos que contienen dobles enlaces en la cadena de acilo se denominan ácidos grasos insaturados; si poseen un doble enlace son denominados monoinsaturados (MUFA), si contiene dos o más dobles enlaces se llama ácido graso poliinsaturado o PUFA, mientras que los ácidos grasos saturados no contienen dobles enlaces en la cadena de acilo (Sala-Vila, Miles y Calder, 2008).

La biosíntesis de ácidos grasos se lleva a cabo mediante la conversión de acetil coenzima A (acetil-CoA) en malonil-CoA, catalizada por la enzima compleja acetil-CoA carboxilasa, donde una de las principales vías bioquímicas para la producción de acetil-CoA proviene del 3-fosfoglicerato (3-PG), producto primario de la fijación del dióxido de carbono (Cuellar-Bermudez y otros, 2014). En la actualidad se han referenciado ampliamente las rutas de biosíntesis, sustratos, intermediarios y enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) ya que éstos son conocidos por sus aplicaciones. En la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, actúan enzimas conocidas como desaturasas y elongasas que por lo general utilizan ácidos grasos de 18 carbonos y 20 carbonos como sustratos (Wang y otros, 2013). La síntesis de *novo* de PUFAs en microalgas es en gran parte a través de una vía aeróbica que involucra la adición secuencial de dobles enlaces a ácidos grasos saturados, principalmente 18:0 y 16:0, a través de las desaturasas  $\Delta 9$  y  $\Delta 12$  para producir 18:2n-6 (ácido linoleico, LA), que luego puede ser desaturado adicionalmente por  $\Delta 15$  desaturasa para dar 18:3 n-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico, ALA) (Guschina y Harwood, 2006). El ácido linoleico (LA, n-6) y ácido alfa-linolénico (ALA, n-3) son considerados ácidos grasos esenciales debido a que no son sintetizados de *novo* por los humanos y, por lo tanto, deben ser proporcionados por la dieta (FAO, 2010). Se ha reportado que los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son competitivos hacia las desaturasas y elongasas para la adición de carbonos o dobles enlaces en sus cadenas, respectivamente (Lee y otros, 2016). LA y ALA se convierten en ácido gamma-linolénico (GLA, 18:3 n-6) y ácido estearidónico (SA, 18:4 n-3), respectivamente, por la enzima delta-6 desaturasa. Por elongación de dos carbonos, GLA y SA se metabolizan a ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA, 20:3n-6) y ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 n-3), respectivamente. Estos ácidos grasos posteriormente pueden metabolizarse al ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3). ARA y EPA son alargados a ácido adrenico

(ADA, 22:4 n-6) y omega-3 ácido docosapentaenoico (D-3 DPA, 22:5 n-3) (Lee, Lee, Kang y Park, 2016) y posteriormente al ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3). Los ácidos grasos omega-3 representan un importante componente estructural de las membranas celulares humanas, en particular las células neuronales (Brunner, 2006). Se ha demostrado que el consumo de suplementos de EPA y DHA previene afecciones cardiovasculares, del sistema nervioso e inflamatorias (Sijtsma y de Swaaf, 2004). Adicionalmente los PUFAs tienen actividades biológicas que actúan para influir en la función y la capacidad de respuesta de las membranas celulares y el metabolismo de los tejidos, a las señales hormonales y otras (Zárate y otros, 2017). Estas actividades biológicas pueden agruparse como la regulación de la estructura y función de la membrana, la regulación de las vías de señalización intracelular, la actividad del factor de transcripción junto con la expresión génica y la regulación de la producción de mediadores de lípidos bioactivos.

## **2.8. Fotobiorreactores (PBR)**

El empleo de fotobiorreactores para el cultivo biotecnológico de microalgas permite el empleo de variaciones en las condiciones de cultivo para producir rápidamente biomasa y biomoléculas a gran escala (Sánchez y otros, 2008a). La producción de biomasa de microalgas puede realizarse tanto en sistemas abiertos como sistemas cerrados. En ambos sistemas de cultivo de microalgas, interiores o exteriores, la fuente de luz y la intensidad de la luz son factores críticos que afectan el rendimiento de éstos (Mata y otros, 2010). En la actualidad se emplean diversos sistemas de cultivos de microalgas, entre ellos se encuentran los raceways. Los estanques de canales de conducción o comúnmente llamados Raceways, en general se construyen en hormigón, concreto, estanques o fosas en la tierra compactados con plástico blanco. En este tipo de sistema de cultivo es de gran relevancia, la movilidad del cultivo de microalgas, ya que en un ciclo de producción continua, el cultivo y los nutrientes son impulsados a lo largo del raceway a fin de facilitar la agitación del medio y evitando sedimentación (Brennan y Owende, 2010). En comparación con los fotobiorreactores cerrados, los estanques abiertos representan el método más barato de la producción de biomasa de algas a gran escala. A continuación, se muestran las ventajas y limitaciones entre ambos, los sistemas abiertos y fotobiorreactores.

## Cuadro 2

Ventajas y limitaciones de los sistemas de producción abiertos y fotobiorreactores (Brennan y Owende, 2010)

Sistema de producción	Ventajas	Limitaciones
Raceways	Relativamente barato Fácil de limpiar No utiliza tierra de la agricultura Entradas de baja energía Fácil mantenimiento	Limitadas productividades de biomasa Gran superficie de tierra requerida Limitado a una pocas cepas de algas Baja mezcla, luz y utilización de CO <sub>2</sub> Los cultivos se contaminan fácilmente
Fotobiorreactor tubular	Amplia superficie de iluminación Apto para cultivos al aire libre Relativamente barato Buena productividad de biomasa	Cierto grado de crecimiento de la pared Abordaje Requiere espacios amplios de terreno Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO <sub>2</sub> a los largo de los tubos

Los sistemas de cultivo cerrados o fotobiorreactores, pueden clasificarse de acuerdo al diseño y modo de operación (Mata y otros, 2010). Los diseños de PBR cerrados comunes son de placa plana, tubular, columna de burbujas y elevación por aire (Bitog y otros, 2011; Posten, 2009; Wang, Lan y Horsman, 2012). Los sistemas cerrados son más caros que los estanques abiertos en términos de construcción, mantenimiento y requisitos energéticos, pero permiten el control de parámetros abióticos, como la temperatura, el pH y la inyección de CO<sub>2</sub> (Fuentes-Grünwald y otros, 2012). En consecuencia, la biomasa obtenida es de mayor calidad y concentración volumétrica (Carvalho, Meireles y Malcata, 2006b). Los sistemas abiertos tienen menores costos de construcción, requieren menos mantenimiento y tienen menos requisitos de energía, pero la productividad de la biomasa es menor y existen problemas relacionados con la evaporación y la contaminación por otras especies de microalgas, hongos y protozoos (Benemann, 2008). Los fotobiorreactores resultan ser más controlables que los estanques abiertos y benefician el crecimiento de microalgas y la producción de lípidos (Ma, Chen, Yang, Liu y Chen, 2016). Por ejemplo, un fotobiorreactor tubular es el sistema comercial más utilizado, con generalmente 20 cm o menos de diámetro (Chisti, 2007). Normalmente están hechos de materiales transparentes, probablemente polipropileno acrílico o policloruro de vinilo con un grosor de unos pocos milímetros, lo que permite una adecuada absorción de la luz (Safi, Zebib, Merah, Pontalier y Vaca-Garcia, 2014; Briassoulis y otros, 2010). La mezcla y agitación del cultivo se realiza utilizando burbujas que forman bombas de aire, y la iluminación se puede obtener de la luz solar o luz artificial (Briassoulis y otros, 2010). Los fotobiorreactores cerrados, tales como placa plana (PBR-FP), columna de burbujeo (PBR-BC) y el reactor tubular (PBR-T), por lo general exhiben un mejor rendimiento en la

producción de biomasa, ya que son fáciles de controlar, proporcionan una alta relación superficie-volumen (S/V) para una mejor exposición a la luz y podrían eliminar los problemas de contaminación (Posten, 2009).

## 2.9. Modalidades de cultivo

Las modalidades de cultivo de las microalgas se han reportado que poseen cierto impacto sobre el crecimiento celular y la composición bioquímica de la biomasa (Han y otros, 2013). Se conoce ampliamente que la modalidad de cultivo batch es un tipo de cultivo discontinuo o estático, debido a que se colocan de una sola vez y son cosechados completamente después que la producción algal alcanza un nivel apropiado, determinado a través del crecimiento celular o producción de biomasa. Estudios reportan que el modo de cultivo estático comúnmente denominado batch ha sufrido ciertas modificaciones convirtiéndolo en otra modalidad de cultivo nombrada semicontinuo que consiste en retirar rápidamente una fracción del volumen de trabajo y reemplazar este volumen con medio de cultivo fresco que posee los nutrientes (Hsieh y Wu, 2009). Con la finalidad de desarrollar modalidades de cultivo continuo fue necesario realizar comparaciones entre estas estrategias y las discontinuas (batch) exactamente en las mismas condiciones de cultivo (por ejemplo, diseño del reactor, régimen de cultivo) (Benvenuti, Bosma, Ji, Lamers, Barbosa y Wijffels, 2016). De acuerdo con Hsieh y Wu (2009) se han evaluado distintas concentraciones de nutrientes y tasas de renovación para mejorar la productividad de los lípidos. Por otro lado, Ippoliti y otros (2016); San Pedro, González-López, Ación y Molina Grima (2014), comprobaron que cambios en las tasas de dilución tiene como consecuencia cambios en la composición bioquímica de las microalgas sobre todo en las cantidades de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos, lo que deja en evidencia el impacto de las modalidades de cultivo en la producción de biomasa microalgal. Por otro lado, los procesos de producción de algas se pueden clasificar en tres clases generales de regímenes de crecimiento según la fuente de energía y el modo de utilización; y estos son: fototrófico, heterótrofico y mixotrófico (Juneja y otros, 2013).

- El cultivo fototrófico se produce cuando las microalgas utilizan luz, como la luz solar, como fuente de energía, y el carbono inorgánico (por ejemplo, dióxido de carbono) como fuente de carbono para formar energía química a través de la fotosíntesis (Huang, Chen, Wei, Zhang y Chen, 2010).

- El cultivo heterotrófico involucra el empleo de carbono orgánico como fuente de energía en ausencia de luz (Chojnacka y Márquez-Rocha, 2004).
- El cultivo mixotrófico se produce cuando las microalgas se someten a la fotosíntesis y utilizan compuestos orgánicos y carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) como fuente de carbono para el crecimiento (Chen, Yeh, Aisyah, Lee y Chang, 2011).

## 2.10. Análisis económico de la producción de microalgas a gran escala

La producción a gran escala de microalgas podría proporcionar recursos valiosos para la ecología industrial futura, aportando resultados ambientales como la reducción del uso de combustibles fósiles, la mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero, un mejor uso de la tierra y una mejora en la seguridad alimentaria, sin embargo, para lograr la viabilidad comercial, aún se necesitan varias soluciones tecnológicas innovadoras para superar los problemas relacionados con el desarrollo de cepas de microalgas, sistemas de cultivo, protección de cultivos, cosecha, procesamiento, riesgos ambientales y gestión de recursos (Brasil, Silva y Siqueira, 2017). Según Oostlander, van Houckeb, Wijffels y Barbosa (2020), la mayoría de los estudios disponibles en la literatura sobre microalgas para aplicaciones de acuicultura se centran únicamente en el valor nutricional de las algas, y dejan de un lado el análisis de costos. Estos autores indican que una reducción del costo de producción de microalgas podría mejorar la rentabilidad y, por lo tanto, la viabilidad de las empresas/criaderos acuícolas. Acién Fernández, Fernández-Sevilla y Molina-Grima (2019), reportaron un estudio comparativo en cuanto al costo de producción de biomasa para aplicaciones agrícolas y acuícolas en reactores Raceway de 4.5 Euros/kilogramo €/kg empleando agua dulce, fertilizantes y CO<sub>2</sub> como fuentes de nutrientes, mientras que al emplear reactores en cascada de capa delgada (Thin-layer), el costo de producción de biomasa de microalgas se redujo a 2.3 €/kg (ver Anexos, Cuadro 8). Estos valores están cerca del valor de 4.15 €/kg calculado para fotobiorreactores tubulares cerrados (PBR-T) a gran escala, 100 ha (Norsker, Barbosa, Vermuë y Wijffels, 2011). Acién, Fernández, Magán y Molina (2012), reportaron un análisis de costos del proceso producción de biomasa, donde el 94% del costo correspondió a la depreciación y la mano de obra, de la cual esta última puede reducirse con la implementación de una automatización (Acién y otros, 2017). Sin embargo, el acoplamiento de la producción de biomasa de microalgas con el tratamiento de residuos, incluidos los gases de combustión

y las aguas residuales, mejora la sostenibilidad del proceso y permite la producción de biomasa adecuada para su uso en la acuicultura (Acién y otros, 2012). Bajo estas condiciones, el costo de producción de biomasa se reduce a 3.6 y 1.4 €/kg cuando se usan ambos tipos de biorreactores (ver Anexos, Figura 28), sin embargo, para alcanzar el valor crítico de 1.0 €/kg, la tecnología también debe mejorarse, maximizando la productividad de la biomasa, reduciendo el costo de los reactores / tecnología y minimizando la mano de obra requerida para el funcionamiento de la instalación (Acién Fernández y otros, 2019).

## **2.11. Parámetros de importancia en los cultivos de microalgas**

### *Medición de fluorescencia*

La eficacia máxima del fotosistema II (PSII) es empleado durante los experimentos como una medida de la actividad fotosintética de las células (Benvenuti y otros, 2014). Las mediciones de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ) tienen la ventaja de ser rápidas, sensibles y mínimamente invasivas por lo que son particularmente útiles en la determinación del rendimiento cuántico máximo basado en la fluorescencia del PSII (Parkhill, Maillet y Cullen, 2001). La fluorescencia de las clorofilas se utiliza ampliamente en muchos estudios de laboratorio como una herramienta para entender el proceso básico de la fotosíntesis, así como el efecto de diferentes factores ambientales sobre la capacidad fotosintética (Lichtenthaler y Rinderle, 1988). Estudios previos han sugerido que  $F_v/F_m$  es un buen índice para detectar el estado fisiológico de las algas (Parkhill y otros, 2001). Una disminución en  $F_v/F_m$  es una característica significativa de la inhibición fotosintética (Herlory, Richard y Blanchard, 2007), y se toma generalmente como el indicador de la inhibición fotosintética (Beardall, Young y Roberts, 2001a). Valores entre 0.6 - 0.7 indican buen estado del fotosistema II y son valores máximos realistas para microalgas (Cosgrove y Borowitzka, 2010).

### *Irradiancia promedio, $I_{av}$*

La irradiancia promedio,  $I_{av}$  puede definirse como el promedio de los valores de irradiancia dentro del cultivo de microalgas (Acién, Fernández y Molina Grima, 2013). Según Molina Grima y otros (1994a) es la cantidad de luz recibida por las células que se mueven aleatoriamente dentro del cultivo. El concepto de irradiancia promedio permite

promediar la disponibilidad de luz dentro de cultivos densos a partir de los cuales se produce una tasa neta de fotosíntesis, lo que resulta en la fotosíntesis para todo el volumen de cultivo (Acién Fernández y otros, 2013). Se ha descrito que la intensidad de luz promedio en el interior del reactor dependerá directamente de la concentración celular y de su coeficiente de absorción específico (Barbosa y otros, 2003), por lo que incrementos en la concentración de biomasa reduce la energía luminosa disponible para las células de microalgas individuales y afecta la tasa de crecimiento específico (Zijffers y otros, 2010).

La determinación rigurosa de la irradiancia promedio dentro de un cultivo requiere la determinación de (1) la radiación incidente total en la superficie del fotobiorreactor, (2) la radiación a cualquier profundidad dentro del cultivo por la ley Beer-Lambert en función de la concentración celular y propiedades óptica, y (3) la integración de los valores locales sobre el volumen total de cultivo (Molina Grima, Fernández, Sánchez y García, 1996a). La irradiancia promedio de un cultivo de microalgas,  $I_{av}$  ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ), se ha descrito por Molina Grima, Sánchez, García, Fernández y Acién (1996b) como una función de la disponibilidad de radiación solar en el área del reactor,  $I_0$  ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ), la trayectoria de la luz, el diámetro del tubo,  $p$  (m); la concentración de biomasa,  $C_b$  ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ); y el coeficiente de extinción de biomasa,  $K_a$  ( $\text{m}^2/\text{kg}$ ) (Molina Grima y otros, 1994a) (Ecuación 1):

$$I_{av} = \frac{I_0}{(K_a * p * C_b)} (1 - \exp(-K_a * p * C_b))$$

Ecuación 1

# CAPÍTULO

## III

## **CAPÍTULO 3. MARCO DE ASPECTOS METODOLÓGICOS**

### **3.1 Tipo de Investigación**

La investigación desarrollada fue de tipo experimental ya que se basó principalmente en el estudio y empleo del método científico para la obtención de los datos.

#### **3.1.1 Definición**

La investigación experimental es un tipo de investigación basada en principios del método científico que se utiliza generalmente en ciencias como la sociología y la psicología, la física, la química, la biología y la medicina, entre otras. La investigación experimental consiste en la manipulación de una (o más) variables no comprobada(s), en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular.

#### **3.1.2 Justificación**

Se empleó la investigación experimental ya que a través de ésta es posible obtener datos verificables y reproducibles empleando el método científico, el cual representa una gran ventaja al aplicar una serie de pasos ordenados, lo que permite la obtención del conocimiento científico válido.

### **3.2 Definición, conceptual, instrumental y operacional de variables.**

Se evaluaron distintas variables como lo fueron peso seco, absorbancia, fluorescencia, composición bioquímica, ácidos grasos. Estas variables fueron definidas en el capítulo anterior.

### 3.3 Población

La población en la cual se enfocó este estudio fueron cultivos de la microalga *Tisochrysis lutea* en fotobiorreactores.

#### 3.3.1 Muestra y tipo de muestreo

La microalga empleada en esta investigación fue *Tisochrysis lutea* obtenida de de la Universidad de Santiago de Compostela. Los cultivos biotecnológicos de *Tisochrysis lutea* se llevaron a cabo en fotobiorreactores tubulares y columnas de burbujeo. Diariamente se monitoreo el crecimiento de la microalga tomando por triplicado muestras de cultivo provenientes de los reactores. Tras finalizados los experimentos, la biomasa microalgal se cosechó por centrifugación y se liofilizó para analizar la composición bioquímica y el contenido de ácidos grasos.

### 3.4 Métodos e instrumentos de investigación

#### 3.4.1 Métodos

##### a) Establecimiento de las condiciones para el cultivo biotecnológico de la microalga *Tisochrysis lutea* en fotobiorreactores.

Inóculos de la microalga *Tisochrysis lutea* se escalaron en botellones de 10 L en la cámara de cultivo con aireación constante, bajo iluminación continua de  $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y a una temperatura de 25 °C. Tales cultivos se emplearon para inocular columnas de burbujeo de 100 L ubicadas en el invernadero, irradiada por luz solar. Se empleó un medio fertilizante para el cultivo de la microalga constituido principalmente por 30 g/L sal marina, 800 mg/L Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 100 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 350 mg/L MgSO<sub>4</sub>, 0.02 mL/L WelgroMix, 0.02 g/L Karentol, 0.1 mL/L oligoelementos y 0.1 mL/L de vitaminas.

Las instalaciones de producción de microalgas se encuentran localizadas dentro de un invernadero en la Estación Experimental Las Palmerillas propiedad de la Fundación CAJAMAR (Almería, España). Las instalaciones poseen diez fotobiorreactores tubulares

construidos como se describió previamente (Fernández, Ación, Berenguel y Guzmán, 2014).

Cada fotobiorreactor tubular (PBR-T) tenía un volumen de 3000 L, estaba provisto por un tubo de 400 m de largo, 0.09 m de diámetro con 3.5 m de alto y una columna de burbujeo de 0.4 m para intercambio de gases y calor. El reactor poseía una sonda de oxígeno disuelto (OD5120, Crison, España), pH y temperatura (pH 5083T, Crison, España), localizadas al final del lazo y conectados a un multiparametros (MM44, Crison, España), a su vez conectado a la unidad de control de PC, permitiendo el completo monitoreo y control. La radiación solar recibida en las instalaciones fue monitoreada con un piranómetro termoelectrico conectado a un adaptador AC-420 (LP-02, Geónica S.A., España) y a la unidad de control. Cada reactor fue burbujeado con aire a una velocidad de flujo constante de 200 L/min, mientras que el pH se mantuvo en 8 mediante inyección a demanda de CO<sub>2</sub> puro a 3 L/min. La temperatura del cultivo se controló por debajo de 30 °C pasando agua de enfriamiento a 1500 L/h (cuando sea necesario, según lo determine el software de control) a través de un intercambiador de calor interno ubicado en la columna de burbujas de cada fotobiorreactor.

El volumen de inóculo suministrado al reactor al comienzo del experimento fue de 10% del volumen total de cultivo en el reactor, con el fin de lograr una concentración baja de biomasa y evaluar correctamente la curva de crecimiento. Una vez inoculado el reactor, se controló, midiendo diariamente la concentración de biomasa y la fluorescencia de las clorofilas. Al final del experimento, una vez que la concentración de biomasa alcanzó la fase estacionaria, se recogió el cultivo a través de un proceso de centrifugación, almacenándose la biomasa para un posterior análisis adicional de la composición bioquímica y ácidos grasos.

Experimentos con fotobiorreactores de columna de burbujeo (PBR-BC) de aproximadamente 100 L se llevaron a cabo en estos invernaderos. Las condiciones de cultivo de *Tisochrysis lutea* ensayadas fueron las mismas que las reportadas para los reactores tubulares empleando aireación y un suministro de CO<sub>2</sub> a demanda para mantener el pH en 8 a través de los mismos sistemas de control.

### b) Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa en términos de biomasa seca ( $C_b$ ) se midió diariamente filtrando entre 50 a 100 mL de cultivo a través de filtros de 1  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron lavados con formiato de amonio y secados a 80°C en un horno durante un período de 24 horas. La productividad de la biomasa se calculó como el producto de la concentración de biomasa por la tasa de crecimiento medida cada día.

### c) Determinación de la irradiancia promedio (lav)

La absorbancia en el intervalo visible (400-800 nm) se midió diariamente usando un espectrofotómetro Genesis 10S Marca ThomaScientific de doble haz. Se establecieron relaciones entre la absorbancia medida directamente de los cultivos y el peso seco a fin de obtener una correlación que nos permitiera monitorear la evolución de los cultivos en términos de concentración de biomasa ( $C_b$ ). La concentración de biomasa de una muestra desconocida se determinó comparando la absorbancia medida de una muestra diluida apropiadamente con la curva de calibración apropiada (Chatsungnoen y Chisti, 2016).

Adicionalmente se calculó el coeficiente de extinción ( $K_a$ ) dividiendo el valor de absorbancia medio por la concentración de biomasa ( $C_b$ ) y la trayectoria de luz de la cubeta (Ecuación 2).

$$K_a = \frac{Abs}{(C_b * p)} \quad \text{Ecuación 2}$$

La irradiancia promedio *in situ* del cultivo (lav) fue calculada como una función de la irradiancia en la superficie ( $I_o$ ), el coeficiente de extinción de la biomasa ( $K_a$ ), la concentración de la biomasa ( $C_b$ ) y el paso de luz incidente en el reactor ( $p$ ) (Ecuación 3). Los valores promedio de irradiancia diarios fueron considerados durante el periodo de luz fue usado como la irradiancia en la superficie del reactor para calcular la irradiancia promedio diaria.

$$I_{av} = \frac{I_o}{(K_a * p * C_b)} (1 - \exp(-K_a * p * C_b)) \quad \text{Ecuación 3}$$

El rendimiento cuántico ( $\varphi_E$ ) fue definido como la cantidad de biomasa generada por unidad de radiación (usualmente un mol de fotón) absorbido por el cultivo. Puesto que representa la relación entre la generación de biomasa y el flujo de fotones absorbidos, puede calcularse mediante la Ecuación 4 (Molina Grima, García, Sánchez, Ación y Fernández, 1997). El flujo de fotones absorbido a través del volumen del reactor ( $F_{vol}$ ) se calcula a partir de la irradiancia media en base al volumen de cultivo utilizando la ecuación 5 (Molina Grima y otros, 1997).

$$\varphi_E = \frac{P_b}{F_{vol}} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$F_{vol} = I_{av} * K_a * C_b \quad \text{Ecuación 5}$$

La eficiencia fotosintética (PE) es la fracción de energía fijada en la biomasa en función del calor de combustión de la biomasa que se consideró constante ( $Q_b = 20 \text{ MJ/kg}$ ) (Ecuación 6) (Molina Grima y otros, 1997).

$$PE = \frac{P_b \cdot Q_b}{F_{vol}} \quad \text{Ecuación 6}$$

#### **d) Mediciones de fluorescencia**

El estado de las células se verificó diariamente midiendo la relación de fluorescencia de clorofila ( $F_v/F_m$ ) con un fluorómetro (AquaPen AP 100, Photon System Instruments, República Checa). Se tomaron muestras de aproximadamente 3 mL provenientes de la muestra extraída de los reactores y se adaptaron a la oscuridad durante 5 minutos antes de las mediciones.

#### **e) Análisis de la composición bioquímica a la biomasa producida**

Los análisis de la composición bioquímica en especial de proteínas, lípidos, cenizas y carbohidratos se llevaron a cabo cada uno por triplicado a partir de la biomasa liofilizada del final de los cultivos. Los lípidos se determinaron gravimétricamente a partir de un extracto obtenido con cloroformo: metanol (2:1) (v/v) (Kochert, 1978). El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Lowry modificado (González López y otros, 2010). El contenido de humedad se realizó en un horno por pérdidas de peso después de 24 h a 80 °C, mientras que el contenido de cenizas se realizó en una mufla por calcinación

a 550 °C durante 6 h. El contenido de carbohidratos de la biomasa se determinó por diferencia al 100% de proteínas, lípidos y contenido de cenizas.

- **Proteínas**

Se pesaron entre 5 y 10 mg de biomasa liofilizada en un tubo de vidrio (Pirex) se adicionaron 2 mL de NaOH 1N y se colocaron en un termo-bloque a una temperatura entre 95 y 100 °C por 1 hora. Posteriormente se centrifugó la mezcla y se colocó 0.1 mL de ésta en un nuevo tubo junto con 0.3 mL de NaOH 1N y 0.4 mL de agua. A esta mezcla se le adicionaron 2 mL del reactivo 3 (solución de cobre-tartrato saturada), se mezcló y se dejó reaccionar por 10 min. Seguidamente se adicionaron 0.4 mL del reactivo 4 (Folin-Ciocalteu diluido) se mezcló y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente, obteniéndose una coloración azul. La absorbancia de las muestras se leyó a 750 nm y se correlacionó con una curva de calibración con el estándar de BSA (Bovine Serum Albumin o Albúmina de Suero Bovino) ( $R^2 = 0.991$ ) para determinar el contenido de proteínas.

- **Lípidos**

Se pesaron aproximadamente 100 mg de biomasa liofilizada y alúmina, y se maceró la mezcla con ayuda de un mortero y pistilo. De allí se tomaron 100 mg de la mezcla y se adicionaron aproximadamente 2 mL de la mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Se agitó y centrifugó la mezcla 5 min a 4000 rpm de la que la fase líquida se transfirió a un nuevo tubo. A este nuevo tubo se le adicionaron 3 mL de HCl 0.1N y 0.3 mL de  $MgCl_2$  0.5% (m/v) se agitó y se centrifugó. Con ayuda de una pipeta pasteur se toma la fase clorofórmica, ésta se colocó en un nuevo tubo, se secó con corriente de nitrógeno y por diferencia en los pesos de los tubos vacío y con lípidos se obtuvieron los lípidos totales.

- **Cenizas y carbohidratos**

Las cenizas se determinaron mediante la incineración de 100 mg de biomasa liofilizada en una mufla a 450 °C durante 6 horas. El contenido de carbohidratos se estimó restando la suma de los porcentajes de las fracciones (proteínas, lípidos y cenizas) de 100%.

- f) **Análisis de ácidos grasos**

El contenido y el perfil de ácidos grasos se realizaron por transesterificación directa y cromatografía de gases según lo descrito por Rodríguez-Ruiz y otros (1998). Para determinar el contenido de lípidos saponificables (SL) de las muestras de biomasa, se

partió de microalgas liofilizadas (tres muestras de 10 mg de cada lote) se transesterificaron directamente en presencia de 1 mL de hexano y 0,125 mg de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0), usando 1 mL de una solución 1:20 v/v de cloruro de acetilo en metanol. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos calentados a 105 °C durante 20 minutos para la transesterificación. A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de agua. Los tubos se agitaron y se centrifugaron. Se formaron dos fases, la superior (hexano) que contenía los FAMES obtenidas de los lípidos saponificables presentes en la biomasa de microalgas. Estos FAMES se analizaron mediante cromatografía de gases (GC) siguiendo el método descrito por Rodríguez-Ruiz, Belarbi, Sánchez y Alonso (1998). Se empleó un cromatógrafo de gases de la serie 6890N de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU). El cromatógrafo estaba equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax TM (0.25 mm x 30 m, película estándar de 0.25 µm, Supelco, Bellefonte, PA) y un detector de ionización de llama (FID). El nitrógeno fue el gas portador a una velocidad de flujo de 58.1 mL/min y una relación de división de 1:40. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 250 y 260 °C, respectivamente. La temperatura del horno se fijó inicialmente a 150 °C durante 3 minutos, luego se programó para aumentar a 240 °C a una velocidad de 7.5 °C/min y a 240 °C durante 12 min.

