



OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE UNA DIATOMEA EDÁFICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2018/19

Alumno: Alba María Plaza Faulín

Tutor: Carlos Blanco Fuentes

Cotutor externo: Olimpio Montero Domínguez

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

Índice

1-	Resumen	1
2-	Introducción	2
3-	Objetivos	7
4-	Materiales y métodos.....	7
4.1-	Materiales	7
4.2-	Estudio del crecimiento: cultivo de <i>Haslea spicula</i>	8
4.3-	Tasa de crecimiento: cámara de Neubauer	9
4.4-	Medida de la luz: Radiómetro	10
4.5-	Extracción de lípidos totales: método cloroformo/metanol	11
4.6-	Cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS-QTOF)	12
5-	Resultados y discusión.....	13
5.1-	Crecimiento de <i>Haslea spicula</i> en diferentes medios de cultivo	13
5.2-	Cultivo de <i>Haslea spicula</i> a diferentes irradiancias	15
5.3-	Crecimiento de <i>Haslea spicula</i> bajo diferentes condiciones metabólicas (fototrófico y heterotrófico).....	16
5.4-	Crecimiento de <i>Haslea spicula</i> en biorreactor	18
5.5-	Perfil lipídico: contenido de ácidos grasos de interés	19
6-	Conclusiones	27
7-	Agradecimientos	27
8-	Bibliografía	28

1- Resumen

Debido a la búsqueda de fuentes alternativas de lípidos y al desarrollo de los alimentos funcionales se ha puesto el foco sobre las microalgas. Estas se caracterizan por un perfil lipídico en el que abundan los ácidos grasos de cadena larga, siendo de vital importancia los ácidos docosahexaenoico (DHA), araquidónico (ARA) y eicosapentaenoico (EPA) por sus propiedades sobre la salud. En este contexto, la diatomea *Haslea spicula* presenta las características idóneas en su perfil lipídico para ser una candidata para la producción de lípidos a niveles industriales. Y por ello, en el presente Trabajo Fin de Máster (TFM), se hace una primera aproximación a su posible aplicación biotecnológica.

Abstract

Due to the search for alternative sources of lipids and the development of functional foods, the focus has been placed on microalgae. These are characterized by a lipidic profile in which long chain fatty acids abound, among which the docosahexaenoic (DHA), arachidonic (ARA) and eicosapentaenoic (EPA) acids are of vital importance because of their health properties. In this context, *Haslea spicula* diatom has the ideal characteristics to be a potential candidate for producing lipids at industrial levels. For this reason, in this Final Master's Report (FMR), its possible biotechnological application is studied.

2- Introducción

La sobreexplotación de los recursos naturales de la Tierra ha dado lugar a la búsqueda de nuevas alternativas sostenibles tanto para la alimentación como para el abastecimiento de energía. En este sentido, los organismos fotótrofos, especialmente microalgas, han ganado especial interés como productores de lípidos (Levering, Broddrick, & Zengler, 2015).

Las algas se han utilizado desde la antigüedad en una multitud de actividades culturales, ceremoniales o medicinales. Actualmente, se sabe que poseen un amplio rango de nutrientes beneficiosos para la salud, como proteínas, aminoácidos esenciales, fibra dietética, polisacáridos sulfatados, florotaninos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), vitaminas, minerales y pigmentos. Dichos nutrientes se encuentran asociados a una gran variedad de efectos beneficiosos sobre la salud, incluyendo antiinflamatorio, anticancerígeno, antivírico, antioxidante, antiobesidad y antidiabético, así como a la prevención y tratamiento del síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y artritis (Rey et al., 2019). Todo ello unido a que en los últimos 50 años ha aumentado el comercio de algas llegando a representar más de 6\$US billones del valor total global, pone en evidencia que llegarán a ser un componente habitual más en la dieta a nivel mundial (Norambuena et al., 2018). Además, son los organismos fotosintéticos más eficientes, ya que poseen la capacidad de fijar las mayores cantidades de carbono por unidad de biomasa, presentando la ventaja frente a plantas superiores de no necesitar una tierra fértil para su cultivo y poseer una mayor tasa de crecimiento (Bernaerts et al., 2018; Gheysen et al., 2018).

El desarrollo de nuevos alimentos funcionales ha puesto el foco sobre las microalgas debido a su potencial como fuente natural de lípidos (Gheysen et al., 2018; Herrero, Vicente, Cifuentes, & Ibañez, 2009). Las microalgas son organismos unicelulares fotoautotróficos, y en algunos casos con capacidad heterotrófica, y pueden ser cultivadas tanto en agua dulce como salada, dependiendo de la especie (Bernaerts et al., 2018; Gheysen et al., 2018). Su perfil lipídico está constituido por ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena media y larga (C14-C20) y ácidos grasos poliinsaturados con más de 20 átomos de carbono (LC-PUFAs) (Sun, Ren, Zhao, Ji, & Huang, 2019). De hecho, los LC-PUFAs son también llamados vitamina F, del inglés fatty acid, y han de ser introducidos a través de la dieta. Los PUFAs son denominados poliinsaturados debido a que su cadena posee más de un doble enlace y nombrados según la localización del primer doble enlace contando desde la cola como ω - o n-final (Gammone, Riccioni, Parrinello, & D'orazio, 2019).

Mayoritariamente los beneficios sobre la salud están asociados al ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y al ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) (Gammone et al., 2019). Por todo esto, la FAO recomendó en 2010 una ingesta diaria de 250 mg de n-3 LC-PUFAs (FAO, 2010), lo cual se puede realizar consumiendo suplementos o alimentos que posean, de manera propia o enriquecidos, n-3 LC-PUFAs. La mejor opción es el enriquecimiento de alimentos habituales, ya que los suplementos no llegan a la mayoría de los consumidores y en ciertos países cambiar la dieta para introducir alimentos que posean de manera natural n-3 LC-PUFAs supondría un largo y gran esfuerzo. Y esta incorporación se puede realizar mediante la adición de toda la biomasa, del aceite extraído de la biomasa o de forma indirecta como pienso para animales destinados al consumo (Bernaerts et al., 2018; Gheysen et al., 2018).

