

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.
ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE
AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU VARIACION
POR CONDICIONES DE CULTIVO**

JUANA ROSA BETANCORT RODRÍGUEZ

Las Palmas de Gran Canaria, septiembre de 1997

Título de la tesis:

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU VARIACION POR CONDICIONES DE CULTIVO

Thesis title:

DETERMINATION OF AMINOACIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY OF HI-RES. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY OF FREE AMINOACIDS IN SEAWEED AND THEIR VARIATION BY CONDITIONS OF CULTURE

Resumen

En el presente trabajo se establece un método analítico, usando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, para la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos libres en algas y se estudia la aplicación de surfactantes para la mejora del método. Se estudia el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la composición de aminoácidos libres, pigmentos y proteínas en la macroalga *Ulva rígida* y se comprobó que la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo provoca una disminución muy marcada los contenidos de clorofilas a y b, proteínas totales y aminoácidos libres y que estos actúan como almacenamiento de nitrógeno cuando éste está disponible en el medio, para ser utilizado posteriormente cuando las condiciones se vuelven limitantes. Además se estudia el efecto de la variación del perfil de aminoácidos de la microalga *Chlorella pyrenoidosa* variando la fuente de carbono y por otro lado variando la fuente de nitrógeno. Se comprueba que la fuente de carbono varía considerablemente el contenido total en aminoácidos libres, así como su perfil y que la limitación de CO₂ en los cultivos de *Chlorella* produce una reducción de los contenidos intracelulares de ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico y asparagina. El contenido total en aminoácidos libres alcanza su valor máximo para los cultivos con amonio, seguido de los de nitrato y por último con urea. Sin embargo, el perfil no se ve afectado por la naturaleza de la fuente nitrogenada. Se determinan las características espectrofluorimétricas convencionales del derivado OPA-lisina en presencia de los surfactantes Brij 35, Brij 96, POLE, TX-100, HDTAB, NaLS y se comparan con las obtenidas en medios acuosos. Se observa que todos los surfactantes empleados aumentan considerablemente la señal de fluorescencia del derivado, obteniéndose los valores más elevados para el TX-100 y el POLE. Se establece un método analítico, usando la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, para la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos en presencia del surfactante POLE. El método puesto a punto presenta una serie de ventajas con respecto al método en ausencia de surfactante, por una parte se redujeron los porcentajes de error en la determinación de todos los aminoácidos derivados, y por otra, se reducen los límites de detección de los aminoácidos lisina, histidina, y valina. El método propuesto se aplicó a una muestra del alga *Ulva rígida* cultivada en condiciones de invernadero. Con el empleo de surfactante se pueden determinar los aminoácidos glicina, tiroxina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, los cuales, en las mismas condiciones de cultivo, no pueden ser detectados por el método establecido en ausencia de POLE.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN. ESTUDIO CUALITATIVO Y
CUANTITATIVO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN
ALGAS Y SU VARIACIÓN POR CONDICIONES
DE CULTIVO**

JUANA ROSA BETANCORT RODRÍGUEZ

Las Palmas de Gran Canaria, Septiembre de 1997

8/1997-98
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/la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/la Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE Las Palmas de Gran Canaria a 7 de noviembre de 1997.

El/la Presidente/a: Dr. D. Benito del Castillo García,

El/la Secretario/a: Dra. Dña. Zoraida Sosa Ferrera,

El/la Vocal: Dra. Dña. Agustina Gómez Hens,

El/la Vocal: Dr. D. Jesús Anzano Lacarte,

El/la Vocal: Dr. D. Juan Luis Gómez Pinchetti,

El/la Doctorando/a: D^a. Juana Rosa Betancort Rodríguez,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN. ESTUDIO CUALITATIVO Y
CUANTITATIVO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU
VARIACIÓN POR CONDICIONES DE CULTIVO.

JUANA ROSA BETANCORT RODRÍGUEZ

1997

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DOCTORADO EN QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA Y MEDIOAMBIENTE

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN. ESTUDIO CUALITATIVO Y
CUANTITATIVO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU
VARIACIÓN POR CONDICIONES DE CULTIVO.

Tesis presentada por Dña. Juana Rosa Betancort Rodríguez.
Dirigida por Dr. José Juan Santana Rodríguez y codirigida por Dr. Guillermo
García Reina

El Director

El Co-Director

La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria, Septiembre de 1997

**DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN. ESTUDIO CUALITATIVO Y
CUANTITATIVO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU
VARIACIÓN POR CONDICIONES DE CULTIVO.**

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias
del Mar Dña. Juana Rosa Betancort Rodríguez para
aspirar al grado de Doctora en Química.

Las Palmas de Gran Canaria Septiembre de 1997

JOSE JUAN SANTANA RODRIGUEZ, PROFESOR TITULAR DEL
ÁREA DE QUÍMICA ANALITICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA Y GUILLERMO GARCÍA-BLAIRSY
REINA CATEDRÁTICO DE AGRONOMÍA MARINA DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

HACEN CONSTAR:

Que la presente Memoria titulada “DETERMINACIÓN DE
AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN. ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE
AMINOÁCIDOS LIBRES EN ALGAS Y SU VARIACIÓN POR
CONDICIONES DE CULTIVO” para optar al grado de Doctora en Química,
ha sido realizada en los laboratorios de la Sección de Química Analítica del
Departamento de Química y en los del Centro de Algología Aplicada de la
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo nuestra dirección,
autorizando con esta fecha su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en Las Palmas de Gran Canaria a
30 de Septiembre de 1997

Fdo: José Juan Santana Rodríguez

Fdo: Guillermo García Reina



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

JESÚS PÉREZ PENA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICO: Que la presente Memoria titulada “Determinación de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Estudio cualitativo y cuantitativo de aminoácidos libres en algas y su variación por condiciones de cultivo” que presenta la Lcda. Dña. Juana Rosa Betancort Rodríguez para optar al grado de Doctora en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios de la Sección de Química Analítica del Departamento de Química. Tras su registro y trámite autorizados por el Departamento (22/7/96), autorizo con esta fecha a su presentación.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 18 de Septiembre de mil novecientos noventa y siete.



A mis padres y hermanos

Agradecimientos

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que de uno u otro modo me han apoyado en la realización de este trabajo.

En primer lugar deseo expresar mi gratitud a los Drs. D. José Juan Santana Rodríguez y D. Guillermo García-Blairsy Reina, por la dirección y el entusiasmo que he recibido durante la realización de este trabajo.

Al Gobierno Autónomo de Canarias por la beca de Tercer Ciclo que ha permitido financiar este período de formación.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por ofrecerme los medios técnicos y materiales durante este tiempo.

Al Dr. K.J. Flynn (Algal Research Unit, School of Biological Sciences) de la Universidad de Gales, por su ayuda tanto en el desarrollo de la parte experimental como en la discusión de esta Tesis y por poder contar con él siempre que le he necesitado.

Al Dr. Ramazanov, por compartir sus ideas y poder trabajar con él.

A los integrantes del equipo de Algología Aplicada y de Química Analítica de la, tanto a los que estuvieron como a los que están, por su ayuda, comprensión y amistad.

A mis amigos, especialmente a Octavio Quijada Navarro por su paciencia y a cuantos me han ayudado, de manera directa o indirecta durante estos años.

Por último, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a José Alberto Herrera Melián por su ayuda, cariño y apoyo que me ha brindado durante estos años y por lo que él significa para mí.

INDICE

Indice	i
Abreviaturas	iv
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aminoácidos	3
1.1.1 Estructura de los aminoácidos	4
1.1.2 Aminoácidos como iones dipolares	8
1.2 Técnicas de análisis de aminoácidos	9
1.3 Uso de Medios Micelares en la determinación de aminoácidos	17
1.4 Composición de aminoácidos y proteínas en algas	22
1.5 Biosíntesis de aminoácidos en algas	28
1.5 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el perfil de aminoácidos en algas	32
OBJETIVOS	35
CAPITULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	36
2.1 Análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución	36
2.1.1 Reactivos	36
2.1.2 Derivatización de aminoácidos	36
2.1.3 Sistema cromatográfico	37
2.2 Procedimiento Espectrofluorimétrico	38
2.2.1 Aparatos y reactivos empleados	38
2.2.2 Estudio espectrofluorimétrico del derivado OPA-lisina en presencia de surfactantes	39
2.3 Determinación de aminoácidos por CLAR en presencia de surfactantes	39

INDICE

2.3.1	Estudio del efecto de la concentración de polioxietileno(10)lauriléter (POLE) sobre la señal de lisina	39
2.4	Descripción de especies	40
2.4.1.-	<i>Ulva rigida</i> C. Agardh	40
2.4.2.-	<i>Chorella pyrenoidosa</i> Beijerinck	40
2.5	Extracción de aminoácidos libres	41
2.6	Determinación de clorofilas y crecimiento celular	41
2.7	Determinación de Proteínas totales y relación C:N	42
2.8	Condiciones de cultivo	43
2.8.1	Macroalgas	43
2.8.2	Microalgas	43
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		48
3.1	Determinación de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución	49
3.1.1	Optimización del método	49
3.1.2	Características analíticas del método	56
3.1.2.1	Curvas de calibrado	56
3.1.2.2	Evaluación estadística del método	57
3.1.2.3	Límites de detección	60
3.2	Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en el medio en la composición de aminoácidos y proteína en <i>Ulva rigida</i>	61
3.3	Efecto de la fuente de carbono sobre el perfil de aminoácidos en <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	71
3.4	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el perfil de aminoácidos en <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	85

INDICE

3.5	Uso de medios micelares como realzantes de la señal de fluorescencia de la lisina	96
3.5.1	Características espectrofluorimétricas del derivado OPA-lisina en presencia de diferentes surfactantes	96
3.5.2	Influencia de diferentes medios micelares en la determinación cromatográfica de aminoácidos	99
3.6	Determinación cromatográfica de aminoácidos en presencia de POLE	102
3.6.1	Influencia de la concentración de POLE en la intensidad de fluorescencia del derivado OPA-lisina	102
3.6.2	Características analíticas del método cromatográfico	105
3.6.3	Aplicaciones	110
IV CONCLUSIONES		112
V BIBLIOGRAFÍA		116

Abreviaturas

AA	aminoácido
ABA	dl- α -amino-n- ácido butírico
Ala	alanina
Arg	arginina
Asp	ácido aspártico
Brij 35	polioxietileno(23)dodecanol
Brij 96	polioxietileno(10)oleiléter
c.c.	coeficiente de correlación
c.m.c.	concentración micelar crítica
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
chl	clorofila
GDH	glutamato deshidrogenasa
Gln	glutamina
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
GOGAT	glutamato sintasa
GS	glutamín sintetasa
HDTAB	hexadeciltrimetilamonio
His	histidina
Iso	isoleucina
L.D.	límite de detección
Leu	leucina
Lys	lisina
2 ME	2 mercaptoetanol
Met	metionina
NaLS	laurilsulfato sódico
OPA	o-ftaldialdehído

Abreviaturas

PF	peso fresco
Phen	fenilalanina
POLE	polioxietileno(10) lauriléter
PS	peso seco
Ser	serina
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
Tir	tirosina
Tryp	triptófano
TX-100	polioxietileno(9,5)-p-t-octifenol
Val	valina

I.- INTRODUCCION

Desde el descubrimiento, a principios de siglo, que las proteínas estaban constituidas por aminoácidos, estos compuestos han suscitado un gran interés y su análisis ha encontrado una amplia aplicación en áreas de desarrollo e industrial como son la Bioquímica, Biotecnología, Neurobiología, Farmacología, Diagnóstico y Control de Calidad. En estas áreas, donde los aminoácidos juegan un papel importante, es preciso frecuentemente el separar y cuantificar de forma fidedigna los diferentes aminoácidos.

El desarrollo de un sistema automatizado para la separación de aminoácidos fue un tema prioritario para los químicos y bioquímicos en los años 40. El primer sistema logrado fue inventado por Moore y Stein en la mitad de los años 50. Con el desarrollo de las técnicas cromatográficas y el aumento de la popularidad, en las últimas décadas, de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), debido a su versatilidad y relativo bajo coste, muchos han sido los trabajos publicados sobre separación y cuantificación de aminoácidos mediante esta técnica. Esto ha permitido que la investigación en el campo de aminoácidos de origen natural se haya desarrollado de forma espectacular, aunque, la atención que se le ha prestado al estudio de aminoácidos y péptidos en algas ha sido menor en comparación con las plantas terrestres.

La síntesis de aminoácidos es uno de los primeros y se puede decir que el punto más importante de la interacción entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno. En este sentido, la cuantificación del contenido o perfil de aminoácidos intracelulares (InAA) en algas es una herramienta útil en estudios de fisiología algal (Admiraal *et al.*, 1986; Flynn y Al-Amoudi, 1988; Martín-Jézequel *et al.*, 1992). En particular, el ratio molar de glutamina/ácido glutámico (Gln/Glu) intracelular ha resultado ser muy útil como indicador del estado C-N del alga (Flynn, 1990a; 1991). Además ha sido sugerido por varios autores que la

composición de aminoácidos intracelulares puede ser usado como una “huella metabólica” del contenido en nitrógeno del organismo (Admiraal *et al.* 1986).

Por otra parte también es conocido el importante papel que juega la composición de aminoácidos totales en determinar las diferencias en la calidad nutritiva en las algas que se utilizan en acuicultura o para consumo humano. En este sentido las algas pueden ser usadas como alimento, mejorando las dietas que carecen de contenido proteico. El contenido en aminoácidos en estas proteínas son las mismas que en proteínas comunes, y la composición en aminoácidos en muchos casos es superior a la de las plantas terrestres.

1.1 Aminoácidos

Los aminoácidos constituyen el alfabeto de la estructura proteica y determinan muchas de las propiedades importantes de las proteínas. Las fórmulas estructurales así como sus pesos moleculares, de los veinte aminoácidos hallados normalmente en las proteínas aparecen en la Tabla 1.1. Además de estos veinte y de varios poco frecuentes encontrados en las proteínas, se conocen unos 150 aminoácidos más que se encuentran en tejidos en forma libre o combinada, pero nunca en las proteínas, son los denominados aminoácidos no proteicos. La mayor parte de ellos son derivados de los α -aminoácidos hallados en las proteínas, pero también se conocen β , γ y δ -aminoácidos.

Mientras que las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, los animales están limitados a la síntesis de ciertos aminoácidos solamente, los denominados no esenciales. Los restantes, los esenciales, deben ingerirse a través del alimento. Los aminoácidos esenciales para el hombre son la fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Se admite que la histidina resulta también esencial para los niños y que la cisteína y la tirosina se

convierten en esenciales si no hay suficiente aporte de metionina y fenilalanina respectivamente, por sintetizarse a partir de ellos.

Aparte de ser las unidades estructurales de las proteínas los aminoácidos tienen otras serie de funciones en las plantas. Están envueltos en el transporte del nitrógeno entre los diferentes compartimentos celulares, o partes de la planta y son los precursores en la síntesis de clorofilas y muchos otros compuestos nitrogenados (biotina, tiamina pirofosfato, coenzima A, etc. Los aminoácidos además sirven como fuente de nitrógeno y carbono para la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, ácidos fenólicos y compuestos cianogénicos.

1.1.1 Estructura de los aminoácidos

Los aminoácidos (Figura 1.1) deben su nombre a los grupos funcionales que poseen.

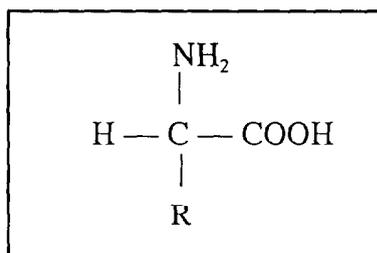


Fig. 1.1 Estructura general de un aminoácido

Por una parte tenemos el grupo amino (NH_2) unido al carbono alfa de la molécula. Es el responsable de la presencia de nitrógeno. La pérdida del grupo amino convierte al aminoácido en su cetoácido correspondiente. Por otro lado tenemos al grupo carboxilo, unido también al carbono alfa. La pérdida de este grupo funcional de la molécula se denomina descarboxilación, dando lugar a las

aminas correspondientes. Unido también al carbono alfa se halla un átomo de hidrógeno. El cuarto enlace será el que diferencie un aminoácido de otro.

Los grupos funcionales principales de los aminoácidos, NH_2 y COOH , son susceptibles de ionizarse a diferentes pH. En función de esta capacidad de ionización los aminoácidos pueden actuar como ácidos o como bases.

El grupo R va a ser el responsable de todas las diferencias existentes entre los aminoácidos. El concepto más utilizado para la diferenciación de los aminoácidos según sea su grupo R es la polaridad. Según esto podemos dividirlos en dos grandes grupos que, a su vez, presentan subdivisiones:

1.- *Grupos R no polares o hidrófobos*. Pertenecen a este grupo: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano.

2.- *Grupo R polares o hidrófilicos* que se subdividen en tres clases:

2.1.- *Hidrófilicos neutros sin carga*. Pertenecen a este grupo la glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. La polaridad de estos aminoácidos se debe a que las funciones R poseen grupos capaces de establecer enlaces de hidrógeno con el agua. Estos grupos son: hidroxilo de la serina, treonina y tirosina; amida de la asparagina y glutamina y tiol o sulfhidrilo de la cisteína

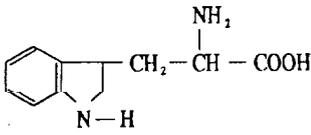
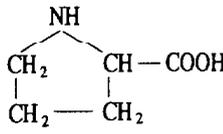
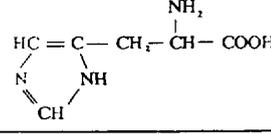
2.2.- *Hidrófilicos básicos con carga positiva*. Constituyen este subgrupo la lisina, arginina y histidina

2.3.- *Hidrófilicos ácidos con carga negativa*. Son el ácido aspártico y el glutámico.

Tabla 1.1 Aminoácidos proteicos.

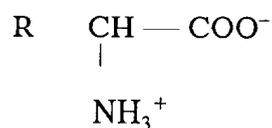
Nombre	Peso molecular	Fórmula estructural
Glicocola	75	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Alanina	89	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Valina	117	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Leucina	131	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Isoleucina	131	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Serina	105	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Treonina	119	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Metionina	149	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Fenilalanina	165	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$
Tirosina	181	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$

Tabla 1.1 Aminoácidos proteicos (continuación).

Nombre	Peso molecular	Fórmula estructural
Cisteína	121	$\text{HS}-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Triptófano	206	
Prolina	115	
Acido aspártico	133	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Asparagina	131	$\text{H}_2\text{NCO}-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Acido glutámico	147	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Glutamina	146	$\text{H}_2\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Histidina	155	
Lisina	146	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$
Arginina	310	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{COOH}$

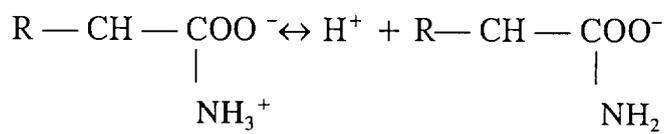
1.1.2. Aminoácidos como iones dipolares

Puesto que los aminoácidos contienen un grupo básico y otro ácido, son compuestos anfotéricos. En estado sólido, los aminoácidos existen como iones dipolares, el grupo ácido está presente como ion carboxilato -COO^- y el grupo básico como amonio -NH_3^+ . Todos los aminoácidos se hallan, en disolución acuosa y a valores de pH próximos a la neutralidad como iones dipolares:

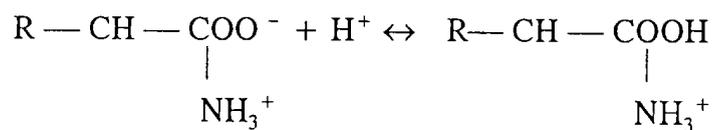


Cuando un aminoácido se disuelve en agua puede comportarse como:

a) ácido:



b) base:



La posición del equilibrio depende del pH de la disolución y de la naturaleza del aminoácido. Un aminoácido con un grupo R neutro es algo más ácido que básico, por lo que su punto isoeléctrico (pH intermedio) se presenta a un pH menor que el correspondiente a una disolución neutra. Si el grupo R es amino el pH del punto isoeléctrico es mucho más alto.

1.2 Técnicas de análisis de aminoácidos

Desde el punto de vista analítico, la separación de aminoácidos es quizás uno de los problemas más estudiados y mejor desarrollado de todas las separaciones cromatográficas realizadas.

En el procedimiento tradicional de intercambio iónico desarrollado por Moore y Stein (1951), los aminoácidos sin derivatizar se separaban en columnas de resinas de intercambio catiónico sulfonadas y se eluían con una serie de tampones citrato aplicados en forma de gradiente. La detección y cuantificación se conseguía por posterior reacción con ninhidrina y espectrofotometría en la región visible.

La Cromatografía de Gases, es una de las técnicas que en un principio más se ha empleado para la separación de aminoácidos. Sin embargo, no ha ganado una amplia aceptación en los laboratorios de análisis bioquímicos (Mackenzie, 1981; 1990; Blau, 1981). Debido a que los aminoácidos no son estables a altas temperaturas y a que contienen grupos funcionales polares, deben ser convertidos a derivados volátiles estables. Habitualmente se utilizan N-trifluoroacetil-n-butil ésteres, trifluoroacetil metil ésteres, trimetilsilil derivados, heptafluorobutiril isopropil o isobutil ésteres. La reacción de derivatización normalmente se lleva a cabo en disolventes orgánicos por lo que primero se debe “clean-up” la muestra. Pueden usarse varios detectores como pueden ser: captura de electrones (ECD), ionización de llama (FID), detector de nitrógeno-fósforo (NPD) y fotométrico de llama (FPD). La principal desventaja de la Cromatografía de Gases en el análisis rutinario de aminoácidos es la laboriosidad de las reacciones de derivatización, además de reproducir cuantitativamente la formación de derivados volátiles estables de todos los aminoácidos.

Por el contrario la Cromatografía de Gases tiene la ventaja de ser compatible con un espectrómetro de masas, permitiendo la determinación estructural de compuestos desconocidos.

Por estas razones se prefiere en la actualidad la Cromatografía Líquida de Alta Resolución para todo tipo de muestra y en un rango muy amplio de sensibilidades. Este método permite el análisis de muestras en disolventes acuosos con una manipulación mínima de la muestra, evitando así problemas de contaminación. Aunque en principio es posible la detección directa de los aminoácidos mediante índice de refracción o por absorción UV en la zona de 190-200 nm, esto no es aplicable en la práctica debido a su escasa sensibilidad. Resulta más útil formar derivados con los aminoácidos que absorban en otras regiones del espectro o que flourezcan.

La estrategia de derivatización para la detección nos ofrece dos alternativas: la separación cromatográfica de los componentes de la mezcla y derivatización post-columna ó derivatización precolumna de los componentes de la mezcla y posterior separación cromatográfica de los derivados.

Esta última técnica presenta tres ventajas claras con respecto a la primera:

a) el derivado elimina el carácter zwitteriónico del aminoácido, dando especies que interaccionan de modo más eficaz con el soporte de la fase inversa.

b) el derivado da lugar a una especie que absorbe o fluoresce, lo que supone un aumento de la sensibilidad de la detección de los aminoácidos.

c) las variaciones en la química de derivatización pueden aprovecharse para incrementar la selectividad o detectabilidad cromatográficas.

En la actualidad existen muchos reactivos de derivatación pre-columna utilizados en Cromatografía Líquida. Entre los más empleados se encuentran los mostrados en la Figura 1.2, cuyas propiedades como agentes derivatizadores se resumen en la Tabla 1.2.

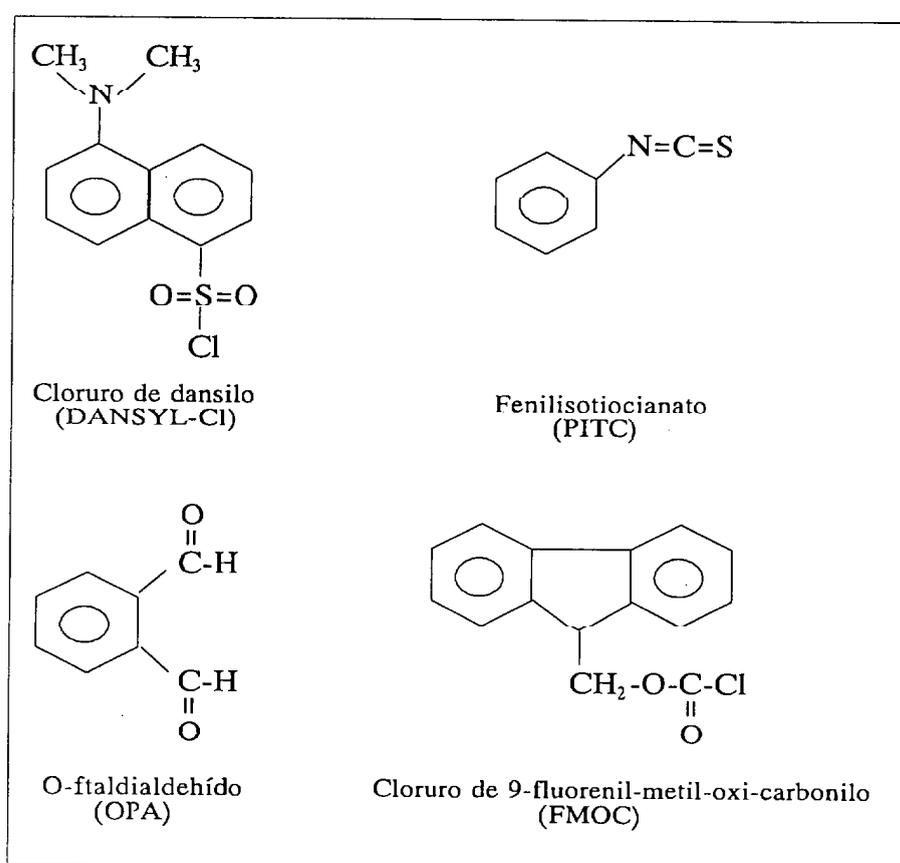


Figura 1.2 Agentes derivatizadores más usuales empleados para la determinación cromatográfica de aminoácidos.

Cloruro de dansilo (DANSYL-Cl): reacciona con el grupo amino de los aminoácidos libres para dar lugar a aminoácidos dansilados altamente fluorescentes. La sensibilidad de la detección es excelente, pero el reactivo presenta ciertas desventajas. Durante y después del proceso de derivatización el exceso de cloruro de dansilo se hidroliza a ácido dansil sulfónico el cual es fluorescente y puede causar problemas en la separación. Las separaciones de los dansil-derivados se realizan utilizando como eluyentes mezclas reguladoras de acetatos o fosfatos con pH comprendido entre 7 y 7.5 y acetonitrilo como fase orgánica. La detección se lleva a cabo por absorción UV a 250 nm, y también fluorimétricamente a longitudes de onda de 520 nm para la emisión y 350 nm para la excitación (Wilkinson 1978).

Cloruro de 9-Fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc): el Fmoc reacciona con aminoácidos primarios y secundarios de forma casi instantánea, para dar lugar a derivados muy estables y fluorescentes. El exceso de reactivo se hidroliza, dando lugar a un compuesto que también es fluorescente. Este es el principal inconveniente del método, ya que es necesario eliminar manualmente el exceso de reactivo con pentano para detener la reacción de derivatización y evitar la hidrólisis espontánea de los derivados formados (Fürst *et al.* 1990). Estos derivados se separan usando mezclas de solventes orgánicos (metanol y/o acetonitrilo) con disoluciones tampón de acetato y se detectan por fluorescencia (Einarsson *et al.*, 1983).

Fenilisotiocianato (PITC): Bajo condiciones alcalinas los aminoácidos primarios y secundarios reaccionan con el feniltiocianato para formar feniltiocarbamatos derivados. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente a vacío ya que el oxígeno interfiere en la derivatización. Después de la feniltiocarbamilación, el exceso de reactivo se evapora mediante centrifugación a vacío para proporcionar una separación estable y proteger la columna. Los

feniltiocarbamatos derivados de los aminoácidos se pueden detectar en el UV a 254 nm. Se separan usando como eluyentes disoluciones reguladoras de acetato, en concentraciones que van desde 5 mM a 1M, en rangos de pH de 4 a 5.6, y metanol o acetonitrilo como fase orgánica (Heinrison y Meredith, 1984; Bidlingmeyer *et al.* 1984). Los PITC-aminoderivados son estables durante días y pueden ser inyectados automáticamente con un inyector automático.

o-Ftaldialdehído (OPA): el o-ftaldialdehído en presencia de 2-mercaptoetanol, reacciona con aminas primarias a temperatura ambiente para formar compuestos altamente fluorescentes. La formación de derivados fluorescentes por reacción de o-ftaldialdehído/2-mercaptoetanol (2-ME) con aminas primarias fue descrita por vez primera por Roth en 1971, y posteriormente aplicada a la derivatización post-columna de los aminoácidos, previa separación de éstos por intercambio iónico (Roth y Hampai, 1973). La estructura de este compuesto fue identificada por Simons y Jonhson (1976, 1977) como un isoindol sustituido. Simons mostró que la reacción de OPA con aminas primarias era debida, en primer lugar, a la formación de un derivado de OPA-2ME, el cual, interaccionaba con la amina primaria del aminoácido para formar el isoindol fluorescente 1-alquil-tio-2-alquil sustituido.

Tabla 1.2 Propiedades de los principales agentes derivatizadores de aminoácidos.

	Fmoc	DANSYL-Cl	PITC	OPA
Incubación muestra	10 min. T ^a amb.	30 min. 37°C	5 min. T ^a amb	1-120 sec. T ^a amb.
Detección	Fluorescencia 260/313	Fluorescencia 340/510 nm	Absorbancia 254 nm	Fluorescencia 340/455 nm
Sensibilidad	Buena 1-5 pmol	Buena 10-50 pmol	Moderada 1-20 pmol	Muy Buena < 10 pmol
Aminas secundarias	Sí	Sí	Sí	No
Automatización	Sí	Sí	No	Sí
Derivados estables	Sí	Sí	Sí	No

La reacción era rápida y cuantitativa pero los isoindoles producidos mostraban ser inestables debido a un reagrupamiento del S-O para producir el compuesto 2,3-dihidro-1H-isoindol no fluorescente. La estabilidad de cada OPA-2ME aminoácido derivado también dependía del aminoácido usado (Roth 1971, Simons y Johnson 1978). Ellos demostraron además la posibilidad de emplear otros tioles distintos del 2-mercaptoetanol como el 3-mercaptoetanol. Los resultados favorables encontrados son debidos presumiblemente a la introducción de un grupo α -carboxilo en el derivado amino, disminuyendo la hidrofobicidad del derivado en comparación con otros mercaptanos.

El o-ftaldialdehído presenta las siguientes propiedades:

- a) Reacciona de forma rápida y cuantitativa (Fig. 1.3), a temperatura ambiente; no fluoresce y su exceso no se descompone o reacciona para formar productos interferentes.
- b) No reacciona con el agua y es estable en solución tampón.
- c) Los derivados son únicos con alto rendimiento fluorescente.
- d) La actividad electroquímica de los derivados permite la doble detección, lo cual mejora su especificidad.

Sin embargo, presenta las siguientes desventajas :

- a) Los derivados no son estables
- b) No reacciona con los aminoácidos secundarios

Estas desventajas limitan la aplicabilidad del método y obliga a establecer un estricto control del tiempo de reacción y hace difícil la automatización del proceso, a no ser que un autoinyector realice la mezcla. La inestabilidad de los derivados parece estar causada por un reacomodamiento intramolecular catalizado por el exceso de OPA y no por el del tiol (Nakamura *et al.*, 1982, Stobaugh *et al.* 1983).