### **3.5 Software de control y tratamiento de la información**

El sistema de registro de datos y el software de control de los reactores fue DaqFactory 5.0 (Azeotech Inc., USA) y fue establecido, diseñado y construido por el grupo de investigación de la Universidad de Almería, España.

Los datos generados en los diversos ensayos fueron analizados en plantillas de datos confeccionadas en Microsoft Excel y que fueron elaboradas por el Dr. Francisco G. Ación Fernández de la Universidad de Almería, principalmente para agilizar el análisis de los resultados, facilitar la elaboración de los reportes de resultados y unificar un formato para presentar los resultados. Las tablas de datos y gráficos fueron confeccionados en Microsoft Excel 2010 sin la necesidad de emplear paquetes estadísticos.

Es importante señalar que los gráficos se presentarán en el idioma inglés debido a que se planea escribir un artículo científico en inglés, y por ende emplear estos gráficos de la fuente inicial.

# CAPÍTULO

# IV

## CAPÍTULO 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1 Cultivo de *Tisochrysis lutea* en un fotobiorreactor tubular (PBR-T)

Se evaluó el crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en un fotobiorreactor tubular de 3000 L, localizado en la Estación Experimental Las Palmerillas, Almería, España. La microalga fue cultivada en un medio fertilizante (Cuadro 3) preparado sobre una solución salina a base de sal marina (NaCl 30 g/L) al exterior, y estuvo expuesta a intensidades de luz que oscilaban entre  $\sim 2000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  durante el día. Durante el experimento se realizaron mediciones de la absorbancia a 680 y 750 nm, fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia media ( $I_{av}$ ), peso seco, análisis de ácidos grasos y composición bioquímica a la biomasa producida.

#### Cuadro 3

Composición del medio de cultivo empleado para el cultivo de T-Iso en PBR-T

Nutrientes	Medio Fertilizante
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , mg/L	800
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mg/L	100
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, mg/L	350
WelgroMix, mL/L	0.02
Karentol, g/L	0.02
Oligoelementos, mL/L	0.1
Vitaminas, mL/L	0.1



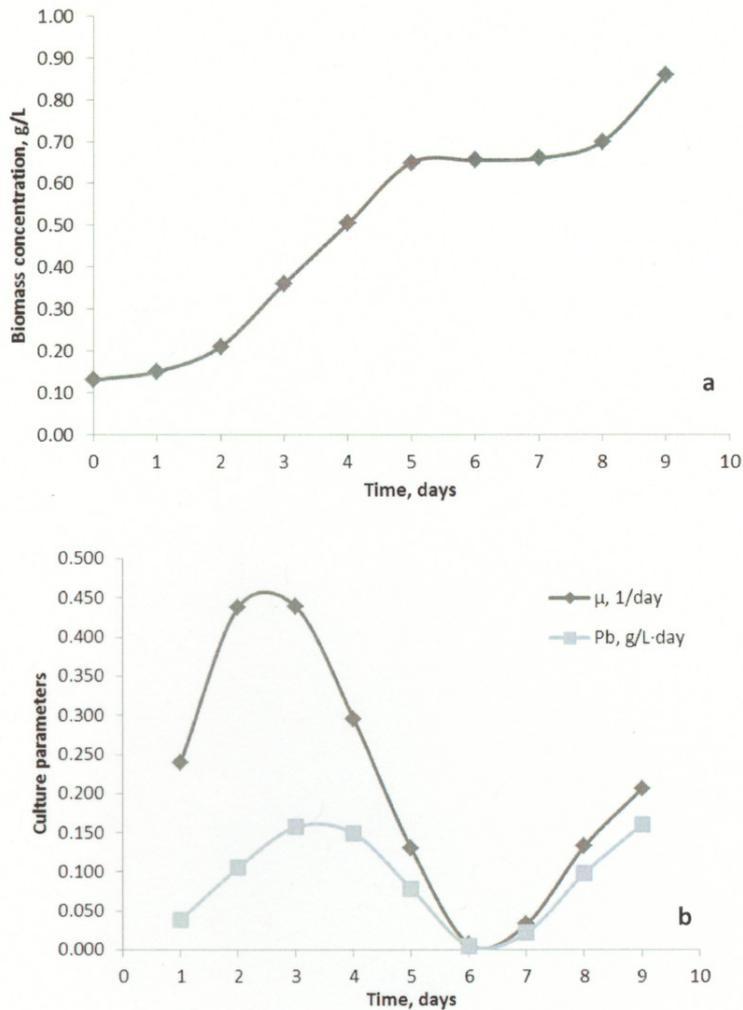
**Figura 2.** Crecimiento de T-Iso en un fotobiorreactor tubular, (a) Inicio del experimento, (b) fin del ensayo.

#### 4.1.1. Parámetros monitoreados durante el cultivo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en el fotobiorreactor tubular (PBR-T).

##### 4.1.1.1. Concentración (Cb), productividad (Pb) de biomasa, velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de nutrientes respecto al tiempo.

La Figura 2, evidencia el crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en un fotobiorreactor tubular (PBR-T), donde la figura a) muestra el cultivo en su fase inicial (0 días) y la Figura b) a los 9 días. Durante los primeros 9 días se muestra un contenido de biomasa seca cerca a  $\sim 1$  g/L (Figura 3a). Diversos autores reportan contenidos de biomasa para *I. galbana* Parke de 0.9 g/L (Molina Grima, Sánchez, García Sánchez, García Camacho y López, 1992); *I. galbana* All4 1.02 g/L (Molina Grima, Sánchez, García Camacho, Fernández y Ación, 1994b); *I. galbana* Parke 0.9 g/L (Sánchez, Martínez y Espinola, 2000) los cuales resultan ser cónsonos con los datos encontrados. Zijffers y otros (2010), indican que el aumento de la concentración de biomasa reduce la energía luminosa disponible para las células de microalgas individuales y afecta la tasa de crecimiento específico. En este estudio, tanto la velocidad de crecimiento como la productividad de biomasa presentan un descenso luego que la microalga empieza a crecer (Figura 3b). La máxima velocidad de crecimiento encontrada oscilaba en los 0.4 días<sup>-1</sup> (0.02 h<sup>-1</sup>) con productividades máximas de biomasa de 0.16 g/L-día. Renaud, Thinh y Parry (1999) reporta para *Isochrysis sp.* NT14 velocidades de crecimiento de 0.47 día<sup>-1</sup>. Otros trabajos presentan tasas máximas de crecimiento de un grupo de criptofitas entre 0.34 - 0.70 día<sup>-1</sup> (Peltomaa, Johnson y Taipale, 2017). Los hallazgos de este estudio fueron cotejados con otros trabajos de microalgas pertenecientes al mismo género tales como, *Isocrysis sp.* (0.08 – 0.17 g/L-día), *Isocrysis galbana* (0.32 – 1,60 g/L-día) (Mata, 2010). Las cepas *Isochrysis sp.* (T-ISO) CS 177 e *Isochrysis sp.* F&M-M37 cultivadas bajo un régimen fototrófico logran alcanzar productividades de biomasa de 0.17 g/L-día y 0.14 g/L-día respectivamente (Rodolfi y otros, 2009). Todo lo antes señalado supone que el empleo de PBRs, como placas planas (Flat-planet), columnas de burbujas (bubble columns) y reactores tubulares (PBR-T), generalmente muestran un mejor rendimiento en la producción de biomasa (Yeh y Chang, 2011). Los sistemas de paneles planos y tubulares son los fotobiorreactores más utilizados (Borowitzka, 1999), ya que permiten una buena utilización de la luz. Se ha observado que la tasa de crecimiento celular y la

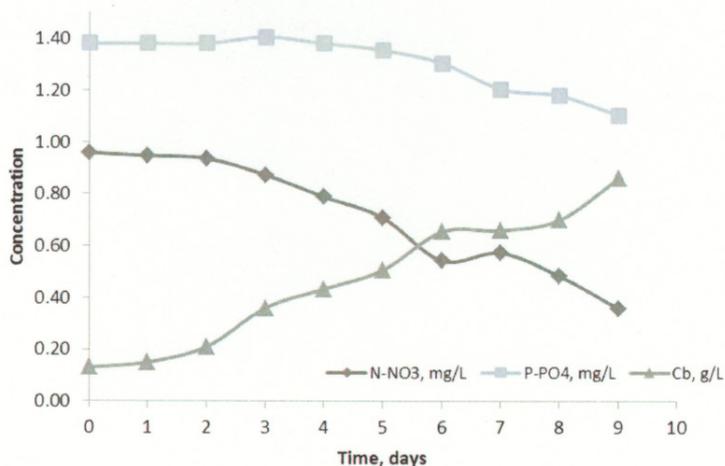
concentración final de biomasa aumentaron en cultivos de *C. vulgaris* ESP-31 cuando se usaron PBR tubulares.



**Figura 3.** Concentración de biomasa (a), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y productividad de biomasa (Pb) para la microalga T-Iso (b).

En la Figura 4, se presenta la relación entre la concentración de biomasa y el consumo de nitratos ( $N-NO_3$ ) y fosfatos ( $P-PO_4$ ). Se muestra la disminución de ambos nutrientes conforme avanza la fase de cultivo, debido a que la microalga aprovecha estos nutrientes para su crecimiento. La absorción de nitrógeno y fósforo tiene un efecto interdependiente en el crecimiento de microalgas (Santos-Sánchez y otros, 2016). Se han reportado reducciones paralelas en el contenido de nitrato y fosfato en el medio de cultivo de *N.*

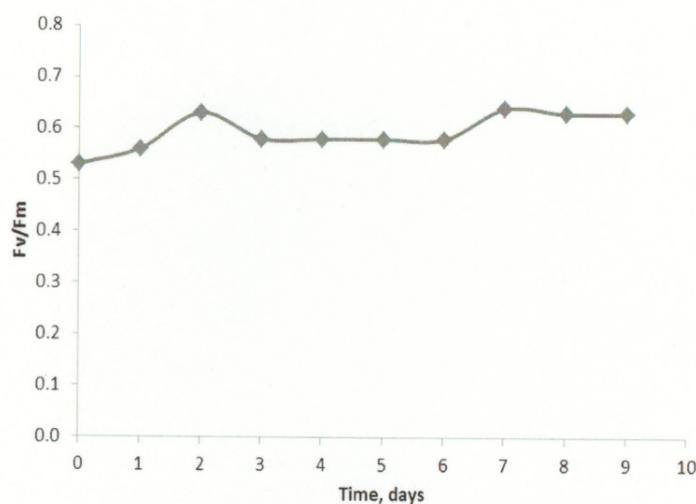
*gaditana* en PBRs tubulares, manteniendo una proporción de 5:1 (San Pedro y otros, 2014). Ésta misma proporción de N/P se empleó al inicio de nuestro ensayo con T-Iso. Tang y otros (2011), afirman que la concentración de nitrato disminuye continuamente con el tiempo de cultivo de *Chlorella minutissima*, y se hace cero cuando la densidad celular alcanza un valor máximo, lo que indica que el crecimiento puede ser limitado por nitratos. El nitrato es considerado el principal factor que afecta la productividad de la biomasa y, por lo tanto, se ha empleado para modelar la tasa de crecimiento. El nitrógeno es el elemento más importante como nutriente requerido para el crecimiento de las microalgas (Becker 1994), considerado un componente principal tanto de ácidos nucleicos como de proteínas (Mondal y otros, 2017). Este hecho fue respaldado por estudios previos donde la contribución de la limitación de fosfato a la acumulación de lípidos no fue tan relevante como la inanición de nitratos (Mujtaba, Choi, Lee y Lee, 2012). Mata y otros (2010), esquematizan una relación inversa entre el crecimiento de microalgas y el consumo de nutrientes, e indica que en general, los cultivos de algas en la fase de crecimiento exponencial contienen más proteínas, mientras que los cultivos en la fase estacionaria tienen más carbohidratos y glucógeno. Desde otro punto de vista, se hipotetiza que regulando adecuadamente la concentración de nitrógeno en cultivos continuo, las células de algas podrían crecer a un ritmo razonable y acumular lípidos simultáneamente, lo que conduciría a una mayor productividad de lípidos sobre el cultivo discontinuo (Wen, Geng y Li, 2014).



**Figura 4.** Concentración de biomasa y consumo de nutrientes durante la fase de cultivo batch.

#### 4.1.1.2. Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia promedio (Iav), eficiencia fotosintética respecto al tiempo.

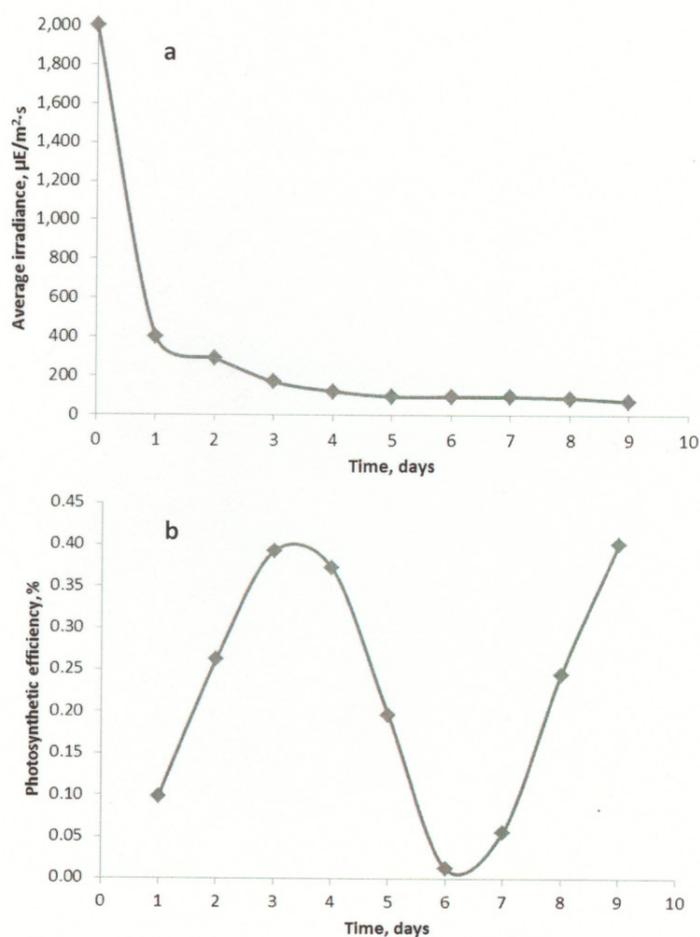
En la Figura 5, se presenta la evolución de la fluorescencia de las clorofilas (Fv/Fm) de *T. Iso* durante el cultivo de la microalga respecto al tiempo. La fluorescencia de las clorofilas se utiliza como una herramienta para comprender el proceso básico de la fotosíntesis, así como el efecto de diferentes factores ambientales sobre la capacidad fotosintética (Lichtenthaler y Rinderle, 1988). La relación entre la fluorescencia variable (Fv) y la fluorescencia máxima (Fm) proporciona el máximo rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (PSII) (Wagner, Braun, Slenzka y Posten, 2015). En nuestro estudio los valores de fluorescencia de clorofilas se mantuvieron durante todo el experimento entre 0.5 y 0.6, lo cual indica que la microalga *Tisochrysis lutea* no sufrió estrés fisiológico durante esta fase de crecimiento y que a su vez se refleja en el crecimiento (Figura 5). Valores de fluorescencia de clorofilas entre 0.6 - 0.7 indican buen estado del fotosistema II y son valores máximos realistas para microalgas (Codgrove y Borowitzka, 2010).



**Figura 5.** Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) de *Tisochrysis lutea* en un sistema de cultivo tipo batch.

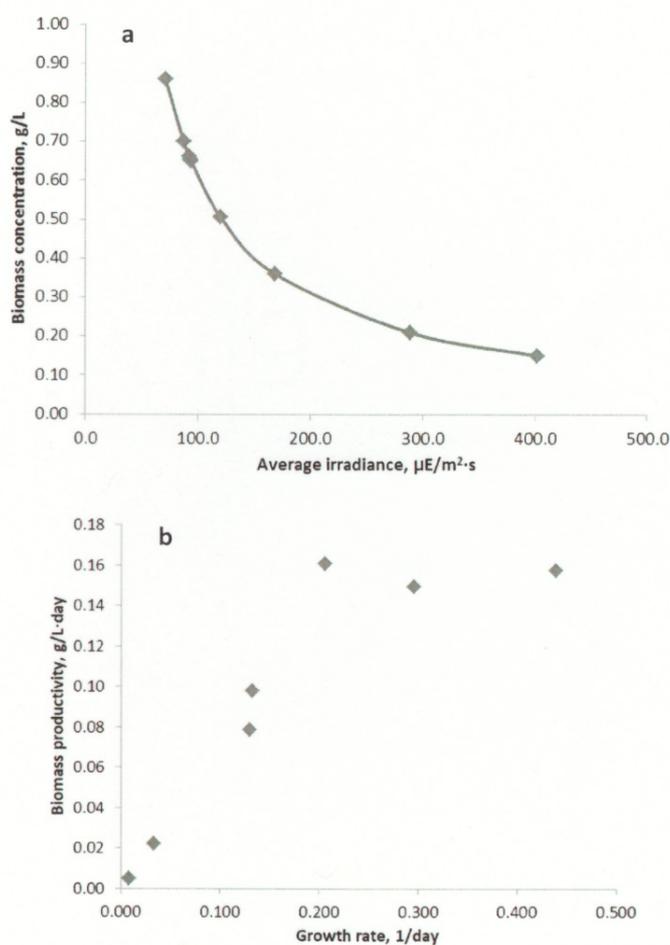
La irradiancia media dentro del reactor se usa como una medida de la luz disponible para las células que se mueven a través de un cultivo denso, en el que existe una distribución heterogénea de luz causada por el auto-sombreado (Acién Fernández, Camacho, Sánchez, Fernández y Molina Grima, 1998). La irradiancia promedio obtenida en cultivos

de *Tisochrysis lutea* se mantuvo prácticamente constante a irradiancias  $<200 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  (Figura 6a). Debido a que en los fotobiorreactores la intensidad de la luz difiere en diferentes zonas del reactor, condiciona la eficiencia con la que la energía de la luz se puede convertir en biomasa (Wagner y otros, 2015). Según Edwards, Thomas, Klausmeier y Litchman (2015), el crecimiento celular se incrementa en función de la irradiancia, debido a un aumento en la tasa de fotosíntesis limitada por luz. Como se muestra en la Figura 6b, la eficiencia fotosintética de la microalga T-Iso disminuye durante los primeros días de cultivo pero luego incrementa siendo acorde con el incremento en la concentración de biomasa obtenidos. Estos resultados no superan el 1%, resultando ser baja, considerando que un valor apropiado está entre un 2 a 4% (Figura 6).



**Figura 6.** Irradiancia promedio y Eficiencia fotosintética de la microalga T-Iso.

Por otro lado, la concentración de biomasa respecto a la irradiancia promedio presenta cierta relación donde a mayores irradiancias promedio la concentración de biomasa decrece, siendo menores irradiancias las que permiten la mayor concentración de biomasa (Figura 7a). Sin embargo, la productividad de biomasa en función de la tasa de crecimiento indica que mayores productividades se encontraron a partir de una velocidad de crecimiento  $>0.2 \text{ día}^{-1}$ , como se muestra en la Figura 7b. Contrariamente, en un estudio se explicó la respuesta en crecimiento de *I. galbana* # 153180 dependiente de la luz en cultivos discontinuos, observándose que cuando la intensidad de la luz incidente aumentó se registró un aumento de la tasa de crecimiento y la densidad celular (Liu, Sommerfeld y Hu, 2013).



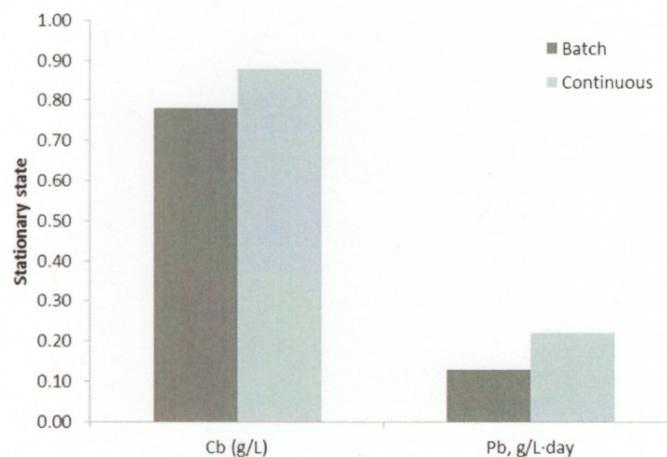
**Figura 7.** Correlación entre concentración de biomasa respecto a la irradiancia promedio, y productividad de biomasa respecto a la tasa de crecimiento.

#### 4.1.1.3. Comparación entre la modalidad de cultivo batch y continuo en el fotobiorreactor tubular.

El crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) se evaluó en la modalidad batch o estático y en continuo, a fin de conocer el comportamiento de este organismo frente a tales condiciones. Se encontró que la concentración de biomasa se incrementa en el estado estacionario con el reactor en continuo en comparación con el estado estacionario en estático (Figura 8). Patil, Källqvist, Olsen, Vogt y Gislerød (2007), reportan para la microalga *Isochrysis galvana* ~0.5 g/L de biomasa y una productividad de 0.16 g/L-día en cultivos continuos mientras que en nuestro estudio encontramos cantidades máximas de biomasa de T-Iso >0.8 g/L y productividades >0.2 g/L-día. La productividad de biomasa en continuo incrementó un 0.1 g/L-día respecto al ensayo en discontinuo (Figura 8). Tales resultados sugieren que el recambio de medio de cultivo fresco favorece el crecimiento de T-Iso. En comparación con los cultivos discontinuos, el modo de cultivo continuo dio como resultado cultivos más estables, con una mayor productividad de biomasa de *I. galvana* # 153180 cultivada al aire libre en PBR de placa plana (Liu y otros, 2013). Uno de los factores clave en la producción de microalgas al aire libre es establecer la tasa de dilución óptima para maximizar la biomasa (San Pedro y otros, 2014). Se conoce que la tasa de crecimiento específico podría controlarse alterando la tasa de dilución del sistema que tuvo un efecto significativo sobre la productividad de la biomasa de microalgas (Tang, Chen, Simon Ng y Salley, 2012). Se encontró una mayor productividad de biomasa con una dilución creciente en cultivos de *Dunaliella tertiolecta* en PBRs. Por otro lado, si la dilución es mayor que la tasa de crecimiento específica, la productividad se vuelve negativa, ya que la biomasa se lava y por ende se pierde (Lucas-Salas, Castrillo y Martínez, 2013). En cultivos de *Pavlova lutheri* crecida en PBRs la concentración de biomasa fue más alta en cultivos batch (0.540 g/L) que en cultivos continuos (0.385 g/L); sin embargo, si se consideran los resultados experimentales en términos de productividad, el rendimiento obtenido en cultivos discontinuos (0.030 g/L-día) es considerablemente menor que el rendimiento equivalente obtenido cuando se trabaja continuamente (0.114 g/L-día) (Carvalho y Malcata, 2005). Frumento, Casazza, Arni y Converti (2013), reportan productividades de biomasa de la cepa de *Chlorella vulgaris* CCAP 211 crecida en la modalidad continua en un PBR tubular horizontal de 0.033 g/L-día y un PBR tubular helicoidal de 0.085 g/L-día. Sin embargo, otros trabajos han comparado la productividad de biomasa (Pb) en cultivos continuos de *N. gaditana* en

reactores tubulares (T-PBR) y reactores de panel plano (FP-PBR). Se reportan  $P_b$  de 0.17 g/L-día (T-PBR) y 0.27 g/L-día (FP-PBR) (Camacho-Rodríguez y otros, 2013). Lo que sugiere que una geometría de panel plano es más eficiente que una tubular.

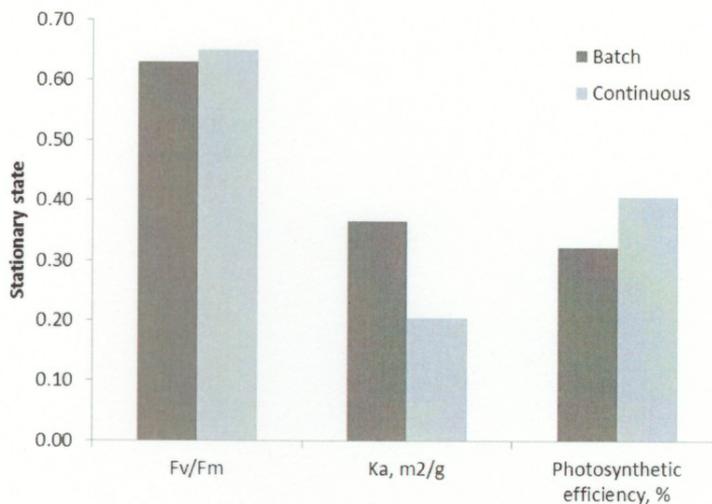
Según Molina Grima, Fernández, Ación y Chisti (2001), la producción de biomasa está controlada principalmente por la disponibilidad de luz. En cultivo continuo, la tasa de crecimiento específico de biomasa depende de la irradiancia promedio. Este hecho se observa en la Figura 8, en la que el empleo de diluciones favorece la disponibilidad de luz y con ello incremento en la concentración y productividad de biomasa. El empleo de tasas de dilución favorece la productividad de biomasa en cultivos continuos (Ación Fernández y otros, 1998) encontrándose que a una velocidad de dilución menor de  $0,025 \text{ h}^{-1}$ , la productividad es menor que la alcanzada a una velocidad de dilución de  $0,040 \text{ h}^{-1}$ , lo que resalta el efecto de la disponibilidad de luz para prevenir la fotolimitación. La maximización de la productividad de biomasa en fotobiorreactores es un paso importante para el desarrollo de la biotecnología de microalgas, e implica la optimización de los parámetros de cultivo y el conocimiento de las características de crecimiento del microorganismo (Barbosa y otros, 2003).



**Figura 8.** Concentración y productividad de biomasa en estado estacionario en batch y continuo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso).

En la Figura 9, se resume el estado estacionario en batch y continuo de ciertos parámetros tales como fluorescencia de clorofilas ( $F_v/F_m$ ), coeficiente de absortividad de la biomasa ( $K_a$ ) y eficiencia fotosintética, analizados durante el crecimiento de T-Iso. Se

muestra la relación entre la fluorescencia de clorofilas en tales condiciones, observándose que ésta se incrementa en continuo con valores próximos a los 0.65. En ambos casos, en cultivo en estático o continuo no se encontró estrés fisiológico de las células de T-Iso hecho que pudo corroborarse con los valores de Fv/Fm. El máximo rendimiento cuántico (Fv/Fm) del fotosistema II (PSII) es empleado para evaluar la eficiencia de la utilización de la luz (Benvenuti y otros, 2014). También esta relación es considerada una medida conveniente del rendimiento fotoquímico en el complejo PSII y se considera a menudo como un índice de fotoinhibición de la fotosíntesis (Liu y otros, 2013). Cultivos *I. galbana* # 153180 PBR de placa plana muestran un rendimiento cuántico máximo de PSII (Fv/Fm) entre 0.6 - 0.7. Se esperan valores de Fv/Fm alrededor de 0.6 - 0.7 para las células de microalgas sanas, mientras que valores más bajos que éstos indican que las células han estado expuestas al estrés biótico o abiótico (Young y Beardall, 2003).

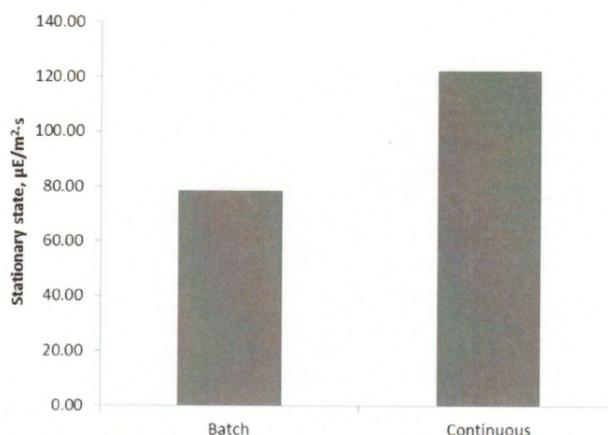


**Figura 9.** Parámetros de cultivo del estado estacionario en batch y continuo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso).

