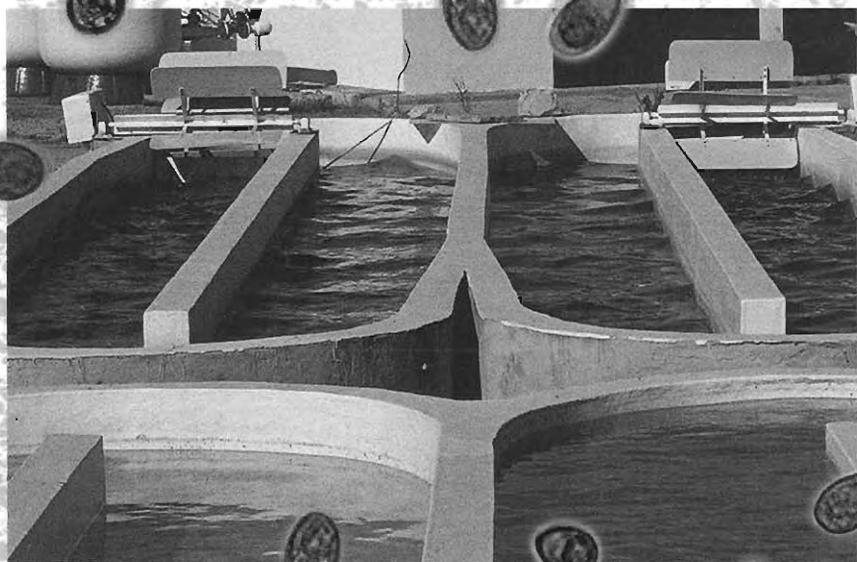


BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE *Dunaliella salina* EN EL LITORAL ANDALUZ



BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE
Dunaliella salina
EN EL LITORAL ANDALUZ

Los resultados presentados en esta monografía se deben al esfuerzo de:

M^a Jesús Castelo Cuadrado
M^a José Figueroa González
Mercedes García González
Miguel García Guerrero
David Jaén Carbonell
José Carlos Manzano Harriero
José Moreno Fernández
Francisco Javier Sánchez-Izquierdo Riera
Manuela Santamaría Martínez

Los autores quieren expresar su gratitud a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y a la Universidad de Sevilla por la financiación de este Proyecto.

Igualmente agradecemos al CICEM "Agua-del Pino" y al grupo de "Biotecnología de Microalgas" del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Centro mixto Universidad de Sevilla - Consejo Superior de Investigaciones Científicas) las facilidades dadas para la utilización de sus instalaciones y recursos.

Este proyecto sigue desarrollándose en la actualidad gracias al apoyo de José María Naranjo Márquez e Ignacio López Cotelo (Consejería de Agricultura y Pesca), con la colaboración y el esfuerzo de Francisco Javier Florencio Bellido (Universidad de Sevilla) y el personal del CICEM de El Toruño.

FICHA TÉCNICA

Título: Biotecnología del cultivo de *Dunaliella salina* en el litoral andaluz

©: **JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca**

© **Textos:** García-González M., Manzano J.C., Moreno J. y Guerrero M.G.

Publica: VICECONSEJERÍA. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

Colección: PESCA Y ACUICULTURA. Nº 16/00

Autores: García-González M., Manzano J.C., Moreno J. y Guerrero M.G.

I.S.B.N.: 84-89802-95-5

Depósito Legal: SE-1929-2000

Fotocomposición e Impresión: A. G. Novograf, S. A. (Sevilla)

PRESENTACIÓN

Las microalgas tienen un gran potencial como fuente alimenticia y de biomasa para la obtención de muy diversos compuestos biológicos y derivados de interés (proteínas, lípidos, pigmentos, carbohidratos, vitaminas,...). La generación de bioproductos por las microalgas mediante nuevas formas de cultivos acuícolas constituye un tema de creciente significación dentro de los campos de la biotecnología y la acuicultura.

Andalucía se configura como un territorio idóneo para el establecimiento de cultivos de microalgas por sus privilegiadas condiciones climáticas y de irradiancia solar, a través de procesos productivos que reúnen, en general, las características ecológicas y energéticas precisas para ser enfocados como biotecnologías blandas.

En este sentido, la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía está cooperando con la Universidad de Sevilla en el desarrollo de tecnologías para la producción masiva de microalgas con interés industrial, a través de un convenio específico de colaboración centrado en la definición de las condiciones idóneas y en las variables operativas de una unidad piloto de cultivo de microalgas marinas para la producción de β -caroteno y otros pigmentos de interés comercial.

El trabajo que se presenta en esta publicación es una materialización del citado convenio, ofreciendo una sobresaliente aportación documental y bibliográfica sobre los cultivos de microalgas marinas para la producción de carotenoides y otros bio-compuestos de interés, así como una excelente panorámica de los estudios experimentales realizados durante el desarrollo del referido proyecto en una unidad pre-piloto de producción.

Así pues, sirva esta monografía como un paso importante hacia el conocimiento de un tema de indudable interés para el sector acuícola y alimentario de nuestra región, que contribuya, por una parte, a incrementar la atención hacia recursos hasta ahora no aprovechados y, por otra, a valorar los trabajos científicos y técnicos que al respecto se realizan en Andalucía.

PAULINO PLATA CÁNOVAS
Consejero de Agricultura y Pesca.

ÍNDICE

PREÁMBULO	7
BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS	13
Introducción	15
Las microalgas y sus aplicaciones	17
Las microalgas y sus productos	27
Factores que afectan al cultivo de microalgas	32
Sistemas para el cultivo de microalgas	34
CAROTENOIDES	39
Introducción	41
Estructura	43
Origen evolutivo	45
Funciones biológicas y protectoras de los carotenoides	47
Aspectos industriales	51
Producción biológica de carotenoides	53
Perspectivas de futuro	56
EL ALGA <i>Dunaliella</i>	57
Introducción	59
Características generales	60
Requerimientos del crecimiento	64
Composición celular	67
Distribución y ecología	68
Tolerancia a la sal	69
Inducción de la biosíntesis de β -caroteno	74

BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO MASIVO DE <i>Dunaliella salina</i>	81
Introducción	83
Factores climáticos	86
Requerimientos nutritivos	90
Propiedades físicas de la zona	97
Requerimientos específicos del cultivo	98
Sistemas de recogida de biomasa	115
Preparación del producto final	123
Comercialización	126
Productividad	128
Diseño final de nuestra planta experimental	130
Metodología	136
Productividad en la planta experimental	139
Ensayos preliminares en un fotobiorreactor tubular cerrado	142
 BIBLIOGRAFÍA	 149

PREÁMBULO

El proyecto de investigación sobre el desarrollo de tecnología para la producción masiva de microalgas con interés industrial en Andalucía, objeto del Convenio de cooperación suscrito a tal efecto entre la Consejería de Agricultura y Pesca y la Universidad de Sevilla en junio de 1994, tenía como objetivo final la puesta en marcha de una planta piloto de cultivo de microalgas en condiciones controladas, que permitiese abordar el desarrollo de tecnología para la producción de biomasa de estirpes de interés comercial, a una escala representativa y siguiendo los procedimientos más adecuados para su implantación en nuestra región, tanto desde el punto de la formulación biotecnológica de la producción como desde los protocolos más adecuados para la gestión, protección ambiental y sostenibilidad del proceso. Se parte de una destacada riqueza de biotopos acuáticos (marismas y salinas marítimas o de manantial) idóneos para el aprovechamiento biotecnológico de estos medios salinos a través de la producción de compuestos de interés, como β -caroteno, glicerol, lípidos o antibióticos, entre otros. Las posibilidades de las marismas y salinas españolas se han destacado en este sentido como posibles ubicaciones para un aprovechamiento adecuado de recursos naturales, como puede ser el caso de la producción de microalgas.

Estas condiciones de partida justifican el desarrollo de investigaciones que permitan definir las etapas en que podrían basarse los procesos industriales de dichas producciones biotecnológicas, para evaluar las posibilidades contrastadas del desarrollo de plantas de producción a escala industrial, y así transferir conocimientos entre grupos de investigación, empresas y Administración, a fin de situarnos, regionalmente, en posición ventajosa. Las técnicas de cultivo y los métodos de producción biotecnológica de carotenos u otros compuestos pueden contribuir al desarrollo de un sector de la industria agroalimentaria, con clara repercusión económica y social en la Comunidad Andaluza, así como de los sectores acuícola y salineros en las provincias litorales, aquejados de diversos problemas que limitan su potencialidad (escasa diversificación de producciones, condicionantes ambientales para el desarrollo acuícola en zonas de marismas y salinas). La aplicación de nuevos avances técnicos y métodos bajo los criterios de sostenibilidad señalados, pueden resolver parcialmente las limitaciones actuales.

Los objetivos más concretos del proyecto original eran el ensayo y evaluación de los distintos sistemas de cultivo, la selección de estirpes de microalgas de interés industrial, prestando atención preferencial a pigmentos, vitaminas y antioxidantes, y el desarrollo de tecnología de producción de estirpes de alto interés, a nivel de planta piloto, incluyendo el análisis bioeconómico. De acuerdo con los medios humanos y materiales inicialmente previstos, así como con las vías de financiación requeridas, la duración

para la realización del proyecto fue estimada en tres años con una prórroga de un año más. El desarrollo de los objetivos primero y segundo se acometería conjuntamente a lo largo de la primera mitad del proyecto, momento en que se emprendería el abordaje del objetivo tercero. Entre otras muchas actuaciones y tareas, el proyecto preveía la construcción e instalación de la citada planta piloto, compuesta de diversos equipos y prototipos, a definir durante la realización del convenio, en los que se experimentarían los distintos sistemas y estrategias de cultivo a los que hacían referencia los objetivos del mismo.

Desde un principio, dadas las condiciones ambientales de la zona, la tecnología de partida conseguida por los participantes en el convenio y la posible orientación industrial prevista para el proyecto, se adoptó un sistema de producción de los denominados intensivo, basado en el cultivo en estanques poco profundos, agitados con paletas, en el que los requerimientos nutritivos y operacionales (aporte de nutrientes incluyendo CO₂, control de principales parámetros) deberían cubrirse y vigilarse plenamente. Igualmente, desde los primeros estudios y ensayos con diferentes estirpes productoras de biomasa, y tras una prospección del mercado existente –dentro de la orientación comercial presupuesta al proyecto en su aplicación futura–, se optó por la microalga *Dunaliella* como fuente biológica de productos bioquímicos de alta rentabilidad, concretamente como material para la obtención de β-caroteno, un pigmento cuya producción comercial, mediante síntesis biológica utilizando especies del citado género, se inició a mediados de la pasada década para uso en los mercados dietéticos, farmacéuticos y cosméticos. Consecuentemente, la planta experimental prevista en el proyecto debería permitir el adecuado cultivo, mediante la investigación y tecnología desarrollada durante el proyecto, de las estirpes de *Dunaliella* seleccionadas en el mismo, orientado a la producción de β-caroteno, aunque sin olvidar el desarrollo de nuevas técnicas y productos.

Tratándose de trasladar unos procesos tecnológicos desde la escala de laboratorio a una fase piloto, el proyecto requirió desde el principio un enfoque multidisciplinario, exigiendo una fuerte integración entre los diversos aspectos físico-químicos, biológicos y de ingeniería de procesos considerados en el mismo, en actuaciones muy interactivas –de diseño y puesta a punto de las instalaciones compartidas o de la coordinación entre las investigaciones–, que se presentaron desde el principio como cuestiones cruciales para el buen funcionamiento del proyecto.

En el contexto anteriormente formulado, el proyecto previsto en el convenio era complejo en su ejecución, en cuanto requería la estrecha cooperación de las dos entidades que lo suscribieron, a través de la participación de tres centros operativos, con funciones y nivel de esfuerzo diferentes respecto a las tareas emprendidas. Según lo previsto en el convenio, el objeto del mismo sería desarrollado por parte del Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla, en cooperación con los Centros de Investigación y Cultivo de Especies Marinas (CICEMS) dependientes en su momento de la Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera de la Junta de Andalucía, posteriormente adscritos

a la Dirección General de Pesca, bajo la dependencia de las correspondientes Delegaciones Provinciales de la Consejería de Agricultura, sobre todo, en un primer momento, con el CICEM de Agua del Pino, sito en Cartaya, y después con el de El Toruño, en el Puerto de Santa María.

Aunque diversos problemas administrativos y técnicos afectaron los plazos previstos para algunas actuaciones y líneas de trabajo contempladas en el convenio, la mayor parte de la instalación de equipamiento y otras inversiones se han ejecutado en el modo y plazo adecuado para abordar los estudios y trabajos planteados en las fases del proyecto, que técnicamente ha evolucionado según el curso previsto.

Esta monografía presenta una visión general y actualizada de los conocimientos sobre la biotecnología del cultivo de *Dunaliella* y describe las actuaciones y trabajos desarrollados al amparo de este convenio, reseñando los principales resultados y conclusiones obtenidos, que en conjunto confirman la potencialidad del cultivo de este alga como fuente para la obtención de β -caroteno bajo las condiciones climáticas del litoral andaluz.

Para la mejor comprensión de los logros alcanzados en nuestra investigación daremos, previamente, una visión general y actualizada de alguno de los temas sobre los que se sustenta la biotecnología del cultivo de *Dunaliella*.

BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS

INTRODUCCIÓN

El cultivo a gran escala de microalgas y el uso práctico de su biomasa como fuente de algunos compuestos tiene su origen en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial. La industria de las microalgas comenzó en los años 60 con el desarrollo de los procesos de producción de *Chlorella*, siguiendo en los años 70 con *Spirulina* y en los años 80 con *Dunaliella salina*. Con el tiempo, el cultivo continuo de algas bajo condiciones parcial o totalmente controladas ha alcanzado un importante desarrollo con grandes perspectivas económicas. En las pasadas décadas hemos asistido a un extraordinario avance en la investigación básica sobre la producción y utilización de algas gracias al esfuerzo de muchos científicos. Pero el escepticismo ante la utilización de fuentes de proteína distintas a las convencionales, el alto costo de producción del cultivo de algas y los criterios de salubridad han dificultado su implantación como complemento alimenticio en la nutrición humana. Consecuentemente, las investigaciones se han dirigido hacia la utilización de la biomasa de microalgas para otras aplicaciones como piensos para animales, biofertilizantes, acondicionadores de suelos, piensos para acuicultura, etc, además de ayudar a solventar problemas de salud pública mediante la purificación biológica de aguas residuales. Los estudios más recientes han demostrado la potencialidad de las algas para producir una amplia gama de compuestos tales como polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, esteroides, enzimas, antibióticos, productos químicos y farmacéuticos, así como hidrógeno, hidrocarburos y otros biocombustibles (metano, etanol). En los últimos años se ha incrementado la utilización del cultivo de algas como indicadores de los efectos de agentes químicos sobre los organismos vivos.

Pero no sólo la finalidad de la biomasa producida ha cambiado, sino que también muchos conceptos relacionados con los cultivos masivos de microalga han evolucionado en los últimos años. Así, ahora se considera fundamental establecer el régimen de luz que sustenta el crecimiento de un microorganismo en relación a la frecuencia y duración de los ciclos luz-oscuridad, la calidad y cantidad de luz que le llega a cada célula, etc. De hecho, la luz aparece como el principal parámetro limitante de la productividad de un cultivo, dándose además una importancia clave a los sistema de agitación y mezcla, así como a la densidad celular. Otra importante evolución está relacionada con el modo de producción de la biomasa, desde los clásicos sistemas abiertos a los más modernos fotobiorreactores cerrados y los sistemas inmovilizados o los cultivos mixotróficos. Por último empiezan a tomar un auge extraordinario las técnicas de ingeniería genética que permiten la manipulación de genes específicos para producir masivamente un compuesto deseado.

Como puede verse, el interés en la producción comercial de microalgas no ha decaído con los años y su potencial económico es manifiesto. Sin embargo, décadas después de la construcción de los primeros estanques para el cultivo de algas a gran escala, existen pocas iniciativas industriales. Se pueden argumentar varias razones para este lento progreso además de las ya mencionadas, alto costo de producción y aceptación del producto en el mercado, como son la necesidad de un conocimiento profundo de la fisiología y bioquímica de las microalgas, la verificación de los resultados de laboratorio a plantas de gran superficie y capacidad que demuestren su operatividad, la escasa pero necesaria cooperación con otras disciplinas científicas como ingeniería, economía, medicina, toxicología, etc. y la presencia en el mercado de productos similares obtenidos por vía sintética con menores costos.

LAS MICROALGAS Y SUS APLICACIONES

Las microalgas son organismos con estructura procariótica o eucariótica, con una maquinaria fotosintética capaz de convertir la energía solar en biomasa con una elevada eficiencia, presentando altas tasas de producción, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y omnipresentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura (Shelef y Soeder, 1980; Thomas y col., 1984).

Dentro del dominio de la Biotecnología actual, las microalgas están consideradas como organismos muy interesantes para la obtención de productos naturales. La mayor parte de esta biomasa de algas se comercializa como alimentos medicinales, en forma de tabletas y cápsulas, aunque, tanto algunas algas como sus extractos, se incluyen como suplemento en algunas pastas, vino, refrescos, cereales y cosméticos. También se utilizan en sistemas de tratamiento de aguas, pudiendo retirar metales pesados, macronutrientes, etc., del medio acuático (Garnham y col., 1982; Garbisu y col., 1991). Las microalgas, a su vez, son esenciales en acuicultura para el cultivo integral de moluscos y de estados larvarios de algunos crustáceos y peces. Se utilizan también para el cultivo de especies intermedias (rotíferos, artemia y copépodos), formando parte de la cadena alimentaria que tiene lugar en cualquier criadero convencional. Parte de la producción se emplea asimismo en la alimentación de peces tropicales y en avicultura, para incrementar la pigmentación (Callegari, 1989; Richmond, 1983, 1986b).

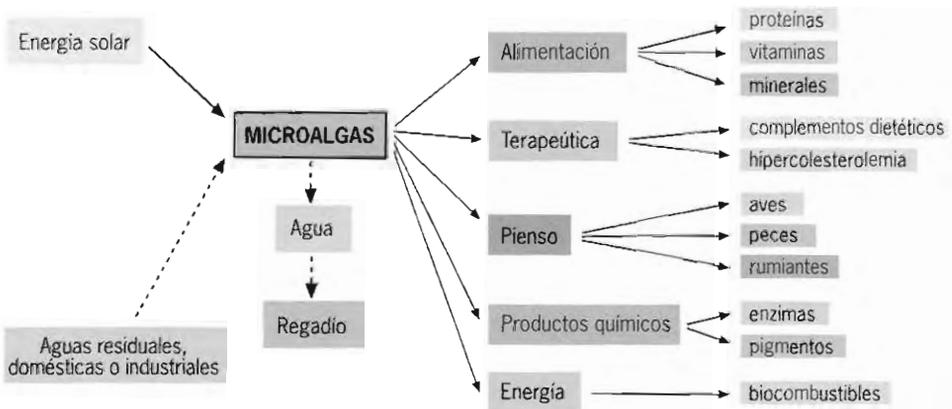


Fig. 1. Posibilidades de utilización de las microalgas.

La fotosíntesis es el proceso que origina la mayor reserva de energía y sustenta la vida en la Tierra. No es sorprendente, por tanto, que la utilización de la maquinaria fotosintética para la producción de energía, compuestos químicos y alimentos a partir de cultivos masivos de microalgas haya tenido un atractivo muy especial como fuente renovable de energía. En las microalgas se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas de interés biotecnológico, tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo en suspensión y la de secretar algunos metabolitos. Hace unos 50 años, se consideraba a las microalgas como importantes fuentes potenciales de biocombustible y proteínas, centrándose muchas de las primeras investigaciones del cultivo masivo de algas en estas dos aplicaciones. Por variadas razones, la idea de satisfacer una importante fracción de los requerimientos proteínicos de animales y humanos incorporando las microalgas en la dieta, no ha conseguido materializarse. Además, las grandes cantidades de terreno y agua necesarios para cultivar algas a gran escala que reduzca de manera apreciable el consumo de combustibles fósiles, han restringido el papel del cultivo de microalgas como fuente de biocombustible (Laws y Berning, 1991).

La biomasa de microalgas posee en general excelentes cualidades para su eventual empleo en la alimentación animal e incluso humana. Las primeras noticias acerca de la utilización de las microalgas como alimento por el hombre se remontan al siglo XVI. En esta época, Bernal Díez del Castillo describió uno de los muchos productos que se vendían en el mercado de Tenochtitlán, población que dio origen a la actual capital de México, como sigue: "pues pescaderas y otros que vendían unos panecillos que hacen de uno como lama (cieno del agua) que cogen de aquella gran laguna (lago Texcoco), que se cuaja y hacen panes dello que tienen un sabor a manera de queso". No hay duda que ese producto que utilizaba el pueblo azteca como alimento, se componía de materia seca de *Spirulina maxima*, cianobacteria de forma espiral que crece en las aguas alcalinas del lago Texcoco de Ciudad de México. El físico y naturalista Francisco Hernández, que acompañó a las primeros conquistadores de México, describió también cómo la masa de algas se recolectaba del lago y secaba para hacer tortas de color "azul o verde" (Ciferri, 1981).

Más de 400 años después, en 1964, el botánico belga J. Leonard, quien formaba parte de la expedición Belga-Trans-Sahariana, vio como en los mercados de muchos pueblos de la región de Kanem, hoy día República del Chad, vendían tortas secas de color verde azulado que empleaba como alimento la población nativa. El uso de estas tortas llamadas "dihè" o "dié" en la lengua local fue publicado por primera vez por Dangeard en 1940 en la revista "Linnean Society" de Burdeos. Para la obtención de estas tortas, se recolectaba y secaba al sol las suspensiones de algas microscópicas que, formando una maraña, flotaban sobre la superficie de pequeños lagos y estanques alrededor del lago Chad. La observación al microscopio de estas tortas revelaron que estaban compuestas de filamentos de una especie simple de alga verde azulada que previamente se había descrito como *Spirulina platensis*. Posteriormente se comprobó que las tortas de "dihè" poseían un alto contenido en proteína, hasta un 70% del peso seco (Ciferri, 1983). En la actualidad se recolectan más de 27 toneladas de dihè al año en el lago Kossorom y sigue siendo la dieta base y fuente de ingresos para los habitantes de esta región.

El lago Texcoco y los pequeños lagos que circundan el lago Chad, se caracterizan por una alta alcalinidad (pH 11), lo que hace la vida casi imposible para otros organismos y permite que *Spirulina* prospere casi como un monocultivo.

La idea de producir microalgas a gran escala tuvo su origen en Alemania en los años 40, donde se llevó a cabo el cultivo en masa de diatomeas, que mostraban la capacidad de acumular cantidades apreciables de lípidos bajo condiciones de laboratorio, en cultivos con limitación de nitrógeno (Harder y von Witsch, 1942). Durante estos años, también tuvo gran importancia la investigación sobre el potencial del alga verde *Chlorella*, observándose que podía doblar su biomasa varias veces al día cuando se cultivaba en condiciones de laboratorio a alta intensidad de luz. Del mismo modo, se demostró que su contenido en proteína bruta era del orden del 50 - 60% del peso seco (Spoehr y Milner, 1949). La meta principal fue la utilización de esta microalga para la producción de proteína, intentando mantener la alta productividad obtenida en el laboratorio en sistemas de cultivo a gran escala.

Estos proyectos comenzaron a desarrollarse a finales de los años 40 en varios países, comprobándose que la iluminación artificial mediante lámparas era demasiado costosa para la producción masiva de algas. Por lo tanto, el cultivo de algas a gran escala debía realizarse a expensas de la luz solar. El traslado de las experiencias básicas desde el laboratorio a procesos industriales de cultivo en masa de microalgas, dio lugar a un desarrollo tecnológico que todavía continúa. En 1951, el Instituto Carnegie de Washington, interesado en este campo de investigación, financió la construcción de una planta piloto al aire libre en Massachusetts. En esta planta se realizaron una larga serie de interesantes experiencias que se recogieron en el libro "Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant" (Burlew, 1953), donde se presenta gran parte de la problemática del cultivo y producción de microalgas, tales como: recolección, control de la especie dominante en el cultivo, control de la temperatura, etc.

Otro centro importante en esos años fue el Instituto Tokugawa de Tokio, en el que se llevaron a cabo una serie de estudios de laboratorio y planta piloto al aire libre sobre el cultivo de *Chlorella*. Se evaluó el coste de producción de 1 t de alga seca en 520 \$ USA aproximadamente, concluyéndose que la biomasa de microalgas no podía competir en términos de precio con materiales de tipo proteico más barato, tales como la harina de soja o de pescado (Tamiya, 1957). Sin embargo, aunque la producción de proteína de microalgas era económicamente desfavorable comparada con los métodos tradicionales, desde los años 60 se comercializa con éxito el alga *Chlorella* en Japón y Taiwán, ya que esta microalga se admitió como producto dietético-medicinal. El tradicional consumo de algas macroscópicas en el lejano oriente favoreció su aceptación en el resto del mundo y Japón se convirtió así en el primer país que comercializó una microalga.

La utilización de las microalgas como producto de interés alimentario se vio influida por la calidad de su biomasa, principalmente por la ausencia de tejidos y su bajo contenido en materiales estructurales. En su composición destaca particularmente un contenido elevado de proteína, con valores superiores al 50% del peso seco y un

aminograma similar al de la harina de soja o pescado y al estándar de la FAO, siendo sólo ligeramente deficiente en aminoácidos azufrados y lisina. Los estudios de digestibilidad llevados a cabo con distintas especies de microalgas han arrojado resultados muy positivos, comparables con cualquiera de los piensos de uso frecuente para animales, según los parámetros internacionales de nutrición. El interés alimentario de la biomasa de microalgas reside no sólo en su riqueza proteica sino también en su contenido en lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, vitaminas, minerales, etc., siendo la concentración de ácidos nucleicos (5–10%), de las más bajas encontradas en microorganismos (Callegari, 1989; Richmond, 1983, 1986b).

Las microalgas cultivadas comercialmente son: *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Isochrysis* y *Chaetoceros*.

Actualmente, la gran mayoría de las plantas industriales para el cultivo de algas está localizada en Asia. Existen alrededor de 110 productores comerciales de microalgas en la costa asiática del Pacífico que han entrado en funcionamiento en los últimos 10 años, con una capacidad de producción anual entre 3 y 500 toneladas, lo que supone la mitad de la producción mundial. Esta rápida y reciente expansión se puede atribuir, en parte, al creciente mercado para los productos dietéticos y, en parte, al cierre a mediados de los años 90 de la planta de producción de *Spirulina*, Sosa Texcoco de México (área de cultivo de 430.000 m², con una producción de unas 300 t por año).

En la actualidad no existen plantas de producción comercial fuera de la costa del Pacífico con una producción anual superior a las 25 t, a excepción de la Nature Beta Technologies, Ltd (NBT) en Eilat, Israel, con un área de producción de 50.000 m² y que produce 1,5 t de β -caroteno o 25 t de *Dunaliella bardawii*, pero es de propiedad japonesa (Nikken Sohonsa Corporation). Hay algunas pequeñas plantas de producción en la República Checa y Alemania (Lee, 1997).



Fig. 2. Vista general de las instalaciones de Nature Beta Technologies, Ltd (NBT) en Eilat, Israel (con permiso).

Respecto a los países productores, Japón es el que tiene una mayor tradición en la producción comercial y consumo de microalgas, por ejemplo, la Heian *Chlorella* G.F.C. Co., Ltd. comenzó a operar en 1969. En 1996 la cantidad total comercializada en Japón de *Chlorella* y *Spirulina* desecadas fue de aproximadamente 2.000 y 400 t, respectivamente, aunque parte de esta producción se importó de Taiwán, Estados Unidos y Tailandia. De hecho, muchas de estas compañías japonesas importan el material microalgal y después lo procesan, empaquetan y distribuyen bajo su marca. Este es el caso de la ya mencionada producción de β -caroteno a partir de *Dunaliella*, de EPA (ácido eicosapentaenoico) y de DHA (ácido docosahexaenoico) extraídos de *Nannochloropsis* e *Isochrysis*, respectivamente, en Israel. Desde 1996 existen dos compañías que han comenzado a producir *Chlorella* heterotróficamente en fermentadores con un rendimiento de 100 - 200 t por año.

En China hay más de 80 compañías productoras de *Spirulina*, localizadas en las provincias del sur. En este caso el mercado local es escaso y se destina a la exportación.

Taiwan es el primer productor de *Chlorella* (con más del 50% de la producción mundial). En la actualidad hay 6 compañías productoras de este alga y otras 5 que producen *Spirulina*, pero de éstas, al menos tres han tenido que reducir su producción o vender sus instalaciones debido a la excesiva oferta.

En Corea se producen microalgas de distintas especies destinadas a la acuicultura. El resto de países productores (India, Tailandia, Vietnam, Indonesia y Filipinas) comercializan *Chlorella* o *Spirulina*, mayoritariamente para la exportación y en algunos casos suministran inóculos y medios de cultivo al mercado interior.

Cyanotech, con una superficie de estanques de 75.000 m² y una producción de 380 t por año y Earthrise Farms, con una superficie de estanques de 150.000 m² y una producción de 500 t por año, en Hawaii y California, respectivamente, son los principales productores de *Spirulina* en Norteamérica. Desde 1997, Cyanotech comercializa productos ricos en astaxantina (2% p/p) a partir de *Haematococcus*, para su uso en acuicultura. Existen otras pequeñas compañías en California, como Unisyn, con una producción de 12 t de *Spirulina* al año y Neutrillite, con una producción de 1 t de β -caroteno al año. Otras compañías, en Columbia y Colorado, cultivan microalgas en condiciones heterotróficas con extracto de levadura y glucosa, para la producción de ácidos grasos omega-3. En Chile y Cuba también se produce *Spirulina*, aunque a una escala menor.

Por último, en Australia existen dos compañías productoras de *Dunaliella*. Betatene Ltd. tiene una superficie de estanques de cultivo sin agitación de 4.600.000 m² que producen entre 7 y 10 t de β -caroteno al año. Esta compañía comercializa una gran variedad de productos tales como:

- Cápsulas de β -caroteno al 4%, utilizadas en la industria dietética.

- Suspensión de β -caroteno al 20% en aceite de soja, utilizada como colorante alimentario y complemento dietético.
- Emulsión de β -caroteno al 2%, utilizada en refrescos.
- Polvo de β -caroteno.
- Preparado de alga con un 2% de β -caroteno, utilizado como pienso en acuicultura.

La otra planta de producción pertenece a la Western Biotechnology Pte. Ltd, con una superficie de cultivo de 2.500.000 m² y una producción aproximada de 6 t de β -caroteno al año. Sus productos se comercializan bajo la forma de suspensiones en aceite de distintas semillas, según el mercado, con un 5 - 30 % de β -caroteno; polvo de β -caroteno soluble en agua, o mezclas de distintos carotenoides. Los principales mercados para estos productos son Japón, Estados Unidos, Corea y Europa.

La clave para la supervivencia de estas compañías reside más si cabe en la calidad de los productos que en los costos de producción. Debido a que la mayoría de las microalgas se están consumiendo como alimentos medicinales o complementos dietéticos, existe una gran exigencia respecto a su calidad. El precio de los productos destinados a este fin podría ser más de 20 veces superior a los costes de producción, con lo que serían rentables. En este sentido, como ya se ha mencionado, la producción de *Chlorella* está evolucionando hacia la utilización de fermentadores donde se puede controlar mejor la calidad del producto. De hecho, en los sistemas de cultivo en estanques abiertos a la intemperie es difícil mantener un cultivo axénico y hay que recordar que estos productos se consumen "sin cocinar". El problema radica en que, hasta la fecha, no se han establecido patrones de cada uno de los posibles principios activos que contiene esta biomasa de alga y, por tanto, es difícil definir la calidad.

A principios de los años 50 se planteó también el uso del cultivo de microalgas a gran escala para el tratamiento de aguas residuales urbanas acopladas a la producción simultánea de biomasa rica en proteína. Como resultado final se logra la depuración del agua y la producción de una biomasa de algas y bacterias (Oswald, 1988a). La depuración de aguas residuales urbanas según el modelo de Oswald se desarrolló principalmente en Israel, donde se estudió la manera de optimizar los rendimientos mediante la variación de parámetros, tales como el tiempo de retención del agua en el estanque de depuración, temperatura, profundidad y área del estanque (Azov y col., 1980; Shelef y col., 1980).

En la década de los 70 se desarrolló la contrapartida marina a los trabajos de Oswald. El objetivo era canalizar los nutrientes a través de una cadena alimenticia marina, cultivando en primer lugar fitoplancton marino, especialmente diatomeas, en una mezcla de aguas residuales y agua de mar para posteriormente utilizarlo como alimento para moluscos (Ryther y col., 1975).

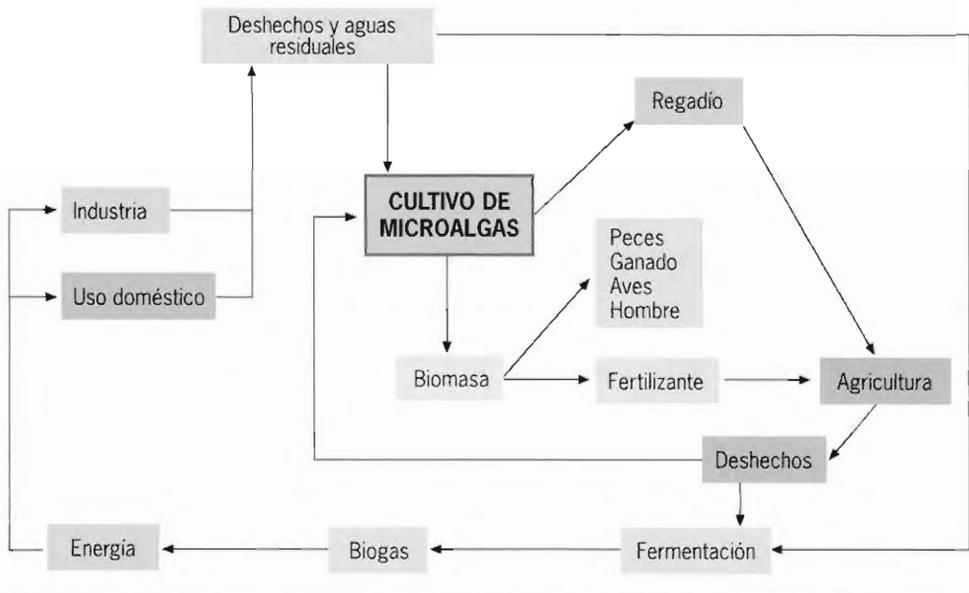


Fig. 3. Cultivo de microalgas con aprovechamiento de desechos y aguas residuales en un sistema múltiple.

En los últimos años, debido a los posibles cambios climáticos por la emisión de CO_2 , se ha despertado un renovado interés por el cultivo a gran escala de algas como consumidoras de CO_2 . La viabilidad de este sistema de eliminación de anhídrido carbónico depende de la disponibilidad de terreno, agua y otros factores económicos. Se conoce poco sobre los costes del cultivo de microalgas a gran escala debido a que las estrategias usadas para cultivar, recoger y procesar las microalgas varían de unos sistemas a otros y depende del tipo de alga. Además, los sistemas suelen estar protegidos por secretos de patente. A partir de la información disponible se ha estimado que el coste de producción es de 1-2 \$ por kg de biomasa seca, en sistemas simples donde no se cuida la pureza del producto y entre 5-10 \$ por kg en la producción de algas para el mercado alimenticio. El coste del cultivo de microalgas para biocombustible es 0,2 \$ por kg (Laws y Berning, 1991).

El potencial agronómico de algunas microalgas se reconoció por primera vez por Watanabe y col. en 1951. La inoculación de campos de arroz con 10 kg de cianobacterias por ha puede resultar en la fijación de 20 a 30 kg de N por ha y por cosecha, incrementando entre un 10 y un 15% la producción de grano (Venkatamaran, 1981). Esta tecnología se emplea en la actualidad en un 5% de las tierras cultivadas con arroz en la India. También se ha demostrado que el crecimiento de cianobacterias en suelo provoca la agregación del mismo, con un efecto beneficioso sobre la permeabilidad al agua, aireación y control de la temperatura.

Paralelamente a los avances conseguidos en el campo de la biotecnología de microalgas, la aplicación de dicha tecnología se ha ido expandiendo desde la década de los

años 70. Esto ha ocurrido especialmente en el área de la acuicultura donde el cultivo de microalgas seleccionadas ha llegado a constituir una vía alternativa indudable en la producción de fitoplancton, sustituyendo paulatinamente a la utilización de las poblaciones microalgales naturales presentes en el medio acuático. Este procedimiento, aunque sencillo técnicamente era complejo como sistema, presentando la desventaja del escaso control que se tenía en la composición de los microorganismos capturados, incluyendo entre sus inconvenientes, la utilización de especies poco nutritivas e incluso tóxicas, el acompañamiento de depredadores, la presencia de agentes patógenos, etc., además de tamaños celulares inadecuados.

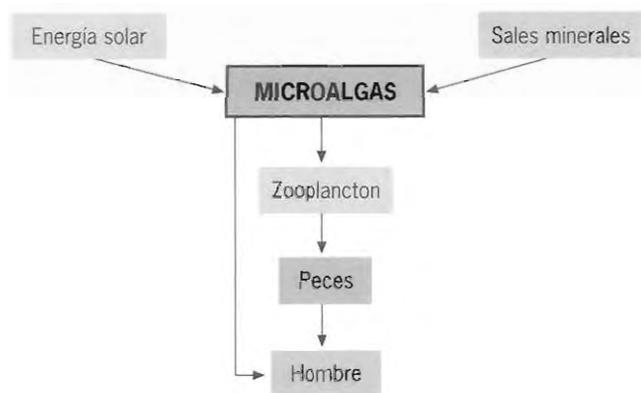


Fig. 4. Cadena alimenticia en un medio acuático.

La importancia del cultivo de microalgas específicas para su utilización en acuicultura, estriba en las apropiadas características biológicas de dichos microorganismos fotosintéticos, tales como su posición basal en la pirámide alimenticia, su crecimiento autotrófico, su pequeño tamaño, etc. En los sistemas acuícolas donde se pretende realizar un control intensivo, la presencia de microalgas es beneficiosa, no tanto por su utilización directa sino por su ayuda a mantener la calidad del agua, consumiendo sales nitrogenadas y favoreciendo la producción de oxígeno. Por otro lado, el tamaño reducido del fitoplancton marino (alrededor de $10\mu\text{m}$) posibilita su utilización como alimento por otros organismos acuáticos, especialmente larvas, que participan como elementos de partida del ciclo biológico en los sistemas acuícolas.

Numerosos estudios han demostrado la importancia del fitoplancton en la productividad de las tradicionales zonas de cultivo acuícola en sistemas integrales bajo condiciones tanto extensivas como intensivas.

En la actualidad, la principal alternativa viable para desarrollar con éxito el cultivo de especies marinas de interés, se basa en el adecuado cultivo y suministro de fitoplancton como alimento vivo. La mayor parte de los criaderos marinos intensivos siguen un modelo simplificado de la cadena trófica existente en el ambiente natural y disponen de

instalaciones para la producción de fitoplancton. A este fin, se llevan a cabo cultivos monoespecíficos de microalgas marinas que se utilizan como alimento de moluscos bivalvos y primeros estadios larvarios de crustáceos, que por otro lado, constituyen el alimento de especies zooplanctónicas, tales como rotíferos, copépodos y artemias, que a su vez servirán como presas para las larvas de peces y estadios larvarios avanzados de crustáceos.

Las características que una especie de microalga debe reunir para servir de alimento vivo en acuicultura son: a) tamaño celular adecuado (2-20 μ m) al sistema de filtración de los animales que lo consumen; b) facilidad de digestión; c) composición bioquímica idónea en relación a los requerimientos nutritivos de cada especie; d) nula toxicidad. Al igual que para otras aplicaciones, también son deseables ciertas propiedades para su cultivo, tales como altas tasas de crecimiento, mínimos requerimientos nutritivos, altas densidades celulares, resistencia a las variaciones ambientales, ausencia de bacterias y/o otros parásitos, resistencia a alguna variable extrema que impida el crecimiento de competidores, etc. Estas características pueden buscarse mediante un estudio sistemático de las posibilidades que ofrece la naturaleza para distintas especies y variedades geográficas, o bien mediante la inducción y selección de mutantes apropiados.

Aunque teóricamente existen alternativas como microcápsulas, piensos a base de proteína vegetal o animal, etc., la utilización de ciertas microalgas o de sus derivados (pigmentos carotenoides añadidos a los piensos), para aumentar la calidad comercial (color, sabor) de algunos productos acuícolas (salmónidos y langostinos) se encuentra en indudable expansión. Con los métodos convencionales de cultivo de microalgas se puede producir fitoplancton de una especie determinada (cultivos monoalgales), o bien de una mezcla de especies (cultivos mixtos), conocidas y controladas, que ofrecen la posibilidad de un mayor control microbiológico sobre el sistema de producción. Estas circunstancias han llevado a desarrollar una tecnología específica de producción de microalgas, orientada particularmente a la alimentación en acuicultura marina, utilizando técnicas de cultivo bastante genuinas, en general caracterizadas por su sencillez y economía de costos –en relación a la mayor sofisticación de las instalaciones y procesos de cultivo que se consideran para otras aplicaciones biotecnológicas–, así como por el empleo de diferentes especies representativas del fitoplancton marino, dependiendo de que los organismos a alimentar sean peces, moluscos o crustáceos (De Pauw y Persoone, 1988) y de la calidad nutritiva de las algas (Brown y col., 1989).

Las técnicas del cultivo masivo de fitoplancton marino para acuicultura se conocen bien en la actualidad (Richmond, 1986a; Laing y Dyak, 1990). Cuando se satisfacen los requerimientos físicos y nutritivos se alcanzan productividades de biomasa comprendidas entre 5 y 30 g m⁻² día⁻¹, dependiendo de las condiciones ambientales (luz, temperatura, salinidad, pH), de la especie utilizada y de los sistemas de cultivo. Existen métodos de cultivo extensivos e intensivos. En los primeros, la producción se obtiene a partir del crecimiento de poblaciones naturales de microalgas marinas tras la fertilización del agua. En los sistemas intensivos de producción se emplean volúmenes de cultivo crecientes,

inoculados a partir del nivel de cultivo inmediatamente inferior, una vez alcanzada su densidad celular máxima. Los métodos intensivos permiten ejercer un control sobre los cultivos, así como obtener unos rendimientos de producción más elevados.

El mantenimiento de las colecciones de estirpes tipo y el idóneo cultivo de los inóculos, que garantizan su pureza y asepsia, representan el primer nivel en esta estrategia de producción, siendo especialmente importante la buena calidad de estos inóculos para, en fases posteriores, obtener una producción masiva óptima, con un alto rendimiento y calidad en su composición bioquímica.

