

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**MIXOTROFÍA Y ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA DE  
ÁCIDOS GRASOS E INTERACCIÓN POLIAMIDAS –  
GLICEROL DURANTE EL CRECIMIENTO Y  
DESARROLLO DE MACROALGAS MARINAS IN VITRO**

**FERNANDO MARIÁN DE DIEGO**

Las Palmas de Gran Canaria, Marzo de 2002

54/2001-02

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de marzo de 2002.

El/a Presidente/a: Dr.D. Jesús Pérez Peña,

El/a Secretario/a: Dr.D. Pascual Caballero Ortega,

El/a Vocal: Dr.D. Ricardo Hilario Sánchez Tames,

El/a Vocal: Dr.D. Kamen Stefanov,

El/a Vocal: Dr.D. José Luis Guj Guerrero,

El Doctorando: D. Fernando Javier Marián de Diego,



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE ECOSISTEMAS LITORALES

**MIXOTROFÍA Y ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA DE ÁCIDOS GRASOS  
E INTERACCIÓN POLIAMINAS-GLICEROL DURANTE EL  
CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE MACROALGAS MARINAS *IN*  
*VITRO***

Tesis Doctoral presentada por *D. Fernando Marián de Diego*

Dirigida por el *Dr. Rafael Robaina Romero* y la *Dra. Pilar García Jiménez*

Dr. Rafael Robaina Romero

Dra. Pilar García Jiménez

El Doctorando



Las Palmas de Gran Canaria, marzo de 2002.

## AGRADECIMIENTOS

De manera sincera y profunda quisiera agradecer:

A los Dres. Rafael Robaina Romero y Pilar García Jiménez por haberme enseñado a aprender, y compartir conmigo su ilusión por el trabajo científico.

A Rafa, por estar conmigo desde el principio y mostrarme qué es ser un gran profesor, un gran científico, pero sobre todo una gran persona. Por saber estimular mi curiosidad científica y mi capacidad de trabajo durante estos largos años. Por enseñarme a ver, escuchar, leer y escribir ciencia. Gracias por haber creído en mí desde el principio y hasta el final.

A Pili, por su paciencia a la hora de enseñarme, de escucharme, y de corregirme. Por su consejo y orientación tanto dentro del laboratorio como fuera de él. Por su incondicional apoyo a mis aptitudes. Su calidad humana y su sencillez me han enseñado a intentar ser siempre mejor de lo que soy como persona y como científico. Gracias por sentirme afortunado de trabajar a tu lado.

Al Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, que me ha permitido usar sus instalaciones para poder desarrollar este trabajo de investigación.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deportes por sus becas de investigación, las cuales me han permitido participar en el avance y desarrollo de la investigación científica.

Al Dr. Diego López Alonso, que me aceptó en sus dependencias del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Almería y me abrió las puertas de los ácidos grasos.

Al Director y al personal del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, y en especial a sus becarios, por compartir conmigo su experiencia en biotecnología algal y hacerme pasar una temporada inolvidable.

To Dr. Kamen Stefanov, for training me on how to understand fatty acid analysis, and for sharing with me his long lab experience.



Al Director y al personal del CIDIA de la ULPGC, por las facilidades prestadas para trabajar con el cromatógrafo de gases.

A mis grandes Amigos Eduardo y Fernando Alonso, por estar ahí cuando los necesité, por saber escucharme, y sobre todo por comprender lo mucho que esto ha significado para mi.

A mi inseparable amigo, colega, y compañero de fatigas, Fernando Tuya, por los buenos momentos que hemos pasado juntos en esta experiencia científica, y por la cantidad de veces que supo contrastar mis opiniones acerca de la ciencia y el deporte: mis dos pasiones. Muchas veces, mis sueños y mis miedos, fueron también los suyos.

A los Becarios de Investigación de antes y de ahora. De aquí, y de allí. Las muchas horas compartidas en los laboratorios y, fuera de ellos hacen que uno no se sienta tan *precario* al menos en términos humanos. Cada uno de ellos tiene su trocito dentro de este trabajo.

A mis compañeros de la XI Promoción de Ciencias del Mar de la ULPGC, por su ánimo y apoyo en mis primeros años en el laboratorio, años difíciles pero inolvidables.

Al Océano Atlántico, por haberme ofrecido grandes días de surf y pesca submarina; permitiéndome *escapar y desconectar* cuando fue necesario.

A todos los deportistas que me han rodeado en estos años, por compartir los muchos kilómetros de aventura por el agua, la tierra y el asfalto, y que me han enseñado a trabajar duro con el objetivo de llegar a una meta.

A mis padres, que siempre me han estimulado para trabajar como el que más, pero también a disfrutar como el que más. A mis hermanos Jaime, Luisa y Nacho, a toda mi familia, y a todos aquellos que han sabido soportar mis locuras por la ciencia. Mis inquietudes, mis esperanzas y, mis desilusiones, eran las suyas. GRACIAS.

To John and Eva Mae, because the year that I spent with them just made it easier for me. I love you.

*A MIS PADRES,  
Y A LA MEMORIA DE JOSÉ MIGUEL CURBELO*

*Una cosa que he aprendido en una larga vida es que toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil, pero es lo más precioso que tenemos.*

**ALBERT EINSTEIN**

**ÍNDICE**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	I.1. INTRODUCCIÓN .....	3
	Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de macrófitos: explantos, asepsia y regulación del crecimiento. Un primer paso en el desarrollo biotecnológico.....	8
	Fisiología del carbono orgánico en las algas: osmorregulación, mixotrofia, actividad biosintética y regulación del crecimiento y desarrollo .....	12
	I.2. MIXOTROFÍA Y ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA. EL GLICEROL Y LOS ÁCIDOS GRASOS.....	15
	I.3. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO. EL GLICEROL Y LAS POLIAMINAS.....	17
	I. 4. OBJETIVOS .....	23
<b>II.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
	II.1. MATERIAL VEGETAL: CARACTERÍSTICAS Y HÁBITAT .....	27
	II.2. PRODUCCIÓN DE CARPOESPORAS E INCUBACIONES.....	32
	Incubaciones para el análisis del glicerol, floridósido y azúcares de bajo peso molecular.....	34
	Incubaciones para el análisis de ácidos grasos .....	37
	Incubaciones y cultivos para el análisis de poliaminas .....	40
	II. 3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL, FLORIDÓSIDO Y DE AZÚCARES DE BAJO PESO MOLECULAR.....	41
	II. 4. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	51
	II.5. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIAMINAS.....	60
	II. 6. TRAZADORES RADIOACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN METABÓLICA ENTRE EL GLICEROL Y LAS POLIAMINAS.....	65
	II. 7. DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN: UN MÉTODO FACTORIAL DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A CULTIVOS.....	67

<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
	III.1 GLICEROL, FLORIDÓSIDO Y AZÚCARES DE BAJO PESO MOLECULAR.....	73
	Efecto de la concentración iónica sobre la acumulación de glicerol interno y floridósido.....	85
	III. 2. ÁCIDOS GRASOS.....	90
	Efecto del tiempo de incubación en la acumulación de ácidos grasos.....	94
	Efecto de las variaciones de las condiciones de cultivo en la acumulación de ácidos grasos.....	98
	III.3. NIVÉLES ENDÓGENOS, ACUMULACIÓN Y EFECTO DE LAS POLIAMINAS.....	116
	Presencia de poliaminas en las algas <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Gelidium canariensis</i> y <i>Grateloupia doryphora</i> .....	116
	Regulación del crecimiento y desarrollo. Cambios en la concentración de poliaminas durante el crecimiento celular por el glicerol <i>in vitro</i> .....	117
	Acumulación diferencial de poliaminas en la fanerógama marina <i>Cymodocea nodosa</i> .....	123
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>127</b>
	Análisis de glicerol, floridósido y azúcares de bajo peso molecular.....	129
	Acumulación de ácidos grasos.....	147
	Poliaminas en macrófitos marinos.....	160
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>173</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>177</b>

## **INTRODUCCIÓN**



## I.1. INTRODUCCIÓN

Las algas han servido como fuente de alimentación a la humanidad y fundamentalmente en la sociedad oriental, durante bastante tiempo (Honya *et al.*, 1992). Hay evidencias de tribus africanas que se alimentaban del alga *Spirulina*, muy abundante en el lago Chad, desde hace cientos de años (Kyle, 1989). Las comunidades humanas explotaban este recurso natural de manera extensiva, recogiendo aquellas especies algales que bien la marea o los arribazones les permitían.

Con el paso de los siglos y el intercambio cultural, occidente comenzó a fijarse en las algas como una posible fuente de alimentación que aportara proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas de manera directa (Borowitzka, 1986). De esta manera, en la década de los setenta se comenzaron a construir grandes sistemas de cultivo extensivos, conocidos como *pond system* (estanques), para la producción de grandes cantidades de biomasa algal, fundamentalmente microalgas del género *Spirulina*, *Dunaliella* y *Chlorella* (Borowitzka, 1986; Kyle, 1989). Países como Estados Unidos, Australia, Israel, y Japón, fueron pioneros en el establecimientos de estas granjas dedicadas a la maricultura.

En un principio, el objetivo de estas grandes industrias era reemplazar las fuentes más tradicionales de proteínas y aminoácidos por un plato de polvo verdoso que aportaba más nutrientes que incluso la carne. Esta mentalidad coincidió, en el tiempo, con la idea de que el desarrollo sostenible de la humanidad tocaba a su fin, que no habría alimentos suficientes para alimentar al mundo entero, y que no había tierras de cultivo suficientes para producir lo que el mundo desarrollado consumía mientras el tercer mundo se moría de hambre.

No obstante y al contrario que en la sociedad oriental, las algas nunca han sido aceptadas por la comunidad occidental como una fuente real de alimento



(Honya *et al.*, 1993), y poco a poco estas industrias han ido desapareciendo al ser poco rentables y de baja productividad (Barclay *et al.*, 1987; Gladue, 1991).

Una vez pasada la frontera del nuevo siglo se puede afirmar que ni el mundo se acabó, que la sociedad occidental no consume algas (por lo menos de manera comparable a otros alimentos tradicionales), y que el tercer mundo sigue pasando hambre. Pero lo que sí ha ocurrido en estos últimos 20 años es una clara evolución en el interés sobre el potencial de las algas marinas y en sus técnicas de cultivo.

De un número pequeño de especies marinas, de todas las existentes, se han llegado a aislar miles de compuestos químicos activos (Ireland *et al.*, 1993). Hoy en día, la actividad biológica y el efecto fisiológico de muchos de estos compuestos está aún por descubrir, pero parece claro que afectará a sectores industriales tan importantes como la farmacéutica, la dietética, la cosmética, y la bioquímica. Esto se traduce en un potencial económico de cientos de millones de dólares (BioScience, 1996).

La ingeniería de los bioprocesos marinos (más conocida en términos anglosajones como *marine bioprocess engineering*), que resulta ser un compendio entre biología, bioquímica, ingeniería industrial, y la industria, se perfila como la herramienta adecuada para desarrollar este potencial existente en los océanos.

Los conocimientos en fisiología y el diseño ingenieril se dan la mano en pro de la biotecnología, pues resulta fundamental comprender el funcionamiento (en un contexto metabólico) de estos organismos para poder enfocar toda su energía hacia un determinado objetivo o producto final. La eficiencia de esta cooperación será posible si se dispone de la tecnología adecuada, esto es, sistemas de cultivo avanzados.

De manera general, las sustancias bioactivas que se encuentran en pequeñas concentraciones en los organismos vivos se denominan metabolitos secundarios, ya que son normalmente generados por el metabolismo secundario, aunque en algunos casos, su nombre pasa al de producto natural, ya que ese metabolito solo lo produce ese organismo. En el contexto marino, una recolección (extractiva) masiva del organismo productor traería seguramente consecuencias desastrosas y desconocidas para la estabilidad del ecosistema concreto, pudiéndose afirmar que ninguna población natural sería capaz de soportar las necesidades de producción industrial exigidas.

Actualmente tanto las micro como las macroalgas, que están siendo usadas industrialmente a una menor escala en la obtención de sustancias de cierto interés, han demostrado previamente en una escala de laboratorio su viabilidad en la producción a mayor escala. De esta manera queda reflejado que el primer paso en el desarrollo biotecnológico pasa por una adecuada tecnología *in vitro* que soporte la investigación básica (Qi & Rorrer, 1994). Este tipo de ciencia resulta esencial para poder estudiar la biosíntesis y acumulación de estos metabolitos secundarios, pues en muchos casos se desconocen qué factores las afectan y en qué manera. A partir de aquí es donde la investigación aplicada surge conjuntamente con la ingeniería responsable de diseñar el sistema de cultivo que optimice la producción.

El diseño del sistema de cultivo va a depender mucho del valor del producto que se quiera obtener. Así, en un principio, cuando el objetivo de las empresas dedicadas a la maricultura era la producción de biomasa destinada al consumo humano, el sistema más usados era del tipo estanque. Este diseño mantenía una producción semi-extensiva al aire libre. El éxito de este sistema consistía en un mantenimiento escaso, de bajo coste, permitiendo una gran producción de biomasa. No obstante, la imposibilidad de controlar las

condiciones ambientales, así como, la pureza del cultivo limitó su desarrollo (Richmond & Vonshak, 1991; Barclay *et al.*, 1994; Xian-Ming *et al.*, 1999).

La tecnología opuesta a los estanques de cultivo extensivo se desarrolló debido a la demanda de compuestos bioactivos sintetizados por las algas, de elevado valor añadido y presentes en bajas concentraciones. Esta industria demandaba una tecnología totalmente diferente: reactores cerrados y totalmente automatizados, los fotobiorreactores. Estos sistemas controlaban en tiempo real las condiciones ambientales del cultivo, y eran capaces de llevar al alga hasta su máximo rendimiento metabólico, dirigiéndolo hacia la biosíntesis de un determinado compuesto (García Camacho *et al.*, 1999).

Hoy en día, la tecnología del siglo XXI para cultivos algales debe cimentarse sobre tres sólidos pilares. El primero es unos profundos conocimientos de la fisiología algal. Es necesario conocer cómo afectan las condiciones físico-químicas del medio al metabolismo algal tanto desde el punto de vista del desarrollo celular como del fisiológico. La interacción entre las variables que controlan el cultivo será determinante en la definición del perfil bioquímico de la biomasa, es decir, conociendo qué condiciones de cultivo afectan al metabolismo, controlarlas y, en cierta medida, poder dirigir la biosíntesis y la acumulación de estas sustancias. La optimización de las condiciones de cultivo resulta, por tanto, fundamental a la hora de poder usar los cultivos algales como una fuente real de sustancias de elevado valor añadido como pueden ser los ácidos grasos poliinsaturados, los ficopigmentos, y otras moléculas más específicas. La investigación básica es fundamental en este aspecto, sobre todo para macroalgas, en lo que se refiere al control del crecimiento y desarrollo y los factores de cultivo que lo controlan.

El segundo pilar está en los fotobiorreactores. La tecnología de los reactores industriales de cultivo debe ser tal que optimice la producción biosintética y aproveche al máximo los rendimientos metabólicos del alga. Este

campo está ya muy avanzado, existiendo en la actualidad numerosos modelos experimentales totalmente automatizados (Pohl *et al.*, 1988; Qi & Rorrer, 1995; Molina Grima *et al.*, 1997; Baquerisse *et al.*, 1999; Borowitzka, 1999; García Camacho *et al.*, 1999).

El tercer y último paso para un correcto procesado industrial de la aplicación biotecnológica consiste en el adecuado refinado y recuperación del producto final. Este campo está en pleno apogeo, pues cada día se diseñan complicados procesos físico-químicos que permiten un mayor rendimiento en el aprovechamiento de la materia prima (Molina Grima *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 1998; Giménez Giménez *et al.*, 1998; Robles Medina *et al.*, 1998). La importancia de este apartado industrial queda de manifiesto en la política adoptada por la Oficina de Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos de América, cuando John H. Gibbons, director de dicha oficina en la administración Clinton, estableció las líneas prioritarias a desarrollar en el ámbito biotecnológico en el comunicado titulado "Biotecnología para el siglo XXI: nuevos horizontes". Se consideró prioritario el desarrollo de técnicas capaces de recuperar y purificar productos derivados de bioprocesos, y el establecimiento de modelos predictivos que faciliten el diseño estos sistemas.

Un importante aspecto tecnológico a tener en cuenta es la metodología analítica usada en la identificación y cuantificación de productos naturales, pues no vale de nada perseguir una serie de compuestos si no se usa el instrumental adecuado.

De esta manera, las técnicas cromatográficas se han revelado como una potente herramienta a la hora de evaluar la presencia de los metabolitos, ya que posterior a una extracción, es posible separar y cuantificar las sustancias de interés. Además, su elevada versatilidad y reproducibilidad, hacen de ellas fundamental en los laboratorios de investigación biotecnológicos. Ya sean sustancias de carácter lipídico, proteínico, o glucosídico, todas pueden ser adaptadas para ser separadas y detectadas en un análisis cromatográfico. Su

versatilidad permite adaptar numerosos tipos de detectores al final del proceso cromatográfico, ya sean de absorbancia, de fluorescencia, o de otro tipo. Y en tanto en cuanto se mantengan las condiciones analíticas constantes, la reproducibilidad de los resultados es muy elevada. En este sentido, Munro y colaboradores (1999) destacan que los avances en las técnicas cromatográficas, para analizar compuestos polares, han supuesto un aumento en la proporción de moléculas aisladas con propiedades bioactivas.

### **Establecimiento de cultivos *in vitro* de macrófitos: explantos, asepsia y regulación del crecimiento. Un primer paso en el desarrollo biotecnológico**

Las primeras técnicas de cultivo *in vitro* (también conocido como cultivo de tejidos) se desarrollaron para plantas vasculares con el objetivo de propagar aquellas variedades que mejores rendimientos dieran a la hora de explotar industrialmente estas plantas, o los productos obtenidos de ellas (frutos, hojas, raíces, etc.; Slocum *et al.*, 1984). En este sentido, la biotecnología vegetal es necesaria para trasladar los conocimientos adquiridos en investigación molecular, hacia su aplicación directa sobre plantas en cultivo. De esta manera, y sobre una base metodológica común, se ha llegado a poder cultivar *in vitro* a la mayor parte de las plantas superiores.

El establecimiento de una metodología de cultivo de tejidos para macroalgas marinas ha permitido el estudio de aspectos como el desarrollo celular, los patrones de crecimiento inducidos por las condiciones de cultivo, y la acumulación de sustancias de interés económico. Los primeros ensayos sobre la propagación de tejidos algales fueron realizados por Chen & Taylor (1978), con la propagación de *Chondrus crispus*. A medida que avanzaban las investigaciones se fueron definiendo una serie de herramientas que resultarían fundamentales comprender y usar para, finalmente, poder establecer una metodología básica. El cultivo axénico (Fries, 1963; Polne-Fuller & Gibor,

1987), las características físico-químicas del medio de cultivo (Fries, 1973; Lee, 1985), y el uso de sustancias reguladoras del crecimiento (Fries, 1973; Augier, 1978), fueron aspectos fuertemente potenciados.

El material vegetal usado en cultivos de tejidos pasa por ser partes aisladas de la planta que, bajo ciertas condiciones es capaz de crecer. No obstante, la presencia de competidores (bacterias) pueden enmascarar el rendimiento del tejido y alterar la respuesta esperada, considerando que en condiciones de cultivo ideales, las bacterias aprovechan a mayor velocidad los nutrientes del medio. El establecimiento de cultivos axénicos es, por tanto imprescindible, para conocer qué agentes químicos (orgánicos o inorgánicos), o físicos están siendo responsables de los cambios bioquímicos registrados (Polne-Fuller & Gibor, 1987).

En vegetales marinos, dada la diversidad de especies, la procedencia del fragmento de alga, su estado fisiológico y reproductivo, las diferentes condiciones de cultivo, hacen que los resultados de una especie no sean reproducibles con otras. Considerando también que diferentes zonas del talo presentan diferencias, la estrategia seguida (adoptada del cultivo de tejidos en plantas superiores) consistía en sembrar partes del alga donde se supiera la inexistencia del contaminante, por ejemplo esporas, cuyo origen tisular interno garantiza la ausencia de endófitos (García-Jiménez *et al.*, 1996, 1998; Rodrigo & Robaina, 1997).

El control de las propiedades osmóticas del medio (osmolalidad) es uno de los factores más importantes a tener en cuenta durante los cultivos, máxime si se añaden fuentes de carbono exógenamente al agua de mar (Robaina, 1988). De esta manera, se puede distinguir los efectos de la fuente de carbono cuando actúa como producto de reserva y de regulación osmótica o durante el crecimiento y el desarrollo.

La habilidad de las microalgas para asimilar fuentes de carbono orgánico en cultivos mixotróficos e incluso heterótroficos estaba sobradamente descrita (Theriault, 1965; Droop, 1974; Endo *et al.*, 1977; Barclay *et al.*, 1994), pero en este campo las macroalgas llevaban mucho retraso.

El glicerol es una de las fuentes de carbono con las que más se ha trabajado en cultivo *in vitro* de algas. Su efecto sobre el metabolismo vegetal no es extrapolable a otras fuentes de carbono, indicando que los cambios fisiológicos que tienen lugar son el resultado directo de su utilización por el alga. En las carposporas germinadas de *G. doryphora* se determinó como el glicerol estaba siendo respirado, provocando al mismo tiempo cambios en el patrón morfogénico (Robaina *et al.*, 1995). Una intensa división celular a las pocas horas de iniciarse el cultivo (2 primeras horas) daba lugar al establecimiento de capas celulares concéntricas en la masa celular (24 horas), y a la posterior emisión de yemas (morfogénesis). La actividad biosintética inducida por la aportación en exceso de glicerol se identificó por la acumulación de polisacáridos, almidón de florideas, secreción de mucílago, y presencia de vacuolas osmiofílicas de naturaleza lipídica (García-Jiménez *et al.*, 1996).

En algas rojas, el glicerol combinado a otros compuestos como las aldosas, es producido fotosintéticamente y usado como mecanismo de regulación osmótica (Lobban & Harrison, 1994; Reed, 1985; Reed *et al.*, 1980). Por ello son explicables los efectos fisiológicos inmediatos del glicerol exógeno citados en la bibliografía (Robaina *et al.*, 1990a, 1995). Éste no sólo actuaba como fuente de carbono permitiendo una elevada tasa de propagación vegetativa, sino que además canalizaba el crecimiento hacia un patrón de crecimiento morfogénico.

Estos resultados reveladores planteaban la pregunta de cómo el glicerol podía generar un patrón de crecimiento siendo, aparentemente una cadena carbonada. En el caso de la planta del tabaco, también en cultivo *in vitro*, se encontró un resultado similar pero con la sacarosa como fuente de carbono (Brown *et al.*, 1979). En este caso el efecto morfogénico detectado era inducido

---

por reguladores de crecimiento aplicados sobre el cultivo, pero ausentes en el caso descrito por Robaina (1988).

Aparte de por las fuentes de carbono, el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los vegetales también está afectado por diferentes tipos de sustancias químicas. Las auxinas, giberelinas, citoquininas, el ácido abscísico, y el etileno son generalmente reconocidas como reguladoras del crecimiento (a las que habrá que añadir las poliaminas y los brasinoesteroides; Azcón-Bieto & Talón, 1993; Hopkins, 1995). En plantas superiores sus funciones se relacionan con múltiples procesos biológicos derivados de la actividad fisiológica-celular: vegetativa y/o reproductiva (Crozier *et al.*, 2000). En el caso de las algas, sus efectos están fundamentalmente vinculados al crecimiento y división celular (Fries, 1977; Mooney, 1983; Evans, 1984; Bradley & Cheney, 1990), aunque estos resultados deben ser tratados cuidadosamente, ya que también se han probado sin éxito en diferentes algas (Robaina, 1988; Kaczyna & Megnet, 1993). Según la diferente bibliografía consultada, el efecto de los reguladores ha sido muy heterogéneo, dependiendo su efectividad de factores como las condiciones de cultivo, y las características del material vegetal usado (Gusev *et al.* 1987; Bradley, 1991; Evans & Trewavas, 1991).

Los estadios de crecimiento más jóvenes de *G. doryphora* (*sporelings*) se mostraron sensibles al efecto tanto de los reguladores de crecimiento como de las poliaminas, no siendo así para explantos de talos adultos. La combinación del glicerol con los reguladores de crecimiento altera el efectos de éstos, aumentando significativamente, el crecimiento y la morfogénesis de los *sporelings* en presencia de las poliaminas (García-Jiménez *et al.*, 1998; Rodrigo, 1998). De esta manera, el papel del glicerol parecía estar más allá de aportar únicamente esqueletos carbonados y energía.

En esta línea, el sistema de cultivo *in vitro* se basa en la utilización preferente de estadios jóvenes, los cuales reaccionan con el glicerol añadido



exógenamente. Así, se incrementa su capacidad de crecimiento, se muestran patrones estables de desarrollo (morfogénesis) con una intensa actividad biosintética celular y, al mismo tiempo, interaccionan con los reguladores del crecimiento, particularmente las poliaminas (Robaina, 1988; Robaina *et al.*, 1995; García-Jiménez *et al.*, 1996, 1998).

A nuestro entender, la investigación de estos aspectos jugará un papel importante en el desarrollo de modernos métodos biotecnológicos de aprovechamiento de los macrófitos marinos.

### **Fisiología del carbono orgánico en las algas: osmorregulación, mixotrofia, actividad biosintética y regulación del crecimiento y desarrollo**

Los mecanismos de osmorregulación adoptados por las algas han sido descritos desde hace tiempo (Kauss, 1967; Hellebust, 1976). Se sabe que tanto los solutos inorgánicos como los orgánicos tienen un papel relevante en el balance osmótico, pues las algas adaptadas a ecosistemas intermareales deben soportar cambios periódicos en la presión osmótica externa, y en la concentración externa de iones salinos. Estas algas son capaces de regular sus concentraciones internas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Cl<sup>-</sup> (iones principalmente implicados), y/o sintetizar o degradar compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Kauss, 1978; Zimmermann, 1978; Bisson & Kirst, 1979). Estos compuestos, también denominados solutos compatibles, se caracterizan por ser muy solubles en la matriz intracelular, y por tener una baja toxicidad a elevadas concentraciones. Estas propiedades se deben a que estas sustancias son responsables de la estabilidad de los sistemas enzimáticos y proteínas en condiciones de estrés osmótico, pues estas moléculas no inhiben la actividad enzimática incluso a concentraciones mucho mayores que la salina (Reed *et al.*, 1980; Ben-Amotz & Avron, 1983a).

Se conocen diferentes compuestos orgánicos con un papel activo en la regulación osmótica. En el grupo de las cianobacterias, dependiendo del hábitat

y de la tolerancia a la salinidad, existe cierta diversidad en la composición de azúcares de bajo peso molecular (sacarosa, trealosa, compuestos cuaternarios de amonio). En algas pardas, se reconoce al manitol como al osmolito principal, y en Chlorophyta son la sacarosa, el glicerol y la prolina los principales solutos implicados (Ben-Amotz, 1983a; Reed *et al.*, 1985). En numerosas especies algales también se ha relacionado con la regulación osmótica al dimetilsulfoniopropionato (DMSP; Blunden & Gordon, 1986; Bisson & Kirst, 1995; Stefels, 2000; Kirst, 2001).

En algas rojas se han descrito una serie de compuestos derivados del glicerol. Esta fuente de carbono combinada con otros compuestos, como aldosas (galactosas o manosa), es producida fotosintéticamente y usado como mecanismo de regulación osmótica. El floridósido (O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-[1-2]-glicerol), junto con sus dos isómeros D y L-isofloridósido (O- $\alpha$ -galactopiranosil-[1-1]-glicerol), y el digeneasido (O- $\alpha$ -D-manopiranosil-[1-2]-glicerato), son los compuestos principalmente acumulados en la gran mayoría de los órdenes de Rhodophyta (Reed *et al.*, 1980; Reed, 1985; Meng *et al.*, 1987; Karsten *et al.*, 1993; Barrow *et al.*, 1995).

El papel fisiológico de los solutos compatibles, en Rhodophyta, aunque no está totalmente comprendido parece estar intrínsecamente relacionado con el incremento de la concentración salina del medio (Kauss, 1967; Kirst, 1980a; Ben-Amotz & Avron, 1983a; Reed *et al.*, 1985; Kirst, 1989), pero desempeñando una función protectora principalmente, pues el contenido intracelular de estos solutos no podría reestablecer el volumen original de la célula (Reed *et al.*, 1980). El floridósido es el carbohidrato soluble más acumulado durante la fotosíntesis, y los cambios descritos en su concentración interna durante condiciones osmóticas variables pueden deberse a ajustes en la relación fotosíntesis/respiración con el fin de evitar la destrucción celular por deshidratación o excesiva entrada de agua (Reed *et al.*, 1980).

La utilización de compuestos orgánicos para el crecimiento está muy documentada en microalgas (Lewitus & Caron, 1990, 1991a,b). En macroalgas existe una escasa documentación sobre el comportamiento de las fuentes de carbono, aunque se sabe que la luz juega un papel importante como reguladora en la utilización de los diferentes sustratos orgánicos. No obstante, este papel no es el mismo en todas las algas, ni en diferentes condiciones fisiológicas, ni con diferentes sustratos orgánicos (Sand-Jensen, 1988a,b; Markager & Sand-Jensen, 1990). Algunas especies vegetales no utilizan los glúcidos (hexosas fundamentalmente) como elementos centrales del metabolismo fotosintético del carbono, sino otras sustancias (Kirst, 1989, Stoop *et al.*, 1996). Asimismo, se sabe que determinadas fuentes de carbono necesitan un sistema de transporte para ser absorbidas, mientras que el alga requiere de un tiempo de contacto para alcanzar la máxima eficiencia de transporte (Van Baalan & Pulich, 1973; Neilson & Lewin, 1974).

## I.2. MIXOTROFÍA Y ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA. EL GLICEROL Y LOS ÁCIDOS GRASOS

En el caso particular de la Rhodophyta *Grateloupia doryphora*, nuestros resultados demostraron que en cultivo *in vitro*, el glicerol estimula el crecimiento y desarrollo, alterando las tasas fotosintéticas y respiratorias. Más aún, se detectó una intensa actividad celular con biosíntesis y acumulación de polisacáridos y sustancias de carácter lipídico (Robaina *et al.*, 1990a,b; Robaina *et al.*, 1995; García-Jiménez *et al.*, 1996, 1998).

Estas evidencias y, la presencia del glicerol como componente estructural de los acilglicéridos, señalaban una posible transformación del glicerol en fracciones lipídicas, pues aparte de proporcionar energía, esta fuente de carbono incorporaba esqueletos carbonados al metabolismo celular, pudiendo ser este exceso de carbono acumulado en forma de PUFAs.

Actualmente existe una gran demanda de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés *polyunsaturated fatty acids*), pues han sido descritos como un agentes protectores de la salud. Esta conexión entre los PUFAs y la salud, ha impulsado continuamente la investigación sobre su uso en la dieta de animales y humanos (Nestel, 1988). Solo aquellos ácidos pertenecientes a las familias  $\omega 6$  y  $\omega 3$  (esta simbología hace referencia a la posición del primer doble enlace) son considerados como esenciales, es decir, que además de desempeñar una función vital en el organismo, no pueden ser completamente sintetizados por éste (Spector, 1999). Aceites como el ácido eicosapentanoico (EPA) y el araquidónico (AA), ambos considerados componentes esenciales en la dieta humana (WHO/FAO, 1977; Lee *et al.*, 1989; Spector, 1999), están relacionados con multitud de eventos que de una manera u otra inciden de forma beneficiosa sobre nuestro organismo. El consumo regular de EPA ha sido relacionado con la disminución del riesgo coronario y de arterioesclerosis, con la prevención de la hipertriglicemia y la disminución del colesterol en sangre, y se ha mostrado

efectivo en la disminución de procesos inflamatorios (Nordoy, 1991; Simopoulos, 1991; Ziboh, 1991; Rambjor *et al.*, 1996; Weylandt *et al.*, 1996; Gill & Valivety, 1997). Asimismo se ha mostrado efectivo contra procesos tumorales (Braden & Carroll, 1986; Senzaki *et al.*, 1998). Por otro lado, el AA es un precursor de las prostaglandinas (Sing & Chandra, 1988), y por ser un componente de la leche materna en mamíferos, es necesario para el correcto desarrollo de los recién nacidos (Koletzko *et al.*, 1996).

La comercialización de los PUFAs está destinada principalmente hacia productos de complementación dietética en humanos, y como suplementos en piensos destinados a la acuicultura (de Pauw & Persoone, 1988; Thompson *et al.*, 1990; Sicko-Goad & Andresen, 1991; Robles Medina *et al.*, 1999).

El aceite de pescado ha sido tradicionalmente la principal fuente comercial de  $\omega 6$  y  $\omega 3$  PUFAs (Yongmanitchai & Ward, 1991; Banaimoon, 1992; Robles Medina *et al.*, 1998; Chini Zitelli *et al.*, 1999; de Swaaf *et al.*, 1999). No obstante, la creciente demanda, las nuevas aplicaciones comerciales y, los inconvenientes derivados del almacenaje de grandes cantidades de aceite de pescado, hacen que esta fuente sea insuficiente e inapropiada (Barclay *et al.*, 1994; Carlson, 1996; Wood *et al.*, 1999).

Las alternativas industriales y comerciales a los aceites de pescado, como fuente de  $\omega 6$  y  $\omega 3$  PUFAs, son las algas (Cartens *et al.*, 1996; Molina Grima *et al.*, 1996; Akimoto *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 1998), pues como es sabido los peces no pueden sintetizar los ácidos grasos esenciales, sino que los acumulan a partir de las algas incorporadas en su dieta (Ackman, 1982; Yongmanitchai & Ward, 1989). En este sentido, las macroalgas rojas se caracterizan por tener cantidades significativamente importantes de PUFAs de cadena larga, es decir, EPA y AA (Khotimchenko & Vaskovsky, 1990; Dembisky *et al.*, 1991; Jones & Hardwood, 1993; Khotimchenko & Levchenko, 1997).

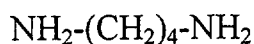
### I.3. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO. EL GLICEROL Y LAS POLIAMINAS

En *Grateloupia doryphora* las poliaminas inducen el crecimiento y la morfogénesis de la misma manera que lo ya descrito para el glicerol, es decir, formación de masas celulares con una alta división celular. No obstante, estos efectos se ven amplificados cuando ambos factores se disponen al mismo tiempo en el medio de cultivo (García-Jiménez *et al.*, 1998).

En fanerógamas marinas, la bibliografía consultada solamente aborda el uso de reguladores comunes durante la germinación y propagación (Loquès *et al.*, 1990; Bird & Jewett-Smith, 1994; Terrados, 1995; Balestri *et al.*, 1998) pero no explícitamente el de poliaminas.

Las poliaminas, moléculas de naturaleza orgánica y compuestas por una cadena carbonada con grupos amino (Figura 1), ocupan una posición relevante entre los numerosos compuestos nitrogenados de los vegetales. La putrescina, la espermidina y la espermina son las más ubicuas de las poliaminas, es decir, las más comúnmente encontradas en todo tipo de organismos (Tabor & Tabor, 1984; Evans & Malmberg, 1989; Flores, 1990; Lee & Chu, 1992; Altman & Levin, 1993).

Son sintetizadas en el ciclo del ácido cetoglutárico, incluida en la ruta biosintética de los aminoácidos glutamina-ornitina-citrulina, que finalmente acumula arginina y ornitina, reconocidos como los mayores precursores de las poliaminas. La putrescina puede derivarse de estos dos precursores: directamente a partir de la ornitina, o indirectamente a través de unos intermediarios desde la arginina (Figura 2).



Putrescina



Espermidina



Espermina

Figura 1. Diaminas y poliaminas de importancia fisiológica.

Cada vía requiere la descarboxilación de la molécula original a través de la enzima específica correspondiente: ornitina o arginina descarboxilasa (ODC y ADC respectivamente). También se propone una ruta alternativa que implica a la putrescina sintetasa, enzima multifuncional muy inestable que afecta a una serie de complejas reacciones donde se implican diferentes compuestos relacionados con las rutas de síntesis más comunes.

La síntesis de la espermidina y de la espermina (Figura 2) requiere la adición sucesiva de un grupo aminopropilo donado por la descarboxilación de la *S*-adenosilmetionina (SAM) a la putrescina. Un tipo específico de aminopropiltransferasas, conocidas como espermidina y espermina sintetasa, son las responsables de llevar a cabo la síntesis.

La degradación oxidativa de las poliaminas se lleva a cabo por la acción de las diaminaoxidasas, enzimas con una especificidad muy pequeña a la hora de oxidar tanto las diaminas como las poliaminas. Los compuestos resultantes de esta oxidación son anillos pirrólicos o derivados (Slocum *et al.*, 1984).

Hasta el desarrollo de inhibidores específicos y competitivos para las enzimas responsables de la biosíntesis de poliaminas, no se conocía específicamente su papel fisiológico, aunque ya se asociaba su acción al crecimiento y desarrollo celular (Slocum *et al.*, 1984). Su descubrimiento permitió conocer de una manera fiable el papel fisiológico de estas sustancias (Altman & Levin, 1993; Kevers *et al.*, 2000). Por ejemplo, la  $\alpha$ -difluormetilornitina (DFMO) y la  $\alpha$ -difluormetilarginina (DFMA), las cuales desactivan irreversiblemente la ODC y la ADC respectivamente, permitieron establecer relaciones entre los cambios en los niveles endógenos de poliaminas y procesos relacionados con el crecimiento (Bagni *et al.*, 1982; Tiburcio *et al.*, 1986; Flores 1990).



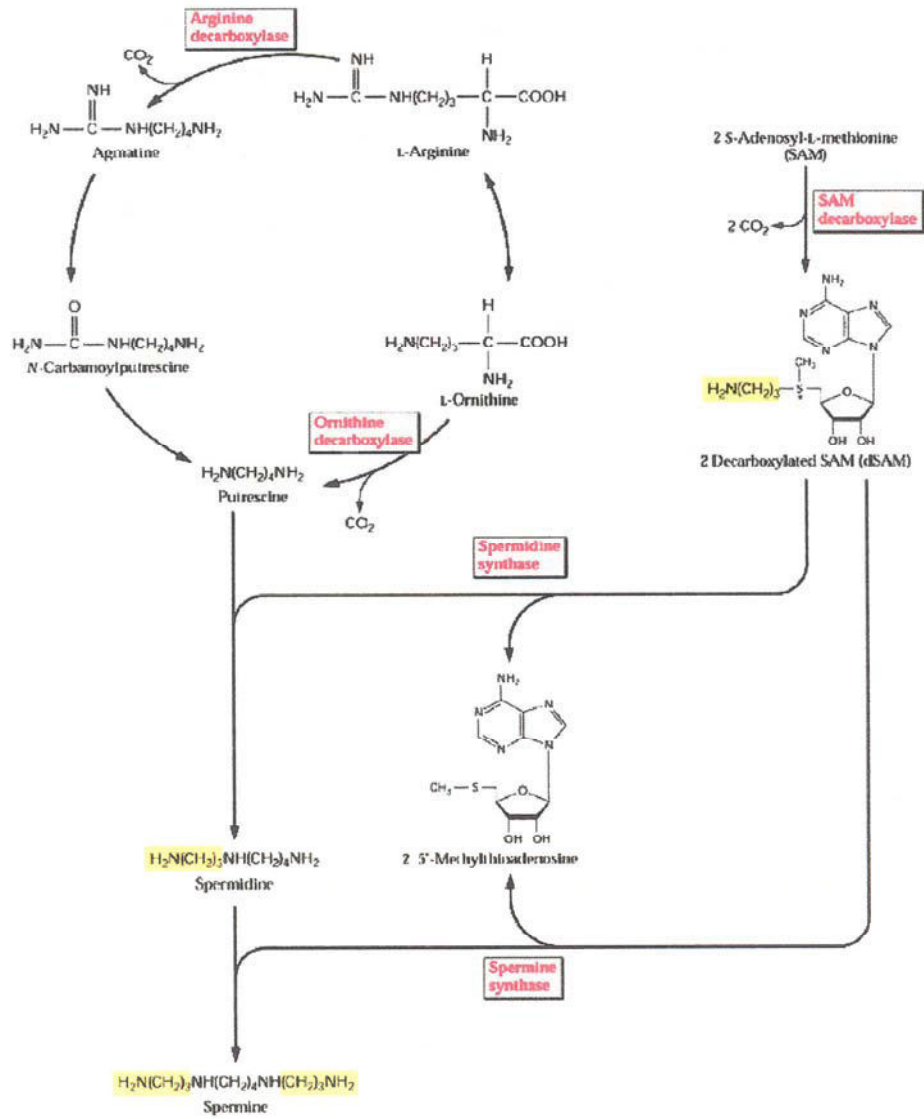


Figura 2. Biosíntesis de las poliaminas (tomada de Buchanan, Grussem, Jones (Eds)).

Existe abundante bibliografía acerca del papel de estas sustancias, fundamentalmente en plantas superiores con aplicación industrial o agrícola como *Nicotiana tabacum* (la planta del tabaco), *Oryza sativa* (la planta del arroz), *Solanum tuberosum* (la patata), *Lycopersicon esculentum* (el tomate), etc. Este conocimiento exacto del metabolismo de las poliaminas ha derivado en estudios excelentes sobre su papel durante el desarrollo vegetal. Así, la actividad fisiológica de estas moléculas, ampliamente descrita, se relaciona con diferentes procesos fisiológicos y metabólicos tales como el desarrollo y maduración de estructuras reproductoras (Torrighiani *et al.*, 1987; Gerats *et al.*, 1988), estabilizadores de membranas celulares (Schuber *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 1983; Kaur-Sawhney & Applewhite, 1993), moléculas que actúan en respuesta a situaciones estresantes (Flores, 1990; Aurisano *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1995; Galston *et al.*, 1997; Kakkar *et al.*, 2000), y como agentes antisenescentes (Slocum *et al.*, 1984; Evans & Malmberg, 1989; Rey *et al.*, 1994; Del Duca *et al.*, 2000).

El papel de las poliaminas como reguladores de crecimiento parece claro (Tiburcio *et al.*, 1993; Scoccianti *et al.*, 2000) y aunque se sabe que están íntimamente relacionadas con todo tipo de hormonas vegetales (Lee & Chu, 1992; Gaspar *et al.*, 1997; Bais *et al.*, 2000; Tassoni *et al.*, 2000), su acción morfogénica y su mecanismo fisiológico de acción no es del todo conocido.

Las poliaminas, debido a su naturaleza policatiónica pueden aparecer unidas a diversos tipos de componentes celulares como ácidos nucleicos y proteínas (Smith, 1985), de tal manera que en el interior de la célula se pueden encontrar de tres formas diferentes, i) en estado libre, ii) asociadas a moléculas de bajo peso molecular y iii) unidas a macromoléculas, (Chibi *et al.*, 1994; Gallardo *et al.*, 1994; Pedroso *et al.*, 1997).

Los estudios sobre la presencia y los efectos de las poliaminas en vegetales marinos son bastante escasos. El primer acercamiento a las aminas de

origen algal fue realizado por Kneifel (1979), mientras que, las primeras revisiones sobre el papel de las poliaminas en plantas fueron hechas por Smith (1971).

En general, los trabajos realizados en algas se han centrado en determinar la presencia de estos compuestos, y sus efectos en diferentes condiciones experimentales (Villanueva *et al.*, 1980). Hamana y colaboradores (1990) también encontraron diferencias en la composición de poliaminas dentro de un mismo grupo algal, relacionándola con las características taxonómicas. A nivel fisiológico, Cohen y colaboradores (1984) encontraron que las poliaminas promovían la división celular en *Chlorella*; se detectaron actividades relacionadas con su absorción y transporte dentro del talo de *Ulva* (Badini *et al.*, 1994); y Lee (1998) relacionó la acumulación de putrescina y espermidina bajo estrés hiposalino letal en varias especies de algas del intermareal.