Por otro lado, el coeficiente de absortividad ( $K_a$ ,  $m^2/g$ ) del reactor tubular en el estado estacionario tanto en batch y continuo presenta diferencias que pueden apreciarse en la Figura 9. Un coeficiente de absortividad menor en continuo es de esperarse, ya que hay ingreso de medio de cultivo fresco y mayor luz disponible en el reactor repercute sobre la disminución de este parámetro. Falkowski y LaRoche (1991), indican que el coeficiente de absorción, disminuye si la intensidad de la luz aumenta en un proceso denominado

fotoacclimación. En cultivos de *Dunaliella tertiolecta* se registra una disminución tanto del coeficiente de absorción como del contenido de clorofila, respectivamente, al aumentar la intensidad lumínica promedio (Barbosa y otros, 2003). Ciertamente, al diluir el reactor se favorece la eficiencia fotosintética la cual se incrementa debido a que existe más luz disponible dentro del reactor aumentando la eficiencia fotosintética así como la concentración y productividad de biomasa. La atenuación producida por las células (efecto de sombreado) depende de la concentración de biomasa y del coeficiente de extinción de la biomasa (Acién Fernández y otros, 1998), efecto que pudo observarse en los datos previos, donde al cambiar la modalidad de cultivo el cultivo se observaron variaciones en distintos parámetros que se asocian a la cantidad de luz que se aporta al cultivo en continuo. Cultivos masivos al aire libre de *Nannochloropsis sp.* son capaces de soportar altos niveles de irradiación y alteraciones en el pH, aunque presentan una disminución de la actividad fotosintética (Pal, Khozin-Goldberg, Cohen y Boussiba, 2011). Contrario a nuestro experimento observamos incrementos en la eficiencia fotosintética en el reactor tubular en continuo (Figura 9), lo que se acompaña de incrementos en la concentración de biomasa.

El efecto de la cantidad de luz disponible para el cultivo resulta ser de gran relevancia para el crecimiento de la microalga T-Iso. Al evaluar la irradiancia promedio para el cultivo en estático y continuo en el estado estacionario observamos que en continuo el efecto de la dilución retira cultivo e ingresa medio de cultivo el cual permite más luz disponible para que la microalga la aproveche para sus procesos fotosintéticos (Figura 10). Diversos estudios muestran que la productividad de biomasa aumenta con la irradiancia media hasta un valor máximo (Hall, Acién, Cañizares, Rao y Molina Grima, 2003), tal como se muestran en estos resultados, los que al aumentar la cantidad de luz disponible producen un incremento en la concentración y productividad de biomasa. Barbosa y otros (2003), reportan que incrementos en las diluciones es de esperarse una disminución en la concentración de biomasa, lo que dará como resultado una mayor intensidad de luz media dentro del reactor. Sin embargo, en nuestro caso se obtuvo una mayor concentración de biomasa, >lav, eficiencia fotosintética en cultivo continuos de T-Iso. El régimen de luz a la que están expuestas las células determina la tasa de fotosíntesis, pero en reactores grandes operados en condiciones dinámicas de fluidos similares, la tasa de crecimiento puede modelarse en función de la irradiancia promedio dentro de los reactores (Acién Fernández y otros, 2013).



**Figura 10.** Irradiancia promedio (lav) en el estado estacionario en cultivos batch y continuo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso).

#### 4.1.1.4. Análisis de Ácidos grasos a la biomasa de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en PBR tubular

El análisis de ácidos grasos de la microalga *Tisochrysis lutea* se llevó a cabo a partir de biomasa cultivada en un fotobiorreactor tubular operado en la modalidad batch y continúa.

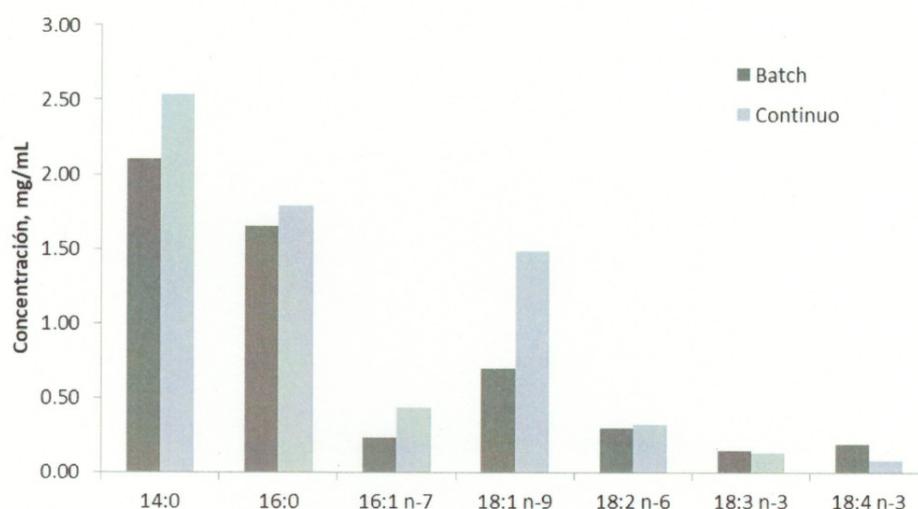
Los resultados obtenidos tras el análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de los ácidos grasos reflejan un incremento en las concentraciones de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados cuando el reactor opera en continuo. En la Figura 11, se muestra la predominancia de los ácidos grasos saturados (SFA) mirístico (14:0) y palmítico (16:0) en concentraciones entre 1.50 y 2.50 mg/mL, sin embargo el ácido oleico (18:1 n-9) (MUFA, monoinsaturado) se encuentra en cantidades ~0.75 y 1.50 mg/mL siendo uno de los principales de este estudio. Se detectaron otros ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados tales como el palmitoleico (16:1 n-7), linoleico (18:2 n-6),  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) y el ácido estearidónico (18:4 n-3). Recientemente se ha descrito para *I. galbana* y *D. vlkianum*, del género de las *Haptofitas* que el principal SFA fue el ácido mirístico (14:0) y el principal MUFA fue el ácido palmitoleico (16:1n7) (Batista y otros, 2013). *I. galbana* se utiliza ampliamente como especie de alimentación para la cría comercial de muchos animales acuáticos, en particular larvas y moluscos juveniles, crustáceos y especies de peces (Fidalgo, Cid, Torres, Sukenik y Herrero, 1998), debido a

la acumulación de PUFA n-3 (Donato, Vilela y Bandarra, 2003; Bandarra, Pereira, Batista y Vilela, 2003).

La importancia biológica de estos ácidos grasos ha sido expuesta en diversas investigaciones donde se resalta el valor de estos compuestos debido a los múltiples beneficios. Mecanismos explican los efectos protectores del ácido oleico con respecto a la diabetes mellitus tipo 2 y la sensibilidad a la insulina (Palomer, Pizarro-Delgado, Barroso y Vázquez-Carrera, 2017). Se ha reportado que el ácido oleico y palmítico provocan efectos opuestos sobre macrófagos / células de Kupffer y hepatocitos (Pardo, González-Rodríguez, Guijas, Balsinde y Valverde, 2015). Sin embargo, se ha comprobado que el ácido oleico puede ser útil tanto en la inmunomodulación, tratamiento y prevención de diferentes trastornos como enfermedades cardiovasculares o autoinmunes, alteraciones metabólicas, lesiones cutáneas y cáncer, además de ejercer un papel destacado en la absorción de fármacos (Sales-Campos, Reis, Crema, Santana, y Ribeiro, 2013). Es importante mencionar que la síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga requiere la presencia de elongasas y desaturasas específicas, que actúan principalmente sobre los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Bellou y otros, 2014).

Los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos catalogados de gran importancia biológica y se caracterizan por la presencia de más de una insaturación. En el presente estudio se encontraron ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6) como se muestra en la Figura 11. Estudios han revelado que los ácidos grasos linoleico (LA, n-6) y ácido alfa-linolénico (ALA, n-3) son considerados ácidos grasos esenciales, ya que éstos no pueden ser sintetizados por los humanos y por lo tanto deben ser provistos por la dieta (FAO, 2010). Este hecho se fundamenta principalmente debido a que una dieta de ácido linoleico puede funcionar como un precursor del ácido araquidónico (ARA), del mismo modo, el ácido alfa-linolénico es un precursor de EPA y DHA (Bird, Calder y Eggersdorfer, 2018). Los seres humanos no pueden convertir los ácidos grasos n-6 en ácidos grasos n-3 y tienen una capacidad muy limitada para convertir el ácido  $\alpha$ -linolénico en EPA y DHA (Brenna, Salem, Sinclair y Cunnane, 2009). Por lo tanto, las principales fuentes dietéticas de EPA y DHA son los pescados, especialmente el pescado azul, salmón, bacalao, salmonete, arenque, entre otros (Mori, 2017). La calidad del aceite de pescado también varía según la especie, la estación y la ubicación geográfica del pez (Cuellar-Bermudez y otros, 2014), pero al igual que los humanos, los peces obtienen EPA y DHA de su dieta, básicamente de microalgas. Éstas son consideradas productoras

iniciales de EPA y DHA en la cadena alimenticia marina (Adarme-Vega y otros, 2012) y algunas han sido empleadas en la producción comercial de PUFAs (Peltomaa y otros, 2017). En particular, éstos PUFA son importantes para el crecimiento y el funcionamiento de la retina, el cerebro, los tejidos reproductivos y para la salud cardiovascular (Bhakuni y Rawat, 2005; Horrocks y Yeo, 1999).



**Figura 11.** Concentración (mg/mL) de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados detectados en la biomasa de *Tisochrysis lutea* en batch y continuo.

La síntesis de ácidos grasos puede proceder por rutas anaeróbicas a través de enzimas policétido sintasa, que solo están presentes en algunos microorganismos, o por vías metabólicas aeróbicas, que son más universales, ya que ocurren en plantas, algas, hongos y animales (Zárate y otros, 2017). Esto consiste en la elongación sucesiva (elongación de la cadena de carbonos) y pasos de desaturación (inclusión de dobles enlaces en la cadena de carbonos), reacciones controladas por las enzimas elongasas y desaturasas (Sayanova y Napier, 2004).

En el Cuadro 4, se resume los porcentajes en cuanto al peso seco de los ácidos grasos identificados a partir de biomasa de *Tisochrysis lutea* T-Iso crecida en batch y continuo en reactores tubulares. Se observa que en ambos casos se registra mayor cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en contraste con los ácidos grasos poliinsaturados, al igual que mayores cantidades de SFA en comparación con el resto de los ácidos grasos.

La acumulación de lípidos en microalgas puede estar influenciada por la temperatura, la intensidad de la luz, el pH, la salinidad, las sales minerales y la fuente de nitrógeno (Yeh y Chang, 2011), así como de variaciones en la modalidad de cultivo. Hoy en día, son numerosos los grupos de investigación que incursionan con novedosas modalidades para el cultivo de microalgas como lo son los fotobiorreactores.

Un fotobiorreactor (PBR) es principalmente un biorreactor en el que se incorpora una fuente de iluminación para que los organismos que crecen en él puedan utilizar la energía de la luz (Mondal y otros, 2017). Entre los diversos tipos de fotobiorreactores, los cerrados son más controlables que los estanques abiertos y benefician el crecimiento de microalgas y la producción de lípidos, siendo el PBR tubular el sistema comercial más utilizado (Ma y otros, 2016). También se ha demostrado que el diseño del fotobiorreactor (PBR) es crucial para el cultivo de microalgas y la producción de lípidos (Chen y otros, 2011; Posten, 2009), permitiendo la obtención sostenible de biomasa microalgal rica en componentes de interés. El uso de fotobiorreactores tubulares cerrados (PBR) permite un mejor control de las condiciones de crecimiento, minimizando la contaminación y el consumo de recursos, mejorando la producción y la calidad de la biomasa resultante y reduciendo los costos de producción (Acién, Fernández y otros, 2012).

Dentro de los factores antes mencionados la luz es un factor de gran relevancia para la acumulación de lípidos en microalgas (Hu y otros, 2008). Se informa que la síntesis de novo de los TAG intracelulares está altamente correlacionada con la actividad fotosintética y con la energía lumínica disponible para las células de microalgas (Dillschneider, Steinweg, Rosello y Posten, 2013; Pan, Wang, Chuang, Chang y Chen, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 8 y 9), se aprecia un aumento en el contenido de biomasa y eficiencia fotosintética al operar el fotobiorreactor tubular en continuo. Se observa en la Figura 10, que el cultivo en continuo posee más luz disponible para las células, lo que favorece la acumulación de ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados (USFA). Variaciones en estos parámetros permiten que las células respondan a una mayor velocidad de crecimiento y a la actividad fotosintética bajo una alta renovación celular (es decir, alta dilución) (Klyachko-Gurvich y otros, 1999). Diferencias en el contenido de USFA en *T. lutea* crecida en continuo y batch en este estudio asocian una mejora del nivel de insaturación a altas tasas de renovación lo que conduce a un aumento inevitablemente en la fluidez de la membrana (Klyachko-Gurvich y otros, 1999; Tzovenis y otros, 2003). Esto deja en evidencia que un suministro de luz suficiente para las

microalgas es útil para obtener un alto contenido de lípidos (Wen y otros, 2016). Mondal y otros (2017), reportan para *Isochrysis galbana* un 32% en el contenido de SFA y 29% de MUFA en comparación con nuestro estudio donde encontramos en promedio (continuo-batch) 49% SFA y 17% MUFA para *Tisochrysis lutea* T-Iso. Sin embargo, tras la operación continua del reactor tubular identificamos incrementos en el contenido de ácidos grasos SFA de ~7% y ~12% MUFA con respecto a la operación del reactor en estático. Ohse y otros (2015), encontraron que el mayor porcentaje promedio de ácidos grasos en *I. galbana* fue de SFA (58.04%), seguido de MUFA (28.80%) y en niveles más bajos de PUFA (12.57%), los cuales fueron consistentes con los resultados encontrados en nuestro estudio. San Pedro y otros (2014), demostraron con *Nannochloropsis gaditana* (crecida en PBR tubular) que conforme la irradiancia promedio en el reactor,  $I_{av}$ , aumentó, se produjo un aumento apreciable en la cantidad de ácidos grasos saturados, tal como se muestra en la Figura 10 ( $I_{av}$  batch y continuo) un incremento en la irradiancia promedio en el reactor ( $I_{av} > 40 \mu E/m^2s$ ) expresa un incremento de los SFA (Cuadro 4). Los principales ácidos grasos saturados C14:0 y C16:0 se incrementaron en continuo 5.2% y 1.6% respectivamente, mientras que los principales ácidos grasos monoinsaturados C16:1 n-7 y C18:1 n-9 aumentaron un ~2% y ~10%. Estos resultados se apoyan a los obtenidos por Sukenik, Zmorab y Carmeli (1993), donde también se observó un aumento en el contenido de ácido palmítico a irradiancias crecientes. En general, las células cultivadas con alta intensidad de luz se caracterizan por una alta síntesis de triacilglicerol, lo que resulta en un bajo contenido de PUFAs y altos niveles de ácidos grasos 16:0 y 16:1 n-7 (Sukenik, Carmeli y Berner, 1989). Las especies *Isochrysis galbana* y *Thalassiosira fluviatilis* contienen más del 50% de SFA, incluidos tanto en los lípidos totales como en los ácidos grasos totales (Ohse y otros, 2015). Según estos autores, en pocas palabras estas microalgas producen niveles más bajos de ácidos grasos insaturados (USFA), que son los más deseables para la nutrición humana y animal. Thompson, Guo y Harrison (1993, 1996), reportan para T-Iso altas cantidades de 14:0 y 16:0, sugiriendo que son de gran importancia para proporcionar energía a las larvas de ostras.

Reportes indican que bajo altas diluciones, es decir, bajo alta irradiancia, las membranas fotosintéticas disminuyen el nivel de insaturación para ajustar la fluidez de las membranas fotosintéticas por el aumento en la proporción de glucolípidos con un nivel más alto de SFA que PUFAs, identificando en *T. lutea* SFA (14:0 y 16:0) y MUFA (18:1 n-9)

predominantes en el almacenamiento de lípidos neutros (Marchetti y otros, 2017). Otros estudios indican que incrementos en la tasa de dilución produjeron aumentos estadísticamente significativos en el porcentaje de ácido oleico (C18:1 n-9) en cultivos de *Pavlova lutheri* (Carvalho y Malcata, 2005). Investigaciones realizadas a un grupo de microalgas se encontró que el ácido graso principal era ácido palmítico (~24%),  $\alpha$ -linolenico (~18%) y ácidos oleicos (~15%) (Bellou y otros, 2014).

Benvenuti y otros (2016), informaron que la estrategia operativa (batch, semicontinuo, continuos) tiene un impacto en la productividad de triglicéridos (TAGs) en la microalga *Nannochloropsis sp.* CCAP 211/78 crecida en fotobiorreactores al aire libre. La formación de TAG se asocia con un mayor porcentaje de ácidos grasos más cortos (Sukenik y Carmeli, 1990; Sukenik, 1999). Se reportó que los procesos semicontinuos o continuos podrían dar como resultado un proceso estable y robusto con una productividad de TAG más alta en comparación con el enfoque por lotes clásico (batch). Otros autores afirman que la producción de TAG semicontinua puede ser rentable si se aplica un enfoque de biorrefinería y se valoriza toda la biomasa (Wijffels, Barbosa y Eppink, 2010). Yeh y Chang (2011), reportan aumentos en la tasa de crecimiento celular y la concentración final de biomasa cuando se emplearon PBR tubulares para *C. vulgaris* ESP-31 identificando ácidos grasos predominantes como el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). Estos tipos de reactores pueden usarse para la producción de lípidos del tipo PUFAs, ya que su alto costo puede ser cubierto por el precio elevado de estos productos (Bellou y otros, 2014). Estudios sugieren que el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* y la producción de lípidos se logró en continuo manipulando adecuadamente la velocidad de dilución (Wen y otros, 2014). Se comprobó que regulando adecuadamente la concentración de nitrato en el cultivo continuo, las células podrían crecer a un ritmo razonable y acumular lípidos simultáneamente, lo que conduciría a una mayor productividad de lípidos sobre cultivos discontinuos. Molina Grima y otros (1996b), realizaron cultivos al exterior con *Phaeodactylum tricornutum* empleando quimiostato encontrando que la productividad de la biomasa aumentó con la tasa de dilución y la irradiancia externa hasta la tasa de dilución óptima. La influencia de la tasa de dilución impacta en la composición bioquímica de las microalgas, a medida que aumenta la tasa de dilución, los contenidos de proteínas y lípidos también aumentan (Camacho-Rodríguez y otros, 2013). Tang y otros (2012), reportan diferencias en los perfiles de ácidos grasos en cultivos de *Chlorella minutissima* y

*Dunaliella tertiolecta* respecto a la tasa de dilución en fotobiorreactores. Afirman que la tasa de crecimiento específico podría controlarse alterando la tasa de dilución del sistema manteniendo un efecto significativo sobre la productividad de biomasa y el perfil de ácidos grasos. Por el contrario, Sobczuk y Chisti (2010), investigaron los efectos de la tasa de dilución en la productividad de lípidos de la microalga de agua dulce *Choricystis minor* en el cultivo de quimiostato, concluyendo que el contenido de lípidos no cambió significativamente con varias tasas de dilución. Los cultivos de microalgas continuos y semicontinuos producen biomasa con una composición bioquímica constante y controlada durante mucho tiempo siendo de gran importancia en la acuicultura especialmente mejorando notablemente el crecimiento y desarrollo de los organismos filtradores como los rotíferos y *Artemia* (Fábregas, Otero, Morales, Arredondo-Vega y Patiño, 1998).

#### Cuadro 4

Ácidos grasos (% peso seco) presentes en la biomasa de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) cosechada en el estado estacionario en la modalidad batch y continuo en PBR-T.

Ácido graso	Peso seco ácidos grasos (%)	
	Batch	Continuo
14:0	25.49	30.68
16:0	20.12	21.71
16:1 n-7	2.83	5.26
18:1 n-9	8.53	18.05
18:2 n-6	3.65	3.93
18:3 n-3	1.79	1.63
18:4 n-3	2.35	0.98
ΣSFA	45.61	52.39
ΣMUFA	11.36	23.31
ΣPUFA	7.79	6.54
USFA	19.14	29.85

Nota. SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; USFA, ácidos grasos insaturados (MUFA+PUFA).

La síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga requiere la presencia de elongasas y desaturasas específicas, que actúan principalmente sobre los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Bellou y otros, 2014). En nuestro experimento se encontraron PUFAs de gran importancia fisiológica como lo son C18:2 n-6, C18:3 n-3 y C18:4 n-3. Se identificó que el contenido de PUFAs disminuyó 1.25% tras operar el reactor tubular en continuo, mientras que las porciones de ácido linoleico/α-linolenico

sufrieron ligeras variaciones entre la operación batch y continuo. Reportes para T-Iso muestran que el aumento en la cantidad de luz repercute en un aumento proporcional de 16:0 y una disminución concomitante de 18:4 n-3 y 18:3 n-3 (Tzovenis y otros, 2003a) tal como se muestra en nuestro estudio. Se conoce que los lípidos tilacoidales en T-ISO contienen principalmente 14:0, 16:0, 18:1 n-9, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 18:5 n-3 y 22:6 n-3, que están presentes también en grandes cantidades en los lípidos de almacenamiento (Sukenik y Wahnon, 1991; Saoudi-Helis, 1994). Probablemente, nuestros resultados con T-Iso, indican que ciertos ácidos grasos fueron enmascarados al proceso de elongación/desaturación hacia ácidos grasos de cadena larga como 22:5 n-6 y 22:6 n-3 por una movilización de reservas de TAG (Tzovenis y otros, 2003a). En un estudio evaluaron mecanismos de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados a partir del ácido linoleico (Mohrhauer, Christiansen, Gan, Deubig y Holman, 1967). Éstos encontraron inhibición en la elongación de la cadena del ácido linoleico (18:2 n-6) a ácido eicosadienoico (20:2 n-6) debido a ciertos ácidos grasos, reportándose inhibiciones >50% provocadas por los ácidos grasos 14:0 (63%), 15:0 (67%), 16:0 (55%), 18:1 n-9 (47%), 18:3 n-3 (72%) y 18:3 n-6 (66%). Se ha definido que los ácidos insaturados de 18 carbonos aparentemente compiten por la misma enzima, y el orden de afinidad (ácido linolénico, linoleico y oleico) (Brenner y Peluffo, 1966). Estos hechos podrían explicar los perfiles de ácidos grasos obtenidos en nuestro estudio en cultivos de *Tisochrysis lutea* T-Iso.

Los mecanismos de la biosíntesis de ácidos grasos de novo y el ensamblaje de TAG se entienden ampliamente para muchas microalgas (Radakovits y otros, 2012; Guschina y Harwood, 2006), pero las redes reguladoras involucradas en la degradación, interconversión y re-ensamblaje de PUFA de cadena larga como el EPA durante condiciones de estrés no están bien descritas (Hulatt, Wijffels, Bolla y Kiron, 2017). Según Hulatt y otros (2017), estos mecanismos podrían ser importantes para determinar la división de los ácidos grasos n-3 en diferentes grupos de lípidos y, por lo tanto, alterar su biodisponibilidad. Schuchardt, Huss, Stauss y Hahn (2009), reportan que a través de una serie de desaturaciones y elongaciones, ácidos grasos como el LA se convierte en ARA, mientras que ALA se convierte en EPA y después en DHA, pero en esta conversión los ácidos grasos n-3 y n-6 compiten por los mismos sistemas enzimáticos. Se ha referenciado en otros estudios sobre el metabolismo de ácidos grasos que el estado de

los cofactores también parece tener una influencia en la conversión y el estado de los ácidos grasos n-3 (Schuchardt y otros, 2009).

Los minerales como el magnesio (Galland, 1985) y el zinc (Arnold y DiSilvestro, 2005), son cofactores de enzimas desaturasa cruciales. La falta de estos micronutrientes produce una inhibición de la actividad enzimática. Se ha evaluado el efecto de los metales pesados en la inhibición del metabolismo de ciertas clases de lípidos en algas, lo que condujo a un aumento relativo en los triacilgliceroles (Guschina y Harwood, 2006b). Se han observado alteraciones en los lípidos, inhibición de rutas biosintéticas y reducción en ácidos grasos insaturados debido a la peroxidación potenciada por metales (Dietz, Baier y Kramer, 1999; Harwood, 1994; Rama Deli y Prasad, 1999). La síntesis de PUFAs de cadena larga (LC-PUFA) involucra ácidos grasos C18 como precursores, por lo que una posible disminución en el grado de saturación y elongación de los ácidos grasos podría deberse a una respuesta adaptativa a la limitación de energía (Van Wagenen y otros, 2012). Se ha descrito desde el punto de vista de la ingeniería metabólica, el bloqueo de rutas competidoras también puede mejorar el flujo metabólico que se canaliza a la biosíntesis de TAG (Courchesne, Parisien, Wang y Lan, 2009). Estudios acerca del enfoque multigénico, es decir, sobreexpresión de más de una enzima clave en la biosíntesis de lípidos permitieron potencializar la ruta TAG (Roesler, Shintani, Savage, Boddupalli y Ohlrogge, 1997; Verwoert, Van Der Linden, Walsh, Nijkamp y Stuitje, 1995). Estos hechos podrían explicar el porqué de los resultados obtenidos en los perfiles de ácidos de grasos de *Tisochrysis lutea* T-Iso. Hipotéticamente también estos resultados se asocian al hecho que en cultivos continuos existe una mayor cantidad de luz ( $>100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) disponible para las microalgas en comparación con cultivos estáticos como se muestra en la Figura 10. El efecto de la intensidad de la luz a menudo depende de la tasa de dilución (Carvalho y Malcata, 2005). Se ha comprobado en la microalga *Chlorella sp.*, que la longitud de la cadena de los ácidos grasos disminuye conforme incrementa la intensidad de la luz (Hempel, Petrick y Behrendt, 2012), lo que podría también asociarse con los resultados encontrados en este estudio. Por tal motivo podemos asociar la irradiancia, como un factor importante que afecta la productividad de los lípidos que se relacionada con la eficiencia fotosintética y la asimilación de carbono (Chen y otros, 2015; Li, Wakao, Fisher y Niyogi, 2009). Sukenik y otros (1989) (1993), reportan para *Nannochloropsis sp.*, que el aumento de la intensidad de la luz condujo a una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados, acompañado por un aumento de C16:0 y C16:1.

Otros estudios indican que cuando se cultiva bajo condiciones de luz alta se favorece la producción de TAG, al igual que se da un aumento en el porcentaje de C16:0 y C18:1, pero con una disminución en el porcentaje de EPA, lo que indica la relación obvia entre la descomposición de EPA presente en la membrana tilacoidal y una mejor biosíntesis de lípidos neutros (Solovchenko y otros, 2014). Por otro lado, también es importante tomar en consideración que la síntesis de PUFA en microalgas se debe principalmente a una vía aeróbica que implica la adición secuencial de dobles enlaces a ácidos grasos saturados, principalmente 18:0 y 16:0, a través de desaturasas  $\Delta 9$  y  $\Delta 12$  (o n-6) para producir 18:2 n-6 (ácido linoleico, LA), que luego puede ser desaturado adicionalmente por  $\Delta 15$  (ó n-3) desaturasa para dar 18:3 n-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico, ALA) (Monroig, Tocher y Navarro, 2013; Guschina y Harwood, 2006). Se conoce que los PUFA n-6 compiten con los PUFA n-3 por las enzimas implicadas en la síntesis de PUFAs de cadena larga (Domenichiello y otros, 2016; Sprecher, Chen y Yin, 1999), hecho que pudo observarse en este experimento donde se registra mayor cantidad de ácido linoleico (n-6) en comparación con el ácido  $\alpha$ -linolénico (n-3). Estos últimos son considerados ácidos grasos esenciales debido a que son precursores vitales en la síntesis de otros ácidos grasos poliinsaturado omega-3 y omega-6 importantes, como EPA, DHA y ARA (Custódio y otros, 2013). Por tal razón, *Tisochrysis lutea* es una microalga utilizada ampliamente como alimento vivo en la acuicultura especialmente en criaderos de bivalvos debido a su ventajoso espectro de ácidos grasos y su relativa facilidad de cultivo (Ewart y Pruder 1981; Napolitano, Ackman y Ratnayake, 1990). En otros términos, se ha demostrado que la composición de los ácidos grasos determina la estabilidad oxidativa y las propiedades de rendimiento del biodiesel (Cuellar-Bermudez y otros, 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son susceptibles a la oxidación, y los lípidos completamente saturados aumentan el punto de enturbiamiento y la viscosidad del biodiesel (Knothe, 2012), siendo los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) los lípidos más deseables (James, Hocart, Hillier, Price y Djordjevic, 2013). Los aceites ricos en ácidos linoleico (C18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3) tienden a tener una estabilidad oxidativa deficiente (Stansell, Gray y Sym, 2012). Es por ello que uno de los desafíos importantes que debe superarse para la producción rentable de biodiesel de microalgas es la selección de microalgas con gran productividad de lípidos con un perfil TAG adecuado para la aplicación de biodiesel (Taleb y otros, 2014). La producción comercial de PUFA de microalgas es actualmente un objetivo mucho más alcanzable que la producción de biodiesel (Bellou y otros, 2014). En realidad, las fuentes

naturales de PUFA son muy limitadas y, por lo tanto, las microalgas tienen un gran potencial industrial.