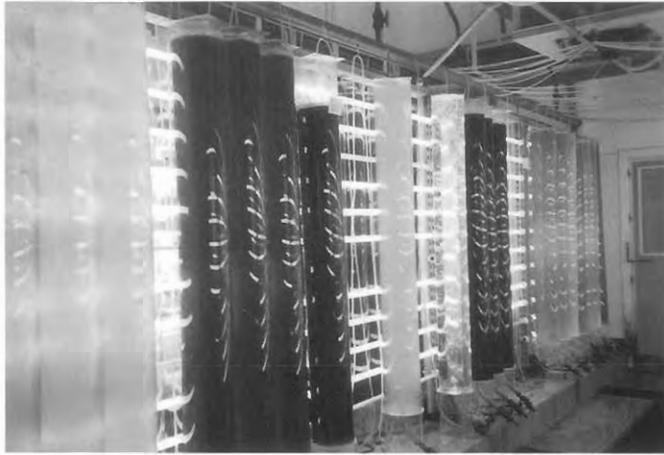


Fig. 5. Sala de cultivo de microalgas, donde se controla estrictamente luz, temperatura, suministro de carbono y agitación para la obtención de inóculos puros y de gran calidad para su posterior uso masivo.

Por supuesto, la composición de cada especie (proteínas, carbohidratos, ácidos grasos esenciales, pigmentos, etc.) varía mucho de unos grupos a otros, si bien ciertas características no dependen tanto de la especie como de las condiciones de cultivo, observándose que, dentro de una misma especie, las variaciones en composición celular durante el crecimiento pueden ser mayores que las encontradas entre distintas especies cultivadas en condiciones similares (Brown y col., 1989)

En relación a lo anterior, y conforme ha ido avanzado el desarrollo tecnológico de los cultivos de fitoplancton marino para acuicultura, junto a una exploración de las posibilidades de las numerosas estirpes de microalgas existentes, se ha despertado un gran interés en aumentar el conocimiento sobre la composición bioquímica de dichos organismos, así como sobre el contenido en variados compuestos de interés potencial presentes en las especies cuyo cultivo a gran escala está ya dominado. Este conjunto de circunstancias ha generado, a su vez, un creciente interés en la posible aplicación de las instalaciones disponibles en los criaderos de acuicultura para el previsible desarrollo de las biotecnologías que actualmente se vislumbra en el dominio marino.

LAS MICROALGAS Y SUS PRODUCTOS

De entre todos los usos comerciales ya mencionados, la generación de productos con aplicación comercial constituye, en la actualidad, el aspecto central de la biotecnología de microalgas. Muchas estirpes producen, como resultado de su metabolismo, diferentes compuestos biológicos de interés para las industrias químicas y farmacéuticas, tales como pigmentos, lípidos, polisacáridos, vitaminas, etc. Estos pueden acumularse como parte de la biomasa del alga o, en algunos casos, liberarse al medio externo.

Las microalgas han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas, tales como sintetizar sustancias mucilaginosas extracelulares para protegerse del estrés hidrodinámico o acumular pequeñas moléculas intracelulares para solventar problemas de osmorregulación en medios salinos. Del mismo modo, pueden variar su contenido en pigmentos fotoprotectores o accesorios de la fotosíntesis para adaptarse a cambios en la irradiancia, así como acumular productos específicos para protegerse de situaciones de limitación de algún nutriente, etc. Por tanto, si estas condiciones se simulan en los sistemas de cultivo, se puede conseguir que el metabolismo celular se dirija hacia la biosíntesis de productos de interés comercial (Gudin y Thepenier, 1986). Los compuestos de interés relativamente bien estudiados son pocos, entre los que destacan carotenoides, ficobiliproteínas, lípidos y polisacáridos, provenientes de las microalgas más consideradas, tales como *Spirulina*, *Dunaliella* y *Porphyridium* (Gudin, 1988).

Por otro lado, históricamente, los microorganismos en general y las microalgas en particular se han utilizado como fuentes excepcionalmente ricas en metabolitos con actividad biológica. Estas sustancias son de especial relevancia en biomedicina y agronomía para el desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos, así como para su empleo en herbicidas y pesticidas. El interés en las cianobacterias como productores de compuestos biológicamente activos se ha incrementado en los últimos años (Rodríguez y Guerrero, 1992).

Revisaremos brevemente cada uno de estos compuestos:

Carotenoides. Por tratarse del objetivo central de este trabajo, se les dedicará un capítulo aparte.

Ficobiliproteínas. En contraste con los carotenoides, que se encuentran presentes en todos los grupos de algas y plantas superiores, las ficobiliproteínas se encuentran exclusivamente en algunos grupos de algas, tales como cianofíceas, rodofíceas y criptofíceas. Las ficobiliproteínas pueden dividirse en tres grupos principales, atendiendo a sus características espectrales: ficoeritrina (máximo de absorción, 565 nm), ficocianina (615-620 nm) y aloficocianina (650 nm). En cianobacterias, las ficobiliproteínas son pigmentos secundarios o antena, cuya función principal es la de captar la energía luminosa y transferirla a los centros de reacción. Estos pigmentos tienen su máximo de absorción en la zona del espectro electromagnético donde la luz solar es más intensa (verde-amarillo), confiriendo una clara ventaja al organismo que los posee, al posibilitar una captación más efectiva de la energía luminosa (Holzwarth, 1991; MacColl y Guard-Friar, 1987).

Las ficobiliproteínas son pigmentos solubles en agua y tienen especial relevancia comercial por su carácter de colorantes naturales, utilizados en la industria alimentaria y cosmética. Adicionalmente, las ficobiliproteínas tienen una aplicación interesante en microscopía de fluorescencia e inmunoensayos. Presentan alta eficiencia cuántica en su fluorescencia, siendo además muy estables en amplios márgenes de pH y temperatura, pudiendo conjugarse fácilmente a una gran variedad de biomoléculas sin que se alteren sus características de absorción y emisión de luz. Las ficobiliproteínas presentan muchas ventajas respecto a los marcadores fluorescentes tradicionales, debido a que su fluorescencia anaranjada es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde de los tejidos. Ésta y otras propiedades convierten a estos compuestos en excelentes trazadores fluorescentes para su aplicación en diagnósticos e investigación biomédica, con una demanda creciente (Glazer y Stryer, 1984; Callegari, 1989; Glazer, 1994).

Lípidos y ácidos grasos esenciales. La idea inicial de producir lípidos a partir de microalgas para su transformación en combustibles alternativos a los derivados del petróleo (Harder y von Witsch, 1942), se ha sustituido por la de obtener selectivamente ácidos grasos con interés aplicado. Desde el punto de vista comercial los ácidos grasos poliinsaturados son los más importantes en general, y los ácidos grasos esenciales en particular. Los ácidos grasos esenciales para la nutrición humana son los ácidos linoleico, araquidónico, γ -linolénico y eicosapentaenoico (EPA). Excepto el linoleico, estos ácidos grasos son poco frecuentes en animales y plantas superiores, estando presentes en cantidades sustanciales sólo en algunas especies de microalgas. Algunas estirpes marinas de *Chlorella*, así como de *Phorphyridium* y, especialmente, *Isochrysis galbana* (Molina-Grima y col., 1993; Molina-Grima y col., 1994) presentan elevados contenidos de EPA. En *Spirulina*, el ácido γ -linolénico constituye el 11% del peso seco (Callegari, 1989; Richmond, 1986b). Se han constatado efectos beneficiosos del EPA en la prevención o tratamiento de la arterioesclerosis (Dyerberg, 1986). Estos compuestos son precursores de las prostaglandinas. El uso de enzimas inmovilizadas para sintetizar estos precursores a partir de ácidos grasos C_{20} ha abierto el camino para producir estos eicosanoides *in vitro* evitando tener que extraerlos de tejidos animales, método actual de producción (Ahern y col., 1983).

Polisacáridos. Su aplicación industrial para la obtención de productos tradicionales como almidón, alginatos, agar o goma arábica, ha estado restringida hasta hace poco tiempo a materias primas extraídas de plantas y algas macroscópicas. Estos productos pueden estar sujetos a fluctuaciones tanto en cantidad como en calidad de la materia prima, ocurriendo a veces, que las propiedades reológicas de los mismos cambian, difiriendo de las requeridas. La producción de polisacáridos de origen microbiano puede proporcionar una alternativa válida a las fuentes convencionales, ya sea a través del desarrollo de productos con propiedades análogas a los ya usados o incluso con mejores características reológicas (Thepenier y Gudín, 1985; Sutherland, 1986).

Por lo general, se considera que la síntesis de un polisacárido exocelular (EPS) es una estrategia metabólica para la supervivencia y crecimiento de ciertos microorganismos, especialmente bajo condiciones ambientales extremas o como respuesta a presiones selectivas de la naturaleza, siendo su función desconocida en algunos casos (Moreno y col., 1998; Vincenzini y col., 1990). Entre las funciones más frecuentemente adscritas a los EPS se encuentran las de protección frente a la desecación (Barclay y Lewin, 1985; Flaibani y col., 1989), agentes quelantes de cationes esenciales para la vida celular (Dudman, 1977) y adhesión celular a superficies sólidas (Barclay y Lewin, 1985).

Los polisacáridos tienen la capacidad de modificar las características reológicas de sistemas acuosos, caracterizándose por formar soluciones altamente viscosas a baja concentración, o por la formación de geles. Una ventaja del uso de polímeros microbianos es la posibilidad de manipular los cultivos para obtener productos con las propiedades deseadas (Sutherland, 1986). Otra aplicación menos conocida de estos polisacáridos microbianos es su utilización en la preconcentración, adsorción, detección y eliminación de iones metálicos de aguas residuales donde, a veces, la concentración de metales pesados es elevada en zonas de alta contaminación, llegando a concentraciones que pueden alterar el medio ambiente (Plude y col., 1991). Del mismo modo, pueden emplearse en el acondicionamiento y recuperación de suelos para su uso agrícola (Flaibani y col., 1989).

Algunas microalgas tienen la capacidad de modular la producción de polisacárido exocelular en respuesta a factores externos (Tease y Walker, 1987). En el caso de la microalga roja unicelular *Porphyridium*, se ha descrito que, bajo condiciones de cultivo definidas, pueden acumularse en el medio cantidades importantes de un peculiar polisacárido sulfatado con atractivas propiedades comerciales, habiéndose registrado distintas patentes sobre el producto, sus aplicaciones y el sistema de producción (Anderson y Eakin, 1986). Este polisacárido sulfatado tiene especial interés práctico por el parecido, en su estructura química y propiedades físicas, a la *carragenina* de las algas rojas macrofitas. Actualmente, se ha llegado a automatizar la producción de polisacárido en esta microalga mediante el empleo de células inmovilizadas, observándose que, en condiciones adecuadas de cultivo, la excreción de este polisacárido por células de *Porphyridium* puede alcanzar tasas del orden de la mitad de la velocidad de producción de su biomasa. La estimación del costo de producción sugiere que puede

competir económicamente con los polisacáridos de goma xantano producidos por la bacteria *Xantomonas* (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Richmond, 1990).

Con respecto a los polisacáridos de cianobacterias, la vaina mucilaginosa que rodea a la pared celular está compuesta de heteropolisacáridos, siendo escasos los conocimientos disponibles tanto acerca de su composición y características, como de las condiciones nutricionales y ambientales que favorecen la producción de los mismos (Benemann y Weissman, 1984; Kerby y Stewart, 1988). En los últimos años se han publicado estudios concernientes a la liberación de material mucilaginoso por algunas estirpes de cianobacterias, aunque la mayoría de ellos se ocupan principalmente de su composición química, y sólo algunos hacen referencia a la cinética y condiciones de producción (Bertocchi y col., 1990; Plude y col., 1991).

Compuestos con actividad biológica. Históricamente, los microorganismos han constituido una fuente rica de compuestos con actividad biológica. Estas sustancias son de importancia en biomedicina y agronomía para el desarrollo de nuevos compuestos de interés farmacéutico o agrícola (herbicidas y pesticidas) (Patterson y col., 1991). Los progresos en el descubrimiento de productos bioactivos procedentes de microorganismos fotosintéticos y el desarrollo de su potencial utilización han sido lentos. Sin embargo, existen referencias que datan del siglo XVI, en las que se menciona el uso de la cianobacteria *Nostoc* como tratamiento para la prevención de gota y cáncer (Metting y Pyne, 1986). El interés sobre microalgas y particularmente cianobacterias en la producción de compuestos biológicamente activos se ha incrementado en los últimos años habiéndose incluido en los programas de detección, aislamiento e identificación de estirpes productoras de sustancias bioactivas, especialmente antibióticos y otros compuestos farmacológicamente activos. Estos estudios han establecido que las cianobacterias son una fuente de nuevos agentes bioactivos (Patterson y col., 1991; Rodríguez y Guerrero, 1992).

Las cianobacterias tienen un enorme potencial para la obtención comercial de antibióticos, ya que muchas de sus especies pueden crecer en heterotrofia, lo que permite la posibilidad de utilizar fermentadores para su producción a gran escala. Son capaces de generar una amplia variedad de sustancias antimicrobianas, de las cuales sólo unas pocas se han identificado. Así, los bromofenoles son productos antibacterianos de *Calothrix brevisima*, y los extractos de *Lingbya majuscula* son efectivos contra *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Myxobacterium*, aunque la naturaleza de los compuestos activos no se conoce. *Nostoc muscorum* libera un factor activo no sólo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sino también contra microorganismos eucarióticos (Bloor y England, 1989). Entre las diferentes sustancias antimicrobianas producidas por las cianobacterias destacan los algicidas, por su potencial en la agricultura como herbicidas naturales. Muchas cianobacterias fijadoras de nitrógeno producen metabolitos secundarios tóxicos para otras cianobacterias y microalgas (Flores y Wolk, 1986; Gross y col., 1991). Entre ellos destaca los de *Scytonema hofmannii*, que inhibe la actividad del fotosistema II. Se han descrito otros algicidas en *Nostoc linckia* y *Fischerella muscicola*. Esta última produce la llamada *fischerellina*, que se ha caracterizado como

un compuesto lipofílico no halogenado de bajo peso molecular, que inhibe el flujo de electrones fotosintético, pero no el respiratorio, de cianobacterias y algas verdes, actuando sobre el fotosistema II (Gross y col., 1991).

Las cianobacterias representan también una interesante fuente potencial de agentes antivirales y se están incluyendo en programas de investigación dirigidos al descubrimiento de nuevos compuestos activos contra diferentes tipos de virus. En este contexto, se ha descrito la inhibición de los efectos citopáticos provocados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). Las sustancias activas anti-HIV-1 se han identificado como sulfolípidos (Gustafson y col., 1989). Ciertas cianobacterias, incluyendo estirpes de agua dulce y marina, producen también compuestos tóxicos para los animales. Las toxinas cianobacterianas incluyen péptidos, alcaloides y lipopolisacáridos. Cabe mencionar que algunas de estas toxinas han mostrado una actividad antitumoral significativa y que las neurotoxinas de cianobacterias se han empleado como herramienta de investigación en el estudio de la función de membranas del tejido nervioso (Falconer, 1993).

Se ha determinado que los extractos de *Spirulina* y *Synechococcus elongatus* estimulan el crecimiento de cultivos de células animales y disminuyen o eliminan la necesidad de suero animal en el medio de cultivo. La ficocianina y la aloficocianina se han identificado como sustancias activas presentes en extractos de *Synechococcus elongatus*, responsables de la actividad promotora del crecimiento de un cultivo celular de mieloma humano. También se ha encontrado una actividad promotora del crecimiento en una preparación comercial de ficocianina de *Spirulina platensis*. Asimismo, extractos de cianobacterias contienen compuestos que estimulan el crecimiento de diversas plantas aunque la caracterización de estas sustancias es escasa hasta el momento (Kerby y Stewart, 1988; Rodríguez y Guerrero, 1992).

Las estimaciones más recientes indican que las ventas totales de algas o productos derivados de ellas exceden los 2000 millones de \$ por año y siguen incrementándose (Borowitzka, 1999)

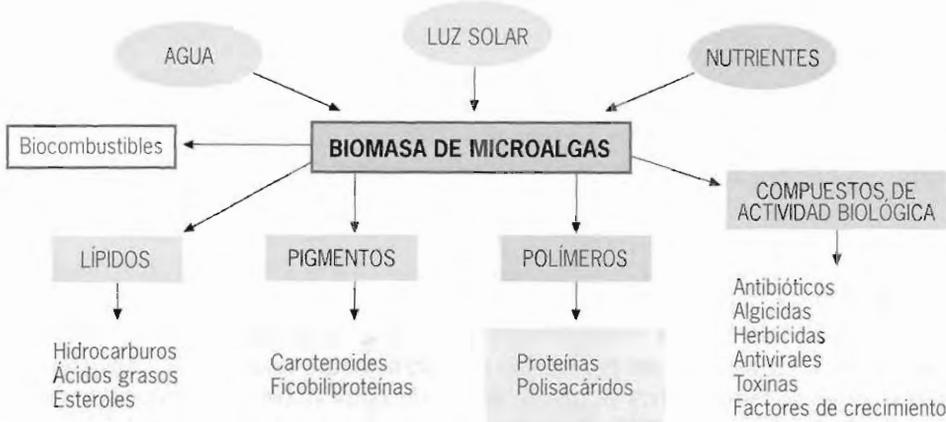


Fig. 6. Compuestos que se pueden obtener a partir del cultivo masivo de microalgas.

FACTORES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE MICROALGAS

La viabilidad y el mantenimiento de los cultivos de microalgas a la intemperie está condicionada, en principio, por dos factores medioambientales que son prácticamente incontrolables: temperatura e irradiancia. Por el contrario, existen otros factores biológicos y tecnológicos con gran influencia sobre la productividad de los cultivos de algas, cuya optimación debe considerarse en el diseño y operación de plantas de cultivo en masa. De hecho, la carencia de un conocimiento profundo de los principios biológicos subyacentes al cultivo de microalgas representa una de las principales limitaciones al desarrollo de la biotecnología de estos organismos, que requerirían previamente una caracterización bioquímica, fisiológica y ecológica más exhaustiva. Así, deben adecuarse las técnicas de cultivo, tratando de controlar en lo posible los parámetros ambientales y nutricionales. Los nutrientes deben estar presentes a concentraciones no limitantes para el crecimiento, y la turbulencia de la suspensión debe ser adecuada para que las células aprovechen en forma óptima tanto los nutrientes como la energía solar incidente.

En el cultivo de microalgas al aire libre se han de establecer condiciones en las que las células utilicen de forma óptima la luz solar incidente, para así maximizar la productividad. Entre los factores a considerar, densidad celular, agitación y profundidad son de especial importancia a este respecto (Fontes y col., 1987; Goldman, 1979; Moreno y col., 1995; Richmond, 1983, 1988).

Finalmente, cuando el objetivo del cultivo de microalgas es la obtención de un producto específico, se han de optimar tanto la producción como las técnicas de separación, extracción y purificación de los compuestos de interés, sin olvidar que no siempre las condiciones de máxima productividad en biomasa se corresponden con las de mayor rendimiento en el bioproducto deseado (Richmond, 1983, 1988; Benemann y col., 1987).

A la hora de seleccionar microalgas para su cultivo a la intemperie debe prestarse especial atención a una serie de características, tales como alta velocidad de crecimiento, amplia tolerancia a temperatura e irradiancia extremas, calidad de biomasa, facilidad en la recolección de las células y cualquier otra característica selectiva de interés, teniendo también muy en cuenta las condiciones ambientales imperantes en la zona donde se ubique el cultivo. Por otra parte, hay que establecer condiciones que beneficien específicamente el crecimiento del alga seleccionada. A este respecto,

debe considerarse el empleo de estirpes de microalgas autóctonas de la zona en que se realicen los cultivos y que posean amplia tolerancia a una serie de condiciones que, a su vez, sean restrictivas para el desarrollo de otras algas o depredadores (Richmond, 1983; Vonshak, 1987; Callegari, 1989; Guerrero y Losada, 1991). Debido a estas restricciones, de las más de 30.000 especies de microalgas conocidas, sólo unas pocas se cultivan a escala comercial. Este problema puede resolverse parcialmente con la implantación de fotobiorreactores cerrados de escala comercial, en los que el control absoluto del proceso y la restricción de contaminaciones externas puede permitir el crecimiento masivo de casi cualquier especie que produzca un compuesto de interés (Olaizola, 1999).

SISTEMAS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

Para el cultivo de microalgas a gran escala se han diseñado distintos sistemas dependiendo de las materias primas utilizadas y del destino final de la biomasa obtenida. Según este criterio, existen sistemas en los cuales el alga seleccionada se cultiva en un proceso denominado "limpio" usando agua pura, nutrientes minerales y fuente de carbono adicionales. Las algas cultivadas en estos sistemas se utilizan como suplemento dietético. Otro grupo de sistemas utiliza agua corriente o agua de desecho industrial como medio de cultivo, sin la adición de nutrientes minerales o carbono externo, estando la población de algas constituida por varias especies, existiendo simultáneamente cantidades notables de bacterias. Un tercer grupo estaría formado por sistemas cerrados bajo iluminación solar o artificial con estirpes puras cultivadas en un medio mineral controlado.

Atendiendo al diseño de los sistemas se pueden considerar dos tipos, abiertos y cerrados al aire. En el caso de los sistemas abiertos, se trata, en general, de estanques horizontales de varios tamaños y tipos, así como unidades de cultivo inclinadas. El cultivo de microalgas en sistemas abiertos combina características típicas de cultivos agrícolas (uso extensivo del terreno, agua y nutrientes, así como dependencia del clima y de la radiación solar) con otras propias de procesos industriales para el cultivo de microorganismos, tales como operación continua, suministro de nutrientes a concentración óptima y control del proceso.

El sistema más empleado es el de tipo intensivo, que consiste en un estanque horizontal de poca profundidad (10-30 cm) abierto al aire. Estos sistemas están constituidos por dos o más canales de 2 a 10 m de ancho y longitud variable dispuestos de manera contigua y separados por tabiques, con el piso y las paredes recubiertos por una capa de polietileno o cloruro de polivinilo. Las unidades de cultivo con carácter comercial tienen un área que puede oscilar entre 1.000 y 5.000 m². La turbulencia necesaria para obtener una homogeneización correcta de la suspensión se produce por la acción de paletas, hélices o bombas, que hacen que la suspensión celular fluya a lo largo de los canales a una velocidad adecuada. Para disminuir la pérdida de carga y la deposición de sólidos, se sitúan tabiques deflectores en las esquinas de los canales para dirigir la corriente de la suspensión celular (Benemann y col., 1987; Richmond, 1983, 1986a, b, c, 1990; Richmond y Becker, 1986).

Estos sistemas de cultivo pueden funcionar de manera continua o intermitente (semi-continua), extrayendo parte de la suspensión y devolviendo al estanque el líquido

sobrante, una vez recogidas las células, midiéndose a intervalos regulares la concentración de los diferentes nutrientes y corrigiéndose en caso necesario para mantener valores óptimos. El suministro de CO_2 puede regularse mediante un controlador de pH y una válvula solenoide, de forma que se insufla CO_2 cuando el pH suba por encima de un determinado valor crítico hasta que se restablezca el valor óptimo para el crecimiento celular del alga en cuestión (Benemann y col., 1987; Richmond, 1983).



Fig. 7. Sistema abierto de tipo intensivo para el cultivo de *Dunaliella*.

Los estanques abiertos tienen una serie de inconvenientes, entre los que destaca la dificultad de controlar la temperatura de la suspensión celular. La profundidad del cultivo no puede reducirse por debajo de 12 - 15 cm a fin de evitar reducciones drásticas en el flujo y la turbulencia, lo que implica utilizar grandes volúmenes por unidad de superficie (120 - 150 l m⁻²). Esto determina que la concentración de biomasa en el cultivo sea baja, con el consiguiente impacto en los costos de recolección de las células y en la posibilidad de contaminación externa. A pesar de todo, el sistema abierto de tipo intensivo, con agitación e inyección de CO_2 , es el mayoritariamente utilizado en plantas de producción de microalgas por las distintas compañías establecidas comercialmente (Richmond, 1990).

El sistema abierto de tipo extensivo utiliza grandes extensiones de terreno (entre 5 y 50 ha), sin agitación mecánica, con una orientación tal que la turbulencia ocasionada por los vientos predominantes en la zona permitan una cierta homogeneización y movimiento de la masa líquida. El medio de cultivo es de tipo basal, con adición de fuentes de nitrógeno y fósforo, aunque no anhídrido carbónico. Lógicamente, la velocidad de crecimiento de las microalgas y la densidad de los cultivos son más bajas que en los sistemas intensivos. La tecnología extensiva (también conocida como semi-intensiva) se ha puesto en práctica comercialmente sólo en Australia, por las compañías

Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd., para la producción de *Dunaliella* rica en β -caroteno (Borowitzka, L.J., 1992; Borowitzka, M.A., 1992).



Fig. 8. Sistema abierto de tipo extensivo para el cultivo de *Dunaliella salina*. Planta piloto y de producción de la Western Biotechnology (Australia) (cedida por Cognis Nutrition and Health).

Los sistemas de cultivo cerrados emplean fotobiorreactores, en los que la posibilidad de controlar las condiciones de cultivo permiten mejorar la cantidad y calidad de los productos obtenidos. En general, los sistemas de cultivo cerrado consisten en uno o varios módulos de captación de luz solar, acoplados a un sistema de carbonatación y recolección de células. Recientemente se han puesto en funcionamiento, con carácter experimental, una variedad de fotobiorreactores cerrados, entre los que predominan los sistemas tubulares, que consisten en ensamblajes de tubos de material plástico por los que circula la suspensión de microalgas, dispuestos sobre el suelo o sumergidos en agua, que actúa regulando la temperatura del cultivo (Pirt y col., 1983; Richmond y col., 1993; Boussiba, 1993).

La forma de conseguir la recirculación de la suspensión por el fotobiorreactor es un elemento de gran importancia, ya que influye notablemente en la productividad del cultivo. Se ha de tener en cuenta el efecto negativo que pueden producir los sistemas de impulsión de la suspensión celular, ya que el estrés hidrodinámico y las fuerzas de rozamiento a que se ven sometidas las microalgas al pasar por los sistemas de bombeo pueden dañar a las células, afectando así a los parámetros fisiológicos del cultivo. De los sistemas ensayados: bombas centrífugas, de desplazamiento positivo, peristálticas y "airlift", es este último el que menor estrés hidrodinámico provoca a las células originando, en general, una mayor productividad (Pirt y col., 1983; Gudín y Chaumont, 1991).

Los reactores cerrados, también denominados sistemas de cultivo hiperintensivo, se aplican fundamentalmente para la obtención de productos de alto valor comercial, ya que tanto la instalación como su mantenimiento comportan mayores costos que los sistemas abiertos. En general, permiten mantener altas densidades celulares y la axenia del cultivo, así como ejercer un control más estricto y automatizado de las condiciones de crecimiento y del proceso de producción (Lee, 1986; Oswald, 1988b; Weissman y col., 1988).



Fig. 9. Fotobiorreactor tubular para cultivo de *Haematococcus* en "The Jacob Blaustein Institute for Desert Research" Universidad Ben-Gurion, en Israel (cortesía del Prof. S. Boussiba).

CAROTENOIDES

INTRODUCCIÓN

Entre los compuestos con interés comercial obtenidos a partir de microalgas sobresalen los carotenoides, que pueden presentarse en cantidades sustanciales en algunas especies, las cuales representan una fuente biológica idónea de estos pigmentos. Los carotenoides aparecen de forma universal en todos los organismos fotosintéticos y de forma esporádica en algunas bacterias no fotosintéticas y en eucariontes. En términos evolutivos, la capacidad de síntesis de carotenoides parece haberse desarrollado inicialmente en bacterias fototróficas anoxigénicas y en cianobacterias (Pierson y Olson, 1989). En eucariontes, la capacidad para sintetizar carotenoides debió aparecer como resultado del establecimiento de simbiosis con bacterias o con cloroplastos (Stanier, 1970). Los animales no son capaces de sintetizar estos compuestos, aunque sí pueden modificarlos por oxidaciones o isomerizaciones transformándolos en vitamina A y retinoides (Johnson y Schroeder, 1995).

Las aplicaciones comerciales de los carotenoides son muy diversas. Su empleo como colorante natural en alimentación se extiende a una gran variedad de productos, tales como mantequilla, margarina, quesos y otros derivados lácteos, bebidas refrescantes, pasta, etc. Las regulaciones, cada vez más restrictivas, del uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria han estimulado la investigación y el desarrollo de procesos para la producción y uso de pigmentos de origen biológico como aditivos en alimentos. La acuicultura, una de las áreas de mayor desarrollo actual en el campo de la producción alimentaria, demanda también cantidades crecientes de carotenoides, ya que muchas de las especies cultivadas requieren carotenoides en su dieta, habiéndose valorado su demanda para el año 2000 en unas 100 t (Benemann, 1992). Además de proporcionar alimento, los carotenoides confieren una pigmentación brillante que aumenta el valor comercial tanto de crustáceos, peces y aves así como de sus huevos. Los carotenoides tienen, asimismo, amplia aplicación en la industria cosmética (Bauernfeind y col., 1971; Cohen, 1986; Borowitzka y Borowitzka, 1988; Harvey, 1988).

Los carotenoides muestran una gran diversidad en su distribución, estructura y función. Se trata de pigmentos accesorios que aumentan la eficiencia de la absorción de luz por los organismos fotosintéticos al captar longitudes de onda del espectro distintas a las recogidas por las clorofilas, desempeñando, asimismo, un importante papel en la protección de las microalgas contra procesos fotooxidativos. Estudios recientes han puesto de manifiesto la poderosa actividad antioxidante tanto del β -caroteno como de oxícarotenoides, tales como astaxantina y cantaxantina (Terao, 1989; Borowitzka, M. A.,

1992). Estos compuestos actúan secuestrando radicales libres de oxígeno, que en la actualidad se relacionan con la aparición de enfermedades degenerativas. Estudios recientes han sugerido que los carotenoides tienen beneficios para la salud en humanos y animales previniendo o retrasando algunas enfermedades crónicas (cáncer, arteriosclerosis, cataratas, etc.). Adicionalmente, la potencialidad de las microalgas como fuentes de vitaminas está suficientemente contrastada (Cohen, 1986; Benemann y col., 1987). El crecimiento durante la pasada década del uso de los carotenoides como colorantes en los piensos para acuicultura así como el papel biológico que juegan en algunas enfermedades humanas son los principales responsables del aumento de su demanda.

Tradicionalmente, los carotenoides para usos agrícolas o alimentarios se obtenían por extracción a partir de plantas naturales y por síntesis química. Durante los últimos diez años se han dedicado considerables esfuerzos al desarrollo de fuentes microbiológicas para la producción industrial de algunos carotenoides de interés. La síntesis microbiana podría cubrir una parte significativa de la demanda de carotenoides, ofreciendo una importante alternativa a la síntesis química, mayoritaria hasta el presente.

A partir de esta molécula básica y por distintos procedimientos enzimáticos se forman los aproximadamente 600 carotenoides que existen en la naturaleza, que aparecen mayoritariamente en la forma isomérica *trans*, aunque, en algunos casos, también se presenta el isómero *cis*.

La región de la molécula implicada en la captación de luz es la cadena de polieno debido a la presencia de los dobles enlaces conjugados. Del número de estos dobles enlaces depende la longitud de onda (λ) a la cual registra la máxima absorción, pudiéndose calcular por la fórmula:

$$\lambda_{\text{max (nm)}} = 300,5 + 65,5 n$$

donde n es el número de dobles enlaces conjugados.

El espectro de absorción típico de los carotenoides se caracteriza por 3 máximos de absorción en el caso de la violaxantina o la neoxantina, o dos máximos y un hombro en el caso de la luteína y el β -caroteno, en la región azul del espectro (figura 11). La posición del máximo de absorción para cada carotenoide depende del tipo de solvente y su contenido en agua. Estos valores están tabulados y se pueden encontrar en la bibliografía (Lichtenthaler, 1987).

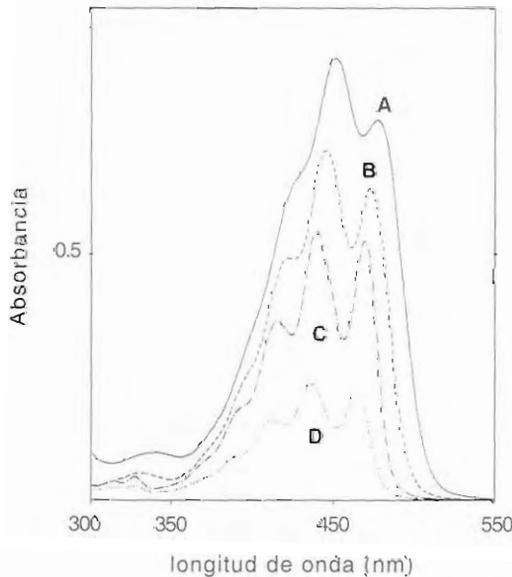


Fig. 11. Espectro de absorción característico de los 4 carotenoides más habituales: A: violaxantina, B: neoxantina, C: luteína, D: β -caroteno.

ORIGEN EVOLUTIVO

La biosíntesis de carotenoides probablemente comenzó en las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, y fue evolucionando a través de pequeños cambios estructurales para aprovechar mejor el espectro de la luz. Un acontecimiento de extrema importancia en la evolución de los carotenoides fue el desarrollo del fotosistema II, que permitió la utilización del agua como donador de electrones en la fotosíntesis liberando oxígeno. Como consecuencia, el O_2 empezó a acumularse y la atmósfera cambió de reductora a oxidante. Esta aparición gradual del oxígeno en la Tierra tuvo, probablemente, tremendas consecuencias en la diversificación de los carotenoides y la adaptación a una nueva función como sistema de protección frente a oxidaciones. Durante la transición de un ambiente anaerobio a un ambiente que contenía O_2 , los carotenoides pudieron jugar un importante papel como rudimentarios sistemas antioxidantes, acoplándose a las especies reactivas de oxígeno.

Existen importantes semejanzas entre los carotenoides de bacterias, plantas y algas lo que sugiere una ruta inicial universal que divergió en las últimas etapas de la síntesis, originando la variedad estructural hoy existente (Imhoff, 1992).

Los carotenoides están distribuidos de manera universal, apareciendo en los tres grandes taxones de vida en la Tierra. Así, se sintetizan en distintos grupos de *Eubacterias*, incluyendo todas las bacterias fototróficas y algunas heterotróficas, en un grupo de *Archaeobacterias*, las halobacterias, y, por supuesto, en los *Eucariotas*, produciéndose en todas las plantas, algas fotosintéticas y en algunos hongos (Johnson y Schroeder, 1995). Por su trascendencia, hay que destacar que los animales no pueden sintetizarlos y han de ingerirlos en su dieta.

La distribución de los carotenoides varía de unos grupos a otros. Así, todos los carotenoides de origen animal proceden de los carotenoides vegetales ingeridos en algún punto de la cadena alimenticia y que, una vez incorporados, sufren procesos de oxidación o reducción para originar otros carotenoides y vitaminas (Schiedt, 1989). Las plantas tienen un complemento limitado y uniforme de pigmentos (α y β -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina y neoxantina). Se localizan en los cromoplastos asociados, de forma no covalente, a proteínas. Las bacterias producen diversos pigmentos poco frecuentes del tipo C_{30} , C_{45} y C_{50} y, generalmente, carecen de los carotenoides típicos de plantas y algas tales como β -caroteno, luteína y epóxidos. En hongos, los

carotenoides sólo aparecen de forma esporádica, acumulándose probablemente en glóbulos lipídicos y en membranas y, parecen proporcionar una protección antioxidante. Mediante activación genética se pueden conseguir grandes acumulaciones de carotenos en algunos hongos. Un caso especial es el de *Phaffia*, una levadura con características fisiológicas inusuales que produce cantidades importantes de astaxantina. Respecto a las algas, los carotenoides suelen aparecer asociados a clorofilas dentro de los plastos, pero también existen acumulaciones extraplásticas, especialmente en algas con interés comercial como *Dunaliella* y *Haematococcus*. Las Clorofíceas, el grupo de algas de mayor interés industrial, acumulan principalmente α y β -caroteno, astaxantina, luteína, violaxantina y neoxantina, normalmente en respuesta a estrés nutricional o ambiental

Por analogía con otras moléculas isoprenoides, los carotenoides probablemente se originan en el retículo endoplásmico liso y después se transportan por el citoplasma en vesículas lipídicas o formando complejos con lipoproteínas. Al alcanzar la región membranosa pueden reaccionar enzimáticamente con oxígeno y dar lugar a las xantofilas (Johnson y Schroeder, 1995).

En las células eucarióticas, la biosíntesis y posterior modificación tiene lugar en la proximidad de los peroxisomas y otras vesículas con sistemas enzimáticos que generan formas tóxicas de oxígeno (Veenhuis y Harder, 1991).

FUNCIONES BIOLÓGICAS Y PROTECTORAS DE LOS CAROTENOIDES

El interés por los carotenoides se ha incrementado considerablemente en los últimos diez años, debido, en parte, al evidente aumento de sus beneficios para la salud humana, así como por el desarrollo de ciertas áreas de la agricultura, especialmente la acuicultura y la avicultura.

La posibilidad de que los carotenoides tengan un papel en la prevención del cáncer y otras enfermedades degenerativas ha originado un considerable interés dentro de este campo.

Los carotenoides secuestran radicales de oxígeno, 1O_2 , originando un estado agregado de oxígeno y un carotenoide con un triple enlace, que vuelve a su estado normal liberando calor. Los carotenoides presentan distinta capacidad para secuestrar oxígeno, dependiendo del número de dobles enlaces conjugados, grupos funcionales y el isomerismo *cis/trans*.

Las principales enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento son el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, el deterioro del sistema inmunitario, las disfunciones cerebrales, artritis y cataratas. Investigaciones epidemiológicas muestran que el consumo de vegetales verdes y amarillos está asociado a una menor incidencia de algunos tipos de cáncer (Peto y col., 1981). De hecho, un consumo dietético adecuado de frutas y verduras reduce a la mitad la posibilidad de desarrollar cáncer (Ames y col., 1993), previniendo la aparición de algunos cánceres producidos por productos químicos y virus (Santamaria y col., 1983; Seifter y col., 1982). Diversas investigaciones apoyan la teoría de que la expectativa de vida está relacionada con los daños oxidativos sobre el ADN, proteínas y lípidos y, que los antioxidantes naturales, tales como ascorbato, tocoferol y carotenoides, son importantes en la prevención de estas oxidaciones (Stadtman, 1992; Sohal y col., 1993).

El posible papel del β -caroteno en la prevención de carcinogénesis y otras enfermedades degenerativas relacionadas con la oxidación de los tejidos ha sido extensamente estudiado y revisado. Recientemente, el Alpha-Tocopherol, β -Carotene Cancer Prevention Study Group y el β -Carotene and Retinol Efficacy Trial, han puesto de manifiesto que, si bien el β -caroteno parece reducir la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares, puede aumentar, sin embargo, el riesgo de padecerlas en el caso de

fumadores y trabajadores expuestos al amianto (Omenn y col., 1996). Los estudios realizados por estos dos institutos y ensayos más recientes, han cuestionado el papel protector del β -caroteno cuando se utiliza únicamente la forma *todo-trans* obtenida de manera sintética. Los estudios realizados con β -caroteno de origen natural han mostrado el potencial de este compuesto como antioxidante *in vitro*. Por otra parte, el *9-cis* β -caroteno no se detecta en el suero de pollos, ratas o humanos alimentados con una dieta rica en *Dunaliella* o con extractos oleosos del alga (Gaziano y col., 1995); sólo se detecta el *todo-trans* β -caroteno. Esta ausencia del isómero *9-cis* en el suero de mamíferos y su respuesta a la oxidación *in vitro*, ha conducido a la hipótesis de que el *9-cis* β -caroteno, al ser más inestable, es más sensible a las bajas tensiones de oxígeno y reaccionaría como un secuestrador de este oxígeno singlete u otros radicales libres, transformándose en *todo-trans* β -caroteno, sirviendo como un efectivo antioxidante *in vivo* y desapareciendo, por tanto, del suero (Levy y col., 1995 y 1996). Otros estudios (Ben-Amotz y Levy, 1996) apoyan también esta hipótesis, ya que detectan niveles mucho más bajos de radicales libres en humanos alimentados con dietas suplementadas con *Dunaliella* rica en β -caroteno que en los tratados sólo con *todo-trans* β -caroteno.

Se desconoce aun el mecanismo de la acción antioxidante del β -caroteno. Se necesitan altos niveles de β -caroteno en la circulación y en los tejidos para que lleve a cabo su función (Gey y col., 1987). Sin embargo, estudios en ratas indican que se acumula casi exclusivamente en el hígado, existen problemas de absorción a nivel intestinal y hay isomerización en algunos tejidos (Johnson y col., 1996). Lo que parece claro es que la tasa de acumulación del pigmento es mucho mayor si se trata de β -caroteno obtenido a partir de *Dunaliella*, tanto en forma de polvo de alga como de extracto, que si es de origen sintético (Ben-Amotz y Avron, 1989b).

Se conocen distintos factores que afectan a la disponibilidad del β -caroteno de *Dunaliella*. Así, un incremento en el contenido en lípidos en la dieta, mejora la absorción de β -caroteno, aumentando sus niveles en plasma e hígado. Esto se ha relacionado con el papel del isómero *9-cis* como agente que facilita la incorporación de β -caroteno en las micelas de grasa que se forman en el intestino, mejorando así su absorción (Mokady y Ben-Amotz, 1991). Por otra parte, la concentración de β -caroteno en plasma es mayor en mujeres que en hombres, posiblemente debido a su utilización para la obtención de retinol, ya que los requerimientos de este compuesto son mayores en hombres que en mujeres (Thurnham, 1988).

En la siguiente tabla se recogen algunos mecanismos de acción y efectos de los carotenoides propuestos para la quimioprotección del cáncer.

Mecanismo propuesto	Confirmación biológica	Efecto
Conversión metabólica a retinoides	<i>In vitro</i> , en animales y humanos	Modula la expresión génica de factores asociados a la proliferación celular y la diferenciación, vía ácidos retinoicos
Modulación del balance oxidativo	<i>In vitro</i> , en animales y humanos	Inhibe los daños oxidativos al ADN. Inhibe la peroxidación de lípidos, manteniendo la integridad y fluidez de la membrana. Mejora la respuesta inmune. Regula la expresión de genes sensibles al estado redox intracelular, implicados en carcinogénesis
Modulación de la expresión génica de conexina 43	<i>In vitro</i>	Induce la formación de "gap junctions", inhibiendo la transformación neoplásica
Modulación de la expresión génica de la enzima HMG-CoA reductasa	En animales	Inhibe la síntesis endógena de colesterol, limitando la proliferación celular y la transformación maligna
Modulación de la actividad de enzimas que metabolizan xenobióticos	En animales	Inhibe la activación metabólica y/o aumenta la detoxificación de carcinógenos potenciales
Interacción con receptores nucleares específicos o receptores de la superficie celular	<i>In vitro</i>	Induce la diferenciación celular

El α -caroteno puede ser un antioxidante incluso más efectivo que el β -caroteno (Murakoshi y col., 1992). Recientemente se ha demostrado que la astaxantina previene cánceres del aparato urinario (Tanaka y col., 1994), al parecer inhibiendo la proliferación celular y modulando la respuesta inmune.