La cistina es reducida a cisteína por el mercaptoetanol presente en la mezcla derivatizante. Debido a la presencia del grupo sulfhidrilo, el derivado de cistina presenta una fluorescencia muy débil. Para evitar este problema ha sido sugerido por Umagat *et al.* (1982), la oxidación de este aminoácido a ácido cisteico mediante el ácido per fórmico.

Para la separación de los OPA aminoácidos derivados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, las fases móviles suelen estar constituidas por mezclas reguladoras de acetatos o fosfatos y metanol como fase orgánica. Las separaciones se llevan a cabo a pHs comprendidos entre 6 y 7.5 por razones de estabilidad de las columnas. La inclusión en la fase móvil de un pequeño porcentaje de tetrahidrofurano (THF) permite la resolución de glicina y treonina (Hodgin 1979).

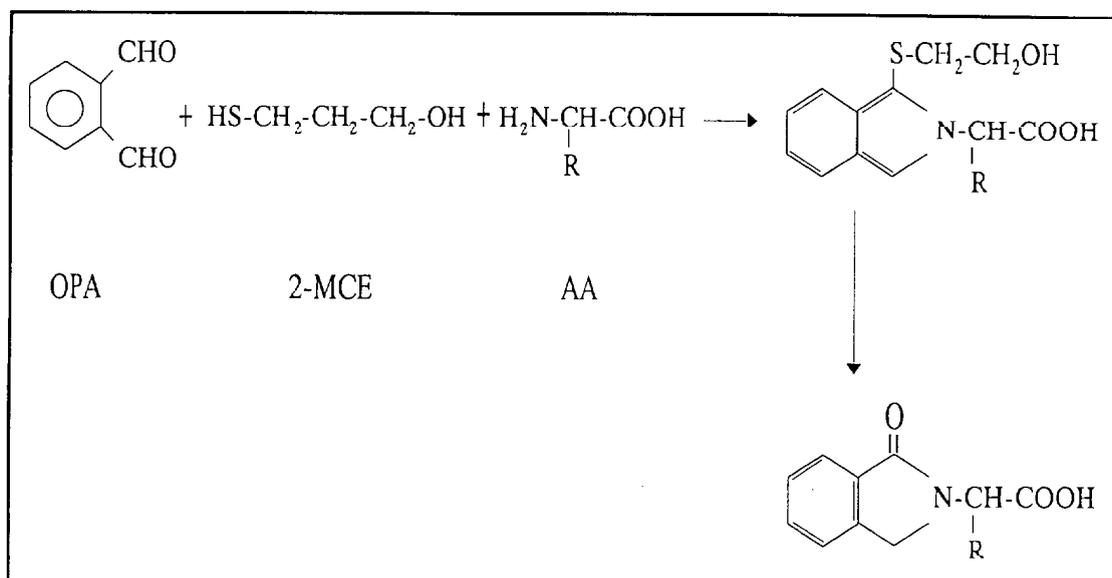


Figura 1.2 Reacción de un aminoácido con el reactivo OPA

La detección de los OPA derivados se realiza fluorimétricamente usando longitudes de onda óptimas de 340 nm para la excitación y 455 nm para la emisión, con lo que se alcanzan límites de detección comprendidos entre 300 y 400 fmol y si se dispone como fuente de excitación un láser se pueden alcanzar hasta 4-15 fmol y 100 amol si se combina con columnas microbore (Roach, 1987).

1.3 Uso de medios micelares en la determinación de aminoácidos.

Los surfactantes (contracción de los términos ingleses “surface”, “active”, “agents”) son sustancias que tienen la propiedad de adsorberse en las superficies o interfases del sistema y alterar las energías libres de esas superficies (o interfases). Aquí, el término “interfase” indica la unión entre dos fases inmiscibles, mientras que por “superficie” se entiende una interfase en que una de las fases es un gas, generalmente aire.

La energía libre superficial es el mínimo trabajo que se necesita para crear una interfase. La tensión superficial de un líquido es la energía libre superficial por unidad de área en la unión entre el líquido y el aire. Así el trabajo mínimo para crear interfase es

$$W_{\min.} = \gamma \Delta A$$

siendo γ la tensión superficial y ΔA el aumento de área entre fases.

El surfactante suele actuar reduciendo la energía libre superficial, aunque hay ocasiones en que la aumenta. Las moléculas presentes en la superficie tienen mayor energía que las que se encuentran en el interior de un medio, pues éstas interactúan más fuertemente, de forma que se rebaja su energía. Por tanto, se requerirá un cierto trabajo para llevar una molécula desde el interior a la superficie.

Los surfactantes poseen una estructura molecular característica llamada *anfipática*, que consiste en un grupo que posee poca afinidad por el disolvente, conocido como *hidrofóbico*, cuando el disolvente es agua, y un grupo con una gran afinidad por el disolvente, llamado *hidrofílico*, en disolución acuosa. Cuando el surfactante se disuelve en agua, la presencia del grupo hidrofóbico en el interior del

agua causa distorsión provocando un aumento de la energía libre del sistema, lo que significa que el trabajo necesario para llevar una molécula de surfactante a la superficie es menor que el trabajo para trasladar una de agua. Por tanto, el surfactante se concentrará en la superficie. Esto hace que disminuya el trabajo necesario para aumentar la unidad de área de dicha superficie (tensión superficial). Por otra parte, la presencia del grupo hidrofílico impide que el surfactante sea expulsado completamente del disolvente lo que requeriría la deshidratación de dicho grupo. La estructura anfipática del surfactante causa no sólo la concentración del surfactante en la superficie y la reducción de la tensión superficial del agua, sino también la orientación de la molécula con su grupo hidrofílico en la fase acuosa y su grupo hidrofóbico hacia el exterior.

El grupo hidrofóbico suele ser una cadena hidrocarbonada y suele llamarse simplemente *cola* y el grupo hidrofílico, también llamado *cabeza*, es un grupo iónico o muy polar. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en:

- 1.- Aniónicos: el grupo *cabeza* tiene carga negativa como, por ejemplo, las sales de ácidos alquil carboxílicos o sulfónicos.
- 2.- Catiónicos: el grupo *cabeza* posee carga positiva como, por ejemplo, las sales de amonio cuaternarias.
- 3.- Zwitteriónicos: en el surfactante existen grupos con carga positiva y negativa como, por ejemplo, los aminoácidos.
- 4.- No iónicos: el surfactante no posee grupos con carga como, por ejemplo los monoglicéridos.

En la Tabla 1.3 se recogen ejemplos de estos cuatro tipos de surfactantes y los valores de alguno de sus parámetros característicos.

Tabla 1.3 Relación de surfactantes y parámetros característicos.

NOMBRE	CMC (M) ^a	N ^b
Catiónicos		
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	9.2×10^{-4}	61
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio	3.5×10^{-3}	75
Bromuro de dodeciltrimetilamonio	1.5×10^{-2}	50
Cloruro de dodecilamonio	1.5×10^{-2}	55.5
Cloruro de hexadecilpiridinio = cloruro de cetilpiridinio	9.0×10^{-4} 3.7×10^{-4}	95 -
Cloruro de bencildimetiltetradecilamonio		
Aniónicos		
Tetradecilsulfato de sodio	2.1×10^{-3}	80
Dodecilsulfato de sodio = laurilsulfato de sodio	8.1×10^{-3}	62
4-Dodecilbencenosulfonato de sodio	1.6×10^{-3}	24
Dodecilsulfonato de sodio	9.8×10^{-3}	54
Dodecanoato de sodio	2.4×10^{-2}	56
Perfluoroheptanoato de sodio	2.8×10^{-2}	-
Zwitteriónicos		
N-Dodecilbetaina	1.5×10^{-3}	73
N-Dodecilsultaina	3.3×10^{-3}	55
No iónico		
Polioxietileno(6)dodeciléter	8.7×10^{-5}	400
Polioxietileno(12)dodeciléter	5.0×10^{-5}	81
Polioxietileno(23)dodeciléter	5.5×10^{-5}	40
Polioxietileno(7)hexadeciléter	1.7×10^{-6}	594
Polioxietileno(12)hexadeciléter	7.5×10^{-5}	152
Polioxietileno(10)nonilfeniléter	7.5×10^{-5}	276
Polioxietileno(23)dodecanol (Brij-35)	9.0×10^{-5}	40
Polioxietileno(9,5)-p-t-octilfenol(TX-100)	3.0×10^{-4}	143

(a) CMC: Concentración micelar crítica; (b) N: Número de agregación. Parámetros medidos en medio acuoso a 25°C.

En disoluciones diluidas (generalmente a concentraciones menores que 10^{-4} M), los surfactantes suelen encontrarse como monómeros, aunque pueden existir dímeros, trímeros, etc. Si la concentración de surfactante en disolución aumenta, puede llegar a alcanzarse un punto en que se da un proceso de agregación y cambian muchas propiedades físico-químicas de la disolución. El agregado coloidal recibe el nombre de *micela* y su forma varía dependiendo del surfactante y del medio. La concentración a la que se producen estos cambios se conoce como *concentración micelar crítica* (c.m.c.). El proceso de agregación se da en un pequeño intervalo de concentraciones y parece ser un proceso altamente cooperativo (Moroi, 1992).

Se ha mencionado previamente que cuando se disuelven en agua sustancias que contienen grupos hidrófobos aumenta la energía libre del sistema. Para hacer mínima esta energía libre, la sustancia se coloca con su parte hidrófoba hacia el exterior del disolvente. Sin embargo hay otra forma de hacer mínima esta energía que consiste en la agregación de estas moléculas, superficialmente activas (surfactantes), en clusters (micelas), con sus grupos hidrófobos orientados hacia el interior del cluster y los grupos hidrofílicos orientados hacia el disolvente. Por tanto, la formación de micelas es un mecanismo alternativo a la adsorción en las interfases para evitar el contacto entre los grupos hidrófobos y el agua, y así disminuir la energía libre del sistema (Rosen, 1989).

Anteriormente se comentó que el estrecho rango de concentraciones a las que se producen bruscos cambios en las propiedades físicoquímicas en disoluciones de surfactantes, se le llama *concentración micelar crítica* (c.m.c.). Para determinar el valor de este parámetro se puede utilizar el cambio en alguna de esas propiedades, y así normalmente se suele medir conductividad eléctrica, tensión superficial o índice de refracción. En la bibliografía se encuentran tabulados numerosos valores de c.m.c., la mayoría para surfactantes que contienen cadenas hidrocarbonadas de entre diez y dieciséis átomos de carbono (Armstrong, 1985; Fendler, 1982). El valor de la

concentración micelar crítica depende de diversos factores como la longitud de la cadena del surfactante, presencia de electrolitos, temperatura y presión (Shinoda *et al.*, 1963).

Es importante destacar que, en general, las micelas compuestas de surfactantes no iónicos suelen tener concentraciones micelares críticas menores y números de agregación más altos que las micelas iónicas análogas (Shinoda *et al.*, 1963). Esto se debe, en parte, a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las *cabezas* de los surfactantes no iónicos. Sin embargo en las micelas iónicas estas repulsiones tienden a limitar el número de agregación y la *c.m.c.*

La utilidad analítica de las micelas es evidente en un gran número de técnicas y ha crecido enormemente en los últimos años. Las aplicaciones más importantes de las micelas en Química Analítica se han dado en medidas electroquímicas, en espectroscopía y en separaciones (Cline Love *et al.*, 1984; Pelizetti y Pramauro, 1985; McIntire 1990). En medidas de fluorescencia la elección de un medio micelar apropiado presenta ventajas como aumento de sensibilidad, disminución de interferencias y mayor conveniencia experimental si se compara con disoluciones homogéneas (Hinze *et al.*, 1984). Este efecto se produce cuando la concentración de surfactante supera la *concentración micelar crítica*. La espectrofluorimetría en medio micelar es particularmente útil para la determinación de compuestos orgánicos pero también ha sido empleada en análisis inorgánico.

La capacidad que tienen las micelas para interaccionar selectivamente con las moléculas permite su utilización para separar estas especies. Se ha utilizado disoluciones micelares acuosas como fases móviles en Cromatografía Líquida. Aunque este tipo de fases se emplearon originalmente en Cromatografía en Columna y en Capa Fina, actualmente se utilizan ampliamente en Cromatografía

Líquida de Alta Resolución (Armstrong, 1985; Pelizetti y Pramauro, 1985; Hinze, 1987; McIntire 1990).

En particular, la aplicación de medios micelares a la separación y análisis de aminoácidos se ha usado en Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía Líquida. El derivado OPA-lisina por razones desconocidas presenta menor fluorescencia que el resto de los aminoácidos derivados (Roth, 1971; Benson y Hare, 1975). El uso de polioxietileno (23)dodecanol (Brij 35) para el aumento de la señal fluorescente de lisina en cromatografía líquida fue demostrado por Benson y Hare (1975) en el proceso de derivatización postcolumna. Posteriormente Gardner y Miller (1980) mostraron que la adición de Brij 35 también aumentaba la respuesta fluorescente de lisina en el procedimiento de derivatización precolumna. Jones *et al.* (1981) demostraron que la adición de laurilsulfato de sodio (NaLS) en el reactivo de derivatización no sólo aumenta la señal de lisina, hasta un 50%, sino que aumenta la estabilidad del derivado. Recientemente se ha ampliado el uso de surfactantes como fase móvil en la separación de OPA-aminoácidos (Catalá *et al.*, 1995) usando como eluyente una solución de NaLS.

1.4 Composición de aminoácidos y proteínas en algas

El contenido en nitrógeno en macroalgas marinas varía entre 1.5 y 7.6 % de su peso seco y en microalgas constituye más de un 10% en células creciendo de forma exponencial. Si este valor lo multiplicamos por el factor de 6.25 para obtener una medida estimativa del contenido proteico el porcentaje varía entre un 10 y un 48% para macro y hasta un 62.5 % para microalgas. En la Tabla 1.3 se muestra el contenido en nitrógeno de varias especies de algas pertenecientes a los cuatro *Phylum* principales.

Tabla 1.4 Contenido en nitrógeno en diferentes algas pertenecientes a Divisiones de macro (2, Arasaki y Arasaki, 1983) y microalgas (1, Becker, 1994)

	Especie	Contenido en N (%)	Ref.
Microalgas			
Cyanophyta	<i>Spirulina maxima</i>	9.6-11.40	1
Chlorophyta	<i>Chlorella vulgaris</i>	9.3	
	<i>Dunaliella salina</i>	9.1	
Rodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	5.6	
Macroalgas			
Chlorophyta	<i>Codium fragile</i>	2.50	2
	<i>Codium latum</i>	2.94	
	<i>Chaetomorpha spiralis</i>	2.63	
	<i>Enteromorpha compressa</i>	1.98	
	<i>Enteromorpha linza</i>	3.09	
	<i>Ulva pertusa</i>	3.26	
	<i>Ulva lactuca</i>	2.38	
Phaeophyta	<i>Eisenia bicylis</i>	1.82	
	<i>Endarachne binghamiae</i>	2.34	
	<i>Hizikia fusiforme</i>	1.69	
	<i>Laminaria japonica</i>	2.47	
Rodophyta	<i>Chondria crassicaulis</i>	3.28	
	<i>Chondrus crispus</i>	1.80	
	<i>Gelidium amansii</i>	3.25	
	<i>Phorphyra tenera</i>	7.63	

Las publicaciones existentes sobre los aminoácidos proteicos encontrados en algas marinas, se refieren principalmente a hidrolizados de la planta o a preparaciones de proteína cruda (Coulson 1955; Smith y Young, 1955; Pillai, 1957; Pellegrini, 1967, 1969; Munda y Gubensek, 1986). En la Tabla 1.4 se muestra el contenido de aminoácidos totales en algas del Mediterráneo (Munda y Gubensëk, 1986). La composición en aminoácidos muestra que el ácido aspártico y el ácido glutámico junto con sus amidas están presentes en altas cantidades en todos los grupos taxonómicos, seguidos por la alanina. Las algas verdes y pardas presentan una mayor uniformidad en cuanto a composición en aminoácidos, mientras que en algas rojas la variedad es más evidente.

Menos atención se le ha prestado a los aminoácidos libres y de los datos publicados, sobre todo los primeros, son datos cualitativos o semicuantitativos (Coulson, 1953; Channing y Young, 1953; Ogino, 1955; Nars *et al.*, 1967; Madgwick y Ralph, 1972, De Napoli *et al.* 1984). Estos sugieren que la mayoría de las algas rojas, verdes y pardas presentan, en general, la misma composición de aminoácidos libres proteicos. Esta composición está caracterizada por una baja concentración de aminoácidos básicos y una general prevalencia de alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y sus amidas, los cuales a menudo forman el 50% o más del total.

Sin embargo, se han observado algunas variaciones en algas rojas. Las algas de la familia Grateloupiaceae, Gracilariaceae, Phyllophoraceae y Gigartinaceae acumulan cantidades relativamente altas de citrulina (Tagaki *et al.*, 1967) y de aminoácidos básicos, incluyendo citrulina, arginina y un aminoácido peculiar, gigartina. Muchas especies de la familia Rhodomenia (orden Ceramiales) contienen excepcionalmente altas cantidades de prolina (Madgwick *et al.*, 1970; Impellizzeri *et al.*, 1975).

En extractos etanólicos de algas podemos encontrar de 20 a 30 tipos de aminoácidos, proteicos y no proteicos, en diferentes cantidades. Los aminoácidos

no proteicos dentro de las células incluyen a β -alanina, α y γ -ácido aminobutírico, taurina, ácido 2-aminocapílico, ornitina, citrulina, lantionina, fenilserina e hidroxiprolina (Arasaki, 1983)

Algunas algas, acumulan en altas concentraciones ciertos aminoácidos no proteicos (Ito y Hori, 1989). Estos aminoácidos son los siguientes:

Condrina: fue aislada a partir de *Chondria crasicaulis* (Rodophyta). Este compuesto también ha sido detectado en *Enteromorpha*, *Ulva* (Chlorophyta), *Laurencia* (Rodophyta), *Undaria*, *Laminaria* y *Zonaria* (Paeophyta) (Madgwick *et al.*, 1970)

Gigartinina: es el único aminoácido que contiene un grupo guanilureido moeity en la molécula. Fue aislado de *Gymnogongrus flabelliformis* (Rodophyta). Varias especies de las familias Gracilariaceae, Gracilariaceae y Phyllophoroceae (Rodophyta) contienen este aminoácido básico.

Baikianina: fue detectado en *Pterocladia pinnata* (Rodophyta). Este derivado piperolate se encuentra en la mayoría de las algas pertenecientes a la familia Corallinaceae (Madgwick *et al.* 1970).

Acido rodoico: se aisló de *Chondrus ocellatus*. Su nombre se debe a su presencia en varias especies de la división Rodophyta, *Chondrus ocellatus*, *C. yendoi* y *Neoditsea yendoana*.

Laminina: fue aislada de *Laminaria angustata* como un compuesto activo en mitigar la hipertensión. Este compuesto se distribuye ampliamente en la familia Laminariaceae.

Taurina: es un producto final del metabolismo de los aminoácidos azufrados y se encuentra normalmente en los órganos de los animales. Este aminoácido está ampliamente distribuido en la división Rodophyta (Madgwick *et al.*, 1970; Impellizzeri *et al.*, 1975)

Los trabajos publicados referentes a la composición en aminoácidos totales en microalgas son más recientes y abundantes que los de macroalgas, debido a que una de sus grandes aplicaciones es la acuicultura. En la Tabla 1.5 se resume el contenido en aminoácidos totales de diferentes especies de microalgas. Como se puede observar los aminoácidos mayoritarios son los ácidos glutámico y aspártico junto con sus amidas, alanina y leucina y los aminoácidos cisteína, metionina y triptófano se presentan como minoritarios en la mayoría de las especies.

Los estudios del perfil de aminoácidos libres en microalgas se refieren principalmente a especies marinas (Admiraal *et al.*, 1986; Moal *et al.*, 1987; Martín-Jézequel *et al.*, 1988; Flynn, 1990b). En once especies fitoplanctónicas marinas pertenecientes a cinco clases taxonómicas, se observó, que en general, de 2 a 5 aminoácidos son los responsables del 70% o más del contenido total en aminoácidos libres. Estos son, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina y leucina. Estos pocos aminoácidos fueron especies dependientes; juntos caracterizan la “huella química” de cada alga. Un segundo grupo de aminoácidos, que representa el 30% o menos del contenido total, estaría formado por glicina, arginina, alanina, tirosina, valina, ornitina, lisina y fenilalanina (Martín-Jézequel *et al.*, 1988)

Tabla 1.4 Composición en aminoácidos totales en algas marinas (mg/g peso seco). (Munda y Gubensek; 1986)

	Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Ser	Thr	Cys	Met	Asp	Glu	Lys	Arg	Phe	Tyr	Pro	His
Rhodophyta																	
<i>Alsilium coralinum</i>	5.6	5.0	5.0	5.7	3.4	4.4	4.7	1.0	0.8	10.1	11.3	6.4	5.0	3.6	3.5	10.4	1.5
<i>Catenella caespitosa</i>	9.2	7.5	6.9	10.1	6.6	8.9	7.8	1.5	2.8	15.8	19.2	9.0	19.1	7.1	3.8	5.9	2.5
<i>Ceramium dicaphanum</i>	8.1	9.7	6.7	8.0	4.8	6.1	6.1	0.7	2.3	15.9	12.5	5.7	7.3	5.0	3.7	5.1	1.7
<i>Geldium spinulosum</i>	6.4	5.4	5.8	7.7	4.8	5.2	4.9	0.3	2.0	10.1	11.5	5.3	6.4	4.8	2.8	4.5	1.5
<i>Laurencia obtusa</i>	6.1	6.0	5.5	7.6	4.8	5.2	5.7	0.6	1.7	10.6	14.3	5.7	5.7	4.6	3.7	4.2	1.5
<i>Polysiphonia elongata</i>	7.5	7.9	6.0	7.8	4.9	5.3	5.5	0.3	1.9	13.1	12.2	5.0	6.6	4.7	3.2	4.6	1.4
<i>Porphyra leucosticta</i>	18.5	10.0	9.6	11.7	5.7	7.4	6.4	0.6	2.9	13.4	16.2	7.5	8.9	5.7	4.4	7.0	2.0
Chlorophyta																	
<i>Codium vermilara</i> (Oliv.)	9.1	6.6	7.7	8.1	4.7	6.3	6.8	1.2	1.8	13.1	14.8	5.7	4.9	5.1	3.9	5.2	1.5
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	5.5	3.8	3.8	4.4	2.6	3.1	3.3	0.2	1.1	7.1	8.2	2.1	3.4	3.1	1.7	2.9	0.6
Phaeophyta																	
<i>Colpomenia sinuosa</i>	5.3	4.2	3.8	5.4	3.0	3.6	3.6	0.2	1.7	7.7	10.0	3.3	3.3	3.2	2.7	3.2	1.0
<i>Cutleria multifida</i>	7.0	5.7	5.7	7.8	4.3	4.6	4.6	0.2	2.5	11.1	15.1	3.7	5.1	4.6	2.9	4.3	1.3
<i>Cyrtoseira barbata</i>	6.7	5.7	4.8	6.9	4.1	4.5	4.6	0.7	1.3	10.0	25.0	4.5	4.8	4.0	2.7	4.3	1.3
<i>Dicyota dichotoma</i>	8.9	7.6	6.9	10.3	5.7	6.4	6.3	0.4	3.4	13.4	22.7	6.2	7.0	6.2	4.0	5.8	1.9
<i>Ectocarpus siaculosus</i>	13.7	9.0	8.6	10.7	4.6	7.3	7.9	0.4	4.0	15.1	19.3	7.1	8.2	6.8	4.1	7.0	2.5
<i>Fucus virsoides</i>	8.7	5.8	6.1	8.9	5.1	5.1	5.1	0.3	1.7	10.3	22.5	6.2	5.2	5.5	3.0	4.6	1.9
<i>Halopteris scoparia</i>	6.7	6.5	5.0	7.2	4.3	4.8	4.9	0.2	2.7	10.9	17.5	4.4	5.1	3.5	2.8	4.9	1.3
<i>Punctaria latifolia</i>	9.3	6.9	7.0	9.6	5.2	5.9	5.9	0.2	3.3	12.2	14.4	6.1	6.7	5.4	3.8	5.5	1.9
<i>Sargosiphon lomentaria</i>	13.2	9.7	9.4	13.8	7.1	8.4	8.4	0.3	4.3	13.1	21.7	8.2	8.3	8.0	4.9	7.1	2.4
<i>Sticxosiphon adriaticus</i>	9.0	5.9	5.9	8.6	4.4	5.2	5.1	0.2	2.6	10.6	15.1	4.7	5.4	4.9	2.9	4.6	1.4

Tabla 1.5 Perfil de aminoácidos totales de diferentes algas (g/16g N) (Becker, 1986)

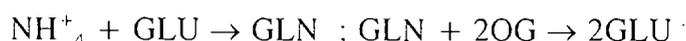
	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Try	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser
Perfil recomendado por la FAO	4.0	7.0	5.0	5.5	6.0		3.5		1.0	4.0	—	—	—	—	—	—	—	—
Huevo	6.6	8.8	7.2	7.0	5.8	4.2	3.2	2.3	1.7	5.0	—	6.2	11.0	12.6	4.2	2.4	4.2	6.9
<i>Spirulina maxima</i>	6.8	10.9	7.5	5.3	5.7	5.0	2.3	0.7	1.5	5.6	9.0	7.2	12.2	17.4	6.6	2.00	4.1	4.9
<i>S. Maxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.5	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2
<i>S. Platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	5.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	7.3	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1
<i>Spirulina sp.</i>	4.8	8.4	5.4	4.7	4.0	—	2.3	1.0	1.5	6.7	9.1	7.3	11.8	12.2	4.9	1.6	3.8	4.9
<i>Cscillatoria amphibia</i>	6.1	9.3	7.0	5.1	4.9	4.3	1.0	—	1.5	6.7	9.1	7.3	10.6	13.9	5.8	1.3	4.8	5.2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	7.1	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8
<i>S. obliquus</i>	3.7	8.1	5.5	5.6	5.0	—	2.1	1.4	1.4	4.8	7.8	5.3	9.0	10.0	5.5	1.6	4.6	4.3
<i>S. Obliquus</i>	3.4	9.6	5.4	6.4	5.8	2.8	1.4	—	—	6.7	10.3	6.3	10.2	12.4	6.8	1.7	5.3	5.9
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	4.5	9.3	7.9	5.9	4.2	1.7	0.6	0.7	—	4.9	12.2	5.8	8.8	10.5	10.4	1.7	5.0	5.2
<i>C. pyrenoidosa</i>	3.4	4.0	5.1	7.9	4.5	2.7	1.8	—	1.4	3.2	5.9	5.6	5.9	9.3	4.8	1.4	4.0	2.2
<i>C. vulgaris</i>	3.2	9.5	7.0	6.4	5.5	2.8	1.3	—	—	5.3	9.4	6.9	9.3	13.7	6.3	2.0	5.0	5.8
<i>Coelastrum sphaericum</i>	3.6	9.6	6.0	6.7	5.7	2.8	1.6	—	—	7.0	9.1	5.9	10.5	12.8	6.5	1.8	5.3	5.5
<i>Dunaliella primolecta</i>	5.5	11.1	5.6	5.3	5.4	3.7	1.9	0.8	—	5.5	7.5	6.1	11.3	11.7	5.8	0.5	—	4.7
<i>D. 'bardawil'</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6

1.4 Biosíntesis de aminoácidos en algas. Incorporación de amonio a las cadenas de carbono.

Tanto el amonio tomado del medio externo como el generado internamente por la reducción del nitrato es asimilado y combinado con las cadenas de carbono para dar lugar a los aminoácidos. Paralelamente a esta asimilación, el amonio generado en el ciclo fotorrespiratorio del nitrógeno y el procedente de la degradación de las proteínas es también reasimilado (Wallsgrave *et al.*, 1983; Wallsgrave y Lea, 1985).

Está firmemente establecido que la asimilación de amonio tiene lugar mediante el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Mifflin y Lea, 1982; Guerrero *et al.*, 1981). En esta vía (Figura 1.5) una molécula de amonio se combina con una unidad de ácido glutámico para formar glutamina, por medio de GS. Posteriormente, el grupo amida de la glutamina se transfiere a α -cetoglutarato, en una reacción catalizada por GOGAT, produciéndose dos unidades de glutamato, una de las cuales se reutiliza en este ciclo y la otra constituye el producto final de la asimilación del amonio. Una unidad de trifosfato de adenosina (ATP) y dos electrones son necesarios para la formación de una unidad de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato.

Por la vía GS-GOGAT los niveles de glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu) y 2-oxoglutarato (2OG) están íntimamente relacionados:



De forma que se ha demostrado que la relación molar de glutamina y glutámico es un buen indicador de la relación carbono-nitrógeno del alga. (Flynn, 1990a, 1991). La proporción Gln/Glu aumenta o presenta valores superiores a 0.5 cuando la fuente de carbono, específicamente 2OG, es limitante (Flynn *et al.*, 1989)

siempre que el poder reductor y el ATP no son limitantes. Por contrario, la proporción tiene un valor bajo (<0.1) cuando no existe fuente nitrogenada en el medio o no existe el poder reductor necesario para llevar a cabo la asimilación de amonio.

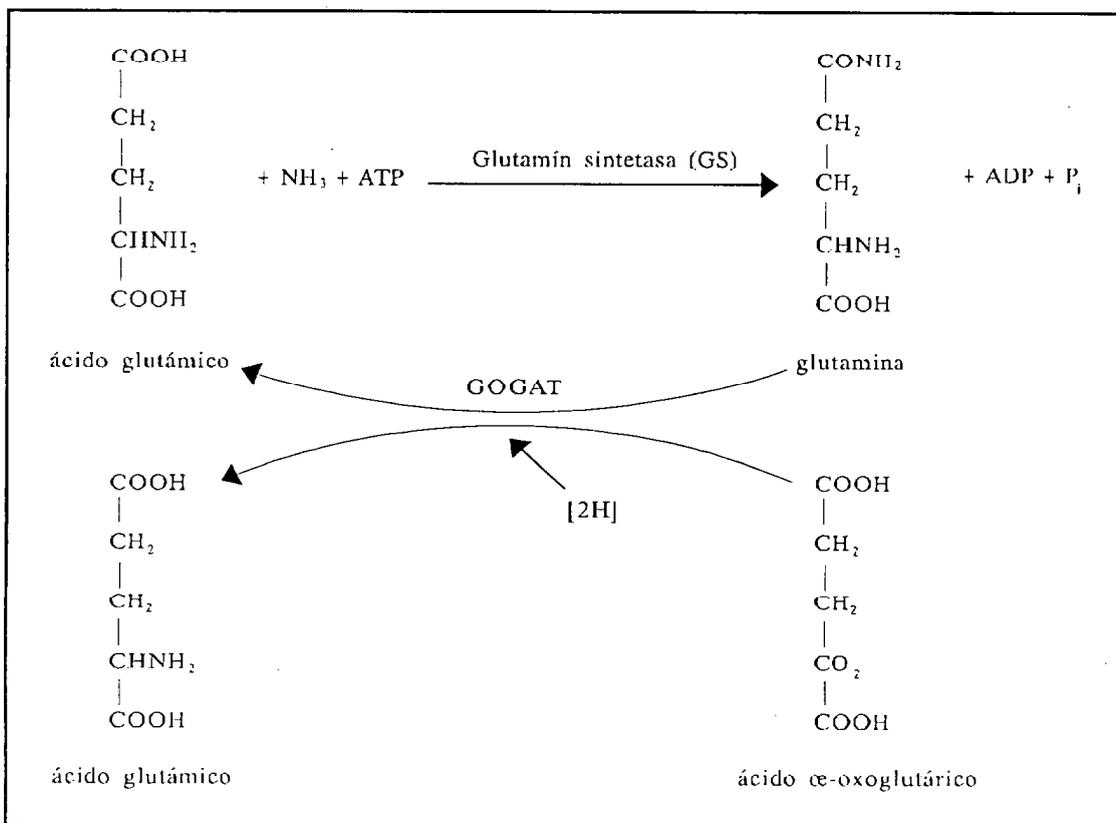


Figura 1.4 Esquema de la vía GS/GOGAT

El enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) ofrece una ruta alternativa de asimilación de amonio. En este caso el primer compuesto de asimilación es el ácido glutámico, formado a partir de amonio y α -cetoglutarato mediante una reacción de reducción. Cullimore y Sims (1981) demostraron actividad de esta enzima en *Chlamydomonas reinhardtii*, aunque según estos autores su actividad, probablemente está más relacionada en el catabolismo que en la asimilación directa de NH_3 . Se ha demostrado la asimilación del amonio mediante GDH en algas, en condiciones de inhibición de la actividad de la glutamina sintetasa por la presencia de metionina sulfoximina (MSX), y en presencia de una alta concentración de CO_2 en el medio (Hipkin *et al.* 1982).