Sin embargo, aún quedan retos por resolver como el aumento de la productividad, el elevado coste de producción y extracción y la manera de suplementar los alimentos con esta clase de lípidos (Sun et al., 2019). Las estrategias para aumentar la producción de biomasa lipídica van desde la ingeniería celular metabólica hasta la imposición de condiciones favorables de crecimiento. Una opción que está siendo explorada es realizar cultivos mixotróficos, donde adicionalmente se tiene una fuente de carbono orgánico para la fijación de CO₂, lo cual está dando altos rendimientos en biomasa, pero conlleva un mayor gasto económico (Levering et al., 2015). Para solucionar este problema, se están diseñando co-cultivos simbióticos, es decir, se cultivan fotótrofos productores de carbono orgánico junto con heterótrofos oleaginosos que consumen dicho carbono orgánico (Menegol et al., 2019).

Los PUFAs en las microalgas se encuentran almacenados principalmente en su membrana tilacoidal como lípidos polares, mayoritariamente monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), fosfatidildiacilglicerol (PG) y sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG), siendo este último el más polar de ellos. Por otro lado, las fosfatidiletanolaminas (PE) se encuentran en las membranas celulares o citosólicas de algas eucariotas (Herrero et al., 2009). Asimismo, pueden llegar a acumular bajo determinadas condiciones hasta un 70 % de estos en peso celular seco (Sun et al., 2019). Las estructuras predominantes en la membrana tilacoidal son 1,2-di-O-acil-3-O-β-D-galactopiranosil-sn-glicerol (MGDG) y 1,2-di-O-acil-3-O-(6'-O-α-D-galactopiranosil-β-D-galactopiranosil)-sn-glicerol (DGDG) (Figura 1) (Christie, 2011).

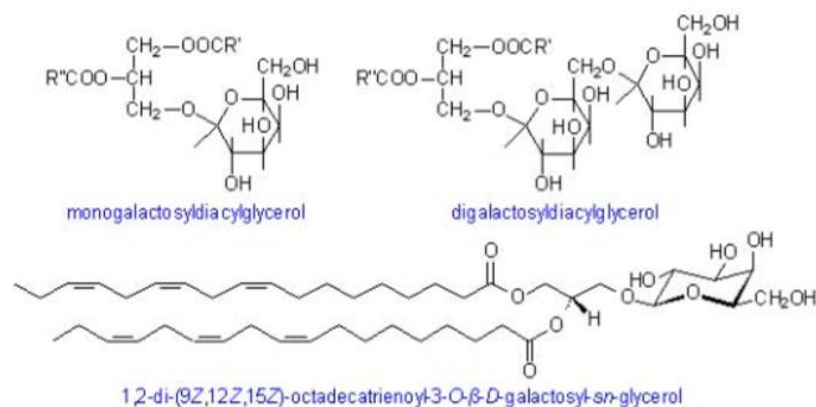


Figura 1. Estructuras de los monogalactosyldiacylglicerol y digalactosyldiacylglicerol (Christie, 2011).

Y en base a estas estructuras se pueden diferenciar 2 grupos de galactolípidos:

- Con estructura “procariota”: ácidos grasos de 18C en la posición sn-1 y de 16C en la posición sn-2 del glicerol.
- Con estructura “eucariota”: ácidos grasos de 16C o 18C en la posición sn-1 y de 18C en la posición sn-2 del glicerol.

Aunque, cabe remarcar que algunas plantas poseen MGDG tanto con estructura procariota como eucariota, dependiendo de su ubicación. Además, estos lípidos han sido aislados formando parte de los fotosistemas I y II.

Por otro lado, los PG se sintetizan solo a través de la ruta procariota en los cloroplastos. Y el sulfolípidos que se puede encontrar mayoritariamente en las plantas es el SQDG (Figura 2) o 1,2-di-O-acil-3-O-(6'-deoxi-6'-sulfo- α -D-glucopiranosil)-sn-glicerol, el cual es el glicolípido más característico de los organismos fotosintéticos. Hay que subrayar que se denomina quinovosa a la 6-deoxiglucosa. Además, se encuentra cargado negativamente, siendo este hecho muy importante para la polaridad de la membrana del tilacoide, ya que contribuye en los procesos de inserción de proteínas y transporte entre membranas (Christie, 2011).

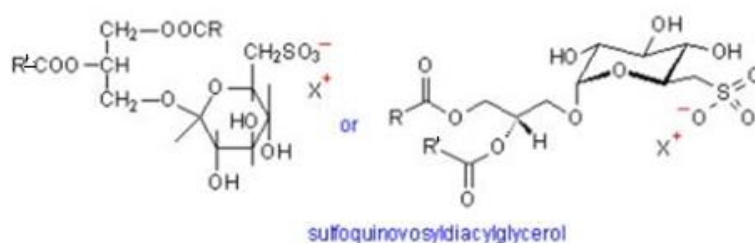


Figura 2. Estructura del sulfoquinovosyldiacylglicerol (Christie, 2011).

Las algas eucariotas son un grupo muy variado de organismos que se pueden encontrar en multitud de hábitats y son un componente esencial en la mayoría de los ecosistemas. Existen muchas clasificaciones, pero la más común se basa

principalmente en la coloración de sus pigmentos y hay nueve grupos, de los cuales los más amplios son: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas marrones), *Pyrrophyceae* (dinoflageladas), *Chrysophyceae* (algas amarillo-marronadas), *Bacillariophyceae* (diatomeas) y *Rhodophyceae* (algas rojas). Y debido a la diversidad de hábitats en los que se pueden encontrar, el perfil lipídico varía, e incluso dentro de un mismo grupo se pueden encontrar diferencias marcadas (Harwood & Guschina, 2009).