#### I.4. OBJETIVOS

La especie *Grateloupia doryphora* es la que mejor se ha adaptado a nuestro sistema de propagación *in vitro*. Así hemos constatado el efecto del glicerol en cultivos asépticos de explantos o esporas, a los que provoca el aumento de su capacidad de crecimiento y desarrollo. También va acompañada de profundos cambios fisiológicos celulares, con alteración de las actividades metabólicas básicas en condiciones mixotróficas; la promoción de la actividad biosintética y el desarrollo de un patrón morfogénico sobre el que, pueden interferir los reguladores de crecimiento, particularmente las poliaminas (Robaina, 1988; Robaina *et al.*, 1990a,b; Robaina *et al.*, 1995; García-Jiménez, 1994; Rodrigo & Robaina 1997; García-Jiménez *et al.*, 1996, 1998).

Este sistema de propagación será útil en un futuro para el aprovechamiento biotecnológico según las tendencias actuales, ya mencionadas.

Este trabajo se centra en el seguimiento del destino del glicerol exógeno, añadido al medio, en los aspectos que se relacionan a continuación.

1. El estudio de la mixotrofia y la actividad biosintética ocasionada. Se pretende determinar si el flujo de carbono, a partir del glicerol, induce la acumulación de ácidos grasos de interés. Esto incluye:
  - La puesta a punto de técnicas cromatográficas para el seguimiento de las fracciones celulares polares y apolares.
  - La cuantificación del glicerol y otros productos derivados de su metabolización, incluido el destino osmótico del glicerol hacia floridósido.
  - La determinación del perfil de ácidos grasos de *G. doryphora* y su modificación por la alteración de variables de cultivo que afectan a la actividad mixotrófica: luz, glicerol y nutrientes.

- 
2. El estudio de la interacción glicerol-poliaminas en la regulación del crecimiento y el desarrollo *in vitro*. La posible acumulación de poliaminas y su relación con el patrón de crecimiento y desarrollo detectado. Esto abarca:
- La puesta a punto de técnicas para la cuantificación de poliaminas, en macrófitos marinos, que sirvan como referencia de los posibles cambios en medios con glicerol.
  - La determinación de las modificaciones en el perfil de las poliaminas detectadas, la conversión de glicerol en éstas, y los efectos de la inhibición de su síntesis.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## II.1. MATERIAL VEGETAL: CARACTERÍSTICAS Y HÁBITAT

Las especies vegetales estudiadas procedieron de poblaciones naturales existentes en diferentes puntos del litoral de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias). La recolección sucesiva de biomasa se realizó sobre las mismas poblaciones para disminuir en lo posible la variabilidad espacial. A la hora de proceder a su colecta se cortaban a los individuos cerca de la base con ayuda de unas pequeñas tijeras. Los individuos presentaban un alto grado de pigmentación, y no estaban deterioradas por agentes físicos (deshidratación, fuerte oleaje), químicos (presencia de vertidos) o biológicos (predación).

El transporte hasta el laboratorio se realizó inmediatamente, y siempre en bolsas de plástico con cierre sellado y conteniendo algo de agua del mismo entorno.

Las especies vegetales que han formado parte de este estudio comprenden a la Chlorophyta *Caulerpa racemosa*; las Phaeophyta *Dictyota dichotoma*, *Padina pavonica*, *Cystoseira abies-marina*, *Stypocaulon scoparium* y *Taonia* sp; las Rhodophyta *Asparagopsis* sp, *Gelidium canariensis* y *Grateloupia doryphora*; y la fanerógama marina de la familia Magnoliophyta, *Cymodocea nodosa*. Señalar, no obstante, que nuestra especie modelo experimental fue *G. doryphora*, al ser la única especie que se cultiva en condiciones axénicas de forma rutinaria. De ésta y de las otras especies se da una breve descripción a continuación.

La Chlorophyta *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh (Orden Caulerpales, Familia Caulerpáceae) presenta un talo de 5-7 cm de largo y 2-3 cm de ancho, erecto y con forma de hoja ovoide alargada, unidas por estolones subterráneos y generalmente formando praderas sobre fondos arenosos. A menudo aparece entremezclada con praderas de la fanerógama *Cymodocea nodosa*. Presenta un color verde brillante, pudiendo presentar tonalidades verde



amarillentas en la zona superior del talo en época de producción de gametos. Bastante común en fondos de Canarias. Se puede presentar a partir de unos pocos metros de profundidad en costas protegidas, o a partir de los 10-15 m y hasta los 30 m o más en fondos de costas expuestas.

Las Phaeophyta *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux, *Padina pavonica* (Linné) Thiry, y *Taonia* sp., pertenecen al Orden Dictyotales, Familia Dictyotaceae. *Cystoseira abies-marina* pertenece al Orden Fucales, y Familia Cystoseiraceae, mientras que *Stypocaulon scoparium* pertenece al Orden Sphacelariales y Familia Stypocaulaceae.

*D. dichotoma* presenta un talo plano muy fino con un crecimiento dicotómico muy regular, de 5-7 cm en tamaño. De un color marrón claro tenue, cuando está sumergida puede presentar tonalidades verde-azuladas iridiscentes. Suele presentarse en agrupaciones más o menos extensas.

En Canarias se presenta en prácticamente todos los fondos rocosos, desde los charcos del intermareal hasta los 10 m de profundidad.

*P. pavonica* es fácilmente reconocible por sus impregnaciones calcáreas a modo de anillos a lo largo del talo. Éste presenta una forma muy característica en forma de abanico y color marrón, y generalmente aparece roto y muy epifitado por algas de menor tamaño.

Aparece en pequeñas agrupaciones de varios individuos desde el intermareal inferior hasta los 10 m.

*Taonia* sp. tiene un talo acintado a modo de jirones e irregularmente dividido, queda fijo al sustrato por un disco basal. Los individuos fértiles muestran unas características bandas transversales debido a estructuras reproductoras. Es de un color marrón-amarillento, con tonalidades más claras en los extremos. Alcanza un tamaño superior a los 10 cm.

Aparece por primavera hasta finales del otoño, en costas agitadas, desde la superficie hasta los 10-15 m, y generalmente asociada a otros géneros como *Dicyota*.

*Cystoseira abies-marina* (S. G. Gmelin) C. Agardh presenta un talo fino, rígido y enmarañado, con abundantes estructuras a modo de espinas a lo largo. Casi siempre presenta un color marrón claro con diferentes tonalidades. Su tamaño no suele exceder los 15 cm, pero forma bandas algales muy densas, siendo difícil distinguir individuos independientes.

En Canarias se encuentra en los primeros metros del infralitoral en costas expuestas, formando parte de la banda de algas fotófilas de la que es su mayor representante.

*Stypocaulon scoparium* (Linné) Kützing tiene un talo compuesto por mechones de filamentos rígidos y muy ramificados a modo de escobillón. De una tonalidad marrón, crece hasta los 10-15 cm. Aparece sobre cantiles y grandes rocas, desde la superficie hasta los 15 m, y en gran abundancia.

Dentro de las Rhodophyta, *Aspargaropsis* sp., pertenece al Orden Bonnemaisoniales, Familia Bonnemaisoniaceae. El gametofito tiene un eje cilíndrico, ramificado y con forma piramidal a modo de espiga. Se encuentra desde la superficie hasta los 10-12 m de profundidad en zonas batidas por el oleaje, generalmente en grandes agrupaciones.

*Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba, representa un endemismo Canario del Orden Gelidiales, Familia Gelidiaceae, posee un talo fino pero con abundantes ramificaciones pinnadas, a veces irregular con terminaciones espatuladas. Con una estructura cartilaginosa, toma tonalidades rojo oscuro dando la impresión de ser incluso negra cuando se encuentra húmeda y agrupada. Esta tonalidad permite diferenciarla fácilmente de otra especie, muy

similar pero de color más claro, como es *G. arbuscula*. Alcanza un tamaño cercano a los 10 cm.

Los individuos de *G. canariensis* se dan en las zonas más batidas de la plataforma rocosa intermareal, siempre en la costa norte de las Islas.

*Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe, pertenece al Orden Halymeniales y Familia Halymeniaceae, y puede aparecer como plantas aisladas o formando matas de aproximadamente 4-5 cm de longitud, y en raras ocasiones llegando hasta los 8-10 cm. Presenta una coloración purpúreo-rojiza cuando está en zonas donde no incide directamente la luz solar, adquiriendo colores más claros (pardos) e incluso llegando a despigmentarse en sus extremos superiores cuando la intensidad luminosa es muy elevada. Las ramificaciones son de una dicotomía irregular, presentando un ancho de 5-20 mm. El ciclo de vida de *G. doryphora* es trifásico del tipo *Polysiphonia* que incluye tetraesporofitos, carposporofitos, y gametofitos. Las fases del gametofito y tetraesporofito son independientes y viven libres, mientras que el carposporofito está adosado al gametofito femenino. Los gametofitos haploides masculinos y femeninos son vegetativamente parecidos, con una morfología idéntica a la del tetraesporofito diploide isomórfico. *G. doryphora* se encuentra en zonas rocosas del intermareal medio-superior, a menudo en recovecos y charcos en zonas de penumbra de la costa NE de Gran Canaria.

*Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson es la única fanerógama marina estudiada, perteneciendo al Orden Potamogetonales y Familia Cymodoceaceae. Sus hojas tienen una longitud de entre 10 – 20 cm, y aproximadamente 4 mm de ancho. Posee un color verde, que toma tonalidades pardas en los extremos de las hojas. Éstas comparten una base común, envueltas por una vaina. El rizoma es fino y rastrero, y permanece unos centímetros enterrado en el sustrato, al que se adhiere con un gran número de raíces. Es una especie perenne que se reproduce

tanto vegetativamente como por medio de flores y semillas. Los frutos son discoidales y miden entorno a 1 cm de diámetro.

Se distribuye en fondos arenosos y someros hasta los 30 m, formando grandes praderas a modo de manchones.

## II. 2. PRODUCCIÓN DE CARPOESPORAS E INCUBACIONES

Los cultivos *in vitro* se realizaron exclusivamente con carpoesporas de *G. doryphora* obtenidas de forma axénica. Diversos experimentos preliminares de cultivos de carpoesporas indicaron que éstas debían ser asépticas, ya que el crecimiento de contaminantes (bacterias y hongos) impedía el de las carpoesporas. Para la obtención de carpoesporas asépticas no fue factible la esterilización directa de las mismas, por lo que se siguió la estrategia de esterilizar los explantos que contenían los cistocarpos.

La estrategia general fue la de utilizar varios agentes que fueran eliminando paulatinamente todos los organismos asociados al talo de las algas, y una vez liberadas las carpoesporas ya asépticas, se recultivaron según la tecnología *in vitro* desarrollada y establecida en nuestro laboratorio.

El procedimiento fue seleccionar los talos fértiles, los cuales se limpiaron con pincel eliminando los restos de sustratos y epífitos, y se sumergieron en agua destilada durante unos minutos para, mediante un shock osmótico, eliminar los microorganismos carentes de pared celular y pequeños invertebrados. Los epífitos bacterianos y algales se retiraron con limpieza manual y baño de ultrasonidos. A continuación, se cortaron fragmentos circulares (explantos) de 3 mm de diámetro conteniendo cistocarpos. Estos explantos fueron tratados con un baño de ultrasonidos y sumergidos en una solución de betadine al 7% con una gota de Tween 80, utilizado como tensoactivo, durante 7 minutos. La esterilización prosiguió con la incubación individual de cada explanto en una solución de antibióticos con distintos espectros de acción durante 6 días (Tabla 1).

Tabla 1. Solución de antibióticos por 100 ml de agua destilada y espectro de acción de cada uno de ellos utilizado en la desinfección de los explantos de *G. doryphora*.

Penicilina	Bactericida gram +	100 mg
Ampicilina	Bactericida +/-	25 mg
Nistatina	Fungicida	25 mg
GeO <sub>2</sub>	Antidiatomeas	10 mg

Los explantos fueron entonces cultivados en medio Provasoli (PES, Provasoli, 1968) agarizado (0.8% agar w:v) hasta que las carposporas se liberaron de forma espontánea y germinaron. Estas esporas fueron recultivadas a medio PES agarizado y se mantuvieron en una cámara de cultivo marca KOXKA, bajo un fotoperiodo 16:8, a  $19\pm 2^{\circ}\text{C}$  y a una irradiancia de  $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por tubos de luz blanca fluorescentes (*Sylvania Grolux*) medida al nivel de las placas de petri.

La composición del medio de cultivo PES y de las soluciones stock se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del medio PES.

Macronutrientes	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Micronutrientes	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	70	ZnCl	52.4
Na <sub>2</sub> -Glicerol-P	10	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	614.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	251.7	CoCl	5.15
Na <sub>2</sub> -EDTA·2 H <sub>2</sub> O	5x10 <sup>3</sup>	Ac. Bórico	57x10 <sup>2</sup>
		Tiamina-HCl	1x10 <sup>3</sup>
		Biotina	10
		Piridoxina	10
		B <sub>12</sub>	2

Todas las operaciones de incubación y cultivo se realizaron en una cámara de flujo laminar horizontal GLATT LABORTECNIC. El material de laboratorio usado en la incubación y siembra fue esterilizado con un paso por autoclave y flameado en alcohol en el interior de la cámara de flujo.

Dado que determinados análisis exigían de una cierta cantidad de biomasa, los diseños experimentales se establecieron con material limpio superficialmente, pero sin llegar a ser asépticos. Para ello, se cortaron las zonas de crecimiento de material vegetal y se realizó una limpieza como la descrita anteriormente, pero sustituyéndose la incubación en antibióticos por incubaciones en erlenmeyers conteniendo agua de mar. Este periodo de aclimatación duró 48 horas bajo luz continua a  $60 \mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $19 \pm 2$  °C de temperatura.

### **Incubaciones para el análisis del glicerol, floridósido y azúcares de bajo peso molecular**

Se analizaron los contenidos de glicerol, floridósido, y azúcares de bajo peso molecular (LMWS), en el momento de la recogida y tras 24 horas de incubación en 0.3M glicerol, en 7 especies algales correspondientes a la Chlorophyta *Caulerpa racemosa*, a las Rhodophyta *Asparopsis* sp., y *Grateloupia doryphora*, y las Phaeophyta *Cystoseira abies-marina*, *Padina pavonica*, *Stypocaulon scoparium*, y *Taonia* sp.

Para estudiar qué variables y en qué manera afectaban la acumulación del glicerol, del floridósido, y de los LMWS, los talos de *G. doryphora*, aclimatados durante 48 horas fueron recultivados en las condiciones experimentales correspondientes durante 24 horas más, lavando previamente el material con agua destilada para eliminar en lo posible los organismos que hubieran podido crecer en esas 48 horas. Los talos eran dispuestos en número de 2 a 3, con un

peso aproximado de 0.3 gramos peso seco, en los correspondientes medios esterilizados de cultivo. Una vez finalizado éste, se procedía a lavar cuidadosamente los talos bajo agua destilada y procurando eliminar los restos de glicerol que pudieran quedar impregnando la superficie del alga, pues en caso contrario se podían obtener medidas erróneas sobre la cantidad de glicerol presente en el interior celular.

En un primer ensayo se trataba de optimizar las condiciones de cultivo que, de acuerdo a la experiencia y bibliografía, pudieran favorecer la acumulación en *G. doryphora*. De esta forma se optó por las variables luz, concentración de glicerol, y concentración nutrientes (Tabla 3). En este último caso y dado que el medio de cultivo base era medio PES, y que el diseño experimental elegido exige el uso de variables concretas y continuas, se decidió representar la concentración de nutrientes como la concentración de nitratos, pues son éstos los más representativos del medio PES. Así, los tres niveles de nutrientes se corresponden con i) agua de mar sin nutrientes, ii) medio PES (70 mg NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>), y iii) medio PES doble (140 mg NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>).

Tabla 3. Niveles de las variables.

Niveles	-1	0	1
<b>Variabes</b>			
Intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	30	60	90
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0	70	140
Glicerol (M)	0.05	0.1	0.3

Para mantener la osmolalidad entorno a 1 Osmol kg<sup>-1</sup>, y debido a la presencia de concentraciones notables de glicerol en cultivo, el medio PES se diluía al 70%, 90%, y 95% con agua destilada, resultando en medios



PES70+0.3M glicerol, PES90+0.1M glicerol, y PES95+0.05M glicerol respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción de agua de mar (SW) y agua destilada (DW) mezcladas para satisfacer la condición de osmolalidad = 1 Osmol kg<sup>-1</sup>.

	PES70	PES90	PES95
Glicerol 0.3 M	7SW:3DW		
Glicerol 0.1 M		9:1	
Glicerol 0.05 M			9.5:0.5

Derivados de los resultados sobre las variables que afectaban a las concentraciones de floridósido y de glicerol interno, se diseñaron dos experimentos. En el primero, se estudió el efecto de la luz y de la salinidad a corto plazo (2 horas de incubación) sobre el comportamiento de los solutos compatibles (glicerol y floridósido). Se sabe que las algas que habitan en entornos intermareales (como es el caso de *G. doryphora*) responden de forma muy rápida a cambios de carácter salino en su entorno. Por esta razón estos experimentos se realizaron durante un corto periodo. Cada experimento consistió en dos series desarrolladas en paralelo; una serie tendría lugar en condiciones de iluminación ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), y la otra en oscuridad. Para cada serie, se establecieron 5 incubaciones cada una con una concentración de glicerol creciente (0, 0.125M, 0.25M, 0.375M, 0.5M) y, diluyendo de manera proporcional el contenido de agua de mar (100%, 87.5%, 75%, 62.5%, 50%), siempre para mantener una osmolalidad constante (aquella del agua marina, 1 Os kg<sup>-1</sup>). Por lo tanto, la concentración de cada uno de las especies químicas que componen la fracción salina del agua de mar, disminuía de forma proporcional (Tabla 5). El medio base estaba constituido por agua de mar diluida con agua destilada, sin ningún tipo de nutriente adicional.

Tabla 5. Características de los medios de cultivo. Las concentraciones de NaCl y de KCl fueron calculadas teóricamente.

%SW. porcentaje de agua de mar.

	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4	Cultivo 5
%SW	100	87.5	75	62.5	50
[NaCl] (mM)	427	374	320	267	214
[KCl] (mM)	9.4	8.2	7.05	5.88	4.7
Concentración de glicerol	0 M	0.125 M	0.25 M	0.375 M	0.5 M

A continuación se planteó un diseño que estudiaría el efecto del NaCl y del KCl (NaCl: 140 mM; KCl: 140 mM) sobre el comportamiento del floridósido y la entrada de glicerol al interior celular, bajo diferentes concentraciones de glicerol exógeno. En esta ocasión, el medio base estaba compuesto por agua destilada, equilibrando la presión osmótica hasta 1 Os kg<sup>-1</sup> por medio de manitol. Las condiciones de luz y temperatura fueron 90  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 19 $\pm$ 2 °C respectivamente.

### Incubaciones para el análisis de ácidos grasos

Se caracterizó el contenido en ácidos grasos de muestras de *G. doryphora* recogidas en la naturaleza y tras 48 horas de aclimatación.

Con la finalidad de observar de qué manera afectaban las concentraciones de nitratos y glicerol y, la intensidad de luz a la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos, se diseñaron dos experimentos. En el primero se determinó el tiempo óptimo (14 horas vs. 24 horas) de biosíntesis de los ácidos grasos en función de la concentración de nitratos y glicerol, a una intensidad de luz de 90

$\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se evaluó también el contenido total en ácidos grasos y el comportamiento de los tres ácidos grasos más significativos en *G. doryphora*: palmítico (16:0), araquidónico (AA, 20:4n6), y eicosapentanoico (EPA, 20:5n3). Esta elección se hizo considerando que la mayoría de los procesos biosintéticos de ácidos grasos en algas comienzan en el palmítico, y finalizan en los compuestos poliinsaturados de cadena larga (Gurr, 1971; Hardwood & Jones, 1989; Wolff *et al.*, 1999).

Se ensayaron dos concentraciones de nutrientes (PES, 70 mg nitrato  $\text{L}^{-1}$ ; PESx2, 140 mg nitrato  $\text{L}^{-1}$ ), junto con dos de glicerol (0.1 y 0.3M), en un ensayo factorial 2x2, con dos tiempos de incubación diferentes, es decir, 8 experimentos (Tabla 6).

Tabla 6. Diseño experimental factorial 2x2x2, aplicado a los primeros estudios sobre la acumulación de ácidos grasos.

Tiempo de incubación	0.1M Glicerol	0.3M Glicerol
Medio PES	14 horas	14 horas
	24 horas	24 horas
Medio (PESx2)	14 horas	14 horas
	24 horas	24 horas

En esta primera serie se trabajó con biomasa en forma de explantos, pues al mismo tiempo se observaría la idoneidad de este tipo de tejido para cuantificar los ácidos grasos.

Los explantos esterilizados y aclimatados durante 48 horas, según lo descrito, fueron analizados para establecer los controles pertinentes.

Se establecieron 16 incubaciones simultáneas, cada una con 40-50 explantos y un peso total de entre 20-50 mg, bajo condiciones homogéneas de agitación, luz ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y temperatura ( $19 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Del total, 8

estuvieron funcionando durante 24 horas, mientras que las otras 8 se detuvieron a las 14 horas.

Atendiendo a los resultados del primer experimento y según el diseño de Box-Behnken, se estudió el perfil de ácidos grasos de *G. doryphora* de acuerdo a tres variables de cultivo: intensidad de luz (30, 60, 90  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); concentración de nitrato (0, 70, 140 mg nitrato  $\text{L}^{-1}$ ) y concentración externa de glicerol (0.05, 0.1, 0.3M).

El efecto de la temperatura sobre la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos de cadena larga ha sido extensamente tratado en la bibliografía para microalgas (Holton *et al.*, 1964; Sato *et al.*, 1979; Ahern *et al.*, 1983; Teshima *et al.*, 1983; Seto *et al.*, 1984; Kayama *et al.*, 1985; Henderson & Mackinlay, 1989; Thompson *et al.*, 1992; García-Sánchez *et al.*, 1996), y en menor medida para macroalgas, fundamentalmente Phaeophyta (Pohl & Zurheide, 1979; Smith *et al.*, 1982; Pettit *et al.*, 1989; Al-Hasan *et al.*, 1991; Dawes *et al.*, 1993). Pero está ampliamente reconocida la relación negativa existente entre ambos factores al mismo tiempo que se relaciona con la fluidez de las membranas.

Por otro lado, el efecto de los nutrientes y fuentes de carbono orgánica sobre microalgas también ha sido extensamente tratado en la bibliografía, pero en mucha menor medida (Chen & Johns, 1991; Tan & Johns, 1991; Yongmanitchai & Ward, 1991; García Sánchez *et al.*, 1994; Vazhappilly & Chen, 1998; Wood *et al.*, 1999), y escasamente para macroalgas (Ivanova *et al.*, 1999).

Por este motivo y dadas las limitaciones propias de un diseño experimental para tres factores, se decidió considerar preferentemente el papel de la luz, los nutrientes y el glicerol; sobre los niveles de ácidos grasos en *G. doryphora*.

## Incubaciones y cultivos para el análisis de poliaminas

Se determinaron los niveles endógenos de poliaminas en las algas *Dictyota dichotoma*, *Gelidium canariensis*, y *Grateloupia doryphora*.

En *G. doryphora*, además de valorar estos niveles endógenos y, con el objetivo de determinar si la presencia de glicerol en el medio de cultivo provocaba una acumulación de poliaminas, las esporas axénicas fueron incubadas en placas de petri con medios líquidos PES90+0.1M glicerol durante 1 semana. Los medios control se establecieron en PES (ausencia de fuente de carbono). Las condiciones experimentales son las ya descritas.

Para el estudio de la relación entre glicerol y poliaminas, se realizaron también otras experiencias de cultivo *in vitro* con *G. doryphora* relacionadas con la asimilación de compuestos marcados radioactivamente, cuyas características se detallan en el apartado II. 6.

Previa a la comprobación de entrada de poliaminas exógenas en *C. nodosa*, se determinaron los niveles endógenos en esta fanerógama, considerando tres partes de la planta: rizoma, hojas, y raíz.

En el experimento de *dipping*, los fragmentos de *C. nodosa* se dispusieron durante 1 hora en medios PES líquido con concentraciones de putrescina, espermidina, y espermina de  $10^{-4}$ M. Éstas se añadieron individualmente a los medios esterilizados. Experimentos previos habían demostrado que esta concentración era óptima para el ensayo. Los controles se establecieron incubando durante el mismo periodo de tiempo en PES. Cada experimento se realizó por triplicado usando 2 explantos, es decir, usando 6 explantos por tratamiento. Al cabo de la hora, las muestras fueron congeladas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### II.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL, FLORIDÓSIDO Y DE AZÚCARES DE BAJO PESO MOLECULAR

Existe una gran homogeneidad en los protocolos usados para extraer los azúcares solubles del interior celular. Extracciones en agua, o bien en disoluciones acuosas de entre el 80%-20% de etanol, durante periodos de una a varias horas y a una temperatura de entre 70-80°C. Esta simplicidad instrumental (agua o etanol:agua a 70°C) se disipa enseguida pues, los autores no se ponen de acuerdo ni en los tiempos de extracción, ni en las proporciones a usar, ni en el número de extracciones sucesivas necesarias (Kirst, 1980a; Reed, 1985). Karsten y colaboradores (1991) trataron de hacer frente a esta heterogeneidad, y concluyeron que no había diferencias significativas entre los métodos anteriormente propuestos. En nuestro caso, y por su máxima simplicidad optamos por una extracción exclusivamente con agua.

En el caso de azúcares simples y heterósidos, solo cuando el análisis cuantitativo se realiza con cromatografía gaseosa o gas-líquido (ver más abajo) tiene sentido la reacción de derivatización. En nuestro caso éstas no fueron las técnicas analíticas elegidas, por lo que para estas sustancias no profundizaremos en este aspecto.

La metodologías analíticas para el glicerol y los azúcares de bajo peso molecular son bastante diversas, desde métodos enzimáticos hasta espectroscopía de resonancia magnética nuclear (solo análisis cualitativo), pasando por varios tipos de cromatografía (cromatografía en capa fina, gas-líquido, y cromatografía líquida de alto rendimiento) y métodos colorimétricos.

En los últimos años parece que los investigadores se han decantado por técnicas cromatográficas HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), quizás debido a la gran fiabilidad y elevada sensibilidad de esta tecnología. En particular, la cuantificación del glicerol, azúcares simples, y heterósidos

mediante HPLC en flujo isocrático tiene la ventaja de trabajar con el agua como única fase móvil y, además, el análisis directo de los extractos vegetales simplifica bastante el protocolo analítico de las muestras. El *software* proporcionado por la empresa VARIAN<sup>®</sup>, asociado al sistema de bombeo isocrático HPLC para LMWS, incluía una aplicación que cuantificaba cada sustancia detectada, a partir de su curva de calibrado previamente calculada e introducida en la memoria del programa.

El protocolo de extracción seguido en este trabajo es una modificación del descrito por Karsten y colaboradores (1991) para la fracción de azúcares de bajo peso molecular solubles en agua.

El material vegetal a analizar se secó en una estufa durante 24 horas a 90°C, y se obtuvo el peso seco de la muestra. En un mortero, se homogeneizó el material para permitir una mejor extracción de sus componentes solubles. Los azúcares fueron extraídos durante 4 horas a 80°C en tubos dispuestos sobre un calentador tipo *termoblock*. La característica especial de estos tubos consiste en su longitud y estrechez, que permiten un calentamiento del agua en su base, y la condensación del vapor resultante en la parte superior, manteniendo la cantidad de agua prácticamente constante e impidiendo que la extracción se detenga por falta de agua. Dado que la concentración de estas sustancias en las algas no es muy elevada, la extracción se hizo a una elevada concentración: 30 mg peso seco ml<sup>-1</sup> agua bidestilada. Varios experimentos preliminares permitieron llegar a esta proporción, la cual daba la resolución óptima de los azúcares en el cromatógrafo. Al final de la extracción se recoge 1 ml de la disolución, que contiene disueltos gran variedad de compuestos como pigmentos, polisacáridos, monosacáridos, heterósidos, etc, y se almacena a -20°C para evitar en lo posible la degradación por parte de bacterias y hongos.

Previo análisis de la muestra en HPLC se hizo necesaria la retirada de aquellas moléculas, presentes en la disolución, con carga opuesta a la de la resina de la columna del cromatógrafo que, pueden disminuir su efectividad.

En este sentido, se utilizó una resina tipo DOWEX-50W, la cual se configura en forma de malla capaz de retener a los aminoácidos e iones cargados positivamente. Esta resina se preparó en una proporción de 70 mg ml<sup>-1</sup>, y a continuación se puso en contacto con una fracción de la muestra en una proporción 5:1 v/v. Agitándose regularmente, se mantuvo en contacto durante 2 horas, tiempo suficiente para que los aminoácidos fueran retenidos por la malla.

Para evitar el paso de macropartículas derivadas de los tratamientos realizados, al interior de la columna, se separaron de la muestra los fragmentos vegetales procedentes de la extracción, restos orgánicos derivados de la hidrólisis ácida, o residuos de resina de intercambio. Así, 100 µl de muestra fueron centrifugados durante 10 minutos, a 15000 rpm; una vez finalizado este primer centrifugado, se tomó 90-95% de la muestra y, en un nuevo *ependorf*, se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. De este último extracto, con una microjeringa para HPLC (ILS microsyringe for HPLC; 50 µl squared end 0.028-inch OD (22 gauge) x 2 inch long needle) se tomaban cuidadosamente 50 µl para ser inyectados al cromatógrafo.

Las condiciones de trabajo se describen a continuación:

- Bomba HPLC isocrática: VARIAN 9002.
- Detector: Refractómetro diferencial WATERS 410.
- Columna: Shodex sugar ionpak KS-801.
- Válvula de inyección de muestra: Rheodyne<sup>®</sup> 20 µl loop 7725i Syringe Loading Sample Injector.
- Temperatura horno externo (columna): 60°C.
- Temperatura horno interno (detector): 45°C.



- Fase móvil: Agua bidestilada Millie-Q y desgasificada (las temperaturas de trabajo de la columna y del detector podía hacer aparecer microburbujas que interferirían con la señal detectada, haciéndola más imprecisa e ilegible).
- Flujo fase móvil: 1ml/min.
- Duración total del cromatograma: 20 min.
- Software informático: Start Chromatography Workstation v4.51.

La válvula de inyección *Rheodyne*<sup>®</sup> incorpora la muestra a la columna sin que el flujo de la fase móvil se vea interrumpido, es decir, sin que cambie la presión del sistema, aspecto fundamental en la cromatografía HPLC. Además posee un sistema que regula el volumen de muestra que se inyecta, de tal manera que, cargándose siempre un volumen algo superior a los 20  $\mu$ l, el exceso es eliminado por un sistema de bucles de reboso.

La identificación e integración de los picos se realizó usando el método del estándar externo, es decir, analizando por separado en el HPLC, cada uno de los compuestos a identificar y calculando su respectiva curva de calibrado a partir de disoluciones con diferente concentración. Inicialmente se prepararon disoluciones milimolares de glucosa, galactosa, manosa, fructosa, xilosa, y glicerol (Tabla 7), y mediante disoluciones sucesivas se obtuvieron los puntos necesarios para obtener las curvas de calibrado y los tiempos de retención asociados a cada compuesto (Figura 3, Tabla 8).

Debido a la gran cantidad de impurezas que presentaban la muestras, la resolución por separado de los picos de la galactosa, manosa, xilosa, y fructosa, no fue posible. Por lo tanto, no se pudo asegurar cuál de las sustancias estaba realmente siendo detectada, y en caso de haber más de una, en que proporción se encontraban. Así y a la vista de los datos de las rectas de calibrado (Figura 3), se decidió considerar una única recta que englobara a todas las hexosas, es decir, se cuantificó la mezcla de monosacáridos en unidades de uno de ellos. La recta

seleccionada fue la de la fructosa, por considerarse aproximada a una media. Por lo tanto, el método de cálculo usado en el estudio sobre la acumulación de azúcares de bajo peso molecular fue:

Compuesto	Tiempo de Retención	Rectas de calibrado	Concentración
LMWS	7' - 8'	$C_{LMWS} = 1.6 \times 10^{-4} \Sigma A_{LMWS}$	nmol / 20 $\mu$ l

Los compuestos usados en estos análisis fueron proporcionados por la casa *Sigma Chemical Co.*

Tabla 7. Concentraciones usadas (mM) en el cálculo de las curvas de calibrado.

	Concentración <sub>1</sub>	Concentración <sub>2</sub>	Concentración <sub>3</sub>
Glucosa	5.99	2.99	0.56
Galactosa	5.60	2.80	0.56
Manosa	5.72	2.86	0.57
Xilosa	6.66	3.33	0.67
Fructosa	5.88	2.94	0.59
Glicerol	110	11	1.1

Tabla 8. Tiempos de retención y rectas de calibrado para cada uno de los estándares usados.

[c], Concentración ( $\text{nmol } \mu\text{l}^{-1}$ ;  $\mu\text{mol } \mu\text{l}^{-1}$  para el glicerol) asociada al área de la señal cromatográfica; A, Área de la señal cromatográfica.

Estándar	Tiempo de retención (minutos y segundos)	Rectas de calibrado	Ajuste ( $r^2$ )
Glucosa	7'00''	$[c] = 0.3719 + 1.78 \times 10^{-4} A$	0.999
Galactosa	7'12''	$[c] = -1.78 + 1.2 \times 10^{-4} A$	0.998
Manosa	7'40''	$[c] = -0.5148 + 1.41 \times 10^{-4} A$	0.999
Xilosa	7'43''	$[c] = -2.03 + 1.34 \times 10^{-4} A$	0.999
Fructosa	7'48''	$[c] = -0.1523 + 1.61 \times 10^{-4} A$	0.999
Glicerol	8'30''	$[c] = -0.0219 + 3.56 \times 10^{-7} A$	0.997

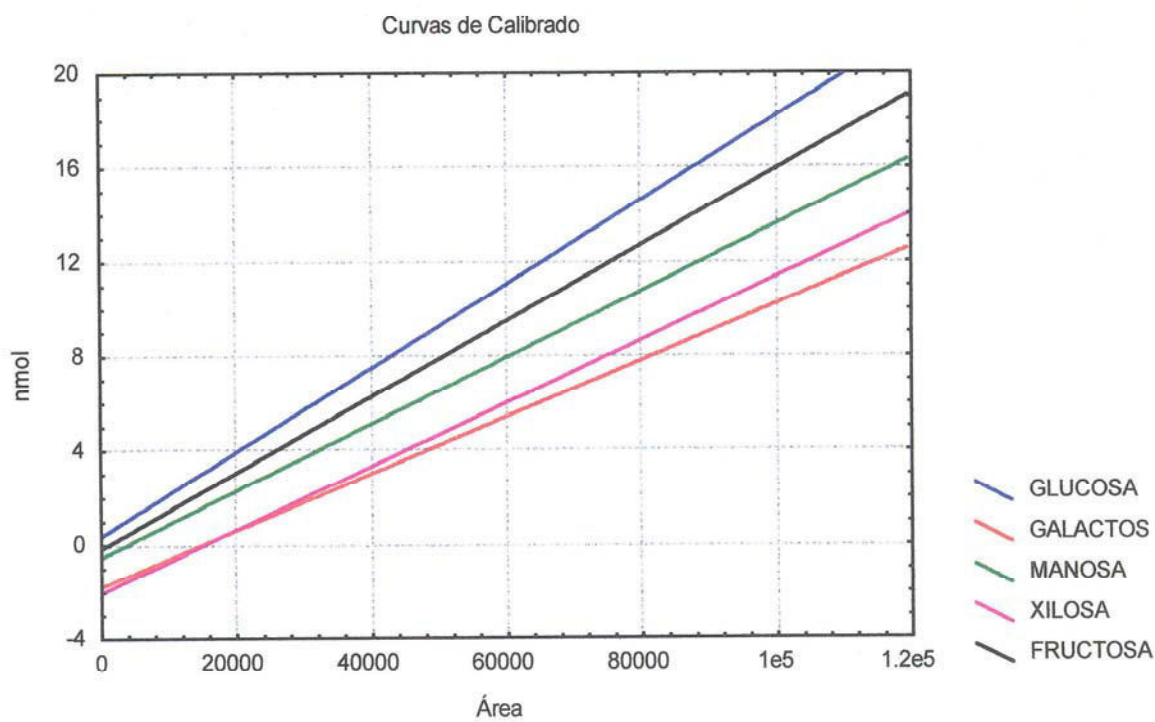


Figura 3. Curvas de calibrado de los distintos monosacáridos analizados.

La cuantificación del floridósido se determinó por un método indirecto, descrito por primera vez por Kirst (1980a). Considerando que no se pudo obtener un estándar comercial para el floridósido, se realizó una hidrólisis ácida para romper dicha molécula y liberar sus dos componentes: el glicerol y la galactosa (Figura 4). Previamente, se había cuantificado el contenido del glicerol.

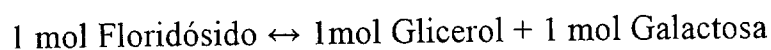


Figura 4. Relación química entre el floridósido y sus componentes moleculares

La hidrólisis consistió en mezclar 200  $\mu$ l de muestra junto con 200  $\mu$ l de HCl 12M en ampollas de vidrio (Ampuly OPC 325 kusov, DIN 58377 B 1-br STONKA 5.5-6.0 09/96 Medical-glass, Bratislava, Eslovaquia). Las ampollas se sellaron con un soldador de propano-butano/oxígeno (Rothenberger, ROXY-KIT 120L 3100°C, Alemania), y se incubaron a 100°C durante 20 horas. Tras este periodo, las muestras ya hidrolizadas, fueron extraídas y tratadas para su análisis en HPLC.

En este primer análisis, se observa que el pico correspondiente al floridósido aparece a los 6.5 minutos (Figura 5). La muestra hidrolizada, presenta los picos de la galactosa y el glicerol, desapareciendo el floridósido. Este procedimiento permite obtener la concentración de floridósido a partir del área correspondiente al glicerol en el cromatograma de hidrólisis (Tabla 9, Figura 5).

Tabla 9. Tiempos de retención, y rectas de calibrado para cada uno de los carbohidratos estudiados.

A = área de la señal; C = concentración.

Compuesto	Tiempo de Retención	Rectas de calibrado	Concentración
Floridósido	6'30''	$A_{\text{Gly}} = 0.0831 A_{\text{F}} + 52531$	---
Glicerol	8'30''	$C = -0.0219 + 3.56 \times 10^{-7} A$	$\mu\text{mol} / 20 \mu\text{l}$

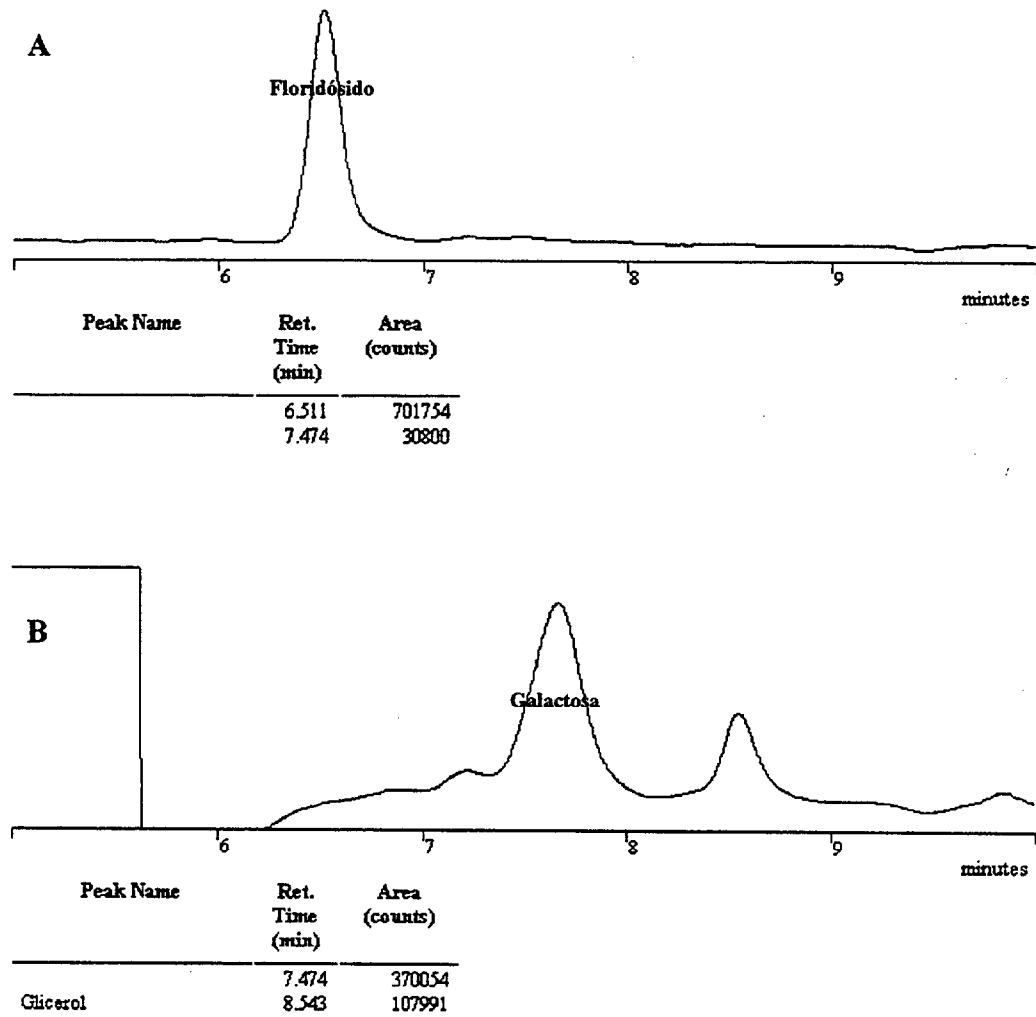


Figura 5. Cromatogramas HPLC correspondientes al análisis de floridósido, glicerol, y azúcares de bajo peso molecular en una muestra control de *Grateloupia doryphora*. En la gráfica superior (A) aparece el contenido intracelular antes de la hidrólisis ácida, y (B) después de la hidrólisis. Las gráficas no están a la misma escala vertical.

## II. 4. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Las metodologías más ampliamente descritas en la bibliografía actual son de Blight & Dyer (1959), y Folch y colaboradores (1959), pero en numerosas ocasiones son modificadas para adaptarlas a las particularidades de las muestras y del material disponible en los laboratorios, tal y como ocurre en nuestro caso y en muchos otros (Khotimchenko & Vaskovsky, 1990; Yongmanitchai & Ward, 1991; Dawes *et al.*, 1993; Stefanov *et al.*, 1994; Vazapilly & Chen, 1998; Xu *et al.*, 1998).

En general, la extracción de las fases lipídicas comprende una primera etapa donde se combina la muestra vegetal con una mezcla azeotrópica de dos solventes polares (metanol-cloroformo, metanol-benceno, hexano-isopropanol, etc.), seguida de una purificación del extracto con la finalidad de retirar compuestos no deseados y restos de estructuras celulares. A partir de aquí los protocolos descritos varían bastante, encontrándose pequeñas modificaciones entre los diferentes autores. Las reacciones de saponificación, la separación de los compuestos no saponificables, y los procesos de purificación y reconcentración de los lípidos totales, son técnicas que puede complicarse mucho, tanto por la variedad de reactivos usados, así como, por las diferentes proporciones usadas entre ellos.

La mezcla metilante, responsable de la reacción de transesterificación de los ácidos grasos previa al análisis lipídico, consiste en una disolución de un ácido fuerte en metanol. Las más comúnmente descritas en la bibliografía pueden contener ácido sulfúrico, clorhídrico, cloruro de acetilo, o fluoruro de boro (Seto *et al.*, 1984; Sukenik *et al.*, 1989; Dembitsky *et al.*, 1990; Ivanova *et al.*, 1999). Esta reacción, altamente exotérmica, se realiza a temperaturas cercanas a los 100°C, y con tiempos de reacción que van desde los 10 minutos a



cerca de la hora. El tipo de muestra, así como su entorno fisicoquímico, son factores fundamentales para determinar el rendimiento de la reacción.