El piruvato, el oxalacetato y el α -cetoglutarato son los tres compuestos de la glucólisis y del ciclo de Calvin que se usan como esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos. Cantidades significantes de fosfoenolpiruvato y acetilcoenzima A son utilizadas para la síntesis de aminoácidos y productos de las vías de las pentosas fosfato se consumen en la síntesis de los aminoácidos aromáticos.

Una vez que el amonio ha sido asimilado a nivel del grupo α -amino del glutamato, éste puede ser transferido a diferentes α -cetoácidos por medio de una serie de reacciones catalizadas por múltiples aminotransferasas para dar lugar a los distintos aminoácidos. Los aminoácidos se pueden agrupar en ciclo familias determinada por su origen biosintético (Tabla 1.7) La histidina tiene una vía biosintética completamente aislada, desconectada de cualquier otro de los aminoácidos. Su esqueleto de 5 átomos de carbono se deriva del 5-fosforribosilpirofosfato (PRPP).

Tabla 1.7 Familias de aminoácidos

Precusores	Productos	Familia
α -cetoglutarato + glutamato	glutamina arginina prolina	Glutamato
Oxalacetato + aspartato	asparagina metionina treonina isoleucina lisina	Aspartato
FNP + eritrosa-4-fosfato	fenilalanina tirosina triptófano	Aromáticos
3-fosfoglicerato	serina glicina cisteína	Serina
Piruvato	alanina valina leucina	Piruvato
PRPP	histidina	Histidina

El glutamato por sí mismo es un precursor directo de la síntesis de prolina, arginina y ornitina y la glutamina puede donar su grupo amida para la biosíntesis de asparagina, arginina, triptófano o histidina en reacciones catalizadas por aminotransferasas.

El grado de asimilación de amonio en tejidos algales varía en función de las condiciones ambientales, estado nutricional, fase de desarrollo, y genotipo o especie y aunque el ion amonio es extremadamente tóxico para las algas a altas concentraciones, es la forma de nitrógeno preferida por muchas especies. Las células de algas verdes tienen la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos esenciales a partir del carbono inorgánico, nitrógeno y azufre. En células eucariotas el principal lugar de síntesis de aminoácidos es el cloroplasto (Wallsgrave *et al.*, 1983).

1.3 Efecto de las condiciones de cultivo en el contenido en aminoácidos.

El contenido en aminoácidos en algas está influenciado por diversos factores como son: hábitat, estación del año, especie, disponibilidad y forma química en que se encuentre el nitrógeno en el medio, irradiación, etc.

En un estudio realizado con clorofitas durante un ciclo luz-oscuridad (Flynn, 1990b) se demostraba que el comienzo de la fase de oscuridad producía una disminución en la concentración de muchos aminoácidos, como consecuencia de la continuada síntesis proteica en oscuridad sin darse una significativa síntesis de aminoácidos. La concentración de aminoácidos en células deficientes en nitrógeno era más baja y presentaba menos variación a lo largo del día que aquellas otras células que habían crecido con suficiente nitrógeno en el medio.

Los efectos de la oscuridad o inadecuada iluminación sobre el nivel de aminoácidos pueden ser debidos a estrés por la fuente de carbono o a estrés por la fuente de energía. Debe existir un mantenimiento mínimo de la fotosíntesis para producir cadenas carbonadas para la síntesis de ciertos aminoácidos, y además debe haber una disponibilidad energética en forma de ATP y/o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) para los procesos de incorporación de amonio en aminoácidos y los subsecuentes procesos de transaminación.

La composición del perfil de aminoácidos libres está también relacionado con el patrón de metabolismo de carbono. La incorporación de carbono en el ciclo del 3-fosfoglicerato se refleja por la acumulación de glicerol y algunos aminoácidos como serina, alanina y glicina, en especies Chlorophyceae y Haptophyceae (Martín-Jézequel *et al.*, 1988). La incorporación de carbono en el ciclo de Krebs también da lugar a una mayor diversidad de aminoácidos, como se muestra en Bacillariophyceae por Beardall *et al.* (1976) y por Mortrain-Bertrand *et al.* (1987).

Por otra parte, la creación o estado continuo del contenido total en aminoácidos libre está relacionada con la incorporación de nitrógeno en los constituyentes celulares (Turpin y Harrison, 1978; Dortch *et al.*, 1984). Sólo una pequeña parte de los aminoácidos libres está envuelta en el metabolismo y en la síntesis proteica de la célula, mientras que la mayoría es de forma aparente, metabólicamente inerte (Wiemkem y Dürr, 1974). Los aminoácidos glutamina y alanina, preferencialmente incorporados a las proteínas forman el complejo metabólico localizado en el citoplasma, mientras que los aminoácidos básicos, arginina, lisina y ornitina, son constituyentes de las sustancias de reserva y están localizados en la vacuola (Oaks y Bidwell, 1970; Wiemken y Dürr, 1974; Wheeler y Stephens, 1977; Matile, 1978).

Si las células están creciendo con suficientes nutrientes en el medio, los niveles de la reserva de carbono disminuyen y la asimilación del nitrógeno inorgánico en aminoácidos depende de los nuevos productos fotosintetizados (Grant y Turner, 1969; Syrrret, 1981; Guerrero y Lara, 1987). Las condiciones que inhiben la fijación fotosintética del carbono (oscuridad, limitación por CO₂), así como el uso de inhibidores fotosintéticos limitan la provisión de estructuras carbonadas y cortan la asimilación de nitrógeno en aminoácidos (Thacker y Syrrret, 1972; Romero *et al.*, 1985; Lara y Romero, 1986). Si las células han estado creciendo en condiciones de limitación por nitrógeno, acumulan almidón y son

capaces de utilizarlo como fuente de carbono para la síntesis de aminoácidos tanto en presencia de luz como en oscuridad (Syrret, 1981; Elrifi y Turpin, 1986; Guy *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1983; Weger y Turpin, 1989). Consecuentemente, sólo las células con suficiente nitrógeno en el medio, presentan una fuerte fluctuación periódica de asimilación de nitrógeno.

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos comentados de forma extensa anteriormente, el presente trabajo presenta los objetivos siguientes:

- 1.- Establecimiento de un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, introduciendo las modificaciones adecuadas en los ya existentes en la bibliografía
- 2.- Aplicación del método a la determinación del perfil de aminoácidos libres y contenido en proteínas en la macroalga *Ulva rigida*, en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio.
- 3.- Determinación cualitativa y cuantitativa del perfil de aminoácidos libres, según el método descrito, en la microalga *Chlorella pyrenoidosa*, en función de la fuente de carbono.
- 4.- Determinación cualitativa y cuantitativa del perfil de aminoácidos libres, según el método descrito, en la microalga *Chlorella pyrenoidosa*, en función de la fuente de nitrógeno.
- 5.- Estudio de la influencia de surfactantes aniónicos, catiónicos y neutros en la intensidad de la señal de fluorescencia del derivado o-ftaldialdehido-lisina.
- 6.- Establecimiento de un método analítico para la determinación de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en presencia de surfactantes y su aplicación a muestras de algas.

II.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

2.1.1 Reactivos

Las disoluciones patrón de aminoácidos: L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, L-glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, DL- α -amino-n-ácido butírico, L-triptófano, L-metionina, L-valina, L-fenilalanina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina se prepararon en agua de calidad HPLC a partir de patrones individuales (Sigma Chemicals Co., USA), para proporcionar disoluciones de 1000, 500, 250 y 100 nM. El agua de calidad HPLC fue obtenida de un sistema de purificación de agua MilliQ (Millipore, USA) con un valor de resistividad de 18 μ S cm y fue utilizada en todo momento. El metanol (Panreac, España) y el tetrahidrofurano (Sigma Chemicals Co., USA) empleados fueron de calidad HPLC. El acetato de sodio, tetraborato de sodio y el o-phthaldialdehído (OPA) fueron adquiridos de Sigma, el 2-mercaptoetanol de BDH (Inglaterra) y el ácido bórico de Merck (Darmstadt, Alemania).

El material de vidrio utilizado se mantuvo exclusivo para el análisis de aminoácidos; se enjuagaba con HCl al 10%, se lavaba con agua destilada y finalmente con agua MilliQ. Durante todo el proceso, preparación de muestras, derivatización y análisis, se usaban guantes para minimizar la contaminación por los aminoácidos presentes en las manos (Hamilton, 1965)

2.1.2 Derivatización

El reactivo de derivatización se preparó disolviendo 0.135 gr. de o-ftaldialdehído (OPA) en 5 ml de metanol y llevándolo a volumen de 25 ml con tetraborato de sodio 0.1 M. Se filtran 2 ml y en el día de uso se añade 20 μ l de 2-mercaptoetanol.

El proceso de derivatización se llevó a cabo en tubos de un solo uso eppendorf de 1.5 ml de capacidad. A 240 μ l de muestra se añade 20 μ l de una solución 9 μ M de ácido 2-n-aminobutírico. La reacción comienza al añadir 50 μ l de agente derivatizador. Después de 1 minuto la reacción se detiene al añadir 150 μ l de ácido bórico 0.4 M. Esta adición rebaja el pH por debajo de 7.5. Se inyecta en el cromatógrafo un volumen de 200 μ l exactamente 3 minutos después de haber comenzado el proceso de derivatización.

2.1.3 Sistema Cromatográfico

El sistema cromatográfico utilizado, suministrado por la casa comercial Pharmacia Biotech (LKB, Suecia) consistió en dos bombas de doble pistón modelo 2142, un inyector manual modelo PV-7 y un detector de fluorescencia con lámpara de xenón y célula de cuarzo de 8 μ l, provisto con un filtro de excitación de interferencia a 330 nm y filtro de emisión de corte a 408 nm. Todos los instrumentos estaban conectados por medio de una interfase a una estación de datos e integración EzChrom (Pharmacia, Suecia).

La columna analítica usada fue Beckman 150 \times 4.6 mm Ultrasphere (5 μ m partícula esférica octadecilsilano ODS C18 endcapped) precedida de un guarda columna Guard-Pak de la casa comercial Waters con relleno μ Bondapak (10 μ m partícula irregular ODS C18 endcapped).

Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes:

solvente A: tampón acetato de sodio 50 mM (pH 6,8) 9:1 en metanol

solvente B: metanol 100%

Una vez que los solventes se desgasificaban filtrándolos con filtros de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Millipore), se añadía el tetrahidrofurano (THF).

El sistema de gradiente lineal usado fue el siguiente:

Tiempo (min.)	% A	% B
0	0	100
7	20	80
14	52	48
19	80	20
22	100	0
26	0	100

2.2 Procedimiento espectrofluorimétrico

2.2.1 Aparatos y Reactivos empleados

Los espectros de emisión y excitación y las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 equipado con una lámpara de xenón y una célula de cuarzo de 1 cm. De paso de luz. Las rendijas utilizadas fueron 2.5 nm.

Los surfactantes polioxietileno(23)dodecanol (Brij-35), polioxietileno 10-oleiéter (Brij 96), polioxietileno 10-lauriléter (POLE) y polioxietileno 9,5-p-t-octifenol (TX-100) fueron suministrados por Sigma Chemical Co., el resto, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) y laurilsulfato de sodio (NaLS), por Aldrich Chemical Co.

2.2.2 Estudio espectrofluorimétrico del derivado OPA-lisina en presencia de surfactantes.

A una solución de lisina $2,5 \times 10^{-4}$ M se añade 50 μ l de agente derivatizador y cantidad variable de los diferentes surfactantes de forma que su concentración final para cada uno de ellos sea 5 veces superior a su concentración micelar crítica según los valores presentados en la Tabla 1.3. Se agita la mezcla y después de 1 minuto se añade 150 μ l de ácido bórico. Con estas disoluciones se realizaban los espectros de excitación y emisión usando rendijas de 2.5 nm, después de 2 minutos de haber comenzado la reacción de derivatización.

2.3 Determinación de aminoácidos por CLAR en presencia de surfactantes.

Para el análisis de aminoácidos por CLAR utilizando surfactantes como realzadores de la señal de fluorescencia, se procedió de la forma descrita en el apartado 2.1, sustituyendo los 20 μ l de ácido aminobutírico por el mismo volumen de surfactante de concentración 5 veces superior a su c.m.c.

2.3.1 Estudio del efecto de la concentración de polioxietileno(10) lauriléter (POLE) sobre la señal de aminoácidos.

Para determinar la influencia de POLE en la señal de los diferentes aminoácidos, se prepararon una serie de ocho soluciones de POLE de concentración comprendidas en el rango $0-2 \times 10^{-3}$ M. Se analizaron diversas muestras patrón que se analizaron según el procedimiento 2.3. Los 20 μ l añadidos de surfactante corresponden a cada una de las soluciones de POLE preparadas. Una vez cromatografiadas cada una de las disoluciones se medía el área de pico

correspondiente a cada aminoácido y se representaba frente a la concentración de POLE.

2.4 Descripción de especies

Las especies utilizadas fueron seleccionadas en función de su disponibilidad, capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo e interés comercial.

2.5.1.- *Ulva rigida* C. Agardh

Especie oportunista y cosmopolita perteneciente a la Familia Ulvaceae del Orden Ulvales (Chlorophyta). Planta laminar diestromática que crece fija al sustrato mediante discos basales aunque es capaz de crecer vegetativamente flotando libremente por lo que presenta una morfología muy variable. Ciclo de vida de tipo haplodiploide isomórfico con marcada estacionalidad, aunque en condiciones propicias puede ser pseudoperenne. Las algas utilizadas para realizar los experimentos fueron recolectadas en el muelle de Taliarte y en Juan Grande, costa Este y Sureste respectivamente de la isla de Gran Canaria.

2.5.2.- *Chlorella pyrenoidosa* Beijerinck

Perteneciente a la Familia Oocystaceae del Orden Tetrasporales (Chlorophyta). Alga unicelular de 2 a 12 μm de diámetro, esférica o elipsoidal que crece individualmente. El cloroplasto es parietal, con un pirenoide en la mayoría de las especies y de pared celular delgada. Ocurre en agua dulce y salada. Reproducción exclusivamente asexual. La especie IPPAS 82T fue cedida por la Prof. E.S Kuptzova (Institute of Plant Physiology, Moscú, Rusia).

2.5 Extracción de aminoácidos libres

Macroalgas: se cortan pequeñas piezas de alga, aproximadamente discos de 1 cm², se introduce en un tubo eppendorf y se añade 1 ml de agua MilliQ. Se incuba la muestra a 70-80°C durante una hora, se centrifuga y se transfiere el contenido a otro tubo. La muestra se almacena en el congelador a -20°C hasta su análisis.

Microalgas: se recoge el medio de cultivo por centrifugación en botellas de polipropileno de 0.5 L de capacidad. Del precipitado celular se recoge un volumen determinado para la extracción de aminoácidos, que suele estar entre 10 y 30 µl. Dicho volumen se introduce en un tubo tipo eppendorf y se añade 1 ml de agua caliente MilliQ y se incuba a 70-80°C durante media hora. A continuación se centrifuga, se retira el sobrenadante y se repite el proceso con otro ml de agua. Al final se obtienen 2 ml los cuales se centrifugan y se guardan en el congelador hasta su análisis.

2.6 Determinación de Clorofila y crecimiento celular.

Las clorofilas se extrajeron del alga en acetona al 90% para macroalgas y en metanol 100% en el caso de microalgas. Las concentraciones de clorofilas **a** y **b** se determinaron espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-60 y se cuantificaron usando las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) y las de Porra (1989) para los extractos de macro y microalgas respectivamente.

La densidad celular se midió por densidad óptica a 750 nm. Las tasas de crecimiento celular (μ) fueron calculadas en la fase exponencial según la expresión siguiente:

$$\mu = \ln x_2 - \ln x_1 / (t_2 - t_1)$$

De donde x_1 y x_2 son los valores numéricos de masa celular (densidad óptica) al principio y al final de la fase exponencial, t_1 y t_2 son los tiempos en horas correspondientes a los que fueron tomados los valores x_1 y x_2 .

A partir de la tasa de crecimiento se obtiene el tiempo de doblaje (td) según la expresión:

$$td = \ln 2 / \mu$$

El tiempo de doblaje para una determinada especie, es el tiempo que tarda la población algal en duplicarse.

2.7 Determinación de Proteínas totales y relación C:N

El contenido en proteína total se calculó multiplicando el contenido en nitrógeno orgánico total por el factor de 6.25. El nitrógeno orgánico total en el tejido de las muestras de algas se determinó por digestión con ácido sulfúrico concentrado a 300 °C en un digestor 1015 Digester (Tecator, Succia) y posterior destilación y neutralización según el método Kjeldahl.

La determinación de la relación C:N en las muestras de *Ulva rigida* se realizó sobre material seco (60 °C, 48 h.) con un Autoanalizador Elemental (2400, Perkin Elmer).

2.8 Condiciones de cultivo

2.8.1 Macroalgas

Las plantas de *Ulva rigida* fueron cultivadas durante un mes en tanques de 750 l de capacidad (1.75 m^2) circulando en la columna de agua con la ayuda de difusores de aire situados en el fondo del tanque y bajo flujo continuo ($8 \text{ vol./d} = 4.8 \text{ g NID (Nitrógeno Inorgánico Disuelto) /m}^2\text{d}$) de efluente de piscifactoría (concentración media de amonio 0.8 mg/l). Los cultivos estuvieron creciendo a una densidad de $2.5 \text{ g peso fresco/l}$, mediante recolección semanal. Después de un mes de cultivo, las muestra fueron tomadas para análisis (día 0) y las plantas fueron cultivadas con agua de mar (contenido en $\text{NID} < 2 \text{ } \mu\text{M}$) bajo las mismas condiciones. Las muestra para análisis (aminoácidos, proteínas y clorofilas) fueron tomadas cada tres días después del cambio a agua de mar, hasta el día decimotavo, a partir del cual no se observó actividad fotosintética del alga.

La irradiación media fue de $1350 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, con fluctuaciones diarias de la temperatura del agua de 25.6°C (al mediodía) a 19.9°C (durante la noche). La diferencia de temperatura entre los tanques no excedió de 0.5°C en cada experimento.

En la Figura 2.1 se muestra la especie de *Ulva rigida* y el sistema de cultivo empleado en el invernadero.

2.8.2. Microalgas

La especie de *Chlorella* se cultivó axenicamente en medio de cultivo mínimo (Sueoka, 1960), bajo luz blanca continua ($400 \text{ } \mu\text{mol de foton/m}^2 \text{ s}$) proporcionada por cuatro fluorescentes Philips, a una temperatura entre 25° y 27° C . Las algas crecieron en matraces de balón de 1 litro de capacidad, y se mantuvieron en suspensión por burbujeo con una mezcla aire: CO_2 en una proporción 95:5 (v/v),

(condiciones de alto CO₂) o con aire con un 0.03% de CO₂ (condiciones de bajo CO₂). En la Tabla 2.1 se describen las disoluciones patrón utilizadas para la preparación de los medios de cultivo.

En la Figura 2.2 se muestran las células de *Chlorella pyrenoidosa* vistas al microscopio óptico (aumentos 400×), así como su sistema de cultivo en cámara.

Tabla 2.1 Composición del medio de cultivo medio mínimo (MM) siguiendo la formulación de Sueoka (1960).

	Reactivo	Cantidad (gr/L)
Solución Beijerinck	NH ₄ Cl	16.0
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	2.04
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	4.0
Solución de Fosfatos	K ₂ HPO ₄	37.42
	KH ₂ PO ₄	14.52
Solución Elementos Traza	EDTA	50.0
	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	22.0
pH 6.5-6.8 con KOH	H ₃ BO ₃	11.4
	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	5.06
	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	4.99
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	1.61
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	1.57
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1.10

Para preparar 1 L. de medio mínimo se mezclan 25 ml de la solución Beijerinck, 25 ml de solución fosfatos, 1 ml de solución Trazas y se enrasa a 1L con agua destilada.

En los ensayos realizados variando la fuente de carbono, se añadió glucosa o acetato de sodio al medio mínimo en concentración 60 mM. Los medios fueron burbujeados con aire.

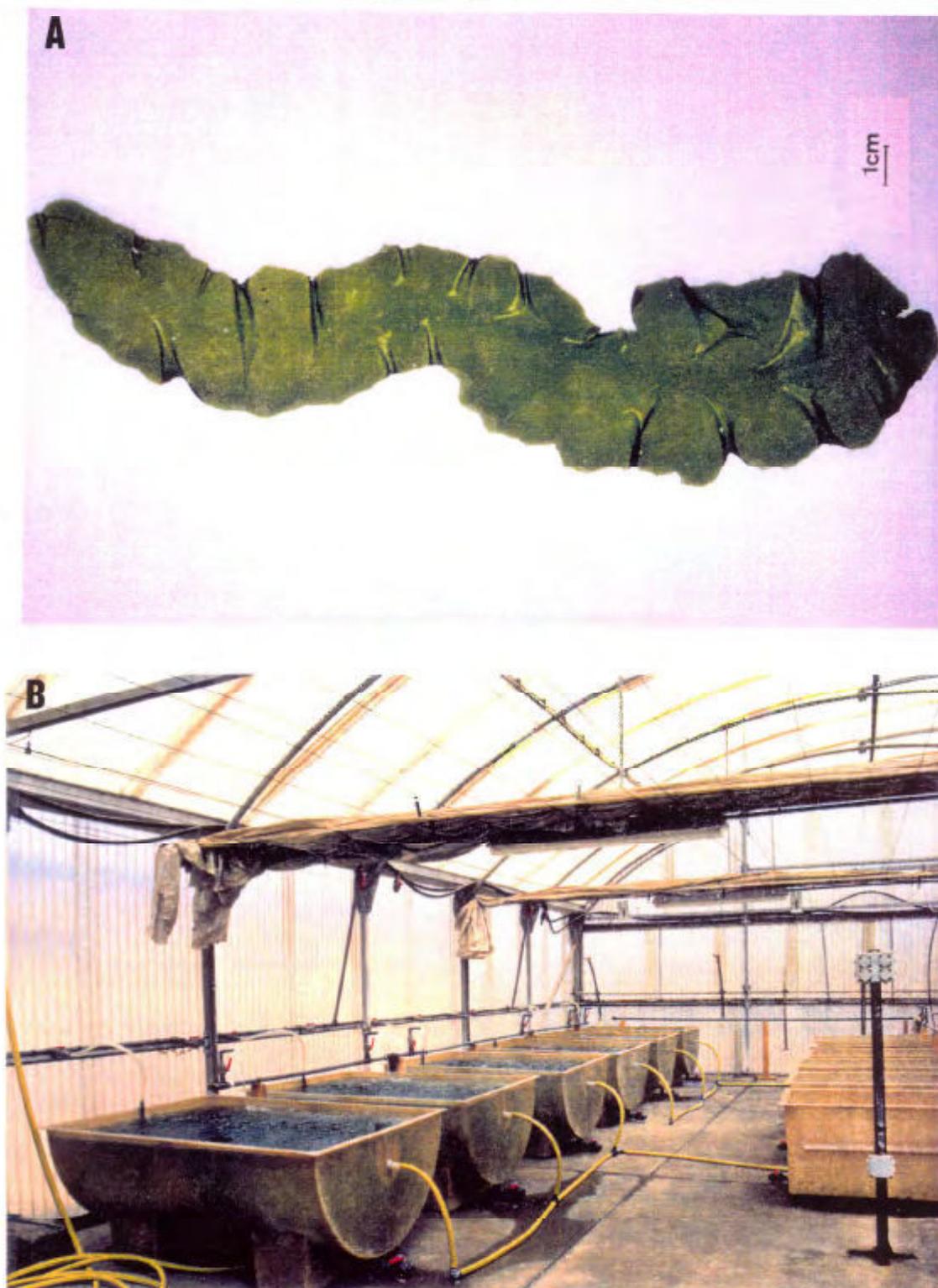


Fig. 2.1 A) *Ulva rigida*; B) vista general de los cultivos de esta especie en invernadero.

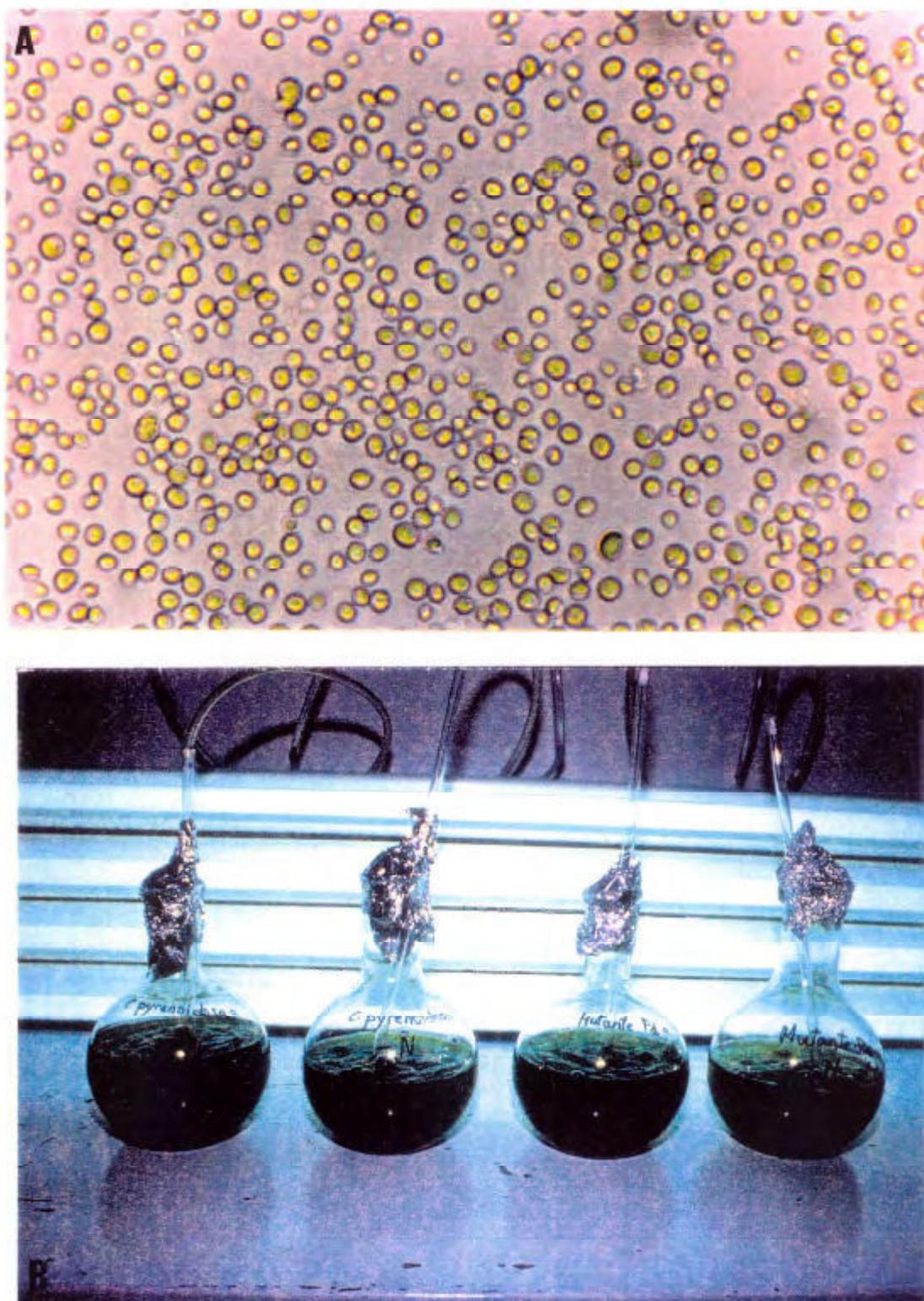


Fig 2.2 A) Células de *Chlorella pyrenoidosa* vistas al microscopio óptico (aumentos 400×); B) sistema de cultivo de esta especie en cámara.

Los estudios realizados con diferentes fuentes de nitrógeno, se añade al medio mínimo sin nitrógeno, nitrato potásico o urea a la misma concentración de nitrógeno (8 mM). Los medios fueron burbujeados con aire al 5 % en CO₂. Para los ensayos realizados con inhibidores de la glutamín sintetasa, se utilizó la metionina sulfoximina (MSX), en concentración 1mM en medio de cultivo mínimo.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

3.1.1 Optimización del método.

Para desarrollar el gradiente cromatográfico se partió de las condiciones cromatográficas descritas por Flynn (1988), estas fueron: eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1) más 0.25% THF y eluyente B metanol, con el siguiente gradiente 0% B a 0 min., 20% B a 0.5 min., 20% B a 7.0 min., 42% B a 9.0 min., 42% B a 11.0 min., 52% B a 12.0 min., 52% B a 14.0 min., 70% B a 14.5 min., 80% B a 19.0 min., 100% B a 22.0 min., volviendo a 0% de B al cabo de 5 min.

La Figura 3.1 muestra la resolución de una mezcla standard resuelta bajo estas condiciones. Se puede observar que los picos correspondientes a glutamina e histidina aparecen muy juntos, la mezcla arginina glicina no esta bien resuelta y los picos de alanina y tirosina prácticamente coinciden.

Para intentar resolver estos picos, se ensayaron las condiciones cromatográficas descritas por Flynn (1992) con una ligera modificación en la fase orgánica. El eluyente A fue un tampón de acetato:metanol (9:1) más 0.25% de THF y solvente B metanol más un 0.5% de THF, con el siguiente gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 7 min., 52% B a 14 min., 80% B a 19 min., 100% B a 22 min., volviendo a 100% B al cabo de 5 min. Con este gradiente se obtuvieron mejores resultados respecto al primero ensayado en cuanto a separación de picos (Fig. 3.2). La posición de histidina cambia, apareciendo ahora antes que glutamina, pero se pierde la resolución de estos picos. Alanina y tirosina están muy bien separadas, mientras que glicina, treonina y arginina aparecen mejor resueltas pero sin separarse por completo.