#### 4.2. Cultivo de *Tisochrysis lutea* empleando columnas de burbujeo (PBR-BC)

Se evaluó el crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en columnas de burbujeo de 100 L, localizadas en la Estación Experimental Las Palmerillas, Almería, España. La microalga fue cultivada en un medio fertilizante (Cuadro 5) preparado sobre una solución salina a base de sal marina (NaCl 30 g/L) al exterior, y estuvo expuesta a intensidades de luz que oscilaban entre  $\sim 2000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  durante el día. Durante el experimento se realizaron mediciones de la absorbancia a 680 y 750 nm, fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia media (Iav), peso seco, análisis de ácidos grasos y composición bioquímica a la biomasa producida.

##### Cuadro 5

Composición del medio de cultivo empleado para el cultivo de T-Iso en PBR-BC.

Nutrientes	Medio Fertilizante
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , mg/L	800
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100
MgSO <sub>4</sub>	350
WelgroMix, mL/L	0.02
Karentol, g/L	0.02
Oligoelementos, mL/L	0.1
Vitaminas, mL/L	0.1

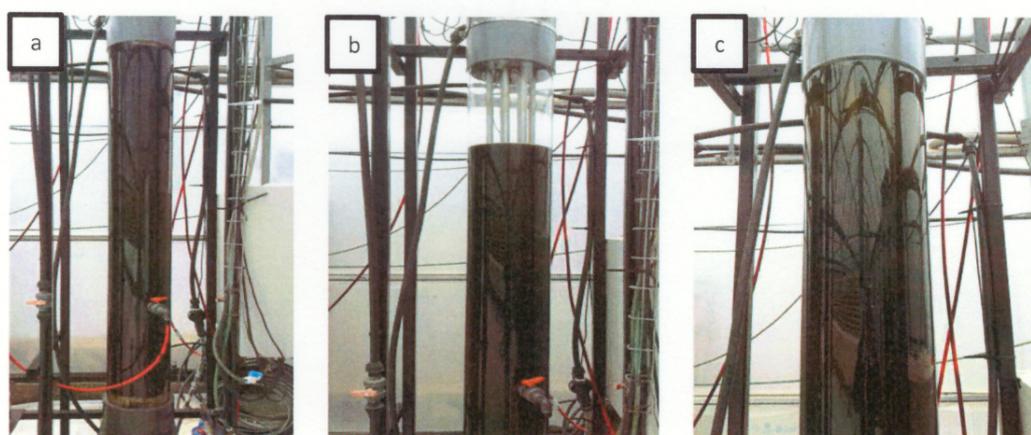


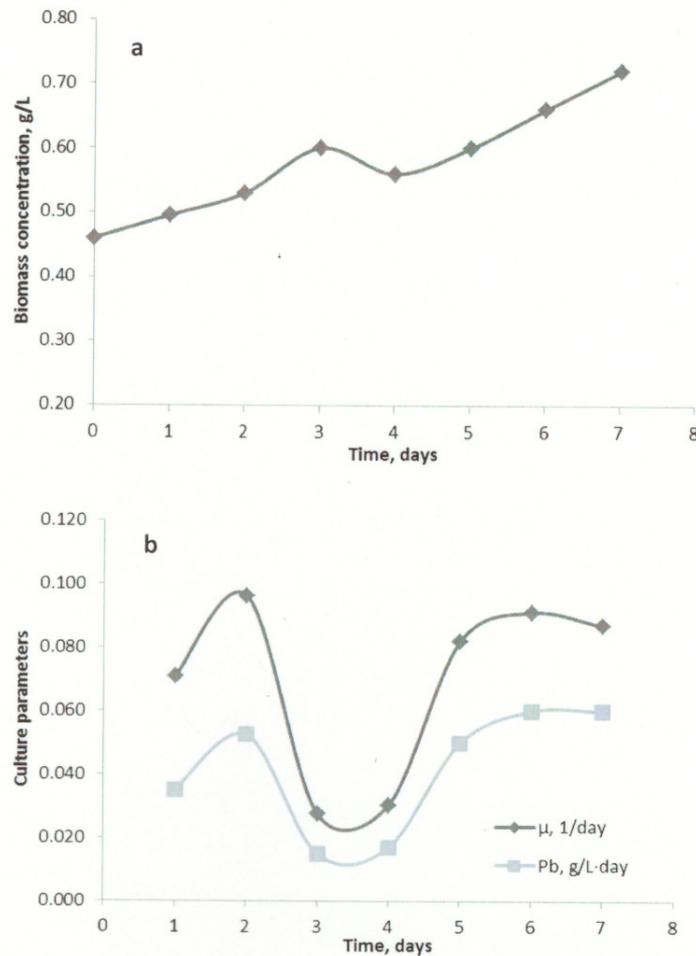
Figura 12. Crecimiento de T-Iso en columnas de burbujeo de 100 L, a) Batch, b) y c) Semicontinuo.

#### 4.2.1. Parámetros monitoreados durante el cultivo de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en columnas de burbujeo (PBR-BC).

##### 4.2.1.1. Concentración (Cb), productividad (Pb) de biomasa, velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de nutrientes respecto al tiempo.

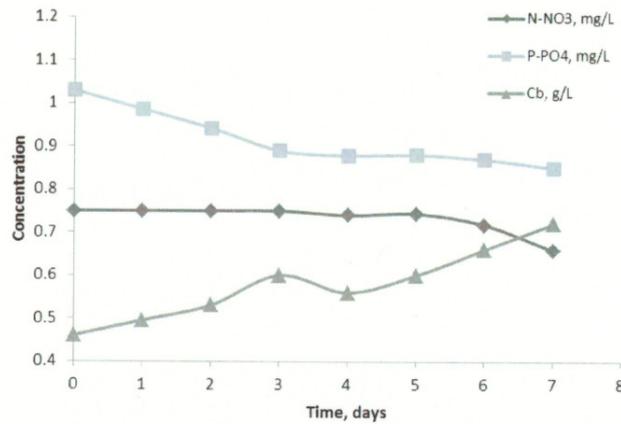
En la Figura 12, se aprecian cultivos de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en columnas de burbujeo en estático y empleando diluciones del 20 y 30%. Los resultados obtenidos muestran que la microalga creció durante la fase de cultivo batch, como se muestra en la Figura 13a, donde se obtuvo una concentración de biomasa cercana a los 0.7 g/L. La velocidad de crecimiento máxima fue de  $0.1 \text{ día}^{-1}$ , que descendió entre el día 3 y 4 del ensayo pero se recuperó luego del día 5 permaneciendo casi constante. Por otro lado, la productividad de biomasa máxima obtenida osciló en  $0.1 \text{ g/L-día}$  reflejando un comportamiento similar a la velocidad de crecimiento de la microalga (Figura 13b). Estudios reportan para *I. galbana* concentraciones y productividades de biomasa de 0.47 g/L y  $0.16 \text{ g/L-día}$  (Patil et al., 2007); 0.49 g/L y  $0.043 \text{ g/L-día}$  (Lin, Chang, Tsao y Leu, 2007); *Isochrysis sp.* 0.53 g/L (Liu y Lin, 2001). Por otro lado, en una investigación se emplearon diecinueve cepas de *Isochrysis* y cepas similares a *Isochrysis* para una evaluación de su potencial como productoras de DHA en los que realizaron cultivos en PBRs columnas de burbujeo (Liu y otros, 2013). CS-177, *I. galbana* # 153180, CCMP1244, CCMP1324 y CCMP463 fueron las cepas que expresaron la mayor productividad de biomasa (entre  $\sim 0.4$  y  $\sim 0.35 \text{ g/L-día}$ ), mientras que UTEX 1292, UTEX 987 y CCMP 355 (entre  $\sim 0.2$  y  $\sim 0.05 \text{ g/L-día}$ ) exhibieron la menor productividad de biomasa, lo que indica que el potencial de crecimiento de *Isochrysis* es en gran medida dependiente de la especie / cepa. Investigaciones con la microalga *Haematococcus pluvialis* en columnas de burbujeo muestran que el organismo puede alcanzar hasta una concentración de biomasa máxima de 1,4 g/L y una productividad de biomasa de  $0.06 \text{ g/L-día}$  (Brennan y Owende, 2009; García-Malea y otros, 2006). Con la microalga *Chlorella sp.* la concentración de biomasa al final de la fase exponencial en columnas de burbujeo fue  $\sim 1.9 \text{ g/L}$  (Rasoul-Amini, Montazeri-Najafabady, Mobasher, Hoseini-Alhashemi y Ghasemi, 2011). Comparando distintas cepas de *Chlorella vulgaris* cultivadas en columnas de burbujeo en la modalidad batch se reporta para la especie CCALA P12 productividades de biomasa de  $1.0 \text{ g/L-día}$  (Anjos, Fernandes, Vicente, Teixeira y Dragone, 2013), mientras que la especie Buitenzorg (RCFWF) valores de  $2.4 \text{ g/L-día}$

(Wijanarko, 2011). Otros estudios con PBRs de columna de burbujeo en la modalidad batch registran productividades de biomasa de 0.173 g/L-día para *Neochloris oleoabundans* (Peng, Zhang, Cheng, Wang y Lan, 2016), 0.028 g/L-día para *Scenedesmus sp.*, 0.017 g/L-día para *Nannochloropsis salina* (Pegallapati y Nirmalakhandan, 2013) y 0.045 g/L-día para *Chlorella minutissima* (Pereira y otros, 2018). Se ha reportado que las columnas de burbujeo (de hasta 0.19 m de diámetro) pueden alcanzar una concentración de biomasa y una tasa de crecimiento específica que pueden ser comparables a los valores reportados típicamente para los fotobiorreactores tubulares angostos (Sánchez Mirón, Cerón, García, Molina Grima y Chisti, 2002). Wong, Ho, Tsang, Wang y Yung (2016), afirman que PBRs columna de burbujeo fueron la mejor opción para el cultivo de *Chlorella vulgaris* comparado con Air-lift y Air-lift poroso. La concentración de biomasa más alta en la columna de burbujeo fue de 0.78 g/L, mientras que el Air-lift tuvo un valor de 0.09 g/L. Estos hechos pueden estar relacionados a una mayor velocidad de flujo que proporciona mejores efectos de mezcla en columnas de burbujeo, lo que no solo evita la sedimentación de microalgas, sino que también absorbe más energía de la luz para que la fotosíntesis tenga una mayor productividad de biomasa. En otra instancia, cultivos al exterior de dinoflagelados y rafidófitos en columnas de burbujeo presentan concentraciones y productividades de biomasa >1 g/L y > 0.2 g/L-día (Fuentes-Grünwald y otros, 2012). Hincapie y Stuart (2015), informaron el uso de un PBR airlift de 28 L para el cultivo de *Chlorella sp.* bajo condiciones autotróficas encontrando una tasa de crecimiento específica constante de 0.01 h<sup>-1</sup> (0.24 día<sup>-1</sup>). Esto sugiere que PBR de columnas de burbujeo permiten un mezclado homogéneo de las células donde la entrada de gas promueve la aireación y la dispersión (Fuentes-Grünwald y otros, 2012). Se sabe que este tipo de PBR tiene una alta relación superficie / volumen y un área de superficie pequeña (Morweiser, Kruse, Hankamer y Posten, 2010). En tanto, estos sistemas se caracterizan por el burbujeo, que impacta de manera ventajosa sobre la producción de biomasa al crear en el medio de cultivo una turbulencia que mejora la transferencia de gases y provoca que el total de las células se trasladen a través de la zona de mayor incidencia lumínica con alta frecuencia (Rost, Perales, Carstens y Pérez, 2017). Este efecto provoca que el principal fenómeno que afecta la captación lumínica por parte de la biomasa se debe a que las células que se encuentran más cercanas a la pared iluminada del PBR provocan que la luz llegue progresivamente atenuada a las que se encuentran en el interior del recipiente, efecto que se intensifica con el aumento de la concentración.



**Figura 13.** Concentración de biomasa a), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y productividad de biomasa (Pb) b) para la microalga T-Iso en columnas de burbujeo.

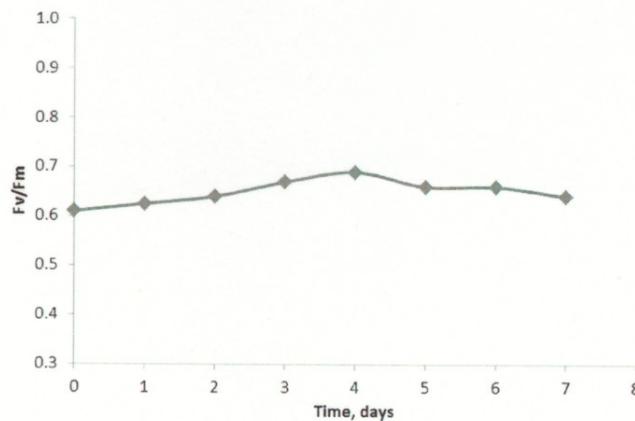
Por otro lado, la concentración de nutrientes como nitratos ( $N-NO_3$ ) y fosfatos ( $P-PO_4$ ) se redujo durante la fase de crecimiento en batch de T-Iso, indicando que ésta los aprovechó para su crecimiento tal como se muestra en la Figura 14. Se observa como decrece la concentración de tales nutrientes esenciales para la microalga y como aumenta la concentración de biomasa durante esa fase de cultivo. Liu y otros (2013), mostraron el efecto del nitrógeno y fósforo sobre el crecimiento de la microalga *I.galbana* #153180, encontrándose que a mayores concentraciones de nutrientes se logró una mayor densidad celular, reportándose el consumo de estos nutrientes durante el ensayo.



**Figura 14.** Concentración de biomasa y consumo de nutrientes (N-NO<sub>3</sub> y P-PO<sub>4</sub>, mg/L) durante la fase de cultivo batch para la microalga T-Iso.

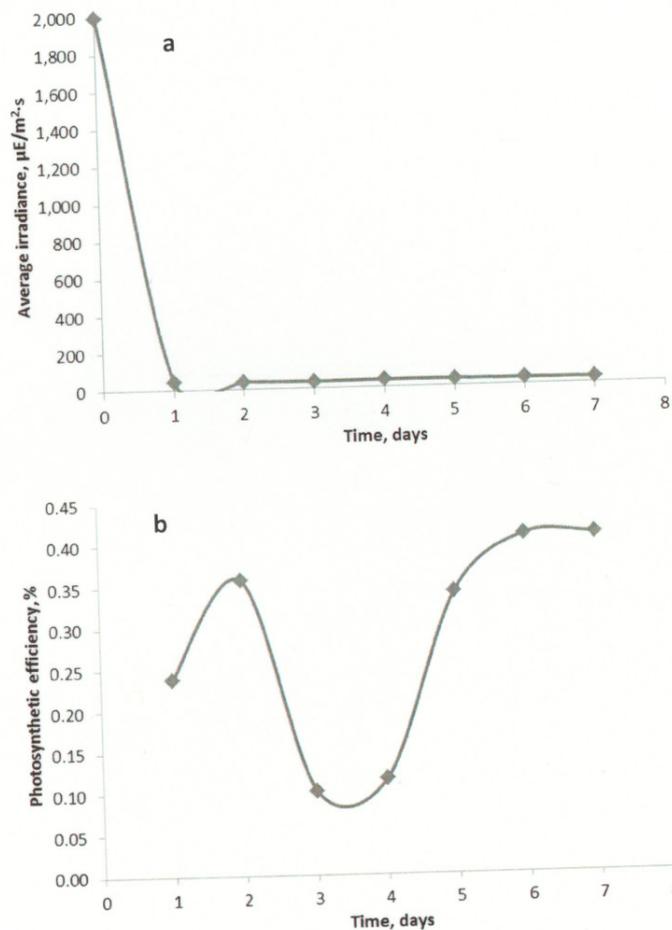
#### 4.2.1.2. Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm), irradiancia promedio (Iav), eficiencia fotosintética respecto al tiempo.

En la Figura 15, se observa el desarrollo de la fluorescencia de clorofilas durante la fase de cultivo de T-Iso. Esta presenta valores entre 0.6 y 0.7. Estos resultados sugieren que la microalga crecida en las condiciones previamente señaladas no refleja signos de estrés fisiológico producto del entorno, lo que indica estabilidad en el crecimiento de las células en esas condiciones. Cuaresma (2011), establece 0.7 como un valor típico para células sanas (Fv/Fm=0.7). Sin embargo, otros autores reportan valores de Fv/Fm próximos a 0.6 a irradiancias < 100 μE/m<sup>2</sup>s (Beuzenberg y otros, 2016).



**Figura 15.** Fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) en sistema de cultivo tipo batch para la microalga T-Iso.

La Figura 16a, muestra como la irradiancia promedio en cultivos de T-Iso disminuye conforme se desarrolla el ensayo batch o estático. La irradiancia promedio dentro de las columnas de burbujeo se mostró constante a partir del segundo día del ensayo con valores  $< 100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , este hecho resulta ser lógico al tratarse de ensayos en columnas de burbujeo de 0.25 m de diámetro donde el efecto de autosombreado juega un papel crucial. En tanto, la eficiencia fotosintética (Figura 16b) durante el cultivo no supera el 1%, lo que representa un valor bajo considerando que lo óptimo supera el 2%. Se ha descrito, que la intensidad de la luz dentro del cultivo depende de la concentración celular (Molina Grima y otros, 1995). Según éstos, en cultivos densos, hay un gradiente de luz a lo largo del radio del reactor, debido a la atenuación de la luz, por lo tanto, a medida que la concentración de biomasa aumenta disminuye la luz interna promedio.



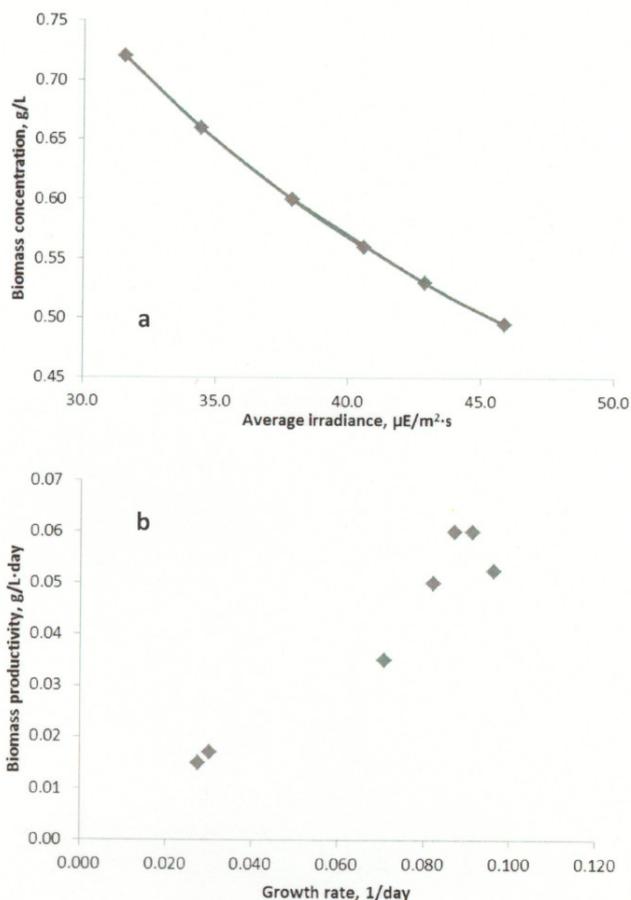
**Figura 16.** Irradiancia promedio (lav) (a), y Eficiencia fotosintética (b) de la microalga T-Iso.

De acuerdo con la Figura 17a, se muestran resultados de la relación entre la concentración de biomasa ( $C_b$ ) y la irradiancia promedio ( $I_{av}$ ), la cual disminuye conforme incrementa la irradiancia dentro de la columna. Sin embargo, la productividad de biomasa se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento (Figura 17b), en donde a una mayor velocidad de crecimiento se registra un incremento en la productividad de biomasa de T-Iso.

En un estudio con *H. pluvialis*, la irradiancia media en el fotobiorreactor tubular fue 2,8 veces mayor que en la columna de burbujas, y la productividad máxima diaria de biomasa en el fotobiorreactor tubular fue de 0,55 g/L-día, en comparación con 0,12 g/L-día medido en columnas de burbujeo (García-Malea y otros, 2006). La columna de burbujeo tenía una gran limitación de luz, la productividad máxima de biomasa en este reactor se midió a la irradiación media máxima de 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Por otro lado, el fotobiorreactor tubular estaba saturado con luz, y la productividad máxima de biomasa de 0.55 g/L-día se midió a una irradiancia promedio óptima de 130  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ .

Tomando en cuenta estos hechos, analizamos nuestros resultados comparando las Figuras 7 (PBR-T) y 17 (PBR-BC), y observamos que con el PBR tubular se obtienen mayores  $P_b > 0.15$  g/L-día a  $\mu > 0.2$  día<sup>-1</sup> en comparación con PBR columna con  $P_b \sim 0.1$  g/L-día a  $\mu \sim 0.1$  día<sup>-1</sup>.

El empleo de PBR-T facilita valores de  $I_{av} > 70$   $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  y  $C_b \sim 0.9$  g/L, que resultan ser mayores que las obtenidas con PBR-BC de  $I_{av} > 30$   $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  y  $C_b > 0.7$  g/L. De acuerdo con García-Malea y otros (2006), la irradiancia o la disponibilidad de luz es una función de la ubicación y el diseño del reactor. El uso de fotobiorreactores horizontales de diámetro de tubo pequeño mejora la irradiación en la superficie del reactor, aumentando así la velocidad de crecimiento y la productividad de biomasa del reactor.



**Figura 17.** Correlación entre, a) concentración de biomasa ( $C_b$ ) y la irradiancia promedio ( $I_{av}$ ), y b) productividad de biomasa ( $P_b$ ) respecto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ).

#### 4.2.1.3. Comparación entre la modalidad de cultivo batch y semicontinuo (20 y 30%) en columnas de burbujeo.

El crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en columnas de burbujeo se realizó en batch o estático y empleando diluciones del 20 y 30% del volumen total de la columna. En estos, se evaluó el desarrollo de las células a fin de conocer la estabilidad que presentaban los cultivos. En la Figura 18, se agrupan datos del estado estacionario de la microalga en cultivo en estático y semicontinuo. Se observa que la concentración de biomasa es más estable, con una dilución del 20%, cerca de los 0.8 g/L, superando al cultivo en batch y una dilución del 30%, ya que esta última es de esperarse sea inferior

por el volumen de medio que se ingresa a la columna. Carvalho y Malcata (2005), informan que a medida que aumenta la tasa de dilución, el rendimiento de biomasa disminuye concomitantemente. Camacho-Rodríguez y otros (2013), reportan que la concentración de biomasa ( $C_b$ ) disminuyó con la dilución en cultivos de *N. gaditana* en reactores de bolsas circular (LB-PBR) y panel plano (FP-PBR).

Cambios en la tasa de dilución del cultivo continuo tuvieron un impacto significativo en la densidad celular y la concentración de biomasa en estado estacionario de la microalga *Chlorella minutissima* (Tang y otros, 2012). Estos esperaban que el aumento de la tasa de dilución redujera la concentración de biomasa en estado estacionario de 0.73 g/L a ~0.1 g/L. La tasa de dilución también tuvo un impacto notable en la concentración de biomasa en el estado estacionario de un cultivo de quimiostato de *C. pyrenoidosa* XQ-20044 (Wen y otros, 2014). Al aumentar las tasas de dilución, el peso seco de la biomasa disminuyó, sin embargo, la productividad de biomasa del cultivo de quimiostato aumentó en respuesta a las crecientes tasas de dilución pero disminuyó a alta tasas de dilución.

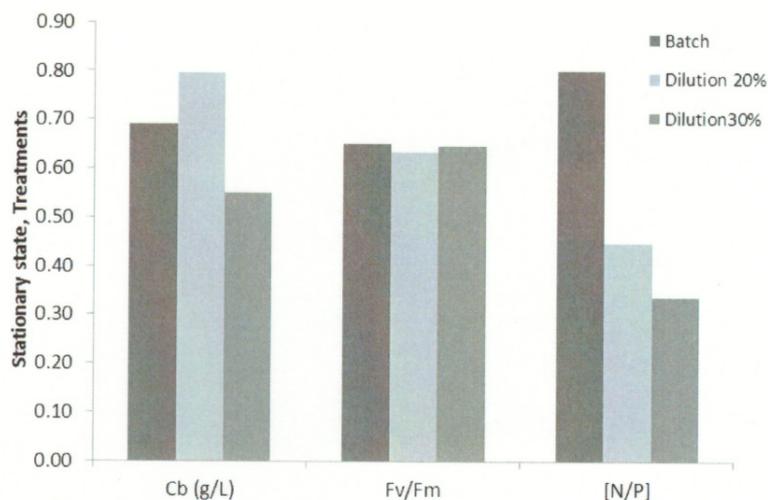
Comparando experimentos semicontinuos y discontinuos se encontraron mayores tasas de crecimiento específico y productividad para cultivos de *Spirulina platensis* en semicontinuo, probablemente debido a que durante el cultivo semicontinuo las células estaban mejor adaptadas al medio de cultivo, manteniéndose en fase exponencial (Reichert, Reinehr y Costa, 2006), contrario al sistema discontinuo o batch, que se caracteriza porque no hay adición o eliminación de nutrientes posterior a la inoculación, comprometiendo la estabilidad de la composición bioquímica microalgal (Zhukova, 2004).

La estrategia operativa semicontinuo o continuo tiene un impacto en la productividad biomasa y lípidos en microalgas (Benvenuti y otros, 2016). Datos sugieren que el crecimiento simultáneo de microalgas y la producción de lípidos se lograron en cultivo continuo manipulando adecuadamente la velocidad de dilución (Wen y otros, 2014). Los cultivos de microalgas continuos y semicontinuos producen biomasa de composición bioquímica constante y controlada (Fábregas y otros, 1998). Esto sugiere que el empleo de adecuadas tasas de dilución favorece al desarrollo de las microalgas. Rost y otros (2017), sugieren que las condiciones de cultivo de microalgas influyen directamente en la tasa de producción de biomasa, al igual que el empleo de reactores de columna de burbujeo pueden proporcionar un análisis confiable sobre los efectos de las condiciones de cultivo en la cinética de crecimiento, ya que estos tienen un gran potencial para el

cultivo a gran escala, facilidad de esterilización y fotoinhibición reducida. Otros estudios indican que los reactores de columnas verticales son una opción realista para producir grandes cantidades de biomasa de microalgas (Sánchez Mirón, Gómez, Camacho, Molina Grima y Chisti, 1999), debido a una buena capacidad para eliminar el oxígeno, la biomasa en los reactores verticales no experimenta la inhibición del oxígeno de la fotosíntesis (Sánchez Mirón y otros, 2002). En contraste con otros tipos de reactores (PBR tubular o placa plana) una columna de burbujeo produce patrones de flujo celular más aleatorios ya que el sistema de elevación aérea produce un patrón de flujo más homogéneo que mueve las células de zonas oscuras a zonas claras (Kaewpintong, Shotipruk, Powtongsook y Pavasant, 2007). Por lo tanto, las células en una columna de burbujas pueden residir en intensidades de luz altas o bajas durante un tiempo prolongado.

La relación  $F_v/F_m$  se utiliza principalmente como indicador de estabilidad de las células de las microalgas (Yentsch C.S., Yentsch, C.M., Phinney, Lapointe y Yentsch, S., 2004). En nuestro caso la fluorescencia de las clorofilas ( $F_v/F_m$ ) reportadas durante el estado estacionario de los tratamientos se muestra casi constante entre los 0.6 y 0.7, lo que indica que los cultivos no se encontraban bajo estrés durante esta fase de cultivo mostrando estabilidad de las células. La relación de fluorescencia ( $F_v / F_m$ ) se emplea como una herramienta para estimar la eficacia máxima de PSII (Baker, 2008; de Mooij y otros, 2014). Se encontró que independientemente del modo de cultivo (batch, o continuo) la relación  $F_v/F_m$  de *Acutodesmus obliquus* (alga verde) siempre se mantuvo  $\geq 0,6$  (Remmers y otros, 2017).

En cuanto a las proporciones moleculares de N:P se conoce que éstas pueden proporcionar una medida integrada de la capacidad de absorción de nutrientes para las células de algas (Beardall y otros, 2001b; Fresnedo y Serra 1992; Qin, Lin y Jiang, 2012). De acuerdo con los resultados presentados por Rasdi y Qin (2014), las tasas de crecimiento de *Tisochrysis lutea* y *Nannochloropsis oculata* bajo una relación N:P (5:1), muy cercana a la de nuestro estudio (6:1 N:P), fueron  $\sim 0.9 \text{ días}^{-1}$  mayor que las obtenidas en cultivos de T-Iso en columna de burbujeo en batch ( $> 0.1 \text{ días}^{-1}$ ). Por otro lado, al analizar la relación de nutrientes disponibles para la microalga en este caso ( $N\text{-NO}_3/P\text{-PO}_4$ ) en los tratamientos encontramos una mayor relación de N/P en cultivos batch, contrario a los cultivos diluidos al 20 y 30%, lo que podría asociarse al consumo de estos nutrientes por la microalga.