De entre las microalgas, las diatomeas (*Bacillariophyceae*) son uno de los grupos más ricos en especies y han ganado especial interés e importancia debido a su utilidad en aplicaciones comerciales e industriales como en biocombustibles, productos farmacéuticos, alimentos saludables o materiales relevantes para la nanotecnología (Huysman, Vyverman, & De Veylder, 2014; Kuczyńska, Jemiola-Rzeminska, & Strzalka, 2015). En su mayoría son organismos fotoautotróficos y unicelulares, aunque en ocasiones forman colonias, y pueden encontrarse en multitud de hábitats. Suelen llamarse microalgas doradas, debido a su pigmentación, ya que el color verde típico de las clorofilas a y c es enmascarado por la coloración marrón de los pigmentos fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina (Mejdandžić, Bosak, & Ljubešić, 2017). Son responsables de la fijación del 40% del carbono en los océanos y del 20% del total global (Huysman et al., 2014; Mejdandžić et al., 2017). La encima responsable de la fijación es la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) y existen dos mecanismos de fijación, toman tanto CO_2 como HCO_3^- y concentran el carbono inorgánico disuelto (Matsuda, Hopkinson, Nakajima, Dupont, & Tsuji, 2017). El carbono fijado se distribuye en carbohidratos y en lípidos. Además, las diatomeas son ricas en pigmentos como los carotenoides, y la mayoría poseen un alto contenido de ácido araquidónico (ARA, 20:4 n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) (Huysman et al., 2014; Mejdandžić et al., 2017; Zulu, Zienkiewicz, Vollheyde, & Feussner, 2018).

Sin embargo, son muy poco conocidos los mecanismos que controlan la vida y el ciclo celular de las diatomeas y, en la actualidad, la microscopia y los análisis genómicos han revelado que las diatomeas exhiben mecanismos específicos de división celular comparados con los modelos clásicos. Estas se caracterizan por un ciclo de vida en el cual se dan masivos crecimientos en muy poco tiempo (bloom) alternados con periodos de muerte celular, reproducción sexual y decaimiento celular (bust) (Huysman et al., 2014). Las diatomeas se reproducen por mitosis, etapa en la cual cada célula hija recibe una de las dos válvulas de la frústula de la célula madre. Un esquema del ciclo reproductivo de las diatomeas se puede observar en la Figura 3 (Mejdandžić et al., 2017).

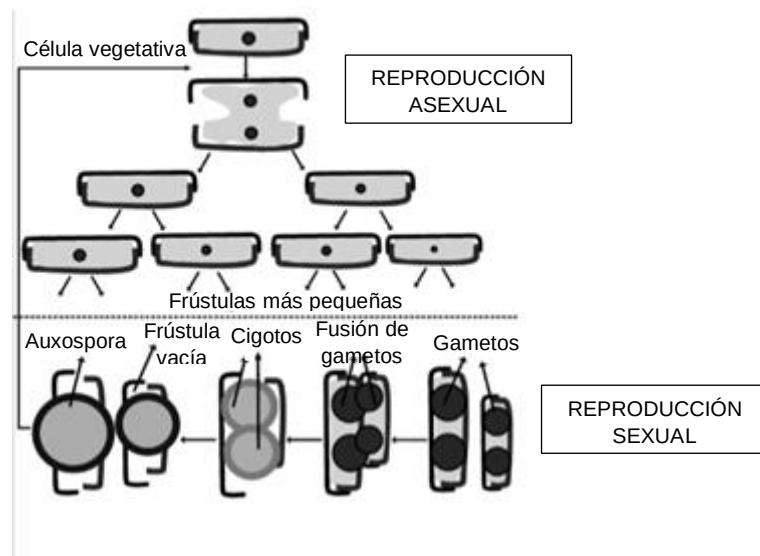


Figura 3. Ciclo reproductivo de las diatomeas (Mejdandžić et al., 2017).

Finalmente, la microalga sometida al presente estudio pertenece al grupo *Bacillariophyceae* (diatomeas) y se denomina *Haslea spicula* (Figura 4). El género *Haslea* (Tabla 1) fue descrito por Simonsen en 1974 y fue interpretado como un enlace entre la sección Fusiformes Cleve de *Navicula* Bory (Talgatti, Sar, & Torgan, 2014). Los sinónimos homotípicos que se pueden encontrar de esta especie son los siguientes: *Navicula spicula*, *Stauroneis spicula*, *Schizonema spicula* y *Pleurostaurum spicula*. Además, es una alga edáfica y bentónica en la cual se han encontrado n-3 LC-PUFAs de especial interés.

Tabla 1. Clasificación de la especie *Haslea spicula* (Kocielek, J.P.; Balasubramanian, K.; Blanco, S.; Coste, M.; Ector, L.; et al. (1995); M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, n.d.).

DOMINIO	Eukaryota
REINO	Chromista
SUBREINO	Harosa
INFREINO	Heterokonta
FILUM	Ochrophyta
SUBFILUM	Khakista
CLASE	Bacillariophyceae
SUBCLASE	Bacillariophycidae
SUPERORDEN	Bacillariophycanae
ORDEN	Naviculales
FAMILIA	Naviculaceae
GÉNERO	<i>Haslea</i>
ESPECIE	<i>Haslea spicula</i>

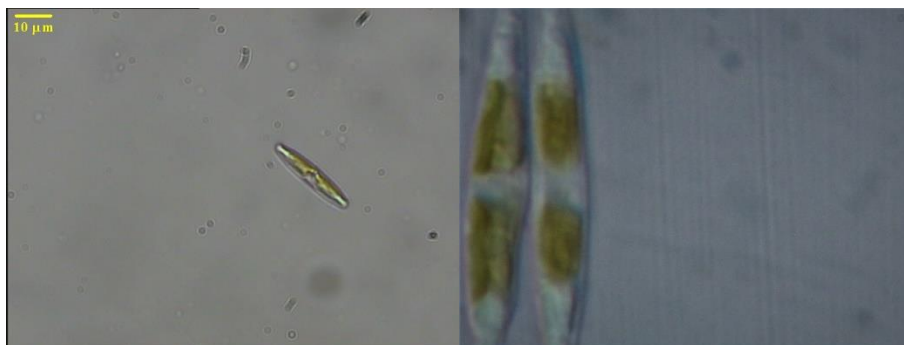


Figura 4. Foto de *Haslea spicula* vista al microscopio.

3- Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Máster es el estudio de la especie *Haslea spicula* como fuente alternativa y natural de lípidos, en especial ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs), y, para ello, este objetivo principal se divide en los siguientes subobjetivos:

- Estudio del crecimiento de *Haslea spicula* en diferentes medios de cultivo.
- Estudio de la influencia de la luz sobre el crecimiento de *Haslea spicula*.
- Estudio del crecimiento de *Haslea spicula* bajo diferentes condiciones metabólicas.
- Estudio del crecimiento de *Haslea spicula* en un biorreactor.
- Estudio del perfil lipídico de *Haslea spicula* en diferentes condiciones de crecimiento.

4- Materiales y métodos

4.1- Materiales

La especie *Haslea spicula* que fue utilizada en este estudio fue aislada de una muestra procedente de una tierra de cultivo de Burgos. Su identificación había sido llevada a cabo previamente por comparación de la secuencia de su 18S RNA ribosomal con otras disponibles en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todos los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados mediante autoclave o por filtración y los cultivos fueron realizados en condiciones asépticas con material esterilizado y en campana. Asimismo, los disolventes utilizados en la determinación analítica poseían grado UPLC-MS.

4.2- Estudio del crecimiento: cultivo de *Haslea spicula*

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo fueron el medio 539 (medio BG-11 modificado) y agua de mar (NSW) diluida 1:7, cuyas composiciones se encuentran en el Anexo II ("UTEX Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin," n.d.). Todos los medios fueron preparados, esterilizados 20 minutos en autoclave a 120 °C y 1,1 Kg de presión y, tras su enfriamiento, se les añadió la solución de nutrientes de Guillard F/2 (Guillard & Ryther, 1962) (20 mL por cada 1 L). Una vez sembrado el inóculo, se añadió silicato de sodio al 3,7 % (1 µL por cada 1 mL de medio de cultivo).

Asimismo, la irradiancia fue variada cuando fueron cultivadas en medio 539, sometiéndolas a irradiancias de 8, 40 y 190 µmol quanta/(m²s). Otras variaciones en medio 539 a las que *Haslea spicula* fue sometida se enumeran a continuación:

- eliminar el aporte de nitrógeno como sal de nitrato
- añadir acetato sódico en concentración 10 g/L
- añadir glicerol en concentración 1 g/L
- añadir glucosa en concentración 5 g/L

Los experimentos fueron realizados en placas Petri desechables e incubadas en una cámara de cultivo (MMM FRIOCELL) (Figura 5), donde se puede controlar la temperatura y la luz. Los volúmenes con los que se trabajó en placa fueron de 10 mL totales, siendo 8 mL del medio de cultivo y 2 mL de inóculo. Además, para el medio 539 también se realizó el estudio del crecimiento en 20 mL totales, siendo 18 mL del medio y 2 mL del inóculo.



Figura 5. Cámara de cultivo MMM FRIOCELL.

Por último, se realizó el experimento de llevar a cabo el crecimiento en un biorreactor (Figura 6) de capacidad 2,5 L para simular las condiciones industriales de producción y comprobar si es factible. En este caso, se realizó el cultivo de *Haslea spicula* en un

volumen total de 2 L, siendo 1,7 L de medio NSW (1:7) y 300 mL de inoculo, y a 190 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ de irradiancia. Y, a la vista de los resultados favorables obtenidos en placa, se decidió adicionar glicerol (1 g/L) como aporte de carbono para el cultivo mixotrófico.



Figura 6. Cultivo de *Haslea spicula* en biorreactor.

4.3- Tasa de crecimiento: cámara de Neubauer

El seguimiento del crecimiento de *Haslea spicula* se realizó utilizando la cámara de Neubauer, instrumento que permite realizar el recuento de células en medio líquido. Como se puede observar en la Figura 7, la cámara de Neubauer posee unos surcos en forma de H y en el centro posee dos zonas deprimidas en cuyo fondo se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas.

La cámara de Neubauer (modelo Blau Brand, Alemania) que fue utilizada en el presente trabajo posee una cuadrícula central arriba y otra abajo, ambas divididas en 4x4 cuadrados grandes, los cuales se encuentran divididos a su vez en cuadrados más pequeños, es decir, un cuadrado grande se encuentra dividido en 4x4 cuadrados pequeños de dimensiones $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ y profundidad 0,1 mm. Además, los cuadrados grandes se encuentran separados por un cuadrado pequeño y si se cuentan el total de cuadrados pequeños, se obtienen 400 cuadrados pequeños (Figura 7), lo cual da un volumen de 10^{-4} mL .