En los tejidos oculares se producen daños por radiación de longitudes de onda comprendidas entre 295 y 450 nm, debido a la aparición de 1O_2 . Estas alteraciones pueden reducirse aumentando la presencia de carotenoides (Zigman, 1993).

Otro ejemplo del papel de los carotenoides es la prevención de la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) relacionadas con las enfermedades cardiovasculares (Packer, 1993).

Además de estas implicaciones en la salud humana, los carotenoides tienen diversas funciones en los organismos fotosintéticos. Junto a los ya mencionados papeles de pigmento captador de luz y fotoprotector, los carotenoides son una fuente de hormonas en vegetales en respuesta al estrés: el ácido abscísico se forma en plantas que sufren estrés hídrico por escisión de carotenoides (Parry y Horgan, 1992). En algas, los carotenoides se escinden para dar retinoides, que se combinan con la opsina, dando lugar así a los fotorreceptores para la fototaxis (Saranak y Foster, 1994). En animales, son los precursores de la vitamina A y fuente de retinoides cruciales para el desarrollo de los vertebrados (Gudas, 1994). Previenen la peroxidación de lípidos evitando, posiblemente, mutaciones en los huevos de peces y moluscos, lo que explicaría la alta pigmentación de las huevas. En el caso de los hongos también se han descrito diversas funciones: actúan como precursores de hormonas y reguladores del desarrollo y la reproducción, estabilizan los lípidos de membrana, disminuyendo la permeabilidad al agua y aumentando la rigidez (Lazrak y col., 1988), activan la resistencia a agentes químicos y ambientales (Rau, 1988), etc.

ASPECTOS INDUSTRIALES

Sólo unos pocos de los más de 600 carotenoides identificados se utilizan industrialmente como colorantes alimenticios, como piensos, en cosmética o en farmacia (Bauernfeind, 1981). La mayoría de los carotenoides utilizados para estos fines industriales se producen por síntesis química. El β -caroteno se produce comercialmente desde 1954 (Pfander, 1992). Los 6 carotenoides sintéticos de importancia comercial son: β -apocarotenal, éster etílico del ácido β -apo-8' carotenoico, citranaxantina, β -caroteno, cantaxantina y astaxantina. Según Pfander, el precio aproximado en el mercado actual para una dispersión en polvo que contenga entre un 5 y un 10% de carotenoide activo es de 600 \$ por kg para el β -caroteno, 900 \$ para los apocarotenoides, 1300 \$ para la cantaxantina y 2500 \$ para la astaxantina. Se ha estimado que las ventas anuales de carotenoides sintéticos asciende a 500 millones de \$.

El mercado mundial estimado para fuentes sintéticas y biológicas de astaxantina, cantaxantina y β -caroteno se recoge en la tabla siguiente (Dean, 1992)

	Mercado en 1996 (millones de \$)		Mercado para 2000 (millones de \$)	
	sintético	biológico	sintético	biológico
β-caroteno (nutrición)	75	35	110	60
β-caroteno (cosmética)	95	45	140	130
Astaxantina/cantaxantina	210	40	305	150

Es imposible estimar el mercado para los extractos naturales, puesto que la mayor parte de las compañías que los producen son de reciente creación. Naturalmente, el mercado y la demanda de carotenoides puede cambiar si los ensayos clínicos en marcha confirman sus beneficios medicinales.

Como ya se ha comentado, en los últimos años se ha incrementado el interés por la síntesis microbiológica de carotenoides, habiéndose registrado algunas patentes (Johnson y Schroeder, 1995). Este interés se debe, en primer lugar, al desarrollo de la acuicultura cuyo mercado ha aumentado más del doble entre 1984 y 1994 en términos de producción (hasta 25,5 millones de t), siendo este incremento aun mayor en cuanto a

su valor económico (casi triplicado, hasta aproximadamente 40.000 millones \$ USA en 1994). Particularmente, en algunos países se ha incrementado la cría de ciertas especies de salmón y langostino. Durante 1994 se cultivaron más de 920.000 t de langostinos y cerca de 812.000 t de salmónidos, con un valor económico de 6.330 y 3.380 millones \$ USA, respectivamente. En Noruega la producción del salmón atlántico superó en 1994 las 210.000 t, con perspectivas de alcanzar el millón de toneladas a mediados de la próxima década. La astaxantina es la principal fuente de pigmentación para estos salmónidos y crustáceos criados en piscifactorías. Hace diez años, sólo un 3 - 5% del consumo mundial de estas especies procedía de piscifactorías, representando en la actualidad entre el 25 - 30%. Aparte del crecimiento de la actividad acuícola, otro factor que explica este creciente interés por los carotenoides naturales es la ya comentada tendencia actual a eliminar los aditivos y productos químicos de las industrias alimentaria y cosmética.

PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE CAROTENOIDES

– LUTEÍNA

La luteína o su extracto es la principal fuente de pigmentación en pollos y huevos. Es también el carotenoide más habitual en los peces (Simpson y col., 1981). Es frecuente mezclar luteína y zeaxantina para obtener la intensidad de color deseada en la yema de huevo (Marusich y Bauernfeind, 1981). La luteína presente en la harina de alfalfa o de gluten de maíz se utiliza comercialmente en avicultura. Otra fuente comercial de luteína son las flores de caléndula (Nelis y de Leenheer, 1991). En la actualidad se están estudiando procesos microbiológicos para producir luteína, existiendo algunas patentes para su producción a partir de *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas* y *Spongio-coccum*. La compañía Hoffmann - La Roche ha patentado la producción de luteína a partir de *Chlorella pyrenoidosa*, pero nunca se ha comercializado (Nelis y de Leenheer, 1991). Se han publicado producciones de 294 mg de luteína por litro de cultivo, comercializados bajo la marca A-Zanth, a partir de *Spongiococcum excentrum* (Marusich y Bauernfeind, 1981).

– ZEAXANTINA

Las plantas superiores, algunas algas, cianobacterias y bacterias tienen la capacidad de producir zeaxantina. De todas ellas, *Flavobacterium* parece ser la mejor fuente para producir este pigmento (10 - 40 mg l⁻¹) habiéndose registrado varias patentes (Ninet y Renault, 1979). También se han desarrollado procesos para producir zeaxantina mediante manipulación genética, introduciendo genes de *Erwinia* implicados en la biosíntesis de este carotenoide en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

– RHODOXANTINA

Este carotenoide está distribuido ampliamente en hojas, peces y plumas de pájaros (Nelis y de Leenheer, 1989). También se ha detectado en la bacteria *Pseudomonas extorquens* donde los niveles de pigmento dependen de la fase de crecimiento y del estado nutricional, siendo máximos en fase estacionaria, utilizando glicerol y nitrato amónico como fuentes de C y N y en condiciones de limitación de Mg²⁺ y O₂ (Downs y Harrison, 1974).

– CANTAXANTINA

La cantaxantina se aisló originalmente del hongo *Cantharellus cinnabarinus* y de los tubérculos de batata (Marusich y Bauernfeind, 1981). Algunas algas verdes (*Haematococcus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Ankistrodesmus*) también la producen, normalmente en respuesta al estrés y deficiencias nutricionales (Czygan, 1968), así como algunas bacterias (Nelis y de Leenheer, 1991).

– ASTAXANTINA

Es el pigmento más importante en la dieta de salmónidos y langostinos debido a la coloración que provoca en ellos. En la actualidad, la mayoría de la astaxantina procede de síntesis química, siendo un proceso difícil al tratarse de una molécula muy compleja. Debido a su potencial mercado en acuicultura y alto precio (2000 \$ kg⁻¹), se ha observado un gran interés en el desarrollo de fuentes biológicas alternativas. El problema más importante para este desarrollo es que la astaxantina de origen biológico no está permitida como aditivo en alimentación, siendo sustituida por cantaxantina.

Se ha identificado astaxantina en varios organismos: en el hongo *Peniophora*, la levadura *Phaffia rhodozyma*, las bacterias *Mycobacterium lacticola* y *Brevibacterium* y en varias algas verdes como *Haematococcus* sp., *Neochloris wimmeri* y *Chlamydomonas nivalis* (Brubrick, 1991). Las principales fuentes biológicas de astaxantina para producción industrial son *Haematococcus pluvialis*, *Phaffia rhodozyma* y extractos de crustáceos. Debido a la gran cantidad de desechos y restos de crustáceos que se generan todos los años se están aprovechando industrialmente, aunque estos residuos tienen altos niveles de cenizas y un bajo poder energético. Además la mayor parte de esta astaxantina está presente como diéster, absorbiéndose con baja eficacia (Storebakken, 1988).

Haematococcus pluvialis es un alga verde de agua dulce, unicelular y móvil que, en condiciones desfavorables de crecimiento, pierde movilidad y forma aplanosporas. Este enquistamiento está acompañado por la síntesis y acumulación en glóbulos lipídicos de grandes cantidades de astaxantina. Esta producción se estimula en ausencia de fosfato y alta irradiancia (Boussiba y col., 1992).

En San Diego (California), Microbio Resources Inc. ha desarrollado un método para la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, comercializada bajo la marca Alga-xan Red. La materia seca obtenida, con un contenido del 1% en astaxantina, se vende a un precio de 20 \$ kg⁻¹, competitivo con la astaxantina sintética (Brubrick, 1991).

– β-CAROTENO

En 1947, investigadores de Hoffmann La Roche llevaron a cabo la síntesis química de la β-ionona. Esto permitió la síntesis de la vitamina A y poco después, en 1956, del β-caroteno. El β-caroteno tiene la fórmula C₄₀H₅₆, un peso molecular de 536,9, once dobles enlaces conjugados y color rojo-violeta en estado cristalino. En solución oleosa, el color varía del amarillo al naranja, mientras que en dispersión

acuosa es de color naranja. El β -caroteno sintético, cristalino y puro tiene estereoquímica de *todo-trans*, muy baja solubilidad en aceite y en solventes orgánicos, así como una tendencia muy alta a cristalizar. El β -caroteno en metanol presenta un máximo de absorción en la región del espectro electromagnético correspondiente a 450 nm y un coeficiente de extinción, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, de 2.620. La falta de una metodología precisa hizo asumir que todo el β -caroteno natural se encontraba en la forma *todo-trans*. Sin embargo, el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostró que el β -caroteno natural extraído de diversas fuentes contenía diferentes formas de *mono-cis*, *di-cis* y *poli-cis*.

El contenido en β -caroteno de las plantas varía considerablemente, desde 0,01 hasta 10 mg por cada 100 g de materia vegetal. Las plantas ricas en β -caroteno más comunes son: plantas de hoja verde tales como espinaca, brócol, perejil; frutas amarillo-naranjas como mandarina, mango y albaricoque; y algunas hortalizas como zanahoria, batata y calabaza.

Se han desarrollado métodos industriales para la obtención de β -caroteno a partir del hongo *Blakeslea trispora* obteniéndose 3 g de β -caroteno l^{-1} , competitivos con la síntesis química. *Phycomyces* también puede acumular grandes cantidades de β -caroteno (30 mg g^{-1}) en partículas lipídicas dentro del micelio, pero esta producción sólo se ha estudiado en condiciones de laboratorio (Haxo y Blinks, 1950). Además los análisis mediante HPLC parecen indicar que se trata de una mezcla de varios carotenoides y una proporción variable de β -caroteno (Khachick y col., 1986).

El proceso más importante para la producción microbiana de β -caroteno es el cultivo de algas, concretamente del alga verde biflagelada *Dunaliella*. La producción anual estimada para este pigmento es de 15 t, equivalente a unas 3.000 t de biomasa de *Dunaliella* (Boussiba, 1999). En la actualidad existen siete compañías comprometidas en el cultivo de este alga con fines comerciales (Ben-Amotz, 1999a):

1. Betatene Ltd., Cheltenham, Victoria 3192, Australia. Es una división de Henkel Co., Alemania. Cultivo extensivo.
2. Cyanotech Co., Kailua-Kona, Hawaii 96740, USA. Cultivo intensivo.
3. Inner Mongolia Biological Eng. Co., Inner Mongolia 750333, China. Cultivo semi-intensivo.
4. Nature Beta Technologies (NBT) Ltd., Eilat 88106, Israel. Es una subsidiaria de Nikken Sohonsa Co., Gifu, Japón. Cultivo intensivo.
5. Nutrilite, Calipatria, California 92233, USA. División de la Amway Corporation, USA. Cultivo intensivo.
6. Tianjin Lantai Biotechnology, Inc. Nankai, Tianjin. En colaboración con el Salt Scientific Research Institute of Light Industry Ministry, China. Cultivo intensivo.
7. Wester Biotechnology Ltd. Bayswater, W.A. 6053, Australia. Subsidiaria de Coogee Chemicals Pty. Ltd., Australia. Cultivo semiintensivo.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

La producción de carotenoides por síntesis microbiana es un ejemplo clásico de la competencia entre los procesos químicos y biológicos. El proceso biosintético parece más interesante pues permite obtener de manera simple los carotenoides de estructura más compleja, así como los isómeros conformacionales que sólo existen de forma natural. Además, está claro que cada grupo de microorganismos está especializado en la síntesis de uno o varios carotenos específicos. Un análisis en profundidad de distintos nichos ecológicos permitirá descubrir organismos carotenogénicos que aun no han sido aislados.

Resulta estimulante comprobar que algunos compuestos naturales, como los carotenoides, no sólo aumentan la belleza de nuestro entorno sino que además pueden incrementar la salud y longevidad de los seres vivos.

EL ALGA *Dunaliella*

INTRODUCCIÓN

El alga verde *Dunaliella* es, probablemente, el microorganismo fotosintético más estudiado para la obtención de cultivos masivos. *Dunaliella* spp. se cultiva para su utilización como fuente de alimento en acuicultura (Davis y Guillard, 1958) y *Dunaliella salina* es la fuente algal más rica en β -caroteno y glicerol (Ben-Amotz, 1980). Este alga halotolerante posee algunas propiedades que explican esta preferencia:

- a) El cultivo de algas a gran escala en estanques abiertos requiere una superficie considerable, en zonas donde la intensidad de la luz del sol sea alta y las temperaturas sean moderadas a lo largo del año. Estas condiciones son propias de zonas áridas donde el agua dulce es escasa pero el agua salada, incluyendo el agua de mar, está frecuentemente disponible. El alga verde *Dunaliella* sobrevive bajo tales condiciones porque su crecimiento óptimo requiere medios de cultivo con un contenido de NaCl entre 6 y 12%.
- b) *Dunaliella* es uno de los pocos organismos que pueden vivir en medios que contienen una concentración de sal tan alta. Esto, junto a un pH óptimo alcalino, le proporciona una gran ventaja selectiva que permite el desarrollo de cultivos relativamente puros.
- c) La alta concentración de sal reduce el número de especies predadoras.
- d) Puesto que *Dunaliella* sobrevive en un medio inorgánico simple, el crecimiento de organismos no fotosintéticos, tales como bacterias y hongos, que no se puedan alimentar de la propia alga, está seriamente limitado.
- e) En condiciones de crecimiento seleccionadas, *Dunaliella* acumula cantidades masivas de β -caroteno (aproximadamente el 10% del peso seco del alga), además de glicerol (entre 20 - 40%).
- f) Al carecer de pared celular, el alga seca es fácil y completamente digerible para los animales y humanos.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Dunaliella* fue descrito por primera vez por Teodoresco (1905). Debe su nombre a M.F. Dunal, quien fue el primero en reconocer que el color rojo de ciertos reservorios hipersalinos era causado por un alga (Dunal, 1837). Massyuk (1973), en su revisión del género, reconoce 29 especies y un gran número de variedades y formas aun no muy bien definidas. Muchas especies de colecciones de cultivo tienen nombres erróneos. Por ejemplo, algunos autores (Borowitzka y Borowitzka, 1988) consideran que *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz y Avron, 1983) es un "nomen nudum" siendo realmente una cepa de *Dunaliella salina* Teod., como todas las especies que aparecen rojas en situaciones de estrés ambiental por acumulación de β -caroteno. Sin embargo, Ben-Amotz y Avron (1983) apuntan diferencias considerables entre estas dos especies. Esta ambigüedad en los nombres dificulta la discusión de resultados entre distintos autores.

Dunaliella pertenece a la clase **Chlorophyceae** y al orden **Volvocales**. Todas son unicelulares pero difieren extraordinariamente en tamaño y forma. Sus dimensiones oscilan entre 8 - 25 μm de largo y 5 - 15 μm de ancho y pueden ser ovoides, periformes, alargadas o esféricas con una papila apical bien definida cuando se trata de individuos pequeños, y ovoides o elípticas con un estrechamiento en la parte central y una papila apical muy pequeña o ausente cuando las células son grandes. Son móviles, debido a la presencia de dos flagelos apicales de igual longitud (Butcher, 1959). El alga contiene un gran cloroplasto en forma de copa con un pirenoide simple embebido en la parte basal. Este pirenoide está rodeado de gránulos de polisacárido que son el producto de reserva. Al igual que la mayoría de las algas verdes, *Dunaliella* tiene los orgánulos celulares típicos: cloroplasto, pirenoide, núcleo rodeado de membrana, mitocondrias, pequeñas vacuolas, aparato de Golgi y una mancha ocular. Su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacárido. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y una envuelta mucídica. Por tanto, es capaz de responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Esta falta de pared celular rígida incrementa su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos.

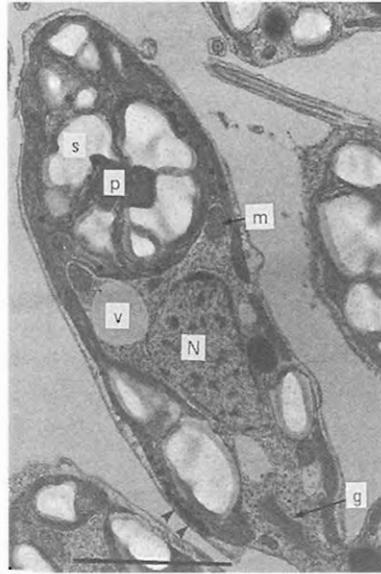


Fig. 12. Micrografía electrónica de *Dunaliella*. La barra de escala representa 2 μ m. N, núcleo; p, pirenoide; s, gránulos de almidón; m, mitocondria; g, aparato de Golgi; v, vacuola; las flechas señalan la mancha ocular en la periferia del cloroplasto (Borowitzka y Borowitzka, 1988)

Parece más correcto hablar de individuos grandes e individuos pequeños, en vez de jóvenes y adultos como fueron designados originariamente (Teodoresco, 1905), porque, independientemente de su tamaño, se reproducen por división longitudinal, manteniendo la movilidad celular durante el proceso de división. También pueden reproducirse de manera sexual (Lerche, 1937). Las células hijas originadas mantienen la morfología típica y la ultraestructura de sus células parentales. Cuando se exponen a condiciones que inducen la reproducción sexual (baja concentración salina, baja temperatura o ausencia de nutrientes), ambos tipos de células responden de manera diferente: los individuos grandes son capaces de conjugarse directamente, mientras que los pequeños experimentan un estado de maduración previo, la etapa "palmeloide". En este estado la mancha ocular se desorganiza y los flagelos quedan embebidos en una capa de mucílago. Algunos autores consideran que este estado es una estrategia para facilitar la supervivencia en condiciones desfavorables de crecimiento (Montoya y Olivera, 1993). Cuando se añade medio fresco, las nuevas células adquieren la capacidad de actuar como gametos. Estos son morfológicamente similares a las células vegetativas pero con el cloroplasto menos desarrollado. La conjugación es lateral y la germinación del zigoto origina de 4 a 8 nuevos individuos (Figura 13).

Algunos datos indican que los individuos grandes derivan de los pequeños: en una replicación donde se parte exclusivamente de individuos pequeños, al cabo de 4 - 5 días de cultivo aparecen los dos tipos de células (Leonardi y Cáceres, 1994). Además, el

número de células grandes aumenta gradualmente durante la fase logarítmica de crecimiento y se hace máximo en la fase estacionaria.

Los cistos (U) son células redondas, de color rojo y gran tamaño que pierden los flagelos y, por tanto, su movilidad. Están rodeados de una doble pared con una superficie de aspecto rugoso (Borowitzka y Huisman, 1993).

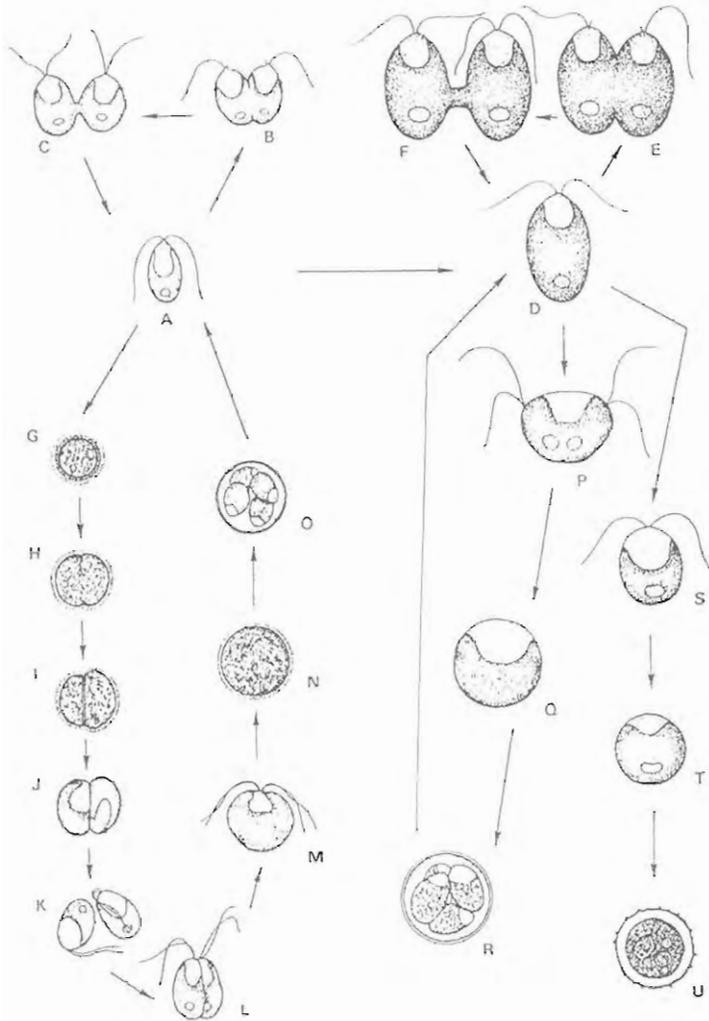


Fig. 13. Ciclo vital de *Dunaliella salina*: A, individuo pequeño; B-C, división longitudinal de individuos pequeños; D, individuo grande; E-F, división longitudinal de individuos grandes; G-O: individuo pequeño: G, estado palmeloide; H-K, gametogénesis; L, conjugación lateral; M-O, formación de cigoto y germinación. P-U: individuos grandes: P, conjugación lateroposterior; Q-R, formación de cigoto y germinación; S-U, formación de cistos. (Leonardi y Cáceres, 1997).

Estos cistos vegetativos o *aplanosporas* fueron observados por Hamburger en 1905. La formación de estas células tiene lugar en cultivos en fase estacionaria, con reducida salinidad, ausencia de nitrógeno y presencia de sulfatos. La intensidad luminosa no parece ejercer ningún efecto. Sin embargo, la baja temperatura aumenta su formación. También se ha descrito la formación de *aplanosporas* cuando se produce la desecación de su hábitat natural (Margulis y col., 1980). Se considera, pues, una estrategia de resistencia a condiciones adversas (Montoya y Olivera, 1993). La característica más notable de esta forma celular es su diferente composición en pigmentos respecto a las células vegetativas, siendo la cantaxantina el carotenoide mayoritario en vez del β -caroteno (Loeblich, 1972). Se acumula en el citoplasma de manera similar a las *aplanosporas* de *Haematococcus* (Grung y Liaaen-Jensen, 1992).

REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO

Dunaliella se desarrolla bien en un medio estrictamente inorgánico sin necesidad de ningún factor orgánico. Se han publicado varios medios de cultivo para este alga. Los principales nutrientes requeridos para su crecimiento son:

Carbono. Todas las especies de *Dunaliella* son fotoautótrofos estrictos y requieren carbono inorgánico para vivir. Existen múltiples evidencias de que *Dunaliella* puede utilizar tanto CO_2 como bicarbonado como fuente de carbono (Loeblich, 1972). El aporte de carbono inorgánico es, probablemente, el más limitante de entre los nutrientes, ya que cuanto mayor es la salinidad del medio de cultivo y mayor es la temperatura, menor es la solubilidad del C inorgánico. En las condiciones de alta salinidad, temperatura y pH que se encuentra *Dunaliella* en las salinas, la mayor parte del carbono inorgánico aparece como carbonato. El alga se "adapta" a estas bajas concentraciones de CO_2 con una gran afinidad por el gas ($K_m \text{CO}_2 = 2 \mu\text{M}$), y acumulando en la célula hasta 20 veces más C inorgánico del que se encuentra en el medio, gracias a la presencia de una enzima, la anhidrasa carbónica (Zenvirth y Kaplan, 1981). La adición de C inorgánico, bien en forma de CO_2 o de NaHCO_3 , estimula el crecimiento mientras no se produzca precipitación de carbonatos. El efecto es mayor cuando se burbujea el medio de cultivo con aire enriquecido en CO_2 , ya que baja el pH y aumenta la concentración de CO_2 (Van Auken y McNultry, 1973).

Nitrógeno. *Dunaliella* puede utilizar nitrato, nitrito, amonio o urea como fuente de nitrógeno para su crecimiento. El amonio es tóxico a concentraciones superiores a 5 mM, particularmente cuando el pH del medio de cultivo es superior a 8 (Azov y Goldman, 1982), y la urea suministra adicionalmente carbono orgánico, estimulando el crecimiento de organismos heterotróficos además de aumentar el contenido en amonio del medio. Por tanto, el nitrato es la fuente de nitrógeno preferente para los cultivos masivos, a pesar de ser la más cara y requerir considerable energía metabólica para su asimilación. Además, de todas las formas de nitrógeno combinado ensayadas, el NO_3Na es el más eficientemente utilizado por *Dunaliella* para su desarrollo, obteniéndose tasas máximas de crecimiento a concentraciones próximas a 5mM. Este N no se almacena de forma significativa en el interior celular, cesando el crecimiento cuando se agota o deja de suministrarse.

La mayor producción de β -caroteno se alcanza cuando la intensidad de luz es máxima y la tasa de crecimiento está limitada, especialmente por deficiencia en el suministro

de N. Esto altera la composición general del alga, disminuyendo el contenido en lípidos y proteínas y aumentando el de carbohidratos. El contenido en β -caroteno pasa del 0,5 al 5% (Ben-Amotz, 1987)

Fósforo. *Dunaliella* requiere concentraciones de fosfato inorgánico inferiores a 0,1 mM para desarrollar un crecimiento óptimo. Este organismo puede acumular fosfato hasta alcanzar contenidos intracelulares de fósforo de 0,5 M. Cuando las células se transfieren a un medio sin este elemento, son capaces de utilizar sus propias reservas durante varios ciclos de división celular antes de que el estado deficitario empiece a ser patente.

La presencia conjunta de calcio y fosfato en los estanques de cultivo, particularmente cuando el pH está por encima de 8, provoca la precipitación de fosfato cálcico y la floculación de las algas, disminuyendo su crecimiento (Sukenic y Shelef, 1984). Por esta razón es aconsejable mantener baja la concentración de fosfato en los estanques de producción, controlando frecuentemente sus niveles.

Sulfato. *Dunaliella* requiere concentraciones de sulfato en torno a 2 mM para obtener máximo crecimiento. Cuando el sulfato es limitante en el medio de cultivo, la división celular se detiene, aumenta el tamaño de las células y se estimula la acumulación de β -caroteno. Puesto que este compuesto es relativamente abundante en el agua de mar (alrededor de 30 mM) y en el agua corriente, no es necesario añadirlo. Cuando está presente a muy altas concentraciones en el medio de cultivo y en presencia de calcio, puede precipitar y reducir el crecimiento del alga.

Magnesio. Se requiere aproximadamente 1 mM de este elemento para un crecimiento óptimo, sin llegar a ser tóxico incluso a 150 mM. *Dunaliella* es capaz de acumularlo hasta valores del orden de 300 mM. El magnesio está presente en el agua del mar a una concentración próxima a 50 mM. Si el pH sube por encima de 9 puede precipitar como hidróxido de magnesio o carbonato de magnesio.

Otros nutrientes. *Dunaliella* necesita 1 mM de potasio para desarrollar un crecimiento óptimo, pero es capaz de acumularlo intracelularmente hasta una concentración de 200 mM. El agua de mar contiene K^+ a una concentración de 10 mM, y por tanto no es necesario añadirlo a los estanques de producción. El calcio se necesita a una concentración en el medio de cultivo de 0,1 mM (el agua de mar contiene 10 mM), sin embargo, cuando el pH es superior a 8, puede precipitar en forma de distintas sales. El medio de *Dunaliella*, normalmente contiene $FeCl_3$ en forma de complejo quelado con EDTA a una concentración de 1 mM, no habiéndose detectado síntomas de toxicidad a valores superiores a 50 mM. Por último, son esenciales cuatro micronutrientes: manganeso, cinc, cobalto y cobre a concentración micromolar (5, 1, 0,1 y 0,01, respectivamente). En cualquier medio de cultivo que contenga sal comercial o agua de mar, no es necesaria la adición de estos elementos, pues su contenido excede a los requerimientos del alga.

Vitaminas. no se requieren como suplemento exógeno para el crecimiento de *Dunaliella*.

pH. el pH del medio de cultivo afecta a muchos procesos asociados con el crecimiento del alga y su metabolismo, incluyendo la disponibilidad de CO₂ y de algunos iones. El pH óptimo para el crecimiento de *D. salina* es 7 tolerando, sin embargo, un amplio rango entre 5,5 y 10. El óptimo para la producción de β-caroteno es 9.

Temperatura. *Dunaliella* también muestra una amplia tolerancia a la temperatura. En el caso de *D. salina* es viable a -3°C y cesa su movilidad a -18°C (Post, 1977) permaneciendo fotosintéticamente activa por debajo de -8°C (Siegel y col., 1984). La temperatura óptima está comprendida entre 20° y 40°C. En general, las células adaptadas a alta salinidad son más resistentes a la temperatura, probablemente debido al efecto protector del glicerol sobre las proteínas celulares (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

COMPOSICIÓN CELULAR

Dunaliella tiene una composición celular aproximada de 50 - 60% proteínas, 30 - 40% carbohidratos y 6 - 8% grasas, aunque esta composición cambia con el medio y condiciones de cultivo. El contenido en proteínas es mayor en los primeros estadios del crecimiento, sin embargo, las células rojas, ricas en carotenoides, tienen sólo un 30% de proteínas, un 11% de carbohidratos y un 18% de lípidos (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Dunaliella spp. contiene además de clorofila *a* y *b* una amplia variedad de carotenoides y xantofilas: α -caroteno, β -caroteno, *cis*- γ -caroteno, luteína, anteraxantina, violaxantina, zeaxantina y neoxantina, siendo el β -caroteno y la luteína los más abundantes. El β -caroteno aparece como una mezcla de varios esteroisómeros: 10% de 15-*cis*- β -caroteno, 41% de 9-*cis*- β -caroteno, 42% de *todo-trans*- β -caroteno y un 6% de dos isómeros no identificados. La composición en esteroides es similar a la de otras algas y varía con el ciclo de crecimiento y la intensidad y calidad de la luz. Además de las altas concentraciones de pro vitamina A (β -caroteno), *Dunaliella* contiene tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, biotina y tocoferol, siendo alguna de estas vitaminas excretadas al medio (Carlucci y Bowes, 1970).

DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

El género *Dunaliella* está ampliamente distribuido y puede encontrarse tanto en aguas dulces como salobres e hipersalinas, incluso en suelos salinos. Las distintas especies de este género tienen una gran tolerancia a la sal y a la variación de pH, así como a otras condiciones ambientales. En general es un componente minoritario de la flora algal de aguas naturales con la excepción de las aguas hipersalinas, donde *Dunaliella* puede formar "blooms" que colorean las aguas de rojo.

A pesar de su amplia distribución, existe muy poca información sobre su ecología, probablemente por tratarse de un componente minoritario del fitoplancton. Las poblaciones naturales de *Dunaliella* muestran un comportamiento distinto según la estación del año. Así, en el Mar Muerto es especialmente abundante a mitad del verano, cuando la temperatura del agua está por encima de los 30°C. Además, las especies de *Dunaliella* no se reparten de forma homogénea en la columna de agua donde habitan: *D. salina* predomina en las capas más superficiales, mientras que *D. viridis* aparece en las zonas más profundas y en la superficie de los sedimentos. Sin embargo, esta distribución también varía con la salinidad del agua, *D. salina* migra al fondo con un 32% (p/v) de salinidad. Las poblaciones naturales también sufren migraciones en la horizontal de los lagos o superficies acuosas donde tienen su habitat, debido al viento. La alta salinidad de las aguas donde vive *D. salina* reduce extraordinariamente el número de predadores. A salinidades superiores al 25% el único predador es el protozoo *Bodo sp.*, y a salinidades entre el 20 y 25% el flagelado *Heteroamoeba sp.* y el ciliado *Cladotricha sigmoidea*. A menores salinidades aparecen otros muchos predadores incluyendo *Artemia salina* (Borowitzka y Borowitzka, 1988). A elevadas concentraciones de sal en aguas naturales, el principal factor limitante para el crecimiento de *Dunaliella* es la concentración de nutrientes y el aporte de CO₂. A menores concentraciones de sal en el medio de cultivo la limitación está impuesta por los predadores.

Este género es especialmente tolerante a metales pesados como cobre, plomo y derivados clorados, aunque se desconoce el mecanismo de esta tolerancia (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Dunaliella es capaz de sobrevivir cuando se seca su habitat, formando esporas de resistencia o permaneciendo en el agua de hidratación que rodea a los cristales de sal formados por la evaporación (Margulis y col., 1980).

TOLERANCIA A LA SAL

Dunaliella predomina en aguas saladas que contienen más de un 10% (2 M) de sal. Ejemplos típicos de este monocultivo de *Dunaliella* son el Mar Muerto en Israel (Nissenbaum, 1975), el Lago Rosa en Australia (Borowitzka, 1981) y el Gran Lago Salado en Utah, USA (Felix y Rushforth, 1979).

Este alga presenta una considerable capacidad de adaptación a distintas concentraciones de sal, creciendo en medios conteniendo desde 50 mM de NaCl (menos salinos que el agua de mar) hasta casi 5,5 M de NaCl (límite de saturación de esta sal), considerándose el organismo eucarionte conocido con mayor tolerancia a sal.

Aunque varía con las especies, el crecimiento es óptimo a concentraciones de NaCl próximas a 2 M (figura 14).

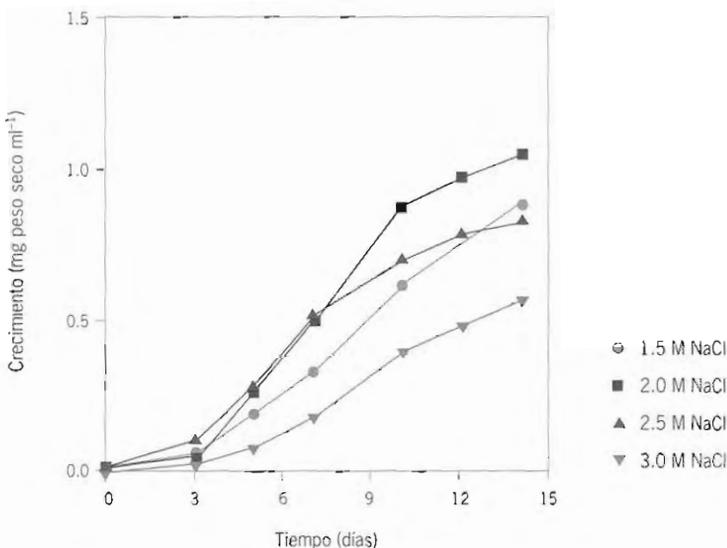


Fig. 14. Efecto de la concentración salina sobre el crecimiento de *D. salina* UTEX 2538.

El mecanismo por el cual un ser vivo se adapta a variaciones en la concentración de sal se denomina "osmorregulación". En *Dunaliella* la respuesta está relacionada con algunas características estructurales y mecanismos bioquímicos excepcionales que permiten su rápida adaptación. Entre ellos cabe destacar la síntesis y movilización de cantidades masivas de glicerol, un polialcohol muy soluble que causa menor inhibición de los procesos metabólicos que ningún otro soluto y que se emplea como elemento osmótico intracelular (Ben-Amotz y Avron, 1973), para la eliminación efectiva de iones Na^+ , para dar plasticidad a la membrana plasmática y para la síntesis de proteínas especiales asociadas con la incorporación de CO_2 y Fe.

Cuando el alga se expone a concentraciones de sal mayores o menores que su medio de cultivo habitual, responde rápidamente como un perfecto osmómetro, arrugándose o hinchándose.

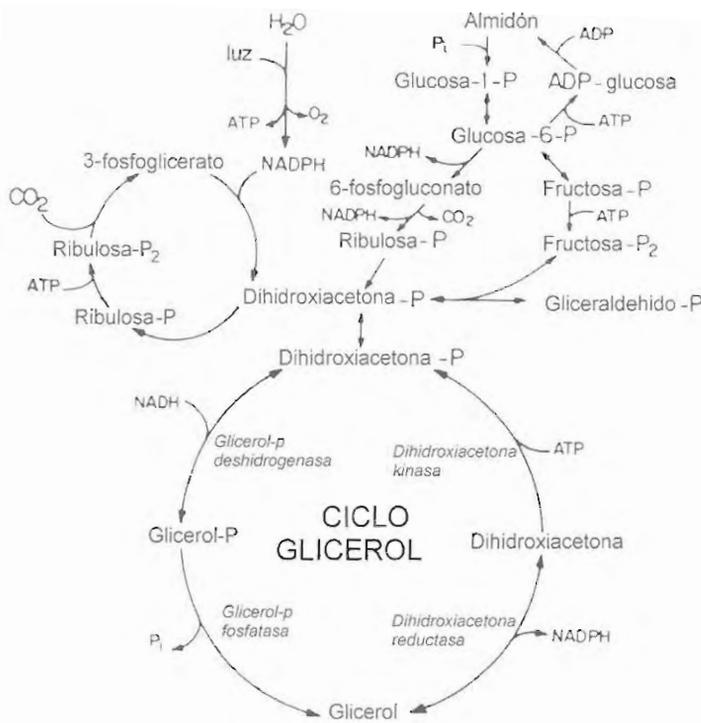


Fig. 15. Posible ruta de biosíntesis y degradación de glicerol a partir de almidón y CO_2 en respuesta a cambios osmóticos (Adaptado de Ben-Amotz y Avron, 1989).

A los pocos minutos de este rápido cambio de volumen, se inicia la síntesis o degradación de glicerol, que se prolonga durante unas pocas horas hasta que el volumen celular vuelve a su forma ovoide original (Ben-Amotz y Avron, 1973).

El alga responde a los cambios osmóticos regulando el flujo de carbono entre la síntesis de almidón en el cloroplasto y la producción de glicerol en el citoplasma. Este proceso no depende de la síntesis de novo de nuevas proteínas (Sadka y col., 1991) y tiene lugar tanto en luz como en oscuridad. Se ha propuesto un nuevo ciclo del glicerol para explicar la biosíntesis y eliminación de este compuesto (Figura 15).

De momento no se conocen los mecanismos de regulación de esta ruta, aunque se han planteado algunas hipótesis (Figura 16). Varios estudios indican que los esteroides de la membrana plasmática estarían implicados en esta respuesta inmediata (Zelazny y col., 1995) e implicarían a una proteína kinasa (Chitlaru y col., 1997).

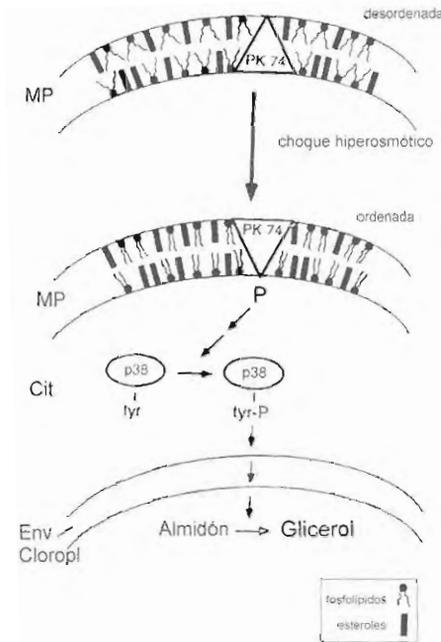


Fig. 16. Posible mecanismo de respuesta a cambio osmótico y transducción de señales en *Dunaliella*. MP: membrana plasmática, Cit: citoplasma, PK 74: proteína kinasa activada osmóticamente, p38: fosfoproteína de 38 kDa. El choque osmótico provocaría cambios estructurales y de permeabilidad en la membrana plasmática, se activaría una proteína kinasa de 74 kDa que fosforilaría a un polipéptido de 38 kDa dando la señal para la síntesis de glicerol en respuesta al cambio osmótico. (Adaptado de Pick, 1998)

La regulación de la síntesis de glicerol parece estar alterada bajo distintas condiciones de estrés, ya que a altas intensidades de luz también tiene lugar la masiva formación de este alcohol estando también en este caso implicados los esteroides de la membrana (Zelazny y col., 1995).

Dunaliella no puede sobrevivir en completa ausencia de Na^+ , necesitando entre 10 y 100 mM para crecer, dependiendo de la especie. Tiene la capacidad de mantener bajas concentraciones de sodio citoplasmáticas incluso en medios que contengan NaCl a concentración molar (Pick y col., 1986). Esto sólo se puede explicar si *Dunaliella* posee unos mecanismos eficientes para la regulación y eliminación de Na^+ . Se ha propuesto que la entrada de sodio está mediada por un antiporte Na^+/H^+ , mientras que la eliminación de Na^+ implica a una Na^+ -ATPasa (Pick, 1992).