Con objeto de mejorar esta última separación, se ensayaron diferentes cantidades (2 %, 2.5 % y 3 %) de THF en el eluyente A. Los perfiles de elución en estas condiciones se muestran en la Figura 3.3, 3.4 y 3.5 respectivamente. Como se puede observar la mejor separación se consigue con un 2% de THF y a medida que aumenta este porcentaje en la fase orgánica se pierde la resolución de los picos glicina, arginina y treonina. Además como consecuencia del aumento de THF, los aminoácidos metionina y triptófano coeluyen en un sólo pico y fueron cuantificados conjuntamente. Estas condiciones fueron las elegidas para todo el desarrollo experimental.

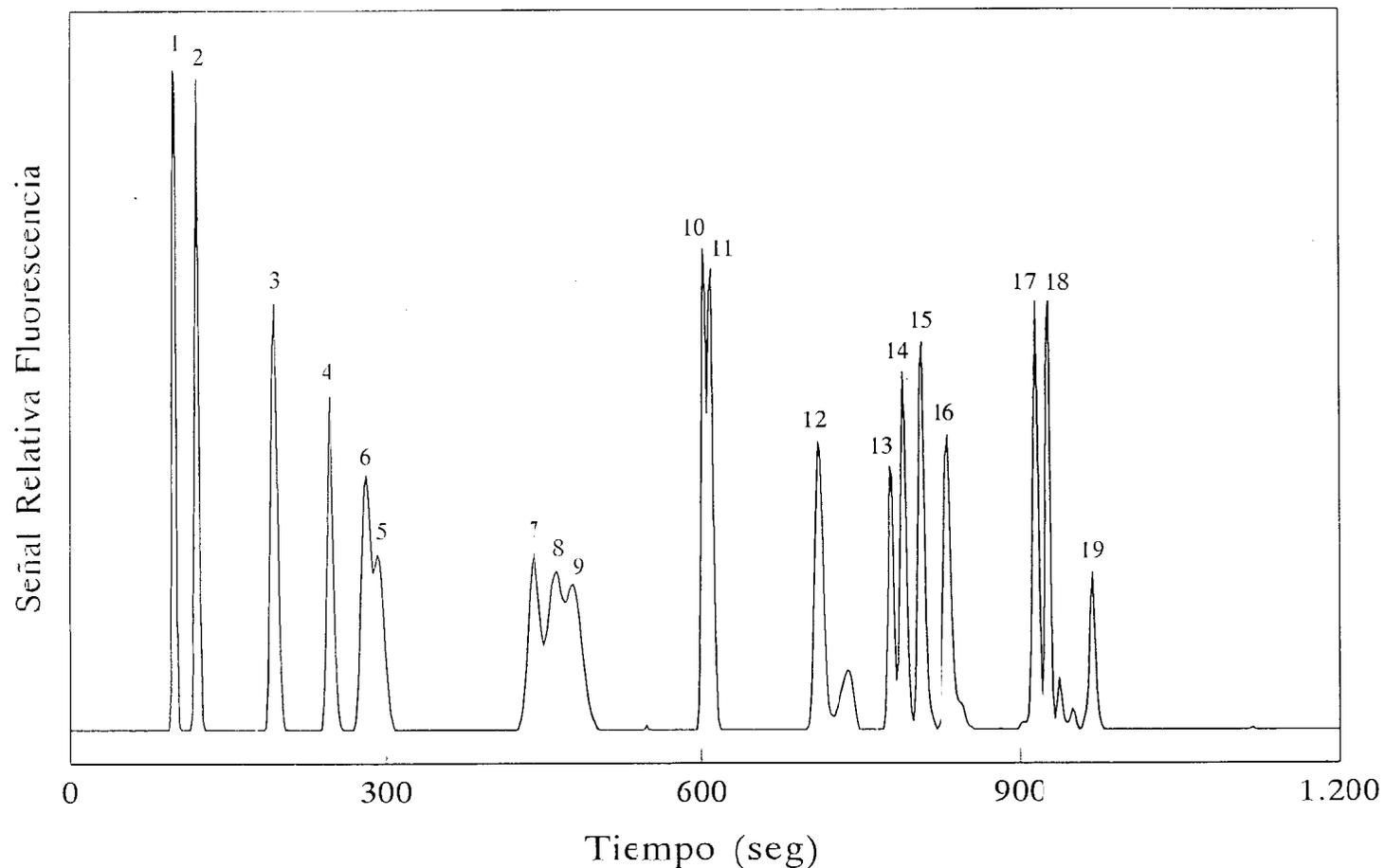


Figura 3.1 Resolución de una mezcla patrón de aminoácidos. Eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1) más 0.25% THF, eluyente B metanol. Gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 0.5 min., 20% B a 7.0 min., 42% B a 9.0 min., 42% B a 11.0 min., 52% B a 12.0 min., 52% B a 14.0 min., 70% B a 14.5 min., 80% B a 19.0 min., 100% B a 22.0 min., 0% de B a 27 min. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu, 19) Lys.

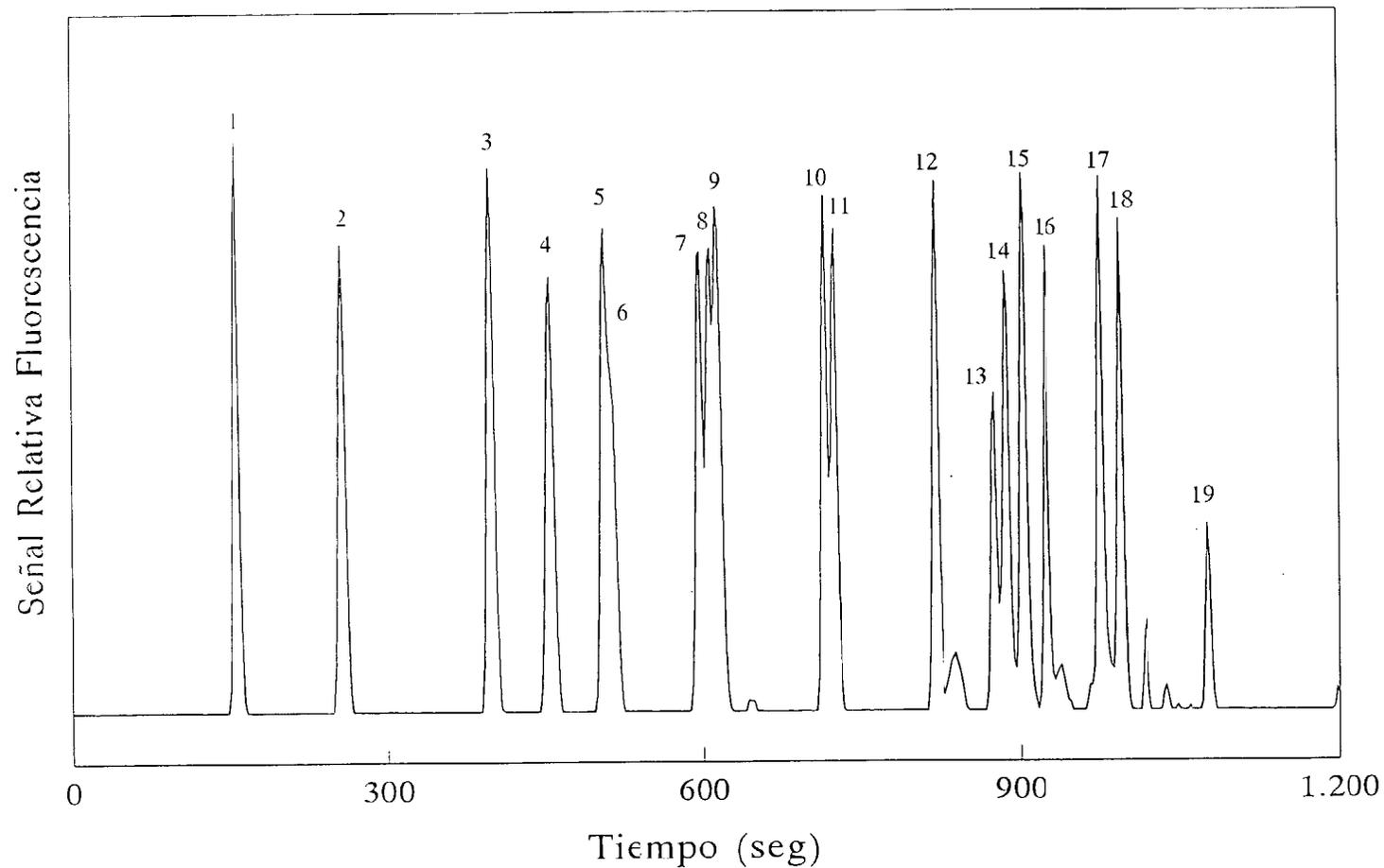


Figura 3.2 Resolución de una mezcla patrón de aminoácidos. Eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1) más 0.25% THF, eluyente B metanol más 0.5 % THF. Gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 7.0 min., 52% B a 14.0 min., 80% B a 19 min., 100% B a 22.0 min., 0% de B a 27 min. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu, 19) Lys.

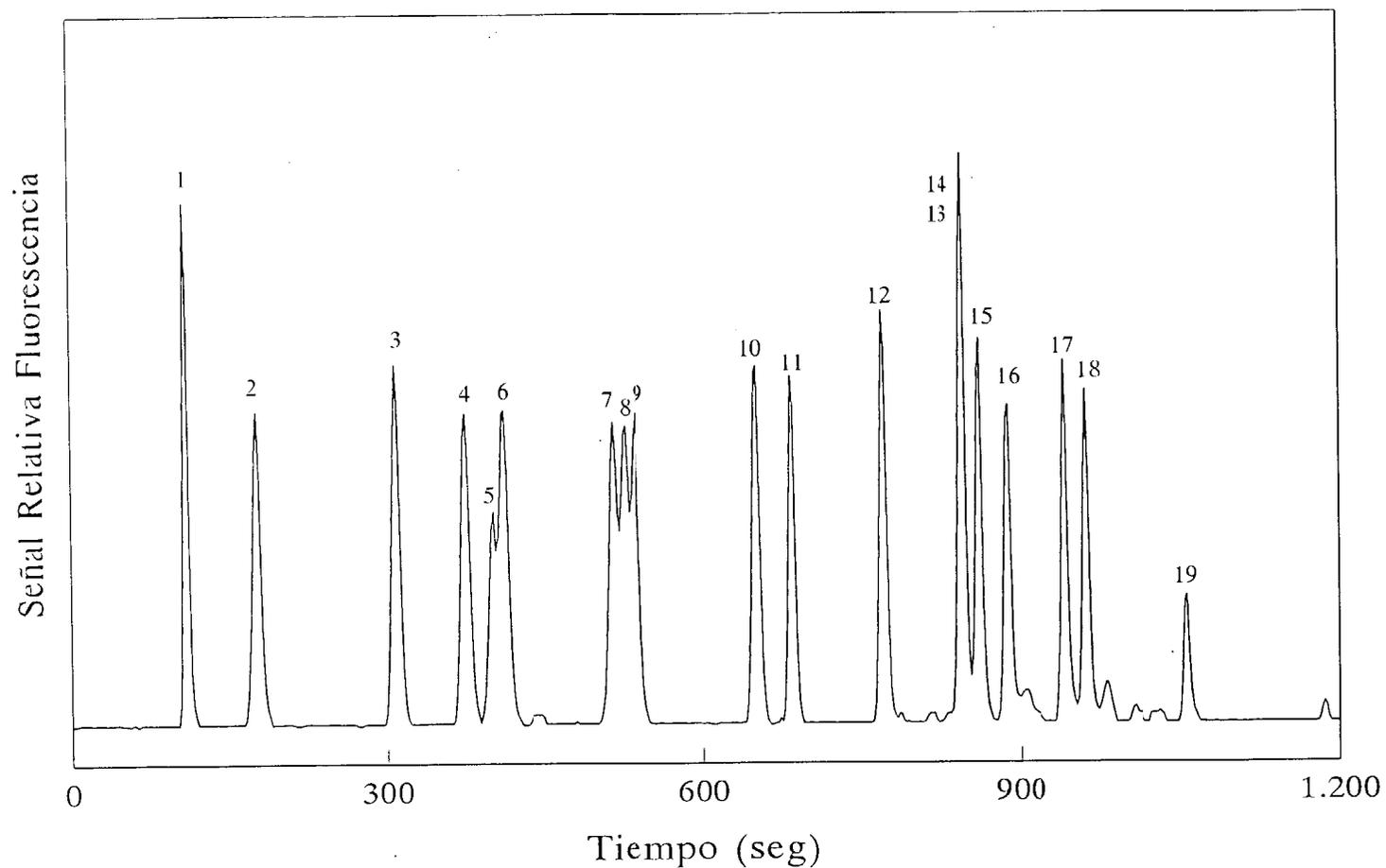


Figura 3.3 Resolución de una mezcla patrón de aminoácidos. Eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1 más 2.0% THF, eluyente B metanol más 0.5 % THF. Gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 7.0 min., 52% B a 14.0 min., 80% B a 19 min., 100% B a 22.0 min., 0% de B a 27 min. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

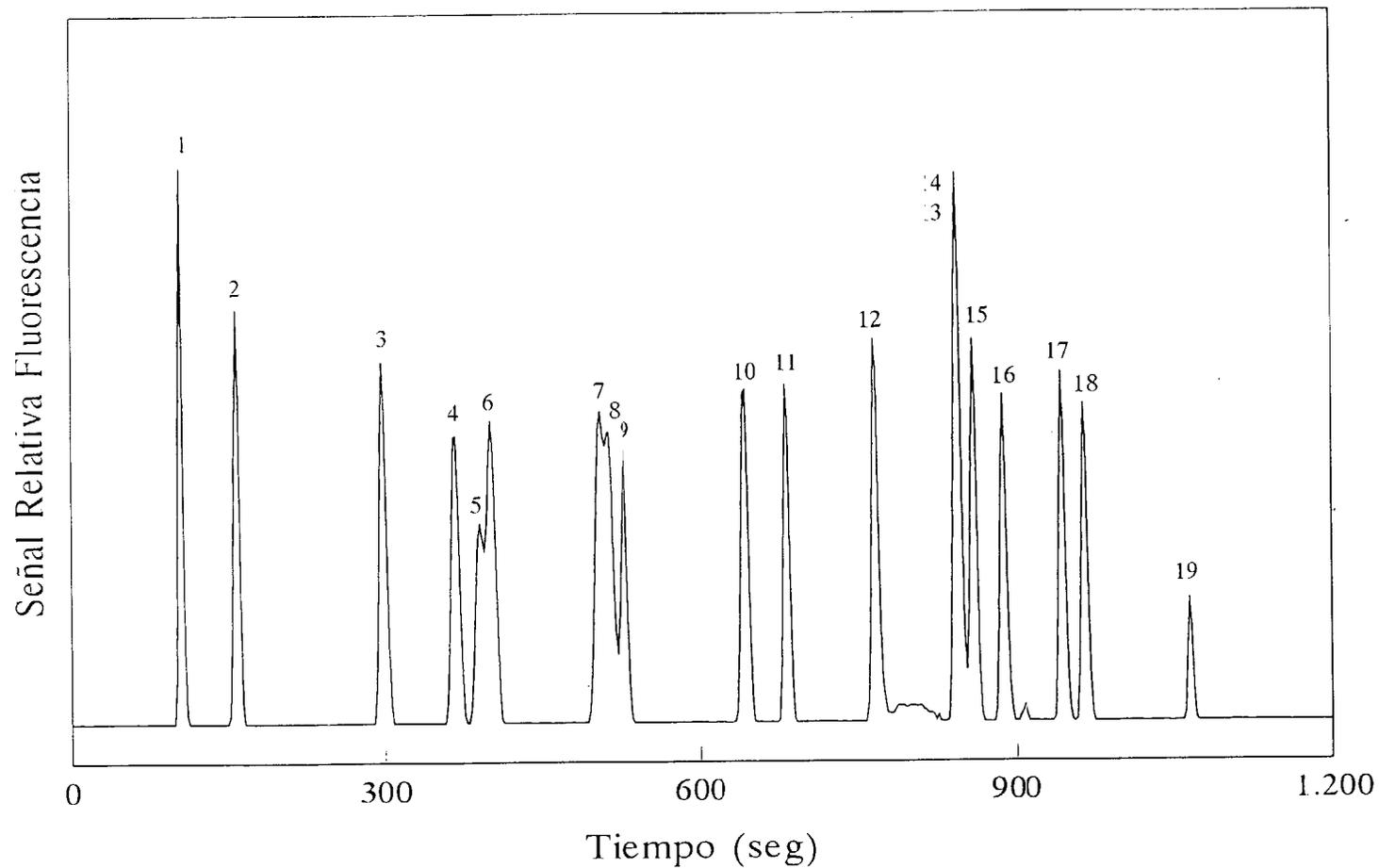


Figura 3.4 Resolución de una mezcla patrón de aminoácidos. Eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1) más 2.5% THF, eluyente B metanol más 0.5 % THF. Gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 7.0 min., 52% B a 14.0 min., 80% B a 19 min., 100% B a 22.0 min., 0% de B a 27 min. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

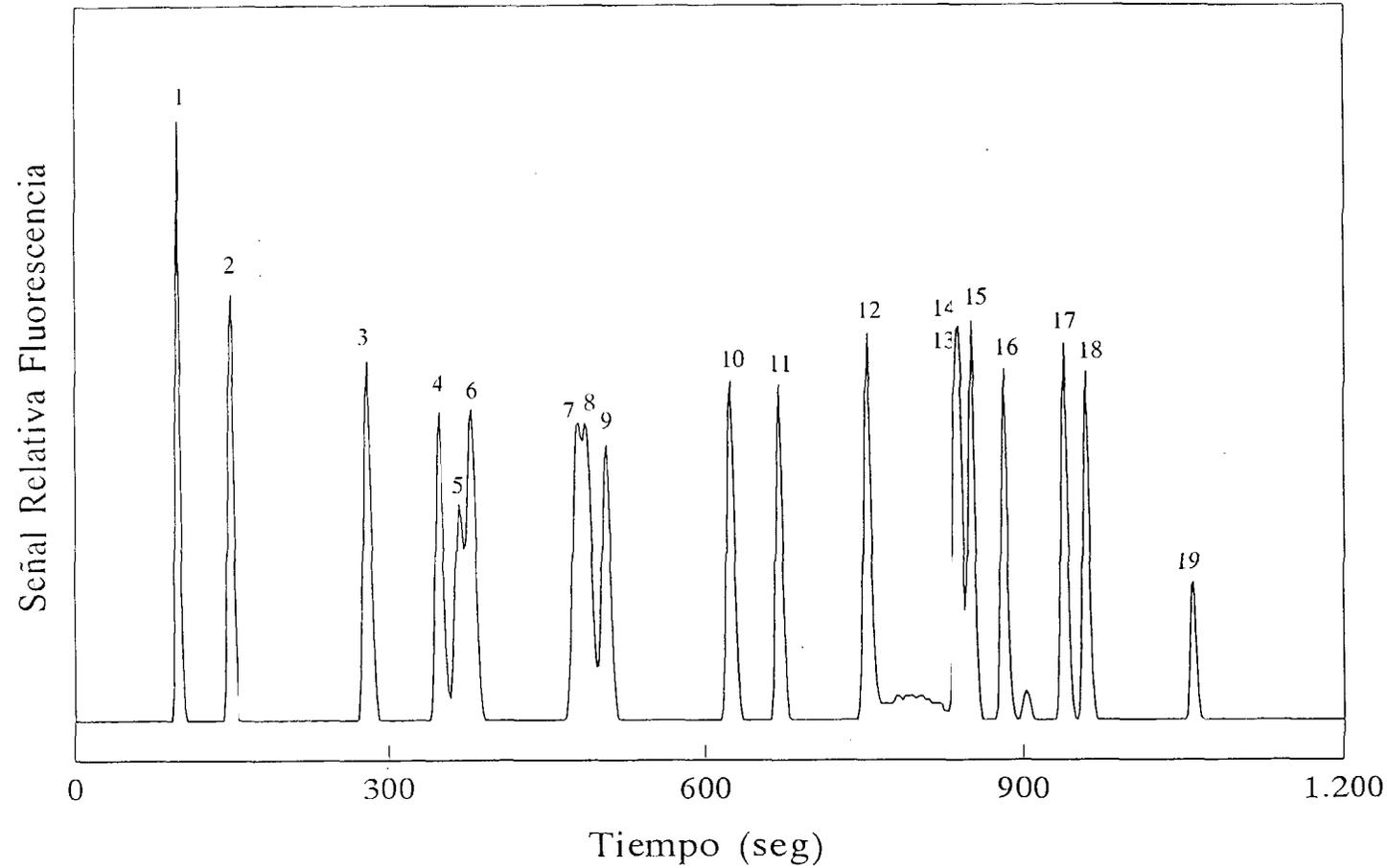


Figura 3.5 Resolución de una mezcla patrón de aminoácidos. Eluyente A tampón de acetato:metanol (9:1) más 3.0% THF, eluyente B metanol más 0.5 % THF. Gradiente: 0% B a 0 min., 20% B a 7.0 min., 52% B a 14.0 min., 80% B a 19 min., 100% B a 22.0 min., 0% de B a 27 min. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu, 19) Lys.

3.1.2 Características analíticas del método

3.1.2.1 Curvas de calibrado

Para una serie de réplicas se determinaron los tiempos de retención en columna. En la Tabla 3.1 se muestran los tiempos de retención obtenidos para los aminoácidos en estudio, así como sus correspondientes desviaciones estándar.

Tabla 3.1. Número de pico y orden de elución, tiempos de retención y desviaciones estándar para cada uno de los aminoácidos identificados en los cromatogramas.

Pico	Aminoácido	TR (min.)	DS
1	Ac. Aspártico	1.88	± 0.01
2	Ac. Glutámico	3.00	± 0.05
3	Asparagina	5.34	± 0.06
4	Serina	6.49	± 0.06
5	Histidina	7.02	± 0.05
6	Glutamina	7.09	± 0.05
7	Glicina	8.73	± 0.18
8	Arginina	8.95	± 0.08
9	Treonina	9.14	± 0.07
10	Alanina	10.77	± 0.69
11	Tirosina	11.56	± 0.20
13/14	Triptófano/Metionina	14.17	± 0.46
15	Valina	14.60	± 0.09
16	Fenilalanina	15.09	± 0.04
17	Isoleucina	16.05	± 0.04
18	Leucina	16.44	± 0.11
19	Lisina	18.02	+ 0.09

Con la finalidad de establecer en qué intervalo de concentraciones existe linealidad entre la intensidad relativa de fluorescencia y la concentración de analito se establecieron las correspondientes curvas de calibrado. Se comprueba la existencia de relación lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 0.1 y 10 μM . Los coeficientes de correlación de la concentración de analito frente al área de pico, en dicho rango, fueron superiores a 0.999 para todos los aminoácidos. Dichos valores se encuentran tabulados en la Tabla 3.2 .

3.1.2.2 Evaluación estadística del método

El estudio de la precisión y exactitud del método para la determinación cuantitativa de los diferentes aminoácidos, se realizó mediante el análisis de seis muestras patrón que contenían una concentración de analito intermedia (3 μM) del intervalo de concentración establecido. A partir de la comparación de las áreas para las respectivas mezclas, se calcularon los parámetros estadísticos que aparecen en la Tabla 3.3. Puesto que al tomar un nivel de confianza del 95% y cinco grados de libertad, el valor de la t de Student es 2,57, de los valores obtenidos para los parámetros estadísticos antes mencionados se deduce que el método analítico propuesto puede considerarse correcto y suficientemente preciso.

Tabla 3.2 Características de las rectas de calibrado obtenidas para la determinación cuantitativa de los OPA-aminoácidos derivados.

Aminoácido	Pendiente	Ordenada	c.c.
Asp	8.94E+04	0.99E+04	0.999
Glu	9.03E+04	1.13E+04	0.999
Asn	10.00E+04	0.72E+04	0.999
Ser	0.08E+04	1.38E+04	0.999
His	6.15E+04	0.34E-04	0.999
Gln	9.94E+04	0.54E+04	0.999
Gly	5.80E+04	2.45E+04	0.999
Arg	7.94E+04	0.89E+04	0.999
Thr	10.34E+04	0.51E+04	0.999
Ala	8.34E+04	1.97E+04	0.999
Tyr	7.89E+04	0.57E+04	0.999
Trp/Met	133.39E+04	0.13E-04	0.999
Val	8.81E+04	0.93E+04	0.999
Phe	7.41E+04	0.58E+04	0.999
Iso	75.62E+04	0.80E+04	0.999
Leu	7.16E+04	0.72E+04	0.999
Lys	2.80E+04	0.12E+04	0.999

Tabla 3.3 Valor de los parámetros obtenidos en la evaluación estadística del método.

AA	\bar{x}^a	σ_{n-1}^b	σ_m^c	t_{exp}^d	% Error
Asp	3.36	0.2	0.47	0.76	14.69
Glu	3.21	0.04	0.20	1.05	6.70
Asn	3.43	0.04	0.20	2.14	6.16
Ser	3.37	0.03	0.18	2.05	5.67
His	3.20	0.03	0.16	1.20	5.38
Gln	3.57	0.03	0.17	3.29	5.12
Gly	3.65	0.03	0.16	4.05	4.63
Arg	4.07	0.06	0.25	4.25	6.51
Thr	3.00	0.03	0.18	0.03	6.29
Ala	3.48	0.05	0.23	2.03	7.08
Tyr	3.50	0.05	0.23	2.22	6.78
Met/Trp	3.30	0.05	0.22	1.25	7.11
Val	3.44	0.05	0.23	1.88	7.13
Phe	3.41	0.06	0.25	1.68	7.55
Iso	3.50	0.06	0.25	1.99	7.53
Leu	3.40	0.06	0.25	1.56	7.83
Lys	3.44	0.03	0.18	2.48	5.42

a) media de los valores de concentración

b) desviación estándar

c) desviación estándar de la media

d) valor del parámetro t calculado experimentalmente

3.1.2.3 Límites de detección

Para determinar la cantidad más pequeña de un componente que se puede medir en una separación determinada, se calcula el límite de detección. Experimentalmente se define como la cantidad de sustancia que produce un pico cuya altura es múltiplo de la altura del ruido de fondo da la línea base (razón señal ruido). En este estudio los valores para cada aminoácido (Tabla 3.2) se obtienen considerando la altura de pico como dos veces la del ruido de fondo de la línea base.

Tabla 3.4 Límites de detección para los OPA-aminoácidos derivados cuantificados.

AA	L.D. (pmol)
Asp	0.09
Glu	0.12
Asn	0.16
Ser	0.20
His	0.42
Gln	0.16
Gly	0.16
Arg	0.19
Thr	0.20
Ala	0.13
Tyr	0.13
Trp/Met	0.02
Val	0.12
Phe	0.15
Iso	0.13
Leu	0.14
Lys	0.91

3.2 Efecto de la disponibilidad del nitrógeno en la composición de aminoácidos y proteínas en *Ulva rigida*.

Las fluctuaciones estacionales en la concentración de nitrógeno en los ecosistemas marinos imponen modelos de crecimiento dependientes del nivel de nutrientes en la mayoría de los macrófitos. Esta dependencia y el efecto fisiológico de la misma, es mucho más evidente en sistemas de cultivo intensivo, en los cuales las algas están sometidas a condiciones de stress fisiológico y nutricional.

El estudio del efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre el perfil de aminoácidos libres en *Ulva rigida* mostró una disminución progresiva en la concentración de los mismos a medida que este elemento pasaba a ser limitante. El contenido inicial de aminoácidos libres fue de 41.76 $\mu\text{moles/gr. PS}$, reduciéndose tras siete días de cultivo en medio sin nitrógeno, a 8.2 $\mu\text{moles/gr. PS}$, lo que supone una disminución del 80% del contenido original. Durante los primeros seis días de cultivo bajo limitación por nitrógeno la disminución de la concentración de aminoácidos libres fue lineal y a partir del sexto día, se mantiene prácticamente constante (Fig. 3.6).

El contenido en proteína total varió desde un 20 % del peso seco en las condiciones iniciales del cultivo hasta menos de un 10% del peso seco al final del experimento. El contenido proteico en el alga siguió una evolución similar a la variación en el contenido de aminoácidos. En una primera fase se observó una disminución lineal, que en este caso se prolongó hasta el noveno día de experimento, seguido por una segunda fase de disminución menos pronunciada hasta el día decimoctavo (Fig. 3.6).

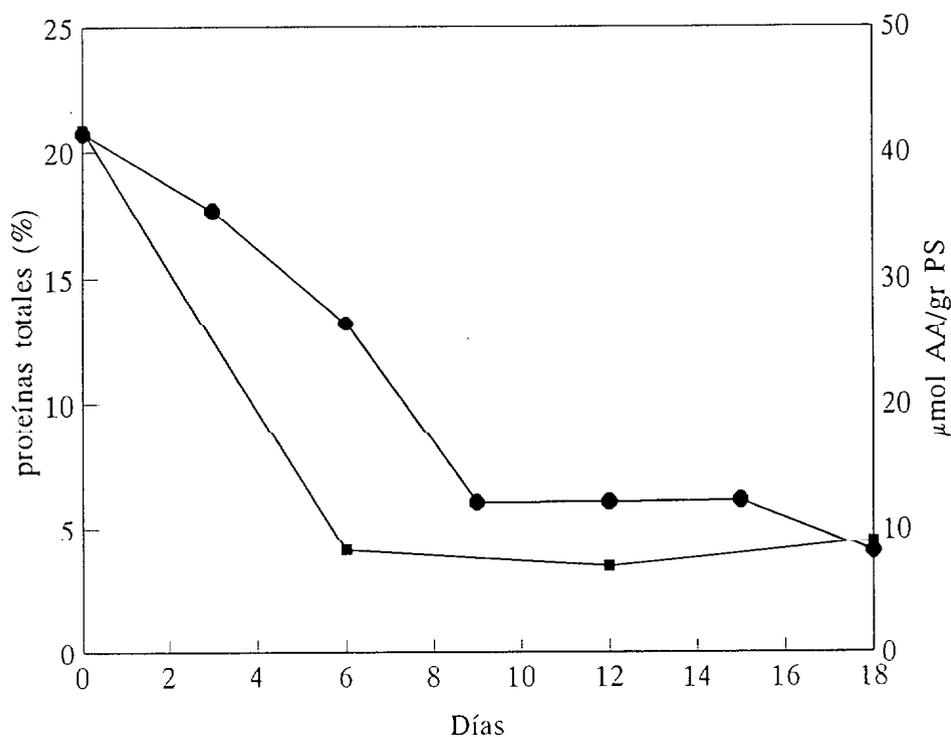


Figura 3.6 Evolución del perfil de aminoácidos libres (■) y proteína total (●) en *Ulva rigida* cultivada en agua de mar.

El análisis cuantitativo de aminoácidos libres se muestra en la Tabla 3.5. De acuerdo con estos datos, el ácido glutámico es el que se presenta en mayor concentración (> 20% del total) en cualquiera de las condiciones de disponibilidad de nitrógeno. En las condiciones iniciales del cultivo los aminoácidos mayoritarios son el ácido glutámico seguido por glutamina, asparagina, ácido aspártico y glicina-arginina, constituyendo un 83% del contenido total. Una vez que las algas son transferidas a condiciones limitantes de nitrógeno el perfil de aminoácidos mayoritarios cambia, sólo se mantiene el ácido aspártico seguido ahora por la serina. Ambos suponen más del 30% del total hasta el final del experimento. Los aminoácidos lisina, histidina se encontraron siempre en bajas concentraciones,

inferiores al 3%. Al final del experimento, se observó un ligero aumento de la concentración de prácticamente todos los aminoácidos, a excepción de la histidina que es el único que aumentaba a medida que la disponibilidad de nitrógeno se hacía menor.