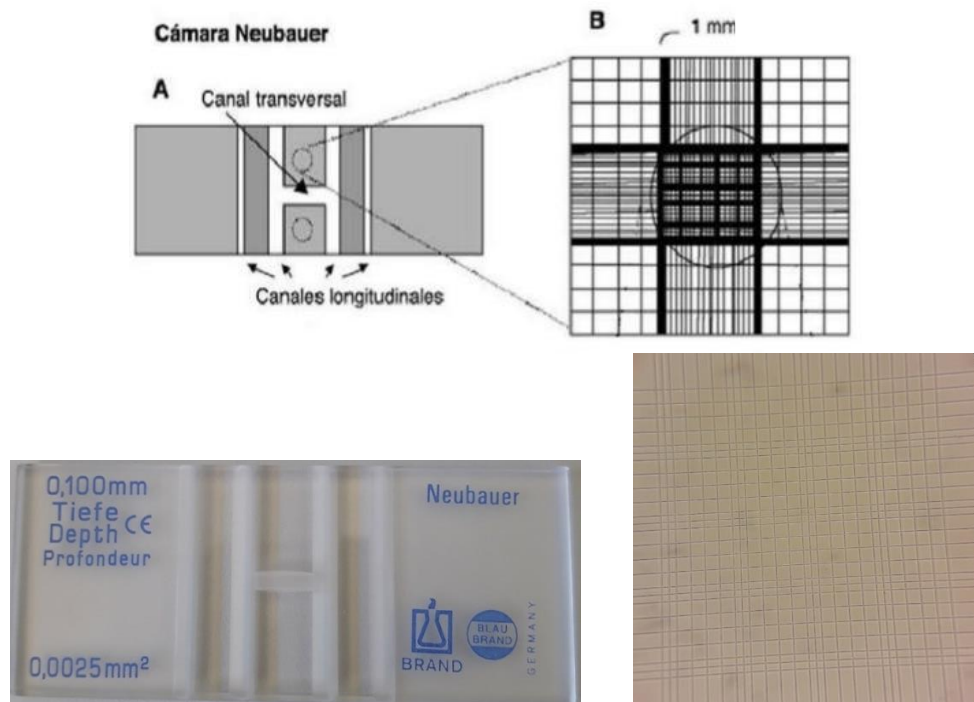


Figura 7. Cámara de Neubauer y su cuadrícula observada al microscopio con un aumento 10x.

Para proceder al recuento, se cubre la H con un cubreobjetos y se carga la muestra por uno de los canales longitudinales de la H con una micropipeta. A continuación, se observa al microscopio (MOTIC TYPE101M) con un aumento de 20x la cuadrícula y se cuenta el número de células observadas en las cuadrículas centrales de arriba y abajo. La muestra que se toma de cada cultivo es de 300 μL y se añaden 10 μL de paraformaldehído para inmovilizar las células y facilitar el recuento. Como el volumen total de la cuadrícula contada es de 10^{-4} mL, el cálculo de la densidad celular se puede expresar de la siguiente forma:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{células contadas}}{10^{-4} \text{ mL}} * f_{\text{dilución}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la densidad de células/mL.

4.4- Medida de la luz: Radiómetro

La irradiancia se define como la densidad de potencia de la radiación incidente sobre una superficie, es decir, es el cociente entre el flujo radiante incidente sobre la superficie y el área de esa superficie o la velocidad a la que la energía radiante incide sobre una superficie por unidad de área de esa superficie. En el Sistema Internacional de medidas se expresa en W/m^2 .

La medida de esta fue realizada mediante un radiómetro portátil de la marca comercial Hansatech (Figura 8), el cual da la irradiancia en unidades de $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.



Figura 8. Radiómetro.

4.5- Extracción de lípidos totales: método cloroformo/metanol

La extracción de Bligh and Dyer es un método estándar de determinación de lípidos totales propuesto en 1959 (Bligh, E.G. and Dyer, 1959), en el cual se utilizan como disolventes metanol y cloroformo. Este método se basa en la homogeneización de la muestra con metanol y cloroformo en proporciones tales que forman una sola fase mezclándose con el agua propia de la muestra y que, al adicionar posteriormente alícuotas de cloroformo y agua, se produzca la separación de fases (Figura 9). En el presente trabajo, fue utilizado como disolvente diclorometano en lugar de cloroformo, con propiedades disolventes similares, y, a continuación, se enumeran los pasos que fueron realizados:

1. En un tubo eppendorf fueron introducidos 1,8 mL de cultivo y 100 μL de cloruro sódico al 0,9 % para ayudar a la precipitación de lípidos. Esto fue realizado por duplicado.
2. El tubo eppendorf fue centrifugado durante 15 minutos a 12.838 g.
3. El sobrenadante fue retirado.
4. 280 μL de diclorometano:metanol (1:2) fueron añadidos en uno de los tubos eppendorf y se traspasó el contenido de este tubo al duplicado, por lo que en este paso reducimos a un tubo eppendorf. Y se agitó en un agitador para mezclar bien.
5. 94 μL de agua mili-Q fueron añadidos al tubo eppendorf y, a continuación, este fue agitado en un agitador.

6. 94 μL de diclorometano fueron añadidos al tubo eppendorf y, a continuación, este fue agitado en un agitador.
7. El tubo eppendorf fue centrifugado durante 10 minutos a 12.838 g.
8. La parte orgánica fue recogida en otro tubo eppendorf.
9. A la parte acuosa se le añadió 150 μL de diclorometano, se agitó en el agitador y se centrifugó durante 10 minutos a 12.838 g.
10. La nueva parte orgánica se recogió y juntó con la anterior.

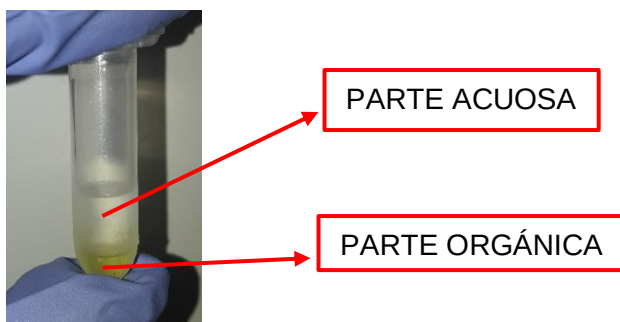


Figura 9. Sistema bifásico de la extracción de lípidos según el método de Bligh and Dyer.