Estudios más recientes parecen demostrar la implicación de algunas proteínas en el proceso de osmorregulación. Así, se han detectado al menos 5 proteínas capaces de unir GTP (guanidina trifosfato) que cambian su ubicación dentro de la célula en respuesta a cambios en la concentración de NaCl, sugiriendo su implicación en los cambios de volumen osmorreguladores en *Dunaliella* (Memon y col., 1993). Tres de estas proteínas se han identificado como polipéptidos de la membrana plasmática, que incrementan sus niveles en respuesta al aumento en la concentración de sal. Las otras dos son enzimas implicadas en la elongación de los ácidos grasos y en la glicosilación de proteínas.

Existe también una proteína de 60 kD ubicada en la membrana plasmática cuyo nivel aumenta considerablemente con el incremento de la salinidad. Se trata de una anhidrasa carbónica duplicada internamente que presenta un exceso de residuos ácidos y que se regula transcripcionalmente por la disponibilidad de CO_2 (Fisher y col., 1996). Se induce a pH alcalino, ausencia de CO_2 o alta concentración de sal.

Por último, se ha identificado una proteína de membrana de 150 kD cuyos niveles se incrementan en respuesta a altas concentraciones de sal (Sadka y col., 1991). Parece tratarse de una transferrina con algunas características especiales, como son una triple repetición interna, exceso de aminoácidos ácidos, bajo punto isoeléctrico y la sustitución de los dos aminoácidos que normalmente actúan uniendo el hierro, aspártico e histidina, por asparagina. Esta proteína parece estar implicada en la incorporación de hierro a la célula a altas concentraciones de sal (Fisher, 1998).

La cualidad más notable de las proteínas de 60 y 150 kD es que mantienen su actividad a altas concentraciones de NaCl en las que prolifera *Dunaliella*. Esta plasticidad es inusual entre las proteínas conocidas y podría deberse a las repeticiones internas y al exceso de cargas negativas que caracterizan a estas dos proteínas (Pick, 1998).

La respuesta de las células de *Dunaliella salina* a las distintas situaciones de estrés implica un aumento en el metabolismo del ácido abscísico. Esta observación llevó a Cowan y colaboradores (1992) a proponer la siguiente secuencia de respuestas:

Cambio de volumen / alteración de la membrana plasmática → cambios de pH / redistribución de ABA → inhibición de H⁺-ATPasa → apertura de los canales de Ca²⁺ / entrada de Ca²⁺ / elevación del Ca²⁺ citosólico → incremento de los niveles de ABA → efectos sobre el metabolismo (activación de enzimas).

Cuando el alga se cultiva en medios con distintas concentraciones de sal se observa que la concentración intracelular de glicerol es proporcional a la concentración de sal en el medio de cultivo (Ben-Amotz y Avron, 1980).

En cultivos abiertos en el exterior, la producción de glicerol está limitada por la radiación solar disponible y por la capacidad de crecimiento del alga. Así, la productividad es máxima en verano (8 g de glicerol m⁻² día⁻¹), pudiéndose duplicar estos valores si se consiguen las condiciones óptimas de cultivo (Ben-Amotz y Avron, 1980). En la actualidad, el glicerol se produce mayoritariamente a partir de derivados petroquímicos. Su precio en el mercado es de 5 \$ el kg, aunque está sujeto a las fluctuaciones en el precio del crudo. La mayor parte de este glicerol se emplea en cosmética (19%), tabaco (12%), alimentos y bebidas (10%), celofán (10%), poliuretano (7%), explosivos (4%) y otros. Hasta la fecha no se ha intentado su producción comercial a partir de cultivos de *Dunaliella*.

INDUCCIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE β -CAROTENO

Además de glicerol, el cultivo de *Dunaliella* rinde otros compuestos de interés entre los que se puede destacar β -caroteno y un residuo que contiene un 40 - 50% de proteína con una composición en aminoácidos semejante a la harina de soja y que podría aprovecharse como alimento para crustáceos, aves y peces pero que, de momento, sólo se está empleando con éxito a nivel experimental por el escaso valor económico del producto (0,3 \$ kg⁻¹). *Dunaliella* también acumula algunos carbohidratos, que aumentan progresivamente con el envejecimiento del cultivo, hasta alcanzar valores de 0,22 mg g⁻¹ de células al cabo de 20 días de cultivo, con un contenido energético comparable al del petróleo (Park y col., 1998). El rendimiento obtenido en cultivos en estanques abiertos es de unos 20 g de alga seca m⁻² día⁻¹ conteniendo 8 g de glicerol, 11 g de residuo rico en proteína y 400 mg de β -caroteno, siendo la producción del pigmento el verdadero propósito del cultivo masivo de esta alga en plantas comerciales.

De las muchas especies conocidas de *Dunaliella*, sólo dos producen y acumulan grandes cantidades de β -caroteno: *Dunaliella salina* Teod., (aunque no todas las cepas poseen esta capacidad) y *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz y Shaish, 1992), aunque, como ya se ha comentado, otros autores las consideran una única especie. El volumen celular de estas dos especies es mayor que el de las demás estirpes de *Dunaliella*, siendo del orden de 300 - 1000 μm^3 . En condiciones ambientales desfavorables se transforman en una gran esfera rojiza de 2000 μm^3 que además suele perder los flagelos. La diferencia entre las dos posibles especies reside en la presencia y número de manchas oculares y glóbulos lipídicos. *D. salina* Teod. carece de mancha ocular en el extremo exterior del cloroplasto, mientras que *D. bardawil* tiene algunas manchas en la parte anterior del citoplasma, próximo a la parte basal del flagelo (Preisig, 1992).

Las poblaciones naturales de *Dunaliella* se concentran en la superficie de distintos nichos ecológicos (lagos hipersalinos, salinas, marismas, etc. conteniendo más de un 10% de sal) debido a movimiento fototáctico, dando lugar a una película de color rojo-anaranjado típico. En general, estos ambientes tienen además una baja disponibilidad de nitrógeno y están expuestos a altas irradiancias. Este color procede de la masiva acumulación de β -caroteno en el espacio intratrilacoidal en respuesta a estas condiciones ambientales.

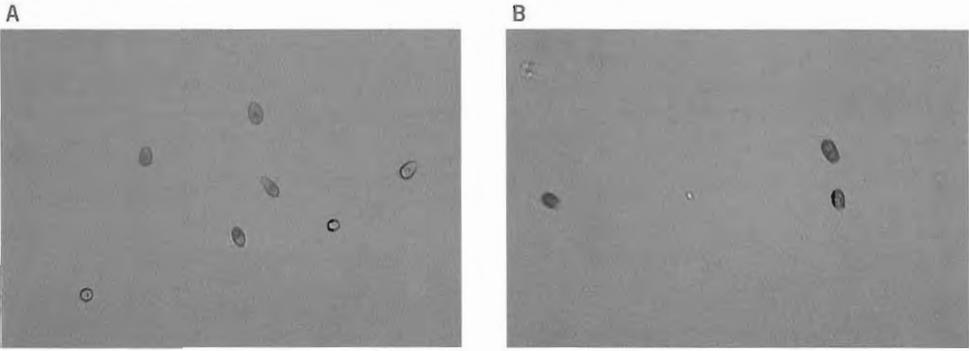


Fig. 17. Fotografías al microscopio óptico de *Dunaliella salina*. A) cultivada en condiciones idóneas (células verdes); B) cultivada en condiciones que promueven la síntesis de β -caroteno (células rojas).

La figura 18 ilustra el espectro de absorción de células enteras (*in vivo*) y extractos celulares (*in vitro*) en acetona al 80%, de una cepa de *Dunaliella salina* cultivada en condiciones idóneas (células verdes) o bajo condiciones que estimulan la síntesis de β -caroteno (células rojas).

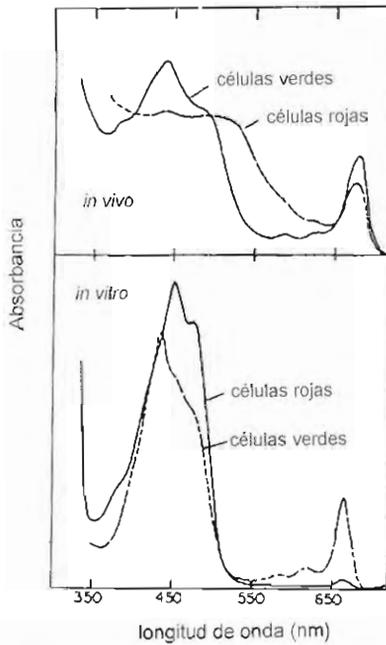


Fig. 18. Espectro de absorción de células intactas (*in vivo*) y extractos celulares en acetona al 80% (*in vitro*) de *Dunaliella salina*.

En un extracto celular de *Dunaliella* analizado mediante HPLC, se puede observar que el pigmento mayoritario es el β -caroteno, además de otros oxicarotenoides y clorofilas a y b, siendo esta composición semejante a la presentada por la mayoría de las algas verdes. El hecho de que este β -caroteno natural contenga una mezcla de los dos isómeros *todo trans* y *9-cis*, responsables de las propiedades terapéuticas descritas para este alga, y de las que se comentará más adelante, es especialmente interesante.

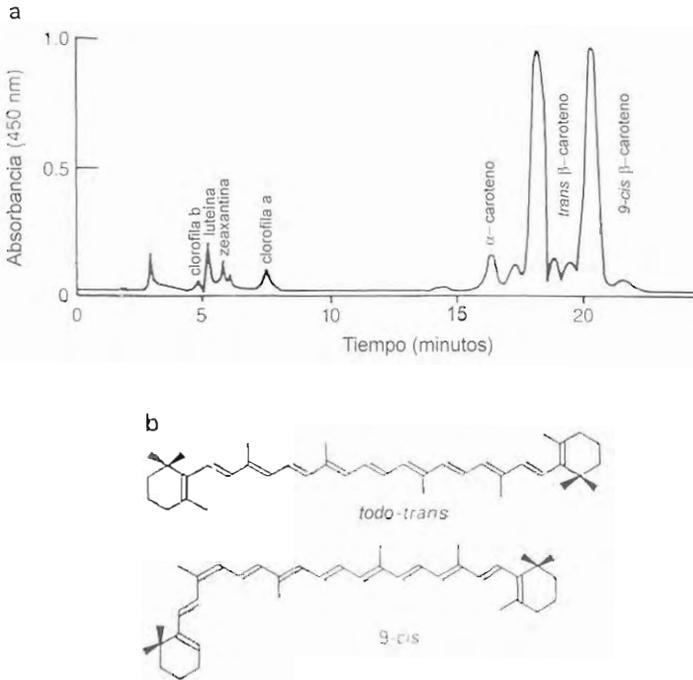


Fig. 19. a) Separación mediante HPLC de un extracto de pigmentos totales de *Dunaliella salina* conteniendo altos niveles de β -caroteno. b) Formas isoméricas del β -caroteno.

Como se ha mencionado anteriormente, en condiciones de estrés ambiental, el contenido en β -caroteno se incrementa hasta superar el 12% del peso seco del alga, lo que va normalmente asociado a un marcado descenso en el contenido en clorofilas. El análisis de β -caroteno revela la presencia mayoritaria de dos isómeros, *todo-trans* y *9-cis*, en cantidades casi equimoleculares y una pequeña proporción de otros estereoisómeros *mono-cis* y *di-cis*. La cantidad de β -caroteno que se acumula, así como la proporción de los dos isómeros mayoritarios, depende de la cantidad de luz que el alga recibe en un ciclo celular (Ben-Amotz y Avron, 1983) y de la calidad de la misma (Sánchez-Saavedra y col., 1996). Cuando la intensidad de luz es máxima y la tasa de crecimiento es mínima, aumenta la proporción del isómero *9-cis* (Ben-Amotz y Avron, 1990). Cualquier situación de estrés que disminuya la tasa de división celular, como alta salinidad, baja

temperatura, pH extremo, deficiencia en nutrientes, concentraciones sub-letales de Cu y Pb, etc., tiende a aumentar la producción de β -caroteno (Ben-Amotz y Avron, 1990). En ausencia de N y baja temperatura de cultivo, la inducción es máxima y rápida. Considerando que la falta de nitrógeno inhibe la producción de clorofila como parte de su efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de proteínas, el mantenimiento de una biosíntesis activa de carotenoides protege a las células con poca clorofila de los daños letales de la luz. La baja temperatura estimula la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (Mendoza y col., 1996) y de 9-*cis* β -caroteno. Las propiedades físico-químicas de la forma 9-*cis* β -caroteno difieren de las de la forma *todo-trans* β -caroteno. Este último es prácticamente insoluble en aceite y cristaliza con facilidad a baja temperatura, mientras que el 9-*cis* β -caroteno es mucho más soluble en solventes lipofílicos y cristaliza con mucha dificultad. Por tanto, para poder sobrevivir a bajas temperaturas, *Dunaliella* produce mayores cantidades de la forma *cis* que actúan *in vivo* como un solvente oleoso que previene la cristalización de la forma *trans* (Ben-Amotz, 1996).

Aunque el β -caroteno se acumula muy rápidamente cuando las células se encuentran en situaciones sub-óptimas, no ocurre igual a la inversa. Cuando células ricas en carotenoides se transfieren desde un medio con alta salinidad a un medio con salinidad normal, el contenido en β -caroteno desciende de modo gradual, a diferencia de lo que ocurre con *Haematococcus pluvialis* (Borowitzka y col., 1984).

La biosíntesis de carotenoides en *Dunaliella* sigue la misma ruta, con los mismos sustratos e intermediarios que en otros organismos eucarióticos y plantas. El ácido mevalónico, a través de isopentenil difosfato, geranil difosfato y geranilgeranildifosfato, forma fitoeno que, tras algunos pasos de desaturación y ciclación, da lugar a β -caroteno (Goodwin, 1988). Aún no se han identificado las reacciones de isomerización que dan lugar a la forma 9-*cis*. También se desconocen las enzimas o complejos enzimáticos responsables de la masiva acumulación de β -caroteno en *Dunaliella*. Hasta el momento se han identificado 3 genes asociados a esta acumulación, regulados de manera coordinada en respuesta a altas intensidades de luz: fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa y la proteína asociada a los glóbulos de β -caroteno (Katz y col., 1995; Pick, 1998).

La alta irradiancia induce cambios notables en el sistema fotosintético, tales como un descenso en el contenido de clorofila, una reducción de tamaño celular y cambios en la composición de pigmentos del sistema antena. Del mismo modo también se produce un incremento en la proporción entre centros de reacción del fotosistema II y elementos captadores de luz (Harrison y col., 1992). También se ha identificado un gen activado transcripcionalmente por alta luz (*cbr*), que está estrechamente relacionado con las proteínas inducidas por luz de forma inmediata (*elip*). El producto de este gen se localiza en los complejos II (Levy y col., 1992). Se trata de una proteína asociada a zeaxantina y que también se induce a baja temperatura (Król y col., 1997). Por último, la alta irradiancia provoca la conversión de violaxantina a zeaxantina, lo que presumiblemente funciona como mecanismo para disipar el exceso de energía radiante (Gilmore y Yamamoto, 1993). Todos estos cambios revierten a baja intensidad de luz.

La siguiente figura recoge un esquema del posible mecanismo de respuesta de la célula a la alta irradiancia.

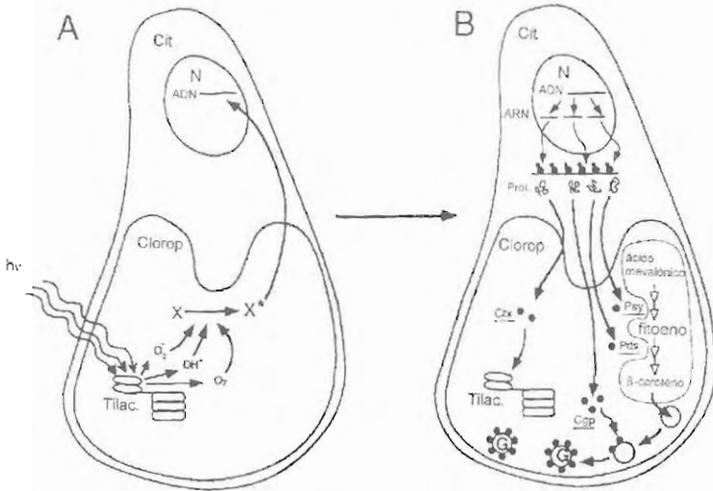


Fig. 20. Mecanismo propuesto de respuesta carotenogénica en *Dunaliella salina*. A: estado de activación, B: estado de respuesta carotenogénica. Cit: citoplasma, G: glóbulos de β -caroteno, X: posible elemento de respuesta, Cbr: proteína relacionada con la biosíntesis de caroteno, Cgp: proteína de los glóbulos de β -caroteno, Psy: fitoeno sintasa, Pds: fitoeno desaturasa, Prot: proteínas (adaptado de Pick, 1998).

El estudio con mutantes sobreproductores de β -caroteno (Shaish y col., 1991) indica que las distintas respuestas de *Dunaliella* a alta intensidad de luz deben estar reguladas de forma coordinada: estos mutantes reaccionan en exceso al estrés por luz, mostrando una respuesta fotoinhibidora incluso a baja irradiancia. Además, acumulan grandes cantidades de β -caroteno, convierten violaxantina en zeaxantina y expresan los genes que responden a alta luz (cgp y cbr) (Levy col., 1993). Por tanto existen varias respuestas a la alta irradiancia que deben estar controladas por elementos reguladores comunes y que están modificadas en estos mutantes (Pick, 1998).

Como ya se ha mencionado, el β -caroteno producido de forma masiva se acumula en el espacio intratilacoidal, en glóbulos lipídicos de pequeño tamaño (100-200 nm), probablemente, para conseguir una distribución más homogénea sin romper la delicada estructura del cloroplasto. Son estables en solución acuosa y contienen exclusivamente β -caroteno, lípidos neutros y una pequeña cantidad de proteína, la ya mencionada cgp, localizada en la periferia del glóbulo dando estabilidad estructural y evitando su coalescencia (Katz y col., 1995).

La formación de estas estructuras para almacenar β -caroteno y la biosíntesis del pigmento, son procesos interdependientes, ya que si se bloquea la síntesis de triacilglicerol también se inhibe la sobreproducción de β -caroteno. Además, cuando se está sintetizando el pigmento de forma masiva, la actividad acetil CoA carboxilasa (enzima reguladora de la biosíntesis de lípidos) está muy incrementada (Rabbani y col., 1998).

Se han propuesto algunas hipótesis para explicar el papel de los glóbulos de β -caroteno. Una sugiere que la acumulación del pigmento está relacionada con un posible efecto protector frente a la producción de oxígeno singlete generado por la clorofila a altas irradiancias. Sin embargo, la microscopía electrónica ha revelado que la acumulación masiva de β -caroteno se localiza en el espacio intratilacoidal. La gran distancia entre los glóbulos y la clorofila, localizada en los tilacoides, no permitiría una retirada eficiente del oxígeno singlete ni de ningún otro producto generado por la clorofila. Otra hipótesis presenta a los glóbulos de β -caroteno como un almacén de esqueletos carbonados utilizable bajo condiciones limitantes del crecimiento (Borowitzka y Borowitzka, 1988), pero se ha demostrado que *Dunaliella* no puede utilizar o metabolizar el β -caroteno en oscuridad o en condiciones de deficiencia de CO_2 . La hipótesis más aceptada en la actualidad es la que sugiere que los glóbulos de β -caroteno protegen a la célula frente a los daños provocados por radiaciones de alta intensidad, en condiciones de crecimiento limitadas, actuando como una pantalla que absorbe el exceso de radiación. El efecto dañino de la región azul del espectro electromagnético está apantallado por los glóbulos periféricos, previniendo cualquier daño celular. Esta hipótesis se apoya en dos evidencias: las estirpes de *Dunaliella* o de otras algas incapaces de acumular β -caroteno mueren cuando se exponen a altos niveles de radiación y, además, la protección frente a la fotoinhibición sólo se observa cuando la luz está compuesta por longitudes de onda que son absorbidas por el β -caroteno, es decir, la luz azul, y no existe fotoprotección cuando el agente fotoinhibidor es la luz roja (Phillips y col., 1995). Se ha demostrado la existencia de una secuencia de eventos que conducen a la fotodestrucción de clorofila en *Dunaliella*. Primero se destruye el 9-cis β -caroteno, después el *todo-trans*- β -caroteno y por último las clorofilas, indicando la mayor sensibilidad del 9-cis β -caroteno a los altos niveles de radiación directamente o a los daños causados por los radicales libres generados por la absorción de esta radiación (Ben-Amotz y Avron, 1989a). Al menos en condiciones experimentales, las especies activas de O_2 generadas artificialmente por agentes químicos son capaces de inducir *in vitro* la biosíntesis de β -caroteno en *Dunaliella* (Jiménez y Pick, 1993). Queda aún por demostrar si esto ocurre de forma natural.

**BIOTECNOLOGÍA
DEL CULTIVO MASIVO DE
*Dunaliella salina***

INTRODUCCIÓN

El concepto de producción de un nuevo compuesto con interés biotecnológico proviene de la conjunción de varios aspectos: científico, información de mercado potencial, información sobre procesos y maquinaria necesaria para su desarrollo, así como disponibilidad de capital para su financiación. En el caso de la producción de β -caroteno a partir de *Dunaliella*, esta conjunción ocurrió de manera independiente en Australia, Israel y Estados Unidos al final de los años 70 y principios de los 80 y se asentaba en los trabajos descritos en la literatura durante los años 60 en Rusia y Ucrania (Massyuk, 1973; Massyuk y Abdula, 1969), en los que se describía a *Dunaliella* como uno de los organismos más adecuados para el cultivo masivo en estanques abiertos al exterior. Su capacidad para prosperar en medios con altas concentraciones de sodio, magnesio, calcio y sus respectivos aniones, cloruro y sulfato, en zonas desérticas con alta irradiancia solar, en aguas salobres y temperaturas extremas (-5 a más de 40°C), hacían a este alga la más atractiva para los estudiosos de la biotecnología y para capitalistas aventureros.

Las investigaciones sobre *Dunaliella* se incrementaron durante los años 70, centrándose especialmente en la osmorregulación y en la fisiología de la fotosíntesis. A final de los años 70 los grupos de investigación de Israel y Australia, conscientes del potencial comercial del β -caroteno, obtuvieron apoyo financiero para llevar a cabo los primeros estudios en condiciones controladas al exterior (Ben-Amotz y Avron, 1980; Borowitzka y col., 1984). Desde los años 80, varias compañías, autoridades gubernamentales e industrias han invertido grandes capitales en la producción de β -caroteno natural a partir de *Dunaliella*.

En Australia, Lesley Borowitzka, al frente del grupo de investigación del "Roche's Algal Biotechnology", estableció las condiciones óptimas de cultivo para la producción de biomasa y β -caroteno a escala de laboratorio. Los primeros experimentos en tanques abiertos se realizaron en un invernadero construido en la azotea del edificio de la compañía Roche en Sidney, en una instalación constituida por estanques de fibra plástica de 200 l calentados a 25-30°C, que utilizaba medio de cultivo mineral y cultivos axénicos procedentes de laboratorio, aislados originalmente de lagos salados de Australia. El principal problema de estos cultivos era la contaminación por otros organismos. Los estudios continuados en este sistema desembocaron en la actual planta industrial del lago Hutt.

Hasta el momento se han desarrollado cuatro métodos para la producción a gran escala de *Dunaliella*. En el primero, denominado cultivo extensivo, no se utiliza agitación y el control del ambiente es mínimo. Para disminuir el ataque de depredadores (ciliados, amebas, artemias, etc.) se emplean concentraciones de sal muy elevadas. En estas condiciones el alga crece muy lentamente. La productividad de este tipo de cultivo es baja y se necesitan amplias extensiones para su explotación comercial, si bien los costes de operación son muy bajos. Esto ha permitido el desarrollo de dos plantas comerciales en Australia y China. El segundo método de producción de *Dunaliella* es el denominado cultivo intensivo, en el que se intenta controlar todos los factores del crecimiento celular. Los estanques son normalmente rectangulares, alineados formando canales de tamaño variable, con un área superficial de 3000 m², como es el caso de las plantas industriales de Israel, USA, China, Chile y Portugal, donde normalmente se utiliza para la agitación una rueda de paletas girando a baja velocidad. En este tipo de cultivo se obtienen unos 200 mg de β-caroteno m⁻² día⁻¹ como promedio a lo largo del año. Si se considera una planta moderna de unos 50.000 m², la producción sería de 10 kg de β-caroteno al día. Entre estos dos sistemas de cultivo, existe un tercer tipo denominado semi-intensivo, desarrollado en Australia y China, donde se ha incrementado la longitud de los estanques en 10 veces, no hay sistema de agitación y el control sobre el sistema es sólo parcial. El cuarto tipo de cultivo es altamente intensivo y se desarrolla en fotobiorreactores cerrados. Este sistema ha merecido una especial consideración en la última década, a fin de conseguir un diseño para la obtención de β-caroteno aprovechando al máximo la luz incidente, aunque se encuentra aun en fase experimental en pequeñas plantas piloto.

En este capítulo examinaremos los estudios realizados por nosotros para definir el diseño de dos sistemas (intensivo y fotobiorreactor) para el cultivo de *Dunaliella* a escala experimental, con el objetivo de producir competitivamente β-caroteno natural en nuestra Comunidad Autónoma.

En principio, se han de tener en cuenta una serie de factores, algunos de los cuales son difíciles de controlar cuando se trata de cultivos a la intemperie, y otros son simplemente desconocidos:

1. Condiciones climatológicas locales, incluyendo variaciones geográficas y estacionales relacionadas con la iluminación, temperatura, precipitaciones, evaporación, humedad relativa y otros.
2. Requerimientos nutritivos para producir la biomasa adecuada y el producto de interés.
3. Propiedades físicas del área seleccionada, incluyendo tipo de suelo, pendientes, drenajes, cantidad y calidad del agua disponible, etc.

4. Requerimientos específicos del cultivo, tales como: selección de estirpes altamente productivas, diseño y construcción del sistema, agitación, profundidad, aporte de CO₂ y control de pH, contaminantes, etc.
5. Recogida de la biomasa y preparación del β-caroteno para su comercialización.
6. Estudio económico y mercado potencial.

Aunque todos los factores mencionados se encuentran interrelacionados, analizaremos de manera independiente el efecto de cada uno de ellos en el diseño final de la planta para la producción de β-caroteno.

FACTORES CLIMÁTICOS

El clima juega un papel fundamental en el emplazamiento de las instalaciones de cultivo al aire libre y en el diseño de su tecnología. Si no se parte de un intervalo apropiado de temperatura y suficiente radiación solar, el cultivo masivo a la intemperie de cualquier organismo fotosintético no es rentable. La iluminación o calentamiento de estos cultivos de forma artificial sólo podría justificarse si el producto a obtener alcanza un elevadísimo precio en el mercado o se puede disponer de una fuente de calor a bajo costo, como es el caso de aguas geotermales (Bedell, 1986).

De manera ideal, los cultivos a gran escala deberían situarse donde las condiciones de luz y temperatura permitiesen el crecimiento durante la mayor parte del año. Ningún emplazamiento puede considerarse perfecto. Así, aunque los trópicos serían los lugares ideales por la estabilidad de su temperatura, tienen una nubosidad casi permanente que disminuye considerablemente la luz disponible. Además, las altas temperaturas nocturnas provocan una considerable pérdida de biomasa a través de los procesos de respiración. Atendiendo a estas consideraciones, las regiones desérticas templadas, con nubosidad mínima y diferencias térmicas apreciables entre el día y la noche, serían las más idóneas. Sin embargo, de nuevo, estas zonas desérticas presentan otra dificultad, el alto grado de evaporación en grandes superficies abiertas, que implica la necesidad de una fuente de agua abundante y barata en las proximidades (Oswald, 1988 b).

El viento es un factor importante a la hora de seleccionar la ubicación de la instalación, ya que promueve la agitación superficial, el enfriamiento y la evaporación. Además, según su intensidad, puede provocar daños en las instalaciones y contaminar los cultivos al arrastrar partículas en suspensión (polen, bacterias, arena, etc.). Otros factores a considerar son: la humedad relativa, que influye considerablemente en la temperatura de los cultivos y no debería ser inferior al 50 - 60% , así como el régimen pluviométrico, ya que un exceso de lluvia puede diluir severamente los cultivos con pérdida de nutrientes (Oswald, 1988 b).

La situación geográfica de Andalucía, con un clima de carácter mediterráneo, con temperaturas medias altas, veranos calurosos, escasa pluviosidad, especialmente en la estación veraniega, e inviernos suaves, convierten a esta región en la más cálida de la Península Ibérica y una zona de interés para el cultivo de microalgas. El carácter continental de parte del territorio se contrapone a una zona periférica abierta a las influencias directas del Atlántico y del Mediterráneo. Esta continentalidad se refleja en

las temperaturas, ya que según nos alejamos de la costa la amplitud media anual va aumentando, en líneas generales, en el eje SO-NE, con diferencias debidas a la proximidad del mar y a la altitud. Las temperaturas medias anuales más bajas aparecen en las áreas más interiores, como resultado de una estación invernal acusada. Como regla general, las temperaturas tienden a aumentar de norte a sur y de oeste a este, con grandes diferencias debido a razones orográficas, siendo Granada y Málaga las capitales más fría y cálida, respectivamente, aunque el litoral granadino comparta las favorables condiciones de la costa mediterránea. En general, son las zonas costeras las que gozan de un régimen térmico más cálido y, también, más uniforme.

Las máximas diferencias entre temperatura mínima y máxima, en general, oscilan entre 12 y 16°C, tolerable habitualmente para el cultivo de microalgas, si bien esta variación afecta a ciertos procesos metabólicos esenciales que condicionan la productividad de estos cultivos. Para definir el enclave definitivo de la planta de producción se debe conocer el perfil de variación de temperaturas y compararse con la temperatura de crecimiento de esta especie, asegurándose que no sobrepasa sus límites letales o de producción adecuada. El número de meses en que la temperatura se mantiene igual o próxima a la temperatura óptima de crecimiento deberá ser máximo, para garantizar una alta productividad.

Como ya se ha mencionado, la energía solar disponible es fundamental en los cultivos de microalgas, dado que su productividad tienen una relación casi lineal con la irradiancia, siempre que se descarten los valores muy altos, que disminuyen el rendimiento de los mismos. Aparte de ello, la insolación es clave en el cultivo de *Dunaliella* por el control que ejerce sobre la inducción y acumulación de β -caroteno. En los anuarios de energía solar se recogen valores de energía solar total en las distintas zonas andaluzas, con un cierto valor estimativo para valorar la productividad potencial de los cultivos. Sin embargo, a efectos de conocer en detalle dichos valores y sus variaciones diarias y mensuales son necesarios los datos locales. De acuerdo a los mismos, Andalucía se caracteriza por unas 3.100 horas de sol al año, pudiendo alcanzarse en la costa gaditana unas 3.200 horas de insolación al año. La insolación total supone una energía media de unos 1.700 $\text{kw m}^{-2} \text{año}^{-1}$. En general, puede decirse que la energía radiante media anual aumenta de norte a sur y de este a oeste, variando desde unos 1.600 $\text{kw m}^{-2} \text{año}^{-1}$, en las zonas más septentrionales, hasta cerca de unos 1.800 $\text{kw m}^{-2} \text{año}^{-1}$, que alcanza en la franja occidental de la costa onubense.

Las condiciones ambientales en muchas áreas de Andalucía, con altas tasas de irradiancia solar y elevado número de horas de sol, así como otras circunstancias climáticas –régimen térmico idóneo, precipitaciones reducidas, incluso con zonas semi-áridas adecuadas a este fin–, dan a nuestra región la posibilidad de establecer cultivos de microalgas como sistemas de producción innovadores y de significado futuro.

Inicialmente se eligió el Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas de "Agua del Pino" sito en el término municipal de Cartaya (Huelva), próximo a la costa, para la instalación de una planta experimental para llevar a cabo los primeros estudios sobre cultivo masivo de *Dunaliella* (Figura 21).

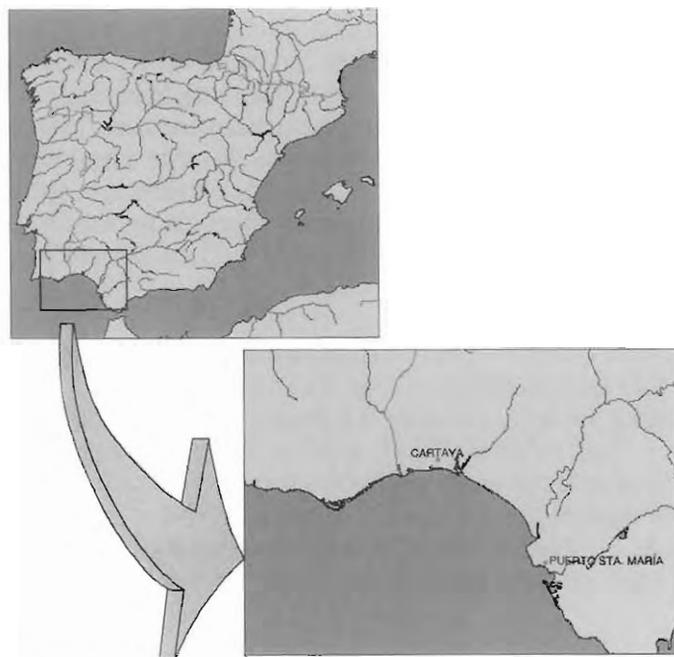


Fig. 21. Mapa del emplazamiento de los CICEMs. Nuestra primera planta experimental estaba instalada en el CICEM de "Agua del Pino". Cartaya.

Las variables climatológicas registradas en esta zona, como promedio de los años 1994 a 1998 se recogen en la siguiente tabla:

	Tª MÁX.	Tª MÍN.	Tª MED.	HUMEDAD	LLUVIA	VIENTO	HORAS SOL	RADIACIÓN P.A.R.*
	°C	°C	°C	%	l m ⁻²	km h ⁻¹	h	μE m ⁻² s ⁻¹
ENERO	17,2	8,2	12,7	89,7	198,8	8,4	106,7	505,8
FEBRERO	17,9	8,1	13,0	90,0	41,4	6,5	186,7	733,4
MARZO	21,1	9,1	15,1	87,9	19,2	7,1	248,0	1064,2
ABRIL	22,5	11,1	16,8	91,1	62,4	7,8	251,0	1320,0
MAYO	23,9	13,5	18,7	86,9	46,6	9,2	270,0	1532,9
JUNIO	27,3	16,2	21,7	89,3	37,6	8,9	334,5	1671,7
JULIO	30,7	18,9	24,8	85,6	4,6	8,7	343,0	1662,7
AGOSTO	29,9	18,7	24,2	88,4	0,0	8,4	349,0	1571,7
SEPTIEMBRE	27,5	16,1	21,8	88,1	31,2	7,8	244,5	1249,9
OCTUBRE	25,3	15,0	20,1	91,9	86,9	5,7	247,0	937,7
NOVIEMBRE	21,5	12,5	17,0	92,4	168,7	7,5	194,0	608,3
DICIEMBRE	18,0	10,2	14,1	92,8	290,3	7,2	131,0	526,9

*RADIACION P.A.R.= radiación activa para fotosíntesis.

Como ya se ha mencionado, *Dunaliella*, es capaz de sobrevivir tanto a temperaturas de congelación como de 45°C, teniendo su óptimo de crecimiento a 32°C en condiciones controladas de laboratorio y manteniendo un crecimiento adecuado entre 20° y 35°C. Como se observa en la tabla, en la zona seleccionada se registraban estas temperaturas durante buena parte del año. Otro hecho importante a considerar en el cultivo a la intemperie de *Dunaliella* es que el glicerol se libera al medio al aumentar la temperatura. Este glicerol puede servir como fuente de carbono orgánico a bacterias y hongos que contaminan habitualmente los cultivos de *Dunaliella* cuando la temperatura excede de 36°C (Wegmann y col., 1980). Las máximas temperaturas registradas en esta zona estaban por debajo de este valor.

Respecto a los demás factores climáticos, las lluvias en esta región son más bien escasas, reduciéndose los riesgos de dilución de los cultivos; la velocidad del viento también es baja, lo que reduce la evaporación de los cultivos y los riesgos de contaminación; por último, el número de horas de sol y la intensidad de esta radiación son elevados, asegurando el buen crecimiento autotrófico de estos cultivos.

La mayoría de las actuales plantas de producción de *Dunaliella* están localizadas cerca de fuentes disponibles de agua salada, en áreas templadas y soleadas, donde la tasa de evaporación es elevada y el terreno no tiene un uso agrícola. Amplias zonas del litoral de nuestra comunidad reúnen "a priori" todos los requisitos climáticos para el cultivo a la intemperie de *Dunaliella*.

REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS

Es evidente que un medio nutritivo que contenga todas las sales puras y en las concentraciones exactas para el crecimiento óptimo del alga, aseguraría productividades máximas. Pero tratándose de explotaciones comerciales hay que tener en cuenta el elevado costo que esto supone. Salvo en casos muy concretos, en que el valor del producto a obtener sea muy elevado, no se justifica el empleo de estos medios artificiales. Por esta razón se tiende a utilizar agua enriquecida con fertilizantes agrícolas (de muy bajo costo), aunque esta alternativa pueda ser contraproducente, ya que muchos de estos fertilizantes contienen metales pesados y otros productos tóxicos en concentraciones superiores a las que soporta el alga, limitando su crecimiento y alterando la calidad del producto a obtener. Por ello, son imprescindibles ensayos previos y un seguimiento continuo de la calidad del medio de cultivo, para asegurar que se encuentra libre de productos tóxicos tanto para el alga como para el consumo humano.

El control continuo del medio asegura, además, que ninguno de los nutrientes esté por debajo de los mínimos necesarios, especialmente cuando se trata de cultivos continuos, donde a la vez que se retira biomasa se están eliminando elementos nutritivos. Además algunos minerales precipitan con el tiempo. Este control es especialmente importante para los nutrientes principales, N, C y P.

Atendiendo a criterios económicos, algunos autores sugieren que la concentración de los nutrientes debe mantenerse en sus valores mínimos, ya que de esta manera disminuyen las pérdidas debidas a precipitación y volatilización, reduciéndose además, el precio del medio de cultivo (Richmond, 1986a). La utilización de los nutrientes a tan bajas concentraciones requiere una gran atención para asegurar que sus niveles no disminuyan por debajo de las concentraciones que limitan el crecimiento.

Podemos concluir que la correcta selección del medio de cultivo es clave en la producción a gran escala de cualquier microalga, ya que su costo puede ser uno de los factores determinantes de la viabilidad económica de estas plantas de producción.

La puesta a punto de nuestra planta experimental requirió un estudio en profundidad de distintos medios de cultivo, bien descritos específicamente para *Dunaliella* o

bien empleados tradicionalmente en plantas de cultivo de algas marinas, buscando la máxima productividad. Se ensayaron tres medios de cultivo diferentes con la siguiente composición:

Medio mineral básico. Especifico para el cultivo de *Dunaliella*, preparado a partir de sales comerciales (Shaish y col., 1992). Las concentraciones finales en el medio de cultivo eran:

KCl	0,372 g l ⁻¹
MgCl ₂	1,015 g l ⁻¹
Na ₂ SO ₄	0,710 g l ⁻¹
CaCl ₂	0,022 g l ⁻¹
NaNO ₃	0,425 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,027 g l ⁻¹
NaHCO ₃	4,200 g l ⁻¹
FeCl ₃	0,541×10 ⁻³ g l ⁻¹
NaEDTA	1,861×10 ⁻³ g l ⁻¹
MnCl ₂	1,385×10 ⁻³ g l ⁻¹
CuCl ₂	0,170×10 ⁻³ g l ⁻¹
ZnCl ₂	0,136×10 ⁻³ g l ⁻¹
CoCl ₂	0,238×10 ⁻³ g l ⁻¹
NH ₄ Mo ₇ O ₂₄	1,236×10 ⁻³ g l ⁻¹

Medio fertilizantes Policross-Multicross. Empleado en el cultivo de microalgas marinas para su uso en acuicultura. Estaba compuesto de dos soluciones con la siguiente formulación:

Policross: mezcla de N:P:K en proporción 4:8:12 (p/p), de composición:

P ₂ O ₅	4,80×10 ⁻³ g l ⁻¹
K ₂ O	7,20×10 ⁻³ g l ⁻¹
NH ₃	1,38×10 ⁻³ g l ⁻¹
CON ₂ H ₄	1,02×10 ⁻³ g l ⁻¹

Multicross: mezcla de metales:

Mg	2,9200×10 ⁻³ g l ⁻¹
S	3,9000×10 ⁻³ g l ⁻¹
Fe	0,1040×10 ⁻³ g l ⁻¹
Zn	0,0325×10 ⁻³ g l ⁻¹
Mn	0,0520×10 ⁻³ g l ⁻¹
Co	0,0104×10 ⁻³ g l ⁻¹
B	0,0520×10 ⁻³ g l ⁻¹
Mo	0,0010×10 ⁻³ g l ⁻¹

El medio se completaba con urea: 0,030 g l⁻¹

Medio f2. Generalmente empleado para el cultivo de algas marinas y fitoplancton (Guillard y Ryther, 1962). Estaba compuesto por:

NaH ₂ PO ₄	10,0×10 ⁻³ g l ⁻¹
FeCl ₃	3,2×10 ⁻³ g l ⁻¹
NaNO ₃	150,0×10 ⁻³ g l ⁻¹
EDTA-Na	4,36×10 ⁻³ g l ⁻¹
Vit B ₁	0,20×10 ⁻³ g l ⁻¹
Vit B ₁₂	0,01×10 ⁻³ g l ⁻¹

Además llevaba los siguiente metales:

Cu	10×10 ⁻⁶ g l ⁻¹
Zn	22×10 ⁻⁶ g l ⁻¹
Co	10×10 ⁻⁶ g l ⁻¹
Mn	180×10 ⁻⁶ g l ⁻¹
Mo	6×10 ⁻⁶ g l ⁻¹

Estos medios se suplementaban con NaCl a distinta concentración.

Para el mantenimiento de los cultivos en el laboratorio se utilizaba agua destilada y los medios se esterilizaban en autoclave. En el caso de los cultivos a la intemperie se usaba agua corriente filtrada o agua de mar filtrada, sin mantenerse condiciones de esterilidad.

El empleo de agua de mar implicaba un enriquecimiento en sales del medio de cultivo que aproximadamente suponía:

NaCl	26,50 g l ⁻¹
MgCl ₂	5,20 g l ⁻¹
MgSO ₄	6,70 g l ⁻¹
CaCl ₂	1,10 g l ⁻¹
KCl	0,72 g l ⁻¹
NaHCO ₃	0,20 g l ⁻¹
BrNa	0,08 g l ⁻¹

Y cantidades no determinadas de micronutrientes. Estos valores eran, además, aproximados pues la composición del agua de mar varía con las estaciones y con otros factores medioambientales no controlables.