Tabla 3.5 Análisis cuantitativo del contenido de aminoácidos libres en *Ulva rigida* en agua de mar.

AA μmol/gr. PS	Día 0	Día 6	Día 12	Día 18
Asp	2.88	0.58	0.46	0.63
Glu	15.61	2.42	1.13	1.86
Asn	4.60	0.15	0.11	0.17
Ser	1.40	1.07	0.90	1.57
His	-	0.09	0.18	0.21
Gln	9.05	0.30	0.15	0.42
Gly/Arg	2.61	0.39	0.27	0.56
Thr	0.68	0.28	0.22	0.33
Ala	1.79	0.66	0.52	0.80
Tyr	0.25	0.18	0.22	0.21
Trp/Mct	-	0.18	0.81	0.22
Val	0.66	0.46	0.64	0.58
Phe	0.72	0.36	0.13	0.43
Iso	0.33	0.26	0.54	0.36
Leu	1.18	0.66	0.37	0.49
Lys	-	0.16	0.19	0.13

A los seis días de cultivo, bajo limitación por nitrógeno, se observaron reducciones muy importantes de los contenidos iniciales de glutamina, ácido glutámico, asparagina y glicina-arginina. Los valores al sexto día fueron 30, 6, 30, y 7 veces menores que en las condiciones iniciales, respectivamente.

La relación Gln/Glu ha sido utilizada como indicador fisiológico de la relación C:N en algas. La evolución de la proporción Gln/Glu en *Ulva rigida* se presenta en la Figura 3.7. El valor de esta proporción se situó en 0.6 el primer día, lo que indica que la planta estaba limitada por la fuente de carbono. A partir del sexto día esta proporción tiene valores entorno a 0.1-0.2 lo que indica que la planta está limitada por la fuente de nitrógeno.

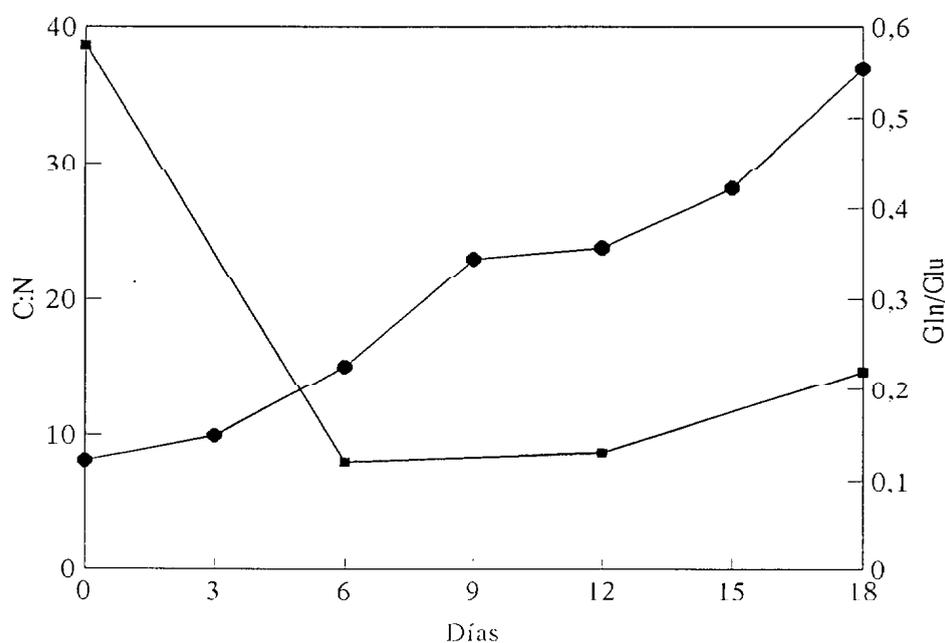


Fig. 3.7 Evolución de los proporción C:N (●) y GLN:GLU (■) en *Ulva rigida* cultivada en agua de mar

En la figura 3.7, además se incluye la representación de la evolución del proporción C:N en condiciones de limitación de nitrógeno. Como se puede observar los valores son bajos cuando el alga se cultivó con agua enriquecida y aumentó progresivamente hasta el día 18, cuando el valor se aproximó a 35 indicando una clara limitación por nitrógeno.

La composición en carbono en el tejido del alga osciló desde un 34.6 % hasta un 26.2 % en el último día. El contenido en nitrógeno varió desde un máximo de 4.14% al comenzar el estudio hasta un mínimo de 0.74% al finalizar el experimento. Se encontró una correlación positiva entre el contenido en nitrógeno en el alga y el contenido de aminoácidos libres ($r=0.85$, $p<0.001$)

El contenido en clorofila (a y b) presenta una disminución prácticamente lineal hasta el noveno día a partir del cual la reducción es menos pronunciada (Fig. 3.8). La concentración inicial de clorofilas fue 1.8 mg/gr. PS y decreció hasta alcanzar un valor de 0.14 mg/gr. PS al finalizar el experimento, lo que supone una reducción con respecto al contenido inicial de un 92%. La reducción más acusada se produce durante los primeros seis días de limitación por nitrógeno, donde se produce una disminución de un 70% con respecto a las condiciones iniciales del experimento. El contenido clorofílico del alga se correlacionó positivamente ($r=0.96$, $p<0.001$) con el contenido en nitrógeno algal. En la Figura 3.9 se muestran plantas de *Ulva rigida* limitada y no limitada por nitrógeno donde se aprecia claramente el efecto de la disponibilidad de este elemento en el contenido clorofílico.

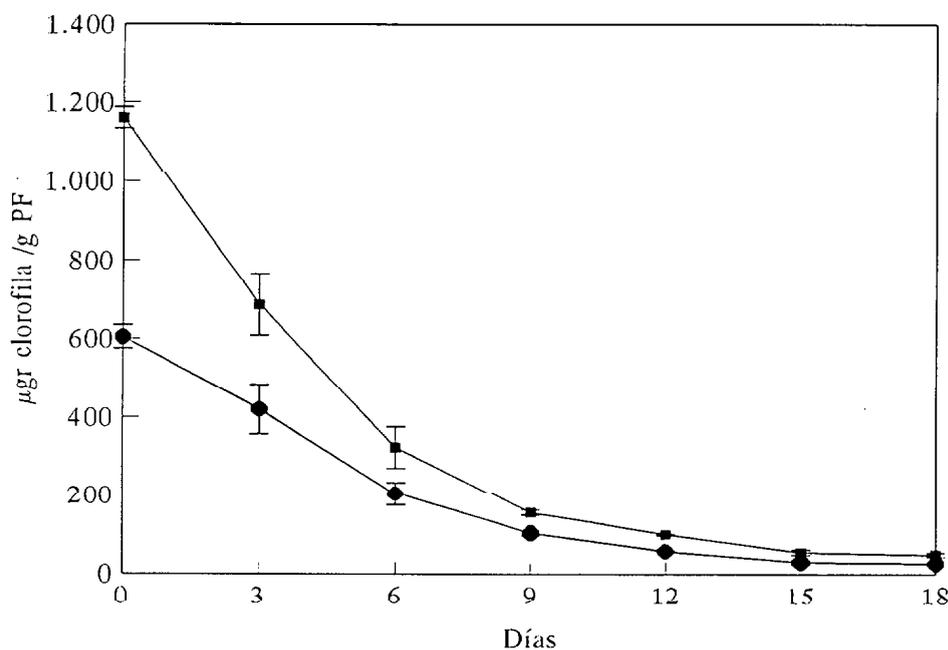


Fig. 3.8 Evolución del contenido en clorofilas a (■) y b (●) en *Ulva rigida*, bajo condiciones limitantes de nitrógeno.

La disponibilidad de nitrógeno ha sido identificado como un factor primario limitante en la producción de algas marinas (Jiménez del Río *et al.* 1996). Se ha demostrado que el enriquecimiento en nitrógeno provoca un incremento de la productividad en un gran número de especies algales creciendo en sistemas de cultivo con circulación continua de agua de mar (Topinka y Robbins, 1976; DeBoer *et al.*, 1978; LaPointe y Ryther 1979; Jiménez del Río *et al.* 1996). La capacidad para almacenar nitrógeno cuando éste no es un factor limitante puede variar dependiendo de la especie, así como de la forma química en que se encuentre el nitrógeno y del tipo de almacenamiento intracelular del mismo. *Ulva rigida* es un alga oportunista, capaz de captar, asimilar y almacenar grandes cantidades de nitrógeno cuando está presente en altas concentraciones en el medio, para utilizarlo posteriormente cuando las condiciones sean desfavorables. Los resultados de este trabajo demuestran que la limitación de nitrógeno en *Ulva rigida* provoca una disminución de la proporción C/N, y de las concentraciones de clorofilas, nitrógeno total y aminoácidos libres.

La composición cualitativa de aminoácidos libres intracelulares en *Ulva rigida* está caracterizada por bajas concentraciones de aminoácidos básicos y una general prevalencia de los aminoácidos ácido glutámico, alanina y serina. El alto contenido de estos compuestos ha sido justificado por su estrecha relación con el metabolismo de los ácidos tricarboxílicos y principalmente porque el ácido glutámico y la glutamina son los primeros aminoácidos en la ruta de incorporación de amonio a compuestos orgánicos. Resultados similares fueron obtenidos por Madgwick y Ralph (1972) en varias especies pertenecientes a diferentes Divisiones de algas marinas. En este estudio el ácido glutámico fue el aminoácido mayoritario en la mayoría de las especies y Divisiones. El contenido en glutamina, aunque importante, fue inferior al del ácido glutámico. La misma composición cualitativa de aminoácidos fue encontrado por De Napoli *et al.* (1984) en el algas pertenecientes al orden Siphonales en el Mar Mediterráneo y por Dave y Parekh (1994) en *Caulerpa scalpelliformis*.

Los aminoácidos especialmente la alanina y proteínas parecen formar el mayor contenido de almacenamiento de nitrógeno en *Gracilaria tikvahiae* (Bird *et al.* 1982) *Gracilaria folifera* (Rosenberg y Ramus 1982) y *Macrocystis pyrifera* (Wheeler y North, 1980). De acuerdo con Laycock y Craigie (1977), concentraciones altas de citrulina y el dipéptido citrulina-arginina pueden servir como compuestos de almacenamiento de nitrógeno en *Chondrus crispus*.



Fig. 3.9 Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre el contenido en clorofilas de *Ulva rigida*.

El aumento de la concentración aminoácidos libres, en diferentes especies de algas, cuando el nitrógeno en el medio no es limitante o incluso aumenta, ha sido descrito por Ji *et al.* (1981) en *Phorphyra yezoensis* y por Lignell y Pedersén (1987) en *Gracilaria secundata*. La rápida disminución de aminoácidos libres en *Ulva rigida* causada por la limitación por nitrógeno también ha sido observada por Bird *et al.* (1982) en *Gracilaria tikvahiae*. Esta rápida disminución sugiere que estos forman el pool inicial de N metabolizado, cuando la concentración de nitrógeno ambiental se reduce y por lo tanto juega un papel funcional importante como reserva nitrogenada (Bird *et al.*, 1982). De forma contraria, Fredriksen y Rueness (1989) no encontraron una correlación positiva entre el contenido de aminoácidos libres y nitrógeno algal en *Gelidium latifolium* creciendo bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Estos autores indican que son las ficobiliproteínas, en este caso, más que los aminoácidos las que son utilizadas como almacén de nitrógeno interno.

Se ha demostrado que la proporción C:N en macroalgas varía entre 5 y 40 (Niell 1976, Hanisak 1979) y se ha intentado relacionar el contenido en nitrógeno en algas usando este ratio (Niell 1976, DeBoer y Ryther 1977, Lapointe y Ryther 1979, Jackson 1977, Hanisak 1979, 1983). Los valores críticos de esta proporción oscilan entre 10 y 15, valores mayores indican que las plantas están creciendo bajo limitación por N. Valores más bajos de 10 indican almacenamiento de nitrógeno. En el presente experimento encontramos que *Ulva rigida* una vez transferida a condiciones de agua de mar, la limitación se hace cada vez más patente, lo que sugiere que en condiciones naturales la planta se encuentra limitada por la fuente de nitrógeno.

Los pigmentos o las proteínas asociados a ellos, pueden jugar un papel secundario en el almacenamiento de N (Perry *et al.* 1981; Smith *et al.* 1983), ya que no representan un alto porcentaje del nitrógeno total de la planta. En *Ulva rigida* no suponen más de un 0.2% del peso seco en condiciones no limitantes de nitrógeno.

Han sido varias las observaciones sobre la marcada disminución en el contenido de pigmentos bajo deficiencias en nitrógeno (DeBoer 1981). Los contenidos en clorofilas y ficoeritrinas en *Gracilaria foliifera*, *Agardhiella subulata* y *Ceramium rubrum*, están fuertemente influenciado por las concentraciones de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo según apuntan DeBoer y Ryther (1977).

3.3 Efecto de la fuente de Carbono sobre el perfil de aminoácidos libres en *Chlorella pyrenoidosa*.

La baja concentración de CO₂ en el medio es un factor medioambiental muy importante que limita la productividad fotosintética de las plantas acuáticas. En los sistemas de cultivo intensivos microalgas, cuyo objetivo es alcanzar la máxima producción, es necesario añadir a los cultivos un fuente de carbono tanto orgánica como inorgánica.

Las células de *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas en condiciones de alto CO₂ (5% CO₂ en aire v/v) fueron transferidas a condiciones de bajo CO₂ (0.03% CO₂ en aire v/v) una vez alcanzada la fase exponencial de cultivo y mantenidas en estas condiciones por un periodo de cuatro horas. Para ambas condiciones de cultivo se tomaron muestras para su análisis de aminoácidos libres intracelulares. Paralelamente se realizaron cultivos de la misma especie con acetato y glucosa, como fuente de carbono, en concentración 10 mM de carbono.

Para determinar la fase de crecimiento exponencial del alga se realizaron las curvas de crecimiento para cada una de las condiciones de cultivo ensayadas (Fig.3.10). A partir de los valores de las curvas de crecimiento se calcularon las tasas de crecimiento y los tiempos de doblaje, cuyos valores se recogen en la Tabla 3.6

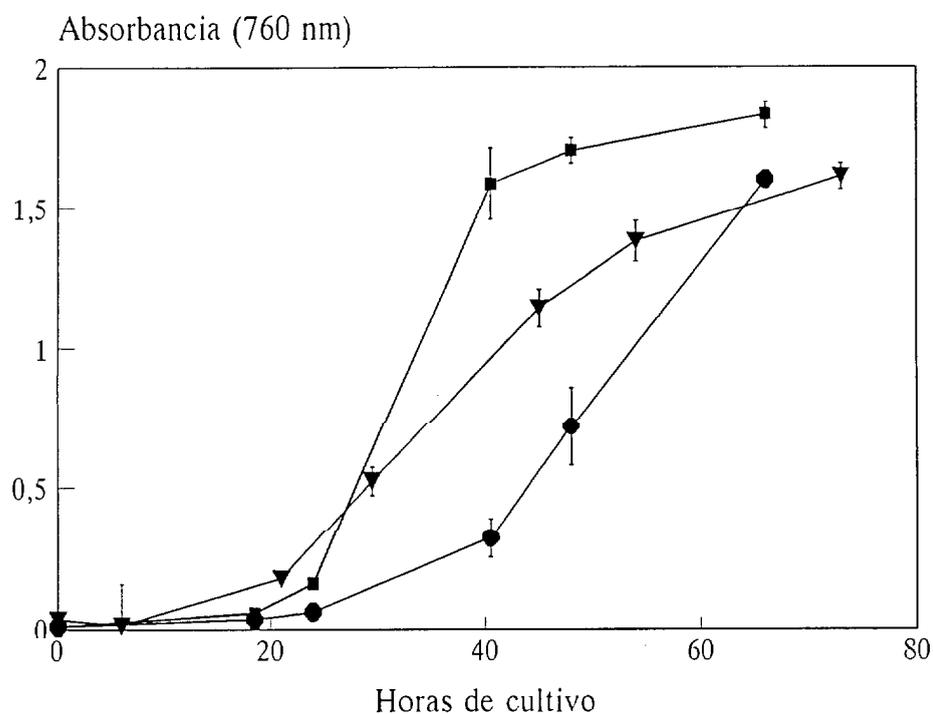


Fig. 3.10 Curvas de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada con diferentes fuentes de carbono: acetato (■) y glucosa (●) y 5% CO₂ (▼)

Tabla 3.6 Tasas de crecimiento y tiempos de doblaje de *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas en diferentes fuentes de carbono.

Medio	Tasa de crecimiento	T. doblaje (h)
aire + 5% CO ₂	0.051 ± 0.002	13.692 ± 0.636
Acetato	0.142 ± 0.005	4.873 ± 0.178
Glucosa	0.103 ± 0.003	6.750 ± 0.233

Como se puede observar, los resultados indican la fuerte influencia de la naturaleza de la fuente de carbono sobre la velocidad de crecimiento de las células de *Chlorella pyrenoidosa*. La tasa de crecimiento es considerablemente mayor, el doble o superior, cuando se utiliza una fuente orgánica de carbono, que cuando se utiliza la inorgánica. Dentro de las fuentes orgánicas de carbono, el acetato se presenta como mejor fuente para el crecimiento celular de esta especie. A los valores de las tasa de crecimiento de los cultivos en acetato y glucosa se les aplicó un test estadístico (T-test) para determinar si las diferencias existentes eran significativas. Los datos obtenidos mostraron que efectivamente lo eran ($p < 0.001$).

De forma paralela, al crecimiento celular, se estudió la variación de la concentración de clorofila (a+b), con el tiempo en los tres cultivos. Las curvas respectivas se muestran en la Figura 3.11.

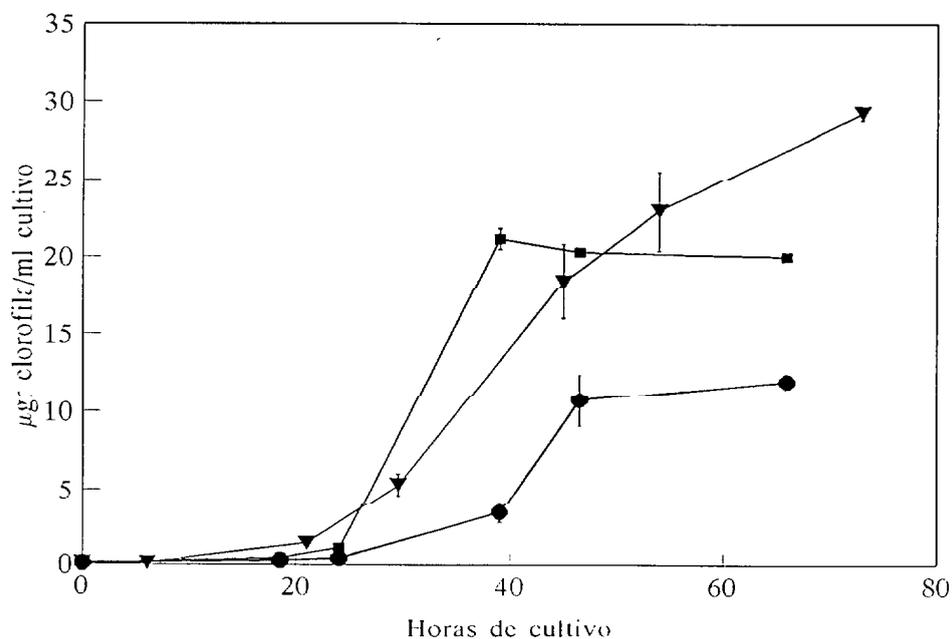


Fig. 3.11 Evolución del contenido de clorofilas en *Chlorella pyrenoidosa* cultivada con diferentes fuentes de carbono: acetato (■) y glucosa (●) y 5% CO₂ (▼)

El contenido en clorofilas, determinado en fase exponencial, en células creciendo con acetato ($21.13 \pm 0.68 \mu\text{gr. chl /ml}$) es mayor que en CO_2 ($18.40 \pm 2.41 \mu\text{gr. chl /ml}$), y supone aproximadamente siete veces el contenido en clorofilas encontrado en células cultivadas con glucosa ($3.50 \pm 0.68 \mu\text{gr. chl /ml}$). A su vez, la concentración de clorofilas en células creciendo con anhídrido carbónico es prácticamente seis veces mayor que en los cultivos con glucosa.

Los perfiles de elución de los extractos para esta especie, en condiciones de bajo y alto CO_2 y en presencia de acetato y glucosa se representan en las Figuras 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 respectivamente. Los resultados de los análisis de aminoácidos libres en *Chlorella pyrenoidosa* en las diferentes condiciones ensayadas se resumen en la Tabla 3.7.

Como se puede observar los contenidos totales de aminoácidos varía de forma significativa en función de la fuente de carbono que utilicemos para hacer crecer las algas. De forma general, se observa que los niveles de aminoácidos intracelulares en condiciones de bajo CO_2 son del mismo orden de magnitud que en condiciones de alto CO_2 . El valor del pool total de aminoácidos libres para *Chlorella* en condiciones de alto CO_2 es de $83.77 \text{ nmoles/mg PS}$, y en condiciones de bajo CO_2 es de $98.66 \text{ nmoles/mg PS}$. Donde se apreciaron mayores diferencias fueron en los contenidos totales de los cultivos mixotróficos. El contenido en aminoácidos libres alcanza su valor máximo ($423.92 \text{ nmoles aa/mg. PS}$) en las células de *Chlorella* creciendo con acetato, cinco veces superior al valor en condiciones de alto CO_2 , y casi nueve veces superior al valor que presentan las células creciendo con glucosa ($48.08 \text{ nmoles aa/mg. PS}$)

Tanto en condiciones de alto como de bajo CO₂ se encontraron los mismos aminoácidos mayoritarios en los extractos acuosos de *Chlorella*, éstos fueron: alanina, lisina, treonina, glicina, y ácido glutámico, los cuales constituyen un 75% y un 62% del contenido total de aminoácidos en condiciones de alto y bajo CO₂ respectivamente. Los aminoácidos minoritarios comunes a ambas condiciones son el ácido aspártico y glutamina.

En las células cultivadas con acetato como fuente de carbono, los aminoácidos libres más importantes fueron la alanina, treonina, leucina y lisina. Los dos primeros, por sí solos, constituyen un 44% del contenido total y los cuatro un 65%. El perfil de aminoácidos se caracteriza además por serina, valina y arginina, representando conjuntamente un 17% del pool total. El ácido aspártico, glutamina, asparagina e histidina son los que se presentan en concentraciones más bajas.

En los extractos celulares de las células cultivadas con glucosa se encontraron como aminoácidos libres mayoritarios la alanina y lisina. Es muy importante la concentración de alanina ya que supone un 41% del contenido total y junto con la lisina representa casi el 70% del contenido en aminoácidos libres. Los contenidos de estos aminoácidos duplica la concentración encontrada para los mismos en los extractos de *Chlorella* creciendo con acetato o dióxido de carbono. La treonina, glicina, isoleucina, serina, arginina y valina conforman en menor medida (23% del total) el perfil de aminoácidos de las células de *Chlorella* creciendo en glucosa. El ácido aspártico, asparagina, y glutamina se encontraron como aminoácidos minoritarios.

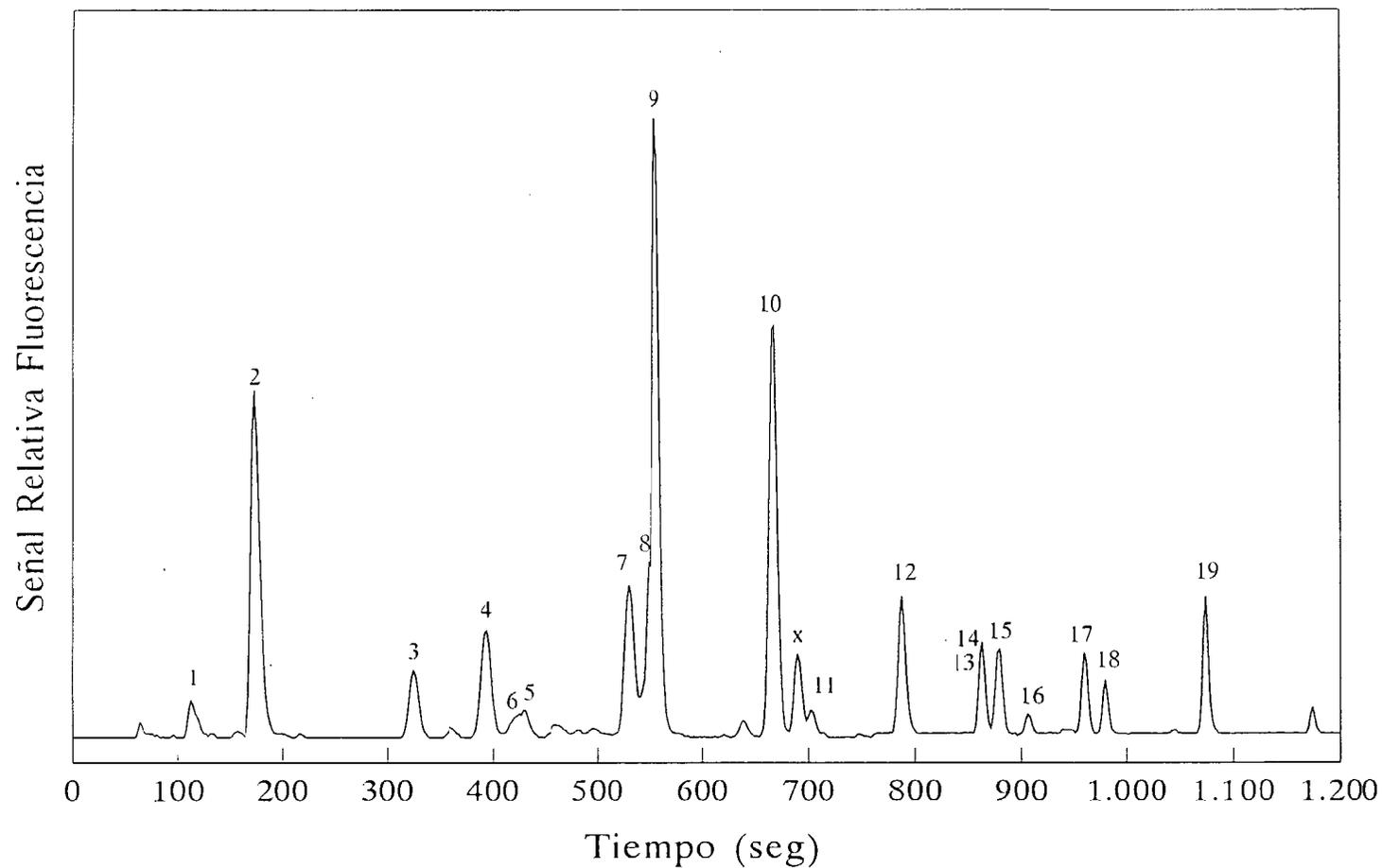


Figura 3.12 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* adaptada a bajas concentraciones de dióxido de carbono en el medio de cultivo. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

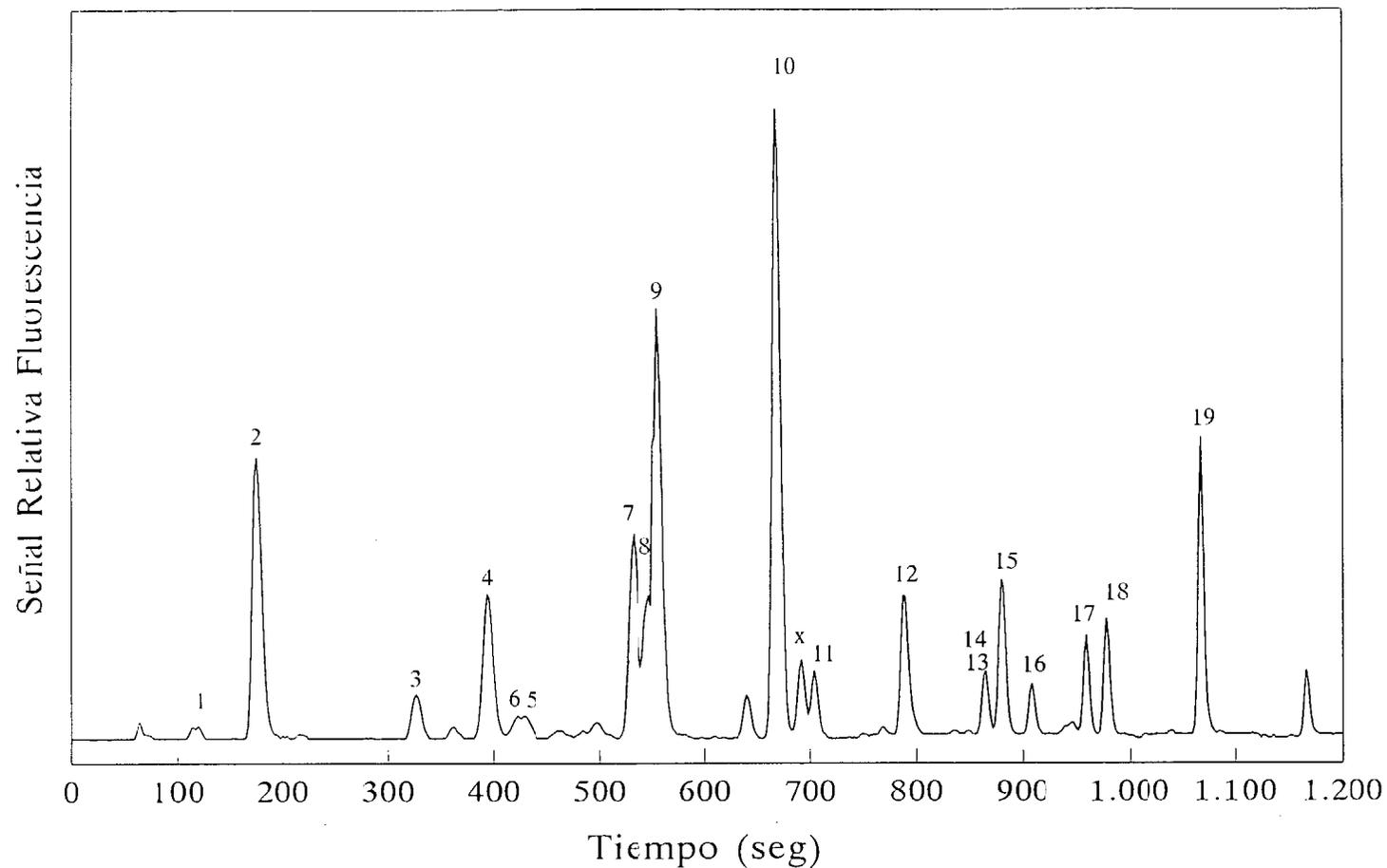


Figura 313 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con un 5% de dióxido de carbono en el medio de cultivo como fuente de carbono. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