4.6- Cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS-QTOF)

La cromatografía es un método analítico de separación que se basa en las diferentes interacciones de los analitos de una muestra con una fase estacionaria y una fase móvil. En este caso, la fase estacionaria se encuentra retenida en el interior de una columna y la fase móvil es una mezcla de disolventes líquidos, la cual se bombea a altas presiones a través de la columna. En este caso, la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) utiliza presiones muy elevadas de bombeo, del orden de MPa, dando lugar a una reducción del tiempo de análisis y a cromatogramas con una alta resolución. Y debido a que este método analítico sólo se encarga de la separación de compuestos, se hace necesario acoplar esta técnica a otra que permita detectar dichos compuestos. El detector acoplado en este caso es un espectrómetro de masas (MS), el cual es capaz de detectar compuestos a nivel de trazas con una resolución 20.000, y, además, es posible identificar los compuestos que se detectan a partir de los datos de la relación masa/carga y fragmentaciones controladas de la molécula, lo que hace que en su conjunto la UPLC-MS sea una técnica de análisis muy completa y potente.



Figura 10. Equipo UPLC-MS.

El extracto orgánico fue dividido en dos fracciones iguales y ambas fueron evaporadas. Una de las fracciones fue resuspendida en Acetona:Isopropanol:Etanol (1:1:1) para el análisis de triglicéridos (TAGs) y la otra en Metanol:Agua mili-Q (9:1) para el análisis de glicerolípidos más polares (GLs). Ambos análisis fueron realizados mediante UPLC-ESI-MS-QTOF y los métodos de análisis empleados tanto para TAGs como para GLs se encuentra en el Anexo III. El equipo que fue utilizado (Figura 10) para la cromatografía líquida (UPLC) es un Acquity™ UPLC System (WATERS, Manchester, UK) equipado con un inyector automático (Sample Manager) y una bomba binaria (Binary Solvent Manager). El cromatógrafo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas SYNAPT G2 HDMS (WATERS, Manchester, UK), el cual posee un analizador cuantitativo de tiempo de vuelo (QTOF) y una fuente de ionización por electrospray (ESI).

5- Resultados y discusión

5.1- Crecimiento de *Haslea spicula* en diferentes medios de cultivo

A continuación, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas para el medio de cultivo 539 (medio BG-11 modificado) y NSW (1:7) en modo “batch” y con iluminación continua (Figura 11 y Figura 12). A la vista de los resultados, se puede asumir que a corto plazo los medios no influyen de manera significativa sobre el crecimiento de *Haslea spicula* y la máxima densidad celular que se puede conseguir en placa es de aproximadamente 3×10^5 cél/mL. Se decidió utilizar el medio 539 para los estudios del efecto de la irradiancia y de ciertos aditivos (nitrato sódico, glucosa, glicerol y acetato sódico) y el medio NSW (1:7) para el experimento del biorreactor, ya que es un medio más barato y sencillo.

Como fue mencionado en la introducción, el ciclo celular de las diatomeas no sigue el típico en forma de “S”, como sería el caso de las levaduras, y se puede apreciar en las Figura 11 que el crecimiento de *Haslea spicula* sigue una fase de crecimiento masivo (bloom) que se intercala con una fase de decaimiento (bust) (Huysman et al., 2014). Poco es sabido acerca de los mecanismos que controlan dicho ciclo celular y recientes estudios se caracterizan por intentar un control sobre este mediante fotoperiodos de luz y oscuridad, mediante la adición/déficit de nutrientes y adicionando feromonas para inducir la reproducción sexual. Sin embargo, poco es el éxito que se ha conseguido intentando controlarlo y los resultados demuestran que las diatomeas poseen una serie de mecanismos de adaptación aún no totalmente conocidos, debido a lo cual se pueden encontrar en multitud de hábitats (Bondoc et al., 2019).

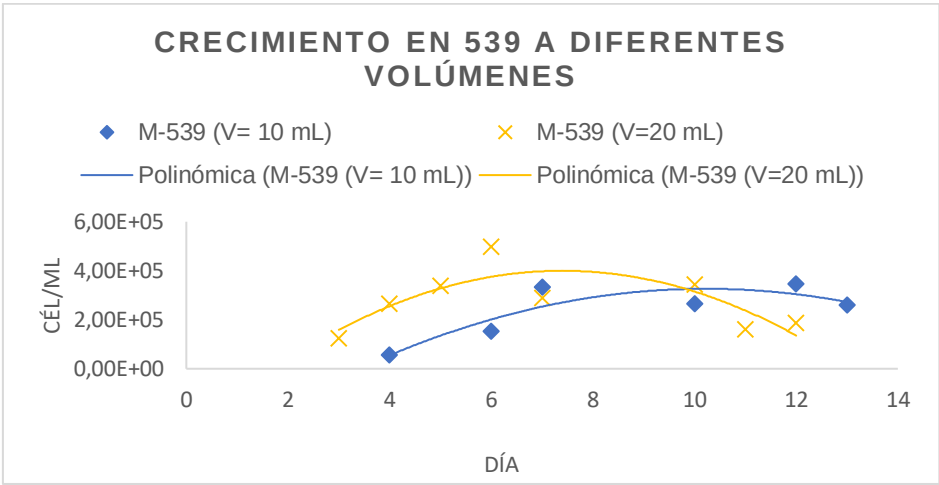


Figura 11. Curva de crecimiento para el medio 539 a los volúmenes totales 10 y 20 mL. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $8 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.

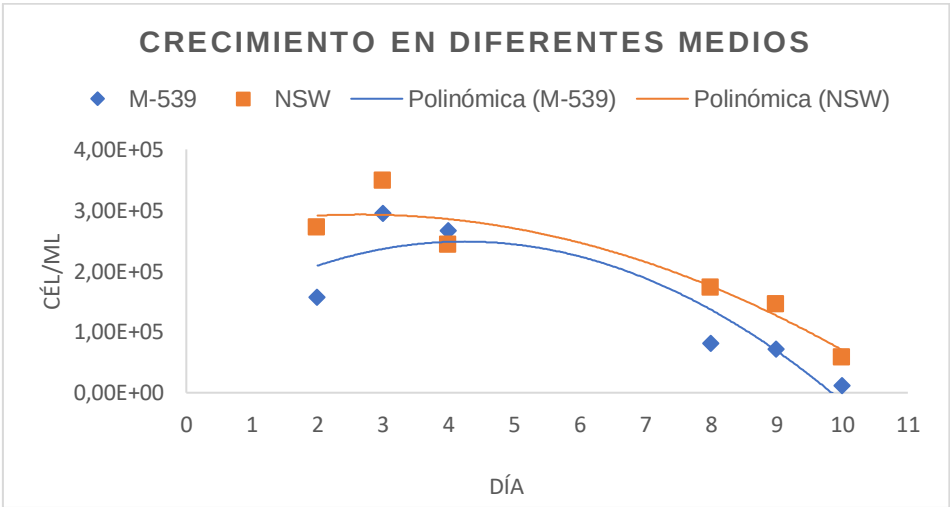


Figura 12. Curva de crecimiento para los medios 539 y NSW (1:7) al volumen total de 10 mL. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $40 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.