A continuación se recoge una tabla comparativa de la composición de los tres medios de cultivo expresada como g l⁻¹ de cultivo (no se incluye el suplemento de NaCl al ser variable para cada experimento, ni el aporte de sales en los casos en los que se utilizó agua de mar).

	f2	Policross-Multicross	Mineral básico
EDTA	4,75	0	1,861 (NaEDTA)
Vit B₁	0,247	0	0
Vit B₁₂	0,002	0	0
Cu	10×10^{-3} (SO ₄ Cu·5H ₂ O)	0	0,170 (CuCl ₂ ·2H ₂ O)
Zn	22×10^{-3} (SO ₄ Zn·7H ₂ O)	$32,5 \times 10^{-3}$	0,136 (ZnCl ₂)
Co	10×10^{-3} (Cl ₂ Co·6H ₂ O)	$10,4 \times 10^{-3}$	0,238 (CoCl ₂ ·6H ₂ O)
Mn	0,18 (Cl ₂ Mn·4H ₂ O)	52×10^{-3}	1,385 (MnCl ₂ ·4H ₂ O)
Mo	6×10^{-3} (MoO ₄ Na ₂ ·2H ₂ O)	$1,04 \times 10^{-3}$	1,236 (NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O)
B	0	52×10^{-3}	0
N	150 (NO ₃ Na)	31,02 (urea)+1,38 (NH ₃)	424,95 (NO ₃ Na) + 1,236 (NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O)
P	10 (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	4,8 (P ₂ O ₅)	27,22 (KH ₂ PO ₄)
Fe	3,2 (Cl ₃ Fe·6H ₂ O)	0,104	0,541 (FeCl ₃ ·6H ₂ O)
Mg	0	2,92	1015,0 (MgCl ₂ ·6H ₂ O)
SO₄⁻²	10×10^{-3} (SO ₄ Cu·5H ₂ O)+ 22×10^{-3} (SO ₄ Zn·7H ₂ O)	3,90	710,0 (Na ₂ SO ₄)
Ca⁺²	0	0	22,0 (CaCl ₂)
K⁺	0	7,2 (K ₂ O)	372,5 (KCl) + 27,0 (KH ₂ PO ₄)
HCO₃⁻	0	0	4249,5 (NaHCO ₃)
Na⁺	6×10^{-3} (MoO ₄ Na ₂ ·2H ₂ O)+150 (NO ₃ Na) +10 (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	0	710,0 (Na ₂ SO ₄) + 4249,5 (NaHCO ₃)+424,95 (NO ₃ Na)+1,861 (NaEDTA)
Cl⁻	10×10^{-3} (Cl ₂ Co·6H ₂ O)+0,18 (Cl ₂ Mn·4H ₂ O) +3,2 (Cl ₂ Fe·6H ₂ O)	0	1015,0 (MgCl ₂ ·6H ₂ O) + 22,0 (CaCl ₂) + 372,5 (KCl)+ 0,541 (FeCl ₃ ·6H ₂ O) + 0,170 (CuCl ₂ ·2H ₂ O)+ 0,136 (ZnCl ₂) + 0,238 (CoCl ₂ ·6H ₂ O)+ 1,385 (MnCl ₂ ·4H ₂ O)

Los resultados obtenidos ensayando estos tres medios tanto en cultivos en el laboratorio como en el exterior, mostraron que el medio mineral básico rendía mayores acumulaciones de biomasa, alcanzándose en algunos casos hasta 8×10^6 cel ml⁻¹ en 9 días, si bien la acumulación media estaba en torno a 6×10^6 cel ml⁻¹. Las tasas de crecimiento en este medio eran del orden de $0,48 \times 10^6$ cel ml⁻¹ día⁻¹ con un contenido de unos 5 pg de β-caroteno cel⁻¹. El medio preparado con fertilizante (Policross - Multicross) y el f2 ofrecían acumulaciones más bajas que el anterior y semejantes entre sí, del orden de 3×10^6 cel ml⁻¹ en 9 días. Con estos medios, la fase estacionaria del

cultivo se alcanzaba muy pronto (3 - 4 días), sin embargo, presentaba la gran ventaja de poseer un mayor contenido en β -caroteno. Así, con los medios de cultivo Policross-Multicross y f2 se alcanzaban del orden de 12 - 13 y 16 - 18 μg de β -caroteno 10^6 cel^{-1} , respectivamente.

Para los trabajos a realizar en el laboratorio (mantenimiento de estirpes, generación de inóculos, etc.), se decidió utilizar el medio mineral básico para asegurar las máximas tasas de producción de biomasa, ya que en este tipo de trabajos se requieren volúmenes pequeños que no implican grandes costes. En los cultivos al exterior, la utilización de este medio es económicamente inviable y por esa razón se optó por el medio preparado a partir de fertilizante (P-M).

Como ya se ha comentado, el nitrógeno es un nutriente básico en el cultivo de *Dunaliella*, tanto por ser esencial para el crecimiento de este alga como por su estrecha relación con la capacidad de sintetizar β -caroteno. Por ello, otro objetivo de nuestra experimentación fue ajustar en lo posible la fuente y concentración de N más idónea para estos cultivos. Así, se ensayaron NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 y urea, comprobándose que el N en forma de NaNO_3 es el más eficientemente utilizado por *Dunaliella salina*. Para determinar la concentración óptima de NaNO_3 en el cultivo, se ensayaron distintas concentraciones entre 0 y 10 mM. El crecimiento era máximo con 5mM de NaNO_3 , sin embargo, con 2mM se observaba una alta tasa de crecimiento y el mayor contenido en β -caroteno. A la vista de estos resultados, se decidió cultivar *Dunaliella* con 2mM.

Además de la selección del medio de cultivo óptimo, los trabajos en el laboratorio y en el exterior nos ofrecieron información sobre otros aspectos importantes directamente relacionados con este tema. El mantenimiento de las estirpes debería realizarse en medio sólido constituido por medio mineral básico suplementado con NaCl 0,5 M y agar al 1% (p/v). Sin embargo, el mantenimiento de cultivos líquidos debía realizarse en el medio mineral básico suplementado con NaCl 3 M, sin aireación y con iluminación constante de $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Estos cultivos se refrescaban al menos una vez al mes. Para el mantenimiento de las estirpes a largo plazo se emplearían técnicas de crioconservación (Levy y Zamir, 1994).

Por otro lado, resultados experimentales demostraron la posibilidad de utilizar el medio procedente de un cultivo anterior, tras la retirada de las células, para iniciar un nuevo ciclo de cultivo obteniéndose una tasa de crecimiento y contenido en pigmentos semejantes al utilizar medio fresco o medio reciclado. Este aspecto es especialmente relevante pues implica un gran ahorro de agua y sales minerales que minimiza una de las principales limitaciones económicas para el cultivo de *Dunaliella*.

De hecho, la utilización de medios salinos reciclados es una práctica bastante común en las plantas de producción, donde el medio se somete a un tratamiento oxidativo de posibles restos orgánicos y posteriormente se filtra. Está descrito que el uso de este agua enriquece el medio con altas concentraciones de magnesio, calcio y

sulfatos, siendo necesario un control rutinario de la calidad del agua y un estricto mantenimiento del pH para evitar precipitaciones.

Otro elemento fundamental en el desarrollo de *Dunaliella* es la salinidad del medio de cultivo. Aunque no se trata de un requerimiento nutritivo en sentido estricto, sí es un componente imprescindible del medio. La mayoría de las especies de *Dunaliella* crecen de manera óptima en medios que contienen 1 - 2 M de NaCl, dependiendo de la temperatura (tasas de crecimiento similares con NaCl 2 M y 15°C o con NaCl 1 M y 25°C). Esta adaptación ambiental única hace posible el crecimiento intensivo a la intemperie en invierno y en regiones frías, como Ucrania o el interior de Mongolia.

Los trabajos realizados en el laboratorio nos permitieron establecer la concentración de NaCl más adecuada para el crecimiento del alga, teniendo en cuenta que altas concentraciones de sal permitían mantener cultivos axénicos pero provocaban en las células una situación de estrés que reducía considerablemente su crecimiento además de encarecer el cultivo. Se ensayaron distintas concentraciones de NaCl, obteniéndose las siguientes tasas de crecimiento:

$$1,5 \text{ M} = 0,212 \text{ día}^{-1}$$

$$2,0 \text{ M} = 0,300 \text{ día}^{-1}$$

$$2,5 \text{ M} = 0,213 \text{ día}^{-1}$$

$$3,0 \text{ M} = 0,280 \text{ día}^{-1}$$

La diferencia de crecimiento entre las distintas concentraciones de NaCl utilizadas no era significativa, decidiéndose la utilización de 2 M de NaCl en todos los cultivos.

La mayoría de los tanques comerciales utilizan agua de mar concentrada por evaporación o agua de mar a la que se añade sal hasta alcanzar la concentración deseada. Los lugares más favorables para el cultivo de *Dunaliella* son, por tanto, las zonas costeras, las próximas a lagos salados y las salinas, donde es fácil obtener la concentración de sal deseada según la estación y la temperatura mezclando agua de mar y agua de mar concentrada.

Atendiendo a estas consideraciones, nuestra planta experimental se instaló inicialmente en la costa onubense, aprovechando la infraestructura disponible en el CICEM de Agua del Pino. Este centro está dotado de un sistema de bombeo que permitía llevar el agua desde el mar hasta el interior de la instalación, donde, tras varios pasos de esterilización con luz ultravioleta y decantación, se distribuía a los tanques de cultivo por una red interior de tuberías. Para completar la salinidad necesaria en cada momento se disponía de unos tanques troncocónicos (Figura 22), con un sistema de agitación mecánica, donde se preparaba sal al límite de su saturación (5,5 M), a partir de sal en polvo traída de las salinas próximas. Esta salmuera se esterilizaba pasando por un sistema de filtros de 25 a 3 mm y por un sistema de radiación ultravioleta (UV). Nuestra instalación se completaba con bombas de tracción magnética que facilitaban el trasiego de esta salmuera para el llenado de los estanques.



Fig. 22. Tanques de preparación de salmuera para el cultivo de *Dunaliella* en el CICEM de "Agua del Pino"

Incluso cuando se recicla el medio empleado para el cultivo del alga después de retirada la biomasa, se necesitan grandes cantidades de agua de una cierta calidad para compensar las pérdidas por evaporación (1 cm por día, en verano) y otros usos. Si es posible, por calidad y precio, es mejor utilizar agua subterránea, ya que contiene menos contaminantes que las aguas superficiales en contacto directo con áreas agrícolas. En general, es aconsejable disponer de tanques de almacenamiento del agua para asegurar su suministro continuo y permitir ensayos rutinarios de calidad del agua antes de su utilización en los cultivos. Igualmente son necesarios otros tanques donde recoger el agua del lavado de equipos o de los estanques de cultivo, especialmente si se está trabajando a alto pH o alta salinidad, para permitir su tratamiento antes de ser vertido a las aguas superficiales evitando daños ambientales.

PROPIEDADES FÍSICAS DE LA ZONA

Para la instalación de una planta experimental las propiedades del terreno tienen una importancia relativa. No ocurre así en instalaciones de tipo industrial donde se requiere un nivelado preciso del terreno, preferiblemente mediante equipos controlados por láser similares a los utilizados en los cultivos agrícolas regados "por goteo". Este nivelado depende de la topografía y características del suelo. La baja profundidad (10 a 20 cm) y la pendiente plana (0,01 a 0,05%) de los estanques para producir microalgas, hace especialmente necesaria esta nivelación. Otro problema a considerar es el posible movimiento de la superficie donde se va a construir el estanque, si éste se levanta en lugares que han necesitado una previa compactación o se trata de zonas inestables desde el punto de vista sísmico.

Las características del suelo influyen en la facilidad y coste de la construcción de los estanques así como en sus características y tipo de recubrimiento. Por ejemplo, un suelo rocoso resulta demasiado duro para trabajarlo. Del mismo modo, un recubrimiento con telas plásticas requiere una superficie completamente lisa, por lo que no se puede instalar en suelos muy heterogéneos o duros. Los revestimientos suelen ser necesarios para prevenir contaminaciones. Si los suelos son arcillosos es recomendable algún recubrimiento para controlar la erosión y turbidez y facilitar el mantenimiento de los estanques. Este tipo de suelo es problemático por su baja consistencia y puede ser arrastrado por la lluvia induciendo presiones y movimientos en la estructura que pueden originar fugas del estanque. Todos estos problemas se pueden reducir si se elige adecuadamente la ubicación de la planta y si se presta atención a algunos detalles como juntas, control de humedad, compactación, etc.

REQUERIMIENTOS ESPECÍFICOS DEL CULTIVO

– SELECCIÓN DE ESTIRPES

El género *Dunaliella* es, probablemente, el más empleado en sistemas de cultivos masivos, pero existen muchas especies con fisiología, morfología y composición diferentes y, sobre todo con distinta capacidad carotenogénica. Esto hace necesario un continuo chequeo de especies potencialmente interesantes. A la hora de seleccionar la especie óptima se deben tener en cuenta algunos criterios claves para obtener máxima productividad en los cultivos al exterior. Así, se deben seleccionar estirpes con un amplio intervalo de temperatura óptima, que abarque las diferencias de temperatura entre el día y la noche e incluso entre estaciones, asegurándose así una alta productividad en casi cualquier época del año. Igualmente, se considerará más conveniente aquella especie que posea una tasa respiratoria baja o presente gran tolerancia a alta irradiancia o alta tensión de oxígeno. Otro criterio a tener en cuenta sería su resistencia a depredadores.

Durante nuestra investigación se ha dedicado un esfuerzo notable para conseguir estirpes de interés. El primer criterio de selección fue la capacidad para sintetizar β -caroteno, ya que no todas las estirpes de *Dunaliella salina* tienen esta potencialidad. La puesta a punto de la metodología para la obtención de estas especies a partir de medios naturales implicaba varios pasos:

- Recogida de muestras.
- Chequeo al microscopio óptico para evidenciar la presencia del alga.
- Crecimiento en medio mineral básico con elevada concentración de NaCl (5M). Este paso parece suficiente para conseguir cultivos axénicos y exclusivos de *Dunaliella salina*.
- Crecimiento en tubo de ensayo con el mismo medio que en el paso anterior e iluminado por la parte superior a una alta intensidad. Después de 3-4 días, si hay estirpes carotenogénicas, aparecen formando una película de color naranja en la superficie del tubo que puede recogerse fácilmente mediante succión.
- Repetición de este último paso varias veces para conseguir la pureza total de la muestra.

Sucesivos muestreos nos permitieron obtener 4 estirpes de *D. salina* procedentes de efluentes próximos a las salinas de Isla Cristina (Huelva) que no eran carotenogénicas, una estirpe que identificaremos como *R*, aislada de una muestra salina de Roquetas de Mar (Almería), que sí presentaba esta potencialidad y otra estirpe obtenida de una salina de Murcia, cedida por el profesor Lubián, que denominamos *D* y que también sintetizaba de forma masiva β -caroteno. Por otro lado, se disponía de las estirpes *UTEX 2538* y *CCAP 19/30*, ambas carotenogénicas, procedentes de colecciones de cultivo que se corresponden con *Dunaliella bardawil*. El siguiente paso fue establecer cual de estas 4 estirpes presentaba mayores contenidos en β -caroteno, tanto en condiciones normales de cultivo como en situación de inducción de la biosíntesis del pigmento.

En cultivos al exterior, la estirpe *R* presentó la mayor tasa de crecimiento, obteniéndose valores inferiores y similares entre sí para las estirpes *UTEX* y *CCAP*. La estirpe *UTEX*, sin embargo, presentaba en condiciones estándar de cultivo, el mayor contenido en β -caroteno, por lo que se seleccionó como organismo a cultivar en la planta experimental. No obstante, nuestro laboratorio continúa la investigación de búsqueda de nuevas estirpes, preferiblemente autóctonas, que mejoren las productividades obtenidas.

– DISEÑO Y REVESTIMIENTO DE LOS ESTANQUES

Uno de los requisitos más importantes para el cultivo de algas al exterior es la construcción de estanques eficientes, fáciles de operar, duraderos y baratos. El tamaño, forma, material de construcción y sistema de agitación varía dependiendo de las condiciones del lugar de ubicación, los materiales disponibles y el destino final de la biomasa obtenida. En la práctica, la construcción de estanques para el cultivo de microalgas es siempre un compromiso entre un sistema altamente eficaz y con propiedades hidráulicas óptimas y la necesidad económica de mantener los costos de construcción dentro de unos límites aceptables.

Durante la corta historia de la biotecnología de microalgas se han desarrollado distintos tipos de estanques para su cultivo masivo tanto a escala experimental como industrial. Como se recoge en el apartado introductorio sobre la biotecnología de microalgas, existen dos tipos generales de diseño: biorreactores cerrados, para producir compuestos de alto valor y unidades abiertas, más baratas y fáciles de mantener, para obtener biomasa, proteínas u otros constituyentes celulares. Los estanques abiertos pueden ser de tres tipos:

- Circulares agitados por un brazo giratorio.
- De forma rectangular, construidos como una unidad simple o unión de varias unidades, agitados por sistemas de paletas, propulsores o bombas de aire.

- Construcciones en forma de meandro con una cierta inclinación, donde las algas se mezclan por un sistema de bombeo y flujo por gravedad.

Salvo en instalaciones concretas, la mayoría de los diseños empleados en la actualidad son los estanques rectangulares y sólo a ellos nos vamos a referir.

Los estanques agitados y poco profundos para mejorar la producción de microalgas fueron introducidos en los años 50 y principios de los 60 por Oswald y col. (1959). La mayoría de estos primeros estanques tenían una configuración en meandros, con canales estrechos y ángulos de 180° y, a veces, eran simples depósitos excavados en el suelo cubiertos con láminas de plástico. El diseño fue evolucionando, eliminándose los tabiques transversales y los meandros, que suponían grandes pérdidas de energía y provocaban la sedimentación de sólidos, hasta adquirir la configuración más actual con una única pista o canal.

La configuración con una única vuelta es especialmente adecuada en instalaciones de grandes superficies donde la longitud de la curva permite utilizar toda la potencia del sistema de agitación. Como norma general, sólo debe emplearse una unidad de agitación por estanque. Por cuestiones de economía, de accesibilidad, disposición de tuberías y mantenimiento de la instalación, se aconseja que todos los sistemas de agitación, adición de medio, recogida de células, etc. estén dispuestos en un extremo, con un camino de acceso para cada par de estanques. Para evitar el depósito de sólidos junto a la pared del separador central, debido a la baja velocidad de circulación en esta región, se deben instalar pantallas curvadas concéntricas en las curvas. La circulación se mejora aun más si se estrecha ligeramente el estanque en la curva opuesta a la que contiene el sistema de paletas.

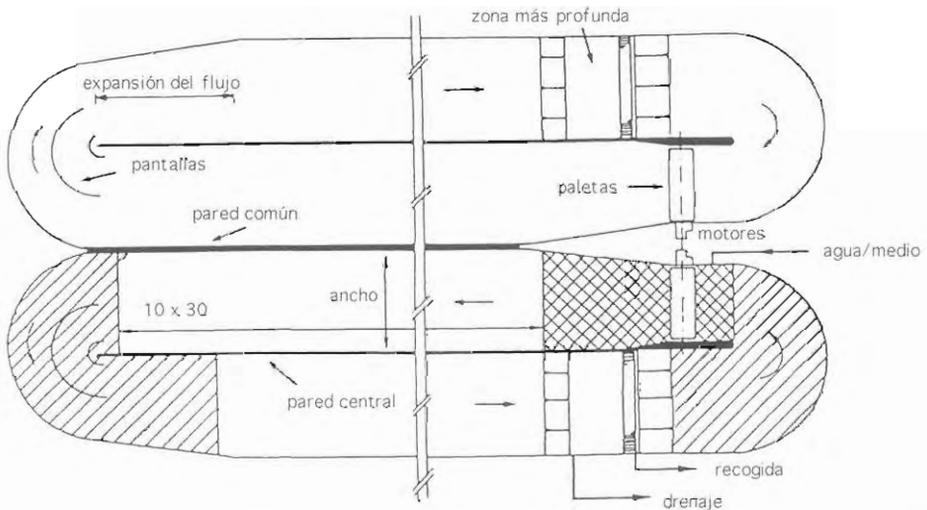


Fig. 23. Diseño de estanques para el cultivo masivo de *Dunaliella salina* donde se recogen todas las características consideradas óptimas para obtener las productividades más altas.

Este estrechamiento también se puede hacer en la pared que contiene la paleta, haciendo innecesarias las pantallas en este lado y facilitando además el diseño y ubicación de los motores propulsores de las paletas. Todas estas mejoras permiten diseñar en principio estanques de cualquier longitud y anchura sólo limitados por los factores hidráulicos. La tendencia actual es disminuir la profundidad y aumentar la velocidad de circulación para obtener mejores productividades. El aprovechamiento hidráulico se mejora cuando el estanque es menos profundo en la zona curvada, por tanto, hay que tener especial cuidado con la profundidad mínima de los cultivos para evitar que estas regiones se queden secas.

Otro aspecto a considerar es la limpieza de los estanques. Cualquier planta industrial opera de manera ininterrumpida durante meses, originando residuos sólidos que interfieren en el funcionamiento del sistema. La eliminación de estos restos celulares y sólidos precipitados es compleja. Para facilitar el proceso de limpieza se aconseja construir una sección más profunda que capture todos los residuos sólidos, siendo retirados periódicamente por un sistema de succión u otro procedimiento. La frecuencia de esta limpieza es variable, debiéndose realizar cada 3 - 4 meses en el caso de estanques con medios salinos. La profundidad de esta sección no debe ser mayor de 1 m.

La elección de los materiales empleados en la construcción, así como un adecuado recubrimiento de las paredes y fondo del estanque son claves en el diseño de una planta de producción. El material utilizado para levantar las paredes de los estanques puede ser tierra, arcilla, cemento o materiales más costosos como fibra de vidrio o poliuretano. El material que recubre interiormente los estanques es fundamental, ya que se encuentra en contacto permanente con el cultivo y determina que pueda haber filtración, erosión o turbidez del mismo, pudiendo afectar también a la composición química y calidad de la biomasa obtenida. En la actualidad, la mayoría de los sistemas de producción de microalgas utilizan revestimientos plásticos que cumplen los requerimientos de atoxicidad, durabilidad y uniformidad, evitando pérdidas de medio, resistentes a productos químicos, a luz ultravioleta y cambios de temperatura, siendo fáciles de limpiar. Los más empleados son PVC o polietileno reforzado.

La mayoría de las plantas comerciales para el cultivo de *Dunaliella* están formadas por canales rectangulares con unidades repetidas, donde cada unidad es un sistema de producción independiente. Las paredes de los estanques son de hormigón que, aunque suponen una gran inversión inicial, resisten muchos años. La alta concentración de sal empleada en este cultivo hace necesario un tratamiento especial de la superficie interna de los estanques para evitar el deterioro del hormigón y la corrosión del metal. No es recomendable el uso de hormigón asfáltico porque se puede desmoronar. De manera general, en la actualidad el recubrimiento empleado para el cultivo de este alga es el PVC. Tan solo en las unidades de producción extensivas, donde no existe un flujo de cultivo, se utiliza arcilla natural (Betatene Ltd., en Whyalla, Australia).

En nuestra planta experimental existían estanques experimentales, de inoculación y de producción. Los 4 estanques para experimentación, de 1 m² de superficie abierta al aire,

se construyeron con poliéster y fibra de vidrio (PRFV) con unas dimensiones de 1,25 m de largo \times 0,8 m de ancho y 30 cm de altura, estando divididos longitudinalmente por un tabique vertical de fibra de vidrio y una pantalla curva del mismo material en cada extremo. Los 6 estanques de inoculación tenían el mismo diseño y estaban contruidos en su totalidad con PRFV, con 3 m² de superficie (2,8 m de largo \times 1,2 m de ancho). También se disponía de dos estanques de producción de unos 40 m² de superficie (15 m de largo \times 2,6 m de ancho) con 40 cm de altura y pendiente nula, recubiertos de una lámina plástica impermeable de PVC de 1mm. Estaban contruidos sobre una soleira de hormigón de 15 cm armada con mallazo de 15 \times 15 cm. En estos estanques se construyó inicialmente un foso para la dosificación de CO₂ y el vaciado y limpieza de los mismos, ubicado en uno de los canales, en el extremo opuesto donde se encontraban las paletas y con unas dimensiones de 0,5 m de ancho y 0,8 m de profundidad medidos desde el fondo del estanque.

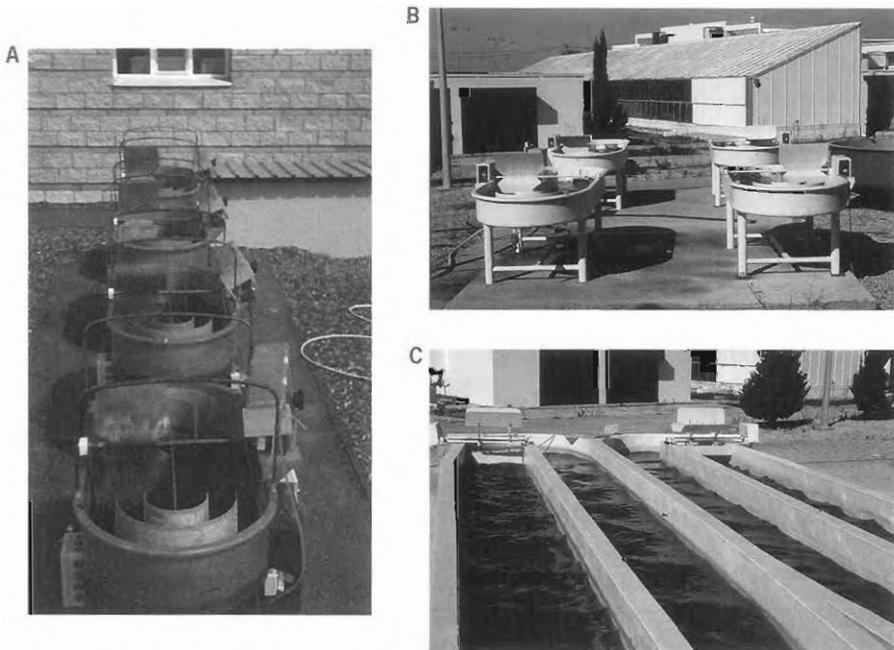


Fig. 24. Vista general de los distintos sistemas abiertos que constituyen la planta experimental. A) estanques de 1 m², B) estanques de 3 m² y C) estanques de 40 m².

– AGITACIÓN

La agitación de la suspensión celular es uno de los requerimientos más importantes en el cultivo masivo de algas ya que incide fuertemente sobre la tasa de productividad. La agitación implica una combinación de varios efectos sobre la viabilidad del cultivo como son:

- Dispersión uniforme del alga, para asegurar una frecuente exposición a la luz e impedir el asentamiento de las algas en el fondo del estanque, lo que disminuiría la productividad aumentando la posibilidad de contaminación y el consiguiente deterioro del cultivo
- Homogénea distribución de los nutrientes
- Mejor utilización del dióxido de carbono
- Prevención de la estratificación térmica
- Eliminación del exceso de oxígeno disuelto, producido como resultado de la fotosíntesis –por cada mol de CO₂ fijado se libera un mol de O₂– (Richmond, 1983).

Este último aspecto es de particular importancia, ya que la productividad de los cultivos puede estar limitada por el efecto deletéreo de la fotooxidación (Vonshak y Guy, 1988). Este proceso está directamente relacionado con la intensidad de la luz, la temperatura y la concentración de O₂ ambiental, pudiendo alcanzar éste, en tanques pobremente agitados, hasta 4 veces el valor de saturación, por lo que, la eliminación de este exceso de O₂ es fundamental (Richmond, 1986a).

La agitación de los cultivos en estanques de grandes superficies abiertos al aire suele ser insuficiente, pudiendo existir hasta 8°C de diferencia entre la temperatura de la superficie del estanque y la del fondo. Esta diferencia puede ser mayor si el cultivo está muy concentrado, ya que la mayor parte de la irradiación absorbida se transforma en calor (proceso 10 veces más eficiente que el de conversión de energía luminosa en energía química). Debido a su densidad específica, el agua más caliente permanece en la superficie, consumiendo las algas de esta capa todo el bicarbonato y elevando el pH del cultivo por encima de 10. En estas condiciones, los nutrientes esenciales precipitan arrastrando hacia el fondo a las algas. Una nueva capa de cultivo ocupa entonces la superficie, repitiéndose de nuevo el ciclo hasta que todas las algas precipitan en el fondo del estanque, formando aglomeraciones que acaban con la muerte del cultivo. Por tanto, la función primaria de la agitación es mantener las células en suspensión, exponiéndolas periódicamente a la luz para asegurar un adecuado crecimiento fotoautotrófico. Si la velocidad de agitación es demasiado lenta, las células muertas y otros restos celulares se acumularán en el fondo del tanque, especialmente en las zonas de menor turbulencia. La formación de estos depósitos producirá zonas anaerobias, ejerciendo un efecto nocivo sobre las células y reduciendo la cantidad y calidad de biomasa obtenida. Ocasionalmente pueden acumularse algunos productos tóxicos que podrían causar la pérdida total del cultivo.

Otro importante efecto de una adecuada agitación del cultivo es el rápido movimiento de la suspensión celular desde la zona superior más iluminada hacia la zona inferior en oscuridad y la vuelta a la zona iluminada, originando un patrón dinámico de luz-oscuridad para cada célula, en una relación estable y precisa (flashing-light effect). En base

a este efecto, parece claro que la eficiencia fotosintética podría incrementarse modulando la disponibilidad de luz por las células a una escala de tiempo adecuada. A este respecto, se ha descrito un diseño consistente en perfiles, con una sección análoga a la de alas de avión, intercalados a intervalos de aproximadamente 1 m a lo largo del estanque. Estos perfiles dispuestos con un ángulo de ataque adecuado (aproximadamente 23°), generan vórtices que se propagan a favor de la corriente mezclando el cultivo con un flujo desde la superficie al fondo. Esto provoca que las células se muevan de arriba abajo mientras se desplazan a lo largo del estanque, experimentando grandes cambios de irradiancia, alternando periodos de luz con otros de oscuridad, en cortos intervalos de tiempo. Este sistema podría llegar a producir incrementos de productividad del orden del 30% (Laws y col., 1988).

La velocidad de flujo mínima para mantener una suspensión de algas es de 5 cm s^{-1} , necesiándose al menos una velocidad lineal de 20 cm s^{-1} para asegurar esa velocidad mínima requerida en todos los puntos del estanque (Oswald, 1988b). En el diseño final de una planta industrial de gran superficie, el factor agitación merece estudios de ingeniería del proceso muy detallados al estar directamente relacionado con el consumo energético y con los costes de instalación y funcionamiento de la planta. Por un lado, la energía necesaria para mezclar el cultivo aumenta con el cubo de la velocidad de agitación, incrementándose ligeramente a profundidades mayores, por lo que si la velocidad se incrementa para conseguir la productividad óptima, se encarece considerablemente el producto obtenido. Conociendo el factor de eficiencia de un sistema de agitación determinado, la anchura del canal, la profundidad y la velocidad de circulación se puede calcular la potencia requerida para mantener dicha agitación según la fórmula:

$$P = \frac{w \cdot d \cdot V \cdot \Delta d \cdot W}{102 \cdot e}$$

donde P es la potencia requerida (kw), w la anchura, d la profundidad, V la velocidad de circulación de la suspensión, Δd los cambios de profundidad delante y detrás del sistema de agitación, W el peso específico del agua (999 kg m^{-3}), 102 es el factor para convertir m kg s^{-1} en kw y e el factor de eficiencia del sistema de agitación. Por tanto, hay que tener en cuenta que si se duplica la velocidad de agitación se requiere 10 veces más energía por hectárea de cultivo (Becker, 1994).

Por otro lado, según la profundidad del cultivo que se defina como óptima, se requerirá una rueda de paletas de agitación cada cierta distancia para mantener la velocidad lineal óptima (para 10 cm de profundidad se necesita una rueda cada 493 m; para 20 cm los sistemas de agitación deben estar separados 2120 m para mantener, en ambos casos, una velocidad de 15 cm s^{-1}). Según esto, parecería mejor trabajar con mayores profundidades de cultivo, pero, como se verá en el apartado siguiente, dicho aumento puede reducir considerablemente la productividad. Además, cuanto mayor sea la profundidad del cultivo se requieren estanques de mayor altura, encareciendo considerablemente la instalación. Otros factores, como el rozamiento con las paredes (que depende del material de recubrimiento), la presencia o no de tabiques divisorios dentro del estanque, la anchura, etc., también afectan a la velocidad del cultivo y deben

tenerse en cuenta. Para una aproximación matemática más detallada de todas estas variables se puede consultar el capítulo sobre aspectos de la ingeniería de los cultivos de algas a gran escala en "Microalgal biotechnology" (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

La selección del sistema de agitación depende de diversos factores tales como: localización de la planta de producción, tipo de estanque de cultivo, disponibilidad de energía, tipo de alga a cultivar y consideraciones económicas. En el caso del cultivo de *Dunaliella*, se han ensayado distintas técnicas de agitación, tales como ruedas de paletas, bombas elevadoras por aire, etc. De todas ellas, la mejor parece ser la rueda de paletas, ya que la ausencia de una pared celular rígida, hace a estas células muy frágiles y sensibles a fuerzas mecánicas. Los demás sistemas ensayados provocan la rotura celular y el colapso del cultivo (Ben-Amotz y Avron, 1989b). Las ruedas de paletas deben construirse con brazos largos para que, girando a pocas revoluciones, no dañen las células y mantenga una velocidad lineal de la suspensión de al menos 10 cm s^{-1} , definida por algunos autores como la más eficiente en las unidades de producción comercial de *Dunaliella* (Ben-Amotz y Avron, 1989b). Esta velocidad de agitación es menor que la requerida en el cultivo de *Spirulina* o *Chlorella*, ya que *Dunaliella* es un alga móvil con una respuesta fototáctica positiva. En la práctica, los estanques de cultivo para la producción de β -caroteno actualmente en funcionamiento operan con un sistema de paletas de 6 brazos proporcionando una velocidad lineal media de 15 cm s^{-1} (Ben-Amotz, 1999b).

En base a estas consideraciones, los estanques de nuestra instalación experimental se dotaron de un sistema de rueda con tres paletas en ángulo de 120° para los estanques de 3 m^2 . En este caso, la longitud del brazo de la paleta era de 58 cm, activado por motorreductores de 2 HP. Las paletas tenían el máximo ancho posible respecto a la sección del estanque, llegando hasta el fondo del mismo (30 cm), condiciones indispensables a considerar en el diseño de las paletas para mantener el flujo en estanques de gran longitud (Dodd, 1986). Estaban construidas con fibra de vidrio para que pesaran menos y fueran más resistentes a los efectos corrosivos de la alta concentración de sal.



Fig. 25. Detalle del diseño de las paletas en los estanques experimentales de 3 m^2 .

Este sistema permitía obtener, para una profundidad de 8 cm, una velocidad lineal del fluido de 30 cm s⁻¹ cuando las paletas giraban a 10 rpm y de 55 cm s⁻¹ para 20 rpm. Esta última agitación daba los mejores resultados, rindiendo 3,3 g de biomasa m⁻² día⁻¹ con una productividad en β-caroteno de 225 mg m⁻² día⁻¹. A una velocidad de circulación de la suspensión celular de 45 cm s⁻¹ (15 rpm) la productividad era similar (3,0 g de peso seco y 196 mg β-caroteno m⁻² día⁻¹). El consumo energético era igual en todos los casos al tratarse de motores regulados por una reductora (0,19 kw h⁻¹). Por tanto, una velocidad de circulación del cultivo de 45 cm s⁻¹ sería adecuada porque no existe diferencia de productividad significativa respecto a la de 55 cm s⁻¹ pero el incremento de profundidad delante y detrás del sistema de paletas generado por su movimiento era menor. Esto permitiría construir estanques con paredes más bajas que ensombrecerían menos la superficie del cultivo y reduciría los costes de construcción.

Velocidad de circulación del cultivo	Biomasa (g m ⁻² d ⁻¹)	Carotenoides (mg m ⁻² d ⁻¹)	Carotenoides (% del peso seco)
30 cm s ⁻¹	1,6	109	6,0
37 cm s ⁻¹	2,1	94	5,9
45 cm s ⁻¹	3,0	196	5,8
55 cm s ⁻¹	3,3	225	6,2

En el caso de los estanques de 40 m² el sistema de paletas constaba de 6 brazos en ángulo de 60°, con las mismas consideraciones respecto a la anchura y longitud explicadas para los estanques pequeños.



Fig. 26. Detalle del diseño de las paletas en los estanques de producción de 40 m².

En este sistema, para una profundidad de 8 cm, la velocidad de circulación del cultivo óptima era de 20 cm s⁻¹ con el sistema de paletas girando a 20 rpm, lo que suponía un consumo energético de 0,22 kw h⁻¹.

Para una profundidad fija y para la misma velocidad de giro del sistema de paletas, cuanto mayor sea la superficie de los estanques menor es la velocidad de circulación del cultivo. Por tanto, en el diseño final de la planta con estanques de mayor superficie, será necesario redefinir esta velocidad.

– PROFUNDIDAD.

En el cultivo de microalgas al exterior, la profundidad de la suspensión, al igual que la densidad celular, incide directamente sobre la disponibilidad de luz para cada célula individual del cultivo y, por tanto, influye notablemente sobre la productividad del mismo. De hecho, en condiciones normales de operación en cultivos a la intemperie, toda la luz incidente se absorbe en la zona fótica (2 - 5 cm superiores de la suspensión celular), quedando el resto en oscuridad. Por otro lado, al igual que en el caso del efecto de la densidad celular, la profundidad de la suspensión determina también un efecto de adaptación a la luz, que se traduce en una variación del contenido celular en pigmentos (Fontes y col., 1991; Richmond y col., 1980).

En la producción de biomasa de algas a la intemperie es de gran relevancia el parámetro denominado "iluminación específica", que se refiere a la cantidad de luz disponible para una célula promedio de la suspensión. Hay que tener en cuenta que la luz incidente va atenuándose a medida que penetra en la suspensión, de manera que las células que se encuentran en la superficie están expuestas a alta irradiancia, mientras que las que están en el fondo se encuentran en la más absoluta oscuridad (Guerrero y Losada, 1991; Richmond, 1992). Así, en un momento dado, y dependiendo de la profundidad de la suspensión, sólo un determinado porcentaje del total de las células del cultivo tendrán luz disponible, variando la cantidad de luz que recibe una célula individual en función de su posición vertical en la suspensión. Por tanto, cada célula de la suspensión recibe luz en forma intermitente, por lo que el parámetro "iluminación específica" se relaciona con el periodo de tiempo que una célula promedio está en la zona fótica o en la oscuridad (Richmond, 1988).

La luz que incide sobre un cultivo de algas es absorbida por éstas a medida que penetra en el estanque. Puesto que la radiación solar es la única fuente de energía para el cultivo autotrófico de *Dunaliella*, la productividad en el exterior está limitada por la cantidad de luz que penetra en el cultivo, siendo proporcional al logaritmo de su intensidad e inversamente proporcional a la concentración de algas. En un cultivo que contenga entre 3 y 10×10^9 células l^{-1} (200-600 mg peso seco de alga l^{-1}), la luz efectiva (400-700 nm) se absorbe completamente en menos de los 5 cm superiores de la suspensión celular. Por tanto, desde un punto de vista de obtención de máxima productividad, cultivos más profundos no dan mayor rendimiento. De hecho, en cultivos de *Dunaliella* llevados a cabo en el exterior a pequeña escala, la productividad, expresada en base a peso seco de algas $m^{-2} \text{ día}^{-1}$, es idéntica cuando la profundidad de los estanques varía entre 5 y 30 cm (Borowitzka y col. 1984). Cuando se opera a gran escala en tanques de más de $1000 m^2$, es prácticamente imposible conseguir que el fondo del estanque

sea uniforme y liso y, en estos casos, no hay circulación de la suspensión celular si la profundidad es menor de 10 cm. Por tanto, en la práctica, los tanques comerciales de *Dunaliella* operan a profundidades entre 10 y 20 cm.

A la vista de esta información, en los estanques de gran volumen de nuestra planta experimental no se realizaron estudios del efecto de la profundidad sobre la productividad de los cultivos. Sin embargo, sí nos pareció interesante establecer cual era la profundidad más adecuada en los estanques de mantenimiento e inóculo (1 y 3 m²). Los resultados obtenidos en estanques experimentales de 1m² indicaban que los cultivos con 10 cm de profundidad eran los más productivos. En este caso se obtuvieron 3,0 g de peso seco de alga m⁻² día⁻¹ con un contenido en β-caroteno de 292 mg m⁻² día⁻¹. La riqueza en pigmento de las células era ligeramente superior en los cultivos de 6 y 8 cm, aunque en términos de productividad era inferior. Estos cultivos tenían menos biomasa que los de 10 cm, factor fundamental en la fase de crecimiento para obtener la mayor cantidad posible de células para su posterior transferencia a los estanques de producción.

Profundidad cm	Biomasa g m ⁻² d ⁻¹	Carotenoides mg m ⁻² d ⁻¹
6	1,86	280
8	2,48	276
10	3,00	292
12	1,80	179

- DENSIDAD CELULAR ÓPTIMA

Para unas condiciones dadas de profundidad, agitación e irradiancia en los cultivos, existe una densidad de población (concentración de células en la suspensión) óptima, que determina la mayor productividad por unidad de área. Es importante subrayar que, en condiciones de densidad celular óptima, las células no crecen a velocidad máxima, sino aproximadamente a la mitad de la misma, debido a que el crecimiento se encuentra limitado por luz. En principio, puede disponerse de un cultivo de menor densidad celular creciendo a velocidad máxima, dándose una condición de mínima limitación de luz y mínimo ensombrecimiento entre las células, aunque así se obtiene una productividad por debajo de la máxima posible, careciendo pues de valor práctico. En cultivos a la intemperie operados a densidad celular óptima y máxima productividad se da la paradoja de que la mayor parte de la suspensión se encuentra en condiciones de limitación de luz, aunque la energía solar incidente sobre la superficie del cultivo sobrepase ampliamente el valor de saturación por luz para obtener máxima velocidad de fotosíntesis (Fontes y col., 1987; Ramos y col., 1987; Richmond, 1988).

En general, una población de algas pasa por distintas fases de cultivo siguiendo un crecimiento típico bacteriano, con un periodo de latencia, una fase de crecimiento exponencial, otra de crecimiento lineal, una fase estacionaria y finalmente la fase de muerte del cultivo. La duración de cada una de estas fases depende de las condiciones de cultivo y del inóculo inicial.

Cuando se inocula un medio, las condiciones a que se someten las algas son, en principio, diferentes a las del ambiente previo en el que se encontraban. Esto se acentúa en el caso de cultivos transferidos desde condiciones controladas de laboratorio al exterior. Las células deben adaptarse al nuevo ambiente, lo que determina un enlentecimiento de su crecimiento. Es importante pues, que la fase de latencia sea lo más corta posible.