La cromatografía gaseosa (GC, del inglés *Gas Chromatography*) con detector tipo FID (*Flame Ionization Detector*) es la más aceptada de las técnicas usadas para detectar y cuantificar los ácidos grasos siempre como ésteres metílicos. Sólo Ramavat y colaboradores (1997) se decidieron por la cromatografía HPLC.

La adición de un estándar interno (EI) a la muestra, previa metilación de los ácidos grasos, es uno de los métodos más usados para la posterior cuantificación de los picos correspondientes a cada ácido graso, y aunque algunos autores se deciden por la cuantificación a partir de comparación con estándares puros, tal y como se ha descrito anteriormente para LMWS, no es lo más común. La cuantificación con EI consiste en añadir, una concentración determinada de un ácido graso conocido pero inexistente de manera natural en la muestra problema. De esta manera, se asocia el área de este pico de referencia a una concentración establecida por el usuario, calculando a partir de estos dos datos la concentración de cada uno de los picos detectados. La elección de un EI adecuado depende del perfil lipídico de la muestra, pues será necesario que el tiempo de retención del EI no coincida con ninguno de los ácidos grasos que estén siendo analizados, es decir, debe aparecer en una ventana libre de ácidos grasos.

Se asumió que el factor de respuesta para todos los ésteres metílicos era el mismo independientemente del número de carbonos del ácido graso.

El método de extracción, a continuación descrito, es una modificación del propuesto por Blight & Dyer (1959), pero adaptado para vegetales marinos.

Las muestras vegetales fueron previamente lavadas en corriente de agua dulce para retirar la mayor cantidad posible de sal, que resulta una dificultad añadida al proceso de deshidratación posterior. A continuación, se cortó el talo en fragmentos pequeños con ayuda de unas tijeras para una mayor homogeneidad del material vegetal. Con el objetivo de retirar la mayor cantidad de agua del tejido vegetal, la muestra se dispuso en un matraz erlenmeyer con 200 ml de metanol durante 1 hora y agitación periódica, para más tarde, desactivar la principal enzima oxidativa de los ácidos grasos (fosfolipasa) en un rotaevaporador a 60-65°C. La resultante mezcla azeotrópica agua-metanol se evaporó en gran medida, y tras el filtrado de la muestra, se realizó la extracción de los lípidos en una disolución cloroformo-metanol 1:1.

Esta disolución se deja actuar durante 20 horas en un matraz erlenmeyer tapado con papel de aluminio. Tras este periodo, el material vegetal se separa por filtración de la disolución extrayente, con ayuda de un embudo cubierto con papel de filtro, la cual es guardada. A continuación y sobre el mismo sistema de filtro, se añaden 100 ml de cloroformo (2 veces, 100x2). Ambas disoluciones se unen en un mismo matraz redondo y, nuevamente en el rotaevaporador se destila, eliminando la mayor cantidad de la mezcla metanol-agua. Tras la destilación y en un embudo de decantación, se añadió a la disolución de cloroformo resultante la misma cantidad de agua destilada. De esta manera se retiran otros componentes celulares que tienen una mayor afinidad por las disoluciones polares que apolares y, que han llegado hasta esta etapa, como es el caso de azúcares, aminoácidos y sales. Esta fase puede optimizarse en el caso de material vegetal de procedencia no marina, añadiendo 0.9% (w/v) de KCl (Christie, 1973).

Tras agitar vigorosamente se observaron tres capas, una acuosa y polar (superior), una orgánica apolar (inferior), y una intermedia más estrecha y turbia

que contiene restos celulares. Se recupera la disolución inferior y se evapora en el rotaevaporador para finalmente añadir otros 2 ml de cloroformo. Este extracto lipídico se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un tubo con rosca de teflón hasta su posterior metilación. Esta muestra además contiene gran cantidad de pigmentos, así como esteroides, y glucósidos. Los restos vegetales totalmente deshidratados fueron puestos en corriente de aire unos minutos, para eliminar el cloroformo restante y a continuación ser pesados (peso seco).

En general, este procedimiento no difiere mucho del propuesto por Christie (1973). La disolución extractiva cloroformo:metanol (1:1 v/v) fue la misma, y el sistema faseado contenía sales. La agitación y posterior decantación de las muestras optimizó el proceso de separación de las diferentes fases frente a la filtración. Por lo tanto, este método extrae un porcentaje de lípidos similar al propuesto originalmente.

La transesterificación de los ácidos grasos se llevó a cabo con la reacción de metilación. La disolución metilante consistió en cloruro de acetilo al 5% (v/v) en metanol (Lepage & Roy, 1984).

La disolución, propuesta por Blight & Dyer (1959), compuesta de ácido sulfúrico al 4% (v/v) en metanol, dio peores rendimientos en la transesterificación de los ácidos grasos.

Tras secar el extracto lipídico en corriente de nitrógeno para evitar la oxidación de los ácidos grasos, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de disolución de estándar interno (EI), 2 ml de disolución metilante y 1 ml de hexano. Como EI se usó el ácido nonadecanoico 19:0,  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$  (*Sigma Chemical Co.*), preparado en una disolución de 25 mg/ml metanol-benceno 3:2 v/v.

La reacción de metilación es muy exotérmica y lenta, catalizándose entre  $90-95^{\circ}\text{C}$ , en un *termoblock*, a durante 2 horas. Las características de la reacción (presiones muy elevadas y atmósfera muy corrosiva) hacen que los tubos deban ser de cristal PYREX<sup>®</sup>, más resistentes, y terminados en rosca para ser cerrados

con tapones que contengan topos de teflón. Una vez pasado el tiempo de reacción, esta se detuvo enfriando los tubos con agua corriente. Seguidamente se añadieron 3 ml de agua destilada y 2 ml de hexano, y se agitó vigorosamente. Transcurridos unos segundos la disolución se faseó, recogándose la capa inferior que contiene los ácidos grasos, ya como ésteres metílicos (FAMEs, de la literatura inglesa *Fatty acid methyl esthers*). La operación con el hexano se repitió al menos 2 veces más para optimizar la recogida de los FAMEs.

El extracto lipídico contiene entorno a un 60% de impurezas (compuestos de naturaleza lipídica pero no saponificables como pigmentos y esteroides), por lo que previo análisis de la muestra en el cromatógrafo de gases se procedió a purificar el extracto mediante una cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*). Se usaron placas de vidrio de 20 x 20 cm (*20x20 cm Pre-Coated TLC plates SIL G-25 UV<sub>254</sub> 0.25 mm silica layer, MACHEREY-NAGEL, Germany*) previamente activadas en una estufa a 80°C. La fase móvil consistía en hexano-acetona 97:3, y junto a la muestra se disponía una pequeña cantidad de una mezcla de ácidos grasos conocida (aceite de hígado de bacalao comercial) y metilados previamente. La cromatografía se desarrolló durante 1 hora aproximadamente, tiempo suficiente para que el frente se sitúe a unos 2 cm del límite superior de la placa.

Para el revelado de las placas se usó vapor de yodo resublimado de la siguiente manera: en una pipeta pasteur con lana de vidrio en la punta se disponen unas bolitas de yodo resublimado. Con corriente de nitrógeno a través de la pipeta, esta se aplicó sobre la placa, apareciendo en breve las bandas de los lípidos metilados en un color amarillo pálido. Al estar el aceite de hígado de bacalao muy concentrado en ácidos grasos, su mancha aparece en una tonalidad más oscura, y tomando su R<sub>f</sub> se identifica la banda correspondiente a los FAMEs de la muestra algal. Esta banda se raspa de la placa y se dispone en

el interior de una columna de plástico adaptada para liberar los metil ésteres del gel de sílice.

En la columna de unos 15-20 cm de largo se disponen por este orden: un poco de algodón (sin excesiva presión), una cierta cantidad de cloruro cálcico-anhidro, y por último la banda raspada de la placa. A continuación se añade dietiléter que extraerá los FAMES del gel de sílice. Una vez finalizado este proceso, se evaporó la mayoría del dietiléter en corriente de nitrógeno hasta quedar unos 300-500  $\mu\text{l}$ , que se traspasan con una pipeta pasteur a un vial tipo *eppendorf* previamente pesado. El resto de disolvente se termina de secar en un liofilizador con trampa para orgánico, pesándose posteriormente el vial ya solo con el residuo seco correspondiente con los FAMES purificados, y calculando así su peso por gravimetría. Por último, redisolvemos los FAMES en cloroformo a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se almacenan en un arcón a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La separación de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases modelo VARIAN STAR 3600, equipado con un detector de ionización de llama tipo FID, y una columna capilar *Chrompack CP WAX 52CB 30M X0.25 DF=0.25 GC 2175*. El sistema de inyección era en columna y manual con una microjeringa de 10  $\mu\text{l}$  con punta biselada. El control del aparato y la integración de los cromatogramas se realizó con el software *STAR Chromatography Workstation v. 4.51* de VARIAN.

Las condiciones de trabajo se detallan a continuación:

Volumen de Muestra: 0.5  $\mu$ l  
Gas Portador (flujo): Nitrógeno (1cm<sup>3</sup>/min)

Programa de temperatura del horno

Temperatura inicial (tiempo): 200°C  
Tiempo inicial: 9 min  
Rampa de Temperatura: 4°C/min  
Temperatura final (tiempo): 240°C  
Temperatura del Inyector: 240°C  
Temperatura del Detector: 260°C  
Duración Total del Análisis: 34 min

Para identificar los ácidos grasos se usaron una serie de mezclas de ácidos grasos estandarizadas perfectamente identificadas. Se trabajó con 2 patrones naturales y uno artificial. Los perfiles lipídicos del aceite de hígado de bacalao y del aceite de girasol comercial son muy conocidos y su composición es muy homogénea. Por otro, lado la empresa *Sigma Chemical Co.*, proporcionó una mezcla de composición conocida. Estos tres patrones fueron analizados en el cromatógrafo (las dos mezclas naturales fueron previamente metiladas tal y como se ha descrito anteriormente) en las mismas condiciones que las muestras experimentales, proporcionando de esta manera la información mostrada en la Tabla 10. A partir de aquí se identificaron los ácidos grasos existentes en las muestras de *G. doryphora* por comparación de perfiles teniendo en cuenta que los tiempos de retención para cada ácido graso eran prácticamente iguales en cada una de las muestras, tanto reales como estándares.

Tabla 10. Ácidos grasos presentes en las mezclas usadas como referencias cualitativas.

Ácido Graso	Aceite de girasol	Aceite de hígado de bacalao	Mezcla <i>Sigma Chemical Co.</i>
A. Mirístico 14:0		X	
15:0		X	
A. Palmítico 16:0	X	X	X
16:1n7		X	
16:3n4		X	
16:4n3		X	
A. Estearico 18:0	X	X	X
A. Oleico 18:1n9	X	X	
18:1n7		X	
A. Linoleico 18:2n6	X	X	X
A. $\gamma$ -Linolénico 18:3n6		X	X
A. $\alpha$ -Linolénico 18:3n3		X	
A. Estearidónico 18:4n3		X	
20:1n9		X	
A. Araquidónico 20:4n6		X	X
A. Eicosapentanoico 20:5n3	X	X*	X
22:1n9		X	
22:4n6		X	
22:5n3		X	
A. Docosahecanoico 22:6n3		X	X

El procedimiento usado para realizar el análisis cuantitativo por el *software* informático de VARIAN, se basa en comparación de áreas teniendo en cuenta la de referencia del EI. Por lo tanto, los cálculos necesarios para la

cuantificación de cada ácido graso se corresponden con las siguientes ecuaciones:

Porcentaje del ácido graso<sub>x</sub> respecto del perfil lipídico:

$$\% \text{AG}_x = 100 \times A_x / (A - A_{EI})$$

Contenido total en ácidos grasos:

$$\mu\text{g AG mg}^{-1} \text{ peso seco biomasa algal} = (125 \times A) / (\text{peso seco biomasa} \times A_{EI})$$

Donde,

Área del pico de referencia =  $A_{EI}$

Área del pico correspondiente al ácido graso<sub>x</sub> =  $A_x$

área total perfil lipídico =  $A$

La constante 125 se corresponde con la cantidad de EI (en  $\mu\text{g}$ ) que se añade a la muestra previa metilación.



## II. 5. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIAMINAS

La metodología más usada para extraer las poliaminas endógenas en vegetales es muy similar entre los diferentes autores. La extracción se realiza en frío (siempre con el objetivo de minimizar la actividad de las enzimas digestivas) y en medio ácido diluido, generalmente ácido perclórico o tricloroacético. Como resultado se obtiene un sobrenadante con las poliaminas solubles (fracciones libres y solubles-conjugadas), y un residuo con las insolubles en ácido (insolubles-conjugadas).

La derivatización de las poliaminas, previa a su separación cromatográfica, consiste en combinarlas con una sustancia que sea capaz de emitir o absorber luz a una longitud de onda determinada, para poder ser cuantificadas. El cloruro de dancilo, o su equivalente de bencilo, son los compuestos más comúnmente usados en la derivatización de las poliaminas. La utilización del primero exige una cuantificación fluorimétrica, mientras que, la segunda debe realizarse mediante absorbancia en el UV. La reacción de derivatización transcurre lentamente a temperatura ambiente, pero se cataliza fácilmente a temperaturas entorno a los 100°C. Previamente, las poliaminas conjugadas, tanto solubles como insolubles, deben ser tratadas con una hidrólisis ácida, que romperá los enlaces covalentes que las mantienen unidas a diversos tipos de moléculas, principalmente enzimas y complejos de carácter proteico (Slocum *et al.*, 1984; Evans & Malmberg, 1989; Gallardo *et al.*, 1994).

Debido a su naturaleza polar (presentan múltiples grupos amino,  $-NH_2$ , a lo largo de sus cadena carbonada de longitud y número variables), las poliaminas siempre han presentado un buen rendimiento analítico con técnicas de TLC con fase móvil polar, y aunque ya Flores & Galston (1982) presentaron un método analítico basado en la cromatografía HPLC, aún hoy las técnicas de TLC parecen

mantener una serie de ventajas frente a la HPLC, como es su bajo coste y alta fiabilidad.

La cuantificación de las poliaminas danciladas se realizó una vez finalizada la separación cromatográfica y usando un espectrofluorímetro. Previamente y trabajando con muestras puras de putrescina, espermidina, y espermina, se estableció la correlación entre la concentración y la fluorescencia relativa a partir de una disolución madre, siguiendo la metodología de las diluciones sucesivas. El rango de concentraciones empleado (hasta 40  $\mu\text{M}$ ) comprendía aquellas citadas para muestras vegetales (Gallardo *et al.*, 1994; Rey *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1994; Pedroso *et al.*, 1997; Lee, 1998; Faivre-Rampant *et al.*, 2000; Scoccianti *et al.*, 2000; Tassoni *et al.*, 2000).

El método a continuación descrito fue desarrollado por Biondi y colaboradores (1993), y Gallardo y colaboradores (1994), pero ha sido modificado y adaptado, en nuestro laboratorio, para vegetales marinos.

La determinación de los niveles control de poliaminas se realizó con *sporelings* procedentes del cultivo *in vitro* de 1 semana de edad. Estos *sporelings* tenían aproximadamente entre 1-4 yemas y un peso de 2-10 mg. Dado que el peso era insuficiente para cuantificar los diferentes tipos de poliaminas y sus fracciones, se optó por analizar las poliaminas totales, y comparar estos resultados con los correspondientes a los niveles endógenos procedentes de muestras de la naturaleza.

Las masas celulares procedentes del cultivo de esporas en medio líquido PES90+0.1M de glicerol (Robaina *et al.*, 1990b), alcanzaron un peso de entre 40-60 mg, biomasa suficiente para hacer un estudio de la composición de las diferentes poliaminas en sus fracciones libre y conjugada.

El contenido endógeno de poliaminas en *C. nodosa* se cuantificó usando ejes plagiotrópicos de  $3 \pm 0.1$  cm longitud. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron limpiadas y separadas para ser analizadas según sus diferentes tejidos: rizomas, raíces, hojas, y sección apical de crecimiento. El material seleccionado para el experimento de poliaminas exógenas consistía en los rizomas plagiotrópicos entre los ejes de hojas.

En un mortero refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$  se tritura el tejido vegetal con nitrógeno líquido. A continuación, se añade ácido tricloroacético (TCA) al 5% en disolución acuosa y frío en una proporción de 10 ml de TCA por cada gramo (peso fresco) de muestra vegetal. La mezcla se macera durante 10 minutos y el extracto resultante se recoge y centrifuga a 195000 rpm durante 15 minutos en viales de plástico. De esta manera obtenemos un sobrenadante con las poliaminas libres, y un sedimento con las insolubles-conjugadas.

Las fracciones insoluble-conjugada (sedimento) y soluble-conjugadas necesitan un tratamiento de hidrólisis ácida para liberar las poliaminas, y poder ser así analizadas de la misma manera que la fracción libre. Ambas se procesan de igual forma, tomando una fracción del sedimento o 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante respectivamente, para a continuación ser hidrolizados con 300  $\mu\text{l}$  de HCl 12 M en un vial de vidrio. El vial se sella con llama (oxígeno y propano) y se incuba a  $100^{\circ}\text{C}$  en una estufa durante 20 horas. Las mezclas resultantes se filtran y se secan. El material seco se redisuelve en 300  $\mu\text{l}$  de TCA al 5% y se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior dancilación.

El proceso de derivatización se realiza por igual para cada una de las 3 fracciones obtenidas anteriormente. Se prepara una disolución que contenga 5 mg de cloruro de dancilo por ml de acetona, y en un vial tipo *ependorf*, se mezclan 400  $\mu\text{l}$  de esta disolución, 200  $\mu\text{l}$  de extracto poliamínico en TCA y 200  $\mu\text{l}$  de solución acuosa saturada en carbonato sódico. La muestra se incuba durante 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ , al final de los cuales se añaden 100  $\mu\text{l}$  de disolución acuosa de prolina, preparada con 100 mg de prolina/ml de disolución, para

reaccionar con el exceso de cloruro de dancilo. La reacción se deja transcurrir durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. En caso de disponer de poco volumen de muestra, se pueden variar los volúmenes de reacción pero guardando siempre la proporción entre los reactivos.

Las poliaminas ya danciladas se extraen con 500  $\mu\text{l}$  de tolueno, agitándose la muestra vigorosamente durante 30 segundos. A continuación se pipetea 400  $\mu\text{l}$  de la fase orgánica y en una trampa de orgánico (*heated speed-vacuum HETOVAC*) se lleva a residuo seco tras 20 minutos a 45°C. El residuo sólido, en forma de cristales blanco-amarillentos, se redissuelve en 600  $\mu\text{l}$  de acetona para dejar la muestra preparada para la cromatografía en capa fina.

La separación de las poliaminas se realizó en placas cromatográficas (Schleicher&Schuell, F1500/LS, 254) de 7.5x2.5 cm, en las cuales se disponían 45  $\mu\text{l}$  de extracto derivatizado sobre un punto situado a 1 cm de la base de la placa. La cromatografía en capa fina se resuelve durante 10 minutos en cubetas cromatográficas usando como fase móvil una disolución de cloroformo/trietilamina 5:1 (v/v). Se revelan las manchas de cada poliamina a la luz UV (254 nm) y se marcan a lápiz.

La identificación de cada poliamina se realiza comparando las placas con las correspondientes a los patrones puros. La mancha, ya identificada, se raspa, redisolviéndose este polvo en 800  $\mu\text{l}$  de acetona. Se agita vigorosamente unos segundos para separar el compuesto dancilado de la malla de sílice y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga. Con cuidado de no agitar la muestra, se pipetea 500  $\mu\text{l}$ , disponiéndose en una cubeta de cuarzo para su cuantificación en el fluorímetro (*High Resolution Espectrofluorimeter SFM 25, Kontron Instruments*). Las poliaminas se analizaron a una longitud de onda de excitación y de emisión de 365 nm y 510 nm respectivamente.

Previo al análisis de las muestras vegetales, se obtuvieron las curvas patrones correspondientes a cada poliamina a partir de los estándares puros de

cada uno de ellas (*Sigma Chemical Co.*). Estos estándares fueron procesados de igual manera que las muestras experimentales para que el error del método fuera igual en ambos casos. La fiabilidad de las curvas de calibrado se consideró dentro del rango de concentraciones usadas en su obtención, considerando medidas de fluorescencia relativa (respecto la fluorescencia del blanco usado: acetona calidad *HPLC Gradient*) fuera de este intervalo nulas. En esos casos, antes de introducir la cubeta en el espectrofluorímetro se procedía a diluir la muestra con una cantidad de acetona conocida y suficiente para que la medida entrara en el intervalo. Los datos relativos a estas curvas se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Rangos de fiabilidad (en unidades de fluorescencia relativa, Fr) y su equivalencia en microgramos y nanomoles de poliamina considerados en las curvas de calibrado.

	Número de datos	Ajuste lineal	$r^2$	Rango de fiabilidad	Microgramos de poliamina	Nanomoles de poliamina
Putrescina	9	$y = -37.15 + 5.24 \text{ Fr}$	0.994	0 - 45	$0 - 2 \times 10^{-2}$	0 - 0.23
Espermidina	8	$y = 0.12 + 0.22 \text{ Fr}$	0.995	0 - 35	$0 - 8 \times 10^{-4}$	$0 - 5.5 \times 10^{-3}$
Espermina	8	$y = -0.26 + 0.22 \text{ Fr}$	0.994	0 - 180	$0 - 4 \times 10^{-3}$	$0 - 2 \times 10^{-2}$

Para comparar diferencias en las medias obtenidas en los diferentes tratamientos se utilizó el test no paramétrico de suma de rangos de Mann-Whitney, también conocido por test de Wilcoxon para muestras de variables cualesquiera e independientes, proporcionado por el *software* SPSS 5.1 (SPSS, Inc. Chicago, IL, EEUU).

## II. 6. TRAZADORES RADIOACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN METABÓLICA ENTRE EL GLICEROL Y LAS POLIAMINAS

Las técnicas de marcaje radioactivo son muy útiles cuando se persigue conocer si existe alguna conexión metabólica entre una determinada sustancia que se dispone exógena al sistema y que es absorbida por las células, y un producto o metabolito intermedio, derivado de un proceso bioquímico. Una de las grandes ventajas de esta técnica es su extremada sensibilidad, lo que permite trabajar a muy bajas concentraciones, disminuyendo así el riesgo derivado de trabajar con fuentes radioactivas.

Experiencias preliminares habían mostrado una relación entre los efectos morfogénicos del glicerol y la presencia de poliaminas en cultivos *in vitro* de *G. doryphora* (García-Jiménez *et al.*, 1998), por lo que parecía interesante estudiar si era posible encontrar trazas radioactivas en la fracción de poliaminas cuando se cultivaba con  $^{14}\text{C}$ -glicerol. Por este motivo, se cultivaron esporas de *G. doryphora* en medios sólidos PES90+0.1M glicerol (control) y conteniendo 0.01 mM y 1 mM de DFMO respectivamente. Tras 7 días en cada uno de estos medios, las esporas resultantes se recultivaron a medios líquidos PES con 70 kBq [U- $^{14}\text{C}$ ] glicerol (NEN, Reino Unido), que representaban 0.75 mM de glicerol en cultivo, y con las mismas concentraciones de DFMO que en los cultivos precedentes (0, 0.01, y 1 mM). Tras 20 horas de incubación, el material vegetal fue lavado con agua de mar estéril y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el posterior análisis de poliaminas.

El análisis de poliaminas fue el mismo que se ha descrito anteriormente con la salvedad de que en la placa de TLC se dispuso todo el volumen de muestra (600  $\mu\text{l}$ ) y, no solo 45  $\mu\text{l}$ , para así captar toda la radioactividad posible,

ya que, se esperaba que el porcentaje en cultivo *in vitro* de radiactividad acumulado en la fracción de poliaminas fuera muy bajo.

Las diferentes poliaminas ya separadas y redisueeltas en 800  $\mu$ l de acetona, se combinaron con 4 ml de líquido de centelleo Formula-989 (NEN, UK) para ser cuantificadas en un contador de centelleo *Pharmacia Wallace 1410 Liquid Scintillator Counter*.

## II.7. DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN: UN MÉTODO FACTORIAL DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A CULTIVOS

El rendimiento fisiológico del alga está perfectamente adaptado a las condiciones ambientales que la rodean. La acumulación de ciertas sustancias, ya sea derivadas del metabolismo principal o secundario, va a estar directamente afectada por toda una serie de variables físico-químicas, de tal manera que, la biosíntesis y/o acumulación de estas sustancias va a estar optimizada para un intervalo determinado.

La posibilidad de desarrollar de modo competitivo la tecnología de cultivo de un alga, en particular para la producción de sustancias de interés, requiere establecer las condiciones óptimas de cultivo (García Sánchez *et al.*, 1996). La composición química del medio de cultivo, así como, la magnitud de ciertas variables ambientales como la intensidad de luz, temperatura, etc., son los factores más comúnmente utilizados en estos experimentos. Una metodología adecuada para acercarse a estas condiciones óptimas consiste en diseñar un experimento donde, fijándose una serie de variables, se combinen según varían (niveles) una o varias en particular (factores). No obstante, cuando el número de factores, y sus niveles, sean muy elevados resultaría en series experimentales larguísimas, muy difíciles de realizar. En estos casos se pueden aplicar diseños estadísticos factoriales incompletos, que reducen sensiblemente el coste de experimentación (tanto temporal como económico) sin afectar a la validez del resultado. El diseño factorial incompleto de Box-Behnken (Box & Behnken, 1969) permite el estudio rápido y eficaz del comportamiento de sistemas biológicos con relación a una serie de factores considerados en el mismo.

En el estudio de sistemas biológicos complejos, tales como cultivos intensivos de organismos, los experimentos que han empleado diseños factoriales simples han resultado adecuados para establecer las condiciones óptimas de trabajo. Por el contrario, la metodología de superficie de respuesta ha



resultado ser más eficiente en la búsqueda de óptimos que los diseños unidimensionales (Montgomery, 1991), especialmente cuando el número de variables es elevado. Más allá, los diseños factoriales completos (*full factorial*) recogen más información del sistema (interacciones entre variables) para un número determinado de experimentos, una vez se han acotado los márgenes óptimos de trabajo, de tal manera que la localización del punto de máximo rendimiento es más sencilla.

El método de la superficie de respuesta, como análisis estadístico asociado a diseños experimentales factoriales, resulta una de las herramientas más potentes a la hora de calcular las tendencias de los modelos biológicos que se ven afectados por varios factores al mismo tiempo (García Sánchez, *et al.*, 1994; Gong & Chen, 1998), es decir, representa una manera simple de calcular el rendimiento de un sistema cuando está sometido a la interacción de muchos y diferentes factores. La aplicación de esta metodología consta de cuatro etapas básicas: i) plantear el diseño experimental, ii) estimar los coeficientes del modelo matemático, iii) predecir la respuesta de aproximación al óptimo mediante la línea de máxima pendiente, y iv) plantear un nuevo diseño a partir de los nuevos niveles predichos.

En nuestro caso, el diseño aplicado en las series experimentales definidas anteriormente resulta ser un Box-Behnken para tres factores con tres puntos centrales (Tabla 12). Los niveles de los factores vienen definidos por los códigos "1", "0", y "-1", pudiendo ser o no equidistantes entre sí.

Este diseño experimental tiene la ventaja de venir integrado en el paquete estadístico STATGRAPHICS® PLUS versión 3.1 (Statistical Graphics Co., Maryland, EE.UU), con lo que todas las operaciones y cálculos estadísticos asociados a este diseño pueden ser realizados de manera rápida y fiable.

Tabla 12. Diseño factorial de Box-Behnken para tres factores con tres puntos centrales.

Experimento	X1	X2	X3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	0	0	0
6	1	0	1
7	1	0	-1
8	-1	0	1
9	-1	0	-1
10	0	0	0
11	0	1	1
12	0	1	-1
13	0	-1	1
14	0	-1	-1
15	0	0	0

El análisis estadístico del modelo incluye los coeficientes de regresión para el ajuste polinómico de segundo orden, es decir, los parámetros para la función superficie de respuesta, que no es sino el modelo empírico al que se ajustan los resultados. Aquellas proyecciones en tres dimensiones de la superficie de respuesta considerada en cada caso que representen un mayor nivel de confianza, y que de una manera cualitativa orientan sobre la tendencia del modelo, serán representadas gráficamente (Figura 6).

$$Y = z_0 + z_A A + z_B B + z_C C + z_{AA} AA + z_{BB} BB + z_{CC} CC + z_{AB} AB + z_{AC} AC + z_{BC} BC$$

Figura 6. Modelo polinomial múltiple propuesto para cada una de las representaciones de la superficie de respuesta. En cada caso, uno de los factores se mantiene constante a medida que se varían los otros dos.  $Y$  es la variable (o superficie) de respuesta.  $A$ ,  $B$ , y  $C$ , los factores o variables independientes. Los  $z_{ij}$  representan los coeficientes de regresión del modelo.

Por último, la fiabilidad del modelo de regresión propuesto debe comprobarse con la verificación de las hipótesis acerca de la adecuada forma del modelo, la distribución normal de los errores,  $N(0,1)$ , y su incorrelación. En caso de no cumplirse alguna de estas hipótesis puede ser que no se haya estimado alguna variable significativa en el diseño experimental.

El análisis de la varianza (ANOVA) descompone la variabilidad asociada a cada una de las variables aleatorias correspondientes, en función de los factores implicados en el modelo (intensidad de luz, concentración de nutrientes, concentración de glicerol externo). Al mismo tiempo determina la significancia estadística de los factores.

## **RESULTADOS**



### III. RESULTADOS

#### III. 1. GLICEROL, FLORIDÓSIDO Y AZÚCARES DE BAJO PESO MOLECULAR

Los análisis preliminares sobre el contenido de solutos compatibles (glicerol y floridósido) y LMWS en varias algas del litoral canario se muestran en la Tabla 13. Como era de esperar, solo las Rhodophyta *G. doryphora* y *Aspargaropsis* sp. contienen floridósido, aunque solo es detectado tras la incubación con glicerol. El contenido medio en LMWS detectado en la Chlorophyta *C. racemosa* y en *Aspargaropsis* sp., disminuye prácticamente a la mitad, en ambos casos, tras las incubaciones en glicerol y, ligeramente en *G. doryphora*.

Las algas pardas analizadas en este estudio acumulan preferentemente manitol, como soluto compatible. El manitol tiene un tiempo de retención muy similar al de los azúcares (WATERS *Chromatography Columns and Supplies Catalog*, Millipore Co., MA, USA; Figura 7). El índice de refracción del manitol es muy diferente al de éstos azúcares, por lo que, fue imposible hacer una estimación fiable de la concentración de esta sustancia o de las otras (no es posible considerar una recta de calibrado en común). En esta línea, como la cuantificación del manitol queda fuera del objetivo de este estudio, la estimación de LMWS no fue posible para estas muestras, ya que, ambas ventanas cromatográficas están solapadas. Los cromatogramas de estas especies mostraban otro pico que probablemente se correspondía con el fucosán, sustancia típica de algas pardas (Figura 7).

La presencia del glicerol solo se detectó en aquellas algas que habían estado en incubación en medios PES70+0.3M glicerol. *C. abies-marina* fue la especie que acumuló mayor contenido en glicerol interno ( $1133 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco), prácticamente el doble que todas las demás, excepto *C. racemosa* (747

$\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco). La Rhodophyta *G. doryphora*, y la Phaeophyta *S. scoparium* fueron las especies con menor cantidad acumulada, un 14 y 20% menos respectivamente que *C. abies-marina*.

Tabla 13. Cantidades de floridósido, glicerol y, azúcares de bajo peso molecular ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco) en varias algas del infralitoral. Las muestras fueron analizadas tras ser incubadas durante 24 h en PES70+0.3M glicerol, y tras ser recogidas del mar (Control).

Datos representan la media  $\pm$ SE de 9-18 medidas; n.d. = No detectado; (-), Debido al solapamiento de las ventanas de elución entre los LMWS y el manitol, no fue posible el cálculo de esta fracción.

Espece	Ensayo	Floridósido	LMWS	Glicerol
<i>Caulerpa racemosa</i>	0.3M glicerol	n.d.	3.113 $\pm$ 0.1023	746.68 $\pm$ 21.2
	Control	n.d.	8.824 $\pm$ 0.9524	n.d.
<i>Grateloupia doryphora</i>	0.3M glicerol	15.9693 $\pm$ 2.189	3.549 $\pm$ 0.546	156.87 $\pm$ 12.2
	Control	56.0130 $\pm$ 1.832	4.086 $\pm$ 0.8347	n.d.
<i>Asparopsis</i> sp	0.3M glicerol	n.d.	8.450 $\pm$ 0.3390	472.41 $\pm$ 26.2
	Control	42.7247 $\pm$ 2.368	13.807 $\pm$ 1.956	n.d.
<i>Cystoseira abies-marina</i>	0.3M glicerol	n.d.	-	1133.73 $\pm$ 25.8
	Control	n.d.	-	n.d.
<i>Padina pavonica</i>	0.3M glicerol	n.d.	-	579.72 $\pm$ 31.6
	Control	n.d.	-	n.d.
<i>Stypocaulon scoparium</i>	0.3M glicerol	n.d.	-	230.03 $\pm$ 22.6
	Control	n.d.	-	n.d.
<i>Taonia</i> sp	0.3M glicerol	n.d.	-	539.05 $\pm$ 20.5
	Control	n.d.	-	n.d.



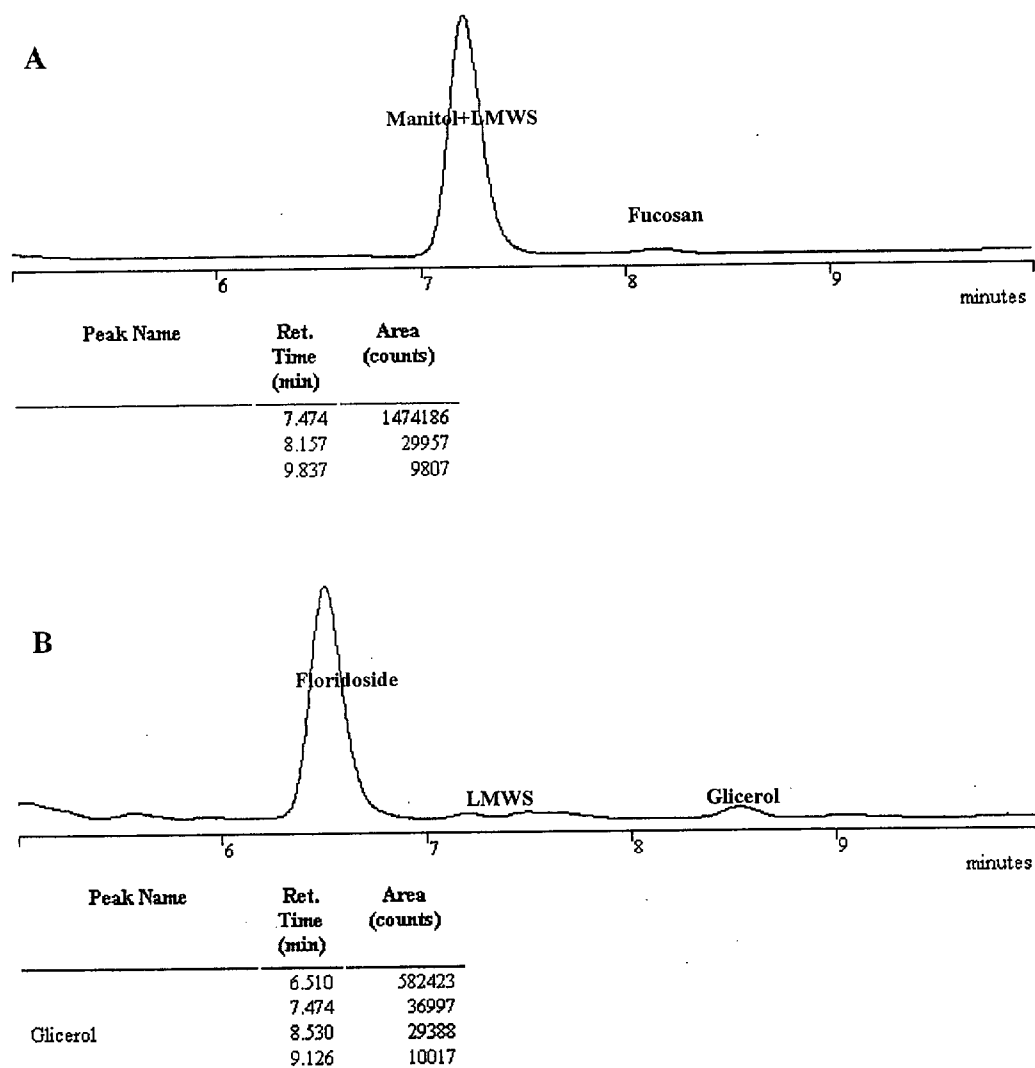


Figura 7. Cromatogramas HPLC correspondientes al análisis de heterósidos y LMWS en (A) la Phaeophyta *Cystoseira abies-marina* y, (B) la Rhodophyta *Asparagopsis* sp. Las gráficas no están a la misma escala vertical.

La concentración interna de glicerol, floridósido, y de LMWS, por la variación de las condiciones de cultivo obtenidas en las diferentes incubaciones de *G. doryphora*, según el diseño experimental factorial incompleto de Box-Behnken, se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentración de glicerol, floridósido, y LMWS en *Grateloupia doryphora*, para cada una de las 15 incubaciones correspondientes al diseño experimental de Box-Behnken (24 h) para tres factores (intensidad de luz, nitratos, glicerol externo).

Dw, peso seco.

Nº Incubación	Intensidad luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Glicerol <sub>ext</sub> (M)	Glicerol <sub>int</sub> ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{Dw}$ )	Floridósido ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{Dw}$ )	$\Sigma$ LMWS ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{Dw}$ )
1	90	140	0.1	416.0377	68.3501	0.6154
2	90	0	0.1	656.8456	69.9346	0.2795
3	30	140	0.1	141.6667	75.3086	0.4117
4	30	0	0.1	241.6667	87.0271	0.3658
5	60	70	0.1	94.1610	73.7350	0.7579
6	90	70	0.3	1509.8333	64.7067	0.2472
7	90	70	0.05	420.5890	48.9631	0.5078
8	30	70	0.3	410.5446	96.8906	0.5265
9	30	70	0.05	30.0000	69.7369	0.8280
10	60	70	0.1	97.3157	84.1549	0.4722
11	60	140	0.3	702.7473	97.7278	0.7760
12	60	140	0.05	92.83333	69.5028	1.1121
13	60	0	0.3	443.5976	122.1462	1.5458
14	60	0	0.05	58.33929	77.4255	0.6450
15	60	70	0.1	0.16629	64.5946	0.7483

La Tabla 15 presenta, de manera resumida, aquellos resultados significativos obtenidos en el análisis estadístico ANOVA para cada uno de los factores analizados. Asimismo, se indican aquellas representaciones gráficas que presentan un elevado índice de significación.

Tabla 15. Resumen del análisis ANOVA realizado para *G. doryphora* sobre las variables concentración de glicerol interno, concentración de floridósido, y concentración de LMWS en el diseño experimental de Box-Behnken para incubaciones de 24 h de duración. Los símbolos representan los niveles de significación estadística de cada uno de los factores considerados.

\*\*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*,  $p \leq 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.1$ ; Ns, no significativo. †, ANOVA para la variable glicerol interno una vez eliminado el factor nutrientes del análisis estadístico.

Factor	Glicerol interno	Floridósido	LMWS	Glicerol interno <sup>†</sup>
I <sub>Luz</sub>	***	**	Ns	***
I <sub>Luz</sub> · I <sub>Luz</sub>	**	*	**	
Nutrientes	Ns	Ns	Ns	---
Nutrientes · Nutrientes	Ns	*	Ns	
Glicerol exógeno	***	***	Ns	***
Glicerol exógeno · Glicerol exógeno	**	Ns	Ns	
I <sub>Luz</sub> · Nutrientes	Ns	Ns	Ns	---
I <sub>Luz</sub> · Glicerol exógeno	*(Fig. 8)	Ns	Ns	**
Nutrientes · Glicerol exógeno	Ns	Ns	*	---
Explicación de la varianza	78.5%	70.1%	41.1%	86.7%
Estadístico de Durwin-Watson	2.2	1.8	1.7	2.0

El modelo de regresión no lineal ajustado a la variable concentración de glicerol interno se correspondió, considerando todos los factores estudiados y las interacciones de segundo orden, con la siguiente expresión:

$$\text{Glicerol INT} = 1230.25 - 35.9162 (I_{Luz}) - 0.65617 (\text{Nitrato}) - 6298.03 (\text{Glicerol}) + 0.315853 (I_{Luz})^2 - 0.0167628(I_{Luz}) (\text{Nitrato}) + 47.2466 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 0.003246 (\text{Nitrato})^2 + 6.41873 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 15653.9 (\text{Glicerol})^2$$

donde el valor de las variables se expresa en las unidades ya especificadas.

Este modelo explica hasta un 78.5% de la variancia asociada a la concentración de glicerol interno, siendo los factores más determinantes en esa variabilidad la concentración de glicerol externa, y la intensidad de la luz (Tabla 15). En la Figura 8-A se muestran los factores asociados al modelo de variancia según su importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estimado de cada factor. Destaca el hecho que los factores asociados al efecto de los nutrientes, como efecto simple o cualquiera de sus interacciones, son los menos significativos, indicando que su implicación en la variabilidad de los resultados es prácticamente nula. El estadístico de Durbin-Watson, al estar entorno a 2 (Tabla 15), descarta la posibilidad de autocorrelación entre los residuos. La verificación de las hipótesis acerca de la distribución normal de los residuos y su independencia dan credibilidad al modelo propuesto.

La tendencia de la concentración interna de glicerol en función de la variación en intensidad de luz y la concentración exógena de glicerol se representa en la Figura 9. A medida que ambos factores se incrementan, el glicerol interno se acumula, es decir, ambos factores causan un efecto positivo sobre la acumulación de glicerol interno. El hecho de no darse un máximo absoluto, en la figura, indica que ambos factores pueden aún ser incrementados de forma regular en la dirección de la máxima pendiente.

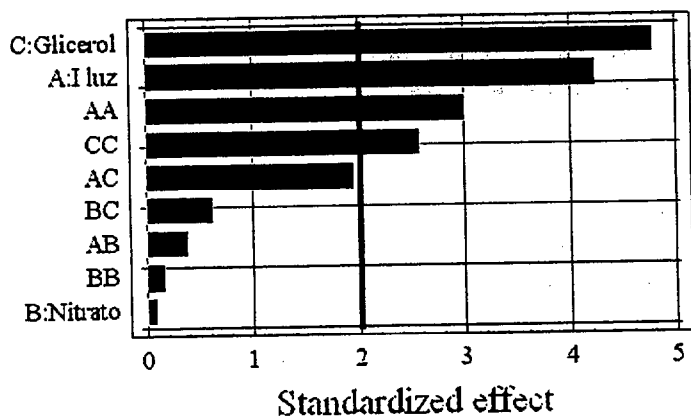
Considerando estos resultados y en vista del papel poco significativo que tiene el factor Nutrientes, se realizó un segundo análisis para mejorar el ajuste del modelo. En esta línea, los parámetros se ven mejorados de manera significativa (Tabla 15). El coeficiente de regresión corregido para más de una variable independiente ( $r^2$  ajustado) aumenta en más de 8 puntos, y la significación estadística de los factores considerados aumenta en todos los casos. En esta ocasión, el modelo no lineal quedó de la siguiente forma:

$$\text{Glicerol INT} = 1202.71 - 36.9265 (I_{Luz}) - 5821.31 (\text{Glicerol}) + 0.3145 (I_{Luz})^2 + 47.2466 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 15575.6(\text{Glicerol})^2$$

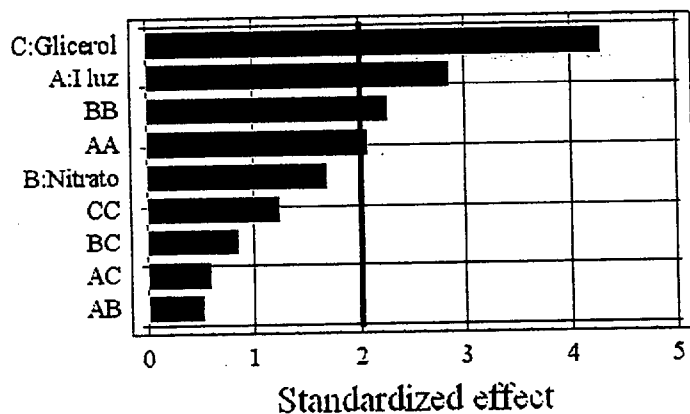
No se observaron diferencias entre la representación gráfica de esta función y la Figura 9.