5.2- Cultivo de *Haslea spicula* a diferentes irradiancias

A continuación, se muestra los resultados obtenidos para el cultivo de *Haslea spicula* en medio 539 y a las irradiancias de 8, 40 y 190 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ (Figura 13).

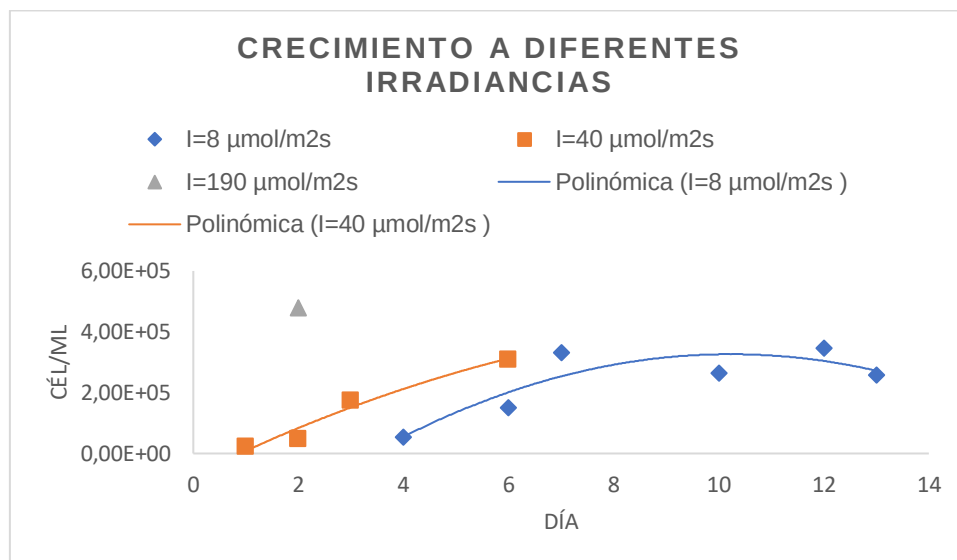


Figura 13. Curvas de crecimiento para el cultivo de *Haslea spicula* en medio 539 (volumen total de 10 mL, siendo 8 del medio y 2 del inoculo) a las irradiancias de 8, 40 y 190 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado.

A la vista de los resultados, se puede asumir que altas irradiancias no favorecen el crecimiento excepto los primeros días, pudiendo ser que las altas irradiancias favorezcan la fase bloom del ciclo celular de las diatomeas. Se puede observar que tanto para 8 como para 40 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ se alcanza una densidad máxima celular de 3×10^5 células/mL, pero para 40 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ se alcanza este máximo en un menor tiempo. Además, y aunque sólo se tiene una medida de la densidad celular, para una mayor irradiancia, 190 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$, se observa un crecimiento muy rápido. Esto lleva a pensar que quizá este crecimiento tan rápido lleva al agotamiento de los nutrientes, por lo que no pueden continuar con su crecimiento.

La variabilidad de la luz es un factor que afecta directamente a la fotosíntesis y, por consiguiente, a la fijación del carbono y su alojamiento en diferentes tipos de macromoléculas (Gacheva & Gigova, 2014). También afecta a la distribución de las diatomeas en el medio. Además, las diatomeas poseen mecanismos de fotoaclimatación, es decir, cuando se da un cambio en la luz, son capaces de responder de manera flexible ajustando el equilibrio entre el metabolismo y la excitación producida por la luz. Este proceso de fotoprotección puede actuar de varias maneras, o bien disipando el exceso energético en forma de calor, o bien ajustando la energía de excitación entre los fotosistemas (Perkins, Williamson, Lavaud, Mouget, & Campbell, 2018). Además, en la diatomea *Haslea ostrearia*, se ha encontrado que la

luz es un condicionante para que se dé la reproducción sexual y, en cierto modo, controla la auxosporulación (Mouget, Gastineau, Davidovich, Gaudin, & Davidovich, 2009).

5.3- Crecimiento de *Haslea spicula* bajo diferentes condiciones metabólicas (fototrófico y heterotrófico)

La finalidad de estos experimentos es encontrar alguna condición que favorezca el crecimiento de *Haslea spicula* para aumentar su rendimiento minimizando costes y favoreciendo su aplicación industrial. Así pues, siguiendo el reciente estudio sobre la producción mixotrófica de PUFAs en la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Menegol et al., 2019), en el cual al añadir glucosa en concentración 5 g/L o glicerol en concentración 1 g/L obtenían mejores rendimientos de la biomasa que los que se conseguirían en cultivo fotoautotrófico, se decidió estudiar este efecto sobre *Haslea spicula*. Además, en el mismo estudio (Menegol et al., 2019), también se añadía acetato sódico en concentración 10 g/L y, aunque no obtenían un resultado mejor que en cultivo fotoautotrófico, en el presente estudio se decidió estudiar su efecto sobre *Haslea spicula*.

En primer lugar, cuando se adicionó acetato sódico (10 g/L) no se observó crecimiento alguno en un periodo de cuatro días, por lo que se concluyó que no es una buena condición de crecimiento para *Haslea spicula*.