Los ensayos realizados en nuestra planta experimental en estanques de 1 m² indicaban que la densidad celular inicial más adecuada para comenzar un cultivo en el exterior a partir de un inóculo procedente del laboratorio era de 400.000 células ml⁻¹. Sin embargo, en estanques de 3 m², esta concentración inicial era insuficiente, necesitando, al menos, duplicarla. Es previsible que este problema se acentúe al incrementar el volumen de cultivo, lo que hace casi inviable la utilización de cultivos procedentes de laboratorio como inóculos iniciales para los cultivos en grandes volúmenes, siendo necesario mantener cultivos en el exterior ya adaptados y con alta concentración celular para ser utilizados como cultivo de partida.

Otro aspecto importante es la edad fisiológica de las células, ya que afecta a su capacidad de multiplicación. Así, células en fases exponencial o lineal, utilizadas como inóculos acortan la fase de latencia en el nuevo cultivo respecto a inóculos provenientes de fase estacionaria. Nuestros trabajos en este aspecto indicaron que las células de cultivos que se encontraban al final de la fase exponencial eran las más adecuadas para iniciar un nuevo ciclo de cultivo.

Cuando un cultivo de algas se mantiene en sistema estanco no se añaden o retiran células o compuestos hasta el final del cultivo. En estas condiciones, las células crecen de modo exponencial hasta que la alta densidad celular alcanzada empieza a producir fenómenos de ensombrecimiento, comienzan a limitarse los nutrientes disponibles y se acumulan residuos que limitan el crecimiento, alcanzándose la fase estacionaria al principio de la cual se obtiene la máxima concentración posible de biomasa en ese sistema y para esas condiciones.

Pero si se desea que un cultivo alcance su máxima productividad debe mantenerse en su densidad celular óptima, lo que implica una retirada de células y adición de medio fresco de manera continua, manteniendo así el cultivo en unas condiciones próximas a las de la fase exponencial. La concentración celular óptima no es constante a lo largo del año, fluctuando con la estación, siendo su valor más elevado en condiciones de alta irradiancia y disminuyendo conforme lo hace ésta, con valores mínimos que suelen coincidir con el periodo de invierno. En el caso de *D. salina* no es fácil establecer condiciones

operativas de cultivo continuo, pudiendo emplearse, sin embargo, los sistemas de cultivo semicontinuo, en los que la retirada de células y adición de medio fresco se realiza cada cierto periodo de tiempo.

Los ensayos realizados en los estanques de 1 m² de nuestra planta experimental nos permitieron establecer que en invierno la densidad celular óptima era de 700.000 cel ml⁻¹, con ciclos de dilución de los cultivos cada dos días. Estos cultivos se mantuvieron durante 5 ciclos de dilución sin pérdida de viabilidad ni problemas de contaminación. La productividad media en biomasa y β-caroteno era de 2,5 g m⁻² día⁻¹ y 235 mg m⁻² día⁻¹, respectivamente. En verano, sin embargo, para ciclos de dilución idénticos, la densidad celular óptima era de 900.000 cel ml⁻¹. En este caso el cultivo se mantuvo durante 10 ciclos de dilución sin cambios apreciables en su comportamiento, siendo la productividad media en biomasa y en β-caroteno de 3,9 g m⁻² día⁻¹ y 317 mg m⁻² día⁻¹, respectivamente.

Densidad celular cel ml ⁻¹	INVIERNO		VERANO	
	Biomasa g m ⁻² d ⁻¹	Carotenoides mg m ⁻² d ⁻¹	Biomasa g m ⁻² d ⁻¹	Carotenoides mg m ⁻² d ⁻¹
100.000	1,1	72		
300.000	1,4	91		
500.000	1,8	131	3,7	212
700.000	2,5	235	3,5	250
900.000			3,9	317
1.100.000			4,2	277

CONTROL DEL PH

El pH del medio de cultivo es un factor especialmente importante en el cultivo de algas, ya que determina la solubilidad del dióxido de carbono y minerales en el medio, influyendo sustancialmente en el metabolismo del alga. Como ya se ha mencionado, el crecimiento óptimo de *Dunaliella* se obtiene en un amplio margen de pH, entre 7 y 9, aunque también se desarrolla por encima y por debajo de estos valores. Cuando el pH está por encima de 9 se produce la precipitación de varias sales de calcio (carbonatos, fosfatos y sulfatos) provocando una deficiencia en nutrientes y un retraso en el crecimiento. Sin embargo, es mejor operar los cultivos a pH ligeramente alcalino, manteniéndose una reserva permanente de este carbono.

La cuestión de cómo añadir el CO₂ a los cultivos masivos es un tema clave en la biotecnología de microalgas. Los tres factores que se deben considerar cuando se discute la transferencia del CO₂ desde el aire al estanque de cultivo son: el régimen

de agitación, la concentración de CO_2 en el estanque y los equilibrios en el sistema CO_2 / bicarbonato / carbonato.

Se han desarrollado distintas técnicas para distribuir el dióxido de carbono en el medio de cultivo. Los dos sistemas más eficientes son:

1. Transferencia activa mediante difusión del gas en pequeñas burbujas dentro del medio.
2. Transferencia pasiva creando una gran superficie de contacto entre una atmósfera de CO_2 y la superficie del medio de cultivo.

En cualquiera de estos sistemas hay que tener en cuenta que el movimiento del medio provoca una pérdida del CO_2 a la atmósfera, que el pH del medio determina el desplazamiento del equilibrio entre CO_2 y carbonato y que debe mantenerse al menos una concentración de $1 \mu\text{M}$ de CO_2 en cualquier punto del cultivo para que el proceso de la fotosíntesis no esté limitado.

La manera más sencilla de introducir gas en un líquido es mediante burbujeo del mismo. Este sistema, bien inyectando sólo CO_2 o bien una mezcla de aire enriquecido en este gas, tradicionalmente empleado en los cultivos de laboratorio, también se empleó originalmente en los cultivos al exterior. En un principio, tan sólo un 10% del CO_2 suministrado se utilizaba eficientemente. Los diseños fueron cambiando a lo largo del tiempo con la idea de aumentar en lo posible el tiempo de retención de las burbujas de CO_2 en el medio líquido.

En nuestros sistemas de cultivo en el exterior se adoptó una de estas modificaciones consistente en largas tuberías de 1,3 cm de diámetro de un material poroso, fijadas longitudinalmente al fondo del estanque, conectadas por un lado a una fuente de CO_2 y selladas en el otro extremo. Con este sistema, las finas burbujas de gas generadas se distribuían **a lo largo** de la mayor parte del estanque aumentando la eficiencia de transferencia. En el caso de los tanques de 40 m³, estas tuberías se situaron en el fondo del foso de limpieza para aumentar la columna de líquido sobre el lugar de formación de las burbujas de CO_2 , incrementando de esta manera el tiempo que dichas burbujas tardaban en alcanzar la superficie, permitiendo un mayor tiempo de difusión del gas en el líquido y un mejor aprovechamiento. Sin embargo, este foso frenaba la circulación de la suspensión celular, originando graves problemas de contaminación que aconsejó su eliminación.

En los estanques de 1 m³ el caudal de CO_2 suministrado se regulaba con medidores de flujo y estaba controlado por una electroválvula conectada a una célula fotoeléctrica, que se ponía en marcha y detenía automáticamente al amanecer y al atardecer, respectivamente. Con este sistema se añadía mucho más CO_2 que el que podían utilizar las células en ese tiempo. Para 4 tanques con 100 L de cultivo, funcionando continuamente se

consumía aproximadamente 0,15 m³ de CO₂ al día. Este consumo podría reducirse si la inyección de gas se realizaba sólo durante unas 4 h al día, a intervalos de tiempo durante el periodo de iluminación del cultivo.

Para los tanques de mayor volumen (3 y 40 m²) se instaló un sistema de multisonda que medía el contenido de O₂ disuelto, la temperatura y el pH del cultivo en cada momento. El sistema estaba controlado por ordenador recogiendo una medida cada dos segundos. El pH del cultivo se mantenía a un valor determinado, de manera que cuando éste se elevaba por la acción de la actividad fotosintética de los células, actuaba una válvula solenoide, insuflándose CO₂ puro al cultivo hasta restablecer de nuevo el valor de pH prefijado inicialmente. Los datos experimentales muestran que para mantener el pH en torno a 7,5 sólo es necesario añadir CO₂ durante 4 horas al día. En nuestra instalación (6 tanques con 300 L y 2 con 8.000 L) se ha estimado un consumo de 2 m³ de CO₂ al día, con una productividad semejante a la obtenida en los tanques más pequeños, dando idea de la mayor eficiencia de este sistema y justificando la mayor inversión inicial necesaria para instalar los sistemas de control.

CONTAMINANTES

Hay ciertos tipos de contaminaciones que son inevitables en los cultivos al exterior, ya que las condiciones de trabajo no son asépticas. En la práctica se hace necesario un seguimiento y control de los cultivos para obtener una biomasa sin impurezas nocivas y para mantener los contaminantes dentro de unos límites aceptables. Los principales contaminantes que se pueden encontrar en estos cultivos son: bacterias, otras algas, zooplancton, virus, hongos, insectos y fragmentos de origen animal o vegetal, dependiendo de las condiciones locales, la especie de alga cultivada y el sistema de cultivo empleado. Para evitar contaminaciones hay que seguir algunas estrategias tales como: utilización de inóculos altamente concentrados, mantenimiento de una densidad celular óptima en el cultivo, limpieza periódica de los estanques y establecimiento de condiciones específicas que permitan sólo el crecimiento del alga deseada. En el caso de cultivos de *Dunaliella*, las altas concentraciones de sal requeridas limitan el desarrollo de muchos otros organismos.

En el caso del presente proyecto, el problema de la contaminación se hizo evidente desde un principio y ha requerido un gran esfuerzo para paliar sus efectos. En el caso de los cultivos en el laboratorio no se detectaron problemas de contaminación. Tan sólo se observó, en algunos momentos, la aparición de bacterias en las placas de mantenimiento. En estos casos, bastaba con cultivar el alga en el medio mineral básico suplementado con NaCl 5 M durante una semana para recuperar cultivos axénicos. Este tipo de tratamiento se ha mostrado más eficaz que el uso de mezclas de antibióticos. El control de contaminación por bacterias se realizaba rutinariamente cada dos meses en placas de medio Luria (medio rico específico para favorecer el crecimiento bacteriano).

En el exterior si aparecieron graves problemas de contaminación. Los contaminantes de mayor tamaño, como insectos, restos animales o vegetales se eliminaban fácilmente intercalando un filtro o malla de tamaño adecuado dentro del estanque. Sin embargo, el principal problema lo constituyeron los protozoos, que podían destruir un cultivo en menos de 24 h. Los cultivos más envejecidos eran los más susceptibles a este tipo de contaminación. Se detectó la presencia de protozoos ciliados, posiblemente de la subclase *Holotrichia* e *Hypotrichia* que soportaban alta salinidad y depredaban a *Dunaliella*.



Fig. 27. Protozoo observado en los cultivos de *Dunaliella* en el exterior.

Estos protozoos llegaban a consumir un cultivo de 300 L con una densidad celular de 3×10^6 células ml^{-1} en tan solo dos días. También se detectó otro protozoo de la clase *Euplotida*, redondo y más pequeño, pero que parecía alimentarse de bacterias.

Este problema parece genérico de los cultivos a la intemperie que utilizan sal procedente de salinas de la zona sur de la península y ha sido descrito en otras plantas experimentales. Por esta razón y ante la inviabilidad de utilizar sal gema o procedente de salinas de otras regiones, por el encarecimiento de los costos, resultaba prioritario establecer un buen método para controlar esta contaminación.

Tras múltiples ensayos se determinó que los protozoos estaban enquistados en la sal y se desarrollaban al ponerlos en un medio de cultivo en presencia de su alimento natural, *Dunaliella*. Se llevaron a cabo distintas estrategias para su eliminación:

– Agentes físicos:

- Cambios bruscos de temperatura usando termo-calefactores.
- Reducción del oxígeno disuelto por detención del sistema de agitación.
- Filtración del agua de cultivo a través de filtros de 8 μm .
- Tratamiento del medio con luz ultravioleta.
- Esterilización del medio en estufa a 200°C, 1 h.
- Esterilización de la sal en autoclave.
- Ozonización del medio.

– Agentes químicos:

- Ácido acético hasta reducir el pH del cultivo a 5,5.
- P-toluensulfonamida a distintas concentraciones.
- Hipoclorito sódico y tiosulfato.
- Ácidos fuertes añadidos a la salmuera.

De todas estas estrategias tan sólo la última resultó efectiva. El procedimiento consistía en preparar la salmuera a concentración adecuada (2 M), añadir 16,8 ml de ClH (también se podía utilizar NO_3H , 13,5 ml) por cada 50 L de salmuera para bajar el pH a 2, dejar actuar el ácido durante 48 h, neutralizar la salmuera añadiendo $0,6 \text{ g l}^{-1}$ de bicarbonato sódico ($0,4 \text{ g l}^{-1}$ si se utiliza ácido nítrico). Con ello se restituía el pH a 6, siendo el propio cultivo, como resultado de su metabolismo, el que lo recuperaba hasta pH 7. No se podía usar bicarbonato para llevar el pH hasta 7 porque aparecían precipitados. El tratamiento con ácido debía hacerse en tanques independientes a los de cultivo porque se amarilleaba el recubrimiento. Resultaba más operativo y económico preparar la salmuera en su límite de solubilidad, tratarla y, una vez limpia, diluirla y usarla para los cultivos.

Pruebas reiteradas demostraron que este tratamiento, si bien no eliminaba totalmente los protozoos, limitaba su crecimiento y viabilidad, sin que los cultivos se vieran alterados ni en su tasa de crecimiento ni en su contenido en pigmentos.

SISTEMAS DE RECOGIDA DE BIOMASA

La economía de los sistemas de producción de microalgas depende en gran medida de la tecnología empleada para la recogida, concentración y procesamiento de la suspensión de algas. De las muchas técnicas que se han desarrollado y ensayado en las tres últimas décadas, sólo unas pocas son efectivas con unos costos razonables.

La separación de las algas del medio de cultivo presenta grandes dificultades debido a su baja concentración en el mismo, siendo su densidad sólo ligeramente superior a la del agua y teniendo además una carga superficial fuertemente negativa. En la práctica el proceso implica convertir un cultivo muy diluido (0,02 a 0,06% de residuo sólido) en una pasta escurrida que contenga entre 5 y 20 % o más de sólido. La elección del sistema de recogida va a depender de la especie de alga y de su destino final. Por ejemplo, la floculación inducida por productos químicos puede originar productos contaminados con residuos del floculante, la centrifugación puede dañar la integridad del alga, liberando el material celular y afectando la calidad del producto, etc.

En la recogida de las algas hay que tener en cuenta algunas consideraciones tales como, si el sistema de recogida va a operar de manera continua o discontinua, si es necesario algún paso previo de concentración, cuál es el porcentaje de materia seca a obtener y cuáles son los costos de inversión y de consumo energético por unidad de volumen de suspensión de alga. Revisaremos brevemente alguno de estos sistemas:

FILTRACIÓN POR GRAVEDAD

Es el método más simple y económico. Los filtros más usados son arena fina, tierra de diatomeas y fibras de celulosa. El medio obtenido tras la filtración puede ser reutilizado de nuevo. Debido a que las algas colapsan rápidamente el filtro, es necesario lavar éste con frecuencia con lo que el factor de concentración de la biomasa nunca es superior a 10. Todos los métodos basados en el principio de sedimentación tienen una eficiencia baja y, a pesar de que consumen una décima parte de la energía empleada en un sistema de centrifugación, el coste relativo de este sistema de recogida de células es de un orden de magnitud superior que el de la centrifugación.

Además de las técnicas de filtración basadas en la gravedad, se han desarrollado otras donde la eficiencia de la filtración se mejora aplicando vacío o presión. En otros casos, se han utilizado filtros de celulosa moviéndose de forma continua para facilitar el paso del medio a su través, u otros sistemas más elaborados, formados por dos tambores uno que filtra el cultivo, dejando las células en su superficie que después van a ser arrastradas por un sistema de correas hasta un tambor más pequeño donde se succionan y recupera el sólido.

En el caso del alga *Dunaliella*, se han desarrollado distintos sistemas de recogida de este tipo, por ejemplo, haciendo pasar el cultivo diluido por un filtro de tierra de diatomeas y la posterior extracción del β -caroteno con solventes orgánicos a partir de esta tierra. El inconveniente de este sistema es la baja eficiencia de la filtración, la necesidad de lavar la tierra de los restos de algas y la contaminación bacteriana de los filtros (patente de Australia nº 486,999) (Ruane, 1974).

Otro posible procedimiento es la filtración de flujo tangencial (Rose y col., 1992) que utiliza como fuerza directriz una diferencia de presión generada por una bomba. La solución se hace pasar tangencialmente por una membrana que es permeable al solvente y no al soluto. La separación se produce en la superficie de la membrana casi únicamente por un mecanismo físico de separación. El flujo tangencial crea una turbulencia en la superficie de la membrana que disminuye los efectos de polarización y permite la deposición de una capa densa sobre la membrana de filtración dando altas tasas de recuperación. Seleccionando adecuadamente el tamaño de poro de la membrana y la presión a través de ella, se pueden obtener altos caudales de filtrado y buenos rendimientos.

En nuestra planta experimental realizamos estudios preliminares con un sistema de este tipo y los primeros resultados presentaban a este sistema como una alternativa viable para la recogida de *Dunaliella*.

Empleando un cartucho de membranas tipo Minisette serie OMEGA de 0,18 m² con un tamaño de poro de 0,22 μ m y operando en canal abierto se ha conseguido concentrar 10 L de un cultivo con una densidad celular de $2,3 \times 10^6$ cel ml⁻¹ a 0,4 L con 57×10^6 cel ml⁻¹ (factor de concentración de 25) en 48 minutos con un caudal de recogida de 7 - 8 l h⁻¹ manteniendo la integridad celular. El rendimiento se podría optimar cambiando el tamaño de poro de la membrana y colocando varios cartuchos en serie. Además se trata de un procedimiento escalable, ya que las características del proceso de concentración dependen directamente de la superficie de membrana empleada.

Este sistema supone un coste alto de inversión inicial pero con bajos gastos energéticos posteriores y escaso mantenimiento, abriendo grandes perspectivas como sistema alternativo a otros empleados para la recogida de *Dunaliella*, especialmente la centrifugación y la floculación (Mohn y Contreras, 1990).

COLADO Y TAMIZADO

Muchas microalgas de tipo filamentoso o formadoras de colonias se pueden separar usando cribas o tamices de distinto tamaño de trama y diferentes tipos, tales como tamices vibratorios, giratorios, microcoladores o tamices en cascada. La ventaja de este sistema es que se recoge el producto puro, mientras que su desventaja es que muchas microalgas no pueden separarse del tamiz tendiendo a obstruirlo, haciendo necesario el uso de gran cantidad de agua para retirar las células. El producto se concentra sólo 5 - 10 veces, requiriendo un sistema adicional de eliminación de agua. Además, el tamizado suele dejar pasar pequeños contaminantes junto con el medio lo cual impide en muchos casos la reutilización del mismo. Los problemas de corrosión de estos sistemas se han solucionado utilizando materiales plásticos.

Los tamices vibratorios se emplean normalmente para la recogida de *Spirulina*, con una eficiencia de casi un 95%. Sin embargo, este sistema no puede utilizarse en el caso de *Dunaliella*, porque el movimiento vibratorio del tamiz genera un fuerte rozamiento que rompe las células.

FLOCULACIÓN

La separación de la masa de microalgas del medio de cultivo puede simplificarse mucho cuando las células tienen la capacidad de unirse unas a otras formando grumos visibles que sedimentan o flotan. Esta floculación puede ser espontánea, debida a factores asociados al medio de cultivo tales como un cambio brusco en el pH o a asociación con cationes en aguas duras. En general, las condiciones que impiden el crecimiento de un cultivo, facilitan la autofloculación. También se pueden formar agregados de algas por la interacción entre éstas y bacterias o entre algas y polímeros orgánicos excretados. La autofloculación puede ser inducida en los estanques de cultivo mediante distintas manipulaciones, como por ejemplo, interrumpiendo el suministro de CO₂ o añadiendo algún nutriente (NH₄⁺ o PO₄H₃).

La floculación se puede inducir añadiendo productos químicos al cultivo para promover la agregación celular. Los compuestos más efectivos son: sulfato de aluminio, limo, sulfato ferroso y férrico, cloruro férrico, etc. La principal desventaja de este sistema, además del coste de los productos químicos, es su presencia en la biomasa recogida y la contaminación del medio de cultivo que impide su reutilización. Los alumbres (sulfatos de distintos metales) a concentración de 150 mg l⁻¹ son muy eficientes como floculantes químicos para *Dunaliella*. La adherencia del floculante a la superficie de *Dunaliella* no es un problema a considerar si el alga se cultiva para la producción de β-caroteno, ya que éste va a ser extraído con un solvente orgánico dejando los restos del alga contaminados con el floculante.

Los floculantes poliméricos forman redes tridimensionales que se entrecruzan con las células y las sedimentan. Para inducir la floculación por este método debe reducirse

la carga superficial del alga para disminuir las repulsiones electrostáticas. La cantidad de polímero necesaria depende del pH, de la concentración del alga y de la fase de crecimiento del cultivo. Así, es más eficiente a pH bajo y cuando el cultivo está en fase estacionaria. Este tipo de floculantes son más adecuados que los químicos cuando la biomasa va a utilizarse como alimento o pienso ya que las concentraciones utilizadas son mucho más bajas, pudiendo además encontrar floculantes no tóxicos e incluso comestibles como es el caso del "quitosan", carbohidrato natural obtenido de la acetilación de esqueletos quitinosos de artrópodos marinos, especialmente útil para la recogida de *Spirulina*.

Sandbank y col. (1974) describieron un proceso de electrofloculación en el cual se generan pequeñas burbujas de hidrógeno mediante electrólisis. Como el hidrógeno es ligero e insoluble, flota, arrastrando con él las algas floculadas. Este proceso es útil en agua de alta salinidad. Este mismo principio se puede aplicar con burbujas de aire disuelto. Los acúmulos de algas flotantes son más fáciles de recoger que cuando se depositan en el fondo de los estanques.

La bibliografía recoge un método de floculación para la recogida de *Dunaliella salina* basado en la naturaleza hidrofóbica de la membrana celular (PCT/AU82/00165) (Curtain y Snook, 1983). Cuando las algas están en contacto con una solución de cloruro sódico superior a 3 M pueden adsorberse sobre sustancias de superficie hidrofóbica, permitiendo separar el alga de una manera rápida y económica del medio salino. A concentraciones de sal bajas, la superficie de *Dunaliella* se hace polar y pierde su capacidad de adsorción permitiendo la recuperación del alga. El cambio de comportamiento hidrofílico a hidrofóbico no es brusco, ocurre a una concentración de NaCl de 3 M y por tanto las células no resultan dañadas. Atendiendo a este criterio, se han registrado al menos 18 métodos utilizando un adsorbente distinto en cada caso. Polímeros orgánicos: polietileno, nylon o teflón; minerales en polvo: calcopirita, hematita, magnetita, etc. y otros compuestos tales como perlas o fibras de vidrio con un tratamiento previo con silano o silicona para conferirle la naturaleza hidrofóbica. Se pueden acopiar técnicas de filtración con las de floculación para aumentar el rendimiento. La principal limitación de este sistema de recogida es que el proceso sólo es efectivo cuando las células están en la forma de cistos.

SEPARACIÓN FOTOTÁCTICA

Se basa en la capacidad que tienen algunas microalgas móviles de desplazarse hacia una fuente de luz de una determinada longitud de onda o intensidad. Es difícil diseñar un sistema que funcione en grandes instalaciones en el exterior ya que implicaría una iluminación controlada de grandes superficies, suponiendo un costo de inversión altísimo. Recientemente se ha diseñado un método de concentración para *D. salina* basado en la capacidad de fototaxis y quimiotaxis de este alga (Fernandes y col., 1997). En este sistema se emplea un difusor circular que deposita una fina capa de agua pura sobre la superficie del cultivo, donde las células de *Dunaliella* tienden a concentrarse debido a la menor densidad y mejor iluminación, aumentando su concentración en esta zona. Este mismo difusor, utilizado como una bomba de succión permite

drenar las células concentradas. Este sistema puede concentrar el cultivo 8 veces con una recuperación de biomasa del 75% en un ciclo de estratificación, y realizando dos ciclos consecutivos puede concentrar la biomasa 6 veces con una recuperación del 90%. Este procedimiento representa una alternativa por su bajo costo en equipos y consumo energético así como por la capacidad de reutilización del medio de cultivo. Este sistema está en fase experimental y sólo se ha ensayado en estanques de pequeña superficie (2,2 m²). Sin embargo, Borowitzka y Borowitzka (1989) consideran que este sistema no es aplicable a gran escala debido a la alta viscosidad del material a filtrar y a la presencia de otras partículas en el cultivo que contaminan la biomasa recogida.

CENTRIFUGACIÓN

Es el método más directo y aplicable a todo tipo de microalgas tanto filamentosas como unicelulares. Su principal ventaja es la simplicidad y que el producto obtenido no contiene ningún compuesto químico. Sin embargo, implica elevados costos de inversión y alto consumo energético (1 kWh m⁻³) que desaconseja su uso cuando la biomasa a recoger no alcanza un precio elevado en el mercado. Originariamente se emplearon centrifugas de discos que actualmente se han reemplazado por las centrifugas de decantación, más baratas y fáciles de mantener. De los muchos tipos de centrifugas existentes en el mercado, sólo cuatro se han ensayado para la recogida de microalgas:

- Centrifuga de cámara. Especialmente utilizada cuando se trata de recoger cultivos poco concentrados. Los intervalos de descarga son de 2 h recogiendo 5 m³ h⁻¹ y concentrando la biomasa un 20%.
- Separador de plato. Estas centrifugas, que eliminan por sí mismas los lodos, se emplean en distintos procesos industriales cuando se trata de separar fases líquidas con pequeñas diferencias de densidad. Pueden operar continuamente durante largos periodos de tiempo. La descarga del concentrado es discontinua y se puede controlar de manera manual o automática.
- Centrifuga de tobera. Es muy semejante a la anterior, pero la descarga de lodos es continua a través de una tobera instalada en la periferia originando un producto más homogéneo. Necesita la instalación de algún tamiz previo a la centrifuga para eliminar partículas contaminantes de tamaño considerable y evitar la obstrucción de la salida. La concentración de sólidos es sólo un factor de 10 - 20, pero supone un costo de inversión menor que en el caso de la centrifuga de platos para una misma capacidad, obteniendo mayor contenido en materia seca ya que permite hacer varios ciclos de centrifugación para una misma biomasa.
- Decantador. Permite obtener las fracciones de sólido más concentradas. Se emplean fundamentalmente en las plantas de aguas residuales. Requieren poco mantenimiento y pueden operar durante largos periodos de tiempo, pero no son aplicables a todos los tipos de algas.

En nuestra planta experimental se ha ensayado una centrifuga de platos con tobera de descarga automática de sólidos marca Westfalia Separator AG tipo OSC 4-91-006, con un caudal mínimo de alimentación de $0,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, con una capacidad del recinto de sólidos de $0,85 \text{ dm}^3$, con un sistema previo de filtros de $800 \mu\text{m}$ y $300 \mu\text{m}$ para retirar insectos, larvas, polen y otros contaminantes.



Fig. 28. Centrifuga de platos instalada en la planta experimental del CICEM "Agua del Pino"

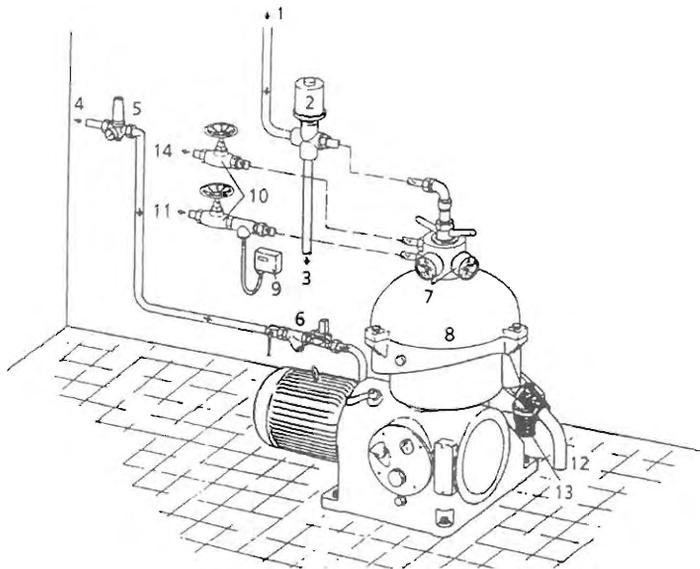


Fig. 29. Esquema de instalación de centrifuga de platos ensayada en nuestra planta experimental.

- 1) alimentación de producto, 2) válvula de tres vías, 3) tubería de retorno, 4) entrada de agua de maniobra, 5) reductor de presión de agua, 6) accesorios de alimentación con electroválvula, 7) manómetro, 8) cuerpo de la centrifuga, 9) presostato, 10) válvula de cierre, 11) descarga líquido pesado, 12) salida agua de maniobra, 13) salida de lodos, 14) descarga líquidos ligeros.

El sistema de platos de este tipo de centrifuga está formado por gran cantidad de platos troncocónicos superpuestos. Cada plato dispone de unos nervios distanciadores que forman entre los distintos platos unos intersticios estrechos perfectamente definidos. Es decir, el recinto de centrifugación está formado por un conjunto de numerosos espacios paralelos de escasa altura, de manera que el producto debe recorrer un trayecto de sedimentación radial muy corto. Los sólidos se acumulan en la pared superior de cada uno de los intersticios y se deslizan fácilmente hacia el recinto de sólidos. La superficie lisa de los platos favorece el deslizamiento de los sólidos y la autolimpieza de los platos. El líquido clarificado se descarga por la salida de líquido ligero (14).

Si bien el caudal de recogida es alto y el clarificado del medio óptimo, el análisis de los lodos recuperados mostraba una fragmentación de las células y, por tanto, la liberación de su contenido celular con la consecuente oxidación de los pigmentos. Esto ha hecho inviable, hasta el momento, la utilización de este sistema de recogida para *Dunaliella* en nuestras instalaciones. Se ha descrito que una reducción en la gravedad específica del cultivo antes de su recogida y un ajuste en la configuración de la centrifuga reduciría este inconveniente (Mackay, patente Australia nº 81507/87).

Como alternativa se ha optado por la utilización de una centrifuga de similares características a la anterior pero sin el sistema de la descarga automática de la biomasa (modelo Westfalia KA-2-86-075). Esta centrifuga opera a un caudal de 400 L h⁻¹, rindiendo un clarificado transparente (retención del 100% de las células) y una pasta de células intactas. El inconveniente de este sistema es que la recogida de la biomasa retenida en los platos de la centrifuga debe realizarse de forma manual parando el sistema.

Periódicamente aparecen artículos científicos que constatan el elevado costo que implica la centrifugación como sistema para la recogida de la biomasa de un cultivo masivo de *Dunaliella*, así como la necesidad de encontrar alternativas a este sistema para reducir costos. Sin embargo, se han realizado algunos estudios bioeconómicos (Becker, 1994) comparando la centrifugación con la floculación, demostrando que la diferencia entre los dos métodos es muy pequeña. Así, empleando una centrifuga separadora de platos de autolimpieza y teniendo en cuenta todos los gastos en energía, equipamiento, etc., se ha estimado que el costo medio para recoger 1 kg de biomasa es de 1,71 \$ USA. En el caso de la floculación, considerando igualmente todos los gastos en reactivos y equipamiento, la estimación es de 1,39 \$ USA por kg de biomasa. Por tanto, la decisión entre un sistema u otro no debe ser exclusivamente el criterio económico. Una centrifuga es fácil de manipular, proporciona siempre un producto de la misma calidad y su eficiencia no depende del medio de cultivo, ni de cambios climatológicos ni de cualquier otro factor que altere las propiedades físico-químicas del alga. Sin embargo, la clarificación no es total y además la descarga de lodos suele dañar la integridad de las células, lo que obliga a un rápido procesado de esta biomasa para evitar que se pierda. La floculación no tiene este inconveniente, pero es un proceso más complejo en cuanto a su manipulación y la calidad del producto va a depender de cambios en las condiciones del cultivo haciendo necesario un continuo ajuste

del proceso y, por tanto, un personal experto y cualificado. Otro inconveniente de la floculación es la presencia de contaminantes en la biomasa, de difícil eliminación, que persisten en el medio tras la separación de las algas dificultando su reciclado.

En la actualidad, los productores industriales de tipo extensivo utilizan como sistema de recogida la floculación. Es el caso de Betatene Ltd. donde el alga se concentra hasta $0,1 \text{ g l}^{-1}$ y el volumen que se recoge al día es superior a 20.000 m^3 . En las plantas intensivas, el método empleado para la recogida de *Dunaliella* es la centrifugación. Nature Beta Technology Ltd. utiliza una centrifuga de flujo continuo de descarga automática que opera a 15.000 rpm recogiendo $15 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ o a 5.000 rpm con un flujo de $1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. La pasta obtenida tiene un 20% de peso seco.

PREPARACIÓN DEL PRODUCTO FINAL

Para la mayor parte de las aplicaciones finales de la biomasa recogida, se necesita obtener un producto que contenga menos de un 10% de agua, ya que la humedad contribuye al deterioro de la biomasa del alga al permitir un cierto crecimiento de bacterias y hongos. Hay que distinguir entre el agua que recubre la materia viva en forma de capa de hidratación, que no permite mantener ningún proceso biológico (< 2% humedad), y contenidos en agua superiores que sí permiten el crecimiento de microorganismos. Un contenido en humedad del 7% es adecuado para mantener la asepsia de la biomasa recogida. Salvo cuando el destino final de la biomasa es para pienso de ganado o para acuicultura, el proceso de secado es de los más importantes en la producción de algas y supone un 30% del coste total de la producción y la principal limitación económica (junto con el sistema de recogida) para la producción de compuestos que no alcancen un elevado precio en el mercado.

Se han diseñado distintos sistemas de secado. La selección de uno de ellos depende de las características del alga, la escala de operación y el uso final del producto seco.

- Secado al sol. Es el sistema más sencillo y barato pero es muy lento y depende de la climatología, existiendo un alto riesgo de que la biomasa se deteriore por procesos de fermentación mientras se está secando. Debido a que el proceso tiene lugar a baja temperatura no se produce la pasteurización ni esterilización de la biomasa, y esto es importante cuando se va a utilizar para consumo humano. Tampoco se produce la rotura de la pared externa de celulosa necesaria para hacer digerible esta biomasa vegetal. Aunque, en principio, se puede emplear para cualquier microalga, lo cierto es que sólo se utiliza en el secado de *Spirulina* y en explotaciones ubicadas en países en desarrollo.
- Secador solar. Es también muy barato. En su forma más simple, se trata de una caja de madera con la superficie interior pintada de negro y cubierta con un cristal de 2 mm, originándose en el interior una temperatura de 60 - 65°C. El cristal puede sustituirse por placas de PVC, aumentando así la temperatura. Existe un flujo de aire debido a pequeños orificios en el fondo de la caja que facilitan el secado. La eficiencia también se incrementa colocando el secador en posición inclinada.
- Secador de tambor. Requiere un alto costo de inversión y consumo energético, pero es la mejor alternativa para obtener un producto completamente digerible y

seguro desde el punto de vista bacteriológico. El principio de este sistema de secado es la aplicación de la pasta húmeda sobre un tambor giratorio, chapado en cromo y calentado. El material se calienta durante algunos segundos y la deshidratación rompe la pared celular. Existen dos tipos de tambores según el método para depositar la pasta sobre el sistema: en el primer tipo, el material se pulveriza a través de una fina tobera sobre un tambor giratorio, pero la distribución no es homogénea y el sistema de pulverización se colmata. En el segundo tipo, el material se deposita en una pequeña abertura formada entre dos tambores girando en sentido inverso. Si la velocidad de alimentación en este sistema es demasiado rápida las algas se pueden sobrecalentar antes de que se depositen sobre el tambor, destruyéndose sus componentes.

Las principales desventajas de este sistema son: que requiere gran cantidad de energía, la superficie del tambor debe mantenerse pulida y las cuchillas que retiran la biomasa seca deben afilarse con mucha frecuencia. Los estudios nutricionales indican que el producto obtenido por este sistema es un polvo excelente, fácilmente digerible. Se puede emplear con todas las microalgas a excepción de *Spirulina* porque le confiere un gusto amargo.

- Secador por micropulverización en contracorriente de aire caliente (spray dryer). Es en la actualidad el método más usado para todas las microalgas, incluida *Dunaliella*. En este sistema, una bomba peristáltica toma el líquido desde el recipiente que contiene una suspensión concentrada y lo dirige a través de un propulsor de pequeño diámetro colocado en la cámara principal. Al mismo tiempo, un compresor bombea aire caliente en la parte superior del propulsor.

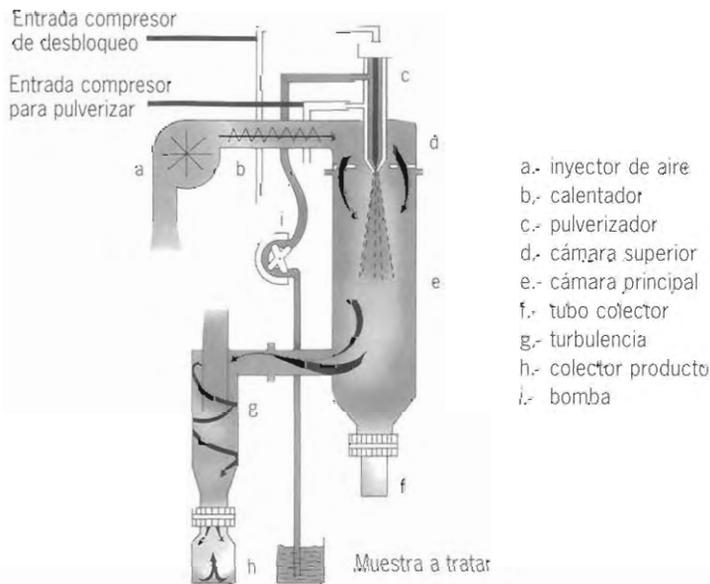


Fig. 30. Sistema de secado por "spray". Mecanismo de funcionamiento y componentes principales.

La proximidad del aire y el líquido, hace que este último emerja como un pulverizado atomizado y muy fino. La inyección de aire caliente a través de la cámara principal **e**, evapora el contenido líquido del pulverizado, dejando las partículas sólidas del material flotando libremente. La turbulencia generada por una corriente de aire en el tubo **g** arrastra estas partículas y las deposita ya secas en un contenedor, **h**. El aire se libera a la atmósfera a través del tubo **f**.

Este sistema tiene una eficiencia y costo similar al de tambor, requiriendo una pasta menos concentrada y dando un producto en polvo muy fino y uniforme, aunque, menos digerible, ya que la temperatura que se alcanza dentro de las gotas pulverizadas es más baja y el tiempo de secado más corto. Esto no es un inconveniente en el caso de *Dunaliella* ya que la ausencia de pared celular la hace perfectamente digerible sin ningún tipo de tratamiento. El producto tiene menos de un 5% de humedad. El sistema puede provocar el deterioro de alguno de los componentes del alga, por ejemplo, pigmentos y vitaminas. La mayor sensibilidad del 9-*cis*- β -caroteno a la oxidación y a la destrucción térmica puede provocar su pérdida, haciendo necesario el uso de compuestos antioxidantes y trabajar en atmósfera anaerobia y ausencia de luz durante el proceso de secado (Bauernfeind, 1981). En nuestra planta experimental se están realizando algunos ensayos previos con este sistema de secado, concretamente con un Spray Dryer SD-04 marca Lab Plant.

Existen otros posibles sistemas de secado pero sólo se han ensayado en el laboratorio y no son válidos para cultivos a gran escala. Entre estos métodos está la criopreservación, sistemas de vacío y de flujo de aire, etc.

COMERCIALIZACIÓN

Un aspecto fundamental para la comercialización de un producto de origen natural es asegurar la ausencia de efectos tóxicos y secundarios que pudiera producir su utilización. En este sentido el "Protein Advisory Group" (PAG) de Naciones Unidas ha publicado una guía a seguir para asegurar que los productos derivados de cualquier alga sean inocuos. Se debe comprobar el efecto sobre el peso corporal, el peso de distintos órganos, la capacidad de reproducción, la cantidad y composición de la sangre, etc. Así mismo, se debe analizar el contenido en metales pesados y ácidos nucleicos del alga que se suministra. Por último, es necesario establecer la dosis que se debe consumir para obtener los efectos deseados y realizar todos los ensayos mencionados con concentraciones de producto iguales o superiores al valor establecido.

Todos estos ensayos se han realizado con *Dunaliella bardawil* (Mokady y col., 1989), verificándose que no existen diferencias significativas respecto a ninguno de los parámetros corporales, medidos entre animales controles y animales con una dieta que contenía el alga. El contenido en metales pesados y ácidos nucleicos era inferior al mínimo permitido. Esta ausencia de efectos negativos sobre animales puede ser indicativo de la inocuidad de *Dunaliella bardawil* para el consumo humano. Se ha estimado que la ingesta humana de *D. bardawil* deshidratada no debe exceder de 10 - 20 g diarios, especialmente si sólo se desea consumir el alga como fuente de β -caroteno natural. Esta cantidad es equivalente a un consumo medio de 200 mg de pigmento por Kg de peso corporal y día (Mokady y col., 1989).

Existen tres destinos finales para el β -caroteno obtenido a partir de *Dunaliella*: como colorante alimenticio, como pienso y en la industria dietética. Estos usos y los potenciales terapéuticos ya han sido descritos en capítulos anteriores.

Desde 1985, está disponible en el mercado *Dunaliella* en forma de polvo y el extracto de β -caroteno en solución oleosa (Borowitzka y Borowitzka, 1989). El extracto purificado de β -caroteno se vende en aceite vegetal, bien en concentrados a granel que contienen entre un 1 y un 20% de pigmento, o bien para usos individualizados en forma de geles blandos que contienen 5 mg de β -caroteno. Debido a que el proceso de purificación durante la extracción no es completo, el β -caroteno suele estar acompañado por otros carotenoides, fundamentalmente luteína, neoxantina, zeaxantina, violaxantina, criptoxantina y α -caroteno, hasta un 15% del total del extracto. También se pueden encontrar en el mercado polvo granular de β -caroteno microencapsulado (2 - 7,5%) y

cristales de β -caroteno empaquetados al vacío o en atmósfera de nitrógeno. Una amplia variedad de estas formulaciones se distribuyen en todo el mundo dentro del mercado de "alimentos dietéticos" o "complementos nutritivos".