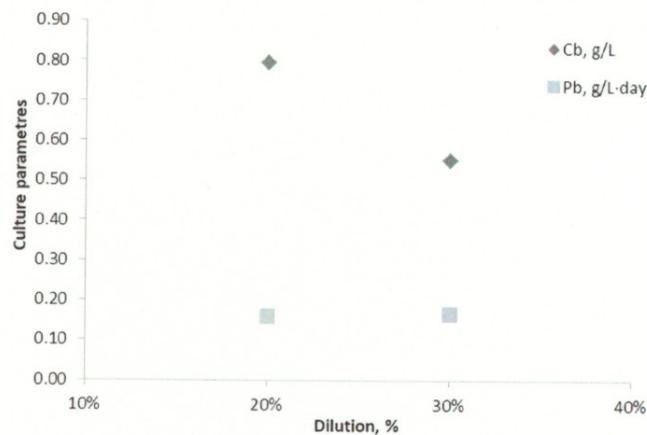


**Figura 18.** Concentración de biomasa (Cb), fluorescencia de clorofilas (Fv/Fm) y relación nitrógeno-fosforo (N/P) en el estado estacionario en la modalidad batch y semicontinuo.

En la Figura 19, se muestra la concentración y productividad de biomasa tras la operación en semicontinuo de T-ISO empleando diluciones. Se observa que una tasa de dilución del 30% favorece una menor concentración de biomasa en comparación con una dilución del 20%. La productividad de biomasa reportada con una dilución del 20% fue 0.16 g/L-día mientras que una dilución del 30% se obtiene 0.17 g/L-día. La posible adaptación de las células de microalgas a las condiciones de cultivo podría permitirles alcanzar altas cantidades de biomasa (Lucas-Salas y otros, 2013).

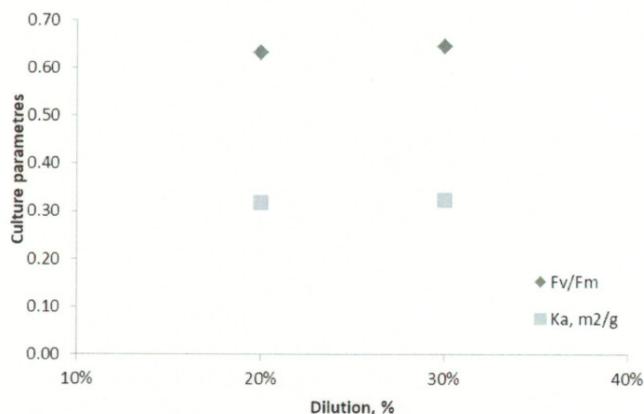
Se reporta que el empleo de un sistema de cultivo continuo permite mejorar la producción de biomasa de *Spirulina platensis* (Pedrosa y otros, 2011). Incrementos en la tasa de dilución se ha comprobado producen una disminución en la concentración de biomasa (Barbosa y otros, 2003). Estos autores indican que sustratos limitantes como la luz, no puede almacenarse en el medio de cultivo, un aumento en la tasa de dilución conducirá directamente a una disminución en la concentración de biomasa, lo que dará como resultado una mayor intensidad de luz media dentro del reactor y un consiguiente aumento de la tasa de crecimiento. Un incremento de la productividad (semicontinuo) se reportó en función del incremento de la tasa de dilución y la intensidad de luz. Estudios revelan que la productividad se ve limitada por la eficiencia en que la luz absorbida se convierte en energía bioquímica y no por la eficiencia en la absorción de la luz (deMooij y otros, 2014). El hecho que se registren bajas productividades de biomasa se asocia a lo

previamente señalado y al hecho que la productividad volumétrica es el producto de la concentración de biomasa y la tasa de dilución.



**Figura 19.** Concentración y productividad de biomasa en estado estacionario de los tratamientos semicontinuo.

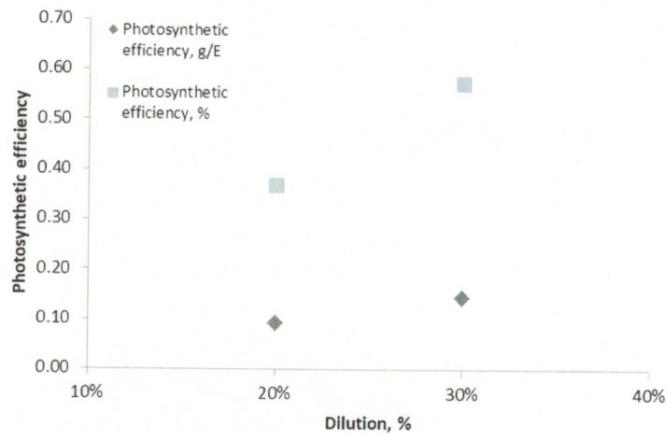
Como se referenció previamente, la fluorescencia de las clorofilas de los tratamientos semicontinuo se mantuvo entre los 0.6, mostrando la ausencia de estrés fisiológico de las células, tal como se presenta en la Figura 20. Acién, García, Sánchez, Fernández y Molina Grima (1997), encontraron una relación entre la concentración de biomasa y el coeficiente de absorción de la biomasa ( $K_a$ ), ya que cuando la concentración de biomasa aumenta,  $K_a$  disminuye. Este hecho pudo observarse en los datos obtenidos, ya que a una dilución del 20% y a una  $C_b$ , g/L=0.80 se obtiene un  $K_a$ ,  $m^2/g = 0.317$ , mientras que con una tasa de dilución del 30% se registra una  $C_b$ , g/L=0.55 y un  $K_a$ ,  $m^2/g = 0.324$ , corroborando lo antes señalado (Figura 20). Esto supone que a bajas concentraciones de biomasa, existe un efecto de dispersión de la luz, importante en todas las direcciones, haciendo que la contribución de la dispersión a la atenuación sea superior a la absorción (Acién Fernández y otros, 1997).



**Figura 20.** Parámetros de cultivo ( $F_v/F_m$  y  $K_a$ ) del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.

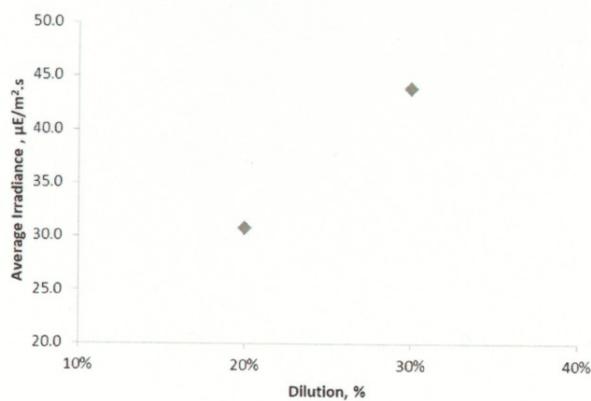
La disponibilidad de luz para los cultivos de microalgas resulta ser un factor de gran importancia, en donde la actividad fotosintética de las células aumenta conforme se incrementa la intensidad de luz hasta el punto de saturación (Mandalam y Palsson, 1998; Suh y Lee, 2003).

La eficiencia fotosintética registrada durante el estado estacionario con las diluciones del 20 y 30%, sugieren que con una dilución del 30% se mejora la eficiencia fotosintética de la células, ya que al existir más luz disponible dentro del reactor ésta permite que las microalgas la aprovechen (Figura 21). La fotosíntesis depende de la luz, la temperatura y los nutrientes (Eppley, 1972; Cullen, Yang y MacIntyre, 1992; Falkowski y Kolber, 1993; Kirk, 1994). La relación entre fotosíntesis e irradiación (Jassby y Platt, 1976) y la influencia de la luz sobre las tasas de crecimiento (Eppley, 1980; Langdon, 1988) y la eficiencia fotosintética (Dubinsky, 1992) han sido bien documentadas y cuantificadas.



**Figura 21.** Eficiencia fotosintética del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.

El efecto de la mejora en la eficiencia fotosintética puede atribuirse al incremento en la irradiancia promedio ( $I_{av}$ ) dentro de las columnas de burbujeo (Figura 22), ya que la eficiencia fotosintética en términos de energía, se ve afectada por la irradiancia total y la distribución de la longitud de onda de la luz (Gutierrez-Wing, Silaban, Barnett y Rusch, 2014). Se observa que con una dilución del 30% se favorece una mayor disponibilidad de luz lo que supone un efecto sobre una mejora en la eficiencia fotosintética de la microalga. Por lo tanto, incremento en la tasa de dilución aporta una mayor disponibilidad de luz, lo que se consigue mediante una disminución en la concentración de biomasa (Sánchez y otros, 2008b).



**Figura 22.** Irradiancia promedio ( $I_{av}$ ) del estado estacionario en los tratamientos en semicontinuo.

#### 4.2.1.4. Análisis de Ácidos grasos a la biomasa de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) en Columnas de burbujeo

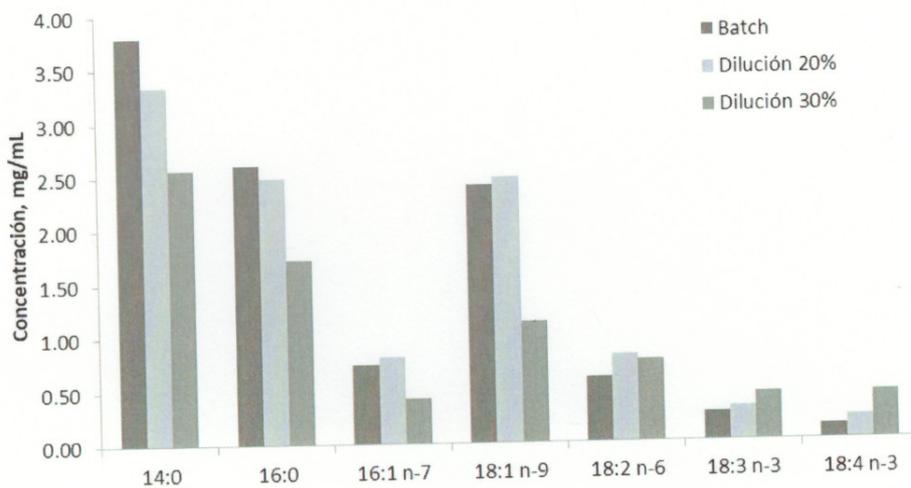
En este apartado se presentan los resultados obtenidos tras el análisis cromatográfico de los ácidos grasos presentes en la biomasa de *Tisochrysis lutea* cultivada en columnas de burbujeo en la modalidad batch y semicontinuo empleando diluciones del 20 y 30%.

En la Figura 23, se muestra predominancia de los ácidos grasos saturados (SFA), mirístico (14:0) y palmítico (16:0) en concentraciones promedio respectivamente de 3.2 y 2.3 mg/mL. Adicionalmente se registra abundancia del ácido graso monoinsaturado (MUFA), oleico (18:1 n-9) en cantidades 2.0 mg/mL siendo uno de los principales de este estudio. Se detectaron otros MUFAs y PUFAs tales como el palmitoleico (16:1 n-7), linoleico (18:2 n-6),  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) y el ácido estearidónico (18:4 n-3). Se conoce que los ácidos grasos más comunes de las microalgas son palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) (Knothe, 2009). Poisson y Ergan (2001), reportaron altos niveles de ácidos grasos 14:0, 16:0, 18:1 y 22:3 para *I. galbana*. Altas cantidades de los ácidos grasos 14:0, 16:0 y 18:1 también se informaron previamente para *I. galbana* (Qi y otros, 2003). Renaud y otros (1999), reportaron para las microalgas *Isochrysis sp.* y *Chaetoceros sp.* altas cantidades de SFA 14:0 y MUFA 18:1 n-7. Aumentos en el contenido de los ácidos grasos saturados (14:0 y 16:0) y monoinsaturados (16:1 n-7 y 18:1 n-9) en *Nannochloropsis sp.* F&M-M24 se asocia principalmente a que estos son considerados lípidos de almacenamiento (Rodolfi y otros, 2009).

En las microalgas eucarióticas crecidas bajo un régimen fotoautótrofo, los triacilgliceroles (TAG) están compuestos predominantemente por ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) mientras que los PUFAs de cadena larga se acumulan principalmente en lípidos polares complejos (es decir, glicolípidos y fosfolípidos) que constituyen las membranas (Guihéneuf y otros, 2010; Berge, Gouygou, Dubacq y Durand, 1995).

Existen trabajos que presentan una disminución en el contenido de PUFA a lo largo de la fase estacionaria, a la vez que se presentan incrementos paralelos en las proporciones de SFA y MUFA, especialmente en los ácidos grasos 14:0, 16:0 y 16:1 (Gong, Guo, Wan, Liang y Jiang, 2013; Fidalgo y otros, 1998). Este hecho se observó en nuestra experiencia

donde se reportan una mayor cantidad de SFA y MUFA en comparación con los PUFA. Se identificaron ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 como se muestra en la Figura 24. Los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y  $\alpha$ -linolénico identificados son miembros de dos clases conocidas de omega-6 y omega-3 respectivamente. Desde un punto de vista bioquímico, ambos tienen 18 átomos de carbono pero desde un punto de vista nutricional, comúnmente son considerados como ácidos grasos "esenciales" ya que no se sintetizan en el cuerpo humano y se obtienen principalmente de la dieta (Russo, 2009). Tal razón explica por qué los ácidos grasos poliinsaturados son nutrientes cruciales debido a que actúan como precursores de una gran variedad de metabolitos bioactivos que realizan diversas funciones fisiológicas (Yap y Chen, 2001). Se ha demostrado que factores como la temperatura, la irradiación y la disponibilidad de nutrientes afectan la composición lipídica y el contenido de lípidos en muchas algas (Guschina y Harwood, 2006a; Hu, 2004; Hu y otros, 2008; Roessler, 1990).



**Figura 23.** Concentración (mg/mL) de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados detectados en la biomasa de *Tisochrysis lutea* en batch y semicontinuo (20 y 30%).

En la Cuadro 6, se resume los porcentajes en cuanto al peso seco de los ácidos grasos identificados a partir de biomasa de *T-iso* crecida en batch y semicontinuo en columnas de burbujeo. Se observa que en los tratamientos se registra mayor cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en contraste con los ácidos grasos poliinsaturados, al igual que mayores cantidades de SFA en comparación con el resto de los ácidos grasos. Está descrito que las microalgas pueden cultivarse normalmente en sistemas de cultivo abiertos (lagos o estanques) y también en los sistemas de cultivo cerrados denominados fotobiorreactores (PBR) (Mata y otros, 2010). Una opción estratégica a los PBRs tubulares es emplear reactores de columnas de burbujeo de diámetro relativamente grande (diámetro > 10 cm), (Chisti y Moo-Young, 1993; Chisti, 1989). Los reactores de columnas verticales son compactos, de bajo costo y fáciles de operar a la vez que constituyen una alternativa para producir grandes cantidades de biomasa de microalgas (Sánchez Mirón y otros, 1999; Chisti, 1989). Este tipo de reactores no experimentaron fotoinhibición que se ve comúnmente en los tubos estrechos de los reactores tubulares horizontales (Molina Grima, Ación, García y Chisti, 1999a; Ación Fernández y otros, 1998). Se reporta que las columnas de burbujeo verticales tienen un buen ciclo de luz-oscuridad, baja superficie/volumen y un flujo de gas-líquido mucho más caótico (Mata y otros, 2010).

Estudios indican que cultivos de microalgas en un reactor vertical de diámetro relativamente grande pueden funcionar al menos tan bien como en un reactor tubular horizontal de calibre estrecho, debido a una buena capacidad para eliminar el oxígeno permitiendo que la biomasa en los reactores verticales no sufra inhibición del oxígeno de la fotosíntesis (Sánchez Mirón y otros, 2002). Tanto fotobiorreactores de columna de burbujeo como airlift se emplean ampliamente para la producción de microalgas en acuicultura (Xu, Weathers, Xiong y Liu, 2009), lo que resulta de gran importancia para el cultivo de microalgas. Tanto en sistemas de cultivo de microalgas al interior como al exterior, la fuente de luz y la intensidad de la luz son factores críticos que afectan el rendimiento del crecimiento fototrófico de las microalgas (Mata y otros, 2010). Se sabe que las características de crecimiento y la composición de las microalgas dependen significativamente de las condiciones de cultivo (Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004).

Numerosos trabajos indican que la luz disponible para los cultivos afecta el crecimiento y el metabolismo, así como la composición de ácidos grasos de los microorganismos fotosintéticos debido a que la membrana del cloroplasto está compuesta de lípidos

polares altamente insaturados (Yap y Chen, 2001). Cuando la luz limita el crecimiento, las células deben sintetizar membranas en los cloroplastos para recoger la luz escasa de manera eficiente. Estas membranas están compuestas de lípidos polares que son altamente insaturados (Molina Grima y otros, 1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 19 y 21), se observa la relación inversamente proporcional entre la disminución en el contenido de biomasa y la eficiencia fotosintética al aumentar la dilución en las columnas de burbujeo. Se aprecia en la Figura 22 que la operación en semicontinuo a diluciones del 20 y 30% permite más luz para las células de T-Iso, lo que favorece la acumulación de ácidos grasos insaturados (USFA), por lo que asumimos que la relación entre las tasas de dilución y la irradiancia promedio afecta la síntesis de los ácidos grasos identificados. Klyachko-Gurvich y otros (1999); Tzovenis y otros (2003a), reportan que mejoras en el nivel de insaturación al incrementar la dilución se asocia a mejoras en la fluidez de las membranas. Tang y otros (2012), observaron diferencias en las composiciones de ácidos grasos con la tasa de dilución donde la fracción de ácidos grasos insaturados aumentó con el aumento de la tasa de dilución. Este hecho puede asociarse con el incremento en las porciones de PUFAs en cultivos semicontinuos a diluciones del 20 y 30%. En cultivos continuos se encontró el mayor contenido celular de PUFAs en experimentos realizados a altas tasas de dilución (Carvalho y Malcata, 2005) en comparación a cultivos discontinuos. Incrementos en el contenido de PUFAs podrían ayudar a proteger a las algas de las reacciones de fotooxidación asociadas con la actividad fotosintética (Guihéneuf, Mimouni, Ulmann y Tremblin, 2009). Esto puede indicar que el grado de insaturación de los ácidos grasos puede asociarse con un alto grado de control de la estructura de las membranas celulares en las algas que controlan la fluidez y la funcionalidad de la membrana (Khotimchenko y Yakovleva, 2005).

En nuestro estudio se reportan cantidades promedio de SFA como el 14:0 (27.71%), 16:0 (19.40%) y MUFA 18:1 n-9 (16.75%) como ácidos grasos principales para *Tisochrysis lutea* T-Iso. Se ha descrito para *I. galbana* niveles altos de SFA 14:0 (21,65%), 16:0 (20,84%), seguido del MUFA 18:1 n-9 (21,12%) (Ohse y otros, 2015). Renaud y otros (1999), reportaron niveles altos de los SFA 14:0 (17,3%) y 16:0 (12,0%), los MUFA 18:1 n-7 (6,9%) y los PUFA 18:4 n-3 (19,0%), 18:5 n-3 (10,6%) y 22:6 n-3 (9,9%) para *Isochrysis* sp.. El género Prymnesiofitas o haptofitas (por ejemplo orden Isochrysidales) se caracterizan por altas cantidades de los ácidos grasos 16:0 (2.0-26.7%) y 18:4 n-3 (9.5-

22.6%) (Renaud y otros, 1999). Los contenidos de ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en los lípidos neutros se vieron afectados significativamente por la dilución en cultivos de *T. lutea* (Marchetti y otros, 2017). Según estos autores los principales SFA fueron 14:0 y 16:0, que mostraron un mayor contenido a baja dilución, mientras que el MUFA 18:1(n-9) exhibió un patrón similar a los MUFA total, aumentando significativamente a bajas diluciones, en tanto, los valores más bajos de PUFA se registraron a altas diluciones. Lucas-Salas y otros (2013), observaron en *S. obliquus* aumento en los ácidos grasos saturados y disminución de los ácidos grasos insaturados con la reducción de la dilución en PBRs cilíndricos. Estudios revelan un patrón de ácidos grasos SFA > PUFA > MUFA en T-ISO (Tzovenis y otros, 2003a). Estos efectos podrían atribuirse a un impedimento de desaturación debido a la limitación de energía o nutrientes que da como resultado la acumulación de reserva. El efecto de la intensidad de la luz a menudo depende de la tasa de dilución y afecta la composición de los ácidos grasos en la microalga *Pavlova lutheri* (Carvalho y Malcata, 2005), donde los ácidos palmitoleico (16:1 n-7), oleico (18:1 n-9) y  $\alpha$ -linolénico (18:2 n-3) aumentaron significativamente con luz solo a la tasa de dilución más alta, mientras que los ácidos oleico (18:1 n-9), linoleico (18:2 n-6) y gamma-linolénico aumentaron consistentemente con la luz a todas las tasas de dilución. Guihéneuf y otros (2009); Courchesne y otros (2009), observaron aumentos en los PUFAs asociado a la intensidad de la luz en la microalga *Pavlova lutheri*. De acuerdo a nuestros resultados, las más altas concentraciones de SFA y MUFA, entre ellos 16:0, 16:1 n-7 y 18:1 n-9, se identifican a una dilución del 20%, mientras que una dilución del 30% favorece la producción de PUFAs especialmente 18:2 n-6, 18:3 n-3 y 18:4 n-3. Estudios indican que en los cultivos semicontinuos una parte de las células se elimina continuamente del cultivo, lo que refleja un aumento en la disponibilidad de luz para las células (Pedrosa y otros, 2011). En nuestro estudio el empleo de una tasa de dilución del 20% ( $I_{av} \sim 30 \mu E/m^2s$ ) permitió incrementos de los MUFA 16:1 n-7 ( $\sim 1\%$ ) y 18:1 n-9 ( $\sim 2\%$ ) mientras que una dilución del 30% ( $I_{av} > 40 \mu E/m^2s$ ) favoreció incrementos en los PUFAs 18:2 n-6 ( $\sim 1.5\%$ ), 18:3 n-3 ( $\sim 2.2\%$ ) y 18:4 n-3 ( $\sim 3\%$ ). El aumento en la desaturación de lípidos podría ser una de las posibles razones del aumento observado en los niveles de PUFAs en condiciones de mayor intensidad de la luz (Molina Grima, García y Ación, 1999b). En un estudio con *Chlorella pyrenoidosa* en batch y continuo se encontraron a los ácidos grasos C16 y C18 como predominantes y afirman que la tasa de dilución impactó en el contenido de lípidos (Wen y otros, 2014). Dunstan, Volkman, Barrett y Garland (1993), reafirman que en

cultivos mantenidos mediante cosecha semicontinua, las proporciones de 16:0 y 18:1 n-9 aumentaron en *Isochrysis sp.*, tal como se muestra en nuestro estudio. Sin embargo, Guihéneuf y otros (2009), reportan la más alta cantidad de MUFAs a bajas irradiancias (20  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) que constatado con nuestra experiencia es comparable a irradiancias promedio de  $\sim 30 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  (dilución 20%). Por otro lado, se ha referenciado que la acumulación de ácidos grasos n-3 supone una expansión de los tilacoides y con ello adaptación de las células a las condiciones ambientales (Mock y Kroon, 2002), como la intensidad de la luz (Sukénik y otros, 1989). En general, altas irradiancias estimulan la acumulación de TAG (Roessler, 1990), mientras que frente a bajas irradiancias, se sintetizan principalmente lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) estructural y funcionalmente asociados a las membranas celulares (Hu y otros, 2008). Boussiba, Vonshak, Cohen, Avissar y Richmond (1987), observaron en *Nannochloropsis salina* una tendencia de mayor almacenamiento de lípidos (principalmente TAG) a las irradiancias crecientes. Se ha explicado que los triglicéridos (TAG) se componen principalmente de ácidos grasos saturados y monoinsaturados ya que estos pueden empacarse eficientemente en la célula y generar más energía que los carbohidratos tras la oxidación, constituyendo así la mejor reserva para reconstruir la célula después del estrés (Roessler, 1990), mientras que otros tipos de lípidos pueden estar involucrados en el desarrollo del sistema fotosintético, como los glucósidos, que son compuestos importantes en la membrana de los tilacoides, y tienen un papel en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis (Bruce, 1998).

Las productividades de biomasa y lípidos de los cultivos de microalgas dependen de la capacidad y la eficiencia para coleccionar la luz (Pal y otros, 2011). Específicamente, se observan variaciones significativas en los contenidos de lípidos y en los perfiles de ácidos grasos en respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento (Yongmanitchai y Ward, 1991; Carvalho, Pontes, Gaspar y Malcata, 2006a; Petkov y García, 2007). También se sabe que la composición de ácidos grasos se ve afectada por el nivel de irradiación (Blanchemain y Grizeau, 1996; Guihéneuf y otros, 2008). Estudios previos de la composición bioquímica ya han demostrado que las microalgas marinas pueden aclimatarse a las variaciones en la luz al cambiar el contenido de sustancias estructurales y de almacenamiento como los lípidos (Khotimchenko y Yakovleva, 2005). La influencia de los niveles de irradiación en la composición bioquímica podría estar relacionada con la fuente de carbono (Guihéneuf y otros, 2009). Cuando las algas se cultivan con carbono inorgánico como su única fuente de carbono, el crecimiento depende de la disponibilidad

de la luz para todas sus necesidades de producción de energía y biomasa (Wood, Grimson, German y Turner, 1999). Sin embargo, las condiciones de luz que producen la mayor proporción de ácidos grasos esenciales son específicas de cada especie (Thompson y otros, 1990). Lo que supone que todas las microalgas probablemente no presentarán el mismo comportamiento frente a distintas condiciones establecidas para su crecimiento. Es conocido que la composición de la clase de lípidos puede modificarse según las condiciones ambientales y culturales (Parrish, 1987; Alonso, Belarbi, Fernández, Rodríguez y Molina Grima, 2000).

Benvenuti y otros (2016), señalan que procesos de producción de microalgas ya sea, semicontinuo o continuo podrían dar como resultado un proceso estable y robusto con una productividad más alta de lípidos en comparación con el enfoque clásico o batch. Si bien es cierto, hemos observado para la microalga *Tisochrysis lutea* T-Iso una mejora en las porciones de lípidos MUFA, PUFA y por ende USFA al operar las columnas de burbujeo en semicontinuo; estudios indican que la cosecha semicontinua de microalgas se usa comúnmente en la industria de la maricultura para producir un suministro regular de microalgas para alimentos y en relación con los cultivos discontinuos, por lo general da como resultado un mayor rendimiento de biomasa por día (promediado durante la vida del cultivo) (Dunstan y otros, 1993). Por ejemplo, es de esperarse que cosechas de cultivos semicontinuos que pueden mantenerse y cultivarse durante varias semanas produzcan más PUFAs (n-3), tal como aconteció en nuestro estudio donde los omega-3 (18:3 n-3 y 18.4n3) se incrementaron >6% en cultivos semicontinuo en comparación con cultivos batch. Cultivos continuos representan mayores productividades de ácidos grasos que los cultivos discontinuos donde el mayor contenido celular de PUFAs se encontró en experimentos realizados a altas tasas de dilución pero las productividades más altas se alcanzaron a tasas de dilución más bajas (Carvalho y Malcata, 2005) (ver Cuadro 6 y Figura 19). Estos mismos investigadores suponen que aumentos en las concentraciones celulares de ácidos grasos insaturados cuando aumenta la tasa de dilución no necesariamente conducen a aumentos en la productividad de esos ácidos grasos insaturados, ya que, a medida que aumenta la tasa de dilución, el rendimiento de biomasa disminuye. En comparación con los cultivos discontinuos, el modo de cultivo semicontinuo resultó en cultivos más estables para la producción de DHA en *I. galbana* # 153180 (Liu y otros, 2013). La estrategia de cultivo semicontinuo se empleó para aumentar la producción de lípidos de *Chlorella* sp. (Hsieh y Wu, 2009). Retirando diariamente el 25%

del volumen del cultivo y añadiendo medio nuevo, las células se pueden mantener en un crecimiento repleto de nutrientes y acumular lípidos. Esta dilución se encuentra en el rango de las diluciones empleadas en este estudio con T-Iso (20 - 30%) lo que favoreció la productividad de biomasa y ácidos grasos de gran importancia. Pernet, Tremblay, Demers y Roussy, (2003), reportan que el modo de cultivo semicontinuo resulta ser estable para *Isochrysis sp.* (Clone T-Iso) en términos de concentración celular y composición de lípidos. Investigaciones sugieren que en sistemas de cultivo semicontinuo, las concentraciones de nutrientes y las tasas de renovación se aplican para mejorar la productividad de los lípidos en microalgas (Hsieh y Wu, 2009; Rodolfi y otros, 2009).

#### Cuadro 6

Ácidos grasos (% peso seco) presentes en la biomasa de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) cosechada en el estado estacionario en la modalidad batch y semicontinuo en PBR-BC

Peso seco ácidos grasos (%)			
Acido graso	Batch	Dilución (20%)	Dilución (30%)
14:0	28.86	27.08	27.20
16:0	19.80	20.13	18.29
16:1 n-7	5.62	6.52	4.47
18:1 n-9	18.29	20.05	11.90
18:2 n-6	4.56	6.59	8.08
18:3 n-3	1.97	2.53	4.70
18:4 n-3	0.98	1.71	4.64
ΣSFA	48.66	47.21	45.49
ΣMUFA	23.91	26.57	16.37
ΣPUFA	7.51	10.83	17.42
USFA	31.42	37.40	33.79

Nota. SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; USFA, ácidos grasos insaturados (MUFA+PUFA)

Se han realizado muchos estudios sobre métodos de cultivo de algas para mejorar el crecimiento de algas y el contenido de lípidos (Tang y otros, 2012). Diversas investigaciones sugieren que los PBRs pueden operarse en modo discontinuo, semicontinuo y continuo. Las operaciones continuas han demostrado ofrecer mayores oportunidades para la investigación y el análisis de sistemas (Mata y otros, 2010). Si bien los estudios por lotes o batch son fundamentales para determinar las fases de crecimiento

básicas y las características de las especies de algas (Tang y otros, 2012). A partir de nuestra experiencia podemos afirmar que el crecimiento de la microalga *Tisochrysis lutea* T-Iso en columnas de burbujeo empleando distintas tasas de dilución permite el crecimiento del organismo y la acumulación de ácidos grasos SFA y USFA especialmente PUFAs.