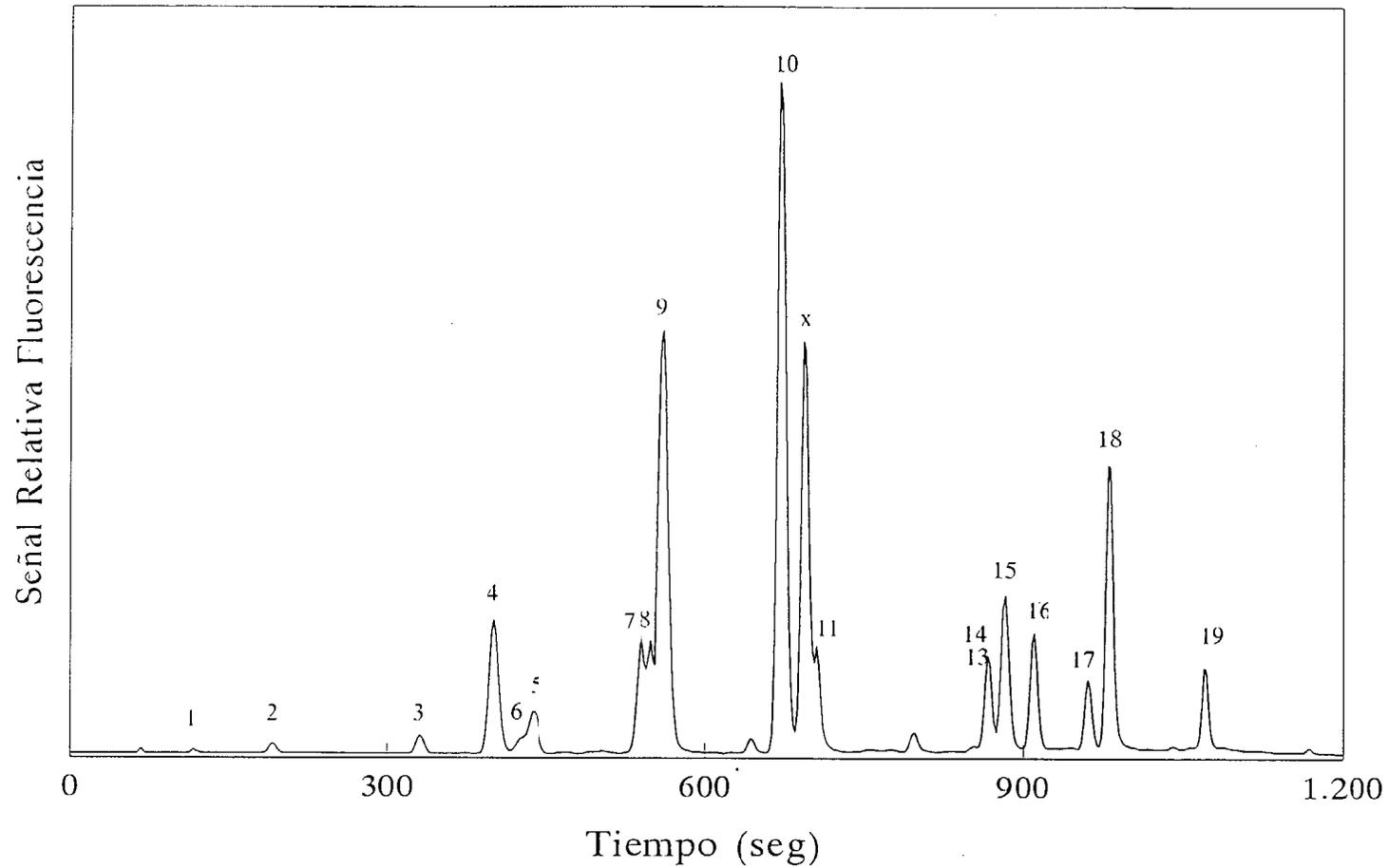


Figura 3.14 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con acetato en el medio de cultivo como fuente de carbono. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

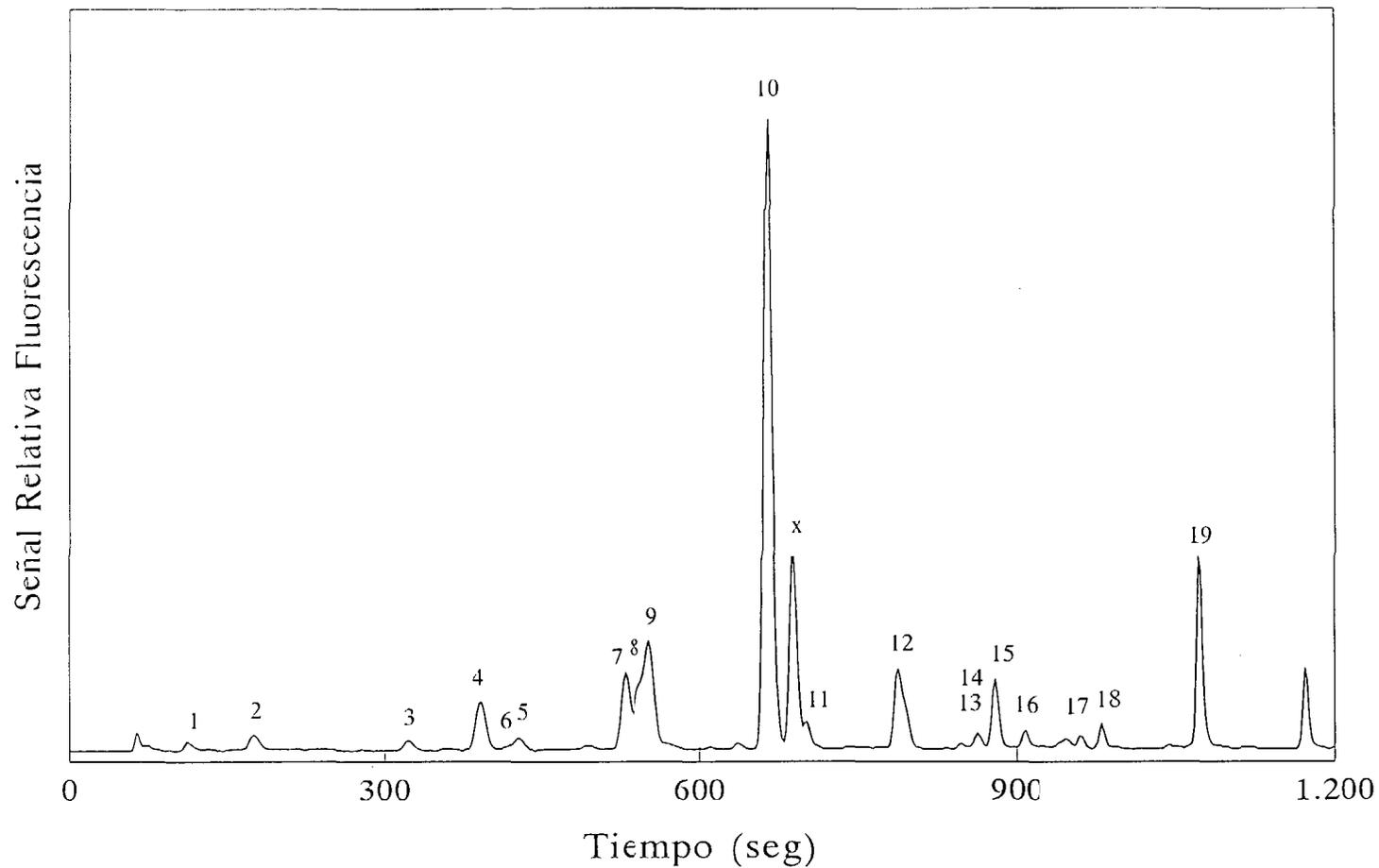


Figura 3.15 Cromatograma correspondiente a perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con glucosa en el medio de cultivo como fuente de carbono. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

Tabla 3.7 Contenido de aminoácidos libres en *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con diferentes fuentes de carbono

AA nmol/mg. PS*	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			
	↑CO ₂	↓CO ₂	Glucosa	Acetato
Asp	0.85	0.04	0.08	0.12
Glu	16.15	7.94	0.26	1.31
Asn	2.43	0.92	0.12	1.99
Ser	5.45	4.28	1.49	25.87
His	1.28	0.98	0.36	3.62
Gln	0.69	0.41	0.22	9.33
Gly	8.44	8.37	2.91	12.76
Arg	2.33	2.32	1.31	22.88
Thr	13.27	11.95	4.41	85.95
Ala	18.04	15.68	20.40	99.69
Tyr	0.57	1.60	0.52	13.52
Trp/Met	1.34	1.26	0.24	7.92
Val	1.38	3.57	1.40	22.13
Phe	1.20	1.27	0.15	18.31
Iso	1.27	2.32	1.85	9.04
Leu	1.28	3.01	0.30	46.43
Lys	6.84	16.80	13.96	42.73
Total	82.81	82.74	50.02	423.92

* media de tres determinaciones independientes

La utilización de estas dos condiciones de concentración de CO₂ en el medio de cultivo, dio lugar a diferencias apreciables en el contenido de ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico y glutamina que como se ha mencionado anteriormente, son los primeros aminoácidos en la incorporación de amonio a la célula. Todos ellos presentan valores más altos, casi el doble, en presencia de dióxido de carbono.

Tanto en las células cultivadas en condiciones de alta concentración de CO₂ como aquellas adaptadas a bajo CO₂, los niveles de ácido glutámico fueron elevados, mientras que los de glutamina se mantuvieron bajos si los comparamos con los respectivos en células creciendo con acetato. La concentración de glutamina en las células cultivadas con acetato fue más de diez veces superior al de células cultivadas con glucosa y más de 4 veces superior a las de alto CO₂. La proporción Gln/Glu presenta valores mayores a la unidad para los cultivos de *Chlorella* con acetato, aproximadamente uno (0.8) para las células creciendo con glucosa y menores a uno para los cultivos en alto y bajo CO₂.

En diferentes trabajos se ha demostrado que ciertas especies de microalgas, como *Chlorella* pueden crecer en condiciones mixotróficas usando la energía de la luz y azúcares conjuntamente (Lalucat *et al.*, 1984; Martínez y Orus, 1991; Ogawa y Aiba, 1981) y existe la posibilidad que el alga sea capaz de refijar el dióxido de carbono liberado en la respiración vía mecanismos fotosintéticos.

El crecimiento con glucosa como fuente de carbono, es llevado a cabo por un sistema de transporte constitutivo o inducible de hexosas (Hass y Tanner, 1974; Heath 1979) y en algunas especies de *Chlorella* este transporte está regulado por la luz (Hass y Tanner, 1974; Kamiya y Kowallik, 1987). Una vez que la glucosa ha sido asimilada, por medio de la glucólisis o por la vía reductora de las pentosas fosfatos es reducida a piruvato para alimentar al ciclo de Krebs. Cuando se usa acetato, como fuente de carbono, el ciclo de Krebs se alimenta del succinato que se origina a partir de la actividad de la enzima isocitrato liasa en el ciclo del glioxilato.

Como se ha demostrado, las células de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo en condiciones mixotróficas con acetato no sólo tenían una mayor tasa de crecimiento sino también un mayor contenido en clorofilas que las células creciendo autotróficamente. Este realzamiento de la producción de clorofilas en la luz en presencia de acetato también ha sido estudiado en *Chlamydomonas humicola* (Laliberté y de la Noüe, 1993), *Goetkinia* sp. (Ellis *et al.*, 1975) y *Chlamydomonas stellata* (Wiessner y French, 1970). Este tipo de cultivo ha sido propuesto por Lee *et al.* (1996), para *Chlorella sorokiniana* como el mejor modo de crecimiento para la producción de biomasa algal en sistemas de cultivo abiertos, por supuesto si se pudiesen mantener cultivos axénicos. Además ha sido demostrada la mayor productividad, comparada con otros procesos, de los cultivos mixotróficos con especies de agua salada (*Tetraselmis succica*) por Cid *et al.* 1992.

El efecto negativo que ejerce la glucosa sobre el contenido de clorofila en varias especies de *Chlorella* ha sido demostrado por varios autores (Beale y Appleman, 1971; Ogawa y Aiba, 1981; Roth y Burger, 1987) y concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo.

En varios trabajos se ha demostrado que en ciertas algas como *Cyadinium caldarium*, *Chlorella* y otras, (Thacker y Syrett 1972, Di Martino Rigano *et al.* 1990) creciendo con suficiente nitrógeno, asimilan amonio sólo en presencia de luz y con suficiente dióxido de carbono en el medio, lo que mantiene la hipótesis de que en este tipo de células la asimilación de amonio requiere una fotosíntesis activa. Esta estricta dependencia de la fotosíntesis soporta la idea que las células sin limitación por nitrógeno obtienen todos los esqueletos carbonados necesarios para la asimilación de nitrógeno. La asimilación de amonio en células con suficiente nitrógeno en luz fue inmediatamente cortada por la ausencia de CO₂. Esto puede ser fácilmente explicable por el hecho de que ni el Ciclo de Calvin y ni la fijación anaplerótica de CO₂ en oscuridad puede operar.

En el experimento desarrollado las células de *Chlorella pyrenoidosa* fueron cosechadas en la fase exponencial del cultivo, por lo que no existía limitación por nitrógeno. El hecho de transferir los cultivos a un medio pobre en carbono, hace que las células estén estresadas por este nutriente lo que inhibe la fijación fotosintética del carbono, consecuentemente se limita la provisión de estructuras carbonadas para la síntesis de aminoácidos (Thacker y Syrret 1972, Romero *et al.* 1985, Lara y Romero 1986), lo que explica claramente el hecho de los niveles de ácido glutámico, ácido aspártico y sus amidas correspondientes, de este experimento presenten valores menores en condiciones de bajo CO₂ que en alto. El aumento de concentración de lisina entre otros aminoácidos hace que el contenido total, en condiciones de alto y bajo CO₂ sea prácticamente el mismo. Este aumento de concentración de ciertos aminoácidos puede deberse al mantenimiento de las rutas metabólicas de sus síntesis.

Como se mencionó en el apartado 1.5 de este trabajo, la composición del perfil de aminoácidos libres en algas está relacionado con el patrón de fijación del carbono. Según Martín-Jézequel *et al.* (1988) la incorporación del carbono en el ciclo de Calvin, para especies de algas verdes, se refleja por la acumulación de serina, alanina y glicina. Sus resultados coinciden parcialmente con los encontrados en *Chlorella pyrenoidosa* en el presente trabajo. Los contenidos en glicina y serina respecto del total en células fijando carbono fotosintéticamente (alto o bajo CO₂) son mayores que en las células cultivadas con acetato o glucosa. Pero los de alanina son prácticamente iguales para las células cultivadas con CO₂ y acetato y suponen casi el doble para las células creciendo en presencia de glucosa.

La fijación del carbono en ciclo de Krebs, da lugar a un comportamiento diferente en las células de *Chlorella pyrenoidosa* dependiendo de la fuente de carbono. Si la fuente carbonada es glucosa el perfil de aminoácidos se reduce a alanina y glicina; los demás aminoácidos presentan valores muy bajos respecto de estos. Si las células crecen con acetato, se diversifica el perfil de aminoácidos, respecto al de las células creciendo con glucosa y respecto a las que fijan el CO₂. Los contenidos en leucina, fenilalanina, valina, tirosina, arginina y glutamina aumentan con respecto a las otras dos fuentes carbonadas. Esta diversidad en aminoácidos incorporando el carbono en el ciclo de Krebs fue demostrado por Beardall et al. (1976) y por Mortrain-Bertrnad et al. (1987).

3.4 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el perfil de aminoácidos en *Chlorella pyrenoidosa*.

Además del nitrato y del amonio que son fuentes preferenciales de nitrógeno inorgánico tanto para microalgas como para macroalgas en condiciones naturales, muchas microalgas crecen con urea como única fuente de nitrógeno, así como con diferentes aminoácidos y purinas. El marcado efecto de estas fuentes de nitrógeno en la fisiología y bioquímica de las algas puede ser muy útil como indicador permitiendo la determinación del tipo de nutrición de la propia alga así como de su valor nutricional para consumo humano o para acuicultura.

Las células de *Chlorella pyrenoidosa* estuvieron creciendo, como se ha mencionado previamente en las condiciones de cultivo, con nitrato de sodio (NaNO_3), cloruro de amonio (NH_4Cl) y urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) en concentraciones 8 mM de nitrógeno. Al igual que se realizó en el apartado anterior, se determinaron las curvas de crecimiento (Figura 3.16) para determinar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de los medios empleados. En la Tabla 3.8 se muestran las tasas de crecimiento y los tiempos de doblaje de *Chlorella*, calculadas a partir de sus respectivas curvas.

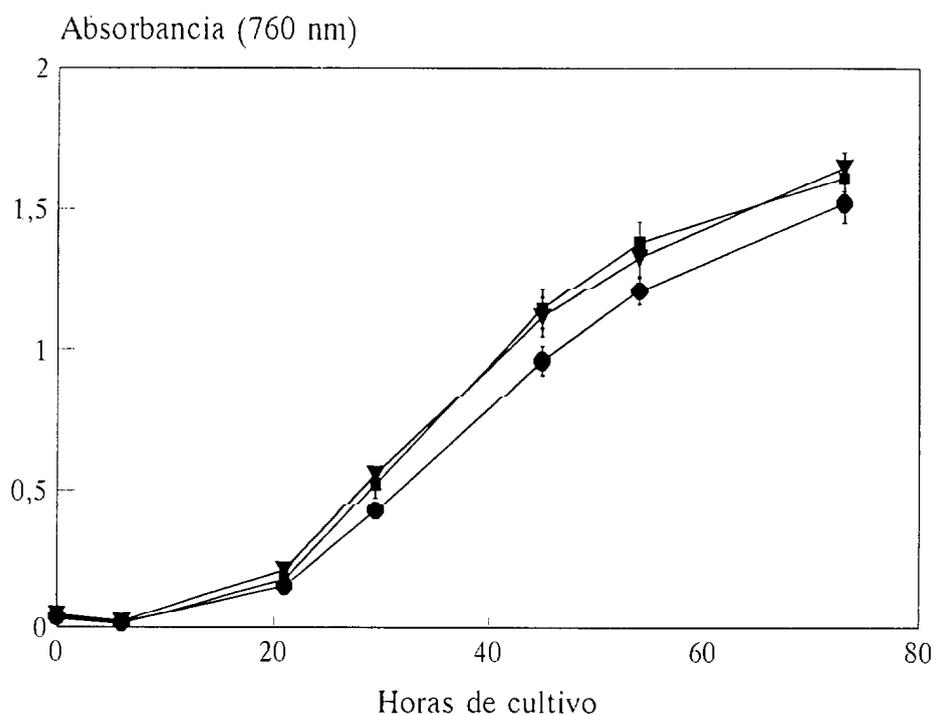


Fig. 3.16 Curvas de crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada con diferentes fuentes de nitrógeno: amonio (■), nitrato (●) y urea (▼).

Tabla 3.8 Tasas de crecimiento y tiempos de doblaje de *C. pyrenoidosa* creciendo en diferentes fuentes de nitrógeno.

Medio	Tasa de crecimiento	Tiempo doblaje
Amonio	0.051 ± 0.002	13.692 ± 0.636
Nitrato	0.053 ± 0.001	13.066 ± 0.285
Urea	0.044 ± 0.003	15.609 ± 1.018

Los datos indican que las células de *Chlorella* presentan diferentes tasas de crecimiento dependiendo de la fuente de nitrógeno que se utilice para cultivarlas. Como se puede observar, el valor máximo se obtuvo para las células creciendo en presencia de urea seguido de amonio y nitrato. Para determinar si estas diferencias existentes eran significativas se les aplicó un análisis estadístico, a los valores de las tasas de crecimiento. Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias significativas entre los cultivos de amonio y nitrato y sí eran significativas entre los cultivos de amonio y urea y entre los de nitrato y urea.

La evolución de la concentración de clorofila (a+b) frente al tiempo de cultivo se presenta en la Figura 3.17. La mayor concentración de clorofilas se obtuvo en los cultivos con urea seguida del amonio y el nitrato. En fase exponencial de crecimiento celular se obtuvieron 40 $\mu\text{gr.}$ de clorofila por ml de cultivo, con urea, 29 $\mu\text{gr./ml}$ con amonio y 25 $\mu\text{gr./ml}$ con nitrato.

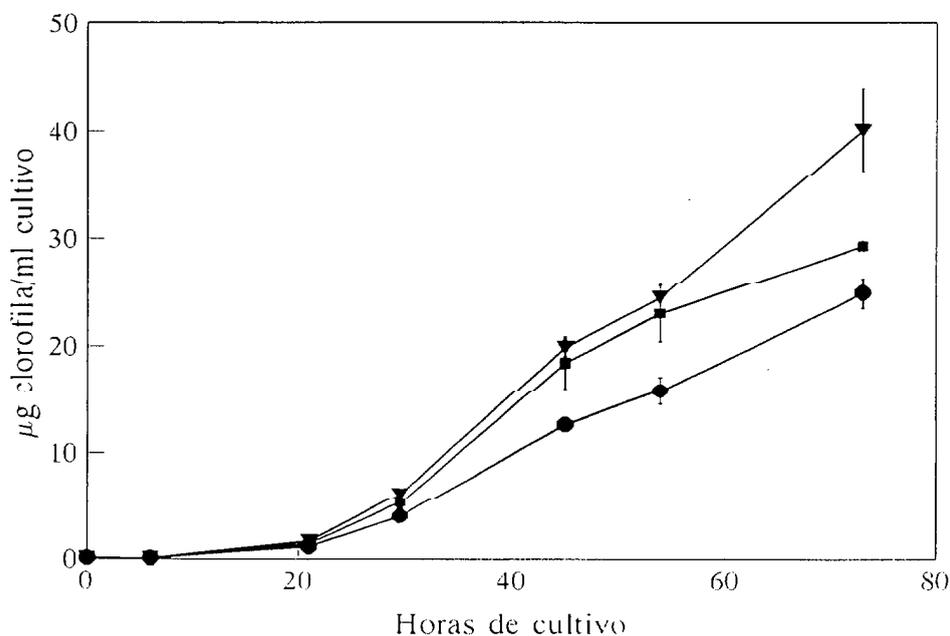


Fig. 3.17 Evolución del contenido en clorofilas de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada con diferentes fuentes de nitrógeno: amonio (■), nitrato (●) y urea (▼).

Los perfiles de elución de los extractos para esta especie cultivada en los tres medios de cultivos ensayados se representan en las Figuras 3.18, 3.19 y 3.20. Los datos cuantitativos del estudio del efecto de la fuente de nitrógeno sobre el perfil de aminoácidos libres en *Chlorella pyrenoidosa* se presentan en la Tabla 3.7. Estos resultados indican que el contenido total en aminoácidos intracelulares se ve afectado ligeramente por la fuente de nitrógeno que se utilice para cultivar el alga.

De la misma forma, la fuente de nitrógeno no afecta al perfil de aminoácidos libres. Cuatro aminoácidos son los responsables de más del 50% del contenido total en *Chlorella pyrenoidosa*, estos son: alanina, treonina, lisina y glicina.

Seguido de este grupo mayoritario, se encontró un segundo grupo de cinco aminoácidos, importantes por su concentración, comunes a las tres fuentes de nitrógeno, éstos fueron leucina, arginina, serina, ácido glutámico y valina. Estos cinco aminoácidos supusieron más del 20% del total para cada una de las condiciones ensayadas.

Los aminoácidos minoritarios encontrados, comunes a los tres cultivos fueron el ácido aspártico, glutamina, asparagina e histidina.

Se encontraron diferencias apreciables en el contenido de ácido aspártico en las células creciendo con amonio (0.008% del total), prácticamente cien veces menor al contenido de las células creciendo con las otras dos fuentes nitrogenadas (0.16%). La concentración de asparagina y glutamina en células cultivadas con urea (1% del total) fue un orden de magnitud superior a la hallada en las células creciendo con nitrato (0.03%) o amonio (0.02%).

La mayor concentración de glutamina en células creciendo con urea conlleva, que la proporción molar de Gln/Glu sea mayor (0.3) en estas células que las que crecieron con nitrato (0.01) o amonio (0.005).

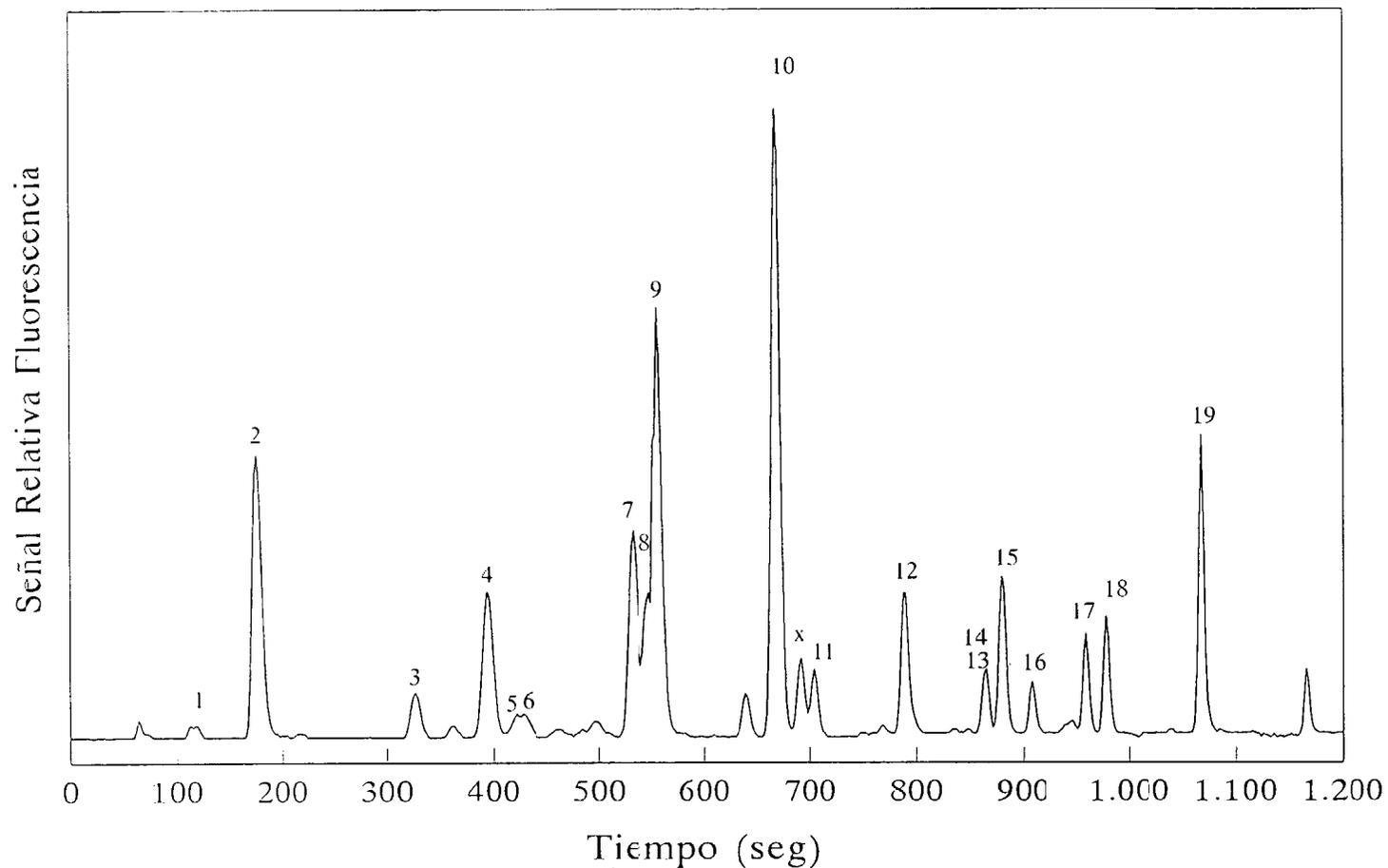


Figura 3.18 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con cloruro de amonio, como fuente de nitrógeno. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

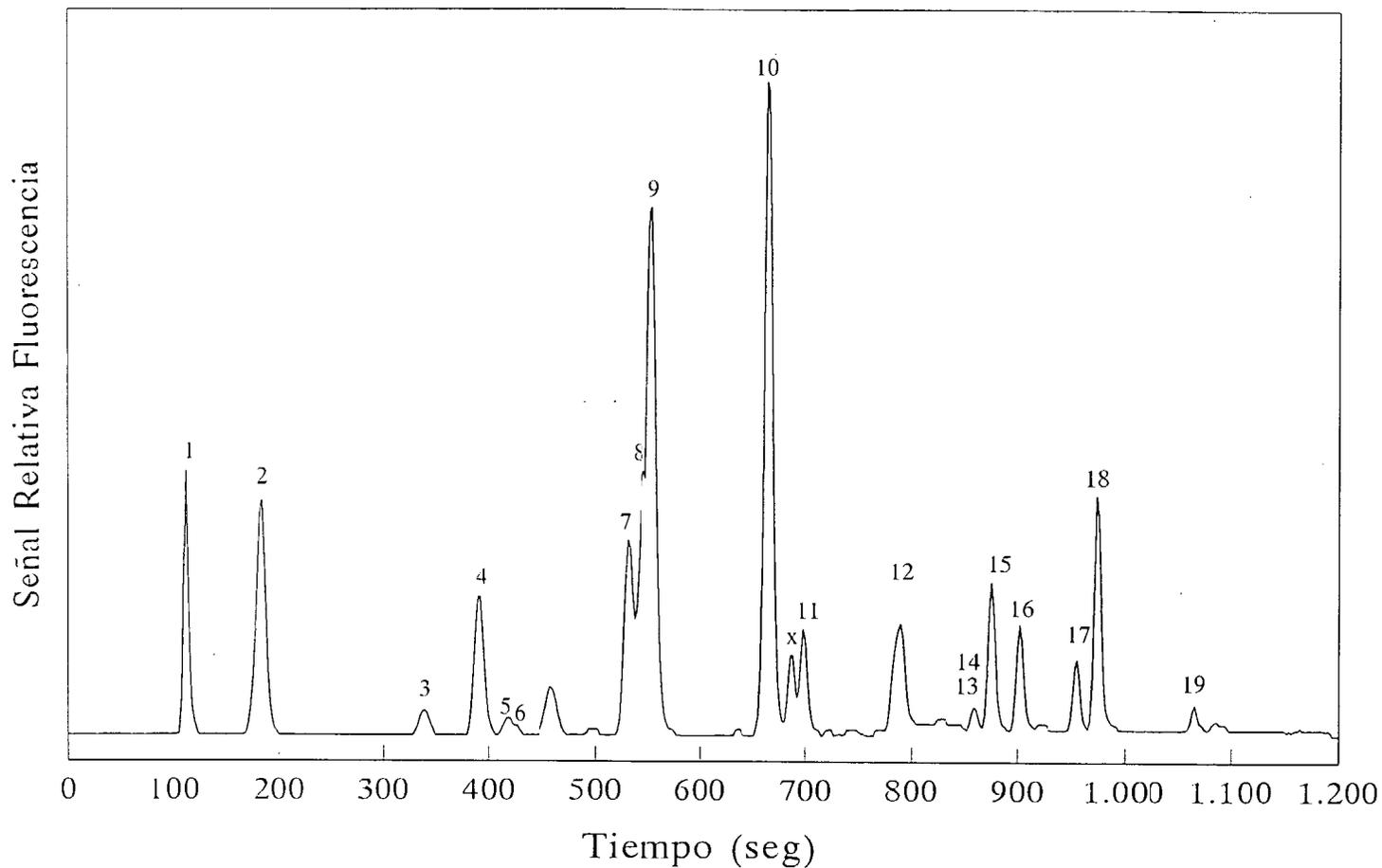


Figura 3.19 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con nitrato potásico, como fuente de nitrógeno. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Pher, 17) Iso, 18) Leu, 19) Lys.