Finalmente, otra fórmula de comercialización de *Dunaliella* es como polvo seco, células del alga recogidas y secadas para su venta, en forma de tabletas o cápsulas que contienen entre 3 y 20 mg de β -caroteno por unidad. Para evitar la oxidación del pigmento, las tabletas están recubiertas de azúcar y las cápsulas se empaquetan por separado en ampollas de aluminio/polietileno. Estas fórmulas de *Dunaliella* seca tienen un amplio mercado en Japón y otros países del Lejano Oriente, donde existe una amplia tradición en el consumo de algas (Ben-Amotz, 1999a).

PRODUCTIVIDAD

Cualquier iniciativa que emplee cultivos de microalgas a la intemperie, con objeto de producir biomasa o compuestos de interés, está sujeta a limitaciones en cuanto a la productividad. Ésta va a depender, entre otros factores, de la disponibilidad de luz solar, características fotosintéticas del alga, disponibilidad de nutrientes, temperatura y características del cultivo. En los cálculos de productividad máxima bajo condiciones naturales, se establece un límite superior del orden del 3% (25 g de biomasa $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) para la eficiencia de conversión biológica de la luz solar. Habría que tener en cuenta que las células sólo absorben efectivamente una fracción del espectro de la luz incidente (400 - 700 nm), menos de la mitad de la energía solar recibida. Además, entre otras, se producen pérdidas por dispersión y refracción de la luz incidente (10%), saturación luminosa (60%), respiración y fotorrespiración (5%), fotoinhibición (10%) y limitaciones por temperatura (20%).

Se puede considerar que el objetivo central de un sistema de cultivo de algas consiste en lograr la mayor eficiencia fotosintética, traduciéndose en la obtención de máxima productividad de biomasa. Sin embargo, en el caso de que la tecnología esté enfocada a producir un determinado bioproducto, el objetivo operacional básico consiste en optimizar la tasa de producción del alga, pero desde una doble perspectiva: como biomasa y como fuente del compuesto deseado. Esto presupone una adecuada gestión del cultivo masivo, en base a modelos predictivos, que deben establecerse para cada tipo de cultivo y condiciones concretas de aplicación. Un buen ejemplo de esta disyuntiva lo constituye el cultivo de *Dunaliella* para obtener β -caroteno, ya que el objetivo básico no es optimizar la productividad de biomasa del alga, sino la máxima producción del pigmento, aún a expensas de dicha biomasa.

Los estudios más recientes establecen como valores de productividad máxima unos 500 mg de β -caroteno $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, aunque la productividad promedio a lo largo de un año baja a 200 - 250 mg $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ (Ben-Amotz, 1999b). Como el contenido en pigmento es aproximadamente un 5% del peso seco del alga, se puede estimar que los correspondientes valores de productividad en biomasa son de 10 y 4 - 5 g de peso seco del alga $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente. Si se cultivase el alga en sus condiciones óptimas podría obtenerse hasta 20 g de células m^{-2} y día^{-1} , pero con muy bajo contenido en pigmento.

Basándose en estudios de laboratorio, que establecieron que carotenogénesis y crecimiento celular son dos procesos biológicamente diferenciados en *Dunaliella*, con mecanismos de control diferentes, junto a que la biosíntesis del pigmento puede inducirse fisiológicamente en cualquier etapa del ciclo celular (Shaish y col., 1992), se ha diseñado un sistema de cultivo en dos fases, aplicando las ventajas del efecto sinérgico de alta irradiancia, deficiencia en nitrato y baja densidad celular para obtener mayor productividad en pigmento (Ben-Amotz, 1995). En una primera etapa, las células se cultivan en un medio rico en nitrato para conseguir una densidad celular de $0,8 \pm 0,2$ millones de células ml^{-1} , con una concentración de pigmentos de $20 \pm 4 \mu\text{g ml}^{-1}$. Cuando se alcanza este nivel, el sistema de control establece la transferencia del cultivo, de manera suave y no destructiva, mediante bombas de alto flujo, a los estanques de la segunda fase. Aquí, el cultivo se diluye hasta una concentración de $0,2$ millones de células ml^{-1} . Para la dilución se emplea medio deficiente en nitrato. En pocos días, el cultivo alcanza $0,5 \pm 0,1$ millones de células ml^{-1} con una concentración de β -caroteno de $15 \pm 3 \mu\text{g ml}^{-1}$.

La productividad de β -caroteno es mayor en los estanques de crecimiento ($450 \pm 75 \text{ mg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) que en los de producción ($300 \pm 50 \text{ mg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), pero el nivel intracelular de pigmento es mayor en estos últimos ($30 \text{ pg célula}^{-1}$, frente a los 25 pg en los estanques de crecimiento). Estos valores son los más elevados publicados hasta la fecha.

Para mantener tasas de productividad tan altas, el tiempo de reciclaje debe ser muy corto siendo además necesario que los estanques se limpien completamente al final de cada ciclo (cada 15 días los de crecimiento y cada 5 días los de producción). Todo ello requiere que la planta funcione con criterios de alta tecnología, incluyendo el control informático de todos los procesos que se llevan a cabo.

DISEÑO FINAL DE NUESTRA PLANTA EXPERIMENTAL

Cada una de las compañías que en la actualidad comercializa *Dunaliella* ha desarrollado y adoptado su propia tecnología de cultivo del alga. En la mayoría de los casos, esta tecnología está sujeta a secreto comercial y en algunos casos se encuentra patentada. Sin embargo, se dispone de alguna información sobre su diseño y productividad que puede servir de referencia en nuestro intento de trasladar estas tecnologías al litoral andaluz. Revisaremos brevemente dos tipos de estas plantas industriales de producción:

Cognis Nutrition and Health (antes Betatene Pty Ltd). En 1978, y después de un reconocimiento de los lagos salados costeros e interiores y de las salinas de Australia, se seleccionó un lugar cercano al lago Hutt para la instalación de una planta experimental (latitud 28° S, a 600 Km al norte de Perth, en Australia Occidental). El clima es subtropical, con pocas precipitaciones, casi siempre concentradas en los meses de invierno, temperaturas cálidas y pocos días nublados. El lago Hutt, de 13 × 3 Km, está seco en verano, pero en invierno se transforma en una laguna poco profunda e hipersalina conteniendo poblaciones naturales de *D. salina*. Tras un estudio preliminar de las características de la salmuera y de la productividad de las estirpes autóctonas se comenzó la construcción de los tanques experimentales en el lecho seco del lago. Se construyeron estanques excavados en la tierra de 10 y 100 m² de superficie y 30 cm de profundidad, utilizando arcilla local con fragmentos de piedra caliza, compactado directamente por la sal seca y costras de yeso procedentes del lago. Se registraron pequeñas filtraciones de cultivo a través de las paredes hasta que se estabilizó la arcilla. Estas filtraciones y el rebosado debido a las lluvias supuso inicialmente un grave problema en los estanques más pequeños, por su mayor relación perímetro/volumen. También la turbidez del cultivo por desprendimiento de arcilla de las paredes representó un problema importante en pequeños volúmenes, pero poco significativo en los estanques de 20.000 L. El paso de los sistemas de 1 m² a los de 10 m² no supuso grandes cambios en los sistemas de bombeo. Sin embargo, para los estanques de 100 m² se requerían inóculos de 2000 L que hicieron necesaria una experimentación adicional, para establecer los sistemas de bombeo idóneos y el diámetro óptimo de las tuberías (pequeña sección de las tuberías y el uso de bombas centrífugas rompían las células).

La mezcla de nutrientes era relativamente fácil en los estanques más pequeños, incluso podían añadirse en forma sólida y agitar manualmente. Para conseguir una buena

distribución de nutrientes en estanques grandes con sólo el viento como forma de agitación se hizo necesario un estudio detallado sobre la orientación, forma, altura de las paredes y profundidad de los cultivos, así como de los sistemas para disolver nutrientes y distribuirlos en solución. Se comprobó así que un exceso de nutrientes en el cultivo provocaba su precipitación y la profundidad excesiva reducía la productividad y aumentaba la contaminación. Se consideró además eliminar la costra de las paredes de los estanques y restaurar las mismas cada cierto tiempo. Entre 1980 y 1983 se amplió la planta con estanques de 250 y 600 m². En estos sistemas se estableció que la concentración de sal en los cultivos debía ser de 3,5 M y los nutrientes estar en concentración limitante, controlándose así mejor los predadores y competidores. También se ensayaron distintos sistemas de recogida del alga. No describiremos ahora cómo evolucionaron estos estudios, por complejos y tediosos, pero sí que el sistema adoptado finalmente como óptimo fue la separación de las células de *Dunaliella* por un proceso puramente físico, sin aditivos químicos, permitiendo procesar un millón de litros de salmuera por hora.

En 1984 se completó la construcción de los estanques a escala piloto (diez veces menores que los previstos para los de producción comercial, 5.000 m²), ensayándose distintas formas y orientaciones que no evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la productividad. Se estableció como óptimo un sistema de cultivo semicontinuo con limitación de nutrientes y alta salinidad. Se puso a punto también el sistema de recogida de la biomasa mediante floculación, así como los procesos de extracción y preparación del β -caroteno para su comercialización. Se realizaron los primeros estudios de mercado sobre posibles consumidores finales, competidores y precio del producto.

A mediados de 1986, la compañía de investigación Westfarmers Algal Biotechnology fue adquirida por una compañía pública, la Western Biotechnology Ltd., comenzando la producción comercial de *Dunaliella* en 5 estanques de 5 ha cada uno, aplicando la experiencia acumulada en la planta experimental, respecto a construcción y orientación. El sistema de tuberías se instaló en superficie, al objeto de detectar y reparar fácilmente posibles fugas. Las adiciones de agua y medio se efectuaban por la parte sur de los estanques para facilitar su distribución en base a vientos predominantes. Cada estanque contenía entre 10 y 15 millones de litros de cultivo y el medio se recogía una vez al año, trasvasándose a estanques especiales para un tratamiento previo a su reutilización. Durante el invierno, la salmuera se suministraba directamente del lago y en el verano desde el océano Índico, a través de un sistema de tuberías. Los nutrientes se preparaban en tanques separados de 50.000 L, distribuyéndose mediante un sistema de bombas y tuberías a los de cultivo. Los estanques se vaciaban por gravedad hasta un canal y de ahí se bombeaba hasta el sistema de recogida de células. Mediante un sistema de multisonda se muestreaba en varios puntos a lo largo del estanque, para controlar en todo momento el crecimiento de las células y la producción de carotenoides.

El salto de un orden de magnitud en el factor de escala afectó en gran medida al sistema de recogida y extracción del producto, siendo necesario un reajuste. Además,

en este punto se pusieron de manifiesto los graves problemas de corrosión que se generan en ambientes con una salinidad tan extrema, haciendo necesario un programa de mantenimiento preventivo.

La primera producción comercial consistió en una suspensión con un 1% de β -caroteno en aceite de soja. Pero los requerimientos del principal distribuidor japonés obligaron a cambiar el aceite de la suspensión, a realizar un estudio que demostrase que el producto se ajustaba a las regulaciones del gobierno japonés, así como a aumentar la concentración de β -caroteno en el producto final.

Aun con graves problemas, en 1987 comenzó la venta regular de los productos de esta compañía en el mercado japonés. El trabajo experimental, sin embargo, no ha cesado todavía, intentándose mejorar la forma de cultivo, estimular la producción del pigmento y reducir sus pérdidas durante el proceso de recogida y extracción.

En la actualidad la compañía cuenta con 830 ha de cultivo y procesa 1 millón de litros de suspensión de células por hora. El alga concentrada se envía en contenedores a Melbourne, donde se procesa definitivamente para su comercialización (Booth, 1999)

No se dispone de una información tan exhaustiva de la puesta a punto y operación de la planta comercial de **Nature Beta Technologies Ltd.**, con un sistema de producción intensivo. Esta planta, con estanques de forma rectangular está ubicada a las afueras de la ciudad de Eilat, al sur de Israel. La planta incluye 20.000 m² de estanques para el mantenimiento del alga, 50.000 m² de estanques de producción y 25.000 m² de tanques para el reciclado de la sal. El sistema controla por medios informáticos todas las variables importantes: pH, profundidad, temperatura, CO₂, aporte de nutrientes, volumen de entrada y salida de medio, funcionamiento de bombas y paletas y recogida de la suspensión de alga. Los estanques tienen 150 m de largo, 10 m de ancho y una profundidad de 20 cm. Longitudinalmente están divididos por un tabique central que deja dos calles de 5 m cada una. Hay un único sistema de paletas por cada estanque, con 6 brazos, que genera una velocidad lineal de 15 cm s⁻¹. Se emplean dos sistemas de operación: cultivo en una fase o cultivo en dos fases. En el caso convencional, en una única fase, la producción de biomasa y de caroteno transcurren simultáneamente. En el caso de dos etapas, las células se cultivan con exceso de nitrógeno para aumentar inicialmente la biomasa; después, la suspensión celular se transfiere a los estanques de producción, en ausencia de N. Esto detiene el proceso de división celular, aumentando la producción de β -caroteno. Esta forma de cultivo en dos etapas permite que la planta opere de manera intensiva todo el año, con menores concentraciones de sal y mayores productividades, aunque en invierno las bajas temperaturas pueden reducir esta producción. Las células se recogen mediante una centrífuga de flujo continuo con descarga automática. Uno de los principales problemas es la destrucción parcial de las células por la entrada de aire en la cámara de la centrífuga. Normalmente, se consigue una pasta de alga de más del 25% de peso seco de alga, quedando el medio libre de células en más de un 90%.

La pasta obtenida tras la centrifugación se seca en un "spray dryer", quedando el polvo resultante pasteurizado por efecto de la temperatura.

Esta planta opera a 2 M de sal. Debido al alto costo que supone mantener esta concentración utilizando sal nueva en cada inóculo, se ha optado por su reciclaje. Para ello, se emplean tanques en los que se efectúa la oxidación biológica del medio recogido, añadiéndose agua de mar que compense las pérdidas de sal.

Otro aspecto fundamental en la operación de esta planta es el estricto control del pH, cuyo valor se reduce mediante inyección de CO₂ gaseoso, para mantener el cultivo a pH 7,3 ± 0,3 o por adición directa de HCl cuando el pH supera el valor de 8,0. El sistema de control de pH está también informatizado. Para una salinidad de 2 M, el carbono disuelto se mantiene en torno a 3 mM.

Siguiendo el modelo de las instalaciones pioneras en la tecnología para el cultivo de *Dunaliella*, el diseño de nuestra planta experimental en el CICEM se ha planteado como un conjunto de estanques de distinto tamaño, en los que gradualmente se traslada el proceso desde el laboratorio hasta conseguir llegar a la escala comercial, en varias etapas, teniendo en cuenta aspectos biológicos, químicos y de ingeniería de procesos. En este sentido, nuestro trabajo se ha dirigido a la puesta a punto de la producción de β-caroteno por *Dunaliella* desde trabajos de carácter muy básico en el laboratorio hasta alcanzar el nivel de planta experimental de 8.000 L, optimizando el proceso para las condiciones ambientales específicas de la zona.

El diseño de la planta experimental se visualiza en la fotografía y esquema siguientes. Dado que los distintos elementos que la constituyen (estanques, sistemas de agitación, sistemas de control, etc.) se han ido describiendo en cada uno de los correspondientes apartados, sirva este esquema como resumen y ubicación en el espacio de cada uno de sus componentes:



Fig. 31. Vista general de la planta experimental del CICEM "Agua del Pino".

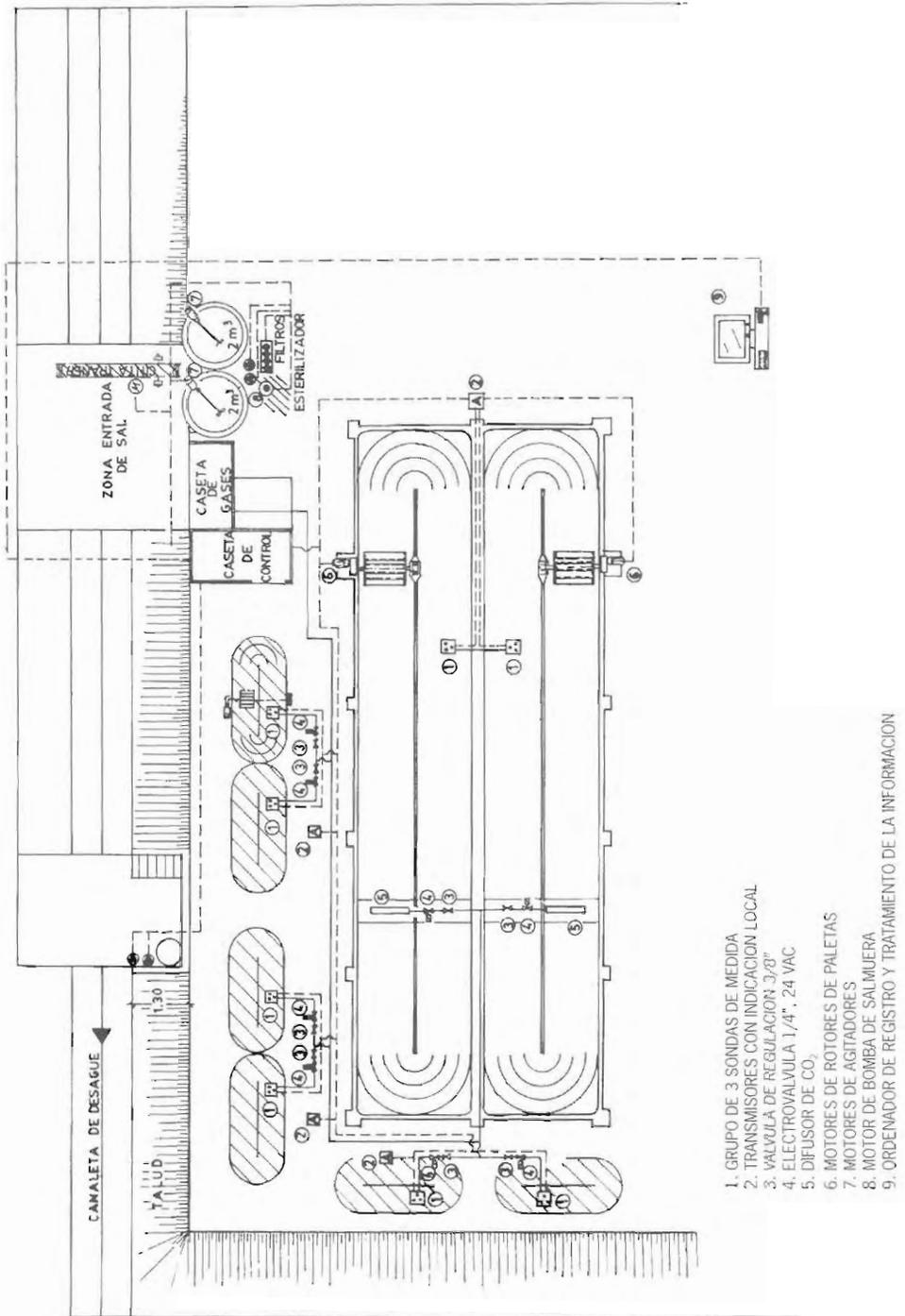


Fig. 32. Esquema de componentes de la planta experimental del CICEM "Agua del Pino".

Los procesos que, en operación completa, se desarrollarían en la planta experimental, incluyendo tratamiento, recirculación y control del medio de cultivo, se recogen en el siguiente esquema:

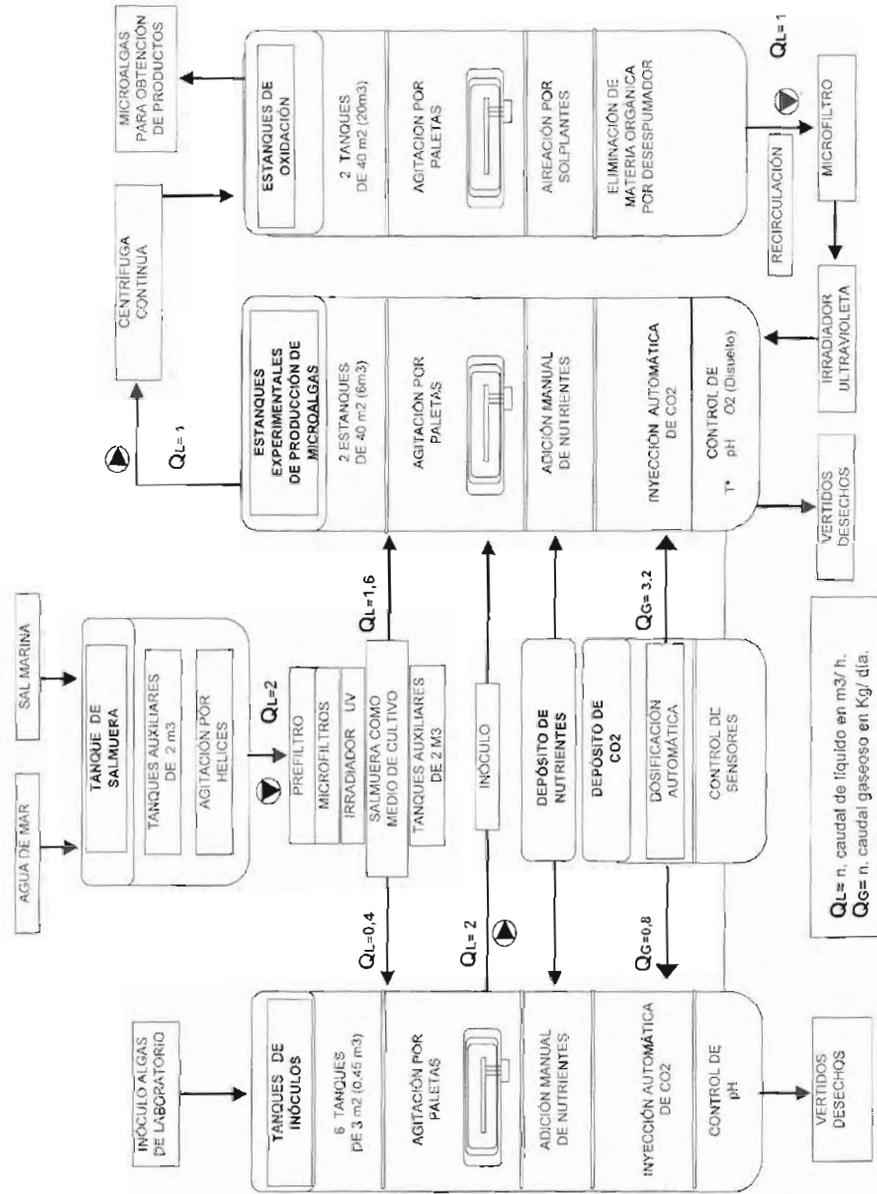


Fig. 33. Diagrama del funcionamiento de la planta del CICEM que recoge las diferentes etapas del proceso de producción de *Dunaliella* a escala experimental.

METODOLOGÍA

Nuestro trabajo durante los 2 primeros años de desarrollo del proyecto consistió fundamentalmente en la puesta a punto de las metodologías necesarias para la extracción y cuantificación de carotenoides totales, su separación y análisis por *HPLC*, así como la evaluación del crecimiento del alga. Igualmente, se establecieron en el laboratorio las condiciones óptimas para el crecimiento de esta microalga y la acumulación de pigmento en relación a requerimientos nutricionales, luz, pH, etc. Se recogen a continuación algunas de estas metodologías:

Análisis de pigmentos. Para la extracción y cuantificación de los pigmentos presentes en *Dunaliella* se ha seguido el método descrito por Shaish y col. (1992) con algunas modificaciones:

- **Extracción.** Se centrifuga 1 ml del cultivo a 13.000 rpm durante 5 min. Se resuspende el sedimento en 1 ml de una mezcla de etanol: hexano 2:1 (v/v), agitando fuertemente y recogiendo el sobrenadante en un tubo con cierre hermético. Se lava el sedimento dos veces para la recuperación total de los pigmentos (volumen final, 3 ml), añadiéndose posteriormente 2 ml de agua para separar por polaridad la fase de etanol, donde quedarán los restos celulares. Se añaden 4 ml de hexano para diluir los pigmentos que han quedado disueltos en este solvente, que ocupa la parte superior del tubo. Se deja reposar 15 min en oscuridad (este último paso se puede sustituir por una centrifugación suave).

- **Cuantificación.** Se toma 1 ml de la fase de hexano y se determina su absorbancia a 450 nm frente a un blanco con el mismo disolvente. Para calcular el contenido en carotenoides expresado como mg ml⁻¹, basta con multiplicar el valor de la absorbancia por 25,2.

$$\text{Abs}_{450\text{nm}} \times 25,2 = \text{mg carotenoides ml}^{-1} \text{ cultivo}$$

Este coeficiente de extinción para carotenoides en hexano ha sido establecido por nosotros, ya que no se ha encontrado en la bibliografía. La calibración en nuestras condiciones de medida fue:

$$\text{Abs}_{450\text{nm}} = 0,1984 \text{ mg ml}^{-1} - 0,0114 \quad r = 0,997$$

Otro aspecto importante es el análisis de estos carotenoides. Para ello se ha utilizado un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (*HPLC*) acoplado a un detector espectrofotométrico de diodos. La columna empleada fue Millipore, Nova-Pack C-18 (3,9 × 150 mm, 4 μm tamaño de partícula, 60 Å tamaño de poro). Los pigmentos

se eluyeron a un flujo de 1 ml min^{-1} utilizando como eluyente una mezcla de acetona: metanol 1:1 (v/v).

Puesto que la fase móvil contiene acetona, antes de la inyección de la muestra debe recogerse la fase de hexano, llevarla a sequedad con flujo de N_2 , resuspenderla en 1 ml de acetona y centrifugar brevemente para limpiar la muestra. Se inyectan $10 \mu\text{l}$ de este sobrenadante en el HPLC.

Las muestras desecadas en nitrógeno pueden almacenarse en esta atmósfera anaerobia a -20°C durante semanas para su posterior análisis, sin sufrir alteraciones.

Estas determinaciones han permitido establecer que la práctica totalidad de los pigmentos extraídos de *Dunaliella* corresponde a β -caroteno (95%), con cantidades mínimas y difíciles de cuantificar de luteína (Fig. 34).

Determinaciones de crecimiento. Se han seguido distintos métodos:

- Turbidez, medida como incremento de absorbancia a 750 nm . A esta longitud de onda no existen interferencias por absorbancia de los pigmentos. Para emplear los valores de turbidez como medida de crecimiento, se han realizado distintas curvas de calibración para relacionar $\text{Abs}_{750 \text{ nm}}$ con el peso del alga, expresado como mg ml^{-1} de cultivo.

Este sistema sólo es válido en los cultivos axénicos en el laboratorio, siendo necesario, además, un lavado de las células con formiato amónico previo a la determinación para eliminar las altas cantidades de NaCl que acompañan a las células, sobrevalorando los pesos.

Para las distintas estirpes de *Dunaliella* ensayadas, se ha establecido la siguiente relación entre turbidez (medida como $\text{Abs}_{750 \text{ nm}}$) y peso seco del alga:

$$\text{UTEX: } \text{Abs}_{750 \text{ nm}} = 1,979 \text{ mg ml}^{-1} + 0,028$$

$$\text{CCAP: } \text{Abs}_{750 \text{ nm}} = 1,343 \text{ mg ml}^{-1} + 0,019$$

$$\text{D: } \text{Abs}_{750 \text{ nm}} = 0,816 \text{ mg ml}^{-1} + 0,196$$

$$\text{R: } \text{Abs}_{750 \text{ nm}} = 0,629 \text{ mg ml}^{-1} + 0,127$$

- Conteo de células:

- Visual. Observación directa al microscopio óptico utilizando una cámara Neubauer. Es el método más exacto, pero muy laborioso como procedimiento de rutina.

- Mecánico. Utilizando un contador de células Coulter Counter Z1 con un poro de $100 \mu\text{m}$ y muestras diluidas 500 veces. Se ha establecido $4,5 \mu\text{m}$ como tamaño mínimo de detección y $14 \mu\text{m}$ como tamaño máximo. Dentro de este intervalo quedan recogidos todos los tamaños que presenta *Dunaliella* a lo largo de su ciclo vital. Debido a dichos cambios de tamaño, resulta difícil establecer una relación fiable entre peso seco del alga y cantidad de células.

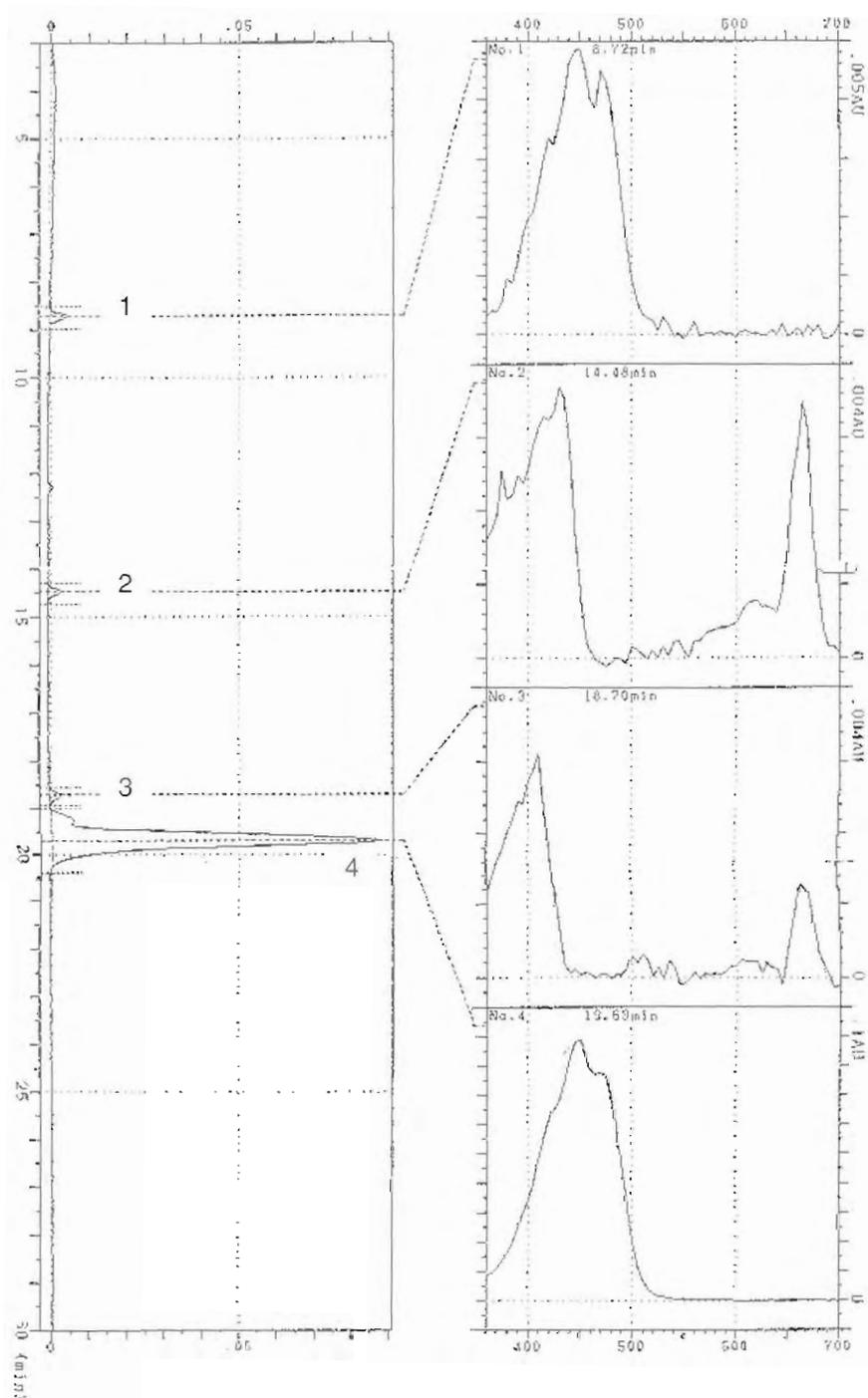


Fig. 34. Espectro de absorción de una muestra de carotenoides totales de *Dunaliella*. Pico nº 1) Luteína, pico nº 2) Clorofila, pico nº 3) no identificado, pico nº 4) β -caroteno.

PRODUCTIVIDAD EN LA PLANTA EXPERIMENTAL

Aunque nuestra planta no opera de manera global, con encadenamiento de todos los procesos porque los aspectos de recogida y manipulación final del producto están en fase de experimentación, se dispone de resultados sobre productividad, que son especialmente abundantes para los estanques de 3 m².

Los valores que se presentan son una aproximación anual (promedio de tres años) respecto a la radiación fotosintéticamente activa (PAR, "photosynthetic active radiation") media en este periodo de tiempo. El cultivo se operaba como sistema estanco, siguiendo la evolución de la biomasa y del contenido en pigmentos a lo largo del tiempo. Por tanto, sería más correcto hablar de acumulaciones, en vez de productividades, aunque para establecer una comparación con los resultados ofrecidos por otros autores, puede hacerse una aproximación teórica a los valores de productividad. Según nuestros datos podría obtenerse un promedio de 150 mg de β -caroteno m⁻²·día⁻¹ durante todo el año, con un máximo en primavera, en que se alcanzaría hasta 450 mg m⁻² día⁻¹. Estos valores son comparables con los descritos para las plantas de producción referidas con anterioridad, actualmente en funcionamiento.

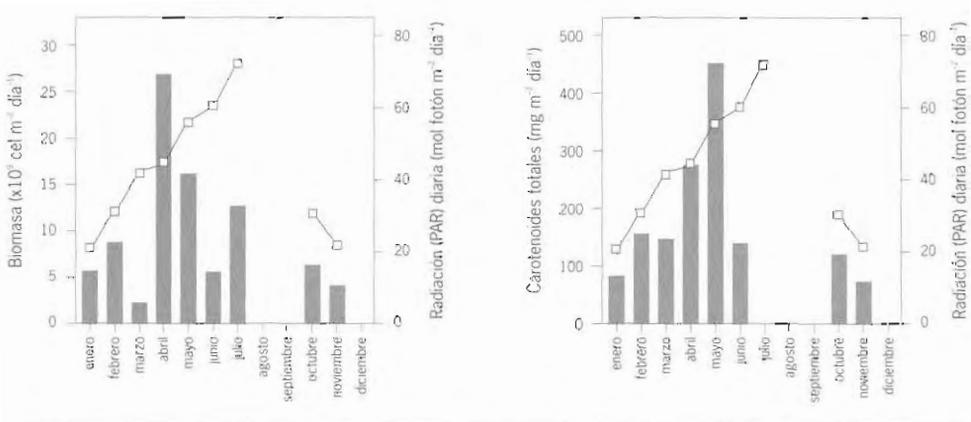


Fig. 35. Productividad en biomasa y carotenoides totales en la planta experimental del CICEM (histograma en azul). En la gráfica se recoge como cuadrados blancos los valores medios de radiación fotosintéticamente activa a los mismos tiempos. Los datos son valores medios de tres años.

A la vista del potencial que ofrecía la planta experimental, nuestros esfuerzos se dirigieron hacia la optimización del proceso de producción de β -caroteno, por tratarse del objetivo central del proyecto. Se trataba de definir si, respecto a este parámetro, era más productivo mantener un cultivo en sistema estanco hasta agotar los nutrientes e inducir así la carotenogénesis, o bien establecer un sistema de cultivo bifásico, como el descrito por Ben-Amotz (1995), donde se emplearían los estanques de 1 m² operando en régimen semicontinuo y condiciones óptimas para obtener máxima productividad en biomasa y transferir después las células a los estanques de 3 m², donde en régimen estanco y deficiencia de nitrógeno se induciría la producción de β -caroteno.

En el primero de estos sistemas, cuando se dejaba evolucionar en el tiempo cultivos estancos suplementados con una fuente de N, la mayor acumulación de biomasa y carotenoides tenía lugar a los 13 - 15 días desde la inoculación. Los valores obtenidos a los 13 días eran:

Profundidad del cultivo (cm)	Biomasa acumulada (g m ⁻²)	Carotenoides acumulados (g m ⁻²)	% de Carotenoides respecto a peso seco
6	17,46	2,79	16
8	21,20	2,25	11
10	24,50	2,13	9

En el caso de los cultivos bifásicos, debido a la falta de N, las células sólo eran viables durante 4 - 6 días. Para poder comparar los dos sistemas, se presentan valores de acumulación de biomasa y carotenoides a los 6 días:

Profundidad del cultivo (cm)	Cultivo estanco +N			Cultivo estanco -N		
	Biomasa g m ⁻²	Carotenoides g m ⁻²	Riqueza %	Biomasa g m ⁻²	Carotenoides g m ⁻²	Riqueza %
6	11,88	1,23	10,35	5,46	0,88	16,1
8	9,44	0,92	9,75	7,04	1,29	18,0
10	10,00	0,76	7,60	7,60	1,17	15,0

Si se toman en consideración los valores de acumulación de pigmento, principal parámetro de interés en la fase de producción, los cultivos estancos sin N añadido y 8 cm de profundidad serían los más productivos.

Sin embargo, podría discutirse si es más rentable un cultivo estanco suplementado con N que se deje evolucionar durante 13 días, generando 2,8 g de carotenoides m⁻²

o un cultivo sin N que en la mitad de tiempo rindiera 1,3 g m⁻². En este segundo caso, los gastos por recogida de células y trasvase de medios y cultivos se multiplicaría por dos, aunque se ahorraría el coste de las sales de nitrato y se reduciría el tiempo de cada ciclo de producción. Además, la biomasa obtenida alcanzaría un mayor valor en el mercado por su alto contenido en pigmentos.

Estos resultados deben considerarse preliminares, requiriendo un análisis a lo largo de un periodo anual, que incluya el estudio de otras variables que afecten a la productividad de β -caroteno, además de la profundidad. Igualmente, es necesario optimizar la primera etapa del proceso bifásico a lo largo del año, ya que los cambios de temperatura e irradiancia en cada estación modifican estos parámetros. Se establecerían así las condiciones de operación de la planta experimental en las distintas épocas del año. Para obtener información sobre la capacidad de regeneración de un cultivo debe definirse cuantos ciclos de crecimiento-producción pueden realizarse con un inóculo inicial sin problemas de viabilidad, productividad y contaminación, sincronizando ambas fases para obtener la mayor rentabilidad a cada ciclo de producción.

En cualquier caso, y aunque los trabajos apuntados anteriormente (que se están llevando a cabo en estos momentos) pueden mejorar las tasas de productividad alcanzadas en nuestra planta experimental, los resultados ya obtenidos confirman la potencialidad del cultivo de *Dunaliella salina* UTEX 2538 como fuente para la obtención de β -caroteno por síntesis biológica bajo las condiciones climáticas del litoral andaluz y además, de forma competitiva con las plantas actualmente en funcionamiento, ya que la riqueza en pigmento es de las más altas obtenida hasta la fecha.

ENSAYOS PRELIMINARES EN UN FOTOBIORREACTOR TUBULAR CERRADO

Ya se han comentado los fundamentos del sistema de cultivo hiperintensivo utilizando fotobiorreactores cerrados, en los que es posible un estricto control de las condiciones de cultivo, mejorando considerablemente la cantidad y calidad del producto obtenido.

Ante la falta de información bibliográfica sobre la utilización de este sistema para el cultivo de *Dunaliella* y la posibilidad de obtener máximos rendimientos respecto al contenido en β -caroteno, hemos estudiado la viabilidad del cultivo de esta microalga utilizando el equipo del que dispone el grupo de "Biotecnología de Microalgas" en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla (Figuras 36 y 37).



Fig. 36. Vista general del fotobiorreactor tubular cerrado instalado en el Centro de Investigaciones Científicas "Isla de la Cartuja". Sevilla.

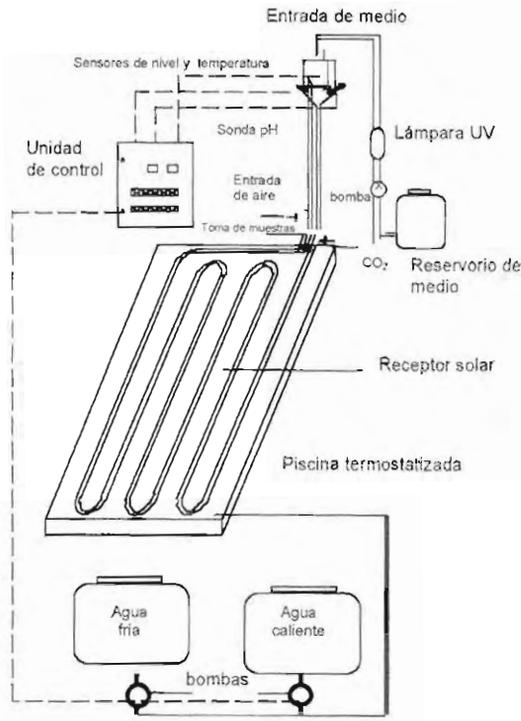


Fig. 37. Componentes principales del fotobiorreactor tubular cerrado.

Este sistema de cultivo consta de varios módulos de captación de luz solar constituidos por tubos de material transparente (plexiglás rígido) de 2,4 cm de diámetro interno y 3,0 cm de diámetro externo y una longitud total de 90 m, con una superficie fotosintéticamente activa de 2,2 m² y 55 L de volumen útil.



Fig. 38. Detalle del sistema de captación de luz del fotobiorreactor tubular.

La suspensión celular circula a través de los tubos por impulsión de aire a presión (air-lift), lo que genera menor estrés hidrodinámico que ninguno de los otros sistemas de impulsión conocidos, preservando por tanto la integridad de las células. Para evitar el depósito de células en las paredes de los tubos, se hacen circular por su interior dos bolas de caucho de diámetro ligeramente inferior al de los tubos, a una velocidad de $0,30 - 0,35 \text{ m s}^{-1}$.

El sistema de cultivo está constituido por 3 componentes principales. Un compresor-inyector de aire, que provoca la circulación y agitación de la suspensión celular, un serpentín de tubos transparentes dispuestos en paralelo y conectados entre sí por medio de piezas del mismo material en forma de "u" (los tubos se encuentran sumergidos en agua, que actúa como elemento termostatizador del cultivo, en una piscina de dimensiones $6,0 \times 1,8 \times 0,15 \text{ m}$, provista de circuito cerrado de circulación con elementos calefactor y refrigerador) y un cilindro de 52 cm de alto por 26 cm de diámetro externo situado a 2,8 m de altura sobre la horizontal del reactor, donde el medio se desgasifica tras su recorrido por los tubos del reactor.



Fig. 39. Detalle del cilindro de desgasificación del fotobiorreactor tubular.