Figura 8. Gráficos de Pareto para cada una de las variables aleatorias estudiadas. **(A)** Concentración de glicerol interno; **(B)** concentración de floridósido; **(C)** concentración de LMWS. Cada barra es proporcional al efecto estandarizado del factor correspondiente sobre la variables estudiada. Un efecto estandarizado superior o igual a 2, representa  $p \leq 0.1$ .

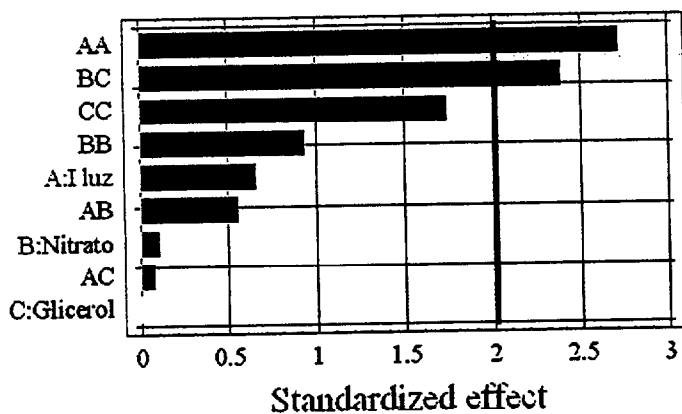
**A** Standardized Pareto Chart for Glicerol INT



**B** Standardized Pareto Chart for Floridoside



**C** Standardized Pareto Chart for LMWS



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

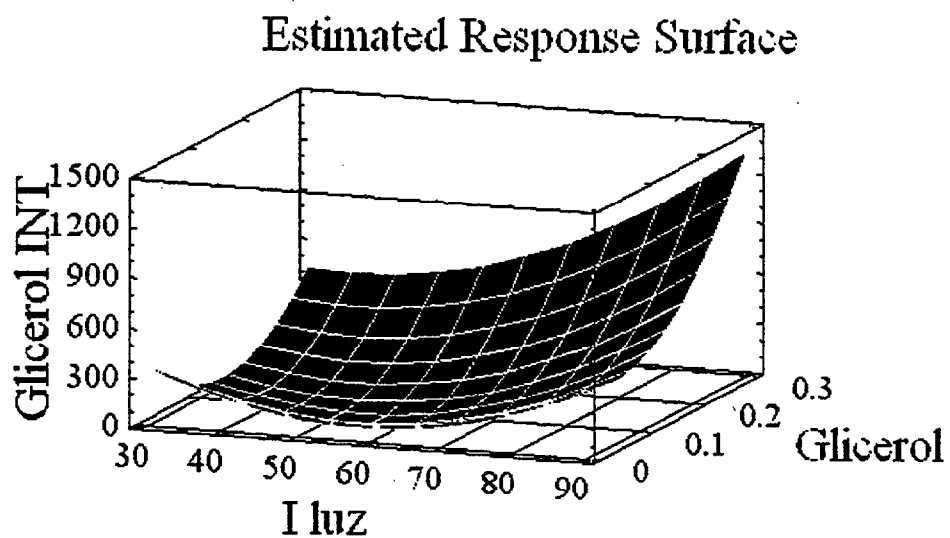


Figura 9. Superficie de respuesta estimada para la concentración interna de glicerol ( $\mu\text{mol gr}^{-1}$  peso seco) frente a la intensidad de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la concentración de glicerol exógena (M). La concentración de nitratos se fija a  $70 \text{ mg L}^{-1}$ .



La intensidad de luz es el factor que más contribuye a la variabilidad de la concentración de floridósido, aunque es la concentración de glicerol exógeno el término más significativo estadísticamente (Figura 8B). Respecto de los efectos conjuntos, la interacción más importante se presenta entre la concentración de nutrientes y la del glicerol exógeno, sin llegar a ser estadísticamente significativa ( $p>0.1$ ). Por lo tanto, aún justificando hasta un 70.1% de la variancia del floridósido (Tabla 15), el modelo no lineal no parece fiable al no ser las interacciones entre factores estadísticamente significativas (Figura 8B).

La representación de los efectos de manera aislada (gráficos en 2-dimensiones: floridósido-intensidad de luz, floridósido-concentración de glicerol, etc.), no es adecuada, pues la variancia se debe al efecto conjunto de los 3 factores, lo que podría dar lugar a error en la interpretación de los resultados.

En una posterior simplificación del modelo (eliminando del análisis aquellos factores menos significativos), aún dando lugar a una mejora en la explicación de la variancia, se detectaba una seria autocorrelación entre los residuos (estadístico de Durbin-Watson), situación que automáticamente invalidaba cualquier resultado, pues esta es una de la hipótesis que debe verificarse para la aceptación del modelo.

La respuesta obtenida en el caso de los LMWS da lugar a un coeficiente de determinación demasiado bajo (apenas un 40%) como para poder hacer algún tipo de predicción fiable. Los factores incluidos en el estudio no parece que estén afectando de manera significativa a la variabilidad observada en los datos, ya que, todos ellos distan mucho de ser estadísticamente significativos (Tabla 15; Figura 8C).

## Efecto de la concentración iónica sobre la acumulación de glicerol interno y floridósido

La Tabla 16 muestra las variaciones en la concentración de glicerol interno y floridósido, en oscuridad y en presencia de luz ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), como consecuencia de la dilución de las especies químicas.

Se observa una respuesta clara en la tendencia negativa de los niveles de floridósido con respecto los cambios en la salinidad. Aquellas incubaciones que estuvieron iluminadas acumularon mayores cantidades que las que se mantuvieron en oscuridad. Esto se observa de una manera más clara en la incubación con menor salinidad (50% SW;  $14.6 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco frente a  $4.8 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco). Debido al bajo número de submuestras, no se pudo realizar una comparación estadística fiable entre los diferentes tratamientos.

El comportamiento del glicerol es más difícil de interpretar, pues en este caso las diferencias parecen aún menores. Probablemente esta variable necesite un mayor tiempo de respuesta para que se detecten diferencias. No obstante, hay un resultado interesante acerca de la acumulación de glicerol interno a medida que aumenta la concentración de glicerol exógeno: parece encontrarse un máximo en la capacidad de acumulación de esta sustancia, pues entre aquellos cultivos con concentraciones de 0.25M y 0.5M, la cantidad de glicerol interno apenas aumenta en un 14%, mientras que, de 0.125M a 0.25M el aumento es casi del 50% (Tabla 16).

Tabla 16. Variaciones en la concentración de floridósido y de glicerol interno ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco), del alga *Grateloupia doryphora*, en incubaciones de 2 horas, a medida que cambia la salinidad y la concentración de glicerol exógeno. Las incubaciones se realizaron en condiciones de iluminación ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en oscuridad. Los tratamientos se realizaron simultáneamente.

Datos representan la media  $\pm$ SE de 6 medidas. %SW, porcentaje de agua de mar; Nd, no detectado.

		Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4	Cultivo 5
	%SW	100	87.5	75	62.5	50
	Concentración de glicerol	0 M	0.125 M	0.25 M	0.375 M	0.5 M
Tratamiento						
Luz	[Floridósido]	33.9852 $\pm$ 5.476	49.7075 $\pm$ 5.696	30.5359 $\pm$ 3.139	15.5089 $\pm$ 3.059	14.6260 $\pm$ 3.782
Oscuridad	[Floridósido]	39.0358 $\pm$ 2.566	41.3139 $\pm$ 4.321	30.6820 $\pm$ 4.100	10.4097 $\pm$ 3.013	4.7947 $\pm$ 3.953
Luz	[Glicerol] <sub>int</sub>	0.0059	922.6 $\pm$ 8.38	1658.5 $\pm$ 8.77	2388.2 $\pm$ 7.79	1885.0 $\pm$ 7.07
Oscuridad	[Glicerol] <sub>int</sub>	Nd	1174.8 $\pm$ 5.23	1641.1 $\pm$ 8.58	1575.8 $\pm$ 3.64	1781.6 $\pm$ 3.35

La Tabla 17 muestra las variaciones de la concentración de floridósido bajo  $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad de luz. Las incubaciones se realizaron durante 2 horas en un medio base constituido por agua destilada a la que se le añadió 140 mM de NaCl o KCl respectivamente, así como las respectivas concentraciones de glicerol externo ya probadas. La osmolalidad fue controlada por la adición de manitol. La concentración de NaCl representa el 33% de la existente en el mar, mientras que, los 140 mM de KCl son 15 veces superior a la concentración marina.

Para las dos series, la concentración de floridósido se mantiene constante a lo largo de las 5 incubaciones. La concentración media más baja para este soluto compatible se encuentra en la serie de 140 mM de NaCl (valor medio  $23.95 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco), detectándose diferencias significativas con la serie de 140 mM de KCl (valor medio  $44.73 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco ; Test *post hoc* de Duncan; Tabla 17).

El comportamiento del glicerol interno resulta algo complejo. A priori, en medios con 140mM de NaCl, a partir de 0.125M de glicerol exógeno, la concentración de glicerol interno se mantiene aproximadamente constante. Esta molécula parece difundir rápidamente a través de la membrana, pues pasa de no ser detectado (1ª incubación), a concentraciones cercanas a los  $500 \mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco en cuanto hay una cierta cantidad de glicerol en el medio. A partir de entonces el aumento es muy leve, aumentando solo 1.5 veces mientras que la concentración externa de glicerol se cuadriplica (Tabla 17; Figura 10).

Por el contrario, en presencia de 140 mM de KCl, no parece darse ninguna tendencia entre las diferentes concentraciones de glicerol externo (Figura 10).

Tabla 17. Variaciones en la concentración de floridósido y de glicerol interno ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco) en el alga *Grateloupia doryphora*, a diferentes concentraciones de glicerol, en medios conteniendo 140mM de NaCl o KCl. Las incubaciones se realizaron de forma simultánea, siendo la intensidad de luz ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la temperatura ( $19\pm 2^\circ\text{C}$ ), y el tiempo de incubación (2 h), homogéneos en todos los casos. La osmolalidad del medio fue alcanzada por medio de manitol.

Datos representan la media  $\pm$ SE de 6 medidas. No detectado, n.d. Test de Duncan para comparación de medias en las series de floridoside, superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p\leq 0.05$ ).

	140 mM NaCl		140 mM KCl	
	Floridósido <sup>a</sup>	Glicerol interno	Floridósido <sup>b</sup>	Glicerol interno
<b>0 M Glicerol</b>	22.3007 $\pm$ 1.141	n.d.	45.8593 $\pm$ 2.044	n.d.
<b>0.9 M Manitol</b>				
<b>0.125 M Glicerol</b>	23.5707 $\pm$ 1.922	396.0237 $\pm$ 24.4	43.7107 $\pm$ 2.383	292.1667 $\pm$ 20.4
<b>0.8 M Manitol</b>				
<b>0.25 M Glicerol</b>	25.6350 $\pm$ 2.111	439.5952 $\pm$ 20.8	41.2947 $\pm$ 2.148	314.0585 $\pm$ 28.2
<b>0.675 M Manitol</b>				
<b>0.375 M Glicerol</b>	24.2899 $\pm$ 2.018	482.7582 $\pm$ 23.8	45.5594 $\pm$ 1.868	770.8663 $\pm$ 26.4
<b>0.544 M Manitol</b>				
<b>0.5 M Glicerol</b>	23.9538 $\pm$ 2.947	525.3695 $\pm$ 27.9	47.2367 $\pm$ 2.360	790.3442 $\pm$ 29.0
<b>0.413 M Manitol</b>				

Fernando Marián de Diego

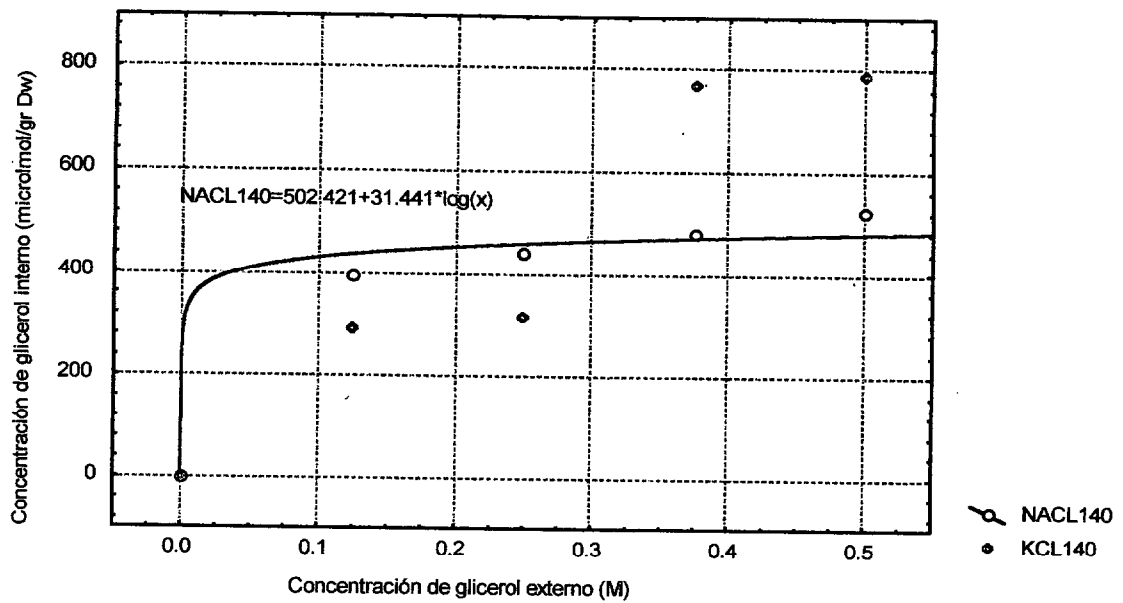


Figura 10. Efecto de la concentración iónica sobre el comportamiento del glicerol interno, a medida que aumenta la concentración de glicerol en el medio de cultivo (agua bidestilada; control de la osmolalidad con manitol:glicerol). La curva representan el ajuste a una logarítmica ( $r^2 NaCl_{140}=0.977$ ).

### III. 2. ÁCIDOS GRASOS

Los análisis sobre el contenido total en ácidos grasos (TFAs) en muestras del alga roja *Grateloupia doryphora* mostraron una proporción de entorno al 0.9-1% con respecto al peso seco. El perfil de ácidos grasos está principalmente compuesto por 15 tipos diferentes (Tablas 18 y 19) que suponen aproximadamente algo más del 80% del TFAs. De estos 15 ácidos grasos, 3 son saturados, 3 monoinsaturados, y 9 poliinsaturados. Según la longitud de la cadena carbonada, se encontró un C14 (cadena de 14 carbonos), tres C16, ocho C18, y tres C20. De todos ellos, tres pertenecen a la familia omega-3, mientras que otros cuatro son omega-6. Cuantitativamente, el ácido palmítico es el más abundante, en concentraciones de entorno a 3.5 mgr g<sup>-1</sup> peso seco, seguido del eicosapentanoico, y del araquidónico, ambos en cantidades cercanas a los 2 mgr g<sup>-1</sup> peso seco (Tabla 18).

Cualitativamente, las muestras de la naturaleza presentan una mayor cantidad de contenido total en ácidos grasos, con respecto a aquellas han sido aclimatadas (48 h), sin que esta diferencia llegue a ser significativa ( $p > 0.1$  según el Mann-Whitney U test). Las proporciones entre las diferentes fracciones de grasas saturadas, monoinsaturadas, y poliinsaturadas se mantienen muy similares, 35-40%, 5-6%, y 35-40% del contenido total en aceite respectivamente (Figura 11).

Tabla 18. Contenido en ácidos grasos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco), y proporción (%) de cada uno de ellos en muestras de *Grateloupia doryphora* procedentes de la naturaleza y aclimatadas, durante 48 h, en el laboratorio.

Nd, no datos. Datos representan  $\text{media} \pm \text{ES}$  de 3 muestras.

	Nombre	Formulación	Insaturaciones	Familia	% <sub>NATURALEZA</sub>	% <sub>ACLMATADAS</sub>
	<b>Ácidos grasos totales</b>				0.95 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.05
1	<b>Mirístico</b>	14:0		Saturado	3.22 $\pm$ 0.92	3.50 $\pm$ 1.20
2	<b>Palmítico</b>	16:0		Saturado	34.6 $\pm$ 3.95	32.11 $\pm$ 3.43
3	<b>Palmitoleico</b>	16:1n7	1	$\omega$ -7	3.29 $\pm$ 1.09	2.35 $\pm$ 0.30
4		16:3n4	3	$\omega$ -4	2.57 $\pm$ 0.87	0.80 $\pm$ 0.04
5	<b>Estearico</b>	18:0		Saturado	1.31 $\pm$ 0.90	0.75 $\pm$ 0.07
6	<b>Oléico</b>	18:1n9	1	$\omega$ -9	1.30 $\pm$ 0.15	2.86 $\pm$ 1.24
7		18:1n7	1	$\omega$ -7	0.95 $\pm$ 0.11	0.91 $\pm$ 0.16
8	<b>Linoléico</b>	18:2n6	2	$\omega$ -6	0.90 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.16
9		18:2n4	2	$\omega$ -4	Nd	Nd
10	<b><math>\gamma</math>-Linolénico</b>	18:3n6	3	$\omega$ -6	Nd	Nd
11	<b><math>\alpha</math>-Linolénico</b>	18:3n3	3	$\omega$ -3	Nd	0.69 $\pm$ 0.02
12	<b>Estearidónico</b>	18:4n3	4	$\omega$ -3	Nd	Nd
13	<b>Dihomo-<math>\gamma</math>-Linolénico</b>	20:3n6	3	$\omega$ -6	Nd	Nd
14	<b>Araquidónico</b>	20:4n6	4	$\omega$ -6	18.05 $\pm$ 1.80	16.70 $\pm$ 1.31
15	<b>Eicosapentanoico</b>	20:5n3	5	$\omega$ -3	18.30 $\pm$ 1.66	17.25 $\pm$ 1.23



Tabla 19. Porcentaje de cada ácido graso detectado, respecto al contenido total, para cada una de las 15 incubaciones de *Grateloupia doryphora* correspondientes con el diseño experimental de Box-Behnken para tres factores.

$I_{Luz}$ , intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); Nutrientes, concentración de nitratos en el medio de cultivo ( $\text{mg L}^{-1}$ ); Glicerol, concentración de glicerol en el medio de cultivo (M).

Incubación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$I_{Luz}$	60	60	90	30	90	30	90	60	30	60	90	30	60	60	60
Nutrientes	70	0	140	140	0	0	70	70	70	0	70	70	140	140	70
Glicerol	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.3	0.05	0.3	0.05	0.05	0.3	0.1
<b>14:0</b>	4.09	3.36	3.96	3.75	4.09	3.45	4.06	3.11	3.64	3.76	3.74	2.77	4.06	3.73	3.60
<b>16:0</b>	30.24	28.69	32.76	31.96	35.29	32.14	31.93	28.29	34.11	31.00	32.06	28.73	30.11	30.89	29.27
<b>16:1n7</b>	2.45	2.76	2.93	2.61	2.52	2.24	2.56	2.57	2.54	2.89	2.71	2.14	2.83	3.45	2.51
<b>16:3n4</b>	0.63	0.48	0.53	0.00	0.36	0.29	0.41	0.30	0.00	0.45	0.29	0.00	0.64	0.59	0.42
<b>18:0</b>	1.81	1.06	1.23	1.31	1.15	1.50	0.98	2.21	1.84	0.91	1.02	2.12	0.82	1.73	2.01
<b>18:1n9</b>	3.19	3.27	3.68	3.41	2.94	3.94	3.18	3.72	4.01	2.93	3.64	4.57	2.57	5.54	4.46
<b>18:1n7</b>	1.97	1.86	2.15	1.62	1.31	1.55	1.60	1.46	1.79	2.42	1.39	1.08	2.27	2.87	1.72
<b>18:2n6</b>	5.90	1.89	2.81	2.34	0.89	2.95	1.07	6.30	2.43	1.18	2.32	3.49	1.18	6.37	5.10
<b>18:2n4</b>	1.33	0.99	1.08	1.32	1.07	1.10	1.09	1.20	0.95	1.35	1.14	0.39	1.16	1.01	1.16
<b>18:3n6</b>	0.75	0.43	0.45	0.00	0.40	0.41	0.59	0.54	0.38	0.74	0.16	0.00	1.40	1.61	0.65
<b>18:3n3</b>	0.56	0.52	0.44	0.51	0.36	0.31	0.54	0.70	0.31	0.54	0.55	0.00	0.54	0.24	0.63
<b>18:4n3</b>	1.02	0.73	0.51	0.00	0.40	0.40	0.61	0.42	0.57	1.02	0.17	0.00	1.52	1.86	0.72
<b>20:3n6</b>	0.27	0.23	0.20	0.00	0.29	0.00	0.31	0.18	0.35	0.27	0.20	0.10	0.28	0.25	0.23
<b>20:4n6</b>	17.46	19.10	14.52	21.63	24.33	17.55	19.59	16.04	17.07	19.43	20.56	15.50	17.93	14.41	16.25
<b>20:5n3</b>	15.02	14.07	11.55	18.56	14.22	16.86	14.38	13.19	15.97	15.36	15.86	17.00	15.33	11.02	13.11

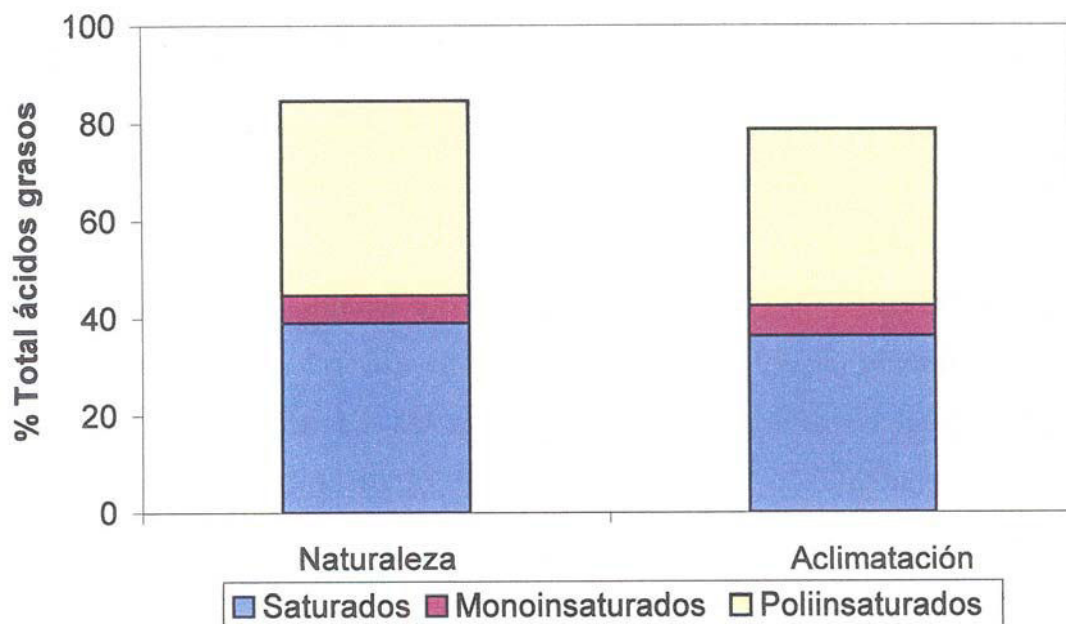


Figura 11. Distribución cualitativa de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, y poliinsaturados en *Grateloupia doryphora* en las muestras recogidas en la naturaleza, y tras el periodo de aclimatación.

## Efecto del tiempo de incubación en la acumulación de ácidos grasos

Los resultados del efecto del tiempo de incubación sobre la acumulación de ácidos grasos muestran que la acumulación de ácidos grasos (FAs), debido al efecto del nitrato y del glicerol, no son detectados hasta las primeras 24 horas de incubación (Figura 12a).

El contenido de TFAs solo mostró, en ese tiempo, cambios significativos en el tratamiento de 140 mg nitrato L<sup>-1</sup>+0.1M glicerol. Cuantitativamente, el contenido total en ácidos grasos osciló entre los 4.5 mg g<sup>-1</sup> peso seco en el tratamiento conteniendo 140 mg nitrato L<sup>-1</sup>+0.1M glicerol, y los 10 mg g<sup>-1</sup> peso seco detectados en ese mismo tratamiento a las 14 horas.

A las 24 horas, y en el caso de concentraciones moderadamente elevadas de glicerol (0.1M), los nutrientes parecen inducir a una disminución en la acumulación de FAs. De forma paralela, a elevadas concentraciones de nitrato (140 mg L<sup>-1</sup>), el glicerol parece favorecer la acumulación de FAs.

Los niveles de ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5n3) no se ven alterados para ninguno de los tratamientos ensayados. No obstante, el contenido de EPA es significativamente diferente a las 14 h y las 24 h de incubación, aumentando en este último periodo (Figura 12b). Su concentración osciló entre 1-1.4 mg g<sup>-1</sup> peso seco.

La proporción de ácido araquidónico (AA; 20:4n6), independientemente del tratamiento usado, tampoco se ve alterada en las primeras 14 horas (0.8 mg g<sup>-1</sup> peso seco aproximadamente).

A las 24 horas, e independientemente de la concentración de nutrientes, solo en aquellas incubaciones con elevadas concentraciones de glicerol (0.3M), se observó un aumento muy significativo en la proporción de AA (1.25 mg g<sup>-1</sup> peso seco; Figura 12c).

---

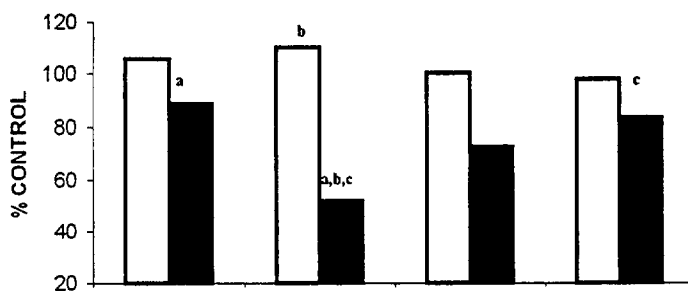
El comportamiento del ácido palmítico (16:0) resulta complejo de interpretar. Este hecho en parte puede ser debido a que en algunos de los tratamientos el error estándar suponía un valor incluso superior al 10% de la media.

A priori, a las 14 horas se observa un aumento muy significativo en las proporciones de palmítico con respecto a la media control, sin detectarse efectos por los diferentes tratamientos. Diez horas después, los niveles de palmítico se mantienen muy altos, apenas cambiando con respecto los niveles anteriores, pero optimizándose a altas concentraciones de nutrientes (Figura 12d).

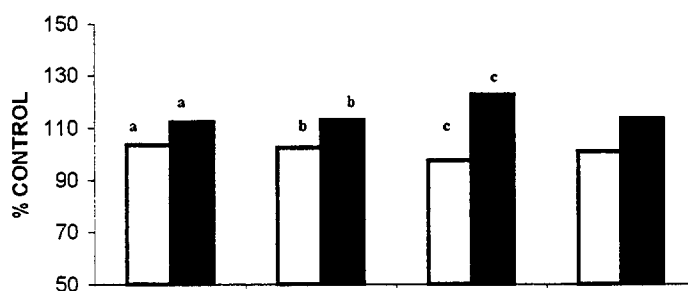
Figura 12. (a) Acumulación de ácidos grasos totales, (b) ácido eicosapentanoico, (c) ácido araquidónico y, (d) ácido palmítico en *Grateloupia doryphora*, para incubaciones de diferente duración y a diferentes concentraciones de nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ), y de glicerol (M). Las condiciones de luz ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura ( $19 \pm 2^\circ\text{C}$ ) se mantuvieron constantes durante toda la experiencia.

Barras claras, 14 horas; barras oscuras, 24 horas. Datos representan el % de variación respecto los valores control. Misma letra indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

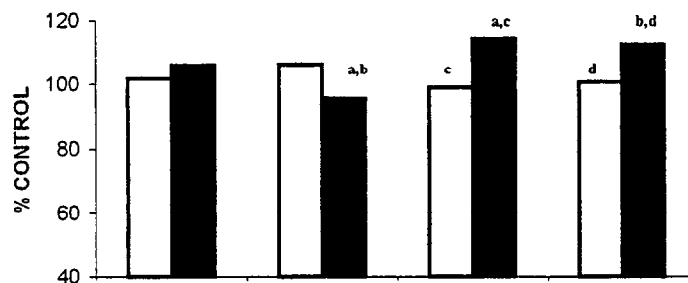
a) **ÁCIDOS GRASOS TOTALES**



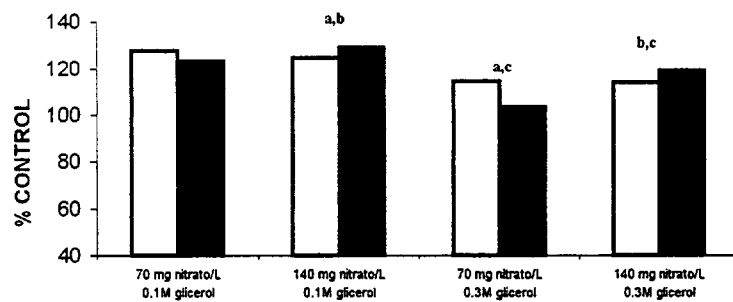
b) **EICOSAPENTANOICO**



c) **ARAQUIDÓNICO**



d) **PALMÍTICO**



## Efecto de las variaciones de las condiciones de cultivo en la acumulación de ácidos grasos

La Tabla 19 muestra el contenido de los 15 ácidos grasos detectados por cromatografía de gases, en cada uno de los tratamientos del diseño experimental de Box-Behnken. La Tabla 20 muestra, para las mismas condiciones, los porcentajes de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, así como, los correspondientes a las familias omega-3 y omega-6. Así mismo se refleja el porcentaje de ácidos grasos respecto al peso seco y al contenido total de ácidos grasos. Para cada ácido graso se realizó un ANOVA con el objetivo de determinar en que medida los factores estudiados afectaban a su acumulación.

Analizando los resultados considerando a cada ácido graso independientemente y, según la importancia de los factores considerados en el modelo, la luz es claramente el más significativo (Tabla 21). Tanto como término lineal o como no lineal, aparece como el factor más importante para 9 FAs de un total de 15 en estudio, presentando el mayor F-ratio entre los 9 factores considerados en el análisis. Además si valoramos aquellos factores de interacción el número asciende a 11. Es decir, que en un 60% de las ocasiones la luz pertenece al factor estadísticamente más importante (menor  $p$  entre todos aquellos que cumplen  $p \leq 0.1$ ): ácido palmítico, 16:3n4, 18:1n7, ácido linoleico,  $\gamma$ -linolénico (GLA), estearidónico, dihomo- $\gamma$ -linolénico, AA, y EPA.

Tabla 20. Porcentaje de ácidos grasos respecto al peso seco y al contenido total; porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, omega-3, y omega-6 respecto del total detectado, para cada una de las 15 incubaciones de *Grateloupia doryphora* correspondientes con el diseño experimental de Box-Behnken para tres factores.

$I_{Luz}$ , intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); Nutrientes, concentración de nitratos en el medio de cultivo ( $\text{mg L}^{-1}$ ); Glicerol, concentración de glicerol en el medio de cultivo (M).

Incubación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b><math>I_{Luz}</math></b>	60	60	90	30	90	30	90	60	30	60	90	30	60	60	60
<b>Nutrientes</b>	70	0	140	140	0	0	70	70	70	0	70	70	140	140	70
<b>Glicerol</b>	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.3	0.05	0.3	0.05	0.05	0.3	0.1
<b>%FA<sub>Peso Seco</sub></b>	0.75	0.75	1.40	1.05	0.79	0.65	1.01	1.05	0.76	0.80	1.10	1.44	1.15	0.75	0.90
<b>%FA<sub>TFA</sub></b>	86.69	79.44	78.8	89.02	89.62	84.69	82.90	80.23	85.96	84.25	85.81	77.89	82.64	85.87	81.84
<b>%Saturados</b>	36.14	33.11	37.95	37.02	40.53	37.09	36.97	33.61	39.59	35.67	36.82	33.62	34.99	36.35	34.88
<b>%Monoinsaturados</b>	7.61	7.89	8.76	7.64	6.77	7.73	7.34	7.75	8.34	8.24	7.74	7.79	7.67	11.86	8.69
<b>%Poliinsaturados</b>	42.94	38.44	32.09	44.36	42.32	39.87	38.59	38.87	38.03	40.34	41.25	36.48	39.98	37.36	38.27
<b>%<math>\Sigma\omega 3</math></b>	16.6	15.32	12.5	19.07	14.98	17.57	15.53	14.31	16.85	16.92	16.58	17	17.39	13.12	14.46
<b>%<math>\Sigma\omega 6</math></b>	24.38	21.65	17.98	23.97	25.91	20.91	21.56	23.06	20.23	21.62	23.24	19.09	20.79	22.64	22.23



Tabla 21. Resumen del ANOVA realizado para cada ácido graso.

Los símbolos indican la significación estadística de los factores considerados en el análisis teniendo en cuenta si su efecto es lineal y/o no lineal. Espacios en blanco implican un resultado no significativo. \*\*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*,  $p \leq 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.1$ .

	$I_{Luz}$		Glicerol		Nutrientes		Interacciones		
	Lineal	No Lineal	Lineal	No Lineal	Lineal	No Lineal	$I_{Luz}$ ·Glicerol	$I_{Luz}$ ·Nutrientes	Glicerol·Nutrientes
14:0									
16:0		**					*		
16:1n7	*	***	**	*	***	***			*(Fig. 13)
16:3n4	*	**				**			
18:0									*
18:1n9									
18:1n7		***			**	**	*(Fig. 16)		*(Fig. 13)
18:2n6		**	*	**	**	**			*(Fig. 14)
18:2n4									
18:3n6					*				
18:3n3									
18:4n3		***			*				
20:3n6		**		*			** (Fig. 16)		
20:4n6		**			**			*** (Fig. 15)	
20:5n3	*								
Ratio Insaturada/Saturada		***					** (Fig. 20)	** (Fig. 20)	

El siguiente factor en importancia es la concentración inicial de nutrientes, siendo estadísticamente significativo ( $p \leq 0.1$ ) como término lineal o no lineal, para 8 FAs: ácido palmitoleico, esteárico, oleico, 18:1n7, ácido linoléico, GLA, estearidónico, y AA).

Por último y de igual forma que anteriormente, la concentración externa de glicerol aparece como factor significativo ( $p \leq 0.1$ ) en el caso de 7 ácidos grasos: palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, 18:1n7, linoleico, y dihomo- $\gamma$ -linolénico.

El comportamiento de los ácidos grasos en función de estos factores se puede modelizar a partir de modelos no lineales (Tabla 22). Solo los modelos de 6 tipos de grasas obtienen coeficientes de ajuste superiores al 60%, desestimándose la fiabilidad de aquellos con coeficientes inferiores. Los casos en los que el coeficiente es muy bajo pero la interacción de los factores es significativa puede deberse a la presencia de factores no controlados en el estudio. Para los 6 compuestos representativos es posible construir una gráficas del tipo superficie de respuesta en tres dimensiones, donde los ejes representan a la variable aleatoria (Z), y a los factores (X,Y) cuya interacción sea estadísticamente significativa (Tabla 21). En las figuras 13-16 se presentan las superficies de respuestas para el palmitoléico, el 18:1n7 (dos), el linoléico, el dihomo- $\gamma$ -linolénico, y el araquidónico.

Tabla 22. Bondad de ajuste y modelos no lineales propuestos para cada ácido graso.

% Ajuste (correg), coeficiente de ajuste para modelos con más de una variable independiente. C, porcentaje respecto la cantidad total de ácidos grasos presente en el alga *Grateloupia doryphora*. N.V., no válido (modelo matemático no representado debido al bajo coeficiente de ajuste). Los factores se expresan en sus unidades correspondientes.

Ácido graso	% Ajuste (correg)	Modelo no lineal
16:1n7	90.12	$C = 1.70488 + 0.0352571 (I_{Luz}) - 0.00811501 (\text{Nitrato}) - 3.30479 (\text{Glicerol}) - 2.38889 \times 10^{-4} (I_{Luz})^2 + 4.7619 \times 10^{-6} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.0142938 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 5.71429 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 + 0.0170702 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 11.45 (\text{Glicerol})^2$
18:1n7	79.06	$C = 0.5113 + 0.0661125 (I_{Luz}) - 0.0180204 (\text{Nitrato}) - 4.49374 (\text{Glicerol}) - 5.27315 \times 10^{-4} (I_{Luz})^2 + 9.16667 \times 10^{-5} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.0548588 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 8.47789 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 + 0.027724 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 18.2417 (\text{Glicerol})^2$
18:2n6	71.10	$C = -5.28075 + 0.20244 (I_{Luz}) + 0.0197817 (\text{Nitrato}) + 59.0508 (\text{Glicerol}) - 0.00213704 (I_{Luz})^2 + 3.0119 \times 10^{-4} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) + 0.114576 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) - 3.2568 \times 10^{-4} (\text{Nitrato})^2 + 0.131501 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) - 197.258 (\text{Glicerol})^2$
20:3n6	70.86	$C = -0.286912 + 0.0149515 (I_{Luz}) + 0.00162066 (\text{Nitrato}) - 0.762422 (\text{Glicerol}) - 6.75926 \times 10^{-5} (I_{Luz})^2 - 1.07143 \times 10^{-5} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.0276271 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) - 8.84354 \times 10^{-6} (\text{Nitrato})^2 + 0.0011138 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 6.89167 (\text{Glicerol})^2$

Tabla 22 (continuación).

Ácido graso	% Ajuste (correg)	Modelo no lineal
18:4n3	67.25	$C = -1.33903 + 0.0964619 (I_{Luz}) - 0.013158 (\text{Nitrato}) - 7.6815 (\text{Glicerol}) - 7.43056 \times 10^{-4} (I_{Luz})^2 + 6.07143 \times 10^{-5} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.0621469 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 5.63776 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 + 0.029201 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 27.275 (\text{Glicerol})^2$
16:3n4	64.83	$C = -0.630979 + 0.0369492 (I_{Luz}) - 0.00611743 (\text{Nitrato}) + 0.244619 (\text{Glicerol}) - 2.88889 \times 10^{-4} (I_{Luz})^2 + 5.47619 \times 10^{-5} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.00508475 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 2.14286 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 + 0.0011138 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) - 0.45 (\text{Glicerol})^2$
20:4n6	63.33	$C = 17.5058 - 0.0935927 (I_{Luz}) + 0.0538418 (\text{Nitrato}) - 1.73491 (\text{Glicerol}) + 0.00188148 (I_{Luz})^2 - 0.00165357 (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) + 0.100169 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 2.5119 \times 10^{-4} (\text{Nitrato})^2 - 0.0805811 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 0.158333 (\text{Glicerol})^2$
18:3n6	57.90	$C = -1.09566 + 0.0789416 (I_{Luz}) - 0.0107262 (\text{Nitrato}) - 6.12888 (\text{Glicerol}) - 6.0787 \times 10^{-4} (I_{Luz})^2 + 5.47619 \times 10^{-5} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.0469492 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 4.39626 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 + 0.0285714 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 19.4167 (\text{Glicerol})^2$
16:0	57.86	$C = 35.2094 - 0.26558 (I_{Luz}) - 0.0319574 (\text{Nitrato}) + 35.2131 (\text{Glicerol}) + 0.00294769 (I_{Luz})^2 - 2.79762 \times 10^{-4} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) - 0.344068 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) + 2.28146 \times 10^{-4} (\text{Nitrato})^2 + 0.104019 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) - 51.0583 (\text{Glicerol})^2$

Tabla 22 (continuación).

## Modelo no lineal

Ácido graso	% Ajuste (correg)	Modelo no lineal
20:5n3	51.34	$C = 25.3989 - 0.276237 (I_{Luz}) + 0.040906 (\text{Nitrato}) - 39.8647 (\text{Glicerol}) + 0.0018787 (I_{Luz})^2 - 5.20238 \times 10^{-4} (I_{Luz}) (\text{Nitrato}) + 0.259096 (I_{Luz}) (\text{Glicerol}) - 3.40136 \times 10^{-5} (\text{Nitrato})^2 - 0.0884504 (\text{Nitrato}) (\text{Glicerol}) + 72.4583 (\text{Glicerol})^2$
18:0	44.92	N.V.
18:1n9	11.82	N.V.
18:3n3	0	N.V.
14:0	0	N.V.
18:2n4	0	N.V.

Las Figuras 13 A, B se corresponden con el comportamiento del palmitoléico y del 18:1n7 respectivamente, observándose que su comportamiento es prácticamente idéntico. El aumento de la concentración de nutrientes, al tiempo que la de glicerol, afecta positivamente a la acumulación de estas grasas. Sin embargo, cuando la presencia de nutrientes es baja, el glicerol no produce ningún efecto sobre la acumulación. Este patrón de respuesta es similar para el caso opuesto, es decir, para una baja concentración de glicerol los nutrientes no afectan considerablemente a la acumulación.

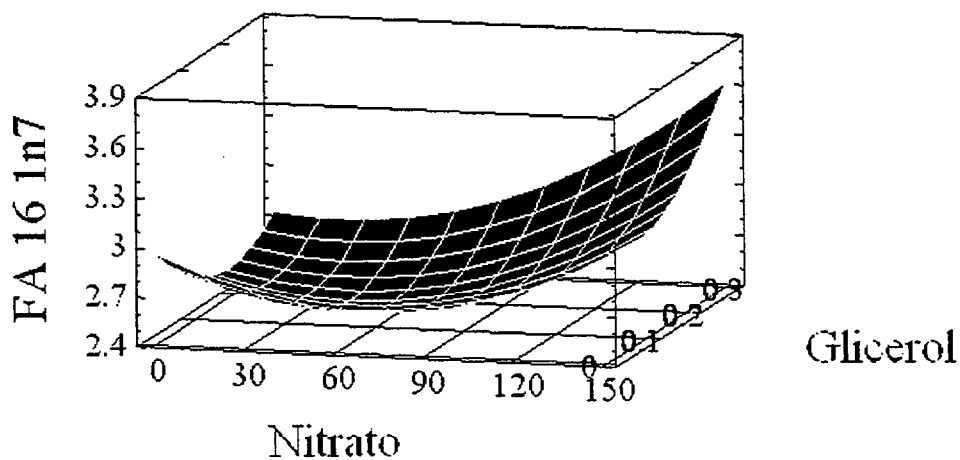
También se observa que en estas gráficas no se alcanza el límite máximo para el intervalo experimental considerado, por lo que es posible optimizar la acumulación de estas grasas si se continúa experimentando en la línea de la máxima pendiente. Las cantidades máximas estimadas para el palmitoléico llegan hasta el 3.6% del contenido total en ácidos grasos.

El ácido linolénico (Figura 14) parece alcanzar un máximo en su acumulación para una concentración de 0.2M de glicerol, y 90 mg L<sup>-1</sup> de nitrato. En ese caso, la acumulación es entorno al 9% del total de ácidos grasos, que supone aproximadamente 0.9 mg g<sup>-1</sup> peso seco, si consideramos un 1% de la biomasa como ácidos grasos.