La síntesis de USFA de cadena larga demanda elongasas y desaturasas determinadas las cuales operan sobre los ácidos C16-C18 (Bellou y otros, 2014). Las diferencias en la respuesta a las condiciones ambientales entre diferentes algas pueden estar relacionadas con sus diferentes rutas biosintéticas (Cohen, 1999). Para obtener cadenas más largas o insaturadas, se requieren elongasas y desaturasas, que actúan sobre el palmitato o el estearato. Este tipo de enzimas se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico y las mitocondrias, y pueden producir ácidos grasos de cadena larga (Courchesne y otros, 2009). Tales afirmaciones podrían explicar las variaciones en el perfil de ácidos grasos encontrados y en la ausencia de ciertos ácidos grasos como DHA (C22:6 n-3) en cultivo de *Tisochrysis lutea* T-Iso. Se conoce que la biosíntesis de DHA implica la desaturación de  $\Delta 6$  del linoleato a C18:4 n-3, seguido de la elongación a C20:4 n-3 y desaturación  $\Delta 5$  a EPA (Guschina y Harwood, 2006a). Desde el punto de vista de la ingeniería metabólica, el bloqueo de rutas competidoras también puede mejorar el flujo metabólico que se canaliza a la biosíntesis de TAG, siendo la  $\beta$ -oxidación la vía metabólica principal responsable de la degradación de los ácidos grasos en eucariotas (Shen y Burger, 2008), limitando la síntesis de ciertos ácidos grasos. Varias razones pueden estar implicadas en la explicación de las variaciones encontradas, como una mayor producción de especies reactivas de oxígeno debido al estrés combinado y, por lo tanto, daño oxidativo a ácidos grasos y enzimas de biosíntesis de TAG (Pal y otros, 2011). Sobre la base de la acumulación de PUFAs durante las respuestas a diferentes factores ecológicos (por ejemplo, alta intensidad de luz y radiación UV, baja temperatura), autores sugirieron que la capacidad de algunas algas para almacenar PUFA de cadena larga en TAG podría ser una reserva que permitiría a los organismos adaptarse a cualquier cambio rápido adicional en su entorno (Bigogno, Khozin-Goldberg, Boussiba, Vonshak y Cohen, 2002). Es importante tomar en cuenta que la producción y el almacenamiento de lípidos en microalgas en respuesta a factores ambientales son específicos de cada especie, lo que dificulta la generalización (Pernet y otros, 2003).

Diferentes estudios han demostrado que variaciones en las condiciones de cultivo pueden afectar el contenido de lípidos y la composición de los ácidos grasos (Bona, Capuzzo, Franchino y Maffei, 2014). Se reporta que las modalidades de cultivo también afectan el crecimiento de las células y la composición bioquímica de las microalgas (Han y otros, 2013; Hsieh y otros, 2009). Este hecho también pudo observarse en diferentes estudios realizados con *Tisochrysis lutea* (T-Iso), empleando reactor tubular y columnas de burbujeo en la modalidad batch y continuo al igual que empleando tasa de diluciones. Diferencias observadas en estos sistemas en términos de contenido y productividad de biomasa reportándose la más alta concentración y productividad de biomasa con reactores tubulares operado en continuo ~1 g/L y 0.22 g/L-día en comparación con los máximos encontrados en cultivos semicontinuos en columnas de burbujeo 0.80 g/L y 0.17 g/L-día.

Por otro lado, la más alta porción de USFA (34%) se identificó en cultivos realizados en columnas de burbujeo en comparación con 30% USFA en células crecidas en un reactor tubular. Estos hechos suponen que variaciones en los sistemas de cultivo (PBR tubular o PBR columnas burbujeo) y modos de operación (batch, semicontinuo y continuo) presentan cierto efecto sobre la acumulación de biomasa y ácidos grasos en cultivos de la *Tisochrysis lutea*. A partir de esto suponemos que variaciones en las modalidades de cultivo indican directamente sobre la productividad de biomasa así como la acumulación de ácidos grasos en microalgas. Acién Fernández y otros (2013), compararon la productividad volumétrica de biomasa para diferentes sistemas de cultivo de microalgas y concluyeron que los paneles planos (flat-panel) tuvieron la mayor productividad (0.22-2.40 g/L-día), seguidos por los fotobiorreactores tubulares (PBR-T) (0.12-1.38 g/L-día) y estanques (open ponds) (0.02-0.19 g/L-día) con la productividad más baja. Jiang y Zhu (2010), compararon el cultivo de *Dunaliella salina* al exterior y en PBR, encontrando que el cultivo de algas en el PBR (24 mg/L-día de productividad de biomasa) fue más efectivo que en el exterior (20 mg/L-día) al final de la fase logarítmica. Sin embargo, en el cultivo a gran escala de microorganismos diversos factores están involucrados como por ejemplo un mezclado adecuado mediante bombeo o agitación para mantener un entorno de cultivo homogéneo (Yap y Chen, 2001). Gudin y Chaumont (1991), investigaron los efectos hidrodinámicos en la microalga *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactores tubulares. Informaron que las células vegetativas verdes preferían una menor velocidad del fluido de bombeo debido a su fragilidad, mientras que los quistes rojos eran menos sensibles al

estrés hidrodinámico impuesto por el bombeo. Este efecto ayudaría a explicar las variaciones en los perfiles de ácidos grasos encontrados en este estudio. Por otro lado, el tamaño de la burbuja aparentemente también es crucial para minimizar el daño por corte a las células (Xu y otros, 2009).

Se ha señalado que el burbujeo pudo aumentar la penetración de la luz en un cultivo de *Anabaena variabilis* hasta en un 20% para dar como resultado una mejor dispersión de la luz (Berberoglu, Yin y Pilon, 2007). También la tasa de aireación está restringida por consideraciones de sensibilidad al corte a las células (Xu y otros, 2009). Por ejemplo, cuando se cultivó *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor con diferentes velocidades de gas superficiales, los resultados indicaron que la densidad celular máxima disminuyó aproximadamente un 10% del nivel óptimo cuando la velocidad se incrementó de 0,4 cm/s a 3 cm/s (Kaewpintong y otros, 2007). Como se explicó previamente existen diversos factores involucrados en la síntesis de PUFA en PBR-tubular y PBR-columna de burbujeo. Se ha referenciado que nivel de oxígeno disuelto en el medio es crucial para el crecimiento celular y la formación de PUFAs. El oxígeno molecular es requerido por la mayoría de los organismos para los mecanismos de desaturación en la biosíntesis de PUFAs (Gurr y Harwood, 1991). En general, se cree que una mayor tensión de oxígeno en el medio puede elevar el contenido de ácidos grasos insaturados en el microorganismo (Yap y Chen, 2001). Todos estos factores son considerados de gran importancia en cultivos de microalgas a gran escala y son de gran utilidad en la optimización de procesos para la obtención de productos de alto valor agregado.

### 4.3. Análisis de la composición bioquímica a la biomasa de *Tisochrysis lutea* (T-Iso) cultivada en fotobiorreactores tubulares (PBR-T) y columnas de burbujeo (PBR-BC).

El análisis de la composición bioquímica de la microalga *Tisochrysis lutea* se llevó a cabo a partir de biomasa cultivada en fotobiorreactores tubulares (PBR-T) y columnas de burbujeo (PBR-BC) en la modalidad batch y semicontinuo empleando tasas de dilución. Los resultados obtenidos reflejan un incremento en la concentración de lípidos y proteínas cuando el reactor tubular se opera en continuo, sin embargo los lípidos y proteínas cuando las columnas se operan en semicontinuo no presentan grandes variaciones en comparación con el estado estático o batch. En la Cuadro 7, se muestran los porcentajes de lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas en cultivos de *Tisochrysis lutea* llevados a cabo en PBR-T y PBR-BC.

**Cuadro 7**

Composición bioquímica (%) de la biomasa obtenida de los diversos reactores empleados para el cultivo de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso)

Tipo de Reactor	Modalidad	% Lípidos	% Proteínas	% Carbohidratos	% Cenizas
PBR-T	Batch	31.5	33.4	14.7	20.4
	Continuo	37.2	45.7	-	-
PBR-BC	Batch	33.2	24.7	16.6	25.5
	Dilución 20%	33.5	24.6	20.6	21.3

La composición bioquímica es un factor clave en la calidad de la biomasa (Camacho-Rodríguez y otros, 2013). Se ha reportado que la manipulación de las condiciones de crecimiento de microalgas puede alterar las características de crecimiento y la composición bioquímica de las células cultivadas en las condiciones aplicadas (Brown, Jeffrey y Garland, 1989). Según Perez-Garcia, Escalante, de-Bashan y Bashan (2011), las proteínas, los lípidos y los carbohidratos son los principales componentes nutricionales de las microalgas, pero el contenido relativo de estos constituyentes se puede modificar mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. En términos generales, bajo condiciones de cultivo favorables, la biomasa microalgal contiene cerca de 8 al 15% de lípidos, 30 al 50% de proteínas y 20 al 40% de carbohidratos (Hu, 2004). Renaud y otros (1999), tras analizar 18 especies de microalgas encontraron que los lípidos, las proteínas,

los carbohidratos y las cenizas representan en promedio un 77% (rango 63–92%) del peso seco total de microalgas.

En nuestro estudio encontramos cantidades de lípidos totales > 30% en la biomasa obtenida de cultivos de *Tisochrysis lutea* llevados a cabo en PBR-T y PBR-BC. Rodolfi y otros (2009), reportan contenidos de lípidos del 8.5% al 39.8% de distintas cepas de microalgas marinas donde las especies *Isochrysis sp.* (T-ISO) CS 177 y *Isochrysis sp.* F&M-M37 presentan el 22.4% y 27.4% de lípidos respectivamente. Servel, Claire, Derrien, Coiffard y De Roeck-Holtzhauer (1994), reportan cantidades de lípidos para *I. galbana* (25.6%), Mata y otros (2010), reportan para *Isochrysis galbana* (7% a 40%) y para *Isochrysis sp.* (7 a 33%). Sin embargo, Ippoliti y otros (2016), confirman que *Tisochrysis lutea* puede producirse al aire libre a escala comercial, logrando producir una biomasa rica en lípidos (25%) y proteínas (45%). Estos datos resultan ser cónsonos con los encontrados en nuestro estudio (Cuadro 7), en cultivos al exterior de *Tisochrysis lutea* llevados a cabo en fotobiorreactores en los que reportamos cantidades > 30% de lípidos totales y > 24% de proteínas totales en la biomasa cultivada en PBR-T y PBR-BC. Alkhamis y Qin (2015), presentan contenidos de lípidos (22%), proteínas (36.4%) y carbohidratos (9.4%) para *Tisochrysis lutea*. Otros autores indican que la composición química de *T. lutea* se caracteriza principalmente por un alto porcentaje de proteína situada en el rango del 30 al 48% (Martínez-Fernández, Acosta y Southgate, 2006; Renaud y otros, 2002).

Por otro lado se ha demostrado que el cambio de las condiciones de luz también puede emplearse para modificar la composición de la biomasa microalgal a fin de optimizar la producción de bioproductos de interés (Gutierrez-Wing y otros, 2014). Se ha detallado que la luz es un factor ambiental esencial para el cultivo de microalgas, donde la cantidad y calidad de la luz pueden inducir cambios en la composición bioquímica de las microalgas (Marchetti y otros, 2017). Cuellar-Bermudez y otros (2015), reportan incrementos proporcionales a la intensidad de luz en el contenido de lípidos en cultivos de *Synechocystis sp.* PCC6803 llevados a cabo en un fotobiorreactor vertical de placa plana (FP-PBR). Estudios previos de la composición bioquímica han demostrado que las microalgas marinas pueden aclimatarse a las variaciones de la luz al cambiar el contenido de sustancias estructurales y de almacenamiento como los lípidos (Khotimchenko y Yakovleva, 2005). Molina Grima y otros (1994b), registran una relación inversa entre las proteínas y el contenido de lípidos para *Isochrysis galbana* conforme incrementa la

intensidad de luz. Evidentemente, en nuestro estudio no observamos con *Tisochrysis lutea* (T-Iso) esta relación inversa entre los lípidos y proteínas, ya que a medida que incrementa la irradiancia promedio dentro del reactor se observa un incremento en el contenido de lípidos y proteínas en cultivos llevados a cabo en PBR-T.

Por lo que se refiere a las proteínas, se ha reportado que variaciones en el contenido de proteínas de *Isochrysis galbana* a mayores intensidades de luz posiblemente se atribuye a que el metabolismo celular se enfoca más intensamente para aumentar el contenido de productos primarios fotosintéticos como lo son carbohidratos (Molina Grima y otros, 1994b). En general, se sabe que altas intensidades de luz producen un aumento en el contenido de carbohidratos (Hu, 2004). Este hecho pudo observarse en cultivos de *T. lutea* realizados en PBR-BC en los que el contenido de carbohidratos incremento ~ 4% mientras que las proteínas presentaron una ligera disminución al existir más luz disponible para las células (ver graficos de irradiancia promedio, Figura 10 y 22). Bajo ausencia de energía luminosa, el metabolismo celular cambiará (Kitajima y otros, 1998) y por lo tanto, la productividad y la composición bioquímica de las células de microalgas se verán afectadas por la disponibilidad de la luz (Chen y otros, 2011).

Desde otro punto de vista, los hechos previamente señalados con la microalga T-Iso guardan cierta relación con la modalidad de cultivo batch y/o continuo llevada a cabo en PBR-T y PBR-BC. De acuerdo con Ación Fernández y otros (1998), los fotobiorreactores permiten un mejor control de los parámetros de cultivo y las variables operativas pueden utilizarse para manipular la composición bioquímica de la biomasa. La relación entre los modos de operación estático o batch y continuo de los reactores guarda una estrecha relación con la cantidad de luz disponible dentro del reactor para las microalgas. La irradiancia promedio dentro de los cultivos se ha referenciado como un indicador de la disponibilidad de luz (Sánchez y otros, 2008a). Carvalho y Malcata (2005), indican que el efecto de la intensidad de la luz depende a menudo de la tasa de dilución. Según Barbosa y otros (2003), la luz como el sustrato limitante, no puede almacenarse en el medio de cultivo por lo que un aumento en la tasa de dilución conducirá directamente a una disminución en la concentración de biomasa que repercutirá en una mayor intensidad de luz promedio dentro del reactor y un aumento consecuente de la tasa de crecimiento.

Se ha referenciado que a medida que aumenta la tasa de dilución, también aumentan los contenidos de proteínas y lípidos (Camacho-Rodríguez y otros, 2013). Carvalho y Malcata

(2005), reportan mayores cantidades de lípidos a mayores tasas de dilución. Guedes y otros (2010), realizaron cultivos de *Pavlova lutheri* en un fermentador que fue operado en semicontinuo y obtuvieron un descenso en las cantidades de proteínas y lípidos conforme incrementa la intensidad de luz, pero un breve incremento en las porciones de carbohidratos al aumentar la luz. Otros resultados muestran que la tasa de dilución tiene un efecto positivo en la eficiencia del uso de la luz de los cultivos al mejorar la disponibilidad de luz (Ippoliti y otros, 2016). De acuerdo con nuestra experiencia, en este estudio observamos que un cambio en el modo de operación de los reactores (Cuadro 7) favorece la acumulación de biomoléculas de interés como lo son lípidos y proteínas en PBR-T, al igual que los lípidos y carbohidratos que se incrementaron en la biomasa producida en PBR-BC. El contenido de cenizas disminuyó con el cambio en el modo de operación (batch a semicontinuo) llevado a cabo en PBR-BC. Es importante señalar que estas diferencias pueden estar asociadas a la configuración de los fotobiorreactores, el modo de operación, la irradiancia promedio dentro del reactor. Los resultados previamente obtenidos en nuestro estudio en cultivos de *T. lutea* no son consonos a los resultados de Jebali y otros (2015), los cuales observaron una ligera disminución en los lípidos y carbohidratos a medida que la tasa de dilución aumentaba en un estudio realizado con distintas especies de microalgas del género de las clorófitas. Por otro lado, Ippoliti y otros (2016), muestran que la tasa de dilución modifica la composición bioquímica de la biomasa: cuanto mayor es la tasa de dilución impuesta, mayor es el contenido de proteínas y menor el contenido de lípidos, donde el contenido de proteínas aumenta de 35 a 45% cuando la tasa de dilución aumenta, mientras que el contenido de lípidos se reduce de 28 a 20% y el contenido de carbohidratos, que representa entre el 28 y el 30% de la biomasa.

Según Wen y otros (2014), en cultivos continuos, las células de microalgas pueden crecer a un ritmo razonable y acumular lípidos simultáneamente, lo que conduce a una mayor productividad de los lípidos que en los cultivos estáticos o batch. Es posible que el contenido de nutrientes y el metabolismo de las algas sean específicos de la especie (Alkhamis y Qin, 2015). San Pedro y otros (2014), realizaron cultivos de *N. gaditana* en fotobiorreactores tubulares y encontraron que el contenido de proteínas aumentó con el aumento de las tasas de dilución, mientras que el contenido de lípidos y ácidos grasos disminuyó a medida que aumentó la tasa de dilución. Yeh y Chang (2011), reportan ~ 46% de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* ESP-31 cultivada en fotobiorreactores

tubulares verticales. Wong y otros (2016), reportan para *Chlorella vulgaris* cultivada en PBR de columna de burbujeo entre ~ 40 y 48% en el contenido de lípidos. Previamente se ha referenciado que si un nutriente es limitado u omitido del medio de cultivo, las microalgas cambian sus estrategias metabólicas resultando en la alteración de su composición de biomasa que en la mayoría de los casos está relacionada con la acumulación de carbohidratos o lípidos (Markou y otros, 2012).

Los beneficios para la industria son innegables porque la composición de las microalgas se puede modular u orientar cambiando la tasa de dilución y la manipulación del suministro de nutrientes (Marchetti y otros, 2017), por lo que cultivos de microalgas continuos y semicontinuos producen biomasa de composición bioquímica constante y controlada, y durante mucho tiempo se ha demostrado que mejoran notablemente el crecimiento y desarrollo de organismos filtradores como los son rotíferos y *Artemia* (Fábregas y otros, 1998).

# CAPÍTULO

# V

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

Se registró crecimiento, producción de biomasa de la microalga *Tisochrysis lutea* en PBR-T con el medio fertilizante encontrándose una mejora en el crecimiento de la microalga tras alcanzada la fase estacionaria en continuo favoreciendo la concentración, productividad de biomasa, eficiencia fotosintética y fluorescencia de clorofilas.

Se observó el efecto de la operación en continua en el perfil de ácidos grasos en la microalga *Tisochrysis lutea* T-Iso en PBR tubulares. Se observaron mayores cantidades de SFA y MUFA en comparación de PUFA tras la operación en continuo lo que refleja el efecto que presenta una mayor cantidad de luz disponible para los cultivos. Se identificaron distintos ácidos grasos los cuales dejaron en evidencia la importancia de la biomasa microalgal para la nutrición humana y animal (acuicultura).

Se demostró que el efecto de la dilución del reactor tubular favorece a la concentración y productividad de biomasa de la microalga *Tisochrysis lutea* (T-Iso). Se obtuvo una mejora en la eficiencia fotosintética así como incrementos en la relación Fv/Fm. La velocidad máxima de crecimiento de la microalga con el fotobiorreactor tubular ( $0.4 \text{ día}^{-1}$ ) supera la velocidad máxima de crecimiento ( $0.1 \text{ día}^{-1}$ ) obtenida con la columna de burbujeo, siendo el efecto de autosombreado un factor relevante.

El efecto de las distintas tasas de dilución se apreció en el ensayo en semicontinuo, donde una dilución del 30% no favorece grandemente a la concentración de biomasa. La mayor eficiencia fotosintética en función de la irradiancia, se registra con una dilución del 30% a menos de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , lo que indica que la microalga aprovecha mejor valores de irradiancia inferiores. Diluciones del 20 y 30% ( $<100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ), permiten mayor estabilidad de la fluorescencia de las clorofilas, valores del  $K_a$  y productividad de biomasa.

Se demostró el efecto de las tasas de dilución sobre el perfil de ácidos grasos en la microalga *Tisochrysis lutea* T-Iso en PBR columna de burbujeo. Se observaron mayores cantidades de MUFA a una tasa de dilución del 20% mientras que los PUFA se incrementaron tras la operación en semicontinuo a una tasa de dilución del 30%. Se identificaron distintos ácidos grasos en el estudio lo que sugiere que una dilución del 20%

favorece en términos de concentración y producción de biomasa la producción estable de ácidos grasos de gran importancia para la nutrición humana y animal (acuicultura). Sin embargo, desde el punto de vista nutricional la biomasa producida a una dilución del 30% permite la obtención de los PUFAs, 18:2 n-6, 18:3 n-3, 18:4 n-3.

Se comprobó que la biomasa de *Tisochrysis lutea T-Iso* cultivada al exterior en fotobiorreactores tubulares (PBR-T) y fotobiorreactores de columna de burbujeo (PBR-BC) representa una fuente nutricional de alto valor agregado compuesta principalmente por lípidos, proteínas y carbohidratos que son considerados de gran importancia en la acuicultura debido al aporte nutricional que podría aportar las microalgas al desarrollo de larvas de peces y camarones.

## 5.2. RECOMENDACIONES

La construcción, diseño y operación de fotobiorreactores es un punto de gran importancia en la implementación de cultivos biotecnológicos de microalgas a escala industrial. Partiendo de este hecho se recomienda el empleo de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas al exterior, ya que el modo de operación, control de variables y productividad de biomasa pueden optimizarse en estos sistemas de producción.

Se recomienda el uso de los modos de irradiancia (lav) para cultivos de microalgas al exterior, ya que éstos ofrecen información sobre la cantidad de luz disponible para las microalgas dentro de los reactores lo cual es de gran importancia en la producción de biomasa y composición bioquímica de ésta.

Se recomienda el empleo de sistemas de cultivos semicontinuos o continuos ya que a través de estos modos de operación es posible mejorar la producción de biomasa microalgal y el desarrollo de compuestos de alto valor nutricional como lo son proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos.

# ANEXOS

## ANEXOS



Figura 24. Fotobiorreactor tubular (PBR-T) empleado para esta investigación.

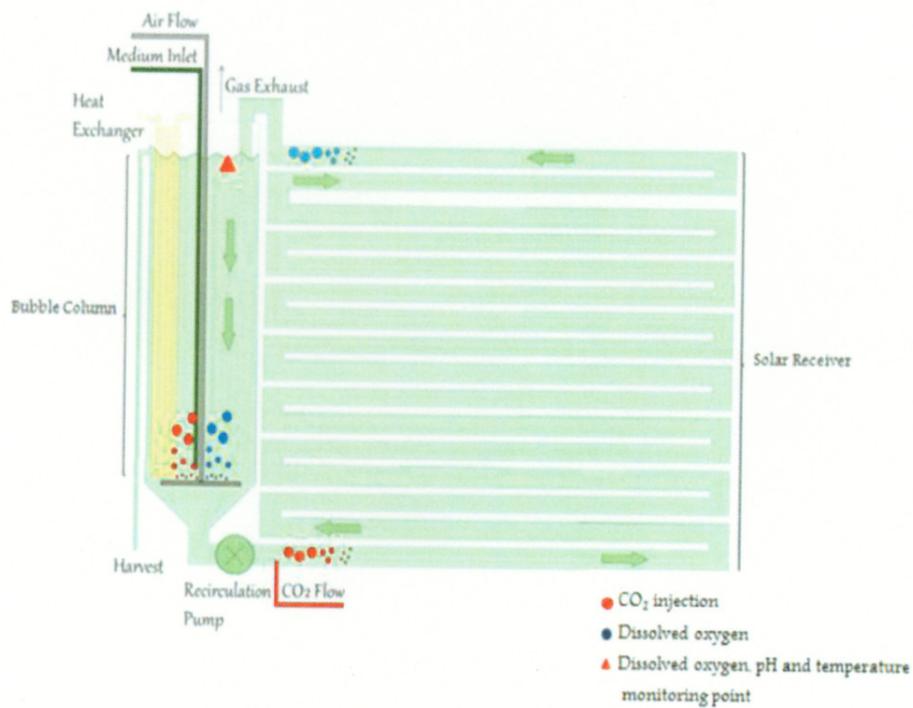
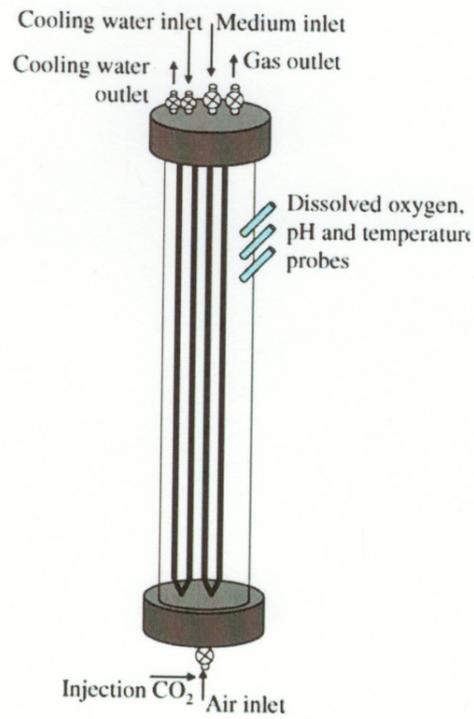


Figura 25. Esquema de Fotobiorreactor tubular (PBR-T) publicado por Solimeno, Gabriel, García, 2017, localizado en la Estación Experimental Las Palmerillas, Almería, España.