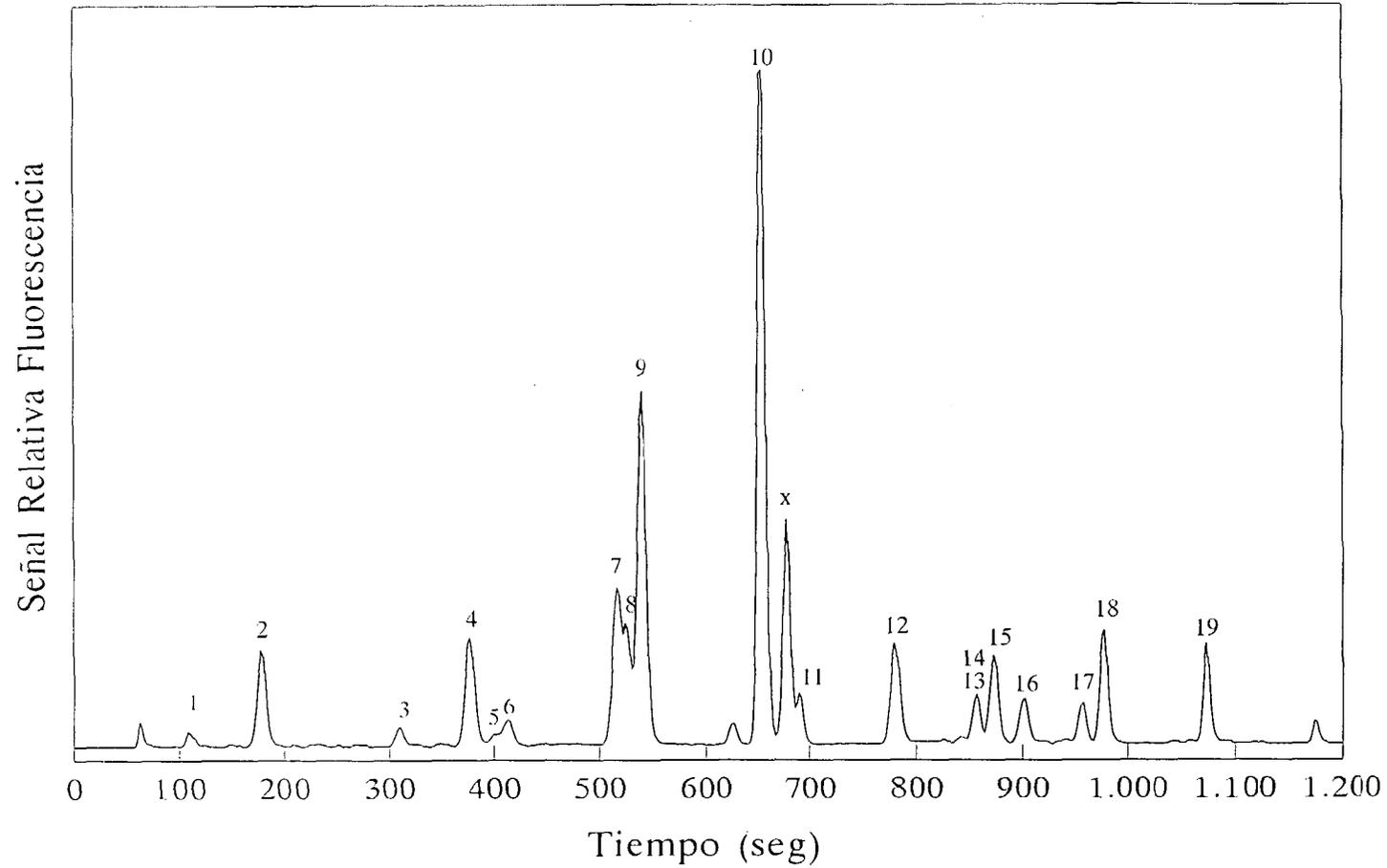


Figura 3.20 Cromatograma correspondiente al perfil de elución de aminoácidos de un extracto acuoso de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo con urea, como fuente de nitrógeno. Identificación de picos: 1) Asp, 2) Glu, 3) Asn, 4) Ser, 5) His, 6) Gln, 7) Gly, 8) Arg, 9) Thr, 10) Ala, 11) Tir, 12) ABA, 13) Tryp, 14) Met, 15) Val, 16) Phen 17) Iso, 18) Leu , 19) Lys.

Tabla 3.7 Contenido en aminoácidos libres de *Chlorella pyrenoidosa* en presencia de tres fuentes de nitrógeno.

AA	Chlorella pyrenoidosa			
	nmol/mg. PS	Amonio	Nitrato	Urea
Asp	0.009	0.16	0.11	
Glu	4.38	3.65	2.65	
Asn	0.15	0.05	0.32	
Ser	4.70	4.84	3.55	
His	0.88	0.86	0.73	
Gln	0.02	0.03	0.71	
Gly	8.24	10.15	6.88	
Arg	5.063	3.63	2.87	
Thr	11.47	13.51	10.18	
Ala	23.71	32.79	20.94	
Tyr	2.06	1.71	1.32	
Trp/Met	1.25	1.07	0.92	
Val	3.94	3.93	2.54	
Phe	2.05	1.62	1.45	
Iso	1.99	1.21	1.04	
Leu	6.36	4.45	3.97	
Lys	9.92	5.62	7.46	
Total	104.73	89.29	67.67	

Los resultados sobre velocidades de crecimiento y contenido en clorofilas indican claramente que *Chlorella pyrenoidosa* no presenta preferencia por el amonio o el nitrato para su crecimiento. Las tres fuentes de nitrógeno que se han empleado en el experimento, son las formas más importantes disponibles para las comunidades naturales fitoplanctónicas (Syrett, 1981). Se ha demostrado que en muchas de estas especies, en presencia de estas tres fuentes, asimilan amonio preferentemente antes que el nitrato o urea (Dugdale y Goering, 1967; Harrison *et al.*, 1985; Levasseur *et al.*, 1990). Esta preferencia del amonio sobre el nitrato se atribuye al estado más reducido del amonio (Dorch, 1990)

Por el contrario en muchas especies, al igual que en nuestros experimentos con las células de *Chlorella pyrenoidosa*, las tasa de crecimiento de las células cultivadas en nitrato no son significativamente diferentes de las tasas de las células creciendo con amonio (Conover, 1975; Syrett, 1981; Thompson *et al.* 1989; Levasseur *et al.*, 1993). Estos autores sugieren que al no existir diferencias en las tasas de crecimiento, las especies fitoplanctónicas creciendo con nitrato deben compensar por otras vías como ajustes en la composición bioquímica, la fuerte demanda de poder reductor que conlleva la asimilación de nitrato (Thompson *et al.* 1989).

Las células de *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas con urea no sólo presentaban mayores tasas de crecimiento sino además mayor concentración en pigmentos que las células creciendo con amonio o nitrato. Aunque poco se conoce sobre el estado fisiológico y bioquímico de las microalgas creciendo con urea, dentro de las formas orgánicas de nitrógeno, ha ganado importancia sobre todo en el cultivo de algas a gran escala. Puede utilizarse como única fuente de nitrógeno en varios miembros de algas unicelulares pertenecientes a *Chlorophyta* y *Xanthophyta* y cianobacterias, y ha sido utilizada como la mejor fuente nitrogenada para el cultivo en masa de *Chlorella* y *Scenedesmus*. (Becker, 1994).

Carpenter *et al.* (1972 y Conover (1975) han demostrado que existen especies fitoplanctónicas que no crecen con urea, mientras que ciertas especies de

dinoflagelados presentan las mismas velocidades de crecimiento creciendo con amonio, nitrato o urea. En dos trabajos de revisión (Syrret, 1981; Antia, 1991) se demuestra que las células de especies fitoplanctónicas creciendo con urea pueden tener tasas de crecimiento similares, inferiores o superiores a las que presentan las mismas creciendo con amonio. Debido a que las células que crecen con urea o amonio presentan el mismo costo energético, las variaciones en crecimiento y otros parámetros fisiológicos y bioquímicos entre las células se deben a pasos previos a la asimilación de amonio, como por ejemplo la toma de urea o la ruptura enzimática (Levasseur *et al.*, 1993)

Los resultados de los análisis de aminoácidos libres en las células de *Chlorella pyrenoidosa* demuestra que la fuente de nitrógeno afecta de forma ligera al contenido total en aminoácidos libres. El contenido en aminoácidos en las células creciendo con nitrato suponen un y ligeramente inferior en células cultivadas con urea.

La fuente de nitrógeno tampoco afecta de forma apreciable el perfil de aminoácidos libres intracelulares de *Chlorella pyrenoidosa*. Independientemente de la fuente nitrogenada empleada para el cultivo de esta especie el perfil se caracteriza por cuatro aminoácidos, alanina, treonina, lisina y glicina. Las diferencias existentes se dan a nivel cuantitativo, pero no a nivel cualitativo.

Los resultados encontrados en *Chlorella* difieren de los encontrados en especies fitoplanctónicas. Los resultados de Wood y Flynn (1995) mostraron que el valor total de aminoácidos intracelulares, durante la fase exponencial para células de *Heterosigma certerae* era mayor en amonio que en nitrato y además presentaban un mayor contenido en glutamato y presentaba mayores valores de la proporción Gln:Glu.

Los valores de la proporción Gln/Glu de las células cultivadas con nitrato y amonio son anormalmente bajos. Estos valores pueden tener una doble explicación. La

primera podría ser que las células en el momento del cosechado estuviesen limitadas por la fuente de nitrógeno. Esta posibilidad se descarta, ya que las células en todos los experimentos desarrollados se recolectaron en fase exponencial de crecimiento, en la que no existe limitación de nutrientes. Otra posibilidad podría ser que la asimilación de amonio en estas células no fuese vía GS-GOGAT, sino mediante la enzima glutamato deshidrogenasa.

La presencia de esta enzima ha sido demostrada en *Chlorella fusca* por Morris y Syrett (1965) y presenta mayor actividad en células creciendo con amonio que en nitrato y mayor aún en células deficientes en nitrógeno. Además Shatilov *et al.* (1978) mostraron la presencia en una cepa termofílica de *Chlorella* 82T dos GDH, una que es constitutiva y otra que sólo está presente en células creciendo con amonio. Estos últimos autores proponen que la asimilación de amonio a altas concentraciones es principalmente vía GDH mientras que a bajas concentraciones es vía GS/GOGAT.

3.5 Uso de medios micelares como realzantes de la fluorescencia de la lisina.

Con objeto de aumentar la señal de fluorescencia del derivado OPA-lisina y por tanto disminuir su límite de detección se realizó un estudio de la influencia de diferentes surfactantes catiónicos, aniónicos y neutros en la fluorescencia de dicho derivado. Los surfactantes utilizados fueron: bromuro de haxadeciltrimetilamonio (HDTAB), laurilsulfato sódico (NaLS), polioxietileno(10)lauriléter (POLE), polioxietileno(10)oleiléter (Brij 96), polioxietileno(23)dodecanol (Brij 35) y polioxietileno(9,5)-p-t-octifenol o Tritón X-100 (TX-100), en concentración cinco veces superior a su c.m.c., de acuerdo con los valores que se presentaron en la Tabla 1.3.

3.5.1 Características espectrofluorimétricas del derivado OPA-lisina en presencia de diferentes surfactantes.

En la Figura 3.21 se muestran los espectros de emisión del derivado OPA-lisina en los diferentes surfactantes ensayados, así mismo en la Tabla 3.10 se muestran los datos de los máximos de excitación y emisión para los respectivos espectros de excitación y emisión.

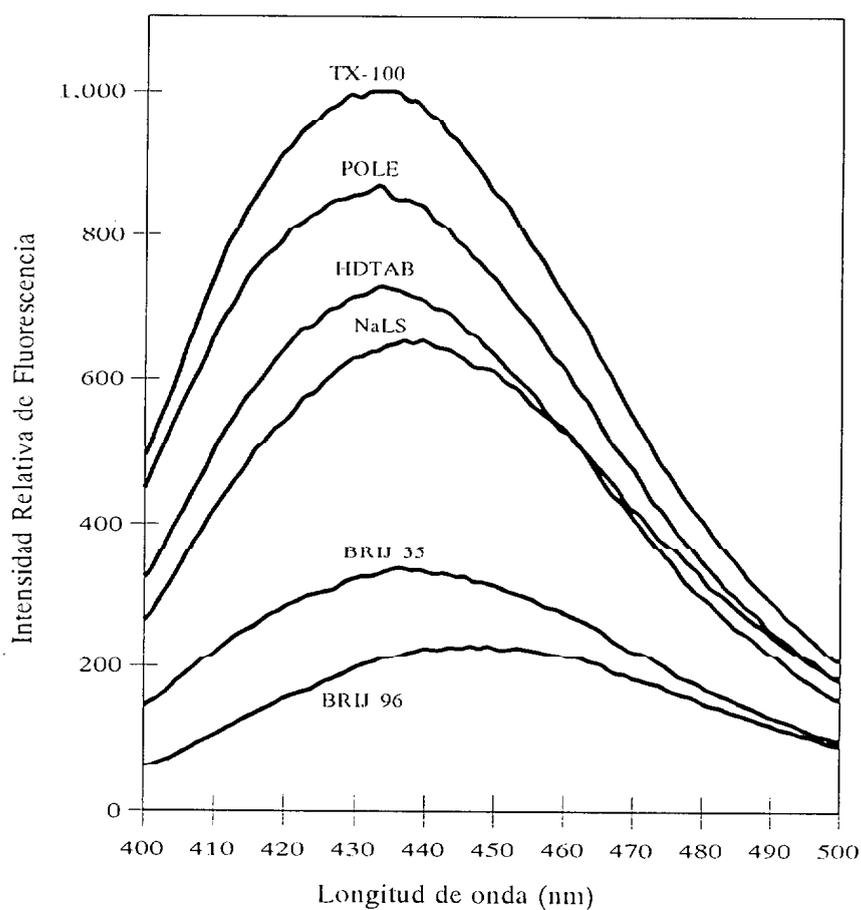


Fig. 3.21 Espectros de emisión del derivado OPA-lisina en presencia de diversos medios micelares.

Tabla 3.9 Máximos de excitación y emisión para la OPA-lisina en presencia de diferentes surfactantes.

Medio	λ_{exc}	λ_{em}
Acuoso	360	450
Brij 35	361	450
Brij 96	361	450
HDTAB	365	434
NaLS	360	435
POLE	363	432
TX-100	363	432

La influencia de los distintos surfactantes sobre la longitud de onda del compuesto de estudio es la misma con respecto al medio acuoso. Los máximos de excitación prácticamente permanecen iguales, excepto para el HDTAB para el cual el máximo se desplaza 5 nm hacia longitudes de onda mayores. Los máximos de emisión permanecen constantes para el Brij 35 y Brij 36, mientras que para el HDTAB, NaLS, POLE y TX-100, los máximos se desplazan 16, 15, 18 y 18 nm respectivamente, hacia longitudes de onda más corta.

En la Tabla 3.11 se recogen los datos de las intensidades relativas de fluorescencia correspondientes a los máximos de emisión de la OPA-lisina ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en presencia de los surfactantes usados, así como la intensidad relativa en medio micelar (I_f) respecto al medio acuoso (I_0) representados por la relación I_f/I_0 .

Tabla 3.10 Intensidades relativas de fluorescencia y realzamientos de la OPA-lisina producido por surfactantes.

Medio	I_f	I_f/I_0
Acuoso	130.6	
Brij 35	335.0	2.6
Brij 96	231.6	1.8
HDTAB	728.0	5.6
NaLS	640.2	4.9
POLE	867.0	6.6
TX-100	998.8	7.6

Se observa que todos los surfactantes empleados aumentan considerablemente la señal de fluorescencia del derivado, obteniéndose los valores más elevados para el

TX-100 y el POLE. Este comportamiento puede ser debido a la protección que el medio micelar proporciona al fluoróforo del efecto quenching vibracional por el puente de hidrógeno del agua, por la alteración de la eficiencia cuántica o por el aumento de la viscosidad alrededor del fluoróforo. Este aumento de la señal fluorescente empleando surfactantes también ha sido observada por Aminuddin y Miller (1995) con el aminoácido glicina empleando naftaleno-2,3-dicarboxialdehído (NAD) como agente derivatizador y Brij-35 como surfactante.

3.5.2 Influencia de diferentes medios micelares en la determinación cromatográfica de aminoácidos.

Los sistemas micelares constituyen microentornos que pueden producir modificaciones importantes en los espectros de excitación y emisión de muchas moléculas así como en la intensidad de fluorescencia emitida. Debido a los óptimos resultados obtenidos para el derivado OPA-lisina en presencia de surfactantes y comentados en el apartado anterior parece muy interesante comprobar el comportamiento cromatográfico de los OPA-aminoácidos en presencia de los diferentes surfactantes ensayados.

El procedimiento de análisis fue el mismo que el desarrollado en el apartado 3.1, salvo que el α -ácido aminobutírico fue sustituido por el correspondiente surfactante. Este fue añadido en concentración superior a su concentración micelar crítica y antes de ser inyectada la muestra en columna. El volumen de muestra final y de inyección se mantuvieron constantes. En la Tabla 3.12 se recogen los valores de la relación entre la señal de fluorescencia en presencia y ausencia de surfactante para los OPA-aminoácidos en estudio.

Como se observa, la presencia de surfactante en la mezcla de derivatización no altera la señal de fluorescencia de los OPA-aminoácidos en el sistema cromatográfico, a excepción de la glicina con NaLS y de la lisina con todos los

surfactantes ensayados en los que se produce realzamiento de la señal, siendo el Brij 96 y el POLE los mayores realzadores de este aminoácido. Los mejores resultados para todos los derivados se obtuvieron con el NaLS y POLE, notando que la señal de fluorescencia aumenta ligeramente o disminuye muy poco para los aminoácidos neutros y apolares, mientras que para los aminoácidos polares la señal se mantiene aproximadamente constante o disminuye en mayor medida que los apolares.

Si comparamos los resultados obtenidos para el derivado OPA-lisina con CLAR y los obtenidos por Espectrofluorimetría convencional, podemos observar el importante descenso del realzamiento de la señal fluorescente producida por el medio micelar, utilizando la técnica cromatográfica, excepto para el Brij 96 cuyo valor permanece constante.

Estas disminuciones, presentan valores que van desde aproximadamente un 15% para el TX-100, aproximadamente un 25% para el POLE, NaLS y HDTAB y en más de un 60% para el caso del Brij 35.

Entre las causas a las que pueden ser debidas estas disminuciones podemos citar:

a) el sistema de medida en el espectrofluorímetro es estático, la solución a medir no se altera por ningún elemento a excepción de la fuente de luz. En cambio, en CLAR las fases móviles alteran el sistema haciéndolo menos específico.

b) el espectrofluorímetro cuenta con un monocromador donde se selecciona la λ_{ex} y λ_{em} para el compuesto en estudio, mientras que el detector de fluorescencia en el Cromatógrafo Líquido cuenta con un filtro de excitación de interferencia y un filtro de emisión de corte, siendo así este sistema menos específico.

Tabla 3.11 Valores de la intensidad de fluorescencia en medio micelar respecto al medio acuoso de los OPA-aminoácidos

AA	Brij 35	Brij 96	HDTAB	NaLS	POLE	TX-100
Asp	0.8	0.7	0.6	1.0	1.0	0.8
Glu	0.9	0.8	0.6	1.0	1.0	0.8
Asn	0.9	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8
Ser	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8
His	0.8	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8
Gln	0.8	0.8	0.9	1.0	0.9	0.8
Gly	0.9	0.9	1.0	1.3	0.9	0.8
Arg	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9
Thr	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9
Ala	0.9	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8
Tyr	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.8
Trp/Met	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0	0.8
Val	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.8
Phe	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.8
Iso	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.8
Leu	1.0	0.9	0.9	1.0	0.1	0.8
Lys	1.6	1.7	1.6	1.3	1.7	1.1

3.6 Determinación cromatográfica de aminoácidos en presencia de POLE.

De los resultados obtenidos en el apartado anterior se concluye que la presencia de POLE aumenta la intensidad de fluorescencia del derivado OPA-lisina respecto a la señal que presentaba en medio acuoso, sin alterar o modificar la señal para el resto de los OPA derivados.

Este realzamiento puede ser utilizado desde el punto de vista analítico con la finalidad de establecer un método más sensible para la determinación de lisina por cromatografía líquida de alta resolución.

3.6.1 Influencia de la concentración de POLE en la intensidad de fluorescencia de la lisina.

La presencia de surfactante ejerce una gran influencia sobre la intensidad de fluorescencia de muchos compuestos, alcanzándose valores máximos para concentraciones de surfactante que superan la c.m.c.

Por esta razón, previo al estudio de las características analíticas del método se realizó un estudio del efecto de la concentración de POLE sobre la señal del derivado OPA-lisina

Los resultados que se representan en la Figura 3.122, 3.23, 3.24 y 3.25 muestra que a concentraciones superiores a $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ la intensidad de fluorescencia aumenta con la concentración de surfactante, a concentraciones superiores, la emisión de fluorescencia permanece prácticamente constante, para disminuir ligeramente a concentraciones mayores a $4 \times 10^{-4} \text{ M}$. Se tomó el valor de concentración de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ para realizar todos los estudios posteriores.

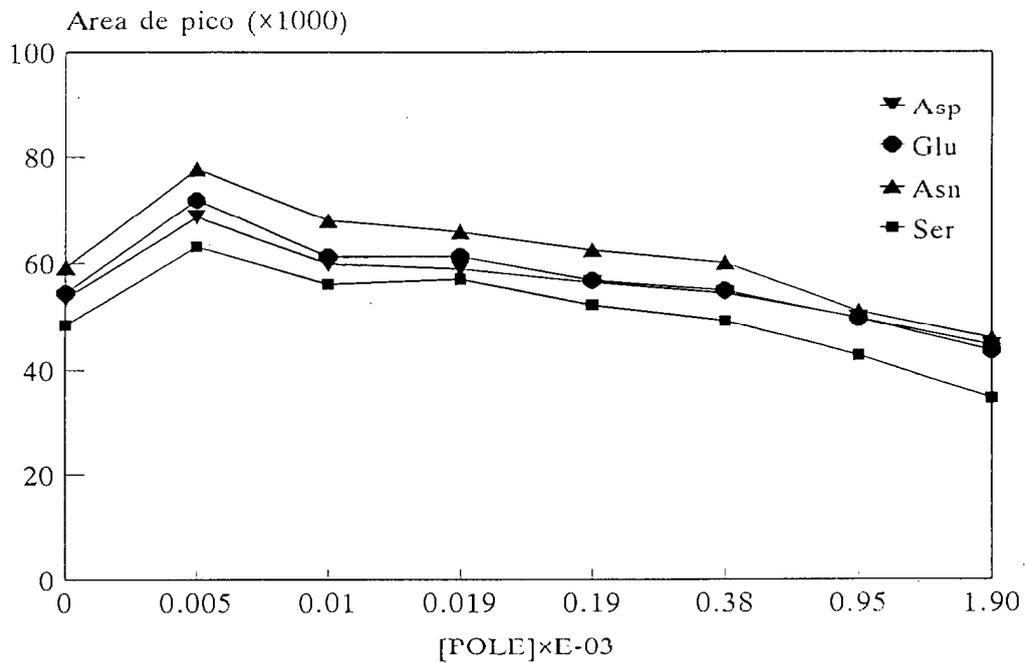


Fig. 3.22 Efecto de la concentración de POLE sobre el área de pico de los OPA-aminoácidos derivados ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y serina.

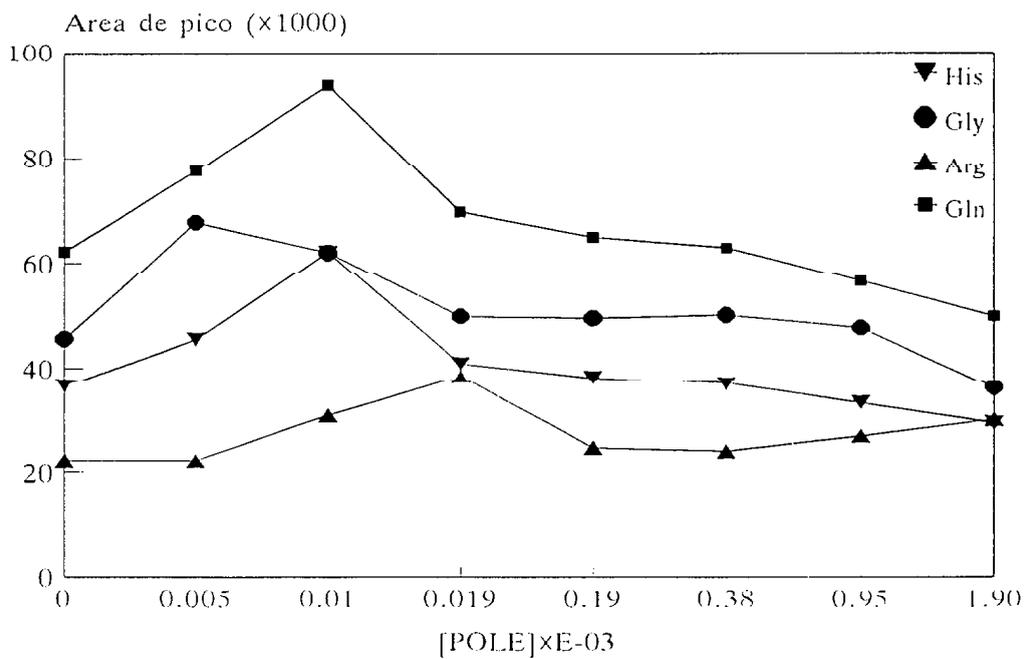


Fig. 3.23 Efecto de la concentración de POLE sobre el área de pico de los OPA-aminoácidos derivados histidina, glutamina, glicina y arginina.

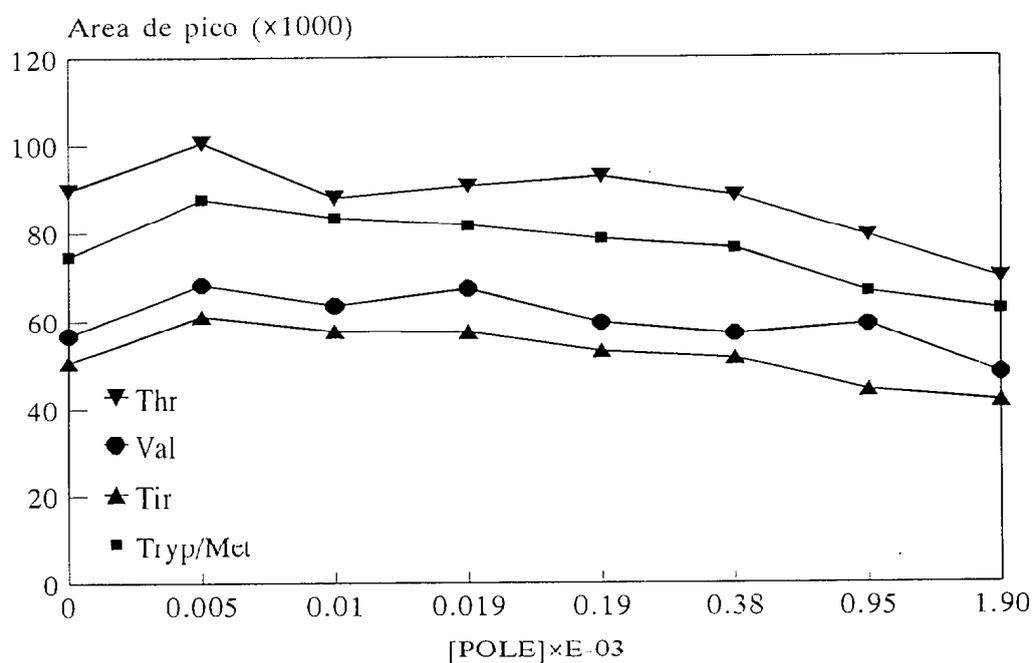


Fig. 3.24 Efecto de la concentración de POLE sobre el área de pico de los OPA-aminoácidos derivados treonina, valina, tirosina y triptófano-metionina.

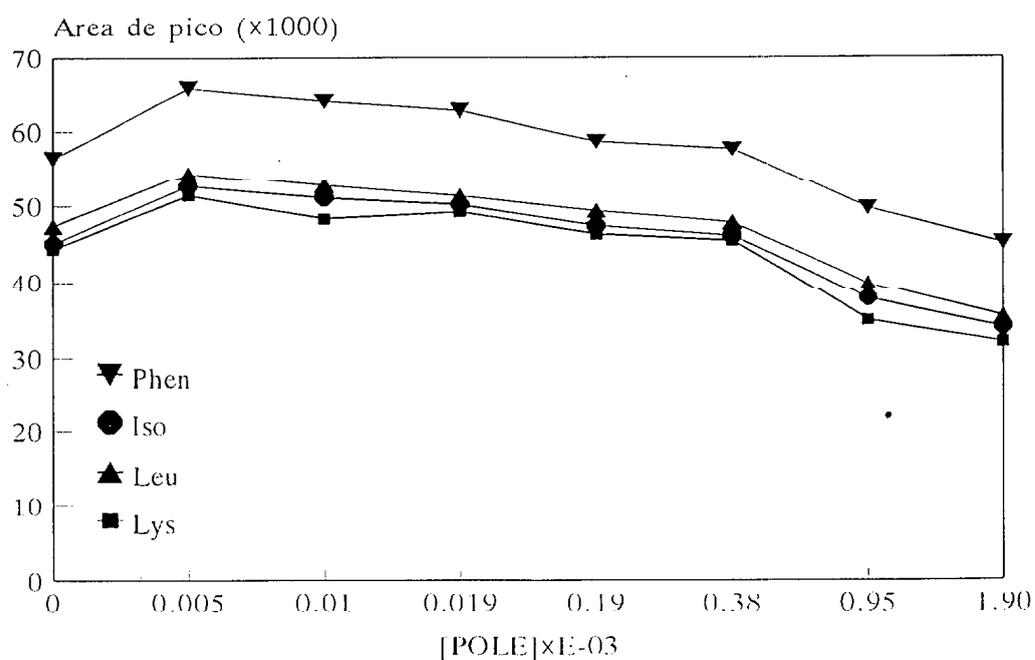


Fig. 3.25 Efecto de la concentración de POLE sobre el área de pico de los OPA-aminoácidos derivados fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

3.6.2 Características analíticas del método cromatográfico.

El rango de concentraciones usado para comprobar la relación lineal entre la señal fluorescente y la concentración de analito en presencia de POLE, fue el mismo que se utilizó en ausencia de surfactante (0.1-10 μM). Las ordenadas en el origen y pendientes de las respectivas curvas de calibrado, obtenidas por ajuste de mínimos cuadrados, junto a sus respectivos coeficientes de correlación se encuentran en la Tabla 3.13. Se puede observar que los coeficientes de correlación de las correspondientes rectas, en dicho rango, fueron iguales a 0.999 para todos los aminoácidos.

Para conocer la reproducibilidad del método, se prepararon seis muestras con una concentración de aminoácido (5 μM) correspondiente al rango de concentraciones establecido. Tomando un nivel de confianza de 95% y siete grados de libertad, el valor de la t de Student es 2.57. A partir de los resultados anteriores se calculan los parámetros estadísticos que aparecen en la Tabla 3.14, de lo que se deduce que se cometen errores que están de acuerdo $t_{\text{exp}} < t$. Los valores de los porcentajes de error cometidos en el método son menores, para todos los aminoácidos, que los que se cometen con el método sin emplear surfactante, lo que supone una mejora analítica con respecto al primer método. Esta disminución de los porcentajes de error se puede deber a la estabilidad que proporciona el surfactante al fluoróforo, proporcionando una señal más estable.