La interacción de la luz con la concentración de nutrientes afecta de manera muy significativa a la proporción de ácido araquidónico ( $p \leq 0.01$ ). Así, la Figura 15 muestra que a intensidades de luz moderadamente bajas (30  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), los nutrientes inducen a una mayor acumulación de grasas en forma de araquidónico, hasta un 26% del TFAs, que suponiendo un 1% de la biomasa como ácidos grasos supone una concentración de 2.6 mg g<sup>-1</sup> de peso seco de alga. De manera opuesta, a medida que aumenta la intensidad de luz, el efecto de los nutrientes es cada vez menor, llegando incluso a ser inhibitorio.

A

## Estimated Response Surface



B

## Estimated Response Surface

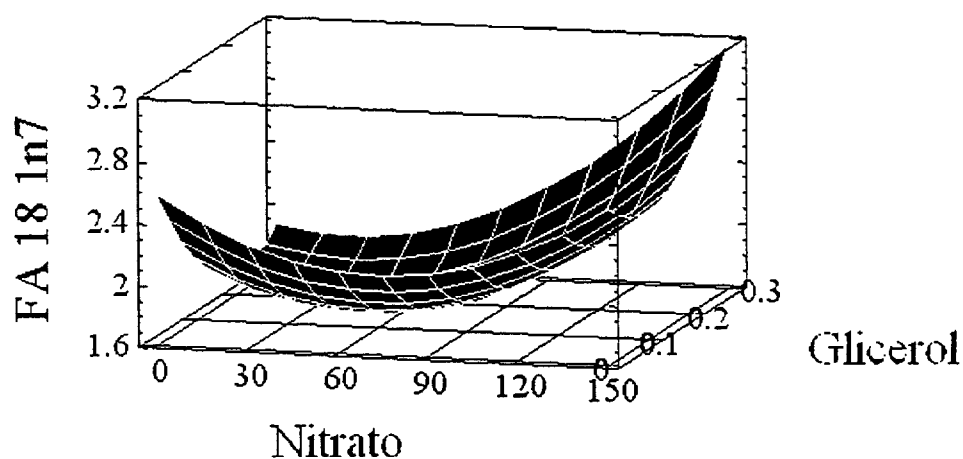


Figura 13. Superficie de respuesta (% respecto del contenido total en ácidos grasos) estimada para (A) el ácido palmitoléico y, (B) el 18:1n7, frente a la concentración de nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y de glicerol (M).

La intensidad de luz se fija a  $60 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

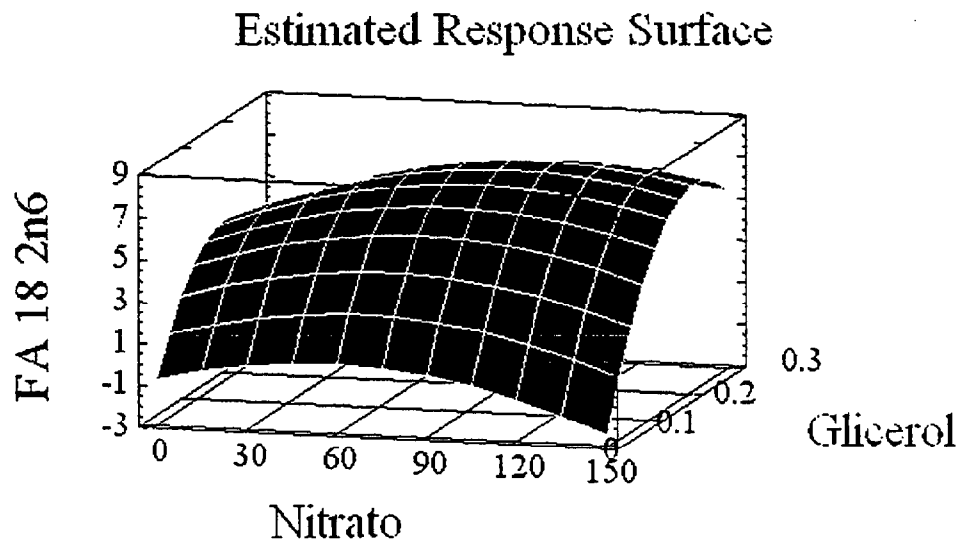


Figura 14. Superficie de respuesta (% respecto del contenido total en ácidos grasos) estimada para el ácido linoléico frente a la concentración de nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y de glicerol (M).

La intensidad de luz se fija a  $60 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



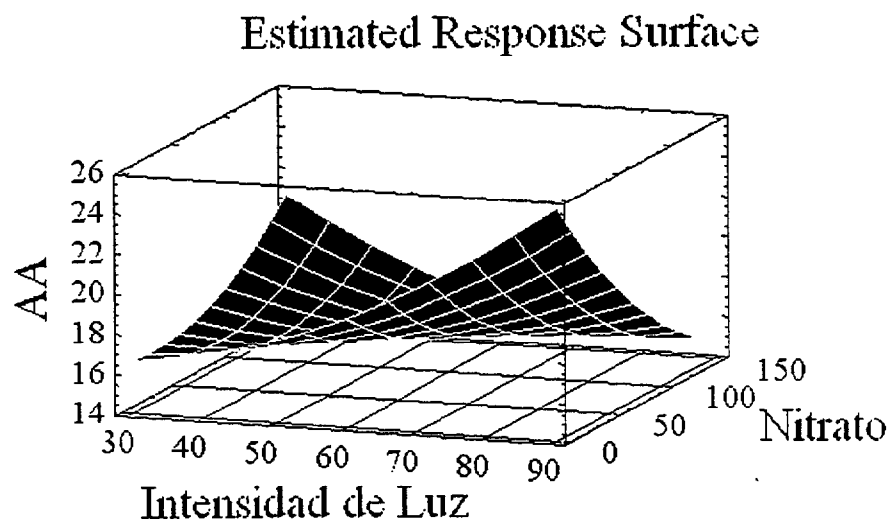


Figura 15. Superficie de respuesta (% respecto del contenido total en ácidos grasos) estimada para el araquidónico, frente a la concentración de nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y la intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

La concentración de glicerol se fija a 0.1M.

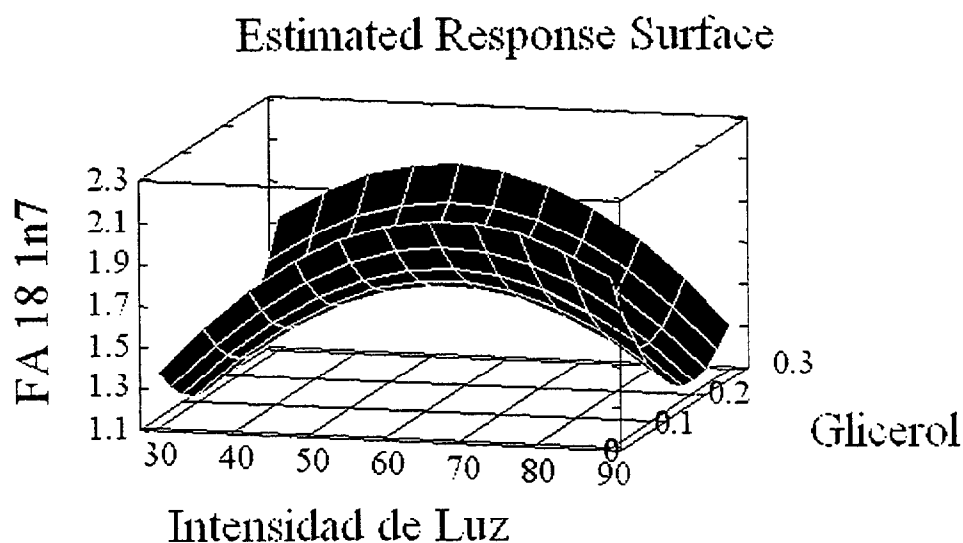
Las Figuras 16 A, B muestran el efecto de la interacción intensidad de luz-concentración de glicerol para el caso del 18:1n7, y del dihomo- $\gamma$ -linolénico. En el primer caso, se promueve una acumulación (máximo relativo) de este ácido graso para intensidades de luz de 50-60  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pero concentraciones elevadas o nulas de glicerol van a optimizar esta respuesta (hasta un 2.1% del TFAs). Para elevadas concentraciones de nitrato (superiores a 100  $\text{mg L}^{-1}$ ), el efecto de una alta concentración de glicerol es superior, en cuanto a la acumulación de esta grasa, que en el caso de no haber glicerol en el medio (resultados no mostrados).

Para el caso del dihomo- $\gamma$ -linolénico, el comportamiento es similar al descrito anteriormente, pero el efecto de la concentración de glicerol no es tan acusado. La concentración más elevada estimada por el modelo se aproxima al 0.5% del TFAs.

Un análisis más detallado de los datos mostrados en la Tabla 20 permite agrupar los diferentes ácidos grasos en sub-familias, proporcionando cierta información acerca de su posición en la larga cadena de síntesis que caracteriza a estos compuestos. De esta manera, el análisis clúster nos permite clasificar en varias categorías los ácidos grasos estudiados.

Para la realización de este análisis y para cada ácido graso las quince medidas, obtenidas a lo largo del diseño experimental, se consideran submuestras bajo la hipótesis de semejanza entre los elementos que componen a cada serie (se asume la variabilidad debida a las diferentes condiciones de incubación), de tal manera que se obtiene una clasificación en un conjunto bien establecido de categorías: Categoría A de productos finales (77% del TFAs), compuesta por el EPA, el AA, el palmítico, y el mirístico; Categoría B de intermediarios (10% del TFAs); y Categoría C de precursores (13% del TFAs), que incluye al esteárico, al linoléico, y al oléico (Figura 17).

A



B

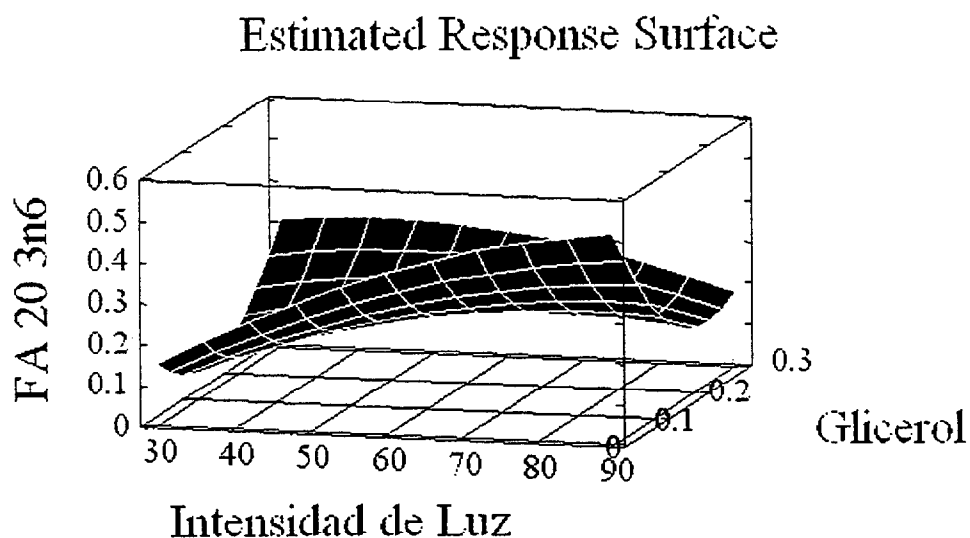


Figura 16. Superficie de respuesta (% respecto del contenido total en ácidos grasos) estimada para (A) el 18:1n7 y, (B) el dihomo- $\gamma$ -linolénico, frente a la concentración de glicerol (M) y la intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

La concentración de nitratos se fija a  $70 \text{ mg L}^{-1}$ .

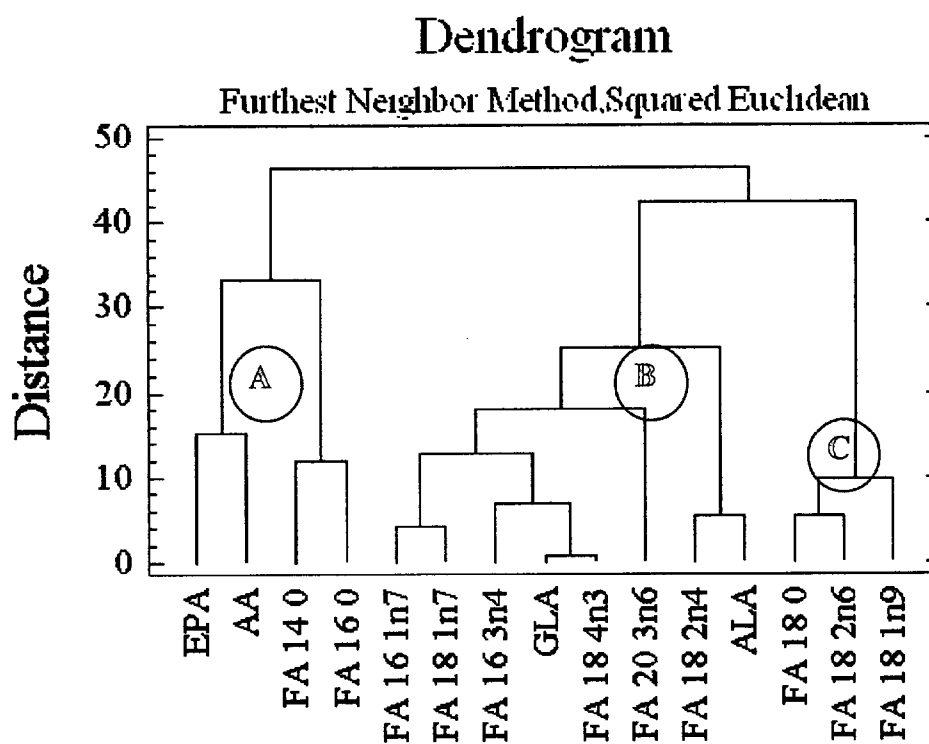


Figura 17. Análisis clúster de los datos obtenidos en el diseño experimental de Box-Behnken. Cada ácido graso es considerado como una variable sobre la cual se realizan 15 medidas. Categoría A, productos finales; Categoría B, intermediarios; Categoría C, precursores.

El estudio del comportamiento de las fracciones según el grado de saturación a lo largo de las 15 incubaciones (Figura 18) muestra que la proporción de grasa poliinsaturada/saturada se mantiene entorno al 1-1.1. El análisis de la variancia correspondiente a este caso se puede representar por el gráfico de Pareto (Figura 19), que muestra que las interacciones intensidad de luz-nutrientes, e intensidad de luz-glicerol son muy significativas ( $p \leq 0.05$ ). Aún siendo el coeficiente de ajuste algo inferior al 60%, el interés por la información que pueda proporcionar el modelo es evidente, pues el 85% de la grasa poliinsaturada se compone de ácidos tan importantes como el EPA, AA, y GLA. La luz modula la respuesta del alga frente a la concentración de nutrientes (Figura 20 A). A bajas intensidades de luz, la concentración de nutrientes se correlaciona con un aumento relativo de las grasas poliinsaturadas alcanzándose un ratio superior a 1.2, pero a medida que aumenta la intensidad luminosa el nitrato favorece la acumulación de las saturadas. Un efecto similar ocurre para la utilización de una fuente de carbono orgánico. A bajas intensidades de luz la presencia del glicerol favorece la biosíntesis y acumulación de grasas saturadas, mientras que este efecto se ve prácticamente inhibido a medida que se incrementa la intensidad de luz (Figura 20 B).

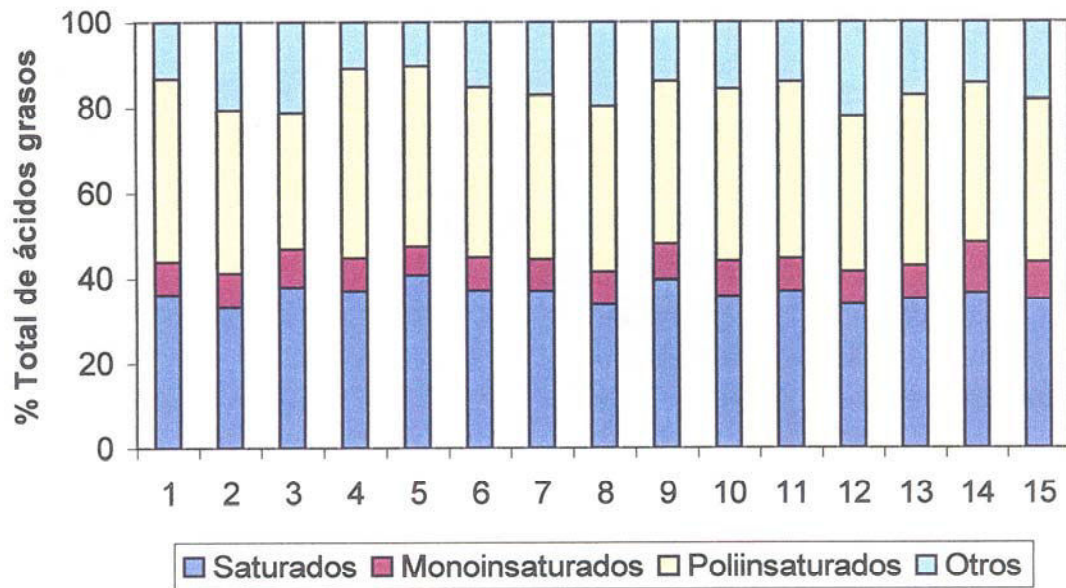


Figura 18. Distribución de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados, y poliinsaturados en *Grateloupia doryphora*, en cada una de las incubaciones propuestas por el diseño experimental de Box-Behnken para tres factores.

## Standardized Pareto Chart for poli vs.satu

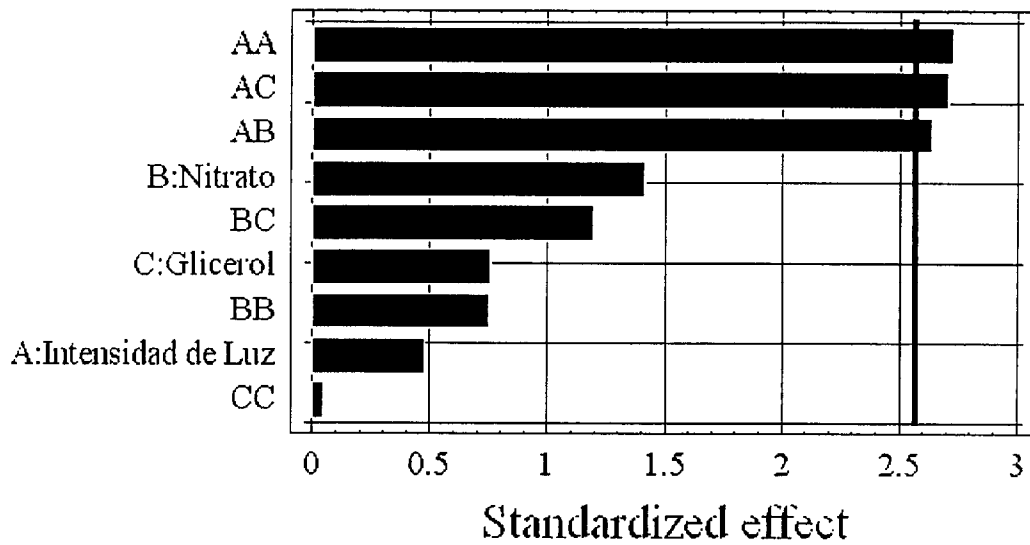
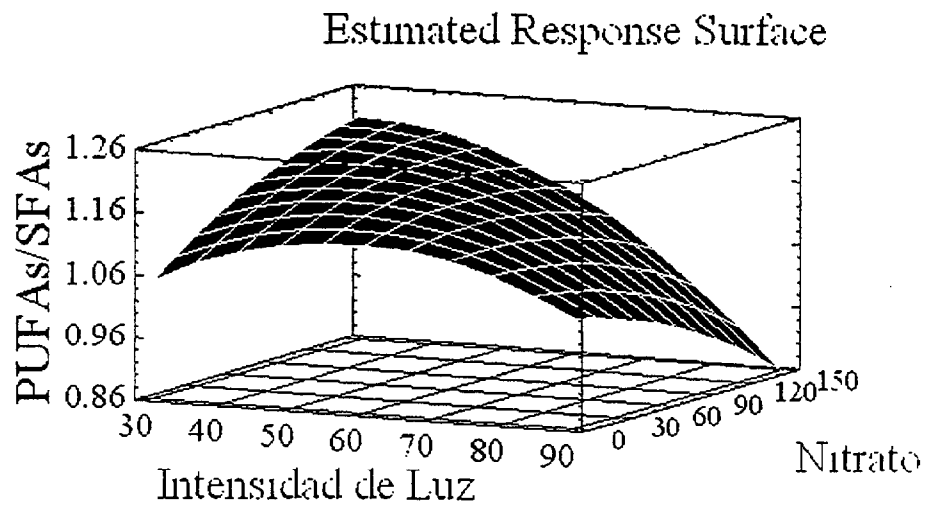


Figura 19. Gráfico de Pareto para la proporción de grasa poliinsaturada/saturada. Cada barra es proporcional al efecto del factor correspondiente sobre la variable estudiada. Un efecto estandarizado superior o igual a 2.6 representa una significancia estadística del factor al 95% en el análisis ANOVA.

A



B

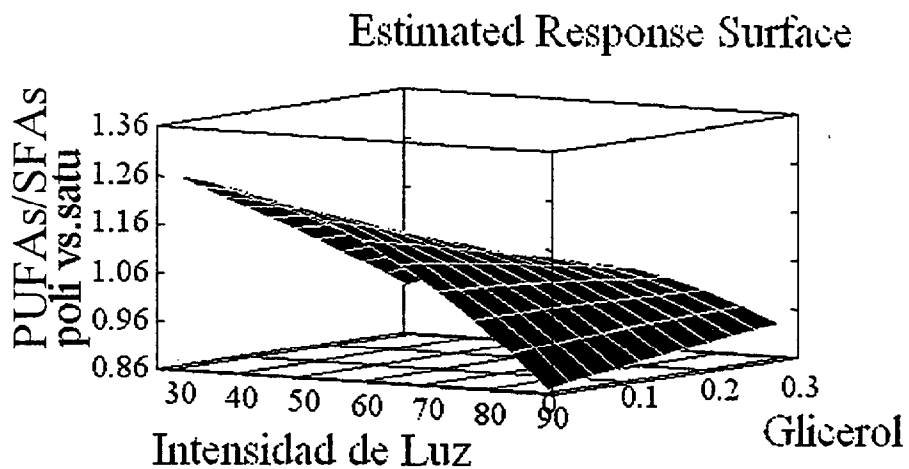


Figura 20. (A) Superficie de respuesta estimada para el ratio grasa poliinsaturada/saturada vs. la concentración de nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y la intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para una concentración de glicerol fija de  $0.05\text{M}$ . (B) Superficie de respuesta estimada para el ratio grasa poliinsaturada/saturada vs. la concentración de glicerol ( $\text{M}$ ) y la intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para una concentración de nitrato de  $140 \text{mg L}^{-1}$ .



### III. 3. NIVELES ENDÓGENOS, ACUMULACIÓN Y EFECTO DE LAS POLIAMINAS

#### Presencia de poliaminas en las algas *Dictyota dichotoma*, *Gelidium canariensis* y *Grateloupia doryphora*

Los niveles de poliaminas en las especies algales estudiadas se muestran en la Tabla 23. En las tres especies se encontraron cantidades significativas de poliaminas, tanto en la fracción libre como en la insoluble-conjugada. La putrescina es siempre la más abundante en ambas fracciones, seguida de espermidina y espermina en cantidades similares. La mayor concentración para las tres especies vegetales se encontró siempre en la fracción insoluble-conjugada correspondiente a la putrescina, y la menor corresponde a la fracción libre de espermina en unos casos (*D. dichotoma* y *G. doryphora*), y a la espermidina en el otro (*G. canariensis*).

Tabla 23. Poliaminas en tres especies de algas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) recogidas en la costa de Gran Canaria (Islas Canarias).

Datos de 16-20 réplicas; media  $\pm$  SE; put, putrescina; spd, espermidina; spm, espermina.

		<i>Dictyota dichotoma</i> (Phaeophyta)	<i>Gelidium canariensis</i> (Rhodophyta)	<i>Grateloupia doryphora</i> (Rhodophyta)
Poliaminas libres	put	81 $\pm$ 1.73	134 $\pm$ 2	62 $\pm$ 2
	spd	0.33 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.02
	spm	0.23 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.03
Poliaminas inslub-conjugadas	put	1667 $\pm$ 226	1998 $\pm$ 39	2624 $\pm$ 33
	spd	7.2 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.1
	spm	4.1 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.2

### Regulación del crecimiento y desarrollo. Cambios en la concentración de poliaminas durante el crecimiento celular inducido por el glicerol *in vitro*

No se detectaron diferencias en los niveles de poliaminas totales entre las muestras de *G. doryphora* recogidas en la naturaleza, y consideradas niveles de referencia, y los cultivos axénicos de esporas cultivadas en medio PES durante 1 semana. En contraste, sí se obtuvieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los niveles endógenos de poliaminas, tanto libres como conjugadas cuando se cultivaba en PES90+ 0.1M de glicerol (Tabla 24). Esta acumulación de poliaminas se correspondió morfológicamente con una intensa actividad de división celular observada en las esporas cultivadas en glicerol, y que daban lugar a la formación de las masas celulares (Figuras 21 A, B).

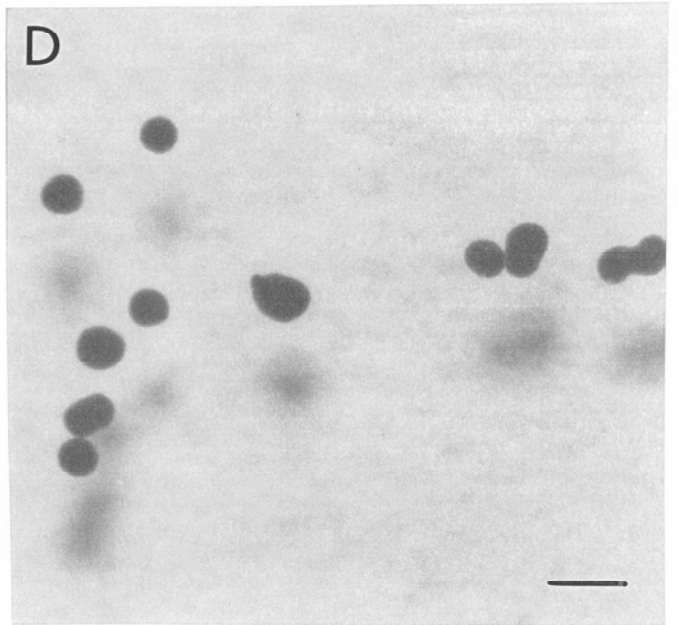
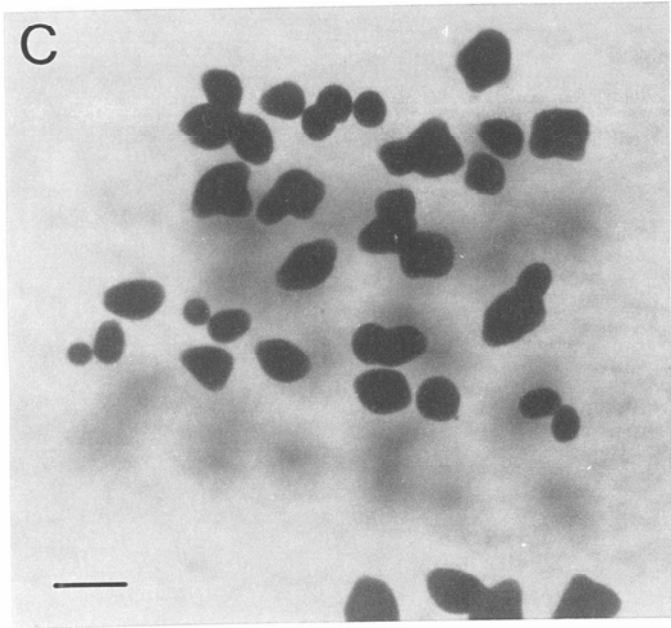
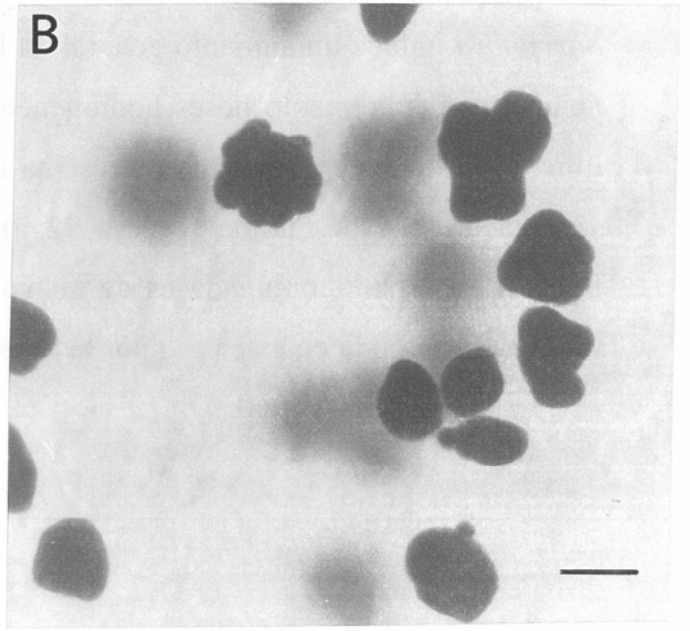
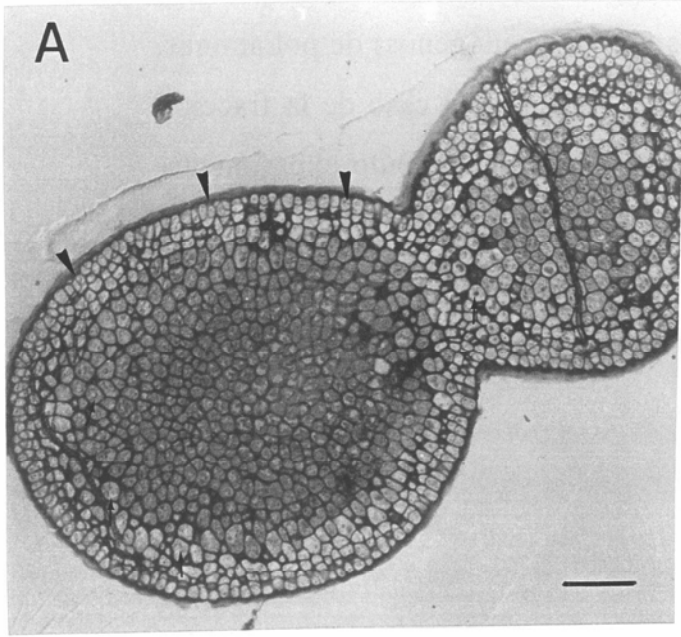
Tabla 24. Poliaminas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) en *sporelings* de *G. doryphora* cultivadas en medio con/sin glicerol (datos de 10 a 20 replicados), comparados con los resultados tomados como referencia (en Tabla 23).

Media  $\pm$  SE; ns = no significativo ( $P > 0.05$ ); \* = diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

	Talo	<i>Sporelings</i> – glicerol
Poliaminas totales	put	2247 $\pm$ 149
	spd	12.2 $\pm$ 2.6
	spm	3.5 $\pm$ 1.6
	Talo	<i>Sporelings</i> + glicerol
Poliaminas libres	put	62 $\pm$ 2
	spd	0.75 $\pm$ 0.02
	spm	0.62 $\pm$ 0.03
Poliaminas conjugadas	put	2624 $\pm$ 33
	spd	4.3 $\pm$ 0.1
	spm	5.8 $\pm$ 0.2

Figura 21. (A) Sección transversal de una masa celular. Nótese la división celular (punta de flecha) y la acumulación de almidón (flecha) generada por la actividad biosintética. (B-D) Masas celulares originadas a partir de esporas cultivadas en PES70+0.3M glicerol (B); glicerol+0.01mM DFMO (C); glicerol+0.01mM DFMO (D).

Escala de la figura A=0.02 cm; escala figuras B-D=0.3 cm.



La presencia del glicerol en el cultivo *in vitro* de las esporas de *G. doryphora* induce un aumento general en los niveles (endógenos) de poliaminas, aunque este incremento no es homogéneo entre ellas. En el caso de la fracción libre, proporcionalmente es la putrescina la que mayor incremento experimenta, seguida de la espermidina (Figura 22 a). En el análisis correspondiente a la fracción insoluble-conjugada es de nuevo la putrescina la que más incremento sufre, pero seguida en este caso por la espermina (Figura 22 b).

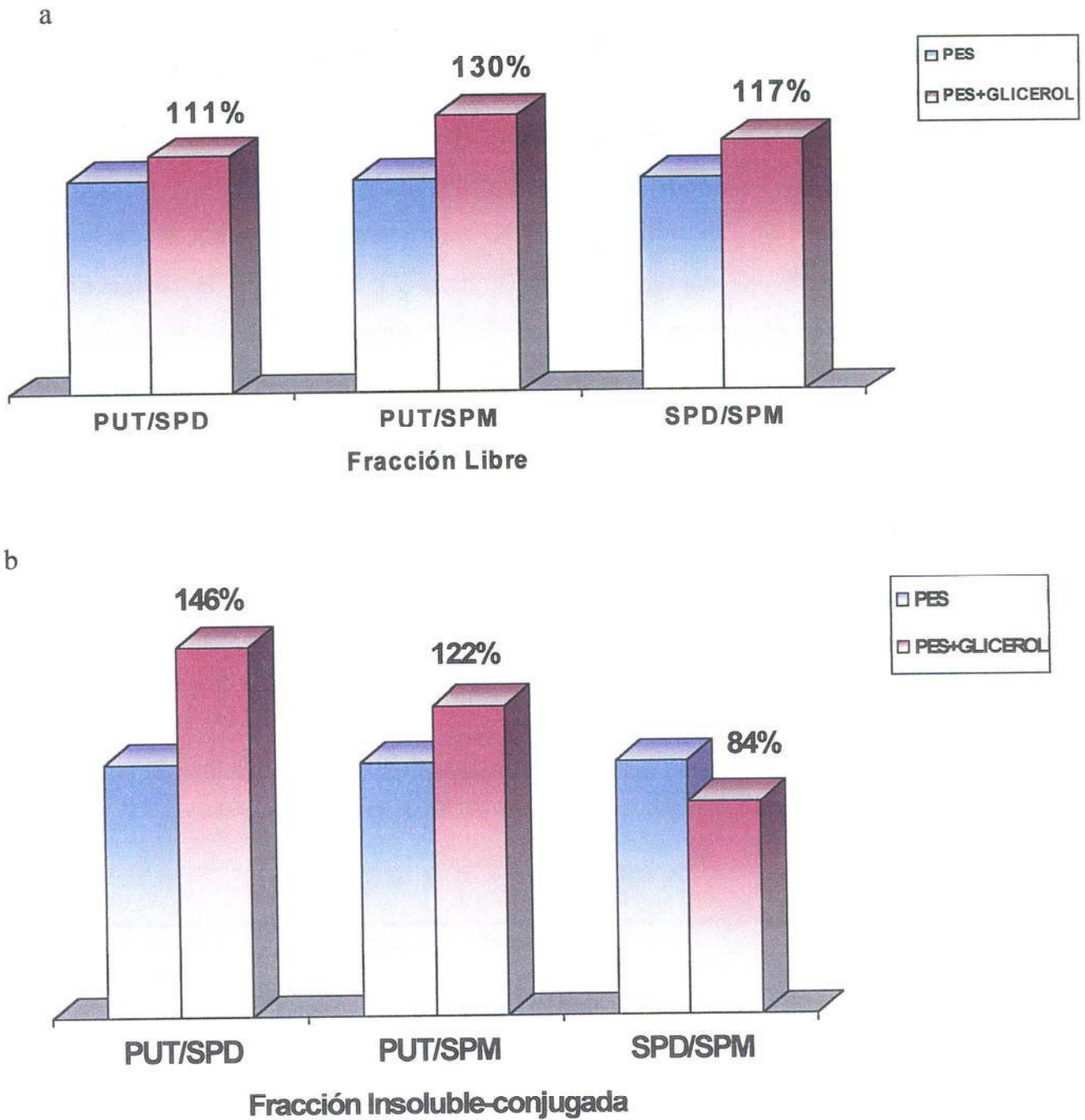


Figura 22. Proporciones relativas entre putrescina (PUT), espermidina (SPD) y espermina (SPM), en tejido de *G. doryphora* cultivado *in vitro* en presencia y ausencia de glicerol. La columna correspondiente a medio [PES+glicerol] representa el % de variación con respecto al medio [PES] (100%).

Los resultados obtenidos para las esporas cultivadas en presencia del inhibidor DFMO se muestran en la Tabla 25 y Figuras 21 C, D. Tras 20 horas de incubación en presencia de 70 kBq de glicerol radioactivo, hasta un 0.022% de la radioactividad se encontró en las bandas de putrescina, espermidina y espermina correspondientes al análisis de cromatografía en capa fina.

La adición del inhibidor DFMO causó una disminución en la tasa de crecimiento de las masas celulares (Figuras 21 B-D) y en la radioactividad acumulada en las poliaminas. En medios PES sin glicerol, el DFMO no provocó ningún efecto (resultados no presentados).

Tabla 25. Tasa específica de crecimiento y radioactividad en putrescina, espermidina y espermina después de incubar los *sporelings* de *G. doryphora* durante 20 h en 70 kBq [U-<sup>14</sup>C] glicerol (0.75 mM) ± DFMO. Los medios de cultivo fueron 0.1 M glicerol + DFMO (0.01 mM y 1 mM) y 0.1 M glicerol sin inhibidor (+ glicerol – DFMO).

Datos de crecimiento son de 3-5 réplicas. Datos de radioactividad (cpm en paréntesis) del extracto de 3 réplicas. Todas las comparaciones están como el porcentaje respecto del resultado en el medio sin inhibidor.

	+ glicerol - DFMO	+ glicerol + DFMO 0.01 mM	+ glicerol + DFMO 1 mM
Tasa específica de crecimiento (% día <sup>-1</sup> )	100 (9,2 ± 2.8)	74	2
% radioactividad en tejido como poliamina	100 (0.022)	86	72
Putrescina	100 (244)	89	67
Espermidina	100 (150)	80	80
Espermina	100 (229)	125	75

---

### Acumulación diferencial de poliaminas en la fanerógama marina *Cymodocea nodosa*

La zona apical presentó la mayor acumulación de poliaminas, tanto en la fracción libre como en la insoluble-conjugada, mientras que las raíces dieron los niveles más bajos. En la fracción libre, hasta cuatro veces más de putrescina y espermidina fue detectada en los ápices con respecto las hojas y el rizoma, y hasta ocho veces más con respecto las raíces. En el caso de la espermina, hojas y raíces mostraron valores diez veces inferior, mientras que solo 3 veces para el caso del rizoma. En el caso de las poliaminas conjugadas, el patrón de distribución fue muy similar. De nuevo la sección apical presentaba niveles diez veces superiores de poliaminas con respecto el rizoma y las raíces, pero solo hasta tres comparado a las hojas (Tabla 26).



Tabla 26. Niveles endógenos de poliaminas libres y conjugadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) en diferentes tejidos de *Cymodocea nodosa*.

Put, putrescina; Spd, espermidina; Spm, espermina. Los datos representan la media  $\pm$  SE de 4-10 réplicas.

	Libres			Conjugadas		
	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm
Hojas	35.46 $\pm$ 1	0.83 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02	1070 $\pm$ 89	2.57 $\pm$ 0.01	5.23 $\pm$ 0.5
Raíces	17.55 $\pm$ 0.7	0.36 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.03	254.6 $\pm$ 13	0.87 $\pm$ 0.01	1.24 $\pm$ 0.01
Rizoma	35.4 $\pm$ 1.8	0.72 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.11	388.5 $\pm$ 16	0.87 $\pm$ 0.1	1.36 $\pm$ 0.01
Zona apical	139.38 $\pm$ 13	2.77 $\pm$ 0.2	1.87 $\pm$ 0.1	2891 $\pm$ 55	5.69 $\pm$ 0.3	13.9 $\pm$ 0.61

En las incubaciones con putrescina, los niveles endógenos de las tres poliaminas libres aumentaron significativamente con respecto los niveles detectados en las muestras control (Tabla 27). La fracción de espermidina-libre fue la que mayor aumento experimentó, seguido de la espermina. Con respecto a las fracciones conjugadas, la putrescina fue la única que aumentó significativamente.

Cuando los rizomas plagiotrópicos se incubaron en medios con espermidina  $10^{-4}\text{M}$ , de nuevo todos los niveles endógenos de poliaminas libres aumentaron significativamente con respecto los controles, siendo la putrescina la que menor aumento experimentó. Sin embargo, las fracciones conjugadas, tanto solubles como insolubles, no sufrieron cambios significativos en estas condiciones.

Los mayores niveles de putrescina libre de todo el experimento se detectaron en aquellas incubaciones correspondientes a espermina  $10^{-4}$ M. Y aunque los niveles endógenos de espermidina, y espermina también aumentaron de manera significativa, lo hicieron en menor medida que en anteriores incubaciones. Con respecto a la fracción soluble-conjugada, los niveles endógenos se doblaron para las tres poliaminas. Pero lo más notable ocurrió para la fracción insoluble-conjugada, donde los niveles de espermidina y espermina aumentaron hasta 13 veces con respecto los niveles control, mientras que la putrescina apenas se dobló.

Tabla 27. Poliaminas libres y conjugadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) en explantos apicales de *Cymodocea nodosa* tras haberlos incubado en putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) a una concentración final de  $10^{-4}\text{M}$  durante 1 hora.

No detectadas = nd. \* = significativamente diferente respecto del control ( $p \leq 0.05$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SE de 4-10 réplicas.

Incubación a $10^{-4}\text{M}$ en:	Libres			Solubles-conjugadas			Insolubles-conjugadas		
	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm	Put	Spd	Spm
Put	244.6* $\pm$ 16.3	3.4* $\pm$ 0.2	1.73* $\pm$ 0.11	1899* $\pm$ 76.4	5.26 $\pm$ 0.3	4.15 $\pm$ 0.9	363.4* $\pm$ 11.4	0.62 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.02
Spd	192.6* $\pm$ 16	2.52* $\pm$ 0.2	1.42* $\pm$ 0.12	976 $\pm$ 53	7.35 $\pm$ 0.4	nd	159.2 $\pm$ 6	0.39 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.03
Spm	327.6* $\pm$ 18.2	3.55* $\pm$ 0.2	1.61* $\pm$ 0.09	1612* $\pm$ 186	12.98* $\pm$ 0.4	11.23* $\pm$ 2	350.2* $\pm$ 8.3	6.19* $\pm$ 2	9.24* $\pm$ 1.7
Control	151.2 $\pm$ 10.8	0.95 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.09	622.6 $\pm$ 1.6	6.01 $\pm$ 0.4	5.41 $\pm$ 0.1	199.4 $\pm$ 10	0.47 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.07

## **DISCUSIÓN**



## IV. DISCUSIÓN

### Análisis de los solutos compatibles

El análisis de los solutos compatibles (floridósido y glicerol) dio resultados muy satisfactorios, aunque para el caso particular del floridósido, su cuantificación hubo de realizarse de manera indirecta. Diversos autores ya han realizado la cuantificación del floridósido a partir de métodos indirectos, siendo el más popular de ellos la ruptura enzimática de la molécula a partir de la  $\alpha$ -galactosidasa (Wiencke & Läubli, 1981; Ekman *et al.*, 1991), para posteriormente cuantificar el contenido en glicerol por diferentes métodos. Más adelante, la posibilidad de adquirir estándares puros de esta sustancia permitió realizar su cuantificación de una manera directa (Karsten *et al.*, 1991).