**Figura 26.** Fotobiorreactor de columnas de burbujeo (PBR-BC) empleados para esta investigación.

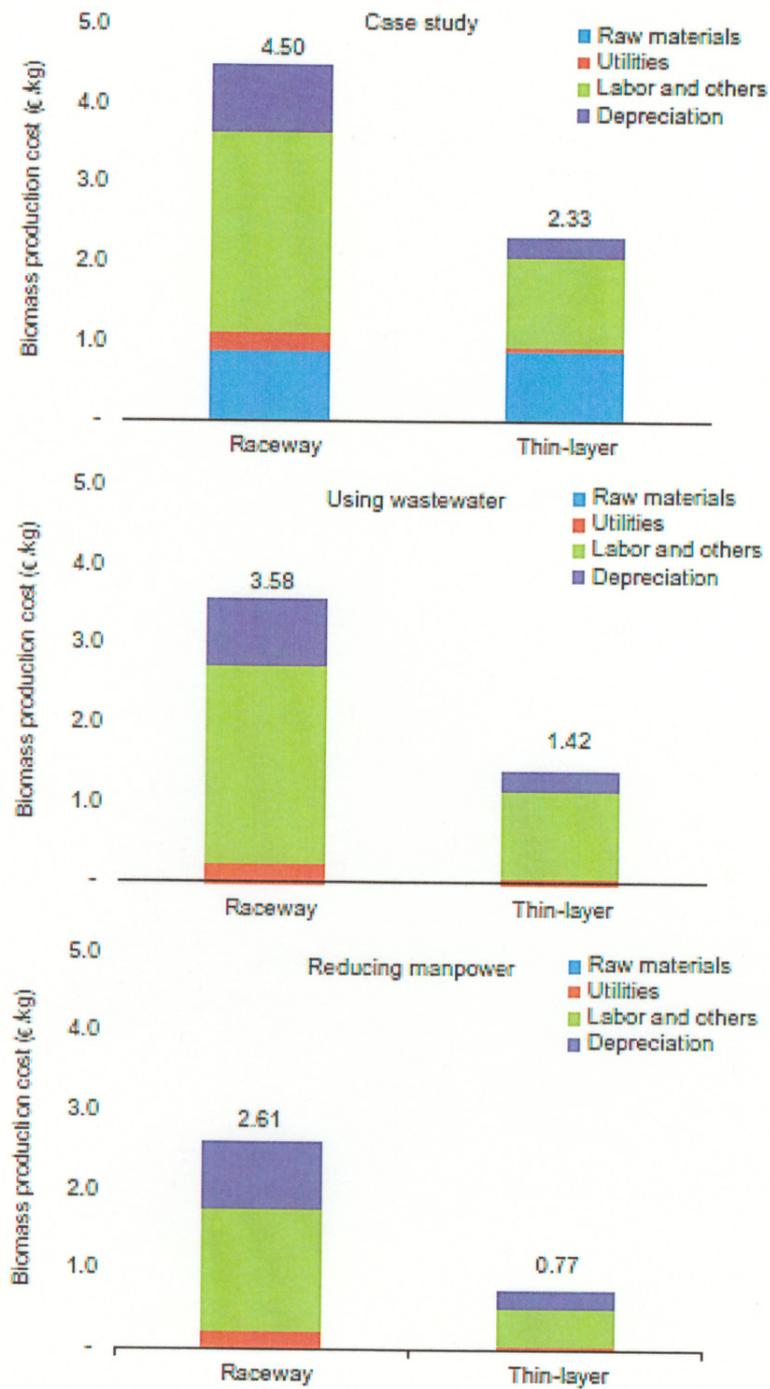


**Figura 27.** Esquema de columnas de burbujeo (PBR-BC) publicado por López y otros, 2006.

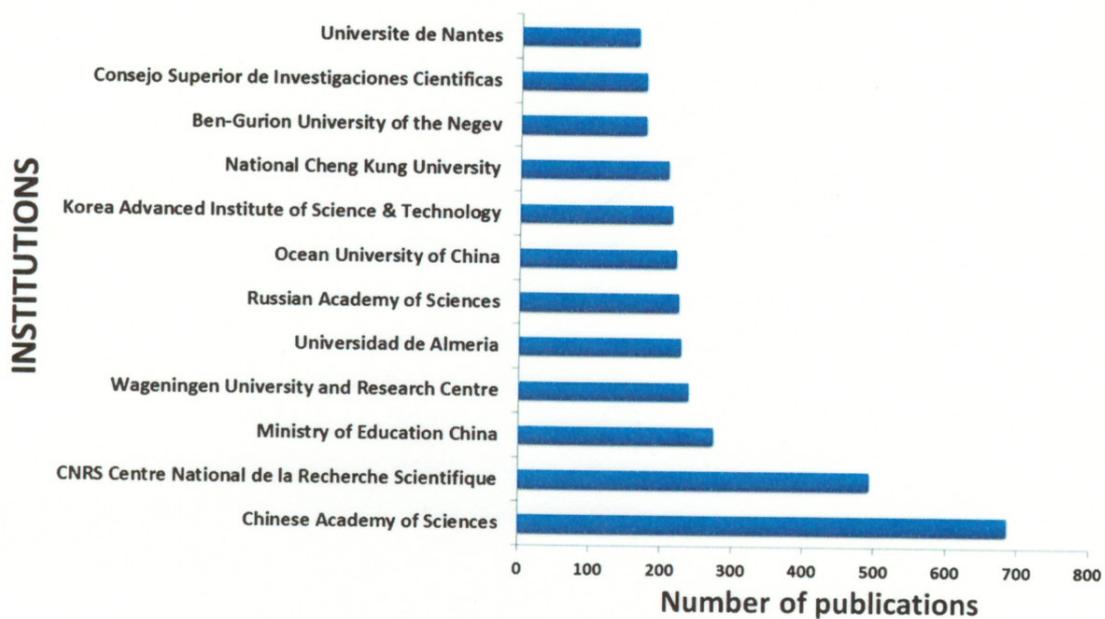
### Cuadro 8

Parámetros principales para las dos tecnologías de producción consideradas en el estudio de caso, relacionadas con la producción de biomasa de microalgas para aplicaciones agrícolas y acuícolas (Acién Fernández y otros, 2019)

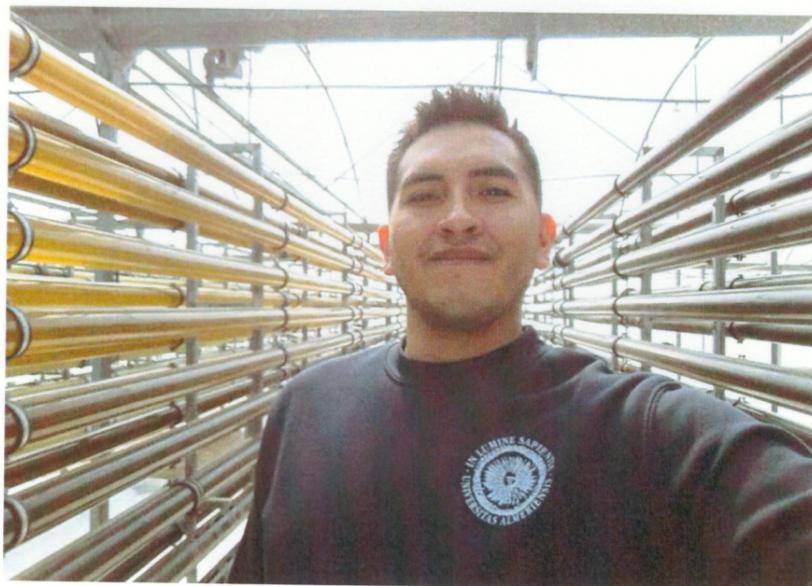
Photobioreactor		Raceway	Thin-layer
<b>Case study</b>			
Biomass productivity	g/m <sup>2</sup> /day	20	30
CO <sub>2</sub> usage	kg/kg algae biomass	2	2
Water evaporation	L/m <sup>2</sup> /day	7.5	7.5
Mixing power consumption	W/m <sup>3</sup>	10	20
Labor	people/ha	1	1
Production days	days	300	300
Land area	ha	5	5
Ratio V/S	m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup>	0.2	0.04
CO <sub>2</sub> fixation efficiency		0.9	0.9
Dilution rate	1/day	0.2	0.3
Total culture volume	m <sup>3</sup>	10,000	2000
Total biomass production	t/ha/year	60	90
Total CO <sub>2</sub> consumption	t/ha/year	120	180
Total water evaporation	t/ha/year	22,500	22,500
Water cost	€/kg	0.00005	0.00005
CO <sub>2</sub> cost	€/kg	0.3	0.3
Nutrients cost	€/kg	1	1
Fertilizers usage	kg/kg algae biomass	0.3	0.3
Power cost	€/kWh	0.1	0.1
Power for harvesting and others	kWh/m <sup>3</sup> harvest	0.1	0.1
Photobioreactor cost	€/m <sup>3</sup>	50	100



**Figura 28.** Comparación del costo de producción de biomasa y las principales contribuciones al costo de producción para el estudio de caso, considerando la utilización de aguas residuales y reduciendo la mano de obra requerida para la operación de la instalación (Acién Fernández y otros, 2019)



**Figura 29.** Las doce (12) principales instituciones por número de publicaciones científicas sobre microalgas (Garrido-Cardenas, Manzano-Agugliaro, Acien-Fernandez y Molina-Grima, 2018).



**Figura 30.** Fotografía junto a los fotobiorreactores tubulares (PBR-T), Almería, España.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ación Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M. and Molina Grima, E. (2019). Costs analysis of microalgae production. In *Biofuels from Algae (Second Edition)*, 551-566. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00021-4>
- Ación, F. G., Molina, E., Fernández-Sevilla, J. M., Barbosa, M., Gouveia, L., Sepúlveda, C., Bazaes, J. and Arbib, Z. (2017). Economics of microalgae production. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 485-503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00020-0>
- Ación Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M. and Molina Grima, E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 131-151. doi:10.1007/s11157-012-9307-6.
- Ación, F. G., Fernández, J. M., Magán, J.J. and Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol Advances* 30: 1344-1353.
- Ación Fernández, F. G., Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M. and Molina Grima, E. (1998). Modeling of Biomass Productivity in Tubular Photobioreactors for Microalgal Cultures: Effects of Dilution Rate, Tube Diameter, and Solar Irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (6): 605-616.
- Ación Fernández, F. G., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M. and Molina Grima, E. (1997). A Model for Light Distribution and Average Solar Irradiance Inside Outdoor Tubular Photobioreactors for the Microalgal Mass Culture. *Biotechnol Bioeng.* 55 (5): 701-14.
- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y. and Schenk, P. M. (2012). Review: Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories* 11: 96. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>.
- Alkhamis, Y. and Qin, J. G. (2015). Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, 28 (1): 35-42. doi:10.1007/s10811-015-0599-0.
- Alonso, D. L., Belarbi, E-H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J. and Molina Grima, E. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 54: 461-471.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Curing Techniques*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, p. 578.
- Andrade Domínguez, L., Cristiani Urbina, E., Martínez Jiménez, A., Flores Ortíz, C. M., Ríos Leal, E., Esparza García, F. J., Ponce Noyola, M. T. y Poggi-Varaldo, H. M. (2012). Polyunsaturated Fatty Acids in Bacteria, Algae and Fungi—A Review. *Environmental Engineering and Management Journal*. 11 (3) Supplement, S160. <http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/>
- Anjos, M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. and Dragone, G. (2013). Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 139: 149-154. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.032
- Arnold, L. E. and DiSilvestro, R. A. (2005). Zinc in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 15 (4): 619-627.
- Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá. (09 de junio de 2020). Aumentan las exportaciones de productos pesqueros en el primer trimestre. <https://arap.gob.pa/aumentan-las-exportaciones-de-productos-pesqueros-en-el-primer-trimestre/>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89-113. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev>.
- Bandarra, N. M., Pereira, P. A., Batista, I. and Vilela, M.H. (2003). Fatty acids, sterols and  $\alpha$ -tocopherol in *Isochrysis galbana*, *Journal of Food Lipids* 10: 25-34.
- Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F. and Brunet, C. (2014). The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Mar. Drugs*. 12, 1641-1675.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M. and Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2 (2), 164-173. doi:10.1016/j.algal.2013.01.004.
- Barbosa, M. J., Hoogakker, J. and Wijffels, R. H. (2003). Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomolecular Engineering*, 20 (4-6): 115-123. doi:10.1016/s1389-0344(03)00033-9.

- Beardall, J., Young, E. and Roberts, S. (2001a). Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat. Sci.*, 63 (1): 44-69.
- Beardall, J., Berman, T., Heraud, P., Omo Kadiri, M., Light, B. R., Patterson, G., Roberts, S., Sulzberger, B., Sahan, E., Uehlinger, U. and Wood, B. (2001b). A comparison of methods for detection of phosphate limitation in microalgae. *Aquatic Sciences*, 63 (1): 107-121. doi:10.1007/pl00001342.
- Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*; Richmond, A., Ed.; Blackwell: Oxford, UK. pp. 312-351.
- Becker, E. W. (1994). In "Microalgae: biotechnology and microbiology". Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Bellou, S., Baeshen, M .N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F. and Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. Research review paper. *Biotechnology Advances* 32: 1476-1493.
- Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C. and de Vargas, C. (2013). On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol* 25: 1763-1776.
- Benemann, J. R. (2008). Opportunities & challenges in algae biofuels production. FAO. [Online] FAO. Available at [http://www.fao.org/uploads/media/algae\\_positionpaper.pdf](http://www.fao.org/uploads/media/algae_positionpaper.pdf).
- Benemann, J. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4, 233-245.
- Benvenuti, G., Bosma, R., Ji, F., Lamers, P., Barbosa, M. J. and Wijffels, R. H. (2016). Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 28 (6): 3167-3177. doi:10.1007/s10811-016-0897-1.
- Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M. J. and Wijffels, R. H. (2014). Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27 (4): 1425-1431. doi:10.1007/s10811-014-0470-8
- Berberoglu, H., Yin, J. and Pilon, L. (2007). Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H<sub>2</sub> production and CO<sub>2</sub> mitigation. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 2273-2285.
- Berge, J. P., Gouygou, J. P. Dubacq, J. P. and Durand, P. (1995). Reassessment of lipid composition of the diatom, *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry* 39, 1017-1021.
- Beuzenberg, V., Goodwin, E. O., Puddick, J., Romanazzi, D., Adams, S. L. and Packer, M. A. (2016). Optimising conditions for growth and xanthophyll production in continuous culture of *Tisochrysis lutea* using photobioreactor arrays and central composite design experiments. *New Zealand Journal of Botany*, DOI: 10.1080/0028825X.2016.1238398.
- Pedrosa, R., Ortiz Montoya, E. Y., Sato, S., Perego, P., Monteiro de Carvalho, J. C. and Converti, A. (2011). Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. A kinetic Monod-type approach. *Bioresource Technology* 102: 3215-3219.
- Bhakuni, D. S and Rawat, D. S. (2005). *Bioactive marine natural products*. New York: Springer. doi:10.1007/1-4020-3484-9
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60: 497-503.
- Bird, J. K., Calder, P. C. and Eggersdorfer, M. (2018). Review: The Role of n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Cardiovascular Disease Prevention, and Interactions with Statins. *Nutrients* 10 (6): 775. doi:10.3390/nu10060775.
- Bishop, W. and Zubeck, H. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *J Nutr Food Sci.* 2 (5). doi:10.4172/2155-9600.1000147.
- Bitog, J. P., Lee, I. B., Lee, C. G., Kim, K. S., Hwang, H. S., Hong, S. W., Seo, I. H., Kwon, K. S. and Mostafa, E. (2011). Application of Computational Fluid Dynamics for Modeling and Designing Photobioreactors for Microalgae Production: A Review. *Comp. Electron. Agric.*, 76: 131-147.
- Blanchemain, A. and Grizeau, D. (1996). Eicosapentaenoic acid content of *Skeletonema costatum* as a function of growth and irradiance; relation with chlorophyll a content and photosynthetic capacity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 196, 177-188.
- Bona, F., Capuzzo, A., Franchino, M. and Maffei, M. E. (2014). Semicontinuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, 5, 1-6. doi:10.1016/j.algal.2014.03.007

- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae – their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25: 743-756.
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70: 313-321. doi:10.1016/S0168-1656(99)00083-8.
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9, 393-401.
- Borowitzka, M. A. (1992) Algal biotechnology products and processes matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4: 267-279.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y. and Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12: 37-47
- Brasil, B. S. A. F., Silva, F. C. P. and Siqueira, F. G. (2017). Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnology*, 39, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., and Cunnane, S. C. (2009).  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80: 85-91. doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 557-577.
- Brenner, R. R. and Peluffo, R. O. (1966). Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. *J. Biol. Chem.* 241 (22): 5213-9.
- Brissoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., Berberidis, K. and Jacobsen, A. (2010). An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 6768-6777.
- Brown, M., Garland, C., Jeffrey, S., Jameson, I. and Leroi, J. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5, 285-296.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. and Garland, C. D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Mar. Lab. Rep.* 205, 44.
- Bruce, B. D. (1998). The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol Biol* 38: 223-246.
- Brunner, E. (2006). Oily fish and omega 3 fat supplements. *BMJ*, 332 (7544): 739-740. doi:10.1136/bmj.38798.680185.47
- Camacho-Rodríguez, J., González-Céspedes, A. M., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., Ación-Fernández, F. G. and Molina-Grima, E. (2013). A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6): 2429-2440. doi:10.1007/s00253-013-5413-9.
- Carvalho, A.P., Pontes, I., Gaspar, H., Malcata, F.X. (2006a). Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 358-366.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A. and Malcata, F. X. (2006b). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog* 22(6): 1490-1506.
- Carvalho, A. P. and Malcata, F. X. (2005). Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Mar. Biotech.* 7 (4): 381-388. doi: 10.1007/s10126-004-4047-4.
- Casal, C., Cuaresma, M., Vega, J.M. and Vilchez, C. (2011). Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Mar Drugs* 9: 29-42.
- Chacón-Lee, T. L. and González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for "Healthy" Foods—Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 655-675
- Chatsungnoen, T. and Chisti, Y. (2016). Harvesting microalgae by flocculation-sedimentation. *Algal Research*, 13, 271–283. doi:10.1016/j.algal.2015.12.009.

- Chen, T.-P., Liu, J., Guo, B.-B., Ma, X.-N., Sun, P.-P., Liu, B. and Chen, F. (2015). Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*. *Sci. Rep.* 5. DOI: 10.1038/srep14936
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J. and Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol*, 102 (1): 71-81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.
- Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1993). Improve the performance of airlift reactors. *Chem Eng Progress* 89 (6): 38-45.
- Chisti, Y. (1989). *Airlift bioreactors*. New York: Elsevier, p. 355.
- Chojnacka, K. and Marquez-Rocha, F.J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 3, 21-34.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agric* 93: 5-11.
- Codgrove and Borowitzka, M. A. (2010). Chlorophyll fluorescence terminology: An introduction. In: Suggett, D., Prásil, O., Borowitzka, M. A. (Eds.) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences. Methods and Applications*. Springer, Dordrecht. Pp 1-17.
- Cohen, Z. (1999). *Porphyridium cruentum*, in Z. Cohen (ed.), *Chemicals From Microalgae*, Taylor & Francis Ltd., U.K, pp. 1-24.
- Contraloría General de la República de Panamá. (2017). Dirección de Estadística y Censo. <https://www.inec.gob.pa/archivos/P9351COMENTARIO.pdf>
- Contraloría General de la República de Panamá. (2017). Dirección de Estadística y Censo. <https://www.inec.gob.pa/archivos/P8481Comentario.pdf>
- Contraloría General de la República de Panamá. (2016). Dirección de Estadística y Censo. <https://www.inec.gob.pa/archivos/P8461Cuadro%207.pdf>
- Contraloría General de la República de Panamá. (2015). Dirección de Estadística y Censo. <https://www.inec.gob.pa/archivos/P8341Cuadro%2010-2.pdf>
- Cornet, J. F. (1998). Le technoscope: Les photobioréacteurs. *Biofutur*. 176, 1–10.
- Correa-Reyes, J. G., Sánchez-Saavedra, M. P., Siqueiros-Beltrones, D. A. and Flores-Acevedo, N. (2001). Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *J Shellfish Res* 20: 603-610
- Cosgrove, J. and Borowitzka, M. A. (2010). Chlorophyll Fluorescence Terminology: An Introduction. *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*, 1-17. doi:10.1007/978-90-481-9268-7\_1
- Costa, J. A. V. and de Morais, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol* 102: 2-9.
- Courchesne, N. M. D., Parisien, A., Wang, B. and Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141, 31-41. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.018.
- Cuaresma, M. (2011). *Cultivation of microalgae in a high irradiance area*. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. ISBN: 978-90-8585-954-3.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Romero-Ogawaa, M. A., Vannela, R., Sean Lai, Y.J., Rittmann, B. E. and Parra-Saldivar, R. (2015). Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. *Algal Research* 12: 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.018>.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A. and Parra-Saldivar, R. (2014). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8 (2): 190-209. doi:10.1111/1751-7915.12167
- Cullen, J. J., Yang, X. and MacIntyre, H. L. (1992). Nutrient limitation of marine photosynthesis. In Falkowski, P. G. & Woodhead, A. D. [Eds.] *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 69-88.

- Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). CCAP 927/14 *Tisochrysis lutea*. Scottish Association for Marine Science. Link web site: <https://www.ccap.ac.uk/results2014.php>.
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Rauter, A. P., Alberício, F. and Varela, J. (2013). Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*, 26 (1): 151-161. doi:10.1007/s10811-013-0098-0.
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M. and Yokoyama, S. (2015). Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heatkilled *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of Amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *BioMed Res. Int.*, 2015: Article ID 514196. <https://doi.org/10.1155/2015/514196>.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. and Samain, J.-F. (1993). The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 173 (2): 163-179. doi:10.1016/0022-0981(93)90051-o.
- Demirbas, A. (2008). Production of biodiesel from microalgae oils. *Energ Sources* 31: 163-168. doi:10.1080/15567030701521775.
- deMooij, T., Janssen, M., Cerezo-Chinarro, O., Mussgnug, J. H., Kruse, O., Ballottari, M., Bassi, R., Bujaldon, S., Wollman, F.-A. and Wijffels, R.H. (2014). Antenna size reduction as a strategy to increase biomass productivity: a great potential not yet realized, *J. Appl. Phycol.* 1-15.
- De Pauw, N. and Persoone, G. (1988). Micro-algae for aquaculture. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algae Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Dietz, K.-J., Baier, M. and Kramer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants (From Molecules to Ecosystems)*. Springer, pp. 73-94.
- Dillschneider, R., Steinweg, C., Rosello-Sastre, R. and Posten, C. (2013). Biofuels from microalgae: photoconversion efficiency during lipid accumulation. *Bioresour Technol.* 142: 647-654.
- Domenichiello, A. F., Kitson, A. P., Chen, C. T., Trépanier, M.-O., Stavro, P. M., and Bazinet, R. P. (2016). The effect of linoleic acid on the whole body synthesis rates of polyunsaturated fatty acids from  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid in free-living rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 30, 167-176. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.11.016
- Donato, M., Vilela, M. H. and Bandarra, N. M (2003). Fatty acids, sterols,  $\alpha$ -tocopherol and total carotenoids composition of *Diacronema vlkianum*, *Journal of Food Lipids* 10: 267-276.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R. and Karube, I. (1995). Photobiological aspects of algal mass cultures. *J Mar Biotechnol* 2: 61-65.
- Dubinsky, Z. (1992). The functional and optical absorption cross-sections of photosynthesis In Falkowski, P. G. and Woodhead, A. D. [Eds.] *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 31-45.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M. and Garland, C. D. (1993). Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5 (1): 71-83. doi:10.1007/bf02182424.
- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A. and Litchman, E. (2015). Light and growth in marine phytoplankton: allometric, taxonomic, and environmental variation. *Limnol. Oceanogr.* 60, 540-552. doi: 10.1002/lno.10033.
- Eppley, R. W. (1980). Estimating phytoplankton growth rates in the central oligotrophic oceans. In Falkowski, P. G. [Ed.] *Primary Productivity in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 231-42.
- Eppley, R. W. (1972). Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish. Bull.* 70: 1063-85.
- Eskin, N. A. M. and Tamir, S. (2006). *Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Essa, A. M., Mabrouk, A. H. and Zaki, A. M. (2004). Growth performance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and hybrid grass carp fingerlings fed on different types of aquatic plants and artificial diet in concrete basins. *Egyptian J. Aquacul. Res.*, 30B: 341-348. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000400007>
- Ewart, J. W. and Pruder, G. D. (1981). Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis* aff. *Galbana*, clone T-iso at four temperatures and three light intensities. *J World Maric Soc* 12: 333-339.

- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. and Patiño, M. (1998). Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture* 169: 167-176.
- Falkowski, P. G. and Kolber, Z. (1993). Estimation of phytoplankton photosynthesis by active fluorescence. *ICES Mar. Sci. Symp.* 197: 92-103.
- Falkowski, P. G. and LaRoche, J. (1991). ACCLIMATION TO SPECTRAL IRRADIANCE IN ALGAE. *Journal of Phycology*, 27(1): 8-14. doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00008.x.
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Oportunidades y desafíos. Roma.
- FAO. (2011). Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series. Aquaculture production: quantities 1950-2009; aquaculture production: values 1984-2009; capture production: 1950-2009; commodities production and trade: 1950-2008; total production: 1970-2009, Vers. 2.30. Available at. FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. [www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp](http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp)
- FAO. (2010). Fats and Fatty Acids in Human Nutrition: Report of an Expert Consultation; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i1953e.pdf>
- Fernández, I., Ación, F. G., Berenguel, M. and Guzmán, J. L. (2014). First principles model of a tubular photobioreactor for microalgal production. *Ind Eng Chem Res* 53: 11121-11136.
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. and Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166: 105-116.
- Fresnedo, O. and Serra, J. L. (1992). Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J Phycol* 28: 786-793.
- Frumento, D., Casazza, A. A., Arni, S. A. and Converti, A. (2013). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: a lipid source for biodiesel production. *Biochem Eng J.*, 81: 120-125. doi:10.1016/j.bej.2013.10.011.
- Fuentes-Grünwald, C., Garcés, E., Alacid, E., Rossi, S. and Camp, J. (2012). Biomass and Lipid Production of Dinoflagellates and Raphidophytes in Indoor and Outdoor Photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 15 (1): 37-47. doi:10.1007/s10126-012-9450-7
- Galland, L. (1985). Impaired essential fatty acid metabolism in latent tetany. *Magnesium* 4 (5-6): 333-338.
- García García, J., Rouco Yañez, A. y García García, B. (2001). Evolución del peso económico de la acuicultura marina: Importancia económica de la acuicultura. *An. Vet.* 17: 41-50.
- García-Malea López, M. C., Del Río Sánchez, E., Casas López, J.L., Ación Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., Rivas, J., Guerrero, M.G., Molina Grima. (2006). Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol.* 123, 329-342.
- Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F., Acion-Fernandez, F. G. and Molina-Grima, E. (2018). Microalgae research worldwide. *Algal Research*, 35, 50-60. doi:10.1016/j.algal.2018.08.005
- Gladue, R. M. and Maxey, J. E. (1994). Microalgae feeds for aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 6, 131-141.
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev Aquac.* 1: 71-124.
- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z. and Jiang, M. (2013). Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *J. Basic Microb.* 53, 29-36.
- Gong, Y. and Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology Letters*, 33 (7), 1269-1284. doi:10.1007/s10529-011-0574-z
- González López, C. V., García Cerón, M. C., Ación Fernández, F. G., Segovia Bustos, C., Chisti, Y. and Fernández Sevilla, J. M. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol* 101: 7587-7591.

- Gordillo, F. J. L., Goutx, M., Figueroa, F. L. and Niell, F. X. (1998). Effects of light intensity, CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 10, 135-144.
- Gouveia, L., Marques, A. E., Sousa, J. M., Moura, P. and Bandarra, N. M. (2010). Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7 (2): 21-37. doi:10.1616/1476-2137.15884
- Graham, R. D. and Rosser, J. M. (2000). Carotenoids in staple foods: Their potential to improve human nutrition. *Food Nutr. Bull.* 21, 405-409.
- Gross, M. (2013). Development and optimization of novel algal cultivation systems. Graduate Theses and Dissertations. 13138. Iowa State University. Food Science and Human Nutrition Department. <https://lib.dr.iastate.edu/etd/13138>.
- Gudin, C. and Chaumont, D. (1991) Cell fragility - the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresour Technol.* 38, 145-151.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M. and Malcata, F. X. (2011a). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs*. 9, 625-644.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M. and Malcata, F. X. (2011b). Microalgae as sources of high added-value compounds—A brief review of recent work. *Biotechnol. Prog.* 27, 597-613.
- Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. and Tremblin, G. (2010). Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.* 22, 629-638.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L. and Tremblin, G. (2009). Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369, 136-143. doi:10.1016/j.jembe.2008.11.009.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L. and Tremblin, G. (2008). Environmental factors affecting growth and omega 3 fatty acid composition in *Skeletonema costatum*. The influences of irradiance and carbon source. *Diatom Res.* 28, 93-103.
- Gurr, M. I. and Harwood, J. L. (1991). *Lipid Biochemistry*, Chapman & Hall, London.
- Guschina, I. A. and Harwood, J. L. (2006a). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160-186.
- Guschina, I. A. and Harwood, J. L. (2006b). Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 67 (16): 1731-1739. doi:10.1016/j.phytochem.2006.01.023.
- Gutierrez-Wing, M. T., Silaban, A., Barnett, J., Rusch, K. A. (2014). Light irradiance and spectral distribution effects on microalgal bioreactors Review. *Engineering in Life Sciences* 14 (6): 574-580.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K. and Webley, P.A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour Technol* 102: 178-185.
- Hall, D. O., Ación Fernández, F. G., Cañizares Guerrero, E., Rao, K. K. and Molina Grima, E. (2003). Outdoor Helical Tubular Photobioreactors for Microalgal Production: Modeling of Fluid-Dynamics and Mass Transfer and Assessment of Biomass Productivity. *Biotechnology and Bioengineering* 82 (1): 62-73.
- Hallmann, A. (2007). Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant. J.* 1, 81-98.
- Han, F., Huang, J., Li, Y., Wang, W., Wan, M., Shen, G. and Wang, J. (2013). Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO<sub>2</sub>. *Bioresour Technol.* 136, 418-424. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.017.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B. y Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*. 1(5): 763-784.
- Harwood, J.L. (1994). Environmental factors affecting lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* 33, 193-202.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. and Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 1737-1746.
- Hempel, N., Petrick, I. and Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *J Appl Phycol* 24: 1407-1418. DOI 10.1007/s10811-012-9795-3.

- Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A. and Maier, U. G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microb Cell Fact* 10: 81.
- Herlory, O., Richard, P. and Blanchard, G. F. (2007). Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. *Mar. Biol.*, 153 (1): 91-101.
- Hincapie, E. and Stuart, B. J. (2015). Design, construction, and validation of an internally lit air lift photobioreactor for growing algae. *Front Energy Res* 2 (65): 1-7. doi:10.3389/fenrg.2014.00065.
- HLPE. (2014). La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, Roma, 2014.
- Horrocks, L. and Yeo, Y. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 40: 211-25.
- Hsieh, C.-H. and Wu, W.-T. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100 (17), 3921-3926. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-39.
- Hu, Q. (2004). Environmental Effects on Cell Composition. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*; Richmond, A., Ed.; Blackwell: Oxford, UK, p 83-93.
- Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W. and Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energ.* 87, 38-46.
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'h, G., Hérault, J. and Ergon, F. (2017). Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL*, 24 (4), D407. doi:10.1051/ocl/2017023.
- Hulatt, C. J., Wijffels, R. H., Bolla, S. and Kiron, V. (2017). Production of Fatty Acids and Protein by *Nannochloropsis* in Flat-Plate Photobioreactors. *PLOS ONE*, 12 (1), e0170440. doi:10.1371/journal.pone.0170440.
- IndexMundi. (21 de junio de 2020). Fish Meal Production by Country in 1000 MT. <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=fish-meal>
- Ippoliti, D., González, A., Martín, I., Sevilla, J. M. F., Pistocchi, R. and Acién, F. G. (2016). Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3159-3166. doi:10.1007/s10811-016-0856-x
- Iqbal, M. and Zafar, S. (1993). Effects of photon flux density, CO<sub>2</sub>, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiol.* 38, 509-514.
- Iwamoto, H. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species. *Chlorella*. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology*. Oxford, U.K.: Blackwell Science. p 255-263.
- James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Price, G. D. and Djordjevic, M. A. (2013). Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresour. Technol.* 127: 441-447, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.090>.
- Jassby, A. D. and Platt, T. (1976). Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 21: 540-7.
- Jebali, A., Acién, F. G., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J. M., Mhiri, N., Karray, F., Dhoubi, A., Molina-Grima, E. and Sayadi, S. (2015). Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. *Bioresource Technology*, 198, 424-430. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.037.
- Jiang, J. G. and Zhu, Y. H. (2010). Preliminary and comparative studies on the cultivations of *dunaliella salina* between outdoors and in the photobioreactor. *J Food Process Eng* 33 (1): 104-114
- Jin, E., Polle, J. E.W., Lee, H. K., Hyun, S. M. and Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 165-174.
- Johansson, N. and Graneli, E. (1999). Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios. *Mar Biol* 135: 209-217
- Juneja, A., Ceballos, R. and Murthy, G. (2013). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*, 6, 4607-4638. doi:10.3390/en6094607

- Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S. and Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor, *Bioresour. Technol.* 98, 288-295.
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci* 5: E25.
- Kelman, D., Kromkowski Posner, E., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R. and Wright, A. D. (2012). Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Mar. Drugs*. 10, 403-416.
- Khan, S. A., Rashmi, Hussain, M. Z., Prasad, S. and Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew Sust Energ Rev* 13: 2361-2372. doi:10.1016/j.rser.2009.04.005.
- Khan, Z., Bhadouria, P. and Bien, P. S. (2005). Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol* 6: 373-9.
- Khotimchenko, S. V. and Yakovleva, I. M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66, 73-79.
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C. and Lynn, S. (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol.* 38: 591-596.
- Kim, Z.-H., Park, Y.-S., Ryu, Y.-J. and Lee, C.-G. (2017). Enhancing biomass and fatty acid productivity of *Tetraselmis* sp. in bubble column photobioreactors by modifying light quality using light filters. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(4): 397-404. doi:10.1007/s12257-017-0200-6.
- Kirk, J. T. O. (1994). *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 509.
- Kitajima, Y., El-Shishtawy, R. M. A., Ueno, Y., Otsuki, S., Miyake, J., Morimoto, M. (1998). Analysis of compensation point of light using plane-type photosynthetic bioreactor. In: Zaborsky, O. (Ed.), *Biohydrogen*. Plenum Press, New York, pp. 359-368.
- Klyachko-Gurvich, G. L., Tsoglin, L. N., Doucha, J., Kopetskii, J., Shebalina, I. B. and Semenenko, V. E. (1999). Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol Plantarum* 107: 240-249.
- Knothe, G. (2012). Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. prediction of fuel properties of algal biodiesel. *Energy Fuel* 26: 5265-5273, <http://dx.doi.org/10.1021/ef300700v>.
- Knothe, G. (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.* 2, 759-766.
- Kochert, G. (1978). Quantitation of the macromolecular components of microalgae. In: Hellebust JA, Craigie JS (eds) *Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 189-195.
- Koru, E. (2012). *Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standards*, Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6.
- Langdon, C. (1988). On the causes of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. II. A general review. *J. Plank. Res.* 10: 1291-1312.
- Lee, J., Lee, H., Kang, S. and Park, W. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients*, 8(1), 23. doi:10.3390/nu8010023.
- León, R., Martín, M., Vígara, J., Vilchez, C. and Vega, J. (2003). Microalgae-mediated photoproduction of  $\beta$ -carotene in aqueous organic two-phase systems. *Biomol. Eng.* 20, 177-182.
- Li, Z.-R., Wakao, S., Fischer, B. B. and Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 239-260.
- Liang, Y., Beardall, J. and Heraud, P. (2006). Changes in growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition with culture age in batch cultures of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.* 49, 165-173.
- Lichtenthaler, H. K. and Rinderle, U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Vol. 19, Suppl. 1: 39-85.
- Lin, Y.-H., Chang, F.-L., Tsao, C.-Y. and Leu, J.-Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochem Eng J.*, 37: 166-176.

- Liu, J., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2013). Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4785-4798. DOI 10.1007/s00253-013-4749-5.
- Liu, C.-P. and Lin, L.-P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot Bull Acad Sin* 42: 207-214.
- López, M. C. G. M., Sánchez, E. D. R., Casas López, J. L., Fernández, F. G. A., Sevilla, J. M. F., Rivas, J., Guerrero, M. G. and Grima, E. M. (2006). Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 123 (3), 329-342. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.010>
- Lourenço S. O., Barbarino, S., Mancini-Filho, J., Schnke, K. P. and Aida, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41:158-168.
- Lucas-Salas, L. M., Castrillo, M. and Martínez, D. (2013). Effects of dilution rate and water reuse on biomass and lipid production of *Scenedesmus obliquus* in a two-stage novel photobioreactor. *Bioresource Technology*, 143, 344-352. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.007.
- Ma, X.-N., Chen, T.-P., Yang, B., Liu, J. and Chen, F. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, 14: 61. doi:10.3390/md14040061.
- Mandalam, R. K., Palsson, B. Ø. (1998). Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 605-611.
- Marchetti, J., da Costa, F., Bougaran, G., Quéré, C., Soudant, P. and Robert, R. (2017). The combined effects of blue light and dilution rate on lipid class and fatty acid composition of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 30: 1483-1494. doi:10.1007/s10811-017-1340-y.
- Markou, G., Angelidaki, I. and Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:631-645. DOI 10.1007/s00253-012-4398-0
- Marshall, R., McKinley, S. and Pearce, C.M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Rev. Aquacult.*, 2, 33-55.
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. and Southgate, P. C. (2006). The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture* 257: 491-503.
- Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232.
- MIDA-DINAAC. (2005). Estadísticas de Acuicultura de 2004. Panamá.
- Mock, T. and Kroon, B. M. A. (2002). Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—II: The significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry* 61, 53-60.
- Mohrhauer, H., Christiansen, K., Gan, M. V., Deubig, M. and Holman, R. T. (1967). Chain elongation of linoleic acid and its inhibition by other fatty acids in vitro. *J. Biol. Chem.* 242 (19): 4507-4514.
- Molina Grima, E., Fernández, J., Ación, F.G. and Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* 92: 113-131.
- Molina Grima, E., Ación Fernández, F. G., García Camacho, F. and Chisti, Y. (1999a). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol.* 70: 231-47.
- Molina Grima, E., García Camacho, F. and Ación Fernández, F. (1999b). Production of EPA from *Phaeodactylum Tricornutum*. In *Chemicals from Microalgae*; Cohen, Z., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 57-92.
- Molina Grima, E., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Ación Fernández, F. G. and Fernández Sevilla, J. M. (1997). Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. *Enz Microbiol Technol*, 21 (5): 375-381.
- Molina Grima, E., Fernández, J. M., Sánchez, J. A. and García, F. (1996a). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J Biotechnol* 45: 59-69.
- Molina Grima, E., Sánchez-Pérez, J. A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J. M., Ación Fernández, F. G. (1996b). Productivity analysis of outdoors chemostat culture in tubular air-lift photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 8, 369-380.

- Molina Grima, E., Pérez, J. A. S., Camacho, F. G., Medina, A. R., Giménez, A. G. and López Alonso, D. (1995). The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification. *Process Biochemistry*, 30 (8): 711-719. doi:10.1016/0032-9592(94)00047-6.
- Molina Grima, E., García, F., Sánchez, J. A., Fernández, J. M., Acién, F. G. and Contreras Gómez, A. (1994a). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *J Chem Technol Biotechnol* 61: 167-173
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G. (1994b). Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 23-27.
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Sánchez, J. L., García Camacho, F. and López Alonso, D. (1992). EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem.* 27: 299-305.
- Mondal, M., Goswami, S., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O. N., Das, P., Gayen, K., Mandal, M. K. and Halder, G. N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *3 Biotech*, 7 (2): 3-21. doi:10.1007/s13205-017-0727-4.
- Monroig, Ó., Tocher, D. and Navarro, J. (2013). Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Invertebrates: Recent Advances in Molecular Mechanisms. *Marine Drugs*, 11: 3998-4018. doi:10.3390/md11103998.
- Mori, T. A. (2017). Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia*, 123: 51-58. doi:10.1016/j.fitote.2017.09.015.
- Mortensen, S. H., Borsheim, K. Y., Rainuzzo, J. R. and Knutsen, G. (1988). Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros neoneogracle* Schutt. Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122, 173-185.
- Morweiser, M., Kruse, O., Hankamer, B. and Posten, C. (2010). Developments and perspectives of the photobioreactors for biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 1291-1301.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.G. and Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresour. Technol.* 123, 279-283.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J. and Divanach, P. (2003). Uses of microalgae in aquaculture. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (Strøttrup, J.G. & McEvoy, L.A. eds), pp. 253-299. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J Appl Phycol* 12: 527-534.
- Napolitano, G. E., Ackman, R. G. and Ratnayake, W.M.N. (1990) Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros neogracle* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World Aquacult. Soc.*, 21, 122-130.
- Nevejan, N., Courtens, V., Hauva, M., Gajardo, G. and Sorgeloos, P. (2003). Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Marine Biology*, 143 (2): 327-338. doi:10.1007/s00227-003-1076-x.
- Norsker, N.-H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H. and Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29 (1), 24-27. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.005
- Ohse, S., Bianchini Derner, R., Ávila Ozório, R., Gordo Corrêa, R., Badiale Furlong, E. and Roberto Cunha, P. C. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia (Arica)*, 33 (1): 93-101. doi:10.4067/s0718-34292015000100010.
- Olsen, R. L. and Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120-128. doi:10.1016/j.tifs.2012.06.003.
- Oostlander, P. C., van Houcke, J., Wijffels, R. H. and Barbosa, M. J. (2020). Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture*, 525, 735310. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735310
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. and Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (4): 1429-1441. doi:10.1007/s00253-011-3170-1.
- Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E. and Vázquez-Carrera, M. (2017). Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 29 (3): 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>.

- Pan, Y.-Y., Wang, S.-T., Chuang, L.-T., Chang, Y.-W., and Chen, C.-N. N. (2011). Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology*, 102(22): 10510-10517. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.091.
- Pardo, V., González-Rodríguez, Á., Guijas, C., Balsinde, J. and Valverde, Á. M. (2015). Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. *J. Biol.Chem.* 290 (18): 11663-11677. DOI 10.1074/jbc.M115.649483.
- Parkhill, J. P., Maillet, G. and Cullen, J. J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.*, 37: 517-529.
- Parrish, C. C. (1987). Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thinlayer chromatography with measurement by latroscan flame ionization detection. *Can J Fish Aquat Sci* 44: 722-731.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. and Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1): 1-9. doi:10.1007/s10499-006-9060-3.
- Pegallapati, A. K. and Nirmalakhandan, N. (2013). Internally illuminated photobioreactor for algal cultivation under carbon dioxide-supplementation: Performance evaluation. *Renew Energy* 56: 129-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.09.052>.
- Peltomaa, E., Johnson, M. and Taipale, S. (2017). Marine Cryptophytes Are Great Sources of EPA and DHA. *Marine Drugs*, 16(1): 3. doi:10.3390/md16010003.
- Peng, L., Zhang, Z., Cheng, P., Wang, Z. and Lan, C. Q. (2016). Cultivation of *Neochloris oleoabundans* in bubble column photobioreactor with or without localized deoxygenation. *Bioresour Technol.* 206: 255-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.081>.
- Pereira, F. M., Loures, C. C. A., Amaral, M. S., Gomes, F. M., Pedro, G. A., Machado, M. A. G., Reisa, C. E. R. and Silva, M. B. (2018). Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor. *Fuel*, 230, 155-162. doi:10.1016/j.fuel.2018.04.170.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E. and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res* 45: 11-36.
- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. and Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221(1-4): 393-406. doi:10.1016/s0044-8486(03)00030-9.
- Petkov, G. and Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 281-285.
- Poisson, L. and Ergon, F. (2001). Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *Journal of Biotechnology*, 91: 75-81.
- Ponis, E., Parisi, G., Le Coz, J.-R., Robert, R., Zittelli, G. C. and Tredici, M. R. (2006) Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquacult. Nutr.* 12, 322-329.
- Posten, C. (2009). Design Principles of Photo-bioreactors for Cultivation of Microalgae. *Eng. Life Sci.* 9: 165-177.
- Powell, E. N., Bochenek, E. A., Klinck, J. M. and Hofmann, E. E. (2002). Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture*, 210 (1-4): 89-117. doi:10.1016/s0044-8486(01)00891-2.
- Priyadarshani, I. and Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (4): 89-100.
- Priyadarshani, I., Sahu, D. and Rath, B. (2012). Algae in Aquaculture. *International Journal of Health Sciences and Research* 2 (1): 108-114. ([www.ijhsr.org](http://www.ijhsr.org)).
- Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 635-648.
- Qi, B., Beoxiu, F., Fraser, T., Bleakley, C. L., Shaw, E. M., Stobart, K. and Lazarus, C. M. (2003). The variant his-box of the C18-Δ9-PUFA-specific elongase IgASE1 from *Isochrysis galbana* is essential for optimum enzyme activity. *FEBS Letters*, 547: 137-139.

- Qin, S., Lin, H. Z. and Jiang, P. (2012). Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol Adv* 30: 1602-1613.
- Qin, J. G. and Culver, D. A. (1996). Effect of larval fish and nutrient enrichment on plankton dynamics in experimental ponds. *Hydrobiologia* 321, 109-118.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S. I., Tae, H., Settlage, R. E., Boore, J. L. and Posewitz, M. C. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications*, 3: 686. doi:10.1038/ncomms1688.
- Rajasekaran, A., Sivagnanam, G. and Xavier, R. (2008). Nutraceuticals as therapeutic agents: A review. *Res J Pharm Tech*. 1: 328-340.
- Rama Deli, S. and Prasad, M. N. V. (1999). Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants (From Molecules to Ecosystems)*. Springer, pp. 99-116.
- Rana, K. J., Siriwardena, S., and Hasan, M. R. (2009). Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. (FAO Technical Paper No. 541). Rome, Italy: FAO.
- Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R. and Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* 98, 560-564.
- Rasdi, N. W. and Qin, J. G. (2014). Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 27 (6): 2221-2230. doi:10.1007/s10811-014-0495-z.
- Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., Hoseini-Alhashemi, S. and Ghasemi, Y. (2011). *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*, 88 (10): 3354-3356. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.040.
- Reichert, C. C., Reinehr, C. O. and Costa, J. A. V. (2006). Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23 (1): 23-28.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30, 972-979.
- Remmers, I. M., Hidalgo-Ulloa, A., Brandt, B. P., Evers, W. A. C., Wijffels, R. H. and Lamers, P. P. (2017). Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 244, 1384-1392. doi:10.1016/j.biortech.2017.04.093.
- Ren, T. (2014). Primary Factors Affecting Growth of Microalgae Optimal Light Exposure Duration and Frequency. Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University. 13793. <http://lib.dr.iastate.edu/etd/13793>.
- Renaud, S. M., Luong-Van, T., Lambrindis, G. and Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211: 195-214.
- Renaud, S. M., Thinh, L. V. and Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170: 147-159.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgae culture. Biotechnology and applied phycology*. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Robin, J. H. (1995). The importance of n-6 fatty acids in the culture of marine fish larvae. In: *Proceedings of the Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish*, Pittman K, Batty RS, Verreth J, eds. (Norway: Bergen) pp. 106-111.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112. doi:10.1002/bit.22033.
- Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E.-H., Sánchez, J. L. G. and Alonso, D. L. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol Techniques* 12 (9): 689-691. doi:10.1023/a:1008812904017.
- Roesler, K., Shintani, D., Savage, L., Boddupalli, S. and Ohlrogge, J. (1997). Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology* 113 (1): 75-81.
- Roessler, P. G. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: Commercial implications and future research directions. *J Phycol* 26: 393-399.

- Rost, E. J., Perales, S. G., Carstens, M. R. and Pérez, L. B. (2017). Modelado de la Producción de Biomasa Microalgal en un Fotobiorreactor de Burbujeo Anular y Configuración Variable. *Información Tecnológica*, 28(2): 95-104. doi:10.4067/s0718-07642017000200011.
- Russo, G. L. (2009). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, 77: 937-946. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.020.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y. and Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35, 265-278.
- Sala-Vila, A., Miles, E. A. and Calder, P. C. (2008). Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(9), 1432-1450. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03072.x
- Sales-Campos, H., Reis de Souza, P., Crema Peghini, B., Santana da Silva, J. and Ribeiro Cardoso, C. (2013). An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(2): 201-210. doi:10.2174/138955713804805193.
- Samudio, R. y Heckadon-Moreno, S. (2009). Open Sea Aquaculture in Panama: An Assessment of Cobia Production by Pristine Oceans. Smithsonian Tropical Research Institute and McGill University.
- San Pedro, A., González-López, C. V., Acién, F. G. and Molina-Grima, E. (2014). Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 169, 667-676. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.052.
- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Acién, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J. and Molina-Grima, E. (2008a). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochem* 43: 398-405.
- Sánchez, J. F., Fernández Sevilla, J. M., Acién, F. G., Cerón, M. C., Pérez Parra, J. and Molina Grima, E. (2008b). Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79: 719-729. DOI 10.1007/s00253-008-1494-2.
- Sánchez, M., Castillo, B.J., Rozo, C. and Rodríguez, I. (2003). *Spirulina* (Arthrospira): An edible microorganism. A review, *Universitas Scientiarum*, Vol. 8, No.1, pp.1-16, URL: [www.javeriana.edu.co/universitas.docs./Vol8\\_hm](http://www.javeriana.edu.co/universitas.docs./Vol8_hm).
- Sánchez Mirón, A., Cerón García, M.C., García Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y. (2002). Growth and characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1015-1023.
- Sánchez, S., Martínez, M. and Espinola, F. (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem Eng J.* 6: 13-18.
- Sánchez Mirón, A., Gómez, A. C., Camacho, F. G., Grima, E. M. and Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol* 70: 249-70.
- Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., Guadarrama-Mendoza, P. C. and Salas-Coronado, R. (2016). Lipids rich in  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (20): 8667-8684. doi:10.1007/s00253-016-7818-8.
- Saoudi-Helis, L. (1994). Influence du taux de croissance et de stress thermiques sur la composition biochimique et lipidique de *Isochrysis aff. galbana* clone T. iso. Culture en conditions controlées. These de Docteur de l' Université d' Aix-Marseille 2, 148 pp.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A. and Bell, J. G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquacul.* 155: 117-128.
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J. and Tocher, D. R. (1994). Marine organisms as models for essential fatty acid research. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Marine Biotechnology Conference*. (Tromsø, Norway: Tromsø University, 94).
- Sayanova, O. V. and Napier, J. A. (2004). Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* 65 (2): 147-158
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. and Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Res.* 1: 20-43.

- Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., & Hahn, A. (2009). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European Journal of Pediatrics*, 169 (2): 149-164. doi:10.1007/s00431-009-1035-8.
- Sen Roy, S. and Pal, R. (2015). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc Zool Soc.* 68 (1): 1-8.
- Servel M-O., Claire C., Derrien, A., Coiffard, L., De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36: 691-693.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. and Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5: 1532-1553.
- Shen, Y.-Q. and Burger, G. (2008). Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Functional & Integrative Genomics*, 9 (2): 145-151. doi:10.1007/s10142-008-0095-6.
- Sijtsma, L. and de Swaaf, M. E. (2004). Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (2): 146-153. doi:10.1007/s00253-003-1525-y.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233: 674-688.
- Singh, A. and Olsen, S. I. (2011). A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Appl. Energy* 88:3548-3555. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.012
- Sobczuk, T. and Chisti, Y. (2010). Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 100-108.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M. and Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*. 243, 217-224.
- Solimeno, A., Gabriel, F. and Garcia, J. (2017). Mechanistic model for design, analysis, operation and control of microalgae cultures: Calibration and application to tubular photobioreactors. *Algal Research*, 21, 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.023>
- Solovchenko, A., Lukyanov, A., Solovchenko, O., Didi-Cohen, S., Boussiba, S. and Khozin-Goldberg, I. (2014). Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CICALA 804. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 635-644.
- Sørensen, L., Hantke, A., and Eriksen, N.T. (2013). Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *J Sci Food Agric* 93: 2933-2938.
- Sorgeloos, P., Dehasque, M., Dhert, P. and Lavens, P. (1995). Review of some aspects of marine fish larviculture. In: *Proceedings of the Symposium in Mass Rearing of Juvenile Fish*, Pittman K, Batty RS, Verreth J, eds. (Norway: Bergen) pp. 138-142.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006) Review: Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101 (2): 87-96.
- Sprecher, H., Chen, Q. and Yin, F. Q. (1999). Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n3: a complex intracellular process. *Lipids* 34: 153-156.
- Stansell, G. R., Gray, V. M., Sym, S. D. (2012). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *J. Appl. Phycol.* 24: 791-801.
- Stottrup, J.G. and McEvoy, L.A. (2003). *Live Feeds in Marine Aquaculture*, Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Suh, I.S. and Lee, C.-G. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8, 313-321.
- Sukenik, A. (1999). Production of EPA by *Nannochloropsis*. In: Cohen Z (ed) *Chemicals from microalgae*. Taylor and Francis, London, pp. 41-56.
- Sukenik, A., Zmorab, O. and Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition II. *Nannochloropsis* sp.. *Aquaculture* 117 (3-4): 313-326.
- Sukenik, A. and Wahnon, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97, 61-72.

- Sukenik, A. and Carmeli, Y. (1990). Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *J Phycol* 26: 463-469.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25, 686-692.
- Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y. and Yan, B. (2014). The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers* 113: 22-31.
- Sun, L., Wang, L. y Zhou, Y. (2012). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers* 87: 1206-1210.
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. and Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans - Trends and prospects. In: *FAO fisheries technical paper*, Vol. 564. Rome: FAO.
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. and Subasinghe, R. P. (2006). Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: Trends and policy implications. In: *FAO fisheries circular*, Vol. 1018. Rome: FAO.
- Taelman, S. E., De Meester, S., Roef, L., Michiels, M. and Dewulf, J. (2013). The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: A life cycle perspective. *Bioresource Technology*, 150, 513-522. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.044.
- Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., Legeret, B., Bouvet, S., Peltier, G., Li-Beisson, Y., Taha, S., Takache, H. (2014). Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource Technology* 177: 224-232. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.068.
- Tandeau-de-Marsac, N., Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 119-190.
- Tang, H., Chen, M., Simon Ng, K. Y. and Salley, S. O. (2012). Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (10): 2468-2474. doi:10.1002/bit.24516.
- Tang, H., Chen, M., Garcia, M. E. D., Abunasser, N., Ng, K. Y. S. and Salley, S. O. (2011). Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (10): 2280-2287. doi:10.1002/bit.23160.
- TASA. (21 de junio de 2020). Harina de pescado. <https://www.tasa.com.pe/productos-y-servicios-harina-de-pescado.html>
- Tejera, E. (08 de diciembre de 2019). Pesca baja 40%, y la apuesta es la acuicultura. *La Prensa*. <https://www.prensa.com/impresa/panorama/pesca-baja-40-y-la-apuesta-es-la-acuicultura/>
- Thompson, P.A., Guo, M.X. and Harrison, P.J. (1996). Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 143, 379- 391.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. and Harrison, P.J. (1993). The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Biol.* 117, 259-268.
- Thompson, P.A., Harrison, P.J. and Whyte, J.N.C. (1990). Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26, 278-288.
- Tredici, M. R., Biondi, N., Ponis, E., Rodolfi, L. and Zitelli, G. C. (2009). Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In: Burnell G. Allan G (ed) *New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environmental management*. Woodhead Publishing, pp 661-676.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. (2003a). Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216: 203-222.
- Tzovenis, I., De Pauw, N. and Sorgeloos, P. (2003b). Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216: 223-242.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H. and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 99 (10): 4021-8.
- Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B. and Huesemann, M. (2012). Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*. *Energies*, 5 (3): 731-740. doi:10.3390/en5030731.

- Verwoert, I.I., Van Der Linden, K.H., Walsh, M.C., Nijkamp, H.J. and Stuitje, A.R. (1995). Modification of Brassica napus seed oil by expression of the Escherichia coli fabH gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. Plant Molecular Biology 27 (5): 875-886.
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I. and Vega, J. M. (2011). Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. Mar. Drugs 9, 319-333.
- Villar-Argaiz, M. and Sterner, R. W. (2002). Life history bottlenecks in Diaptomus clavipes induced by phosphorus-limited algae. Limnol Oceanog 47: 1229-1233.
- Vinayak, V., Manoylov, K. M., Gateau, H., Blanckaert, V., Hérault, J., Pencreac'h, G., Marchand, J., Gordon, R. and Schoefs, B. (2015). Diatom Milking: A Review and New Approaches. Mar. Drugs. 13, 2629-2665.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. L. and Garland, C. D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol 128, 219-240.
- Wagner, I., Braun, M., Slenzka, K. and Posten, C. (2015). Photobioreactors in Life Support Systems. Adv Biochem Eng Biotechnol. 153: 143-84. DOI 10.1007/10\_2015\_327.
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep. 24: 629-641.
- Walker, J.B. (1954). Inorganic micronutrient requirements of Chlorella. II. Quantitative requirements for iron, manganese, and zinc. Arch. Biochem. Biophys. 53, 1-8.
- Wang, M., Chen, H., Gu, Z., Zhang, H., Chen, W. and Chen, Y. Q. (2013).  $\omega$ 3 fatty acid desaturases from microorganisms: structure, function, evolution, and biotechnological use. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (24): 10255-10262. doi:10.1007/s00253-013-5336-5
- Wang, B., Lan, C. Q. and Horsman, M. (2012). Research Review Paper: Closed Photobioreactors for Production of Microalgal Biomasses. Biotechnol. Adv. 30: 904-912.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C.Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. Appl Microbiol Biotechnol 79: 707-718.
- Welladsen, H., Kent, M., Mangott, A. and Li, Y. (2014). Shelf-life assessment of microalgae concentrates: effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. Aquaculture 430, 241-247.
- Wen, X., Du, K., Wang, Z., Peng, X., Luo, L., Tao, H., Xu, Y., Zhang, D., Geng, Y. and Li, Y. (2016). Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga Graesiella sp. WBG-1. Biotechnology for Biofuels, 9: 123. doi:10.1186/s13068-016-0541-y.
- Wen, X., Geng, Y. and Li, Y. (2014). Enhanced lipid production in Chlorella pyrenoidosa by continuous culture. Bioresource Technology, 161: 297-303. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.077.
- Wijanarko, A. (2011). Effect of the Presence Of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivied Medium on Chlorella Lipid Content. Progress in Biomass and Bioenergy Production. ISBN: 978-953-307-491-7. doi:10.5772/19358.
- Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. and Eppink, M. H. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. Biofuels Bioprod Biorefin 4: 287-295.
- Wikfors, G. H., Twarog, J. W. and Ukeles, R. (1984). Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, Crassostrea virginica. Biol. Bull., 167, 251-263.
- Wong, Y. K., Ho, K. C., Tsang, Y. F., Wang, L. and Yung, K. K. L. (2016). Cultivation of Chlorella vulgaris in Column Photobioreactor for Biomass Production and Lipid Accumulation. Water Environment Research, 88 (1): 40-46. doi:10.2175/106143015x1436286522755.
- Wood, B. J. B., Grimson, P. H. K., German, J. B. and Turner, M. (1999). Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. J. Biotechnol. 70, 175-183.
- Xing, R., Wang, C., Cao, X. and Chang, Y. (2007). The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin Strongylocentrotus intermedius, Aquaculture 263, 142-149.
- Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X.-R. and Liu, C.-Z. (2009). Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. Engineering in Life Sciences, 9 (3): 178-189. doi:10.1002/elsc.200800111.
- Yap, C. Y. and Chen, F. (2001). Polyunsaturated Fatty Acids: Biological Significance, Biosynthesis, and Production by Microalgae and Microalgae-Like Organisms. Algae and Their Biotechnological Potential, 1-32. doi:10.1007/978-94-015-9835-4\_1

Yeh, K.-L., and Chang, J.-S. (2011). Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. *Biotechnology Journal*, 6 (11): 1358-1366. doi:10.1002/biot.201000433.

Yentsch, C.S., Yentsch, C.M., Phinney, D.A., Lapointe, B.E. and Yentsch, S.F.W. (2004). The odyssey of new production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300: 15-30. DOI: 10.1016/j.jembe.2003.12.025

Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. (1991). Growth and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (2): 419-425.

You, T. and Barnett, S. M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 2004, 19, 251-258.

Young, E. B. and Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J Phycol* 905: 897-905.

Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A. and Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin Trans Med* 6: 25. DOI 10.1186/s40169-017-0153-6.

Zhukova, N. V. (2004). Changes in the lipid composition of *Thalassiosira pseudonana* during its life cycle. *Russ. J. Plant Physiol.* 51: 702-707.

Zijffers, J.-W. F., Schippers, K. J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J. and Wijffels, R. H. (2010). Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 12 (6): 708-718. doi:10.1007/s10126-010-9258-2.