Para la determinación del límite de detección de los diferentes aminoácidos en estudio calculó la cantidad de analito que producía un pico cuya altura era múltiplo de la altura del ruido de fondo de la línea base (razón señal ruido). En este estudio los valores del límite de detección, que se recogen en la Tabla 3.15, para cada aminoácido se obtuvieron considerando la altura de pico como dos veces la del ruido de fondo de la línea base. El límite de detección del derivado OPA-lisina se ha

conseguido disminuir en más de tres veces. La lisina presentaba un límite de detección en el método original de 0.91 pmol, con el método con surfactante se ha pasado a aproximadamente a 0.3 pmol. También disminuyeron los límites de detección de la histidina de 0.42 pmol a 0.3 pmol y de la valina de 0.133 pmol a 0.053 pmol, por el contrario el del par triptófano-metionina aumentó de 0.023 pmol a 0.157 pmol.

Tabla 3.13 Curvas de calibrado y límites de detección para los OPA-aminoácidos derivados en medio micelar de POLE.

Aminoácido	Pendiente	Ordenada	c.c.
Asp	6.17E+04	0.11E+04	0.999
Glu	6.01E+04	0.08E+04	0.999
Asn	6.99E+04	0.05E-04	0.999
Ser	6.32E+04	0.27E+04	0.999
His	3.75E+04	0.25E-04	0.999
Gln	6.95E+04	0.12E+04	0.999
Gly	4.80E+04	0.28E+04	0.999
Arg	5.93E+04	0.03E+04	0.999
Thr	6.11E+04	0.05E+04	0.999
Ala	5.89E+04	0.57E+04	0.999
Tyr	5.30E+04	0.06E-04	0.999
Trp/Met	8.13E+04	0.24E-04	0.999
Val	5.92E+04	0.06E+04	0.999
Phe	4.89E+04	0.05E-04	0.999
Iso	5.17E+04	0.035E+04	0.999
Leu	4.76E+04	0.02E-04	0.999
Lys	3.19E+04	0.03E-04	0.999

Tabla 3.14 Parámetros estadísticos para los OPA-aminoácidos derivados en medio micelar de POLE.

AA	\bar{x}^a	σ_{n-1}^b	σ_m^c	t_{exp}^d	% Error
Asp	5.06	0.22	0.09	0.27	4.51
Glu	5.10	0.24	0.10	0.42	4.89
Asn	4.99	0.22	0.09	0.02	4.65
Ser	4.77	0.24	0.10	0.92	5.39
His	4.59	0.27	0.11	1.54	6.14
Gln	5.52	0.24	0.10	2.16	4.59
Gly	4.92	0.20	0.08	0.40	4.36
Arg	5.06	0.28	0.11	0.22	5.84
Thr	5.08	0.30	0.12	0.27	6.23
Ala	5.08	0.22	0.09	0.35	4.77
Tyr	5.21	0.22	0.09	0.93	4.51
Met/Trp	5.62	0.16	0.06	3.84	2.99
Val	5.05	0.22	0.09	0.24	4.59
Phe	5.26	0.36	0.15	0.72	7.14
Iso	5.04	0.20	0.08	0.21	4.23
Leu	5.00	0.20	0.08	0.03	4.26
Lys	4.90	0.22	0.09	0.44	4.65

a) media de los valores de concentración

b) desviación estándar

c) desviación estándar de la media

d) valor del parámetro t calculado experimentalmente

Tabla 3.2 Límites de detección para los OPA-aminoácidos derivados cuantificados.

AA	L.D. (pmol)
Asp	0.08
Glu	0.14
Asn	0.17
Ser	0.10
His	0.28
Gln	0.20
Gly	0.15
Arg	0.17
Thr	0.16
Ala	0.05
Tyr	0.14
Trp/Met	0.16
Val	0.15
Phe	0.20
Iso	0.20
Leu	0.20
Lys	0.28

3.6.2.4 Aplicaciones

El método propuesto se aplicó a muestras de *Ulva rigida*, cultivada con agua de mar en invernadero. En estas condiciones el alga no tiene ningún aporte extra de nitrógeno y como se comentó en el apartado 2.6.1 el alga crece en condiciones limitantes por la fuente de nitrógeno.

La muestra del alga fue recogida y se procesó como se indica en el apartado 2.5. Al extracto acuoso de la misma se le añadió 20 μl de una solución de POLE 2×10^{-3} M y se cuantificó según las curvas de calibrado que se presentan en el apartado 3.6.2. Los resultados de los análisis se presentan en la Tabla 3.16. Hay que destacar en los mismos, los valores correspondientes a los aminoácidos glicina, tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, aminoácidos no detectables por el método en ausencia de surfactante, según se comprobó al analizar la misma muestra por este último método. Este resultado junto al aumento de la sensibilidad de la lisina muestra la utilidad de este método en la determinación de aminoácidos en algas.

Tabla 3.16. Efecto de la presencia de POLE en la determinación de aminoácidos libres en *Ulva rigida*

AA (μM)	<i>Ulva rigida</i>
Asp	0.48
Glu	10.68
Asn	0.30
Ser	2.13
His	0.18
Gln	0.56
Gly	0.20
Arg	0.63
Thr	0.55
Ala	0.72
Tyr	0.11
Trp/Met	0.08
Val	0.22
Phe	0.10
Iso	0.15
Leu	0.18
Lys	0.29

IV.- CONCLUSIONES

1. Se establece un método analítico, usando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, para la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos en algas tanto marinas como de agua dulce.

2.- Se estudia el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la composición de aminoácidos libres, pigmentos y proteínas en la macroalga *Ulva rigida*. El ácido glutámico, la glutamina, asparagina, glicina y arginina, son los aminoácidos mayoritarios en condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno en el medio. En condiciones limitantes los aminoácidos mayoritarios son el ácido glutámico y la serina.

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo provoca una disminución muy marcada en los tres primeros días de limitación en los contenidos de clorofilas a y b, proteínas totales y aminoácidos libres. A partir del sexto día esta disminución se hace menos patente. La marcada variación del contenido total de aminoácidos libres demuestra su importancia como almacenamiento de nitrógeno cuando éste está disponible en el medio, para ser utilizado posteriormente cuando las condiciones se vuelven limitantes.

3.- Se estudia el perfil de aminoácidos libres de la microalga *Chlorella pyrenoidosa*, creciendo a dos concentraciones de dióxido de carbono, y con dos fuentes orgánicas de carbono en el medio de cultivo. Las tasas de crecimiento obtenidas son menores en condiciones fotoautotróficas que en condiciones mixotróficas (acetato o glucosa) y dentro de éstas, fueron de forma significativa mayores en acetato que en glucosa. Los mayores contenidos en clorofila se consiguieron en las células de *Chlorella* cultivadas con acetato, seguida del dióxido de carbono y de la glucosa. El contenido total de aminoácidos libres intracelulares varía considerablemente entre las diferentes fuentes de carbono utilizadas para crecer las algas. Es mayor en células creciendo con acetato, seguido del dióxido de carbono y por último la glucosa.

La limitación de CO₂ en los cultivos de *Chlorella* produce una disminución en la tasa asimilación de amonio por las células, que se refleja en la reducción de los contenidos intracelulares de ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico y asparagina.

4.- Se estudia el perfil de aminoácidos libres en diferentes cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* creciendo en presencia cloruro de amonio, nitrato de potasio y urea. Se demuestra que las células prefieren la fuente orgánica de nitrógeno para crecer y que no presentan preferencia entre el amonio y el nitrato. La concentración en clorofilas es mayor en las células creciendo con urea y no se encuentran diferencias significativas en los contenidos de las células creciendo con amonio o nitrato.

Se demuestra que la fuente de nitrógeno altera ligeramente el contenido total de aminoácidos libres intracelulares en *Chlorella pyrenoidosa*. En este caso, el contenido total alcanza su valor máximo para los cultivos con amonio, seguido de los de nitrato y por último con urea. Sin embargo, el perfil no se ve afectado por la naturaleza de la fuente nitrogenada. Los aminoácidos mayoritarios son la alanina, treonina, lisina y glicina y los minoritarios la asparagina, ácido aspártico, histidina y glutamina.

El valor que presenta las proporciones molares de la proporción Gln/Glu en los cultivos de *Chlorella* cultivada con nitrato y amonio, hace pensar que la asimilación de amonio en estas células es por medio de la enzima glutamato deshidrogenasa. Esta hipótesis se confirma al cultivar esta especie en un medio agarizado conteniendo un inhibidor de la gltamina sintetasa.

5.- Se determinan las características espectrofluorimétricas convencionales del derivado OPA-lisina en presencia de los surfactantes Brij 35, Brij 96, POLE, TX-100, HDTAB, NaLS y se comparan con las obtenidas en medio acuosos.

Los máximos de excitación prácticamente permanecen iguales en ambos medios, excepto para el HDTAB para el cual el máximo se desplaza 5 nm hacia

longitudes de onda mayores en presencia de surfactante. Los máximos de emisión permanecen constantes para el Brij 35 y Brij 36, mientras que para el HDTAB, NaLS, POLE y TX-100, los máximos se desplazan 16, 15, 18 y 18 nm respectivamente, hacia longitudes de onda más corta en presencia de surfactante y respecto al medio acuoso.

Se observa que todos los surfactantes empleados aumentan considerablemente la señal de fluorescencia del derivado, obteniéndose los valores más elevados para el TX-100 y el POLE.

6.- Se establece un método analítico, usando la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, para la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos en presencia del surfactante POLE

Se estudia la influencia de la concentración de POLE sobre la señal del derivado OPA-lisina. Concentraciones inferiores a 5.0×10^{-5} M de POLE producen un aumento en la señal fluorescente de los aminoácidos; a concentraciones superiores, la señal permanece prácticamente constante hasta una concentración de 4×10^{-4} M, a partir de la cual disminuye ligeramente.

El método puesto a punto presenta una serie de ventajas con respecto al método en ausencia de surfactante, por una parte se redujeron los porcentajes de error en la determinación de todos los aminoácidos derivados, y por otra, se reducen los límites de detección de los aminoácidos lisina, histidina, y valina.

El método propuesto se aplicó a una muestra del alga *Ulva rigida* cultivada en condiciones de invernadero. Con el empleo de surfactante se pueden determinar los aminoácidos glicina, tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, los cuales, en las mismas condiciones de cultivo, no pueden ser detectados por el método establecido en ausencia de POLE.

V.- BIBLIOGRAFÍA

-
- Admiraal W., Peletier H., Laane R.W.P.M. (1986). Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms; excretion, assimilation and cellular pools of free aminoacids in seven species with different cell size. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98: 241-263.
- Aminuddin M., Miller J.N. (1995) New fluorogenic reagents and their fluorescent reactions for amino acid measurements. *Talanta* 42(6): 775-778.
- Antia N.J., Harrison P.J., Oliveira L. (1991) Phycological reviews 2: The role of dissolved organic nitrogen in phytoplanktonic nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* 30(1):1-89.
- Arasaki S., Arasaki T. (1983) *Vegetables from the sea*. Japan Publications Inc., Tokyo
- Armstrong D.W. (1985) Micelles in separations: a practical and theoretical review. *Sep. Purif. Methods* 14:213-304.
- Armstrong D.W., McNeely M. (1979). Use of micelles in the TLC separation of polynuclear aromatic compounds and amino acids. *Analytical Letters* 12A(12):1285-1291.
- Beardall J., Mukerji D., Glover E., Morris Y. (1976) The path of carbon in photosynthesis by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 12:409-417.

-
- Becker E.W. (1986) Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. En: *Handbook of Microalgal mass culture*. A. Richmond, (ed.), CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, USA, pp 339-420.
- Becker E.W. (1994) En: *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. E.W Becker (ed.), Cambridge University Press, pp 291.
- Benson J.R., Hare P.E. (1975) o-Phtaldialdehyde:Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorecamine and nynhydrin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72(2): 619-622.
- Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. J. of Chromatography 336: 93-104.
- Bird K.T., Habig C., DeBusk T. (1982) Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rodophyta) J. Phycol. 18(3):344-348.
- Blau K. (1981) Amino acid analysis by gas chromatography. En: *Amino Acid Analysis*. J.M. Rattenbury (ed.). Cichester: Ellis Horwood. pp 48-65.
- Carpenter E.J., Reusen C.C., Watson S.W. (1972) Utilization of urea by some marine phytoplankters. Linnol. Oceanogr. 17:265-269.
- Catalá-Icardó M., Medina-Hernández M.J., García Álvarez-Coque M.C. (1995) Determination of amino acids by micellar high performance liquid chromatography and pre-column derivatization with o-phtaldialdehyde and n-acetyl-L-cysteine. J. Liquid Chrom. 18(14):2827-2841.

-
- Cid A., Abalde J., Herrero C. (1992) High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis succica* (Kylin) Dutcher (Prasinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 1:31-37.
- Cline-Love L.J., Habarta J.G., Dorsey J.G. (1984) The micelle analytical chemistry interface. *Anal. Chem.* 56:1132A
- Conover S.A.M. (1975) Nitrogen utilization during spring blooms of marine phytoplankton in Bedford basin, Nova Scotia, Canada. *Mar. Biol. (Berl.)* 32:247-261.
- Cooper J.D.H., Ogden G., McIntosh J., Turnell D.C. (1984). The stability of the o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: an investigation using high - pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Analytical Biochemistry* 142: 98-102.
- Coulson C.B. (1953) Amino acids in marine algae. *Chem. Ind. (London)* 971-972
- Coulson C.B. (1955) Plant proteins. V.-Proteins and aminoacids of marine algae. *J. Sci. Food Agric.* 6:674-682.
- Cullimore J.V., Sims A.P. (1981). Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20: 597-600.
- Chaning D.M., Young G.T. (1953) Amino acids and peptides. Nitrogenous constituents of some brown algae. *J. Chem. Soc.* 503:2481-2491.

- Dave M.J., Parehk R.G. (1994) Amino acid composition of marine green alga *Caulerpa scalpelliformis* (Chlorophyta). *Indian Journal of Marine Sciences* 23:59-60.
- De Napoli L., Fattorusso E., Mayol L., Novellini E. (1984) Free protein amino acids of some Mediterranean Siphonales. *Biochem. System. and Ecol.* 12(1):19-21.
- DeBoer J.A. (1981) Nutrients. En: *The biology of seaweeds*. C.S Lobban y M.J. Wynne (eds.), Oxford Blackwell Scientific, pp 356-391.
- DeBoer J.A., Guigli H.J., Israel T.L., D'Elia C.F. (1978) Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. *J. Phycol* 14:261-266.
- DeBoer J.A., Ryther J.H. (1977) Potential yields from a waste recycling algal mariculture system. En: *The marine plant biomass of the Pacific Northwest Coast*. I.R. Krauss (ed.), Corvalls Oregon State University Press, pp 231-249.
- Di Martino Rigano V., Vona V., Expósito S., Di Martino C., Rigano C. (1990) Light dependent decline of NH_4^+ assimilation under CO_2 deprivation in N-limited *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) *J. Phycol.* 26(1):69-72.
- Dortch Q. (1990) The interaction between ammonium and nitrate uptake in phtoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61(1-2):183-201.
- Dortch Q., Clayton J.R., Thorensen S.S., Ahmed S.I. (1984) Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. Biol. (Berl.)* 81:237-250.

-
- Dugdale R.C., Goering J.J. (1967) Uptake of new and regenerated focus of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12:196-206.
- Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S. (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 22:609-618.
- Elrifi I.R., Turpin D.H. (1986) Nitrate and ammonium induced photosynthetic suppression in nitrogen limited *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 81:273-279.
- Ellis R., Spooner T., Yakulis R. (1975) Regulation of chlorophyll synthesis in the green alga *Golenkiana*. *Plant Physiol.* 55:791-795.
- Fendler J.H. (1982) *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley Interscience, New York
- Flynn K.J. (1988) Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chem. Ecol* 4: 1-13.
- Flynn K.J., Al-Amoudi O.A. (1988) Effects of N-deprivation and darkness on composition of free amino acid pool and on amino acid release from diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119: 131-143.
- Flynn K.J. (1989) Nutrient limitation of marine microbial production: fact or artefact?. *Chem. Ecol.* 4(1):1-13.
- Flynn K.J. (1990a). The determination of nitrogen status in microalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61:297-307.

- Flynn K.J. (1990b). Composition of intracellular and extracellular pools of amino acid utilisation of microalgae of different sizes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 139: 151-166.
- Flynn K.J. (1991) Algal carbon-nitrogen metabolism. A biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake. *J. Plankton Research* 13(2):373-387.
- Flynn K.J., Flynn K. (1992). Non-protein free amines in microalgae: consequences for the measurement of intracellular amino acids and the glutamine/glutamate ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 89: 73-79.
- Flynn K.J., Garrido J.L., Zapata M., Opik H., Hipkin C.R. (1992). Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium- and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. *J. of Applied Phycology* 4: 95-104.
- Fredriksen S., Ruess J. (1989) Cultures studies of *Gelidium latifolium* (Grav.) Born et Thur (Rhodophyta) from Norway. Growth and N storage in response to varying photon flux density, temperature and nitrogen availability. *Bot. Mar.* 32(6):539-546.
- Fürst P., Pollack L., Graser T.A., Godel H., Stehle P. (1990) Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J. Chromatogr.* 499:557-569.

-
- Gadner W.S., Miller W.H. (1980) Reverse-phase liquid chromatographic analysis of amino acids after reaction with o-Phtaldialdehyde. *Analytical Biochemistry* 101:61-65.
- Grant B.R., Turner I.M. (1969) Light simulated nitrate and nitrite assimilation in several species of algae. *Comp. Biochem. Physiol.* 29:995-
- Guerrero M.G., Lara C. (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. En: *The cyanobacteria*. L. Van Baalen C. (ed.), Elsevier Sci. Publ. Amsterdam, pp 163-186.
- Guerrero M.G., Vega J.M., Losada M. (1981). The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:169-204.
- Guy R.D., Valerberghe G.C., Turpin D.H. (1989) Significance of phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation. C isotope discrimination in photosynthesis and respiration by the nitrogen limited green algae *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 89:1150-1157.
- Haass D., Tanner W. (1974) Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 53:14-20.
- Hamilton P.B. (1965). Amino acids on hands. *Nature* 205, 284-285.
- Hanisak M.D. (1979) Nitrogen limitation of *Codium fragile* spp *tomentosoides* as determined by tissue analysis. *Mar. Biol.* 50:33-337.

-
- Hanisak M.D. (1983) The nitrogen relationships of marine macroalgae. En: *Nitrogen in the marine environment*. E.J. Carpenter y D.G. Capone (eds.), New Academic Press, pp 699-730.
- Harrison W.G., Head E.J.H., Conover R.J., Longlurst A.R., sameoto D.D. (1985) The distribution and metabolism of urea in the eastern Canadian Arctic. *Deep sea Res.* 32(1A):23-42
- Heinrikson R., Meredith S. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* 136:65-74.
- Hinze W.L., Singh H.N., Baba Y., Harvey N.G. (1984) Micelar enhanced analytical fluorimetry. *Trends Anal. Chem.* 3(8):193-199.
- Hinze W.L. (1987) Utilization of surfactant systems in chemical separations. *Annali di Chimica* 77:167-207.
- Hipkin C.R., Everest S.A., Rees T.A.V., Syrett P.J. (1982) Ammonium generation by nitrogen-starved cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 154:587-592.
- Hodgin J.C. (1979) The separation of pre-column o-phthaldialdehyde derivatized amino acids by high performance liquid chromatography. *J. of Liquid Chromatogr.* 2(7):1047-1059.
- Impellizzeri G., Mangiafico S., Oriente G., Piatelli M., Sciuto S. (1975). Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry* 4:1549-1557.

-
- Ito K, Hori K (1989) Seaweed, chemical composition and potential food uses. *Food Rev. Int.* 5:101-104.
- Jackson G.A. (1977) Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, of southern California. *Limnol. Oceanogr.* 22:979-995.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. (1975). New spectrophometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁, and c₂ in higher plants, algae and natural populations. *Biochem. Physiol. Pflanz en.* 167: 191-194.
- Ji M.H., Pu Z., Niu Z.Q. (1981) The variation in contents of various states of amino acids in *Porphyra yezoensis*. In Levring T (de) Proceedings from the Xth International Seaweed Symposium de Gruyter, Berlín and New York, 431-435.
- Jiménez del Río M., Ramazanov Z., García Reina G. (1996) *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank cultures as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishponds effluents. *Hydrobiologia* 326/327:61-66.
- Jones B.N., Paabo S., Stein S. (1981) Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthaldialdehyde precolumn labelling procedure. *J. of Liquid Chromatogr.* 4(4):565-586.
- Jones B.N., Gilligan J.P. (1983). o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. of Chromatography* 266: 471-482.
- Kamiya A., Kowallik W. (1987) Photoinhibition of glucose uptake in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.* 28:611-619.

- Laliberté G. de la Noüe J. (1993) Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate. *J. Phycol.* 29:612-620.
- Lalucat J., Imperial J., Pares R. (1984) Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ79. *Biotechnol. Bioengng.* 26:677-681
- LaPointe B.E., Ryther J.H. (1979) The effects of nitrogen and seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* in mass outdoor cultures. *Bot. Mar.* 22:529-537.
- Lara C., Romero J.M. (1986) Distinctive light and CO₂-fixation requirements of nitrate and ammonium utilization by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 81:686-688.
- Laycock M.V., Craigie J.S. (1977). The occurrence and seasonal variation of gigartine and l-citrullinyl-l-arginine in *Chondrus crispus* Stackh. *Can. J. Biochem.* 55:22-27.
- Lee Y.K., Ding S.Y., Hoe C.H., Low C.S. (1995) Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *J. Applied. Phycol.* 8:163-169.
- Levasseur M., Harrison P.J., Heindal B.R., Therriault J.C. (1990) Simultaneous nitrogen and silicate deficiency of a phytoplankton community in a costal jet-front. *Mar. Biol.* 104(2):329-338.
- Levasseur M., Thompson P.A., Harrison P.J. (1993) Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.* 29(5):587-595.

-
- Lignell A., Pedersén M. (1987). Nitrogen metabolism in *Gracilaria secundata* Harv. *Hydrobiologia* 151/152:431-441.
- Mackenzie S.L. (1981) recent developments in amino acid analysis by gas-liquid chromatography. En: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 27, D. Glick (ed.), John Wiley & Sons, New York, pp. 1-88.
- Mackenzie S.L. (1990) Amino Acids. En: *Gas Chromatography Biochemical, Biomedical and clinical Applications*. R.E. Clemente (ed.), John Wiley & Sons, New York, pp.267-293.
- Madgwick J.C., Ralph B.J., Shannon J.S., Simes J.J. (1970) Non-protein amino acids in Australian seaweeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 141:766-767 .
- Madgwick J.C., Ralph B.J. (1972). Free amino acids in Australian marine algae. *Botanica Marina* XV: 205-209.
- Martínez F., Orus M.I. (1991) Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. *Plant Physol.* 95:1150-1155.
- Martín-Jézequel V., Poulet S.A., Harris R.P., Moal J., Samain J.F. (1988) Interspecific and intraespecific composition and variation of free amino acids in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44:303-313.
- Martin-Jézequel V., Sournia A., Birrien J.L. (1992). A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. III. Free amino acids composition studied by HPLC analysis. *J. Plankton Res.* 14: 409-421.

-
- Matile P. (1978) Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:193-213.
- McIntire G.L. (1990) Micelles in Analytical Chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 21:257-278
- Miflin B.J., Lea P.J. (1982) Ammonia assimilation and amino acid metabolism. En "Encyclopedia of Plant Physiology" New series vol. 14A (D. Boulder y B. Parthier, eds.) Springer, Berlín. pp 3-64.
- Moal J., Martín-Jézequel V., Harris R.P., Samain J.F., Poulet S.A. (1987) Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanologica Acta*, 10:339-346.
- Moore S., Stein W.H. (1951) Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.* 192:663-681.
- Moroi Y. (1992) Micelles. Theoretical and applied aspects. Plenum Press. New York.
- Morris Y., Syrett P.J. (1965) The effect of nitrogen starvation on the activity of nitrate reductase and other enzymes in *Chlorella*. *J. Gen. Microbiol.* 38:21-28.
- Mortrain- Bertrand A., Descolas-Gros C., Jupin H. (1987) Short-term ¹⁴C incorporation in *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (Bacillariophyceae) as a function of light regime. *Phycologia* 26:262-269.
- Munda I.M., Gubensek F. (1986). The amino acid content of some benthic marine algae from the Northern Adriatic. *Botanica Marina* XXIX: 367-372.

- Nakamura H., Matsumoto A., Tamura Z. (1982) On the stability of isoindole-type fluorophores derived from o-phthaldialdehyde, primary amino compounds and thiols. *Analytical Letters* 15(A17): 1393-1410.
- Nars A.H., Bekheet I.A., Ibrahim R.K. (1967) An electrochromatographic investigation of the amino acid pattern of some marine algae from Alexandria. *Hydrobiologica* 29:80-92.
- Niell F.X. (1976) C:N ratio in some marine macrophytes and its possible ecological significance. *Bot. Mar.* 19:347-350.
- Oaks A., Bidwell R.G.S. (1970) Compartmentation of intermediary metabolites. *Ann Rev. Plant Physiol.* 21:43-66.
- Ogawa T., Aiba S. (1981) Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1121-1132.
- Ogino C.J. (1955) Biochemical studies in the nitrogenous compounds of algae. *J. Tokyo Univ. Fish.* 41:107-152.
- Pelizzetti E., Pramauro E. (1985) Analytical implications of organized molecular assemblies. *Anal. Chim. Acta* 169:1-29.
- Pellegrini M. (1969) Contribution á l'étude chimique des algues méditerranées. Tesis de especialidad. Marsella 159 pp
- Pellegrini M. (1967) Contribution á l'étude chimique des algues méditerranées. Composition en acides aminées au *Callithamion granulatum* (Ducluzeau) J. Ag. J. *Ag. Ann. Fac. Sci. Marseille* 39:163-171.

-
- Perry M.J., Larsen M.C., Alberte R.J. (1981) Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar. Biol* 62:91-101.
- Pillai V.K. (1957) Chemical studies in Indian seaweeds. Partition of nitrogen. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 45:43-63.
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann D.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975:384-394.
- Roach M.C., Harmony M.D. (1987) *Anal. Chem* 59:411
- Romero J.M., Lara C., Guerrero M.G. (1985) Dependence of nitrate utilization upon active CO₂ fixation in *Anacystis nidulans*: A regulatory aspect of the interaction between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:396- 401.
- Rosen M.J. (1989) *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Interscience, New York.
- Rosenberg G., Ramus J. (1982) Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Mar. Biol.* 66(3):251-259
- Roth and Hampai (1973) Column chromatography of amino acids with fluorescence detection. *J. of Chromatogr.* 83:353-356.

-
- Roth M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* 43: 880-882.
- Shatilov V.R., Sof'in A.V., Zabrodina T.M., Mutuskin A.A., Pshenova K.V., Kretovich V.L. (1978) Ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Chlorella*. *Biokhimiya* 43:1492-1495.
- Shinoda K., Nakagawa T., Tamamushi B., Isemura T. (1963) "Colloidal surfactants" Acad. Press., New York.
- Simons S.S, Johnson D.F. (1976) The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines. *J. Am. Chem. Soc.* 98:7098.
- Simons S.S, Johnson D.F. (1977) Ethanethiol: a thiol conveying improved properties to the fluorescent product of o-phthalaldehyde and thiols with amines. *Anal. Biochem.* 82:250.
- Smith D.G., Young G.E. (1955) A closer examination of amino acids free and in hydrolysates of *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Chondrus crispus*, *Rhodomenia palmata* and *Ulva lactuca*. *J. Biol. Chem.* 217:845-855.
- Smith R.G., Wheeler W.N., Srivastava L.M. (1983) Seasonal photosynthetic performance of *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) *J. Phycol.* 19:352-359.
- Spencer B.J., Purdy W.C. (1995) High Performance Liquid Chromatography separation of derivatized amino acids enantiomers using modified β -cyclodextrin as a mobile phase additive. *Analytical Letters* 28(10):1865-1881

- Stobaugh J.F., Repta A.J., Sternson L.A., Garren K.W. (1983) Factors affecting the stability of fluorescent isoindoles derived from reaction of o phthaldialdehyde and hydroxyalkylthiols with primary amines. *Anal. Biochem.* 135:495-504.
- Sueoka N. (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acids in *Chlamydomonas reinhardtii* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:83-91.
- Syrret P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fisher. Aqua. Scien.* 210:182-210.
- Syrett P.J., Al-Houty F.A.A. (1984) The phylogenetic significance of the occurrence of urease/urea amidolyase and glycollate oxidase/glycollate dehydrogenase in green algae. *Br. Phycol. J.* 19(1):11-21.
- Thacker A., Syret P.J. (1972) The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 71:423-433.
- Thompson P.A., Levasseur M.E., Harrison P.J. (1989) Light limited growth on ammonium vs. Nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton?. *Limnol. Oceanogr.* 34(6):1014-1024.
- Topinka J.A., Robbins J.V. (1976) Effects of nitrate and ammonium enrichment on growth and nitrogen physiology in *Fucus spiralis*. *Limnol. Oceanogr.* 21:659-664
- Turpin D.H., Harrison P.J. (1978). Fluctuations in free amino acids pools of *Gymnodinium simplex* (Dinophyceae) in response to ammonia perturbation: evidence for glutamine synthetase pathway. *J. Phycol.* 14: 461-464.

-
- Umagat H., Kucera P., Wen R.F. (1982) Total amino acid analysis using pre-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* 239:463-474.
- Wallsgrave R.M., Keys A.J., Lea P.J. y Miflin B.J. (1983). Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ.* 6:301-309.
- Wallsgrave R.M., Lea P.J.(1985) Photosynthetic nitrogen metabolism. En: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*. J.Barber y N.R. Baker (eds.) Elsevier Science Pub. B.V. (Biomedical Division), Amsterdam, pp. 389-418.
- Weger H.G., Turpin D.H. (1989) Mitochondrial respiration can support NO_3^- and NO_2^- reduction during photosynthesis. *Plant Physiol.* 89:409-415.
- Wheeler P.A., Stephens G.C. (1977) metabolic segregation of intracellular amino acids in *Platymonas* (Chlorophyta). *J. of Phycol.* 13:193-197.
- Wheeler P.A., North W.J. (1981) Nitrogen supply, tissue composition and frond growth rates for *Macrocystis pyrifera* of the coast of Southern California. *Mar. Biol.* 64(1):59-69.
- Wiemken A., Dürr M. (1974) Characterization of amino acids pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae* *Arch. Microbiol.* 101:45-57.

-
- Wiessner W., French C.S. (1970) The forms of native chlorophyll in *Chlamydomonas stellata* and their changes during adaptation from photoheterotrophic to autotrophic growth. *Planta (Berl.)* 94:78-90
- Wilkinson J.M. (1978) The separation of dansyl amino acids by reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Cromatogr. Sci.*, 16:547-552.
- Yang C.Y., Sepulveda F.I.(1985) Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by high-performance liquid chromatography on Spherisorb octadecylsilane columns. *J. of Chromatography*. 346: 413-416.