En nuestro caso, la imposibilidad de adquirir un estándar puro de floridósido, nos obligó a realizar una hidrólisis ácida previa para liberar sus componentes moleculares (glicerol y galactosa). El pico más significativo que aparecía en las muestras control de *G. doryphora* se suponía fuera el floridósido (Figura 5). La desaparición de éste tras la hidrólisis ácida coincidió con un aumento del área correspondiente a los LMWS de entre 10-14 veces, y con la aparición del glicerol. Estos cambios solo podían deberse a la ruptura de los componentes de la molécula del floridósido. De esta manera, la cuantificación del floridósido se realizó a través de la expresión del glicerol (Tabla 9), pues en caso de hacerlo a través de la galactosa, se estaría sobreestimando el contenido en heterósido debido a que la hidrólisis libera moléculas de galactosa de origen (oligo)polisacárido (Kirst, 1980a). Recientemente, el desarrollo de técnicas de resonancia magnética nuclear ha permitido al cuantificación directa y fiable de este compuesto sin la necesidad de disponer de ningún tipo de estándar (Broberg *et al.*, 1998; Karsten, 1999), pero la hidrólisis ácida del floridósido y compuestos similares como el digeneasido, y su posterior análisis por cromatografía HPLC

continúa siendo una técnica rápida y económica, que tampoco requiere la utilización de estándares (internos o externos).

Sin embargo, la correcta identificación de los 5 monosacáridos potencialmente presentes en algas no fue posible debido a que la resolución de los picos cromatográficos, correspondientes a cada uno de ellos, no fue tan buena como para que el programa de integración automática de picos (VARIAN<sup>®</sup> *software*) pudiera discriminar entre un monosacárido u otro. Esto era debido a que la base de los picos era demasiado ancha, y por lo tanto unos se solapaban con otros. La duración de la ventana de elución de estos azúcares en el método propuesto en este estudio coincide con la detallada en el folleto técnico correspondiente a la columna usada (*Shodex Test Chromatogram* para la columna *Sugar KS-801*), por lo que esta baja resolución es debida a las impurezas presentes en la muestra vegetal. Karsten y colaboradores (1991), proponen la instalación de una pre-columna para retirar parte de estas sustancias, aunque siguen reconociendo la ausencia de resolución para ciertos compuestos, principalmente debido a la degradación, propia del proceso de extracción, de sustancias de alto peso molecular. Estos compuestos como el agar o el almidón, son los primeros en aparecer en el cromatograma, y su presencia es especialmente alta en aquellas muestras donde la solución extractora no incluía etanol, como es nuestro caso.

Por lo tanto, la técnica HPLC usada en este estudio para la identificación y cuantificación de osmolitos tales como el glicerol y el floridósido presentes en algas marinas, se mostró como una herramienta rápida y sencilla, más ventajosa que otras descritas para la cuantificación de estas sustancias, donde se deben realizar diferentes extracciones y reacciones durante periodos que a veces alcanzan incluso las 72 h (Kirst, 1980a; Reed, 1985; Meng & Srivastava, 1993). Sin embargo, el tiempo total de análisis empleado en este estudio, desde que comienza el proceso de extracción y hasta que se inyecta la muestra en el HPLC, nunca superó las 6 horas y media, usando únicamente agua bidestilada y resina

de intercambio iónico como elementos involucrados en el proceso analítico (Karsten *et al.*, 1991).

Los ensayos preliminares acerca de la presencia de osmolitos y azúcares de bajo peso molecular en algas del litoral grancanario mostraron que, como era de esperar, solo las especies de algas rojas acumulaban floridósido. Este heterósido, característico de las Rhodophyta, supuso aproximadamente un 1% del peso seco en las especies estudiadas, aunque este porcentaje puede oscilar entre diferentes especies sobretodo porque depende de numerosos factores ambientales (Kirst, 1980a). En este sentido, para *Gracilaria sordida*, Ekman y colaboradores (1991) establecen el contenido de floridósido entorno a 50  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco, que contrasta con los 450  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco registrados por Glazer y colaboradores (1994), para *Compsopogon coeruleus*, una especie de Rhodophyta de agua dulce, cuando es cultivada en agua de mar. Recientemente, en un estudio que incluía a 25 especies de Bangioficeas (Rhodophyta) cultivadas en condiciones homogéneas de luz (30  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura (23°C) y salinidad (36‰), Karsten y colaboradores (1999) observan una oscilación desde los 8  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco de *Stylonema cornu-cervi*, hasta los 723  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco de *Bangia atropurpurea*.

Respecto a los monosacáridos libres (no fosforilados), solo se pudo cuantificar el contenido en aquellas especies donde no se encontrara al manitol como osmolito, como fue el caso de las 4 especies de algas pardas aquí analizadas.

Como se justificó anteriormente, fue imposible llegar a una correcta resolución de las sustancias que componen este conjunto. Por este motivo, y dado que los análisis resultaron de medidas puntuales resulta complicado interpretar los resultados obtenidos. Los monosacáridos potencialmente reconocidos en este análisis, tienen papeles muy específicos en el metabolismo



del general del carbono, principalmente en su forma activa (glucosa-6-fosfato, manosa-fosfato, fructosa-1,6-difosfato, UDP-galactosa, etc.) y no detectada por la columna HPLC utilizada en este estudio (resultados no mostrados).

Para las 7 especies de macroalgas estudiadas, el resultado más importante obtenido, en las primeras incubaciones en medios con glicerol 0.3M, está relacionada con el hecho de que en todas ellas se detectó la presencia de glicerol en el interior del talo. Esta propiedad tiene una aplicación biotecnológica inmediata siempre y cuando el alga sea capaz de incorporar esta molécula a su metabolismo, pues el glicerol es una molécula que interviene en multitud de procesos metabólicos, además de resultar una fuente útil de energía para el crecimiento. Para que esto pueda ocurrir, el glicerol debe estar en el interior celular, y en este caso, esta posibilidad no la hemos podido probar, pues nuestro método no discriminaba entre el glicerol intracelular y el intercelular, éste último ocupando el espacio intersticial. Sin embargo, en experimentos anteriores realizados con *G. doryphora*, se ha demostrado que el glicerol exógeno dispuesto en cultivo (0.3M) si era metabolizado, promoviendo una elevada tasa respiratoria, inhibiendo la fotosíntesis, y aumentando el crecimiento celular (Robaina *et al.*, 1995). Estos efectos del glicerol sobre *G. doryphora* solo pueden deberse a su metabolización tras su incorporación al interior celular. Por lo tanto, y aunque aún no se ha descrito un mecanismo de transporte específico para esta molécula (como se discutirá más adelante), *a priori* se sabe que presenta una fácil difusión a través de la membrana celular. En esta línea, nuestros experimentos mostraron que la entrada de glicerol en *G. doryphora* parece ser más compleja que una simple difusión.

Una vez en el interior celular, el glicerol se debe acoplar a las rutas metabólicas establecidas, pero en este sentido el glicerol parece ser una molécula metabólicamente activa ya que ha sido reconocida como una fuente de carbono efectiva en el cultivo de otras especies algales. Fries (1973) reconoció la

efectividad del glicerol como fuente de carbono en numerosas algas rojas, y más tarde, Saga y colaboradores (1982), y de nuevo Fries (1984) reconocen que para que una fuente de carbono sea efectiva en un alga, debe ser posible su acumulación en el interior celular. Es, por lo tanto, muy significativo que las algas aquí estudiadas sean capaces de almacenar grandes cantidades de esta molécula en su interior, ya que permitiría que en un futuro se pudiera hacer crecer estas especies en medios suplementados con glicerol como fuente de carbono.

Para que esta molécula quede retenida en el interior celular ha de ser rápidamente fosforilada a través de la enzima glicerolquinasa, que incorpora un grupo fosfato en el tercer carbono de la molécula (De Koning *et al.*, 1987). A partir de este momento, el glicerol-3-fosfato (glicerol-3P) puede verse involucrado en multitud de eventos metabólicos tales como la síntesis de almidón, de agar, de carbohidratos de bajo peso molecular, o de las diferentes fracciones lipídicas. La síntesis natural del glicerol-3P está relacionada con la actividad fotosintética de tal manera que la triosa-fosfato sintetizada en el cloroplasto es transformada en glicerol-3P a través de la gliceril-fosfodeshidrogenasa. Así que la entrada del glicerol exógeno al interior celular, aquí registrada, debería afectar de alguna manera a la actividad fotosintética. Sobre esta hipótesis Robaina y colaboradores (1995) encontraron que cuando *G. doryphora* era cultivada en condiciones mixotróficas, la tasa fotosintética disminuía mientras que la respiratoria se incrementaba. En esta misma línea, Lewitus y colaboradores (1991) identifican importantes cambios estructurales en el aparato fotosintético de *Pyrenomonas salina* cuando es cultivada con glicerol como fuente orgánica de carbono.

La entrada del glicerol exógeno al interior celular se estudió para el caso particular de *G. doryphora* bajo condiciones variables de luz, de concentración de nutrientes y glicerol. Los resultados mostraron un claro efecto regulador de la intensidad de luz, junto con la concentración de glicerol dispuesta en el medio de

cultivo (Tabla 15). El primer resultado (efecto regulador de la luz) es mucho más interesante que el segundo, pues cabe esperar una alta correlación positiva entre el glicerol dispuesto en el medio con el encontrado en el interior celular, más aún teniendo en cuenta la aparente facilidad para penetrar en el interior de los talos de todas las especies anteriormente estudiadas. Este efecto regulador de la luz está en el camino de la existencia de un transporte más complejo que una mera difusión pasiva.

Que se necesite luz, redundaba en la idea sobre que la entrada del glicerol al interior pudiera no ser una simple difusión. Un posible efecto de la luz sobre la utilización del glicerol ya fue reconocido en este laboratorio para *G. doryphora* por Robaina y colaboradores (1990a,b). Estos autores establecían la necesidad de la luz para que el alga pudiera crecer utilizando esta fuente de energía alternativa a la fotosíntesis. Este papel relevante de la luz en el flujo de carbono celular ya fue descrito por Macler (1986), aunque en este caso, el estudio no implicaba ninguna fuente exógena de carbono orgánico. Los resultados obtenidos en la Tabla 15 justifican un efecto regulador de la luz en la entrada de glicerol. Este efecto es notable en incubaciones a largo plazo, pues en el plazo de 2 horas no se detectaron diferencias entre el tratamiento en luz ( $90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), y el de oscuridad. Este efecto regulador de la luz a largo plazo en la entrada (*uptake*) de una fuente orgánica de carbono también fue constatado por Pettit & Harwood (1989), cuando detectaron un efecto de la iluminación a partir de las 8 horas en incubaciones de *Chondrus crispus*, y de *Polysiphonia lanosa*, usando acetato como fuente de carbono.

El análisis estadístico, a partir del diseño experimental de Box-Behnken, parece ajustarse a los resultados expuestos anteriormente por otros autores. El modelo propuesto acerca de la variación de la concentración interna de glicerol (Figura 9) justifica un muy alto porcentaje de la variancia observada en los datos experimentales, un 86.7%. García Sánchez y colaboradores (1994), trabajando en modelos no lineales derivados del mismo diseño experimental aquí empleado,

pero con variables tales como la tasa de crecimiento de un cultivo microalgal, o la concentración interna de ciertos ácidos grasos en algas unicelulares, obtienen porcentajes muy similares. Según estos autores, los coeficientes de determinación para los distintos modelos propuestos oscilaban entre 73.5-93.3%.

Las incubaciones de *G. doryphora* en presencia de glicerol 0.3M dan un contenido intracelular de aproximadamente el 0.015% del peso seco (Tabla 13). Kremer & Kirst (1981), en un estudio realizado sobre 7 especies de Rhodophyta determinan que en incubaciones con bicarbonato como fuente de carbono, el contenido en glicerol nunca fue superior al 0.05% del peso seco.

El hecho que la Figura 9 no muestre un máximo en el rango ensayado para la intensidad de luz y la concentración de glicerol nos hizo pensar que aún se podía llegar más lejos en la capacidad de acumulación del alga. La superficie de respuesta para la concentración de glicerol interno predice que la capacidad de acumulación de *G. doryphora* es muy superior a la detectada, pudiendo llegar a ser hasta el 0.15% del peso seco, siempre dentro del rango ensayado para las variables, pues fuera de él cabe la posibilidad de darse efectos no controlados. En este sentido, en la Figura 9, si consideramos concentraciones de glicerol externo ya ensayadas en cultivo para *G. doryphora*, donde se han registrados efectos significativos sobre el crecimiento y desarrollo (0.2-0.3M), el modelo predice un crecimiento constante e ilimitado en la concentración interna a medida que se incrementa la irradiancia, pero intuitivamente este resultado no parece lógico, por lo que fuera de estos límites cabe esperar la existencia de algún tipo de regulador, a nivel celular y dependiente de la concentración, que controle el transporte del glicerol hacia el interior, en concordancia con lo expuesto anteriormente acerca de un tipo de transporte para el glicerol diferente y más complejo que la difusión simple. Aún así, esta propiedad del alga para acumular glicerol en tan elevada concentración es muy importante si, como se comentó anteriormente, el alga es capaz de utilizar esta reserva energética como precursora de numerosos productos finales derivados de los procesos

metabólicos que implican al glicerol. En este sentido, este resultado está de acuerdo con la elevada actividad biosintética detectada en carposporas de *G. doryphora* cuando son cultivadas *in vitro* a concentraciones de glicerol similares a las aquí ensayadas (García-Jiménez *et al.*, 1996). En la misma línea, otros autores han encontrado que, en ciertas algas rojas unicelulares cuando son cultivadas en medios con fuentes orgánicas de carbono, existe una reorientación del metabolismo del carbono hacia la producción de compuestos de elevado peso molecular (Cheng & Antia, 1970; Antia *et al.*, 1973, 1979).

Los cambios en las condiciones de cultivo anteriormente descritas ciertamente afectaron a la variación de floridósido en *G. doryphora*. Esta variación pudo ser explicada hasta en un 70.1% de la variancia. El análisis estadístico reveló que los tres factores considerados estaban contribuyendo significativamente a la explicación de la variancia para este soluto compatible. Sin embargo, el modelo no lineal propuesto por el análisis estadístico no fue fiable, dado que los términos de interacción no resultaron significativos. Es decir, que no es posible predecir la tendencia del floridósido a partir de una ecuación polinómica. Este hecho nos impide realizar una evaluación acerca de la tendencia de este heterósido en función de los factores propuestos. Aún así, el diseño experimental de Box-Behnken y sus posterior análisis, resultó un método válido para identificar aquellos factores que más afectan a las variaciones de floridósido en *G. doryphora* bajo condiciones de cultivo controladas, permitiéndonos plantear nuevos experimentos en la dirección adecuada para estudiar el comportamiento de este osmolito en condiciones de cultivo más restrictivas.

Para algas rojas, el floridósido está reconocido como el principal fotosintetato (Kremer & Kirst, 1981; Reed, 1985; Barrow *et al.*, 1995), es decir, como el principal producto derivado del proceso fotosintético, actividad bioquímica dependiente en gran medida de las condiciones de luz. Nuestros

resultados están, por lo tanto, en absoluta concordancia con la bibliografía, identificando a la luz como uno de los principales agentes responsable de los cambios en la concentración de floridósido. Además, es significativo que el ANOVA realizado considere relevante el efecto no lineal de la luz (Tabla 15), pues indica una interacción compleja entre estas variables, donde quizás intervengan más factores de forma indirecta. En este sentido, más adelante se plantea la posibilidad de un efecto conjunto entre la luz, la concentración de iones (el  $K^+$  especialmente), y la concentración de floridósido.

El factor estadísticamente más significativo resulta ser la concentración de glicerol externa (Figura 8B). Este resultado está potenciado por aquel descrito por Kremer & Kirst (1981), cuando en experimentos de incubación con  $H^{14}CO_3^-$  en diferentes especies de Rhodophyta identifican al glicerol, junto a la galactosa, y el floridósido-fosfato, como uno de los precursores directos en la biosíntesis del floridósido. Por otro lado, el hecho que sea este factor el que más peso estadístico tenga puede ser debido a más de una razón (la de precursor es la primera). Si tenemos en cuenta que en los experimentos asociados al diseño experimental de Box-Behnken, la concentración de glicerol en el medio de cultivo resulta tener una perfecta correlación con la salinidad (condición indispensable para mantener la osmolalidad constante para las diferentes concentraciones de glicerol ensayadas, es decir, que la salinidad es una covariable de la concentración interna, Tabla 5), parte de la variación observada en la concentración interna de glicerol puede deberse a los cambios en la concentración de sales. Este efecto de la concentración iónica extracelular sobre el glicerol intracelular ya fue descrito por Ben-Amotz & Grunwald (1981) para la microalga *Asteromonas gracilis*, donde determinan que existe una relación lineal entre el glicerol intracelular y la concentración salina externa. De esta manera, es lógico que el índice de significación estadística sea  $p \leq 0.01$ , ya que posiblemente está reflejando el efecto de dos factores sobre la variable en particular.

En último lugar, el análisis de la variancia también considera significativo el efecto de la concentración de nutrientes sobre el contenido en floridósido (efecto no lineal). Diversos autores han relacionado el papel del metabolismo del nitrógeno con el flujo de carbono en algas. Vanlerberghe y colaboradores (1990) describen como hasta un 50% del metabolismo del carbono celular para la Chlorophyta *Selenastrum minutum* está acoplado al del nitrógeno. Turpin y colaboradores (1988), también para *S. minutum*, afirman que existen importantes interacciones entre la asimilación del nitrógeno y el metabolismo fotosintético. La consecuencia más obvia de una deficiencia en nitrógeno es la disminución en pigmentos fotosintéticos nitrogenados, tales como las clorofilas y las ficobilinas (Macler, 1986; Falkowski *et al.*, 1989; Herzig & Falkowski, 1989; Plumley & Schmidt, 1989), que por lo tanto se corresponde con una significativa limitación en la actividad fotosintética. Más aún, Macler (1986), relaciona directamente una deficiencia en nitrógeno con la inhibición de la biosíntesis de floridósido en el alga roja *Gelidium coulteri*, al tiempo que aumenta la correspondiente a agar y a almidón de floridéas. Por lo tanto, establece que la biosíntesis de estas moléculas es competitiva, ya que todas ellas requieren de las mismas bases azucaradas, identificando al nitrógeno el agente regulador.

Aunque en nuestros análisis no contemplamos las fracciones de agar o almidón de floridéas, nuestros resultados mostraron que a medida que la intensidad de luz era mayor, una menor concentración de nutrientes afectaba negativamente (hasta un 30%) a la acumulación de floridósido (resultados no mostrados), resaltando esta necesidad del nitrógeno para mantener el buen funcionamiento del aparato fotosintético. En este sentido, y aunque la fiabilidad estadística de este resultado no era toda la esperada (de ahí que no hayan sido mostrados), nuestros resultados están en la línea expuesta por los autores anteriormente citados.

Por lo tanto, y dado que el comportamiento del floridósido en estos experimentos parece más de ajuste osmótico que de metabolismo, y que su interacción con el glicerol exógeno se relaciona de alguna manera con cambios en la concentración iónica, a partir de un nuevo experimento se trató de discriminar aquella variable a la cual el floridósido respondiera de una manera más crítica: la concentración de glicerol, la presión osmótica, o la concentración iónica.

La regulación osmótica de las algas está regulada mediante la biosíntesis fotosintética, y la degradación por vía respiratoria o de cualquier otro tipo, del floridósido. En esta regulación también participan ciertos iones presentes en el agua de mar, asumiendo un papel más rápido en el ajuste que desembocaría en otro, más lento, dependiente de los solutos compatibles. Kauss (1968, 1969) estudió la biosíntesis de floridósido en la Rhodophyta *Porphyra perforata*, y mostró que su comportamiento estaba linealmente relacionado con la variación en la salinidad en el medio. Estos resultados enfatizaron la importancia de esta molécula en el balance osmótico de las macroalgas. Por otro lado, Reed y colaboradores (1980) obtuvieron similares resultados para *Porphyra perforata* en incubaciones de 24-48 h de duración, destacando que la respuesta a estos cambios era prácticamente igual en condiciones de luz o de oscuridad.

Estos resultados coinciden con los obtenidos para *G. doryphora* (Tabla 16) en las incubaciones con diferentes concentraciones de glicerol a osmolalidad constante, en condiciones de luz y oscuridad. Por lo tanto, en condiciones de presión osmótica constante pero variables en cuanto a la concentración iónica, el floridósido mostraba un comportamiento lineal con pendiente negativa e independiente de las condiciones de iluminación. En esta ocasión, que las diferencias debido a la ausencia / presencia de luz no sean tan apreciables en la acumulación del floridósido puede deberse a que: primero, el periodo de incubación es 12 veces más corto (2 horas vs. 24 horas), con lo cual la capacidad



de respuesta del alga no es la misma; segundo, el análisis anterior incluía 3 factores de variación (luz, glicerol, y nutrientes), mientras que en esta ocasión solo la luz y el glicerol fueron considerados en el ensayo y en unos niveles de variación muy diferentes; y tercero y quizás la más importante, en condiciones de oscuridad la biosíntesis de estos solutos compatibles se realiza a partir de los productos de reserva (Kirst, 1975,1980b; Belmans & Van Laere, 1987; Ginzburg, 1987), aunque su movilización no es tan rápida como a partir de la fotosíntesis (Kirst, 1989). Con respecto a este último punto, nuestros resultados muestran este tipo de respuesta metabólica diferencial, pues en el caso de aquellas incubaciones iluminadas y para una concentración de 0.3M de glicerol (la más elevada ensayada según el diseño de Box-Behnken), la concentración de floridósido apenas había variado un 25%, mientras que para aquellas en oscuridad la variación observada era ya cercana al 50% respecto de la cantidad inicial.

En esta misma línea, Reed y colaboradores (1980) aseguran que esta disminución en el contenido de floridósido en medios con salinidad cambiante puede también deberse a un cambio en el balance metabólico entre la fotosíntesis y la respiración, pues se han registrado disminuciones en la actividad fotosintética por aumentos en la respiratoria para varios macrófitos marinos en condiciones de hiposalinidad (Munda & Kremer, 1977; Macler, 1988). Este tipo de respuesta puede estar dirigido hacia la reducción de la presión osmótica intracelular con el fin de evitar la lisis de la célula si la salinidad (presión osmótica) continúa disminuyendo.

Sin embargo, cuando la concentración iónica del medio se mantuvo constante no se observaron variaciones en el contenido en floridósido (Tabla 17). Este resultado nos induce a pensar que es la concentración iónica el factor más determinante en el control de la concentración de floridósido, particularmente el efecto del  $K^+$  (la concentración de  $K^+$  ensayada en las incubaciones se corresponde con la existente en el citosol, comprendida entre 80-200 mM), pues

la respuesta del floridósido es significativamente mayor para este ión frente al  $\text{Na}^+$ . Nuestros resultados indican que esa adición de  $\text{K}^+$ , hasta concentraciones no restrictivas, reestablece los contenidos de floridósido hasta el nivel referenciado para las muestras incubadas en agua de mar. Por lo tanto, es el ión  $\text{K}^+$  el que provoca el ajuste osmótico y al cual responde el floridósido, y no al componente osmótico de la salinidad. En este sentido, Shabala y colaboradores (2000) identificaron en células de *Vicia faba* un cierto tipo de canales a nivel de membrana y específicos para el  $\text{K}^+$  (canales KIR), con propiedades mecánico-sensitivas que actúan como receptores primarios del estrés osmótico.

Nuestros resultados contrastan con Reed y colaboradores (1980). Estos autores afirman que no existe un mecanismo vía la concentración de iones específicos que controle la respuesta del floridósido. No obstante, Reed y colaboradores (1980), al estudiar el efecto de iones específicos por separado ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), simplemente modifican la concentración del ion en cuestión conservando el resto de las características del medio de cultivo base (ASP 12S, agua de mar artificial). Es decir, que en el caso del  $\text{K}^+$ , varía su concentración pero conservan las concentraciones del resto de los iones ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , etc.) del agua de mar. Es por este motivo que la elevada concentración de  $\text{NaCl}$  respecto al del  $\text{KCl}$  (más de 20 veces superior en el agua de mar) enmascara el posible rol individual de cada ion.

El  $\text{K}^+$  es un macronutriente esencial para los vegetales marinos, y quizás por ello, de los más conocidos. Su participación en la regulación osmótica ha sido descrita por Mostaert y colaboradores (1996), cuando identifican al  $\text{K}^+$ , junto al  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , como agentes reguladores a nivel de vacuola-citosol en el balance osmótico del alga Rhodophyta *Caloglossa leprieurii*. El aumento en  $\text{K}^+$ , detectado en la Chlorophyta *Chlorococcum submarinum* sometida a un aumento significativo de la concentración de  $\text{NaCl}$ , es paralelo al de prolina y glicerol, mientras que en shock hipoosmótico, el glicerol es rápidamente eliminado sin ocurrir lo mismo para el  $\text{K}^+$  (Blackwell & Gilmour, 1991). Así mismo, el glicerol

intracelular en *Dunaliella bioculata* responde positivamente a los cambios de osmolalidad producidos por variaciones en las concentraciones de NaCl, KCl, o sacarosa (Ahmed & Zidan, 1987).

El potasio también está relacionado con procesos fisiológicos como i) la liberación de gametos. Así, Pearson & Brawley (1998) describen como la presencia del ion tetraetilamonio, un agente bloqueador de los canales del K<sup>+</sup>, afecta negativamente hasta en un 50% al efecto inductor de la luz sobre la liberación de gametos en la Phaeophyta *Pelvetia compressa*; y ii) la fijación del nitrógeno en microalgas. Ping y colaboradores (1998) asocian una fuerte inhibición en la actividad fijadora del nitrógeno en cultivos de *Anabaena cylindrica* en presencia de altas concentraciones de KCl (0.1-0.05M).

En la microalga verde *Chlorococcum submarinum* y a corto plazo, la disminución en la salinidad conlleva un aumento del 30% de la tasa respiratoria por una disminución del 16% de la fotosíntesis, pero este efecto desaparece al cabo de las 2 horas (Blackwell & Gilmour, 1991).

El resultado más interesante de estas experiencias sobre la entrada de glicerol al medio intracelular es que, a bajas concentraciones de glicerol extracelular (0-0.25M), la entrada al interior podría seguir un comportamiento lineal según un modelo de difusión simple, pero a medida que el medio se carga en glicerol, existe un efecto de saturación. Es decir, parece haber un comportamiento bifásico en relación al contenido de glicerol interno. En la bibliografía consultada no se pudo encontrar ninguna referencia acerca de la presencia de un transportador para el glicerol, pero nuestros resultados indican que existe un control por parte del alga para la entrada de glicerol. El análisis estadístico realizado, mostró además claramente que la relación entre la concentración de glicerol externo e interno estaba afectada por la luz, identificándose incluso una interacción entre la luz y la concentración externa de esta fuente de carbono.

Con respecto a la concentración de iones, de nuevo el glicerol presenta un comportamiento característico, pero exclusivamente en presencia de  $K^+$ . A partir de concentraciones exógenas entorno a 0.25M de glicerol, éste entra abundantemente al interior, no ocurriendo así a menores concentraciones. Es decir, parece que el paso de glicerol al interior respondiera según un modelo de transporte bifásico relacionado con el  $K^+$ .

Por lo tanto, hemos reconocido dos factores que están relacionados con el paso del glicerol al interior celular, no correspondiéndose esta observación con un modelo de difusión simple, si no que se propone un comportamiento bifásico que responde a la concentración externa de esta fuente de carbono. En caso de existir un transportador y, dada la capacidad de ciertas algas para metabolizar el glicerol, sería posible, mediante técnicas de genética molecular, transferirlo a especies que pudieran aprovechar el potencial biotecnológico del glicerol como fuente de carbono.

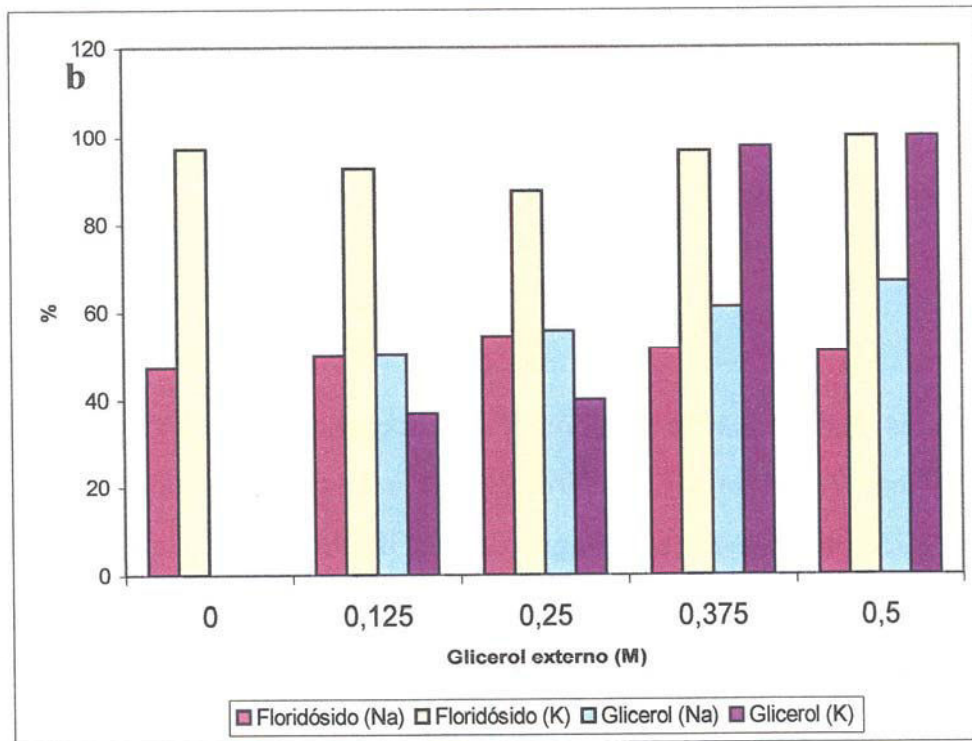
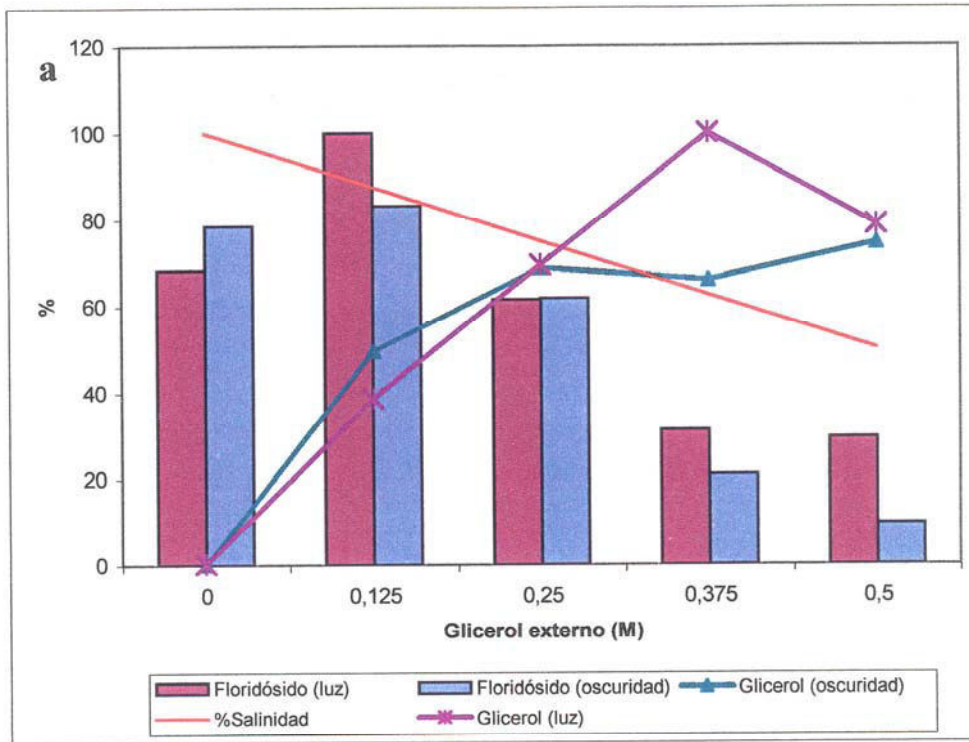
La reestructuración de los datos expuestos en la Tablas 16 y 17, nos permite evaluar la respuesta de los osmolitos glicerol y floridósido en *G. doryphora* de una forma más completa, y para condiciones de salinidad y concentración iónica diferentes (Figura 23). Esta figura muestra que habiendo una alta correlación negativa entre la disminución del floridósido y la entrada de glicerol exógeno, en ningún momento se está derivando este glicerol hacia la biosíntesis del heterósido (aún habiéndose descrito al glicerol como un precursor de la biosíntesis del floridósido), si no que los cambios detectados en la concentración interna del heterósido se deben a la modificación de las condiciones salinas del medio, mientras que el glicerol debe ser mayoritariamente respirado, de acuerdo con lo descrito en este laboratorio para *G. doryphora* en similares condiciones de cultivo (Robaina *et al.*, 1995). Por otro lado, el floridósido no responde al componente osmótico de la salinidad, sino a los cambios en las concentraciones iónicas del medio, preferentemente al  $K^+$

frente al  $\text{Na}^+$ , siendo este ion la señal que dispara la regulación biosintética del floridósido. Por último, en el aparente comportamiento bifásico de la entrada de glicerol al interior intervienen de manera contundente la luz (*G. doryphora* no es capaz de crecer en condiciones de oscuridad en presencia de concentraciones de hasta 0.3M de glicerol, mientras que si lo hace en luz; Robaina *et al.*, 1995), y el  $\text{K}^+$ , pues la entrada masiva de glicerol detectada a partir de 0.3M de concentración externa no es registrada para concentraciones equivalentes de  $\text{Na}^+$  (incluso de ensayaron concentraciones de 180mM de  $\text{Na}^+$  con idénticos resultados; resultados no mostrados). Esta adaptación metabólica parece estar inducida tanto por las condiciones osmóticas, como por la concentración iónica, la intensidad de luz, etc., y no solo por la presencia del  $\text{K}^+$ , pues Vona y colaboradores (1992) no detectaron desajustes en el balance fotosíntesis/respiración debidos a la presencia del ion  $\text{K}^+$ .

Por lo tanto, y solo para las condiciones anteriormente descritas (elevada concentración de glicerol exógeno, luz, y medio enriquecido en  $\text{K}^+$ ), *G. doryphora* es capaz de asimilar y metabolizar el glicerol como fuente de carbono efectiva para su crecimiento y desarrollo, demostrándose que no basta con poner una fuente de carbono en el medio para que el alga adquiriera un comportamiento mixotrófico, si no que deben controlarse las condiciones de cultivo para que se mantengan unos niveles bajos y estables de floridósido (evitando la derivación del glicerol hacia este heterósido), y se favorezca la respiración del glicerol.

Figura 23. Contenidos endógenos de floridósido y glicerol (% respecto del valor máximo alcanzado en cada serie) en *Grateloupia doryphora* para diferentes concentraciones de glicerol exógeno (a) en agua de mar diluida para tratamientos de luz y oscuridad (100% floridósido=49.7  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco; 100% glicerol=2388.2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco) y, (b) en medios de agua destilada conteniendo  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (140 mM) en luz (100% floridósido=47.2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco; 100% glicerol=790.3  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco).

Osmolalidad = 1 Osmol  $\text{Kg}^{-1}$  ajustada con manitol; Luz = 90  $\mu\text{mol fotón m}^2 \text{s}^{-1}$ ; Tiempo de incubación 2 horas.



## Acumulación de ácidos grasos

El nivel de grasa registrado en *Grateloupia doryphora* se encuentra en el rango observado para la mayoría de las Rhodophyta de las costas atlánticas. Fleurence y colaboradores (1994) registraron unos niveles de ácidos grasos (FAs) para 4 especies de algas rojas de las costas de Bretaña de entre 0.1-1.4% del peso seco.

El contenido total en FAs en el alga roja *G. doryphora* se situó entorno al 1% del peso seco tanto para las muestras recogidas en la naturaleza, como tras el periodo de aclimatación. Este resultado es algo mayor que el obtenido por Ivanova y colaboradores (1999), para esta misma especie, donde en un estudio acerca del efecto del glicerol sobre el contenido en FAs obtubieron un contenido de 0.6% en peso seco en la muestras control, y de 0.9% tras 5 días de aclimatación en agua de mar enriquecida. Teniendo en cuenta que los especímenes recolectados en ambos casos procedían de la misma población, las oscilaciones en el contenido total de FAs se deberán fundamentalmente a la variación en las condiciones ambientales. En este sentido, Roessler (1990) explica que la amplitud observada entre las diferentes especies se debe a que las adaptaciones a las condiciones ambientales son específicas, y no se puede generalizar un único tipo de respuesta. Varios autores también aseguran que cambios en los principales factores ambientales como luz y temperatura afectan de manera significativa al contenido de FAs en macroalgas (Pohl & Zurheid, 1979; Smith *et al.*, 1982; Smith & Harwood, 1984a,b; Nyberg, 1985; Araki *et al.*, 1986a,b; Cohen *et al.*, 1987; Pettit *et al.*, 1989; Stefanov *et al.*, 1994). Así, esto explicaría el 0.022% del peso seco registrado por Ramavat y colaboradores (1997) en *Grateloupia indica* recogida en las costas de la India. Sin embargo, Khotimchenko & Levchenko (1997) consideran que el contenido en FAs no se ve afectado por el estado morfológico o fisiológico del alga a lo largo de su ciclo de vida.



El perfil de ácidos grasos de *G. doryphora* se corresponde con el descrito para la mayoría de las algas rojas (Khotimchenko & Vaskovsky, 1990; Dembitsky *et al.*, 1991; Khotimchenko & Levchenko, 1997). Se caracteriza por una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (20 ó más átomos de carbono), principalmente araquidónico (AA, 20:4n6), y eicosapentanoico (EPA, 20:5n3), suponiendo más de un 30% del contenido total de ácidos grasos. Ambos se encuentran en proporción muy similar, por lo que según la clasificación establecida por Khotimchenko & Vaskovsky (1990), *G. doryphora* se encontraría dentro del Grupo II. Este agrupamiento se establece en función del ratio EPA/AA (EPA/AA>1, Grupo I; EPA/AA≈1, Grupo II; EPA/AA<1, Grupo III), aunque esta clasificación no parece ser muy indicativa, pues los mismos autores citan especies dentro del mismo género con ratios diferentes. Tal es el caso de *Grateloupia divaricata*, y *G. turuturu*, la primera perteneciendo al Grupo III, y la segunda al Grupo II.

El ácido graso en mayor proporción en *G. doryphora* es el palmítico (16:0), representando por si solo más del 30% del contenido total en FAs. Este resultado coincide con la bibliografía consultada, pues el palmítico es el más abundante para la mayoría de las algas rojas, y casi siempre en porcentajes que oscilan entre el 25-45% del total de ácidos grasos (Dembitsky *et al.*, 1991; Fleurence *et al.*, 1994). Al contrario que las plantas terrestres, las algas contienen bajas cantidades de C18 (Harwood & Jones, 1989; Dawes *et al.*, 1993; Fleurence *et al.*, 1994). Para *G. doryphora*, cada uno de ellos apenas representaba el 1% del contenido total en ácidos grasos.

En *G. doryphora*, la proporción de grasas saturadas y poliinsaturadas es aproximadamente la misma, suponiendo entre ambas cerca del 80% del total. Por otro lado, el porcentaje de grasa monoinsaturada apenas supera el 5% (Figura 11). Floreto & Teshima (1998), en diferentes experimentos realizados con *Grateloupia sparsa* endémica de Japón, encuentran que la composición centesimal apenas cambia, con una proporción de poliinsaturados y saturados

también del 80% aproximadamente, pero en una proporción 2:1. Esta composición contrasta con la citada para *Grateloupia indica* por Ramavat y colaboradores (1997). Estos autores encontraron que hasta un 47% de la composición en grasas se debía a compuestos monoinsaturados. En este caso, los datos recogidos para esta especie difieren mucho de los encontrados en nuestro laboratorio, pues tampoco encuentran cantidades significativas de EPA, y apenas un 1.4% de AA. En su caso, el FAs más abundante fue el mirístico 14:0, representado más de 20% del total. Estas diferencias, entre especies de diferentes océanos, ya fueron puestas de manifiesto por Johns y colaboradores (1979), cuando compararon la composición de diez especies macroalgales originales de Australia con ejemplares de latitudes septentrionales.

En el estudio preliminar acerca del efecto del tiempo de incubación sobre la acumulación de ácidos grasos, se observaron resultados variables para las grasas estudiadas (Figura 12). De manera general, los niveles de palmítico se vieron afectados significativamente en las primeras 14 h de incubación, mientras que en la proporción de araquidónico y eicosapentanoico no se detectaron diferencias hasta las 24 h. Estos resultados sugieren por lo tanto que el proceso de elongación e insaturación de los ácidos grasos es un proceso lento, que se realiza a partir de las grasas de menor peso molecular y saturadas. Varios autores han observado este mismo comportamiento en experimentos de incubación con  $^{14}\text{C}$ -acetato, un reconocido precursor en la biosíntesis de ácidos grasos (Gurr, 1971; Harwood & Jones, 1989; Pettit & Harwood, 1989).

Los resultados acerca del efecto de las diferentes condiciones de cultivo, sobre los niveles de cada uno de los ácidos grasos tras 24 h de incubación, no mostraron ninguna tendencia. Fue necesario el planteamiento de un diseño experimental más completa como fue el de Box-Behnken. De esta manera, el análisis de los resultados derivados de las incubaciones a 24 h según el diseño experimental de Box-Behnken, mostró que las variables estudiadas causaban un claro efecto sobre los niveles de ácidos grasos (Tabla 21).

La luz fue, estadísticamente, el factor más determinante en la acumulación de ácidos grasos. Destaca el hecho que para la mayoría de las grasas estudiadas es el término no-lineal el más determinante. Este resultado está en concordancia con Klyachko-Gurvich y colaboradores (1999), cuando afirman que el efecto de la luz sobre la desaturación de los ácidos grasos descrito en la bibliografía es bastante contradictoria, asociando este fenómeno a una relación no lineal entre la composición en ácidos grasos y la intensidad lumínica, así como con el contenido en pigmentos fotosintéticos. Una posible justificación a este resultado viene dada probablemente porque la luz aumenta la tasa biosintética de las enzimas implicadas en la elongación y desaturación de las grasas, y/o porque suministra los cofactores necesarios para esas reacciones (McKeon & Stumpf, 1982), causando por lo tanto, un efecto indirecto y complejo. Por otro lado, Ben-Amotz & Avron (1983b) aseguraban que la relación entre los PUFAs y la intensidad de luz no se debía directamente al proceso fotosintético, pero sí con los cambios en ciertos componentes de los pigmentos. En este sentido, Pettit & Harwood (1989) también observaron cambios en aquellas fracciones lipídicas más directamente relacionadas con el cloroplasto cuando *Chondrus crispus* era incubada en luz respecto a las incubaciones en oscuridad. Sin embargo, Dawes y colaboradores (1993), trabajando sobre cuatro especies de *Gracilaria* no obtienen resultados consistentes en cuanto a la acumulación de ácidos grasos cuando cambia la intensidad de luz, pudiéndose asociar esta ausencia de respuesta a lo complejo de las relaciones entre la luz y los pigmentos fotosintéticos (Pettit & Harwood, 1989).