En el cilindro se encuentran el orificio de salida de gas, protegido por un filtro de $0,2 \mu\text{m}$, existiendo entradas para llenado rápido del reactor, así como para inoculación y adición de medio fresco cuando el sistema opera en cultivo continuo, sensor de nivel, rebosadero para recolección de la suspensión celular, y entrada de aire (previo paso por un filtro de $0,2 \mu\text{m}$), además de sondas de pH y de temperatura.

El air-lift está situado perpendicularmente y conectado al sistema tubular de captación de luz del fotobiorreactor mediante dos tubos del mismo diámetro, situados fuera de la piscina, con los siguientes elementos: válvulas para abrir y cerrar el flujo de líquido a través de los tubos, entrada de CO₂ provista de filtro de 0,2 µm y válvula antirretorno de líquido, sistema estéril para toma de muestra, válvula de vaciado del fotobiorreactor, e inmovilizador de las bolas de caucho.

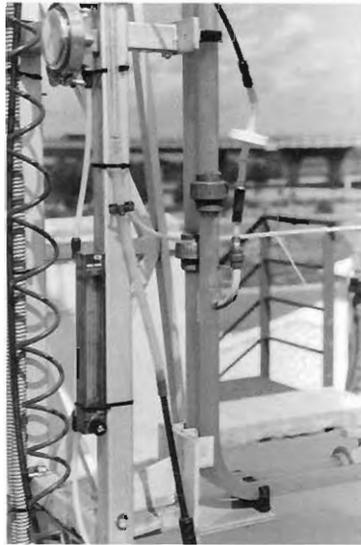


Fig. 40. Detalle del sistema de inyección de aire del fotobiorreactor.

El sistema puede operar en forma continua, mediante la adición continuada de medio fresco. De esta manera, el sensor de nivel situado en el cilindro desgasificador (que puede situarse a distinta altura mediante un tubo que se desplaza a través de la tapadera del cilindro) se activa al aumentar el volumen de la suspensión celular, actuando sobre una electroválvula, situada en la llave de vaciado del fotobiorreactor, permitiendo la salida de un determinado volumen de la suspensión celular. La adición de medio se realiza mediante bomba peristáltica conectada a una célula fotoeléctrica, activándose al amanecer y deteniéndose al atardecer, de manera que no añade medio fresco al sistema de cultivo en horas de nula iluminación, cuando las células no crecen.

Para *Dunaliella*, el pH del cultivo se mantenía en torno a 7,5 por medio de un controlador de pH (pHstato). Cuando éste se elevaba, debido a la actividad fotosintética de las células, por encima del valor óptimo para el crecimiento, el controlador de pH mandaba una señal a una válvula solenoide, que insuflaba CO₂ puro al cultivo hasta restablecer de nuevo el valor de pH prefijado inicialmente.

Se han realizado estudios preliminares de la viabilidad del cultivo de *Dunaliella salina* en este fotobiorreactor tubular cerrado para la producción de biomasa y carotenoides

en dos épocas del año (primavera y otoño). La baja tasa de duplicación de *Dunaliella salina* dificultó la utilización de cultivos en régimen continuo o semicontinuo, obligando a trabajar en régimen estanco.

A los valores de baja irradiancia ($700 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en otoño, la acumulación en biomasa y carotenoides después de 15 días de cultivo fue de $15,3 \text{ g m}^{-2}$ y $1,0 \text{ g m}^{-2}$, respectivamente, con una riqueza en carotenoides del 6,6 % respecto al peso seco. A irradiancias solares altas ($1500 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) correspondientes a la época primaveral, se registraron valores similares de producción de biomasa, si bien la acumulación de carotenoides subía hasta $1,5 \text{ g m}^{-2}$ (riqueza del 12%) en el mismo tiempo de cultivo. Parece que la irradiancia afecta poco a la acumulación de biomasa de *Dunaliella* cultivada en este sistema, aunque sí al contenido en pigmentos.

Aunque es difícil comparar este sistema de cultivo cerrado operando en régimen estanco con cultivos en estanques abiertos operando en régimen semicontinuo, en una aproximación teórica parece que el fotobiorreactor es menos efectivo en cuanto a productividad. Sin embargo, la biomasa que se obtiene es de mayor valor comercial por su alto contenido en carotenoides. Otro aspecto interesante es que el perfil de los carotenoides de la biomasa obtenida en el fotobiorreactor muestra la presencia de otros pigmentos distintos al β -caroteno (9% astaxantina, 4% luteína, 87% β -caroteno), lo que podría incrementar considerablemente el valor comercial de esta biomasa (Figura 41).

Puesto que *Dunaliella* cultivada en fotobiorreactor tubular cerrado tiene baja tasa de crecimiento y alta tasa de producción de β -caroteno, se podría acoplar un sistema abierto de estanques para producir biomasa en condiciones óptimas con un fotobiorreactor cerrado al que se transfiera esa biomasa para inducir la producción de pigmentos en tan sólo 2 - 3 días.

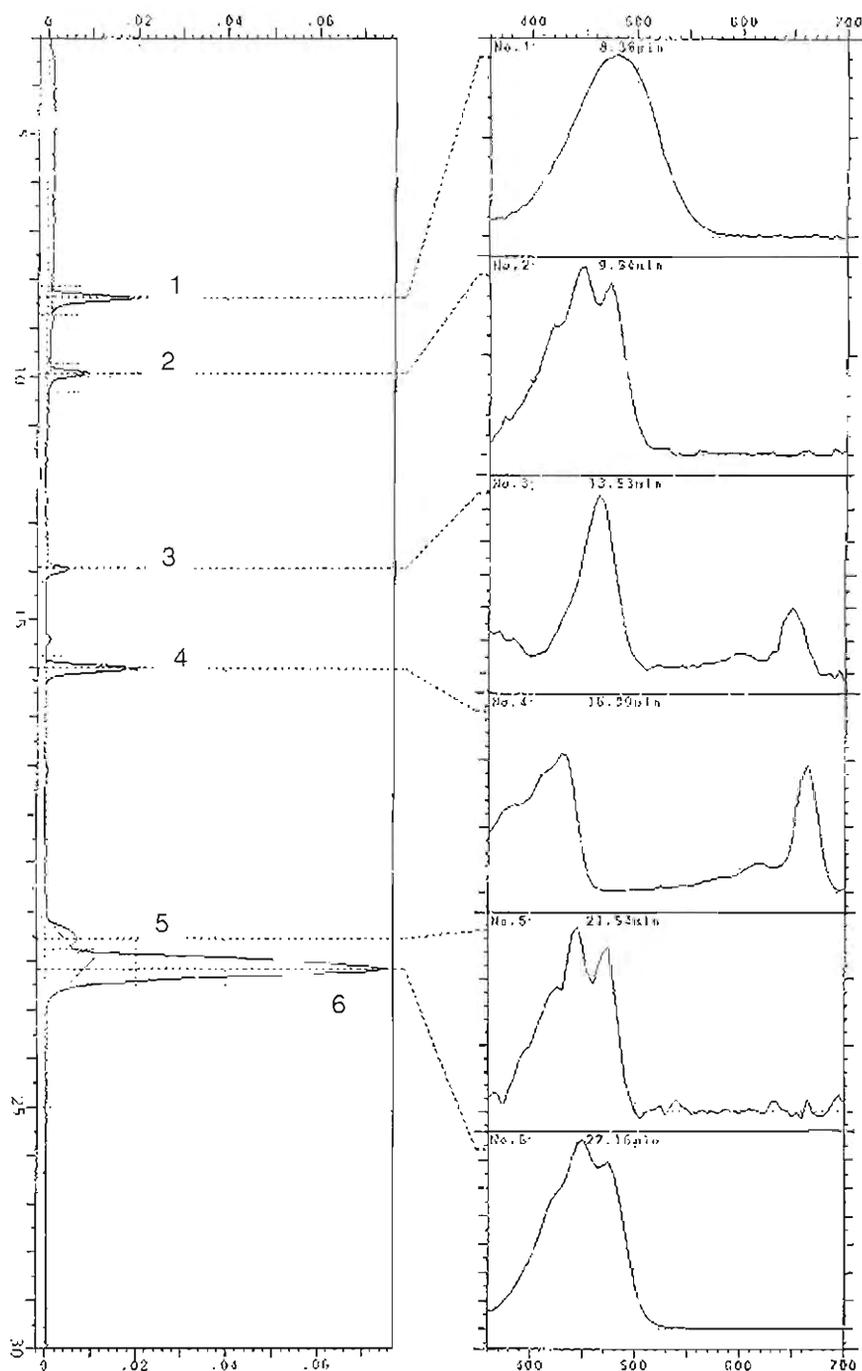


Fig. 41. Análisis mediante HPLC de los carotenoides de *Dunaliella* cultivada en fotobiorreactor tubular. Nº 1) astaxantina, nº 2) luteína, nº 3 y 4) clorofilas, nº 5) no identificado, nº 6) β -caroteno.

Podría concluirse que, si bien quedan numerosos vacíos de información, requiriéndose por tanto experimentación para llegar a una perfecta definición del proceso de cultivo de *Dunaliella* a escala industrial en Andalucía, el esfuerzo de estos últimos cuatro años ha permitido dar un gran impulso a nuestro conocimiento en el cultivo de esta microalga en las condiciones de la zona. Se han resuelto problemas básicos de los cultivos al exterior, tales como la manipulación de grandes volúmenes, la complejidad de trabajar con elevadas concentraciones de sal, etc. Este bagaje puede permitir, en un futuro cercano, la aplicación a una planta piloto y, posteriormente, a una planta comercial. La explotación de la planta comercial representa una importante fuente de bioproductos de alto valor económico y una actividad innovadora en acuicultura, ciertamente necesitada de una diversificación de sus enfoques y para la que Andalucía, y gran parte del arco mediterráneo español, dispone de condiciones y recursos competitivos (clima, salinas, experiencia acuícola, etc).

Por sus privilegiadas condiciones climáticas, así como por las altas tasas de irradiancia solar y elevado número de horas de sol, Andalucía se configura como territorio idóneo para el establecimiento de estas plantas industriales, que puede constituir una alternativa ecológica y económicamente interesante para la explotación sostenible de las salinas marítimas y otros biotopos hiperhalinos, recursos de los que Andalucía dispone en extensas superficies, muchas de ellas con escaso o nulo aprovechamiento económico actual.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahern, T.J., Katoh, S. y Sada, E. 1983. Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. Biotech. Bioengineering, **25**, 1057-1070.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. y Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **90**, 7915-7919.
- Anderson, D.B. y Eakin, D.E. 1986. A process for the production of polysaccharides from microalgae. En: "Proceedings of the Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals". Scott, C.D. (eds.) John Wiley and Sons, Inc. New York, pp. 533-547.
- Azov, Y. y Goldman, J.C. 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive culture. Appl. Env. Microbiol., **43**, 735-739.
- Azov, Y., Shelef, G., Moraine, R. y Oron, G. 1980. Alternative operating strategies for high-rate sewage oxidation ponds. En: "Algal biomass. Production and use". Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds.) Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 523-529.
- Barclay, W.R. y Lewin, R.A. 1985. Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. Plant and Soil, **88**, 159-169.
- Bauernfeind, J.C., Brubacher, G.B., Kläni, H.M. y Marusich, W.L. 1971. Use of carotenoids. En: "Carotenoids". Isler, O. (ed.) Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 743-770.
- Bauernfeind, J.C. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Academic Press, New York, pp. 883-916.
- Becker, E.W. 1994. "Microalgae: biotechnology and microbiology". Baddiley, J., Carey, N.H., Higgins, I.J. y Potter, W.G. (eds.) Cambridge University Press. Gran Bretaña.
- Bedell, G. 1986. Geothermally stimulated algal growth in the state of Nevada. Beihefte zur Nova Hedwigia, **83**, 252-256.
- Ben-Amotz, A. 1980. Glycerol production in the alga *Dunaliella*. En: "Biochemical and photosynthetic aspects of energy production". San Pietro, A. (eds.) Academic Press. Nueva York, pp. 191-208.
- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz y Avron (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol., **131**, 479-487.
- Ben-Amotz, A. 1995. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. J. Appl. Phycol., **7**, 65-68.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation in the halophilic alga *Dunaliella parva*. Plant Physiol., **51**, 875-878.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1980. Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. En: "Algal biomass". Shelef, G. y Leder, C.J. (eds.) Elsevier. pp. 603-660.

- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, **72**, 593-597.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1989a. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **25**, 175-178.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1989b. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: "Algal and cyanobacterial biotechnology". Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. y Shah, N. (eds.) Longman Scientific and Technical Press, pp. 90-114.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trend Biotechnol.* **8**, 121-125.
- Ben-Amotz, A. y Shaish, A. 1992. β -carotene biosynthesis. En: "*Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology". Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 206-216.
- Ben-Amotz, A. y Levy, Y. 1996. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic *all-trans* beta-carotene in human serum. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63** (5), 729-734.
- Ben-Amotz, A. 1996. Effect of low-temperature on the stereoisomer composition of beta-carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta) *J. Phycol.*, **32**, 272-275.
- Ben-Amotz, A. 1999a. *Dunaliella* β -carotene. From science to commerce. En: "Enigmatic microorganisms and life in extreme environments". Seckbach, J. (ed.) Kluwer Academic Publ. Netherlands. pp. 401-410.
- Ben-Amotz, A. 1999b. Case study: *Dunaliella* natural β -carotene biotechnology in large scale oblong open raceway. En: Abstracts of "8th International conference on applied algology". Montecatini Terme, p. 130.
- Benemann, J.R., Tillet, D.M. y Weissman, J.C. 1987. Microalgae biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **5**, 47-53.
- Benemann, J.R. y Weissman, J.C. 1984. Chemicals from microalgae. En: "Bioconversion systems". Wise D.L. (ed.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 59-70.
- Benemann, J.R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.*, **4**, 233-245.
- Bertocchi, C., Navarini, L. y Cèsaro, A. 1990. Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohidrate polimers*, **12**, 127-153.
- Bloor, S. y England, R.R. 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *J. Appl. Phycol.*, **1**, 367-372.
- Booth, W.A. 1999. Extensive cultivation of *Dunaliella salina* for mixed carotenoids in Australia. En: Abstracts of "8th International conference on applied algology". Montecatini Terme, p. 131.
- Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. 1988. *Dunaliella*. En: "Micro-algal biotechnology". Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 27-58.
- Borowitzka, M.A. y Huisman, J.M. 1993. The ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales): effect of environmental conditions on aplanospore formation. *Botanica Marina*, **36** (3), 233-243.
- Borowitzka, L.J. 1981. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia*, **81**, 33-46.

- Borowitzka, L.J. y Borowitzka, M.A. 1989. β -carotene (provitamin A) production with algae. En: "Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors". Vandamme, E.J. (ed.) Elsevier Applied Science, London, pp. 15-26.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. y Moulton, T.P. 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, **116/117**, 115-121.
- Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemicals from microalgae. En "Micro-algal biotechnology". Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 153-196.
- Borowitzka, M.A. 1992. Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies. En: "Profiles on biotechnology". Villa, T.G. y Abalde, J. (eds.) Servicio de publicaciones. Universidad Santiago, pp. 301-310.
- Borowitzka, M.A. 1999. Commercial applications of algae. En: Abstracts of "8th International conference on applied algology". Montecatini Terme, p. 129.
- Borowitzka, L.J. 1992. Commercial *Dunaliella* production: history of development. En: "Profiles on biotechnology". Villa, T.G. y Abalde, J. (eds.) Servicio de publicaciones. Universidad Santiago, pp. 233-245.
- Boussiba, S. 1993. Production of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* in a closed tubular reactor for rice farming. *Microb. Releases*, **2**, 35-39.
- Boussiba, S. 1999. Commercial production of pigments and antioxidantes from microalgae. En: Abstracts of "8th International conference on applied algology". Montecatini Terme, p. 239.
- Boussiba, S., Fan, L. y Vonshak, A. 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. En: "Methods in enzymology" vol 213. Packer, L. (ed). Academic Press. California, pp. 386-390.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories report 201. CSIRO, Australia, pp. 44.
- Brubrick, P. 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technol.*, **38**, 237-239.
- Burlew, J.S. 1953. Algal culture: From laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, publicación n^o 600. Washington.
- Butcher, R.W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I: Introduction and Chlorophyceae. *Fishery Invest. London Ser.*, **4**, 1-74.
- Callegari, J.P. 1989. Feu vert pour les microalgues. *Biofutur.*, **76**, 25-40.
- Carlucci, A.F. y Bowes, P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *Journal of Phycology*, **6**, 393-400.
- Ciferri, O. 1981. Let them eat algae. *New Scientist*, Sept. 810-812.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **47**, 551-578.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. En: "Handbook of microalgae mass culture". Richmond, A. (ed.) CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 421-454.
- Cowan, A.K., Rose, P. D. y Horne, L.G. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *J. Exp. Bot.*, **43** (257), 1535-1547.

- Curtain, C.C. y Snook, H. 1983. Method for harvesting algae. PCT / AU82 / 00165 (8 October 1982); US patent nº 511135 (7 June 1983).
- Czygan, F.C. 1968. Sekundär-carotinoide in grünalgen. I. Chemie, vorkommen und faktoren welche die bildung dieser polyene beeinflussen. *Archiv für Mikrobiol.*, **61**, 81-102.
- Chitlaru, E., Seger, R. y Pick, U. 1997. Activation of a 74 kDa plasma membrane protein kinase by hyperosmotic shocks in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *J. Plant Physiol.*, **151**, 429-436.
- Davis, H.C. y Guillard, R.R. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and clam larvae. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service*, **58**, 293-304.
- De Pauw, N. y Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: "Microalgal biotechnology". Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Dean, K.L. 1992. Industrial bioprocessing 14:6. Technical insights, Inc. Englewood, New Jersey.
- Dodd, J.C. 1986. Elements of pond design and construction. En: "Handbook of microalgal mass culture". Richmond, A. (ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, USA, pp. 265-283.
- Downs, J. y Harrison, D.E.F. 1974. Studies on the production of pink pigment in *Pseudomonas extorquens* NCIB 9399 growing in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.*, **37**, 65-67.
- Dudman, W.F. 1977. The role of surface polysaccharides in natural environments. En: "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. Sutherland, I.W. (ed.) Academic Press, London. pp. 357-414.
- Dunal, M.F. 1837. Note sur les algues qui colorent en rouge certaines eaux des marais selants méditerranéens. *Comptes Rendus de la Académie de Science*, Paris, **15**, 585-587.
- Dyerberg, J. 1986. Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of arteriosclerosis. *Nutrition Reviews*, **44**, 125-134.
- Falconer, I.R. 1993. Algal toxins in seafood and drinking water. Falconer, I.R. (ed.) Academic Press, INC., Cambridge.
- Felix, E.A. y Rushforth, S.R. 1979. The algal flora of the Great Salt Lake, Utah, USA. *Nova Hedwigia*, **31**, 163-195.
- Fernandes, H.L., Veloso, V., Gouveia, L., Empis, J.M. y Novais, J.M. 1997. Mild method of pre-concentration of *Dunaliella salina* from culture medium. *Biotechnology Techniques*, **11** (8), 557-559.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U. y Zamir, A. 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *The Journal of Biological Chemistry*, **271** (30), 17718-17723.
- Fisher, M. 1998. Salt adaptation of *Dunaliella salina*: isolation, characterization, and cloning of salt induced proteins. Ph.D. thesis, Weizmann Institute of Science, Rehovot.
- Flaibani, A., Olsen, Y. y Painter, T.J. 1989. Polysaccharides in desert reclamation: compositions of extracellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydr. Res.*, **190**, 235-248.
- Flores, E. y Wolk, C.P. 1986. Production by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Arch. Microbiol.*, **145**, 215-219.

- Fontes, A.G., Vargas, M.A., Moreno, J., Guerrero, M.G. y Losada, M. 1991. Changes in the pigment content of *Anabaena variabilis* cells in outdoor culture. *J. Plant Physiol.*, **137**, 441-445.
- Fontes, A.G., Vargas, M.A., Moreno, J., Guerrero, M.G. y Losada, M. 1987. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass*, **13**, 33-43.
- Garbisu, C., Gil, J.M., Bazin, M.J., Hall, D.O. y Serra, J.L. 1991. Removal of nitrate from water by foam immobilized *Porphyridium laminosum* in batch and continuous flows bioreactors. *J. Appl. Phycol.*, **3**, 221-234.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. y Gadd, G.M. 1982. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the stuarine green microalga *Chlorella salina*. *J. Appl. Phycol.*, **3**, 222-234.
- Gaziano, J.M., Johnson, E.J., Russel, E.M., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Ridker, P.M., Frei, P.M., Hennekens, C.H. y Krinsky, N.I. 1995. Discrimination in absorption on transport of all-trans or 9-cis β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1248-1252.
- Gey, K.F., Brubacher, G.B. y Stahelin, H.B. 1987. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 1368-1378.
- Gilmore, A.M. y Yamamoto, H.Y. 1993. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.*, **35**, 67-78.
- Glazer, A.N. y Stryer, L. 1984. Phycofluor probes. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 423-427.
- Glazer, A.N. 1994. Phycobiliproteins- a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.*, **6**, 105-112.
- Goldman, J.C. 1979. Physiological aspects in algal mass cultures. En: "Algal biomass". Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press. pp. 343-359.
- Goodwin, T.W. 1988. Plant pigments. Academic Press. London, p. 362.
- Gross, E.M., Wolk, C.P. y Jüttner, F. 1991. Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *J. Phycol.*, **27**, 686-692.
- Grung, M., y Liaaen-Jensen, S. 1992. Normal phase gradient HPLC separation of algal carotenoids and microalgal origin of carotenoids in coral eggs. En: "Marine natural products". Symposium proceedings of seventh international symposium on marine natural products, Capri, p. 25.
- Gudas, L.J. 1994. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15399-15404.
- Gudin, C. 1988. Why bother with microalgae? En: "Algal biotechnology", Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. y Christiaen, D. (eds.) Elsevier Applied Science Publ., Londres. pp. 33-40.
- Gudin, C. y Chaumont, D. 1991. Cell fragility-the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresource Technology*, **38**, 145-151.
- Gudin, C. y Thepenier, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv. Biotechnol. Processes*, **6**, 73-110.
- Guerrero, M.G. y Losada, M. 1991. Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. En: "Fijación y movilización biológica de nutrientes, vol I, Fotosíntesis: Aspectos fisiológicos y de estrés". CSIC (ed.), Madrid. pp. 169-182.

- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol., **8**, 229-239.
- Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, R.F., Snader, K.M., Patterson, G.M.L. y Boyd, M.R. 1989. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). J. Natl. Cancer Inst., **81**, 1254-1258.
- Hamburger, C. 1905. Zur kenntnis der *Dunaliella salina* und einer amöbe aus salinenwasser von Cagliari. Arch. Protistenk., **6**, 111-131.
- Harder, R. y von Witsch, H. 1942. Über massenkultur von diatomeen. Ber. Bot. Ges., **60**, 146-152.
- Harrison, M.A., Melis, A. y Allen, J.F. 1992. Restoration of irradiance stressed *Dunaliella salina* to physiological growth conditions: changes in antenna size and composition of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, **1100**, 83-91.
- Harvey, W. 1988. Cracking open marine algal's biological treasure chest. Biotechnol. **6**, 488-492.
- Haxo, F. T. y Blinks, L. R. 1950. Photosynthetic action spectra of marine algae. J. Gen. Physiol., **33**, 389-442.
- Holzwarth, A.R. 1991. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. Physiol. Plant., **83**, 518-528.
- Imhoff, J.F. 1992. En: "Photosynthetic prokaryotes" Mann, N.H. y Carr, N.G. (eds.) Plenum, New York, pp. 53-70.
- Jiménez, C. y Pick, U. 1993. Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. Plant Physiol., **101**, 385-390.
- Johnson, E.A. y Schroeder, W.A. 1995. En: "Advances in biochemical engineering biotechnology", vol 53. Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 119-178.
- Johnson, J.E., Krinsky, N.I. y Rusell, R.M. 1996. Serum response of *all-trans* and *9-cis* isomers of β -carotene in humans. Circulation, **15**, 620-624.
- Katz, A., Jiménez, C. y Pick, U. 1995. Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol., **108**, 1657-1664.
- Kerby, N.W. y Stewart, W.D.P. 1988. The biotechnology of microalgae and cyanobacteria. En: "Biochemistry of algae and cyanobacteria". Rogers, L.J. y Gallon, J.R. (eds.) The phytochemical society of Europe. Oxford Science Publications, Oxford. pp. 319-333.
- Khachick, F., Beecher, G.R. y Whittaker, N.F. 1986. Separation, identification and quantification of major carotenoids and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., **34**, 603-607.
- Król, M., Maxwell, D.P. y Huner, N.P.A. 1997. Exposure of *Dunaliella salina* to low temperature mimics the high light-induced accumulation of carotenoids and the carotenoid binding protein. Plant Cell Physiol., **38** (3), 213-216.
- Laing, I. y Dyak, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En: "Introduction to applied phycology". Akatsura, I. (ed.) SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, pp. 447-477.
- Laws, E.A., Taguchi, S., Hirata, J. y Pang, L. 1988. Mass culture optimization studies with four marine microalgae. Biomass, **16**, 19-32.
- Laws, E.A. y Berning, J. L. 1991. A study of the energetics and economics of microalgal mass

- culture with the marine chlorophyte *Tetraselmis suecica*: implications for use of power plant stack gases. Biotechnology and Bioengineering, **37**, 936-947.
- Lazrak, T., Wolff, G., Albrecht, A.M., Nakatani, Y., Ourisson, G. y Kates, M. 1988. Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta, **939**, 160-162 .
- Lee, Y.K. 1986. Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend. TIBTECH., **4**, 186-189.
- Lee, Y.K. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. J. Appl. Phycol., **9**, 403-411.
- Leonardi, P.I. y Cáceres, E.J. 1994. Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae Chlorophyceae), with emphasis on the flagellar apparatus. J. Phycol., **30**, 642-653.
- Leonardi, P.I. y Cáceres, E.J. 1997. Light and electron microscope observations of the life cycle of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae) Nova Hedwigia, **64** (3-4), 621-633.
- Lerche, W. 1937. Untersuchungen über entwicklung und forpflanzung in der gattung *Dunaliella*. Arch. Protistenk., **88**, 236-268.
- Levy, H. y Zamir, A. 1994. Long-term cryoconservation of the halotolerant alga *Dunaliella*. T.I.G., **10**, 3.
- Levy, H., Gochman, I. y Zamir, A. 1992. Regulation and light-harvesting complex II association of a *Dunaliella* protein homologous to early-light-induced proteins in higher plants. J. Bio. Chem., **267**, 18831-18836.
- Levy, H., Tal, T., Shaish, A. y Zamir, A. 1993. Cbr, an algal homolog to plant early light-induced proteins, is a putative zeaxanthin binding protein. J. Bio. Chem., **268**, 20892-20896.
- Levy, Y., Ben-Amotz, A. y Aviram, M. 1995. Effect of dietary supplementation of different beta-carotene isomers on lipoprotein oxidative modification. J. Nutr. Environm. Med., **5**, 13-22.
- Levy, Y., Kaplan, M., Ben-Amotz, A. y Aviram, M. 1996. Effect of dietary supplementation of β -carotene on human monocyte-macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein. Isr. J. Med. Sci., **32**, 473-478.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. En: "Methods in enzymology", vol 148, pp. 350-382.
- Loeblich, L.A. 1972. Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina*. PhD Thesis. University of California. San Diego, pp. 141.
- MacColl, R. y Guard-Friar, D. 1987. Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Margulis, L., Barghoorn, E.S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovanonni, S. y Stolz, J. 1980. The microbial community in layered sediments at Laguna Figueroa. Baja California. México: Does it have Precambrian analogues? Precambrian Research, **11**, 93-123.
- Marusich, W.L. y Bauernfeind, J.C. 1981. En: "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Bauernfeind, J.C. (ed.) Elsevier, London, pp. 320-341.
- Massyuk, N.P. 1973. Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilisation. Kiev: Naukova Dumka.

- Massyuk, N.P. y Abdula, E.G. 1969. First experiment of growing carotene-containing algae under semi-industrial conditions. *Ukranskya Botanichny Zhournal*, **26**, 21-27.
- Memon, A.R., Herrin, D.L. y Thompson, G.A.Jr. 1993. Intracellular translocation of a 28 kDa GTP-binding protein during osmotic shock induced cell volume regulation in *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**, 11-22.
- Mendoza, H., Jimenez del Rio, M., García Reina, G., y Ramazanov, Z. 1996. Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Eur.J.Phycol.*, **31**, 329-331.
- Metting, B. y Pyne, J.W. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 386-394.
- Mohn, F.H. y Contreras, O.C. 1990. Harvesting of the alga *Dunaliella*, some considerations concerning its cultivation and impact on the production costs of β -carotene, Jülich: Institute für Biotechnologie Jülich (nº 2438).
- Mokady, S. y Ben-Amotz, A. 1991. Dietary lipid level and the availability of β -carotene of *Dunaliella bardawil*. *Nutr. Cancer*, **15**, 47-51.
- Mokady, S., Abramovici, A. y Cogan, U. 1989. The safety evaluation of *Dunaliella bardawil* as a potential food supplement. *Food Cem. Toxicol.*, **27**, 221-230.
- Molina-Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J.M. y Acien Fernández, F.G. 1994. Effect of growth rate on EPA and DHA content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41** (1), 23-27.
- Molina-Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., García Sánchez, J.L. y López Alonso, D. 1993. n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 599-605.
- Montoya, H.T y Olivera, A.G. 1993. *Dunaliella salina*: from saline environments of the central coast of Peru. *Hydrobiologia*, **267**, 155-161.
- Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. y Guerrero, M.G. 1995. Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. *J. Appl. Phycol.*, **7**, 17-23.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J. y Guerrero, M.G. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.*, **60**, 175-182.
- Murakoshi, M., Nishino, H., Satomi, S., Takayusu, J., Hasegasa, T., Tokuda, H., Iwashima, A., Okuzumi, J., Okabe, H., Kitano, H. y Iwasaki, R. 1992. Potent preventive action of β -carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by α -carotene than by β -carotene. *Cancer Res.*, **52**, 6583-6587.
- Nelis, H.J. y de Leenheer, A.P. 1989. En: "Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors" Vandamme, E.J. (ed.) Elsevier, London, pp. 43-80.
- Nelis, H.J. y de Leenheer, A.P. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 181-191.
- Ninet, L., y Renault, J. 1979. En: "Microbiol technology 2nd edn". Peppler, H.J. y Perlman, D. (eds.) Academic Press, New York, pp. 529-530.

- Nissenbaum, A. 1975. The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. Microbial Ecol., **2**, 139-161.
- Olaizola, M. 1999. Commercial production of high value metabolites from microalgae: a reality. En: Abstracts of "8th International conference on applied algology". Montecatini Terme, p. 135.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Galss, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.R., Malanis, B., Williams, J.H., Barhrt, S., Cherniak, M.G., Brodtkin, C.A. y Hammar, S. 1996. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med., **334**, 1150-1155.
- Oswald, W.J. 1988a. Micro-algae and waste-water treatment. En: "Micro-algal biotechnology". Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 305-328.
- Oswald, W.J. 1988b. Large-scale culture systems (engineering aspects). En: "Micro-algal biotechnology". Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 357-394.
- Oswald, W.J., Golueke, C.G. y Gee, H.K. 1959. Waste water reclamation through the production of algae, Water Res. Center Contrib. 22. Sanitary Eng. Res. Lab., University of California, Berkeley.
- Packer, L. 1993. Antioxidant action of carotenoids *in vitro* and *in vivo* and protection against oxidation of human low-density lipoproteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., **691**, 48-61.
- Park, D.H., Ruy, H.W., Lee, K.Y., Kang, C.H., Kim, T.H. y Lee, H.Y. 1998. The production of hydrocarbons from photoautotrophic growth of *Dunaliella salina* 1650. Applied Biochemistry and Biotechnology, **70-72**, 739-74.
- Parry, A.D. y Horgan, R. 1992. Abscisic-acid biosynthesis in roots. 1. The identification of potential abscisic-acid precursors, and other carotenoids. Planta, **187**, 185-191.
- Patterson, G.M.L., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D. y Turang, G.C. 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). J. Phycol., **27**, 530-536.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. y Sporn, M.B. 1981. Can dietary beta carotene materially reduce human cancer rates? Nature, **290**, 201-208.
- Pfander, H. 1992. Carotenoids: an overview. En: "Methods in enzymology" vol. 213. Packer, L. (ed.) Academic Press. pp. 3-13.
- Phillips, L.G., Cowan, A.K., Rose, P.D. y Logie, M.R.R. 1995. Operation of the xanthophyll cycle in non-stressed and stressed cells of *Dunaliella salina* in response to diurnal changes in incident irradiation: a correlation with intracellular β -carotene content. J. Plant Physiol., **146**, 547-553.
- Pick, U., Gounaris, N. y Barber, J. 1986. Dynamics of photosystem II and its light harvesting system in response to light changes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol., **85**, 194-198.
- Pick, U. 1992. ATPases and ion transport in *Dunaliella*. En: "Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology". Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp.63-97.
- Pick, U. 1998. *Dunaliella*, a model extremophilic alga. Israel Journal of Plant Sciences, **46**, 131-139.

- Pierson, B.K. y Olson, J.M. 1989. En: "Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities". American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 402-420.
- Pirt, S.J., Lee, Y.K., Walach, M.R., Pirt, M.W., Balyuzi, H.H. y Bazin, M.J. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **33B**, 35-58.
- Plude, J.L., Parker, D.L., Schommer, O.J., Timmerman, R.J., Hagstrom, S.A., Joers, J.M. y Hnasko, R. 1991. Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C 3-40. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1696-1700.
- Post, F.J. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial Ecology*, **3**, 143-165.
- Preisig, H.R. 1992. Morphology and taxonomy. En: "*Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology". Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 1-16.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J.V., Hugueney, P. y Kleinig, H. 1998. Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, **116**, 1239-1248.
- Ramos, J.L., Guerrero, M.G. y Losada, M. 1987. Factors affecting the photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 566-571.
- Rau, W. 1988. Function of carotenoids other than in photosynthesis. En: "Plant pigments". Goodwin, T.W. (ed.) London. Academic Press, pp. 231-255.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A. y Kopel, R. 1993. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.*, **5**, 327-332.
- Richmond, A., Vonshak, A. y Arad, S. 1980. Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. En: "Algal biomass. Production an use". Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds.) Elsevier North Holland, Amsterdam, pp. 65-72.
- Richmond, A. 1983. Phototrophic microalgae. En: "Biotechnology". vol 3, Dellweg, H. (ed.) Verlag Chemie, Weinheim. pp. 109-143.
- Richmond, A. 1986a. Outdoor mass cultures of microalgae. En: "Handbook of microalgal mass culture" Richmond, A. (ed.) CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, pp. 285-329.
- Richmond, A. 1986b. Microalgaculture. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **4**, 369-438.
- Richmond, A. 1986c. Future prospects. En: "Handbook of microalgal mass culture". Richmond, A. (ed.) CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. pp. 485-487.
- Richmond, A. 1988. A prerequisite for industrial microalgaculture: Efficient utilization of solar irradiance. En: "Algal biotechnology", Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. y Christiaen, D. (eds.) Elsevier Applied Science Publishers, London. pp. 237-244.
- Richmond, A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. En: "Progress in phycological research" vol 7. Round, M. y Chapman, S. (eds.) Biopress Ltd. pp. 269-330.
- Richmond, A. 1992. Mass production of microalgae: a mode of industrial photosynthesis. En: "Trends in photosynthesis research". Barber, J., Guerrero, M.G. y Medrano, H. (eds.) Intercept Limited, Andover. pp. 305-317.
- Richmond, A. y Becker, E.W. 1986. Technological aspects of mass cultivation -a general outline. En: "Handbook of microalgal mass culture". Richmond, A. (ed.) CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. pp. 245-263.

- Rodriguez, H. y Guerrero, M.G. 1992. Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). En: "Profiles on biotechnology". Villa, T.G. y Abalde, J. (eds.) Servicio de publicaciones Universidad de Santiago, Santiago. pp. 247-260.
- Rose, P.D., Maart, B.A., Phillips, T.D., Tucker, S.L., Cowan, A.K. y Rowswell, R.A. 1992. Cross-flow ultrafiltration used in algal high rate oxidation pond treatment of saline organic effluents with the recovery of products of value. *Wat. Sci. Tech.*, **25** (10), 319-327.
- Ruane, M. 1974. Recovery of algae from brine suspensions. Australian patent nº 486999.
- Ryther, J.H., Goldman, J.C., Gifford, C.E., Huguenin, J.E., Wing, A.S., Clarner, J.P., Williams, L.D. y Lapointe, B.E. 1975. Physical models of integrated waste recycling-marine polyculture systems. *Aquaculture*, **5**, 163-177.
- Sadka, A., Himmelhoch, S. y Zamir, A. 1991. A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.*, **95**, 822-831.
- Sanchez-Saavedra, M.P., Jimenez, C. y Figueroa, F.L. 1996. Variable fluorescence of chlorophyll *a* in *Dunaliella bardawil* with different β -carotene content. *Sci. Mar.*, **60** (1), 227-231.
- Sandbank, E., Shelef, G. y Wachs, A.M. 1974. Improved electroflotation for the removal of suspended solids from algae pond effluents. *Water Research*, **8**, 587-592.
- Saranak, J. y Foster, K.W. 1994. The *in vivo* cleavage of carotenoids into retinoids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Botany*, **45**, 505-511.
- Santamaria, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Andreoni, L. y Bermond, P. 1983. Benz[a]pyrene carcinogenicity and its prevention by carotenoids. En: "Mediation of cancer by vitamins" Basel: Karger, pp. 81-88.
- Schiedt, K. 1989. En: "Carotenoids: chemistry and biology", Krinsky, N.I., Mathews-Roth, M.M. y Taylor, R.F. (eds.) Proc 8th Int. symp. carotenoids, Plenum, Nueva York, p. 247.
- Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J. y Levenson, S.M. 1982. Moloney murine sarcoma virus tumours in CBA/J mice: chemopreventive and chemotherapeutic action of supplemental beta-carotene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 835-840.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1991. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta) *J. Phycol.*, **27**, 652-656.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1992. Biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella*. En: "Methods of enzymology", vol 213. Packer, L. (ed.) Academic Press, pp. 439-444.
- Shelef, G. y Soeder, C.J. 1980. "Algal biomass: production and use". Elsevier. North-Holland, Biomedical Press, Nueva York.
- Shelef, G., Azov, Y., Moraine, R. y Oron, G. 1980. Algal mass production as an integral part of a wastewater treatment and reclamation system. En: "Algal biomass. Production and use", Shelef, G. y Soeder, C.J. (eds.) Elsevier North-Holland, Amsterdam. pp. 163-189.
- Siegel, B.Z., Siegel, S.M., Speitel, T., Waber, J. y Stoeker, R. 1984. Brine organisms and the question of habitat-specific adaptation. *Origins of Life*, **14**, 757-770.
- Simpson, K.L., Katayama, T. y Chichester, C.O. 1981. En: "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Bauernfeind, J.C. (ed.) Academic Press, New York, pp. 43-51.
- Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A. y Orr, W.C. 1993. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **90**, 7255-7256.

- Spoehr, H.A. y Milner, H.W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. Plant Physiol., **24**, 120-149.
- Stadtman, E.R. 1992. Protein oxidation and aging. Science, **257**, 1220-1222.
- Stanier, R.Y. 1970. Twentieth symposium of the society for general microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1.
- Storebakken, T. 1988. Krill as a potential feed source for salmonids. Aquaculture, **70**, 193-205.
- Sukenik, A. y Shelef, G. 1984. Algal autoflocculation: verification and proposed mechanism. Biotechnol. Bioeng., **26**, 142-147.
- Sutherland, I.W. 1986. Industrially useful microbial polysaccharides. Microbiol. Sciences, **3**, 5-8.
- Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. Ann. Rev. Plant Physiol., **8**, 309-334.
- Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okomura, A. y Mori, H. 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. Carcinogenesis, **15**, 15-19.
- Tease, B.E. y Walker, R.W. 1987. Comparative composition of the sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* ATCC 27152 cultured with and without combined nitrogen. J. Gen. Microbiol., **133**, 3331-3339.
- Teodoresco, E.C. 1905. Organisation et développement du *Dunaliella* nouveau genre de Volvocaceae-Polyblepharidée. Bot. Zentralbl. Beih., **18**, 215-232.
- Terao, J. 1989. Antioxydant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. Lipids, **24**, 659-661.
- Thepenier, C. y Gudin, C. 1985. Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. Mircen J., **1**, 257-268.
- Thomas, W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A. y Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. Biomass, **5**, 181-225.
- Thurnham, D.I. 1988. Do higher vitamin A requirements in men explain the difference between sexes in plasma provitamin A carotenoids and retinol?. Br. J. Nutr., **47**, 181-184.
- Van Auken, O.W. y McNulty, I.B. 1973. The effect of environmental factors on the growth of a halophilic species of algae. Biological Bulletin, Woods Hole, **145**, 210-222.
- Veenhuis, M. y Harder, W. 1991. En: "The yeasts, 2nd edn", vol 4. Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.) Academic Press, London, pp. 601.
- Venkatamaran, G.S. 1981. Blue-green algae: a possible remedy to nitrogen scarcity. Current Science, **50**, 253-256.
- Vincenzini, M., De Philippis, R., Sili, C. y Materassi, R. 1990. A novel exopolysaccharide from a filamentous cyanobacterium: production, chemical characterization and rheological properties. En: "Novel biodegradable microbial polymers". Dawes, E.A. (ed.) Kluwer Academic, Netherlands. pp. 295-310.
- Vonshak, A. 1987. Biological limitations in developing the biotechnology for algal mass cultivation. Sciences de l'eau, **6**, 99-103.
- Vonshak, A. y Guy, R. 1988. Photoinhibition as a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina páfensis*. En: "Algal biotechnology". Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H. y Christiaen, D. (eds.) Elsevier Applied Science, Londres. pp. 365-370.

- Watanabe, A., Nishigaki, S. y Konishi, C. 1951. Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. Nature, **168**, 748-749.
- Wegmann, K., Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1980. The effect of temperature on glycerol retention in the halotolerant algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. Plant Physiol., **66**, 1196-1197.
- Weissman, J.C., Goebel, R.P. y Benemann, J.R. 1988. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization and oxygen accumulation. Biotechnol. Bioeng., **31**, 336-344.
- Zelazny, A., Shaish, A. y Pick, U. 1995. Plasma membrane sterols are essential for sensing osmotic changes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol., **109**, 1395-1403.
- Zenvirth, D. y Kaplan, A. 1981. Uptake and efflux of inorganic carbon in *Dunaliella salina*. Planta, **152**, 8-12.
- Zigman, S. 1993. Ocular light damage. Photochem. Photobiol., **57**, 1060-1062.

ISBN 84-89802-95-5



9 788489 802957

P.V.P.
1.800 P.
10,81