Fijándonos en un análisis más particular, Thompson y colaboradores (1990) observaron en distintas especies de fitoplancton, que la intensidad de luz afectaba a la acumulación de 16:0, 16:1n7, 18:2n6, 18:1n9, 18:3n3, 18:4n3, y 20:5n3, tal y como en nuestro caso, exceptuando al  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3n3), aunque los periodos de incubación considerados por los autores eran muy diferentes a los aquí ensayados. También Sukenik y colaboradores (1993)

observaron que, en *Nannochloropsis* sp., el exceso de energía luminosa en condiciones fotoinhibitorias, se almacena en forma de palmítico, y palmitoleico, aumentando el ratio C16/C20, pero disminuyendo el C16/C18. Recientemente, Floreto & Teshima (1998) observaron que para *Grateloupia sparsa* los niveles de 18:1n7, 18:1n9, y 20:5n3 se veían afectados de manera independiente al resto del perfil lipídico. En definitiva, no hay un efecto general de la intensidad de la luz sobre la acumulación de los diferentes ácidos grasos. Nuestros resultados (Tabla 22) también muestran como el efecto de la variable luz no es homogéneo para todos los ácidos grasos (los términos correspondientes a la luz tienen signo diferente). Particularmente, el comportamiento del linoléico es opuesto al araquidónico, pues la acumulación de linoléico alcanza un máximo (relativo) entorno a los  $58 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que el porcentaje de araquidónico tiene una correlación positiva con la intensidad luminosa a partir de los  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 24). La estimación realizada solo es válida para un entorno del rango de luz ensayado ( $30\text{-}90 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), pues por fuera de éste, el comportamiento puede verse alterado notablemente debido a efectos no controlados (i.e. fotoinhibición a intensidades de luz muy elevadas).

La gran parte de los estudios realizados por otros autores acerca del efecto de la luz fueron realizados estableciendo incubaciones de diferente duración, y posteriormente estudiando como cambiaba la tasa de fijación de una fuente orgánica radioactiva ( $^{14}\text{C}$ -acetato, generalmente) en las diferentes grasas estudiadas. Nuestros resultados no son directamente comparables a los anteriormente expuestos, pues el análisis estadístico desarrollado (Tabla 21) está centrado en los resultados obtenidos tras 24 h de incubación, es decir, en una única medida temporal. Aún así, nuestro resultado está de acuerdo con la bibliografía consultada, al identificar a la luz como uno de los factores más determinantes en el metabolismo de las grasas.

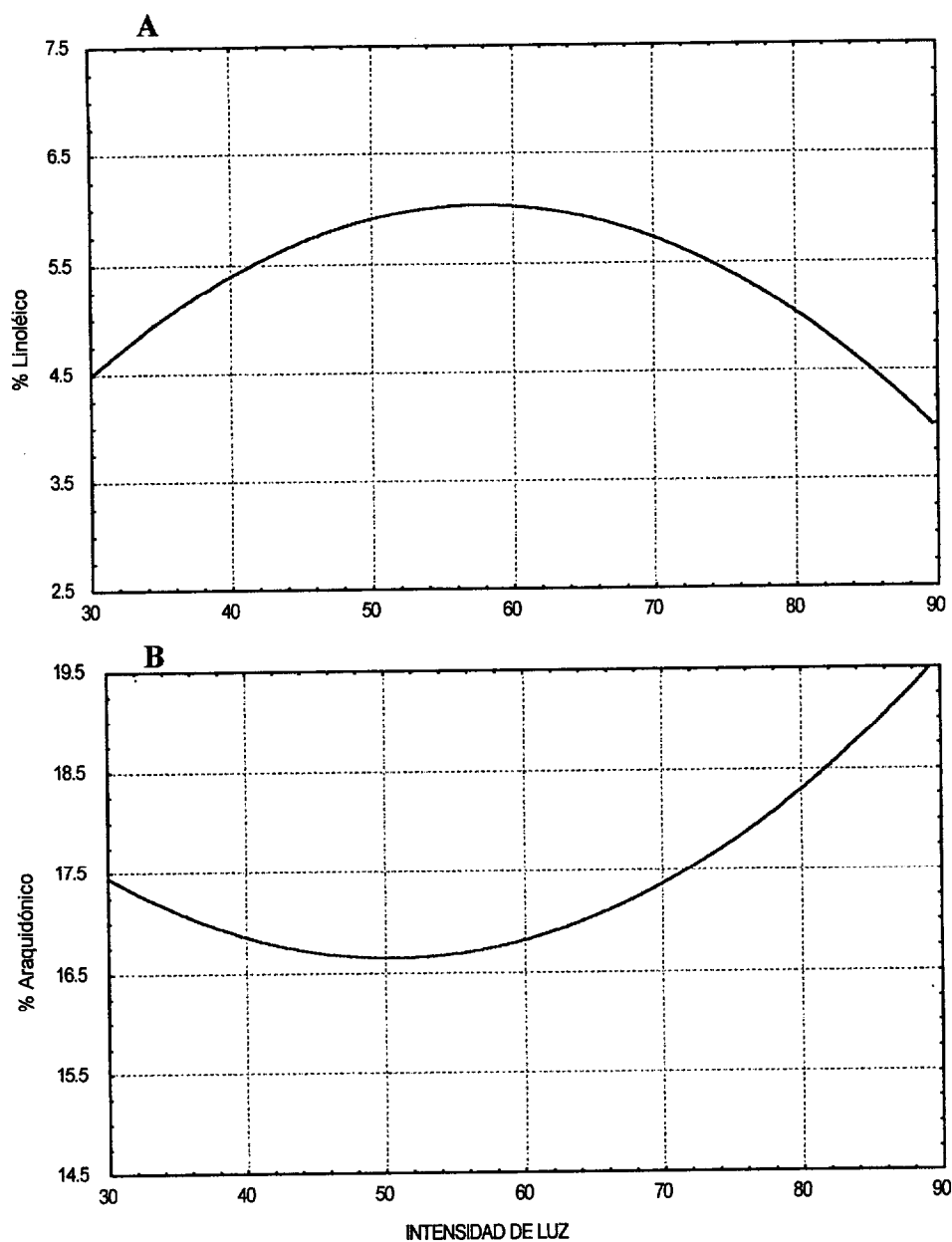


Figura 24. Estimación para la acumulación, en % del contenido total de ácidos grasos, de (A) ácido linoléico y (B) de araquidónico en *Grateloupia doryphora* según la intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El medio de cultivo se corresponde con PES+0.1M glicerol.

El efecto de los nutrientes sobre la composición cualitativa y cuantitativa del perfil lipídico está ampliamente reconocida (Borowitzka, 1986; Roessler, 1990; Radwan, 1991; García-Sánchez *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994), aunque no se está de acuerdo con el efecto causado, pues los resultados no son homogéneos entre las diferentes especies estudiadas. Ben-Amotz y colaboradores (1985) registraron un aumento en la acumulación relativa de EPA bajo condiciones mínimas de nutrientes para *Botryococcus braunii* y dos especies de *Dunaliella*, al igual que Chu y colaboradores (1996) para *Nitzschia inconspicua*, mientras que Piorreck y colaboradores (1984), y Yongmanitchai & Ward (1991), obtuvieron resultados opuestos para *Scenedesmus* y *Chlorella*, y *Phaeodactylum tricornutum* respectivamente. Estudios sobre el efecto de los nutrientes son muy escasos en macroalgas, únicamente Pohl & Zurheide (1979), registraron una correlación positiva entre los niveles de saturación de los C20 en *Gracilaria verrucosa* y la concentración de nitrato, al igual que Dawes y colaboradores (1993), para *Gracilaria tikvahiae* y el ácido araquidónico. En nuestro caso, el perfil lipídico de *G. doryphora* también está marcado por el efecto de los nutrientes como lo demuestra el análisis ANOVA (Tabla 21). Además, este efecto también va a estar influenciado por la intensidad de luz. Así, para el caso particular del ácido araquidónico, en condiciones de baja luminosidad la concentración de nutrientes favorece la acumulación de esta grasa poliinsaturada, pero a medida que la intensidad lumínica se incrementa el efecto se invierte (Figura 15). Un efecto similar se obtiene para el caso de la proporción entre las grasas poliinsaturadas y las saturadas (PUFAs/SFAs). La pendiente de la superficie de respuesta es positiva a medida que aumenta la concentración de nutrientes y a intensidades de luz moderadamente bajas ( $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mientras que, a partir de los  $60 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aproximadamente, la acumulación preferente de grasa saturada se ve favorecida (Figura 20A). Por lo tanto, para *G. doryphora* en las condiciones de incubación descritas podemos generalizar que la presencia de nutrientes favorece la acumulación de los PUFAs en condiciones de intensidad de luz bajas. Esta

afirmación está de acuerdo con Orcutt & Patterson (1974), cuando afirman que el estrés causado por la falta de nitratos en cultivos de *Nitzschia closterium* favorece la acumulación de PUFAs cuando se dan condiciones de baja intensidad luminosa, aunque otros autores han llegado a la conclusión opuesta (Opute, 1974; Mortensen *et al.*, 1988). Pero de lo que no hay duda es que el uso de diferentes intensidades de luz puede utilizarse para manipular el efecto de los nutrientes y así variar la composición del perfil lipídico (Thompson *et al.*, 1990; Chen & Johns, 1991).

Sorprendentemente, el glicerol como fuente de carbono orgánico no parece ser muy determinante sobre la biosíntesis y acumulación de los ácidos grasos en *G. doryphora* (Tabla 21). La gran parte de los trabajos relacionados con el uso de fuentes de carbono orgánico en cultivos de algas destinadas a la producción de PUFAs están realizados sobre especies microalgales en condiciones heterotróficas (Barclay *et al.*, 1994; Chen, 1996), siendo la glucosa la fuente más extensamente probada (Wright *et al.*, 1980; Chen & Johns, 1991; Tan & Johns, 1991). Recientemente se han comenzado a utilizar otras fuentes alternativas, fundamentalmente el acetato y el glicerol (Vazhappilly & Chen, 1998; Chu *et al.*, 1996; Ivanova *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). El acetato había ya sido utilizado en estudios sobre la biosíntesis de las distintas clases lipídicas, pero marcado radioactivamente para experimentos de pulso y caza, y no como fuente de carbono alternativa (Gurr, 1971; Harwood & Jones, 1989; Honya *et al.*, 1992). El efecto de estas fuentes de carbono no parece estar del todo claro en la bibliografía consultada, ya que los efectos detectados son o poco reproducibles (Wood *et al.*, 1999), o simplemente no se detectó ningún efecto (Ivanova *et al.*, 1999).

En nuestro caso, el glicerol interactúa junto con los nutrientes de manera significativa en el caso del palmitoléico (16:1n7), del 18:1n7, y del linoléico (18:2n6), siendo el tipo de respuesta obtenida para los dos  $\omega$ -7 muy similar y opuesta para la del último (Figuras 13 y 14). La síntesis de ácidos grasos es cloroplástica, y la adición del glicerol interfiere significativamente con la

actividad de este orgánulo, como indica el hecho de que la actividad fotosintética disminuye, o su deteriorización (Lewitus *et al.*, 1991a,b). De ahí que la condición mixotrófica tenga un límite al menos en lo que a ácidos grasos se refiere.

La importancia real de nuestros resultados no está en el efecto aislado de las variables estudiadas, pues el control fisiológico del alga consiste en la manipulación de las condiciones de cultivo para poder dirigir, en cierta manera, el metabolismo biosintético. Esta idea puede tener una aplicabilidad muy importante si tenemos en consideración el resultado obtenido en la Figura 17. Este análisis clúster nos ha permitido agrupar los diferentes ácidos grasos por categorías bien establecidas. Claramente se observan tres grupos bien establecidos. En el Grupo A se encuentran el EPA, el AA, que están reconocidos como productos finales en la cadena de síntesis de ácidos grasos de la mayoría de especies vegetales (Khotimchenko *et al.*, 1991; Nichols & Appleby, 1969; Certik & Shimizu, 1999; Wolff *et al.*, 1999), es decir, que a partir de estos dos aceites no se sintetiza ningún otro. De esta manera, suponemos que el mirístico y el palmítico deben también ser productos que estén situados en el extremo de la cadena biosintética (se acumulan) aunque en este caso si sirven de eslabón hacia la biosíntesis de otro ácido graso. En este sentido, Schneider & Roessler (1994) afirman que los primeros productos de la biosíntesis cloroplasmática de ácidos grasos son el mirístico y el palmítico, y Kayama y colaboradores (1986) estudiando la biosíntesis de ácidos grasos en *Porphyra* obtuvieron que la elongación y las insaturaciones ocurren a partir de estos dos ácidos grasos.

En el otro extremo de la gráfica se agrupan el esteárico, el linoléico, y el oléico. Estos tres compuestos han sido agrupados como Precursores. Los resultados de Okumura y colaboradores (1986), sobre el incremento significativo de la producción de PUFAs, especialmente EPA y araquidónico, cuando añadían oléico, linoléico, o linolénico al medio de cultivo de *Euglena gracilis*, están de acuerdo con este resultado. Asimismo, Gurr (1971) asegura que los C18



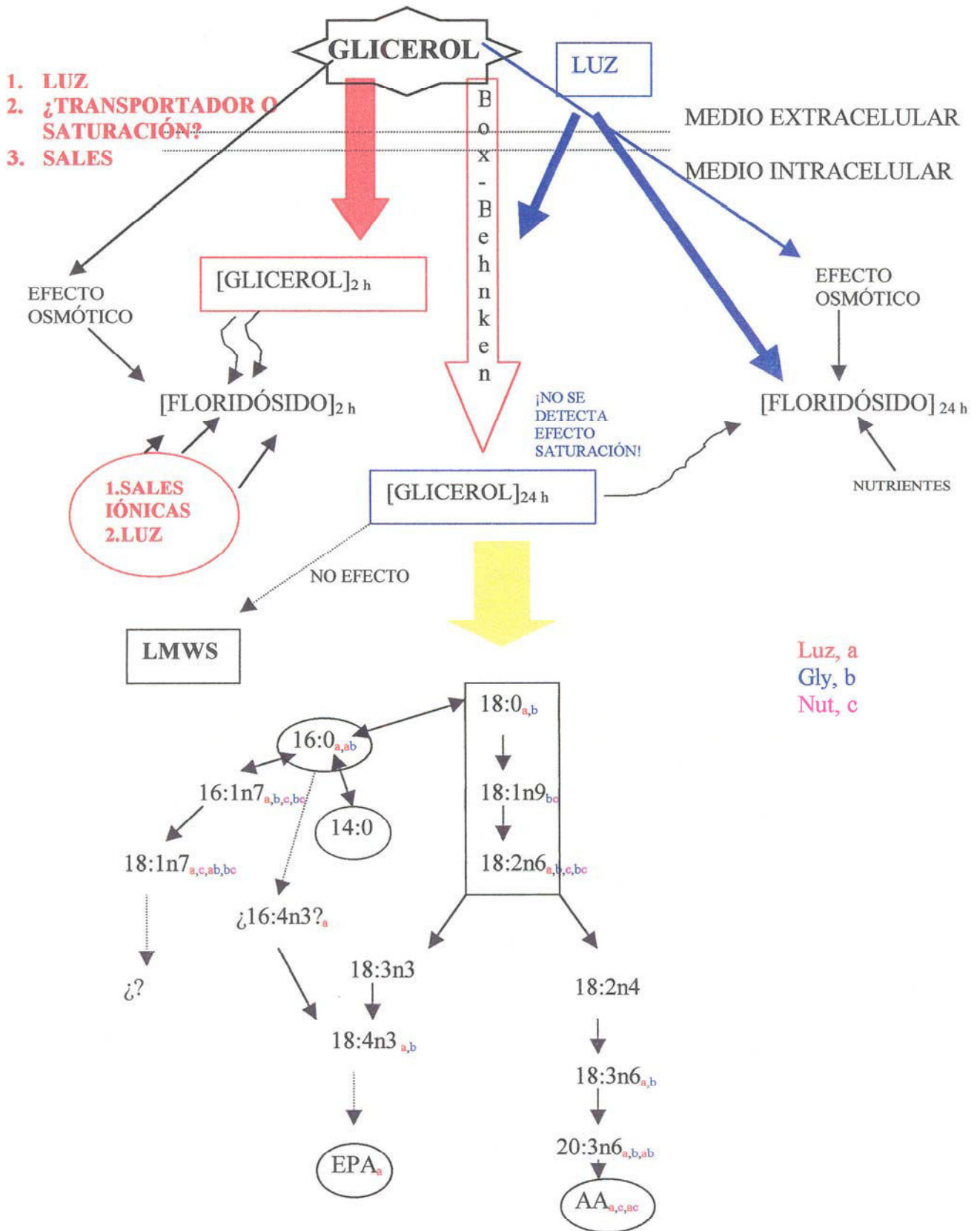
poliinsaturados se realizan a partir de desaturaciones secuenciales del ácido oléico.

Finalmente, aquellos ácidos grasos comprendidos entre los Grupos A (Prod. Finales) y B (Precusores), han sido clasificados como Intermediarios, pues son los eslabones necesarios para, a partir de los precursores, sintetizar los productos finales. Estos ácidos grasos apenas se acumulan en *G. doryphora*, representando por término medio un 0.95% del contenido total de ácidos grasos. Los esquemas biosintéticos considerados para *Porphyra* (Kayama *et al.*, 1986), *Gracilaria* (Khotimchenko *et al.*, 1991) y, microorganismos en general (Certik & Shimizu, 1999), están de acuerdo con nuestro resultado. Aún así, se debe tener en cuenta que las algas tienen patrones de ácidos grasos exclusivos, incluso detectándose diferencias a nivel de especies (Pohl & Zurheide, 1979), debidas fundamentalmente a las particularidades metabólicas de cada una (Harwood & Jones, 1989).

El diseño experimental de Box-Behnken y, su posterior análisis, se han mostrado efectivos a la hora de evaluar el efecto de una serie de variables que afectan al flujo del carbono en la Rhodophyta *Grateloupia doryphora*. Los diferentes modelos obtenidos, así como la significancia estadística de los factores sobre las variables estudiadas: glicerol intracelular, floridósido, azúcares de bajo peso molecular, y 15 tipos de ácidos grasos, nos permiten aproximarnos de manera estimativa y cualitativa a un modelo general del flujo del carbono cuando el glicerol se dispone como fuente orgánica de carbono en condiciones mixotróficas (Figura 25, en esta discusión). El glicerol penetra al interior celular, siendo respirado, fosforilado, o simplemente acumulado y, causando de esta manera una serie de cambios en el metabolismo celular. Estos cambios ya se detectan en las primeras horas, pues cambia tanto la concentración interna de glicerol, como la de floridósido (este último debido a un efecto osmótico). Tras 24 h en presencia de glicerol, el efecto osmótico sobre el floridósido se sigue haciendo notar, interviniendo la luz en esta respuesta. La biosíntesis de ácidos

grasos también se ve afectada por las condiciones de cultivo, pudiéndose manipular para optimizar la acumulación de un ácido graso en particular. En este sentido, establecer durante un periodo de tiempo superior a las 24 h aquellas condiciones que favorezcan la acumulación de los “Ácidos Grasos Precursores” (i.e.  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en medio PES85+0.15M glicerol), puede optimizar la acumulación de ácidos grasos con interés bio-económico como el EPA, o el araquidónico, si más tarde se orientan las condiciones de cultivo en este sentido (i.e.  $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en medio PES doble+0.05M glicerol).

Figura 25. Esquema propuesto sobre el efecto e interacciones del glicerol en diferentes fracciones de carbono orgánico (glicerol, floridósido, azúcares de bajo peso molecular, y ácidos grasos) para *G. doryphora*.



## Poliaminas en macrófitos marinos

La presencia de tejidos bien diferenciados en la fanerógama marina *Cymodocea nodosa*, nos permitió realizar un estudio más exhaustivo de la acumulación de poliaminas en esta especie. Su condición de planta superior hace de este estudio también interesante, ya que no existen referencias sobre la presencia de poliaminas en fanerógamas marinas. Los valores detectados para *C. nodosa* se encuentran entre aquellos citados para algunas plantas terrestres (Tabla 28, en esta Discusión; Egea-Cortines *et al.*, 1993; Gallardo *et al.*, 1994; Rey *et al.*, 1994; Pedroso *et al.*, 1997). Las mayores cantidades de poliaminas, tanto libres como conjugadas, se encontraron en las zonas apicales del rizoma, donde se espera la mayor actividad de crecimiento para *C. nodosa*. En el meristemo apical aparecen células en constante división y diferenciación. De todos los tejidos estudiados aquí, las raíces mostraron los niveles endógenos de poliaminas más bajos, estando este resultado de acuerdo Larkum y colaboradores (1989), los cuales trabajando con fanerógamas marinas australianas, relacionan este evento con el menor potencial de crecimiento que poseen las raíces. Esta acumulación diferencial de las poliaminas según los diferentes tejidos, órganos o especies en particular ha sido constatada por varios autores, estando siempre correlacionada con la actividad de crecimiento y desarrollo celular de los diferentes órganos (Slocum *et al.*, 1984; Torrigiani & Scoccianti, 1995). Si bien no se encontró ningún estudio específico sobre esta acumulación diferencial para los diferentes tejidos maduros de especies vegetales, pues la mayoría de estos estudios se realizaron sobre explantos, callos, y brotes inmaduros en cultivos *in vitro*. Así, Gallardo y colaboradores (1994), observan que a lo largo del eje embriogénico de *Cicer arietinum*, la mayor acumulación de poliaminas se da en la zona del hipocotiledón (ápice plumular), mientras que los niveles más bajos se encuentran en el ápice radicular.

Los niveles endógenos absolutos de una poliamina para una planta en particular dan poca información acerca de su papel fisiológico, pues el rango en los niveles citados en la bibliografía es muy amplio (Velikova *et al.*, 1998). Algunos autores se basan en el estudio de las proporciones entre las poliaminas para comprender su papel en el desarrollo de los tejidos vegetales (Rey *et al.*, 1994; Bajaj & Rajam, 1995; Hongliang *et al.*, 1995; Krebsky *et al.*, 1999; Kakkar *et al.*, 2000). Si consideramos las proporciones PUT/SPD, y PUT/SPM entre los diferentes tejidos estudiados, éstos permanecen estables tanto para la fracción libre como para la conjugada, con la excepción de la proporción PUT/SPM correspondiente a la fracción libre para las hojas, en cuyo caso se triplica como consecuencia de la disminución de los niveles de espermina. La espermina se ha identificado como un factor anti-envejecimiento (Galston *et al.*, 1997), por lo tanto, esta acumulación de putrescina con respecto a espermina puede ser el factor que promueva el envejecimiento de la hoja. Anteriormente, Rey y colaboradores (1994), asociaron esta acumulación preferente como un bioindicador de envejecimiento celular. Este resultado podría ser de gran importancia en la interpretación de los eventos de la biología de esta especie. La hoja de *C. nodosa* es un órgano muy dinámico en el que se producen a lo largo del año una renovación continua del número de haces que lo forman, lo que es debido en algunas fases, a la pérdida por ablación de la hoja a la altura de la conexión en la vaina que lo constituye en el extremo proximal. El hecho de que las poliaminas estén implicadas en este fenómeno podría derivar en posteriores relaciones con sistemas de control del crecimiento y desarrollo, o de estrés, en los que estas están implicadas.

Para el caso de las fracciones conjugadas, su interpretación es más complicada, pues solo hace unos años que se ha comenzado a comprender su función en el interior celular (Chibi *et al.*, 1993; Kaur-Sawhney & Applewhite, 1993; Escribano *et al.*, 1996; Tassoni *et al.*, 1996, 1998; Scoccianti *et al.*, 2000). Las primeras hipótesis acerca de su rol fisiológico giran entorno a que pueden

representar una forma de reserva de poliaminas, desde las que se liberan las libres (Martin-Tanguy, 1997), incluso se cree que el control de los niveles endógenos se realiza a través del equilibrio conjugadas/libres, en vez de a través de su síntesis/degradación (Pandey *et al.*, 2000). El porcentaje que representa esta fracción respecto el total de poliaminas es muy elevado, confirmando los resultados de Galston & Kaur-Sawhney (1995), en el sentido de que esta fracción representa más del 90% del total de poliaminas.

El experimento sobre el efecto de las incubaciones con poliaminas exógenas, parece evidenciar una entrada de éstas al interior celular desde el medio de cultivo, pues se detecta una alteración en muchas de las fracciones analizadas (Tabla 27).

Hay numerosos estudios que avalan esta hipótesis sobre el efecto fisiológico de las poliaminas exógenas en su estado libre. Kaur-Sawhney y colaboradores (1988) detectan un aumento significativo en la generación de brotes florales en *Nicotiana tabacum* cuando se añade espermidina exógena al medio de cultivo. Recientemente, Bernet y colaboradores (1998) comprobaron que la putrescina exógena estaba siendo transportada al interior celular en cultivos *in vitro* de *Zea mays*. En un estudio sobre el efecto de la putrescina exógena sobre el crecimiento de callos, estos autores comprobaron que al tiempo que aumentaba el contenido endógeno en esta poliamina, durante el crecimiento de los callos, se detectaba una reducción del 70% del total dispuesto en el medio de cultivo. Sin embargo, no detectaron efecto alguno sobre el crecimiento.

Kakkar y colaboradores (1998), por su parte, asemejan el transporte celular de poliaminas al de compuestos nitrogenados como los aminoácidos. Estos autores hacen una revisión acerca del transporte de poliaminas al interior celular, en varias especies vegetales (incluyendo las algas) y, concluyen que éstas penetran al interior celular de manera rápida según un comportamiento lineal y con constantes de saturación muy específicas. Nuestros experimentos de *dipping* para *C. nodosa* mostraron que cuando estuvo presente cualesquiera de las poliaminas de forma exógena, los niveles endógenos de cada una de las

poliaminas libres aumentaron significativamente tras solo 1 hora en incubación. Independientemente de la poliamina aplicada al cultivo, tanto la putrescina, como la espermidina, y la espermina se acumularon de forma significativa. En este sentido, Bajaj & Rajam (1995) detectaron cambios en los niveles de espermidina y putrescina de *Oryza sativa* cuando incubaron callos en presencia de espermidina libre. Sin embargo, Bernet y colaboradores (1998) no registraron cambios significativos en los niveles endógenos de espermina y espermidina en cultivos de *Zea mays* cuando se incubó con putrescina exógena. Los resultados de estos trabajos nos inducen a pensar que, en cultivos que contengan poliaminas exógenas, puede haber una activación o desactivación de las rutas metabólicas de las poliaminas, pero este punto parece necesitar investigaciones más precisas.

Los niveles endógenos para las poliaminas conjugadas no cambian significativamente cuando se incubó con espermidina. Sin embargo si se detectaron diferencias para la fracción libre (Tabla 27), anulando la posibilidad de que esta poliamina se mostrara inefectiva. Aunque la síntesis de las fracciones conjugadas a partir de las libres no parece aún clara (Chibi *et al.*, 1994), solo las incubaciones con espermina exógena causaron aumentos significativos en las tres poliaminas conjugadas, mientras que la incubación con putrescina solo afectó a la fracción putrescina-conjugada. Estos resultados parecen indicar que es la espermina la molécula determinante en la regulación de los niveles de poliaminas conjugadas en el interior celular, pues un aumento en el *pool* celular de esta poliamina provoca cambios en las otras dos (putrescina y espermidina). Más adelante se deberá estudiar si es la espermina la responsable en el control enzimático de la síntesis de poliaminas.

Como conclusión, se puede resumir que en la fanerógama marina *C. nodosa* existe una distribución diferencial de poliaminas endógenas entre los diferentes tejidos estudiados, existiendo la mayor concentración en el tejido meristemático del rizoma, que es donde hay una mayor actividad celular.



Además, se ha relacionado el proceso de envejecimiento y ablación de las hojas con una disminución de espermina, un agente antisenescente.

La adición de poliaminas causaron efecto rápidamente sobre los niveles endógenos, evidenciando que estas plantas responden a tratamientos con reguladores de crecimiento. Estos resultados deben tratarse con cautela, pues la respuesta de las plantas a los experimentos sobre regeneración, crecimiento, y desarrollo es muy heterogénea debido a la cantidad de estímulos internos y externos que controlan estas respuestas, tales como la luz, la temperatura, hormonas, etc (Bernet *et al.*, 1999). Además la posibilidad de establecer correlaciones entre las fracciones libres y conjugadas exige estudios de genética molecular (Pandey *et al.*, 2000), que no se llevaron a cabo en este estudio por estar fuera de los objetivos marcados inicialmente.

Los resultados de la Tabla 23 muestran la presencia de putrescina, espermidina y espermina en las macroalgas marinas estudiadas. La existencia de estos compuestos está bien documentada tanto en micro como en macroalgas, por tanto, estos resultados pueden añadirse a estudios previos sobre la presencia de poliaminas en especies de vegetales marinos. Hamana & Matsuzaki (1982, 1985), y Hamana y colaboradores (1983, 1990), describieron la presencia y distribución de poliaminas en cianobacterias, y en varias especies de algas rojas, tanto micro (*Porphyridium cruentum*, *Cyanidium caldarium*) como macroalgales (*Porphyra tenera*). Badini y colaboradores (1994), describieron las oscilaciones estacionales en los niveles endógenos de poliaminas para la Chlorophyta *Ulva rigida*. Dörnemann y colaboradores (1996), relacionaron los niveles de poliaminas con el desarrollo del cloroplasto en la microalga verde *Scenedesmus obliquus*. Por otro lado, Lee (1998), y Lee & Chen (1998), estudiaron la relación entre los niveles endógenos de poliaminas con cambios en las condiciones de salinidad para varias especies de macroalgas verdes. En todos ellos, las concentraciones citadas se encuentran en el rango comúnmente aceptado para poliaminas en plantas superiores (Kaur-Sawhney *et al.*, 1982; Harkess *et al.*, 1992; Biondi *et al.*, 1993; Hongliang *et al.*, 1995; Tassoni *et al.*, 2000). El patrón

de distribución de las poliaminas entre las diferentes especies muestreadas difiere muchísimo no solo en las cantidades totales de putrescina, espermidina y espermina, sino también, en las fracciones libre e insoluble-conjugada. En este sentido, Lee (1998) llegó a la misma conclusión tras analizar 7 especies de macroalgas verdes, incluyendo 3 del mismo género. Esta observación es también válida para las plantas terrestres, donde el rango puede oscilar en varios cientos de nanomoles (Tabla 28; Galston & Kaur-Sawhney, 1990). Respecto a la proporción entre la fracción libre y la conjugada, nuestros resultados concuerdan con Galston & Kaur-Sawhney (1995), cuando afirman que la fracción conjugada puede representar un 90% de las poliaminas totales. Aún así y en condiciones naturales, la distribución cuantitativa fue bastante homogénea independientemente de la especie vegetal y de la fracción analizada, siendo la putrescina la más abundante, seguida de lejos por la espermidina y la espermina en cantidades similares. Esta distribución ha sido descrita por varios autores (Tabla 28; Lee & Chu, 1992; Altman & Levin, 1993; Bajaj & Rajam, 1995; Torrigiani & Scoccianti, 1995; Aldesuquy *et al.*, 2000; Scoccianti *et al.*, 2000), aunque bajo ciertas condiciones experimentales (ensayos hormonales, efecto de factores físicos, etc.), o estadios de crecimiento, este patrón puede verse alterado (Predieri *et al.*, 1993; Scaramagli *et al.*, 1995; Pedroso *et al.*, 1997; Hennion & Martin-Tanguy, 2000). El por qué unas especies acumulan preferentemente una poliamina con respecto a las demás, o por qué la cantidad de poliaminas en sus diferentes estados, libre o conjugado, varía tanto de una especie a otra, sigue aún sin comprenderse (Applewhite *et al.*, 2000), pero si está reconocido que estas variaciones se deben fundamentalmente a que la acumulación de poliaminas es sensible a las condiciones fisico-químicas del medio, aunque no queda claro si la variación en los niveles endógenos de poliaminas es por efecto de la adaptación fisiológica, o si son las poliaminas las responsables de esa adaptación.

Tabla 28. Valores de poliaminas (nmoles poliaminas g<sup>-1</sup> peso fresco) referenciados en la bibliografía.

Autor	Especie	Putrescina		Espermidina		Espermina	
		Libre	Insoluble-conjugada	Libre	Insoluble-conjugada	Libre	Insoluble-conjugada
Este estudio	<i>Dictyota dichotoma</i>	920	19x10 <sup>3</sup>	2.3	50	1.1	20
Este estudio	<i>Gelidium canariensis</i>	1500	23x10 <sup>3</sup>	3	28	9	29
Este estudio	<i>Grateloupia doryphora</i>	700	30 x10 <sup>3</sup>	5	30	3	30
Este estudio	<i>Cymodocea nodosa</i>	1500-200	7500-600	20-2	4-0.5	10-1	9-1
Lee, 1998	<i>Ulva reticulata</i>	200-40	1	25-5	2-1.5	3	0.2-0.05
Lee, 1998	<i>Ulva lactuta</i>	200-40	1	15-10	3-0.5	4-2	0.4-0.2
Lee, 1998	<i>Ulva fasciata</i>	50-5	1	5	0.5	1	0.2
Lee, 1998	<i>Chaetomorpha crassa</i>	75-20	4-2	10-2.5	0.3	6	0.4-0.2
Lee, 1998	<i>Valoniopsis pachynema</i>	100-0	4-0.5	30-0.1	1.5-0.5	1	0.2-0.1
Gallardo <i>et al.</i> , 1994	<i>Cicer arietinum</i>	220-80	13-8	190	16	60-40	3.5
Sung <i>et al.</i> , 1994	<i>Oryza sativa</i>	5000-1000	---	1200-200	---	150-50	---
Tassoni <i>et al.</i> , 2000	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100	50	800	150	300	---
Faivre-Rampant <i>et al.</i> , 2000	<i>Nicotiana tabacum</i>	250	900	50	150	30	100
Scoccianti <i>et al.</i> , 2000	<i>Solanum melongena</i>	800	200	200	---	25	---
Pedroso <i>et al.</i> , 1997	<i>Camellia japonica</i>	250	80	50	10	25	---
Rey <i>et al.</i> , 1994	<i>Corylus avellana</i>	200	50	600	100	500	400

La interacción metabólica existente entre el glicerol y las poliaminas (como reguladores del crecimiento) no es del todo conocida. Si se han registrado cambios en la fisiología del crecimiento y en el metabolismo vegetal cuando se aporta una fuente exógena de carbono al cultivo (Antia, 1980). En particular, Robaina y colaboradores (1995), y García-Jiménez y colaboradores (1996), observaron que las células de *G. doryphora* metabolizan el glicerol cuando este se dispone como fuente orgánica de carbono en cultivos axénicos, aumentando la tasa respiratoria y la actividad biosintética. Por otro lado, en cultivos *in vitro* de esporas de *G. doryphora* en medios con glicerol, la adición de poliaminas provocó que se potenciaron los efectos del glicerol, aumentando el crecimiento de la masa celular y la morfogénesis (García-Jiménez *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran que, tal y como describió anteriormente García-Jiménez y colaboradores (1996), la adición de glicerol transformó en 7 días a las esporas de *G. doryphora* cultivadas en medio con glicerol en masas celulares morfogénicas (Figuras 21A,B). Al mismo tiempo, se detectó un aumento significativo en la acumulación de poliaminas en esporas cultivadas en glicerol (Tabla 24), sugiriendo que los eventos dirigidos al crecimiento y desarrollo de las esporas pueden estar relacionados con una acumulación significativa de poliaminas tanto libres como en su estado conjugado. Esta acumulación se deberá a un aporte extra de carbono y energía proporcionada en condiciones mixotróficas, es decir, que el glicerol podría ser el agente responsable de desencadenar el crecimiento registrado en las esporas cultivadas en PES+glicerol a través de la síntesis de poliaminas. Nuestros resultados están de acuerdo con aquellos de Hamana y colaboradores (1990), para la Rhodophyta unicelular *Cyanidium caldarium*, cuando analizan el contenido endógeno de poliaminas en diferentes condiciones de cultivo. En condiciones mixotróficas con glucosa como fuente orgánica de carbono, la acumulación de poliaminas fue sensiblemente superior con respecto a aquellas condiciones totalmente autótrofas, detectándose paralelamente un aumento de la productividad del cultivo. Sin embargo, los autores no dan mucha relevancia a este resultado.

Los niveles de poliaminas, tanto libres como conjugadas, en esporas en división representan aproximadamente el doble con respecto a los presentes en talos maduros (Tabla 24). Este resultado sugiere una vez más un papel regulatorio de las poliaminas en la división celular de acuerdo con lo también descrito por Kaur-Sawhney & Applewhite (1993). Estos autores establecen que elevadas concentraciones de putrescina ligada a sustancias de carácter proteico están relacionadas con procesos de división celular. Esta conexión entre la división celular y la acumulación de poliaminas fue descrita por Cohen y colaboradores (1984), para cultivos de *Chlorella vulgaris*. Estos autores asocian una acumulación de poliaminas (putrescina y espermidina especialmente) previa replicación del ADN, y posterior aumento de la división celular. Altman & Levin (1993) identifican un aumento en los niveles de putrescina previa a la fase exponencial de crecimiento de células del tabaco. Posteriormente, Galston & Kaur-Sawhney (1995), afirmaron que células en proceso de división contienen niveles más altos de poliaminas (libres) que aquellas inactivas. Esta hipótesis, sobre el efecto regulatorio de las poliaminas en la división celular, fue asumida por primera vez por Slocum y colaboradores (1984), que determina que de manera general, los niveles de poliaminas son más elevados en tejidos jóvenes en desarrollo que en maduros.

La putrescina es el precursor obligado tanto en la biosíntesis de la espermidina como de la espermina (Slocum *et al.*, 1984; Kao, 1997), por lo tanto, los cambios en los niveles de estas dos últimas deben reflejarse de alguna manera en la putrescina. Lo anteriormente expuesto hace suponer que el efecto de las poliaminas no solo se debe a su concentración absoluta en el interior celular, sino también a la proporción existente entre ellas. La Figura 22 muestra como cambian esas proporciones en *G. doryphora* cuando se cultiva en medio PES+glicerol. Se detectó un aumento en los ratios PUT/SPD (un 11 y un 46% respectivamente para la fracción libre y conjugada) y PUT/SPM (un 30 y un 22% respectivamente), respecto el tejido control. La importancia de estas proporciones ha sido previamente constatada para plantas superiores. Bajaj &

Rajam (1995), concluyen que el potencial de regeneración de callos de *Oryza sativa* va a depender del ratio PUT/SPD, al igual que la tasa de crecimiento en embriones de *Vitis vinifera* (Faure *et al.*, 1991). La tendencia de estos ratios no se puede extrapolar de una especie a otra, ni siquiera dentro de una misma especie, de un tejido otro. Gallardo y colaboradores (1994), observan como los cambios registrados en el ratio PUT/SPD varían de un tejido a otro en *Cicer arietinum*. Así, los resultados de Rey y colaboradores (1994), contrastan con los nuestros, al asociar un mayor ratio PUT/SPD y PUT/SPM con el inicio de la fase de inactividad propia de los tejidos vegetativos en árboles caducos, registrando un nuevo aumento al inicio de la etapa de floración.

Quizás, el resultado más destacado es que no cabe duda que el balance entre las diferentes poliaminas forma parte del sistema encargado de controlar el proceso de desarrollo celular en vegetales, y que pueden usar una fuente externa de carbono orgánico como el glicerol, para alterar su patrón de desarrollo y crecimiento y adaptarlo a las nuevas condiciones ambientales. En este sentido, la Figura 21C,D, y la Tabla 25, muestran como inhibiendo la síntesis de poliaminas se inhiben al mismo tiempo los efectos que el glicerol tiene sobre el crecimiento y desarrollo celular.

Según Galston y colaboradores (1997), las poliaminas son sintetizadas a partir de la putrescina, que se forma por la descarboxilación de la arginina o de la ornitina a través de la arginina descarboxilasa (ADC), o de la ornitina descarboxilasa (ODC). Aunque puede darse el caso de que ambas rutas subsistan en un mismo organismo, la proporción ADC:ODC varía considerablemente de una especie a otra, y diferentes factores físicos, químicos y biológicos afectan y regulan la actividad de una y otra. De manera general, una ruta biosintética predomina sobre la otra (Pegg, 1986; Marton & Pegg, 1995; Kumar *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1998). El reciente uso de inhibidores permanentes para las dos enzimas responsables de esta biosíntesis, DFMA y DFMO respectivamente, ha permitido reconocer funciones diferentes en las poliaminas según la ruta de la

cual provengan (Tiburcio *et al.*, 1993; Hausman *et al.*, 1994; Bernet *et al.*, 1998). Su actividad enzimática está incluso controlada por factores diferentes (Voigt *et al.*, 2000). La actividad de la ODC está asociada a células en división de tejidos inmaduros, mientras que la ruta de la ADC se ha identificado fundamentalmente en células que no presentan división activa y están bajo diferentes condiciones de estrés (Ruiz *et al.*, 2000). La adición de DFMO a ambas concentraciones, inhibe el crecimiento y la morfogénesis promovida por el glicerol, mientras que no se observó efecto alguno cuando el DFMO fue añadido a cultivos sin glicerol, como se muestra en la Tabla 25 y Figuras 21C,D. Este resultado sugiere indirectamente, que parte del glicerol asimilado por *G. doryphora* es dirigido a la biosíntesis de poliaminas a través de la ruta de la ornitina, ruta biosintética activa fundamentalmente en procesos de división celular (Flores y Galston, 1984; Tiburcio *et al.*, 1988). Cohen y colaboradores (1984), y Villanueva y colaboradores (1980) también relacionan el aumento en putrescina en células de *Chorella* y *Euglena* a partir de la ornitina. Villanueva y colaboradores (1980) detectaron para *Euglena gracilis* la mayor acumulación de radioactividad en la fracción de putrescina cuando las células se cultivaron con ornitina radioactiva (48% de la radioactividad total), seguida por arginina (2.4%). Los resultados en Tabla 25 muestran que el glicerol no parece ser un precursor directo en la síntesis de poliaminas (sólo un 0.02% de la radioactividad), al menos no comparable a la ornitina o la arginina. Pero a pesar de la pequeña cantidad detectada, parece que como se muestra en la Tabla 25, la presencia del DFMO en el medio hace disminuir la cantidad de glicerol usado para la síntesis de poliaminas al mismo tiempo que promueve la inhibición de los efectos del glicerol sobre el crecimiento discutidos anteriormente.

La combinación de los resultados mostrados en las Tablas 24 y 25 nos sugiere que en *G. doryphora*, el glicerol promueve la biosíntesis y acumulación de poliaminas a través de la ruta de la ODC, relacionándose este aumento con la elevada tasa de división celular registrada en los cultivos con glicerol.

## **CONCLUSIONES**





## V. CONCLUSIONES

Con relación al flujo de carbono:

1. El glicerol, como fuente de carbono exógeno, fue detectado en cantidades significativas en el interior de 7 especies de macroalgas (*C. racemosa*, *G. doryphora*, *Asparagopsis* sp., *C. abies-marina*, *S. scoparium*, y *Taonia* sp.) cuando fueron incubadas durante 24 horas en medios PES70+0.3M glicerol.
2. El diseño experimental de Box-Behnken, aplicado a incubaciones de algas marinas, es una herramienta efectiva para identificar aquellos factores que, de forma significativa, están implicados en la regulación de ciertos procesos metabólicos relacionados con el flujo de carbono como es la regulación osmótica y la biosíntesis de ácidos grasos.
3. La entrada de glicerol al interior de *G. doryphora* parece seguir un comportamiento bifásico, según una difusión simple para concentraciones exógenas de esta fuente hasta 0.2 M, y más complejo, evidenciada por la interacción de la luz y el K<sup>+</sup>, para concentraciones mayores. Este hecho es lo que condiciona la mixotrofia.
4. Bajo ciertas condiciones de cultivo, el glicerol exógeno que penetra al interior del talo de *G. doryphora* no es dirigido hacia la biosíntesis de floridósido, sino que es principalmente metabolizado, proporcionándola energía útil para el crecimiento y desarrollo.
5. *G. doryphora* destaca por su elevado contenido en las grasas poliinsaturadas 20:4n6 (AA) y 20:5n3 (EPA), entorno al 30% del contenido total de ácidos grasos.

6. La intensidad de luz y la concentración de nutrientes afectan, de manera general, a la acumulación de ácidos grasos en *G. doryphora* cultivada en glicerol, aunque no se puede establecer un modelo único que prediga su tendencia, pues el efecto de estas variables es específico sobre cada ácido graso.
7. Desde una perspectiva biotecnológica del cultivo *in vitro*, es posible dirigir la fisiología de *G. doryphora* para que, a partir de una previa acumulación de los ácidos grasos precursores, se favorezca la biosíntesis de aquellos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Con relación a la regulación del crecimiento:

8. La diamina putrescina, y las poliaminas espermidina y espermina han sido encontradas en varias especies de algas marinas pertenecientes a las Divisiones Rhodophyta y Phaeophyta, y en concentraciones similares a las citadas anteriormente por otros autores para plantas superiores terrestres. En *Cymodocea nodosa*, las poliaminas presentan claros patrones de localización endógena en los diferentes tejidos, previsiblemente relacionados con los eventos fenológicos de esta especie.
9. *In vitro*, las esporas de *G. doryphora* cultivadas con glicerol como fuente exógena de carbono orgánico, mostraron un aumento significativo en sus niveles endógenos de poliaminas.
10. El aumento en los niveles endógenos de poliaminas se corresponde con una mayor división y crecimiento celular en las esporas cultivadas.
11. Los efectos del glicerol sobre el crecimiento fueron inhibidos por la adición del DFMO al mismo tiempo que inhibió la transformación de glicerol en poliaminas.

12. En *G.doryphora*, la biosíntesis de las poliaminas implicadas en la división celular inducida por el glicerol, parece ocurrir a través de la ruta de la ornitina descarboxilasa



## **BIBLIOGRAFÍA**



---

**VI. BIBLIOGRAFÍA**

Ahern TJ, Katoh S, Sada E (1983) Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biotechnol Bioeng* 25: 1057-1070

Ahmed AM, Zidan MA (1987) Glycerol production by *Dunaliella bioculata*. *J Basic Microbiol* 27(8): 419-425

Akimoto M, Shirai A, Ohtaguchi K, Koide K (1998) Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Appl Biochem Biotechnol* 73: 269-278

Aldesuquy HS, Abdel-Fattah GM, Baka ZA (2000) Changes in chlorophyll, polyamines and chloroplast ultrastructure of *Puccinia striiformis* induced "green islands" on detached leaves of *Triticum aestivum*. *Plant Physiol Biochem* 38: 613-620

Al-Hasan RH, Hantash FM, Radwan SS (1991) Enriching marine macroalgae with eicosatetraenoic (arachidonic) and eicosapentaenoic acids by chilling. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 530-535

Altman A, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1977) Stabilization of oat leaf protoplast through polyamine mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol* 60: 892-896

Altman A, Levin N (1993) Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiol Plant* 89: 653-658



Andersen SE, Bastola DR, Minocha SC (1998) Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol* 116: 299-307

Antia NJ (1980) Nutritional physiology and biochemistry of marine cryptomonads and chryomonads. En: Levandowsky M, Hunter SH (Eds) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Academic Press, New York, pp, 67-115

Antia NJ, Cheng JY, Foyle RAJ, Percival E (1979) Marine cryptomonad starch from autolysis of glycerol grown *Chroomonas salina*. *J Phycol* 15:57-62

Antia NJ, Kalley JP, McDonald J, Bisalputra T (1973) Ultrastructure of the marine cryptomonad *Chroomonas salina* cultured under conditions of photoautotrophy and glycerol heterotrophy. *J Protozool* 20: 377-385

Araki ST, Sakurai T, Omata T, Kawaguchi A, Murata N (1986a) Lipid and fatty acid composition in the red alga *Porphyra yezonensis*. *Jap J Phycology* 34: 94-100

Araki ST, Sakurai T, Oohusa T, Kayama M (1986b) Component fatty acid of lipid from *Gracilaria verrucosa*. *Bull Jap Soc Sci Fich* 52: 1871

Augier H (1978) Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. Applications, conclusions, bibliographie. *Bot Mar* 21: 175-197

Aurisiano N, Bertani A, Mattana M, Reggiani R (1993) Abscisic acid induced stress-like polyamine pattern in wheat seedlings, and its reversal by potassium ions. *Physiol Plant* 89: 687-692

Azcón-Bieto J, Talón M (1993) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. MacGraw-Hill. Interamericana de España

Badini L, Pitocchi R, Bagni N (1994) Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta) *J Phycol* 30: 599-605

Bagni N, Serafini-Fracassini D, Torrigiani P (1982) Polyamines and cellular growth processes in higher plants. En: Wareing PF (Ed) *Plant Growth Substances*. Academic Press, London, pp 473-482

Bajaj S, Rajam MV (1995) Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. *Plant Cell Rep* 14: 717-720

Banaimoon SA (1992) Fatty acids in marine macroalgae from southern Yemen (Hadramount) including occurrence of eicosatetraenoic (20:4) and eicosapentaenoic (20:5) acids. *Bot Mar* 35: 165-168

Baquerisse D, Nouals S, Isamberst A, Ferreira dos Santos P, Durand G (1999) Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. *J Biotechnol* 70: 335-342

Balestri E, Piazzzi L, Cinelli F (1998) *In vitro* germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquat Bot* 60: 89-93

Barclay WR, Terry KL, Nagle NJ, Weissman JC, Goebel RP (1987) Potential of new strains of marine and saline-adapted microalgae for aquaculture. *J World Aquaculture Society* 18: 218-228

Barclay WR, Meager KM, Abril JR (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycol* 6: 123-129

Barrow KD, Karsten U, King RJ, West JA (1995) Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales)- a chemosystematic study. *Phycologia* 34: 279-283

Ben-Amotz A, Avron M (1983a) Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann Rev Microbiol* 37: 95-119

Ben-Amotz A, Avron M (1983b) On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 72: 593-597

Ben-Amotz A, Grunwald T (1981) Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. *Plant Physiol* 67: 613-616

Ben-Amotz A, Tornabene TG, Thomas WH (1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol* 21: 72-81

Belmans D, van Laere A (1987) Glycerol cycle enzymes and intermediates during adaptation of *Dunaliella tertioleca* cells to hyperosmotic stress. *Plant Cell Environ* 10: 184-190

Bernet E, Claparols I, Santos M<sup>a</sup>A, Torné JM<sup>a</sup> (1998) Role of putrescine metabolic pathways in the differentiation process of maize meristematic callus. *Plant Physiol Biochem* 36(10): 759-766

Bernet E, Claparols I, Dondini L, Santos M<sup>a</sup>A, Serafini-Fracassini D, Torné JM<sup>a</sup>, (1999) Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxilases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplast. *Plant Physiol Biochem* 37(12): 899-909

Biondi S, Hagège D, Rossini P, Bagni N (1993) Polyamine metabolism and ethylene biosynthesis in normal and habituated sugar beet callus. *Physiol Plant* 89: 699-706

BioScience (1996) Marine Biotechnology Special Issue, pp. 46

Bird KT, Jewett-Smith J (1994) Development of a medium and culture system for *in vitro* propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Can J Bot* 72: 1503-1510

Bisson MA, Kirst GO (1979) Osmotic adaptation in the marine alga *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae): the role of ions and organic compounds. *Aust J Plant Physiol* 6: 523-538

Bisson MA, Kirst GO (1995) Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften* 82: 461-471

Blackwell JR, Gilmour DJ (1991) Physiological response of unicellular green alga *Chlorococcum submarinum* to rapid changes in salinity. *Arch Microbiol* 157(1): 86-91

Blight EG, Dyer WI (1959) A rapid method of total lipids extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917

Blunden G, Gorgon SM (1986) Betaines and their sulphonio analogues in marine algae. En: Round FE, Chapman DJ (Eds) Progress in Phycological Research, Biopress, Bristol, pp 39-80

Borowitzka MA (1986) Micro-algae as sources of fine chemicals. Microbiol Sci 3(12): 372-375

Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J Biotechnol 70: 313-321

Box GEP, Behnken DW (1969) Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2: 455-475

Braden LM, Carroll KK (1986) Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. Lipids 21: 285-288

Bradley PM, Cheney DP (1990) Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardiella subulata* (Gigartinales Rhodophyta) Hydrobiologia. 204/205: 353-360

Bradley PM (1991) Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. J Phycol 27: 317-321

Broberg A, Kenne L, Pedersén M (1998) In-situ identification of mayor metabolites in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. Planta 206: 300-307

Brown DC, Leung DW, Thorpe TA (1979) Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol Plant 46: 36-41

Carlson SE (1996) Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids. *J Nutr* 126: 1092-1098

Cartens M, Molina Grima E, Robles Medina A, Giménez Giménez A, Ibáñez González J (1996) Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *JAOCS* 73(8): 1025-1031

Certik M, Shimizu S (1999) Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng* 87(1): 1-14

Chen F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14: 421-426

Chen F, Johns MR (1991) Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phycol* 3: 203-209

Chen LCM, Taylor ARA (1978) Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Can J Bot* 56: 883-886

Cheng JY, Antia NA (1970) Enhancement by glycerol of phototrophic growth of marine planktonic algae and its significance to the ecology of glycerol pollution. *J Fish Res Board of Canada* 27: 335-346

Cheung PCK, Leung AYH, Ang Jr PO (1998) Comparison of supercritical carbon dioxide and soxhlet extraction of lipids from a brown seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *J Agric Food Chem* 46: 4228-4232

Chibi F, Angosto T, Garrido D, Mantilla AJ (1993) Requirement of polyamines for *in-vitro* maturation of the mid-binucleate pollen of *Nicotiana tabacum*. J Plant Physiol 142: 452-456

Chibi F, Mantilla AJ, Angosto T, Garrido D (1994) Changes in polyamine synthesis during anther development and pollen germination in tobacco (*Nicotiana tabacum*) Physiol Plant 92: 61-68

Chini Zitelli G, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR (1999) Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. J Biotechnol 70: 299-312

Christie WW (1973) Lipid Analysis. Pergamon Press, Oxford – New York

Chu WL, Phang SM, Goh SH (1996) Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. J Appl Phycol 8: 389-396

Cohen E, Arad S, Heimer YH, Mizrahi Y (1984) Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. Plant Physiol 74: 385-388

Cohen Z, Vonshak A, Richmond A (1987) The effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*. En: Stumpf PK, Mudd JB, Nes WD (Eds) Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids. Plenum Press, New York, pp 641-644

Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T (2000) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. En: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (Eds) Biochemistry Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, pp 850-929

Das S, Bose A, Ghosh B (1995) Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*. *Phytochemistry* 39(2): 283-285

Dawes CJ, Kovach C, Friedlander M (1993) Exposure of *Gracilaria* to various environmental conditions II. The effect on fatty acid composition. *Bot Mar* 36: 289-296

De Koning W, Harder W, Dijkhuizen L (1987) Glycerol metabolism in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: phosphorylation as the initial step. *Arch Microbiol* 148: 314-320

Del Duca S, Dondini L, Della Mea M, Munoz de Rueda P, Serafini-Fracassini D (2000) Factors affecting transglutaminase activity catalysing polyamine conjugation to endogenous substrates in the entire chloroplast. *Plant Physiol Biochem* 38(6): 429-439

Dembisky VM, Pechenkina-Shubina EE, Rozentsvet OA (1991) Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the Black Sea. *Phytochemistry* 30(7): 2279-2283

De Pauw N, Persoone G (1988) Micro-algae for aquaculture. En: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (Eds.) *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge, pp 257-287

De Swaaf ME, De Rijk TC, EggEnk G, Sijtsma L (1999) Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol* 70: 185-192



Droop MR (1974) Heterotrophy of carbon. En: Stewart WDP (Ed) Algal Physiology and Biochemistry, Botanical Monographs, Vol. 10. Berkeley, University of California Press, pp 530-559

Dörnemann D, Navakoudis E, Kotzabasis K (1996) Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment. J Photochem Photobiol B: Biology 36: 293-299

Dubinsky Z, Falkowsky PG, Wyman K (1986) Light harvesting and utilization by phytoplankton. Plant Cell Physiol 27: 1335-1349

Egea-Cortines M, Cohen E, Arad S, Bagni N, Mizrahi Y (1993) Polyamine levels in pollinated and auxin-induced fruit tomato (*Lycopersicon esculentum*) during development. Physiol Plant 87: 14-20

Ekman P, Yu S, Pedersen M (1991) Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content,  $\alpha$ -galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. Br Phycol J 26: 123-131

Endo H, Hosoya H, Koibuchi T (1977) Growth yield of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous culture using acetate. J Ferment Technol 55: 369-379

Escribano MI, Aguado P, Reguera RM, Merodio C (1996) Conjugated polyamine levels and putrescine synthesis in cherimoya fruit during storage at different temperatures. J Plant Physiol 147: 736-742

---

Evans ML (1984) Functions of hormones at the cellular level of organization. En: Scott TK (Ed.) Encyclopedia of Plant Physiol. New Series, vol 10. Springer-Verlag, Berlin

Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol* 40: 235-269

Evans LV, Trewavas AJ (1991) Is algal development controlled by plant growth substances? *J Phycol* 27: 322-326

Faivre-Rampant O, Kevers C, Dommes J, Gaspar T (2000) The recalcitrance to rooting of the micropropagated shoots of the *rac* tobacco mutant: implications of polyamines and of the polyamine metabolism. *Plant Physiol Biochem* 38(6): 441-448

Falkowsky PG, Dubinsky Z, Wyman K (1985) Growth irradiance relationship in marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30: 310-313

Falkowski PG, Sukenik A, Herzig R (1989) Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae) II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J Phycol* 25: 471-478

Faure O, Mengoli G, Nugerede A, Bagni N (1991) Polyamine patterns and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol* 138: 545-549

Fleurence J, Gutbier G, Mabeau S, Leray C (1994) Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *J Appl Phycol* 6: 527-532

- Flores HE, Galston AW (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol* 69: 701-706
- Flores HE, Galston AW (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* 75: 102-109
- Flores HE (1990) Polyamines and plant stress. En: Flores HE (Ed) *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatation Mechanism*. Wiley-Liss Inc., New York, pp 217-239
- Floreto EAT, Teshima S (1998) The fatty acid composition of seaweeds exposed to different levels of light and salinity. *Bot Mar* 41: 467-481
- Folch JK Lee M Sloame-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
- Fries L (1963) On the cultivation of axenic red algae. *Physiol Plant* 16: 695-708
- Fries L (1973) Requirements for organic substances in seaweeds. *Bot Mar* 16: 19-31
- Fries L (1977) Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenilacetic acid on *Fucus spiralis* in axenic culture. *Phycologia* 16: 451-455
- Fries L (1980) Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (Phaeophyta) *J Phycol* 16: 475-477

- Fries L (1984) Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of *Fucus spiralis*. Can J Bot 62: 1616-1620
- Gallardo M, Gallardo ME, Mantilla AJ, Muñoz de Rueda P, Sánchez-Calle MI (1994) Inhibition of polyamine synthesis by cyclohexylamine stimulates the ethylene pathway and accelerates the germination of *Cicer arietinum* seeds. Physiol Plant 91: 9-16
- Galston AW, Kaur-Sawhney R (1990) Polyamines in Plant Physiol. Plant Physiol 94: 406-410
- Galston AW, Kaur-Sawhney R (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. En: Davies PJ (Ed) Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, Ed 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp, 390-178
- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. Bot Acta 110: 198-207
- García Camacho F, Contreras Gómez A, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (1999) Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. Enzyme Microb Technol 24: 164-172
- García-Jiménez P (1994) Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo *in vitro* del alga *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe (Rhodophyta) Tesis Doctoral sin publicar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de GC. 338 pp

García-Jiménez P, Robaina RR, Luque A, Tsekos I (1996) Glycerol-activated cellular division and biosynthetic activity during growth and morphogenesis of carpospore seedlings of *Grateloupia doryphora* (Cryptonemiales, Rhodophyta) *Phycologia* 35(3): 261-269

García-Jiménez P, Rodrigo M, Robaina RR (1998) Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia doryphora* cultured *in vitro*. *J Appl Phycol* 10: 95-100

García Sánchez JL, Molina Grima E, García Camacho F, Sánchez Pérez JA, López Alonso D (1994) Estudio de macronutrientes para la producción de PUFAs a partir de la microalga marina *Isochrysis galbana*. *Grasas y Aceites* 45(5): 323-331

García Sánchez JL, Sánchez Pérez JA, García Camacho F, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (1996) Optimization of light and temperature for growing *Chlorella* sp. using response surface methodology. *Biotech Tech* 10(5): 329-334

Gaspar T, Kevers C, Hausman JF (1997) Indissociable chief actors in the inductive phase of adventitious rooting. En: Altman A, Waisel Y (Eds) *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press, New York, pp 55-64

Gerats AGM, Keye C, Collins C, Malmberg RL (1988) Polyamine level in *Petunia* genotypes with normal and abnormal floral morphologies. *Plant Physiol* 86: 390-393

Gill I, Valivety R (1997) Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *TIBTECH* 15: 401-409

Giménez Giménez A, Ibáñez González MJ, Robles Medina A, Molina Grima E, García Salas S, Esteban Cerdán L (1998) Downstream processing and purification of eicosapentenoic (20:5n3) and arachidonic acids (20:4n6) from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Bioseparation* 7: 89-99

Ginzbur M (1987) *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv Bot Res* 14: 183-193

Gladue RM (1991) Heterotrophic microalga production: Potential for application to aquaculture feeds. En: Fulks W. Main KL (Eds) *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. Oceanic Institute, Honolulu, pp 275-286

Glazer AN, Chan CF, Karsten U, West JA (1994) Salinity tolerance, biliproteins, and floridoside content of *Compsopogon coeruleus* (Rhodophyta) *J Phycol* 30: 457-461

Gong X, Chen F (1998) Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry* 33(4): 385-391

Gurr MI (1971) The biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in plants. *Lipids* 6(4): 266-273

Gusev MV, Tambiev AH, Kirikova NN, Shelyastina NN, Aslanyan RR (1987) Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. *Marine Biology* 95: 593-597

Hamana K, Matsuzaki S (1982) Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukariotic algae. *J Biochem* 91: 1321-1328

Hamana K, Matsuzaki S (1985) Further study on polyamines in primitive unicellular eukaritic algae. *J Biochem* 97: 1311-1315

Hamana K, Miyagawa K, Matsuzaki S (1983) Occurrence of sym-homospermidine as the mayor polyamine in notrogen-fixing cyanobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 606-613

Hamana K, Matsuzaki S, Niitsu M, Samejima K, Nagashima H (1990) Polyamines of unicellular thermoacidophilic red alga *Cyanidium caldarium*. *Phytochemistry* 29: 377-380

Harkess RL, Lyons RE, Kushad MM (1992) Floral morphogenesis in *Rudbeckia hirta* in relation to polyamine concentration. *Physiol Plant* 86: 575-582

Harwood JL, Jones AL (1989) Lipid metabolism in algae. *Advances in Botanical Research* 16: 1-47

Hausman JF, Kevers C, Gaspar T (1994) Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. *Physiol Plant* 92: 201-206

Hellebust J (1976) Osmoregulation. *Ann Rev Plant Physiol* 27: 485-505

Henderson RJ, Mackinlay EE (1989) Effect of temperature on lipid composition of the marine Cryptomonad *Chroomonas salina*. *Phytochemistry* 28(11): 2943-2948

Hennion F, Martin-Tanguy J (2000) Amines of the subantartic crucifer *Pringlea antiscorbutica* are responsive to temperature conditions. *Physiol Plant* 109: 232-243

Herzig R, Falkowski PG (1989) Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae) I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *J Phycol* 25: 462-471

Holton RW, Blecker HH, Onore M (1964) Effect of growth temperature on the fatty acid composition of a blue-green algae. *Phytochemistry* 3: 595-599

Hongliang W, Chenglie Z, Houguo L (1995) Seasonal changes of polyamines in habitat adaptation of different ecotypes of reed plants. *Oecologia* 101: 119-123

Honya M, Kashiwabara Y, Nisizawa K (1992) Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -radioactivity into various lipid classes at different growth-stages of cultured *Laminaria japonica*. *J Appl Phycol* 4: 189-195

Honya M, Kashiwabara Y, Nisizawa K (1994) Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -radioactivity into lipid classes at different maturity of *Laminaria japonica* Aresch. cultured under natural and partially controlled conditions. *Hydrobiologia* 260/261: 621-625

Hopkins WG (1995) *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley Sons, Inc.

Ireland CM, Copp BR, Foster MD, McDonald LA, Radinsky DC, Swersey JC (1993) Biomedical potential of marine natural products. En: Attaway DH, Zaborsky OR (Eds.), *Marine Biotechnology. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, vol 1. Plenum Press, New York, pp 1-43

Ivanova AP, Robaina RR, Martín J, Stefanov KL (1999) Effect of glycerol on the lipids in the red alga *Grateloupia doryphora*. *Grasas y Aceites* 50(6): 469-471



Johns RB, Nichols PD, Perry GJ (1979) Fatty acids composition of ten marine algae from Australian water. *Phytochemistry* 18: 799-806

Jones AL, Harwood JL (1993) Lipids and lipid metabolism in the marine alga *Enteromorpha intestinalis*. *Phytochemistry* 34(4): 969-972

Kaczyna F, Menget R (1993) The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyta) *Hydrobiologia* 268: 57-64

Kakkar RK, Rai VK, Nagar PK (1998) Polyamine uptake and translocation in plants. *Biol Plantarum* 40: 481-491

Kakkar RK, Bhaduri S, Rai VK, Kumar S (2000) Amelioration of NaCl stress by arginine in rice seedlings: changes in endogenous polyamines. *Biol Plantarum* 43(3): 419-422

Kao CH (1997) Physiological significance of stress-induced changes in polyamines in plants. *Bot Bull Acad Sin* 38: 141-144

Karsten U, Thomas DN, Weykam G, Daniel C, Kirst GO (1991) A simple and rapid method for extraction and separation of low molecular weight carbohydrates from macroalgae using high-performance liquid chromatography. *Plant Physiol Biochem* 29(4): 373-378

Karsten U, Barrow KD, King RJ (1993) Floridoside L-isofloridoside and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina*. *Plant Physiol* 103: 485-491

Karsten U (1999) Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. *New Phytol* 143: 561-571

Karsten U, West JA, Zuccarello GC, Nixdorf O, Barrow KD, King RJ (1999) Low molecular weight carbohydrate patterns in the bangiophyceae (Rhodophyta) *J Phycol* 35: 967-976

Kaur-Sawhney R, Shih LM, Galston AW (1982) Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol* 69: 411-415

Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Galston AW (1988) Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 173: 282-284

Kaur-Sawhney R, Applewhite PB (1993) Endogenous protein-bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. *Plant Growth Regul* 12: 223-227

Kauss H (1967) Metabolism of isofloridoside (O- $\alpha$ -D-galactopyranoyl-(1-1)-glycerol) and osmotic balance in the fresh water alga *Ochromonas*. *Nature* 214: 1129-1130

Kauss H (1968) *Z Pflanzenphysiol* 58: 428-433

Kauss H (1969) *Ber Dtsch Bot Ges* 82: 115-125

Kauss H (1978) Osmotic regulation in algae. *Progr Phytochem* 5: 1-27

Kayama M, Iijima N, Sado T, Mankura M, Araki S, Sakurai T (1986) *De novo* synthesis and conversion of fatty acids in *Porphyra*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 52: 575-583

- Kayama M, Iijima N, Kuwahara M, Sado T, Araki S, Sakurai T (1985) Effect of water temperature on the fatty acid composition of *Porphyra*. Bull Jpn Soc Sci Fish 51: 687-692
- Kevers C, Le Gal N, Monteiro M, Dommes J, Gaspar T (2000) Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. Plant Growth Regul 31: 209-214
- Khotimchenko SV, Levchenko EV (1997) Lipids of the red alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. Bot Mar 40: 541-545
- Khotimchenko SV, Vaskovsky VE (1990) Distribution of C<sub>20</sub> polyenoic fatty acids in red macrophytic algae. Bot Mar 33: 525-528
- Khotimchenko SV, Vaskovsky VE, Przhemenetskaya VF (1991) Distribution of eicosapentaenoic and arachidonic acids in different species of *Gracilaria*. Phytochemistry 30(1): 207-209
- Kirst GO (1975) Correlation between content of mannitol and osmotic stress in the brackish-water alga *Platymonas subcordiformis*. Z Pflanzenphysiol 76: 316-325
- Kirst GO (1980a) Low MW carbohydrates and ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. Phytochemistry 19: 1107-1110
- Kirst GO (1980b) Mannitol accumulation in *Platymonas subcordiformis* after osmotic stresses and the effect of inhibitors. Z Pflanzenphysiol 98: 35-42

Kirst GO (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 21-53

Kirst GO (2001) Biological roles of dimethylsulphide (DMS) and dimethylsulphonioacetate (DMSP) *Phycologia* 40(4), supplement

Klyachko-Gurvich GL, Tsoglin LN, Doucha J, Kopetskii J, Shebalina (Ryabyhk) IB, Semenenko VE (1999) Desaturation of fatty acids as an adaptative response to shifts in light intensity. *Physiol Plant* 107: 240-249

Kneifel H (1979) Amines in algae. En: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (Eds.) *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin – New York, pp 365-396

Koleztko B, Decsi T, Demmelair H (1996) Arachidonic acid supply and metabolism in human infants born at full term. *Prog Lipid Res* 30: 39-103

Krebsky EO, Geuns JMC, De Proft M (1999) Polyamines and sterols in *Cichorium* heads. *Phytochemistry* 50: 549-553

Kremer BP, Kirst GO (1981) Biosynthesis of 2-O-D-glycerol- $\alpha$ -D-galactopyranoside (Floridoside) in marine *Rhodophyceae*. *Plant Sci Lett* 23: 349-357

Kumar A, Altabella T, Taylor MR, Tiburcio AF (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* 2: 124-130

Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA (1989) *Biology of seagrasses: a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region*. Elsevier, Amsterdam

Lee TF (1985) Aposporous gametophyte formation in stipe explants from *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) Bot Mar 28: 179-185

Lee TM (1998) Investigations of some intertidal green macroalgae to hyposaline stress: Detrimental role of putrescine under extreme hyposaline conditions. Plant Sci 138: 1-8

Lee TM, Chen MH (1998) Hyposaline effect on polyamine accumulation in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). Bot Bull Acad Sin 39: 167-174

Lee TM, Chu C (1992) Ethylene-induced polyamine accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. Physiol Plant 100: 238-245

Lee YK, Tan HM, Low CS (1989) Effect of salinity of medium on cellular fatty acid composition of marine alga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) J Appl Phycol 1: 19-23

Lepage G, Roy CC (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J Lipid Res 25: 1391-1396

Lewitus AJ, Caron DA (1990) Relative effects of nitrogen or phosphorous depletion and light intensity on the pigmentation chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae) Mar Ecol Prog Ser 61: 171-181

Lewitus AJ, Caron DA (1991a) Physiological responses of phytoflagellates to dissolved organic substrate additions. 1. Dominant role of heterotrophic nutrition in *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) Plant Cell Physiol 32(5): 671-680

Lewitus AJ, Caron DA (1991b) Physiological responses of phytoflagellates to dissolved organic substrate additions. 2. Dominant role of autotrophic nutrition in *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae) *Plant Cell Physiol* 32(6): 791-801

Lewitus AJ, Caron DA, Miller KR (1991) Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae) *J Phycol* 27: 578-587

Loquès F, Caye G, Meinesz A (1990) Axenic culture of selected tissue of *Posidonia oceanica*. *Aquat Bot* 37: 171-188

Macler BA (1986) Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red alga, *Gelidium coulteri*. *Plant Physiol* 82: 136-141

Macler BA (1988) Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation, and nitrogen assimilation in the red alga, *Gelidium coulteri*. *Plant Physiol* 88: 690-694

Markager S, Sand-Jensen K (1990) Heterotrophic growth of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) *J Phycol* 26: 670-673

Martin-Tanguy J (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* 100: 675-688

Marton LJ, Pegg AE (1995) Polyamines as target for therapeutic interventions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 55-91

McKeon TA, Stumpf PK (1982) Purification and characterization of the stearyl-acyl carried protein desaturase and the acyl-carrier protein thioesterase from maturing seeds of Safflower. *J Biol Chem* 257: 12141-12147

Meng J, Rosell KG, Srivastava LM (1987) Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforata*. *Carbohydr Res* 161: 171-180

Meng J, Srivastava LM (1993) Variations in floridoside content and floridoside phosphate synthase activity in *Porphyra perforata* (Rhodophyta) *J Phycol* 29: 82-84

Molina Grima E, Sánchez Pérez JA, García Sánchez JL, Gracia Camacho F, López Alonso D (1992) EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem* 27: 299-305

Molina Grima E, Robles Medina A, Giménez Giménez A, Ibañez González MJ (1996) Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *J Appl Phycol* 8: 359-367

Molina Grima E, Gracia Camacho F, Sánchez Pérez JA, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM (1997) Growth yield determination in a chemostat culture of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J Appl Phycol* 8: 529-534

Montgomery DC (1991) Métodos y diseños de superficie de respuesta. En: *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana SA (Ed.) México, pp 467-509

Mooney PA (1983) Cytokinins in *Sargassum heterophyllum* under natural and *in vitro* conditions. M.Sc. Thesis. University of Natal, South Africa

Mortensen SH, Borsheim KY, Rainuzzo RR, Knutsen G (1988) Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J Exp Mar Biol Ecol* 122: 173-185

Mostaert AS, Orlovich DA, King RJ (1996) Ion compartmentation in the red alga *Caloglossa leprieurii* in response to salinity changes: Freeze-substitution and X-ray microanalysis. *New Phytol* 132(3): 513-519

Munda IM, Kremer BP (1977) Chemical composition and physiological properties of fucoids under conditions of reduced salinity. *Mar Biol* 42: 9-15

Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, Battershill CN, Duckworth AR (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J Biotechnol* 70: 15-25

Neilson AH, Lewin RA (1974) The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia* 13: 227-264

Nestel PJ (1988) Reassessment of the role of polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease. *Food Technol in Aust* 40: 225-257

Nichols BW, Appleby RS (1969) The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. *Phytochemistry* 8: 1907-1915

Nordoy A (1991) Is there a rational use for n-3 fatty acids (fish oils) in clinical medicine? *Drugs* 42: 331-342

Nyberg H (1985) The influence of ionic detergents on the phospholipid fatty acid compositions of *Porphyridium purpureum*. *Phytochemistry* 24: 435-440



Okumura M, Ii S, Fujii R, Araki H. August 1986. Japan patent 61177990. En: Yongmanitchai W, Ward OP (1991) Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 57(2): 419-425

Opute FI (1974) Lipid and fatty acid composition of diatoms. *J Exp Bot* 25: 823-835

Orcutt DM, Patterson GW (1974) Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*) *Lipids* 9: 1000-1003

Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci* 258(3): 291-299

Pearson GA, Brawley SH (1998) A model for signal transduction during gamete release in the furoid alga *Pelvetia compressa*. *Plant Physiol* 118: 305-313

Pedroso MC, Primikiriou N, Roubelakis-Angelakis KA, Pais MS (1997) Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiol Plant* 101: 213-219

Pegg AE (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234: 249-262

Pettit TR, Harwood JL (1989) Alterations in lipid metabolism caused by illumination of the marine red algae *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*. *Phytochemistry* 28(12): 3295-3300

Pettit TR, Jones AL, Harwood JL (1989) Lipid metabolism in the red marine algae *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa* as modified by temperature. *Phytochemistry* 28: 2053-2058

Ping Y, Houliang G, Kaiyao, H (1998) Nitrogen-fixing inhibition by KCl in a blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Wuhan Univ J Nat Sci* 3(2): 239-242

Piorreck M, Baasch K, Pohl P (1984) Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of fresh-water green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23: 207-216

Plumley FG, Schmidt GW (1989) Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 2678-2682

Pohl P, Zurheid F (1979) Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. En: Hoppe HA, Levring HA, Tanaka Y (Eds) *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Vol 2. Walter de Gruyter, Berlin, pp 433-523

Pohl P, Kohlhase M, Martin M (1988) Photobioreactors for the axenic mass cultivation of microalgae. *Algal Biotechnol* 209-217

Polne-Fuller M, Gibor A (1987) Callus and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia* 151(2): 131-138

Predieri S, Krizek DT, Wang CY, Mirecki RM, Zimmerman H (1993) Influence of UV-B radiation on developmental changes, ethylene, CO<sub>2</sub> flux and polyamines in cv. Doyenne d'Hiver pear shoots grown *in vitro*. *Physiol Plant* 87: 109-117

- Qi H, Rorrer GL (1995) Photolithotropic cultivation of *Laminaria saccharina* Gametophyte cells in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 45: 251-260
- Radwan SS (1991) Sources of C<sub>20</sub>-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 421-430
- Ramavat BK, Pazdro K, Kosakowska A, Pempkowiak J (1997) Fatty acids content in seaweeds from the Baltic Sea and the Indian Ocean. *Oceanologia* 39(3): 279-287
- Rambjor GS, Walen AI, Windsor SL, Harris WS (1996) Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oils in humans. *Lipids* 31(Suppl S): 45-49
- Reboloso Fuentes MM, García Sánchez JL, Fernández Sevilla JM, Ación Fernández FG, Sánchez Pérez JA, Molina Grima E (1999) Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *J Biotechnol* 70: 271-288
- Reed RH, Collins JC, Russell G (1980) The effects of salinity upon galactosyl glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea*. *J Exp Bot* 31: 1539-1554
- Reed RH (1985) Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta, Bangiales): the osmotic role of floridoside. *Br Phycol J* 20: 211-218
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol* 30: 972-979

Rey M, Díaz-Sala C, Rodríguez R (1994) Comparison of endogenous polyamine content in hazel leaves and buds between the annual dormancy and flowering phases of growth. *Physiol Plant* 91: 45-50

Richmond A, Vonshak A (1991) Preface of the special issue of *Biores Technol* 38: 83-84

Robaina RR (1988) Biotecnología del cultivo *in vitro* de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis Doctoral sin publicar. Universidad Politécnica de Canarias. Las Palmas de GC. 230 pp

Robaina RR, García-Reina G, Luque A (1990a) The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia* 204/205: 137-142

Robaina RR, García P, García-Reina G, Luque A (1990b) Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *J Appl Phycol* 2: 137-143

Robaina RR, García-Jiménez P, Brito I, Luque A (1995) Light control of the respiration of exogenous glycerol in the red macroalga *Grateloupia doryphora*. *Eur J Phycol* 30: 81-86

Robaina RR, García-Jiménez P, Luque A (1996) Light and glycerol driven development of *Grateloupia doryphora* (Rhodophyta) *in vitro*. *Sci Mar* 60: 283-289

Roberts DR, Dumbroff EB, Thompson JE (1986) Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves. A basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* 167: 395-401

Robles Medina A, Molina Grima E, Giménez Giménez A, Ibáñez González MJ (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol Adv* 16 (3): 517-580

Robles Medina A, Esteban Cerdán L, Giménez Giménez A, Camacho Páez B, Ibáñez González MJ, Molina Grima E (1999) Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *J Biotechnol* 70: 379-391

Rodrigo Sanz M (1998) Sustancias reguladoras, fotofisiología y diferenciación celular (tetrasporogénesis) durante los Estadios de crecimiento *in vitro* del alga roja *Grateloupia doryphora*. Tesis Doctoral sin publicar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 220 pp

Roessler PG (1990) Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J Phycol* 26: 393-399

Ruiz OA, Bortolli C, Masgrau C, Tiburcio AF, Altabella T (2000) Molecular forms of arginine decarboxylase in oat leaves. *Physiol Plant* 108: 370-375

Saga N, Motomura T, Sakai Y (1982) Induction of callus from the marine brown alga *Dictyosiphon foeniculaceus*. *Plant Cell Physiol* 23: 727-730

Sánchez Pérez JA (1994) n-3 polyunsaturated fatty acid productivity of the microalga *Isochrysis galbana*. Growth conditions and phenotypic selection. *J Appl Phycol* 6: 475-478

Sand-Jensen K (1988a) Minimum light requirements for growth in *Ulva lactuca*. *Mar Ecol Prog Ser* 50: 187-193

Sand-Jensen K (1988b) Photosynthetic responses of *Ulva lactuca* at very low light. *Mar Ecol Prog Ser* 50: 195-201

Sato N, Murata N, Miura Y, Ueta N (1979) Effect of growth temperature on lipid and fatty acid composition in the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. *Biochem Biophys Acta* 572: 19-25

Scaramagli S, Bueno M, Torrigiani P, Altamura MM, Capitani F, Bagni N (1995) Morphogenesis in cultured thin layers and pith explants of tobacco. II. Early hormone-modulated polyamine biosynthesis. *J Plant Physiol* 147: 113-117

Scoccianti V, Sgarbi E, Fraternali D, Biondi S (2000) Organogenesis from *Solanum melongena* L (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. *Protoplasma* 211: 51-63

Schneider JC, Roessler P (1994) Radiolabeling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga. *J Phycol* 30: 594-598

Schubert F, Hong K, Düzgünes N, Papahadjopoulos D (1983) Polyamines as modulators of membrane fusion: aggregation and fusion of liposomes. *Biochemistry* 22: 6134-6140

Scoccianti V, Sgarbi E, Fraternali D, Biondi S (2000) Organogenesis from *Solanum melongena* L (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. *Protoplasma* 211: 51-63

- Senzaki H, Iwamoto S, Ogura E, Kiyozuka Y, Arita S, Kurebayashi J, Takada H, Hioki K, Tsubura A (1998) Dietary effects of fatty acids on growth and metastasis of KPL-1 human breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Anticancer Res* 18: 1621-1627
- Seto A, Wang HL, Hesseltine CW (1984) Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *JAOCS* 61(5): 892-894
- Shabala S, Babourina O, Newman I (2000) Ion-specific mechanism of osmoregulation in bean mesophyll cells. *J Exp Bot* 51: 1243-1253
- Shi XM, Liu HJ, Zhang XW, Chen F (1999) Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochem* 34: 341-347
- Sicko-Goad L, Andresen NA (1991) Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J Phycol* 27: 710-718
- Simopoulos AP (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54: 438-463
- Sing MD, Chandra MD (1988) Biochemical and cellular effects of fish and fish oils. *Prog Food Nutr Sci* 12: 371-419
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys* 235(2): 283-303
- Slocum R, Galston AW (1985) *In vivo* inhibition of polyamine biosynthesis and growth in tobacco ovary tissues. *Plant Cell Physiol* 26: 1519-1526

- Smith TA (1971) The occurrence metabolism and functions of amines in plants. *Biol Rev* 46: 201-241
- Smith TA (1985) Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 117-143
- Smith KL, Bryan GW, Harwood JL (1982) Phospholipid metabolism in the brown alga *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 21: 569-573
- Smith KL, Harwood JL (1984a) Lipid metabolism in *Fucus serratus* as modified by environmental factors. *J Exp Bot* 35: 1359-1368
- Smith KL, Harwood JL (1984b) Lipids and lipid metabolism in the brown alga *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 23: 2469-2473
- Spector AA (1999) Essentiality of fatty acids. *Lipids* 34: S1-S3
- Stefanov K, Seizova K, Elenkiov I, Kuleva L, Popov S, Dimitrova-Konaklieva S (1994) Lipid composition of the red alga *Chondria tenuissima* (Good et Wood.) Ag., Inhabiting waters with different salinities. *Bot Mar* 37: 445-447
- Stoop JMH, Williamson JD, Pharr DM (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci* 1(5): 139-144
- Sukenik A, Zmora O, Carmeli Y (1993) Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117: 313-326
- Sung HI, Liu LF, Kao CH (1994) The induction of  $\alpha$ -amylase activity by sucrose starvation in suspension-cultured rice cells is regulated by polyamines. *Physiol Plant* 91: 137-140



- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790
- Tan CK, Johns MR (1991) Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*. *Hydrobiologia* 215: 13-19
- Tassoni A, Antognoni F, Bagni N (1996) Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 110: 817-824
- Tassoni A, Antognoni F, Battistini ML, Sanvido O, Bagni N (1998) Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 117: 917-977
- Tassoni A, Van Buuren M, Franceschetti M, Bagni N (2000) Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiol Biochem* 38(5): 383-393
- Terrados J (1995) Effects of some plant growth regulators on the growth of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquat Bot* 51: 311-318
- Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, Hirata H (1983) Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 49: 805-810
- Theriault RJ (1965) Heterotrophic growth and production of xantophylls by *Chlorella pyrenoidosa*. *Appl Microbiol* 13: 402-416
- Thompson PA, Harrison PJ, Whyte JNC (1990) Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J Phycol* 26: 278-288

Thompson PA, Guo M, Harrison PJ, Whyte JNC (1992) Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol* 28: 488-497

Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1986) Polyamine metabolism and osmotic stress: II. Improvement oat protoplasts by an inhibitor of putrescine biosynthesis. *Plant Physiol* 82: 375-378

Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1988) Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. *Plant Cell Physiol* 29: 1241-1249

Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Bedford RT (1993) Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Regul* 12: 331-340

Torrigiani P, Altamura M<sup>a</sup>M, Pasqua G, Moncelli B, Serafini-Fracassini D, Bagni N (1987) Free and conjugated polyamines in floral bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiol Plant* 70: 453-460

Torrigiani P, Altamura M<sup>a</sup>M, Capitani F, Serafini-Fracassini D, Bagni N (1989) De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol Plant* 77: 294-301

Torrigiani P, Scoccianti V (1995) Regulation of cadaverine and putrescine levels in different organs of chick-pea seed and seedlings during germination. *Physiol Plant* 93: 512-518

Turpin DH, Elrifi IR, Birch DG, Weger HG, Holmes JJ (1988) Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Can J Bot* 66: 2083-2097

Van Baalan C, Pulich WM (1973) Heterotrophic growth of the microalgae. *Crit Rev Microbiol* 2: 229-255

Vanlerberghe G, Schuller KA, Smith RG, Feil R, Plaxton WC, Turpin DH (1990) Relationship between  $\text{NH}_4^+$  assimilation rate and *in vivo* phosphoenol pyruvate carboxylase activity: regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* 94: 284-290

Vazhappilly R, Chen F (1998) Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and alga-like microorganisms. *Bot Mar* 41: 553-558

Velikova VB, Yordanov IT, Georgieva KM, Tsonev TD, Goltsev V (1998) Effects of exogenous polyamines applied separately and in combination with simulated acid rain on functional activity of photosynthetic apparatus. *J Plant Physiol* 153: 299-307

Villanueva VR, Adlakha RC, Calvayrac R (1980) Biosynthesis of polyamines in *Euglena gracilis*. *Phytochemistry* 19: 787-790

Voigt J, Deinert B, Bohley P (2000) Subcellular localization and light-dark control of ornithine decarboxylase in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* 108: 353-360

Vona V, Martino-Rigano Vdi, Espisito S, Martino Cdi, Rigano C (1992) Growth, photosynthesis, respiration, and intracellular free amino acid profiles in

the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. Effect of nutrient limitation and resupply. *Physiol Plant* 85: 652-658

Weylandt KH, Kang JX, Leaf A (1996) Polyunsaturated fatty acids exert antiarrhythmic actions as free acids rather than in phospholipids. *Lipids* 31: 977-982

Wiencke C, Läuchli A (1981) Inorganic ions and floridoside as osmotic solutes in *Porphyra umbilicalis*. *Z Pflanzenphysiol* 103: 247-258

WHO/FAO (1977) Dietary fats and oils in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO, Rome, Italy

Wolff RL, Christie WW, Pédrone F, Marpeau AM (1999) Arachidonic, eicosapentaenoic, and biosynthetically related fatty acids in the seed lipids from a primitive Gymnosperm, *Agathis robusta*. *Lipids* 34(1): 1083-1097

Wood BJB, Grimson PHK, German JB, Turner M (1999) Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *J Biotechnol* 70: 175-183

Wright DC, Berg LR, Patterson GW (1980) Effect of cultural conditions on the sterols and fatty acids of green algae. *Phytochemistry* 19: 783-785

Xu X-Q, Tran VH, Kraft G, Beardall J (1998) Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia. *Phytochemistry* 48(8): 1335-1339

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

Ziboh VA (1991)  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid constituents of fish oil and the management of skin inflammatory and scaly disorders. En: Simopoulos AP. Kifer RR. Martin RE. Barlow SM (Eds) Health Effects of  $\omega$ 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods. *Word Rev Nutr Diet* 66: 425-435

Zimmermann U (1978) Physics of turgor and osmoregulation. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 121-148