En el caso de la adición de glucosa (5 g/L), se apreció un crecimiento excesivo de bacterias, aunque también se apreció un cierto desarrollo de *Haslea spicula* (Figura 14).

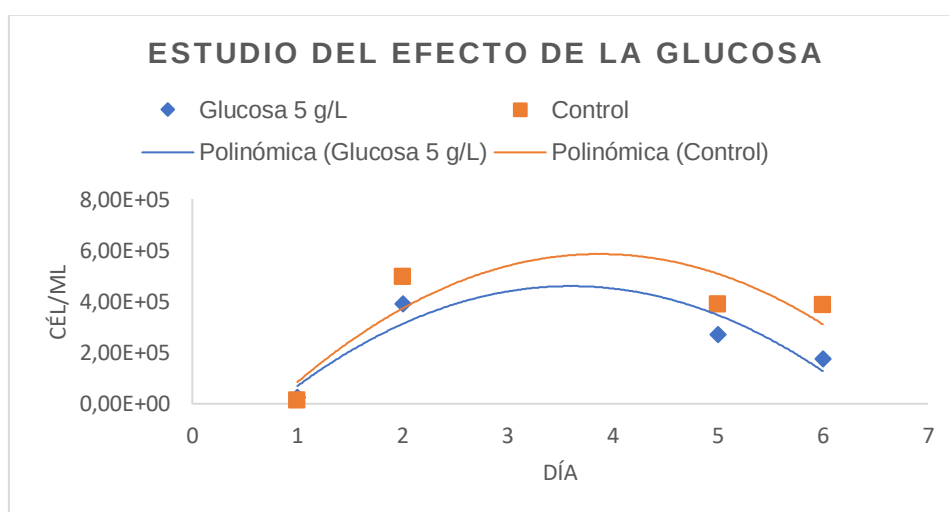


Figura 14. Efecto de la adición de Glucosa (5 g/L) sobre el crecimiento de *Haslea spicula*. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de 8 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.

Como se puede observar en la Figura 14, el crecimiento de *Haslea spicula* fue menor en el medio con glucosa que en el medio sin glucosa (control). Además, la población de bacterias llega a superar a la de *Haslea spicula*, pudiéndose observar cómo esta queda atrapada en el mucilago bacteriano y, quizás, al verse reducida su movilidad, la diatomea se halla en desventaja ya que ambas compiten por los nutrientes y el espacio.

Sin embargo, recientemente Fabrizio Di Caprio et al. (Di Caprio, Altimari, Iaquaniello, Toro, & Pagnanelli, 2019) han desarrollado una estrategia de cultivo heterotrófico para *Tetrademus obliquus* en la que mediante el suministro desacoplado periódico de nitrato y glucosa estos investigadores consiguieron reducir la población bacteriana. Quizás una estrategia de este tipo pueda ser beneficiosa en este caso y más investigación debería ser realizada.

En cuanto a la adición de glicerol (1 g/L), como se puede apreciar en la Figura 15, se da un mayor crecimiento de *Haslea spicula* en el cultivo con glicerol que sin glicerol (control), o al menos un crecimiento sostenido durante mayor tiempo.

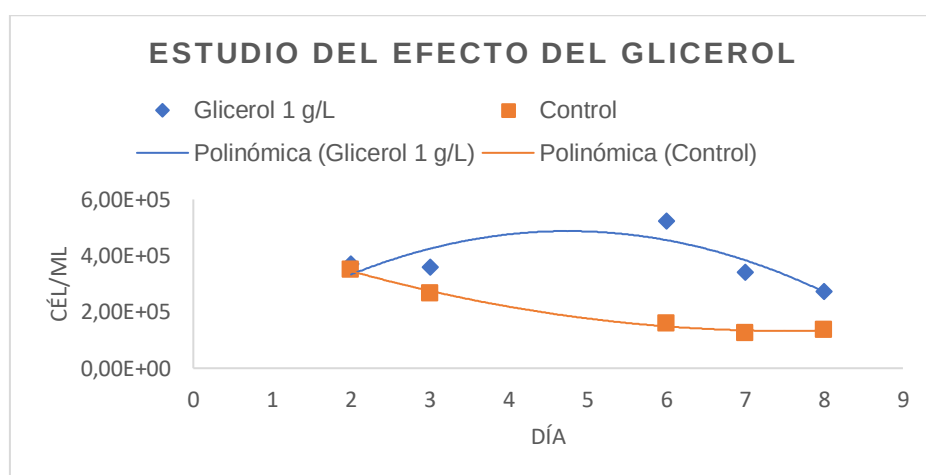


Figura 15. Efecto de la adición de Glicerol (1 g/L) sobre el crecimiento de *Haslea spicula*. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $40 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.

Aunque se pudo apreciar el crecimiento de bacterias, este no fue tan elevado como en el caso de la glucosa, ya que hasta el cuarto día no comenzó a ser evidente. Además, se puede observar en la Figura 15 que el glicerol aumenta el crecimiento de *Haslea spicula* de manera considerable con respecto al crecimiento en medio sin suplemento de glicerol, por lo que añadir glicerol como fuente alternativa o complementaria de carbono al CO_2 es una buena condición de crecimiento (crecimiento mixotrófico).

Asimismo, se realizó la experiencia de filtrar el cultivo de glicerol para eliminar las bacterias y las diatomeas se sembraron en medio 539 sin glicerol. No se apreciaron bacterias en este cultivo sembrado y, además, el quinto día alcanzó una densidad

celular de 4×10^5 cél/mL. Quizá una estrategia de este tipo puede resultar útil a niveles industriales.

Finalmente, también se estudió el cultivo en medio 539 sin nitrato sódico, el cual no favorece un aumento del crecimiento, ya que, como se puede observar en la Figura 16, se produce un decaimiento progresivo del crecimiento de *Haslea spicula*. Aunque también se puede observar que el crecimiento en el medio con suplemento de nitrato sódico decae, existe durante los primeros días una pequeña fase de bloom inapreciable en el medio sin suplemento de nitrato.

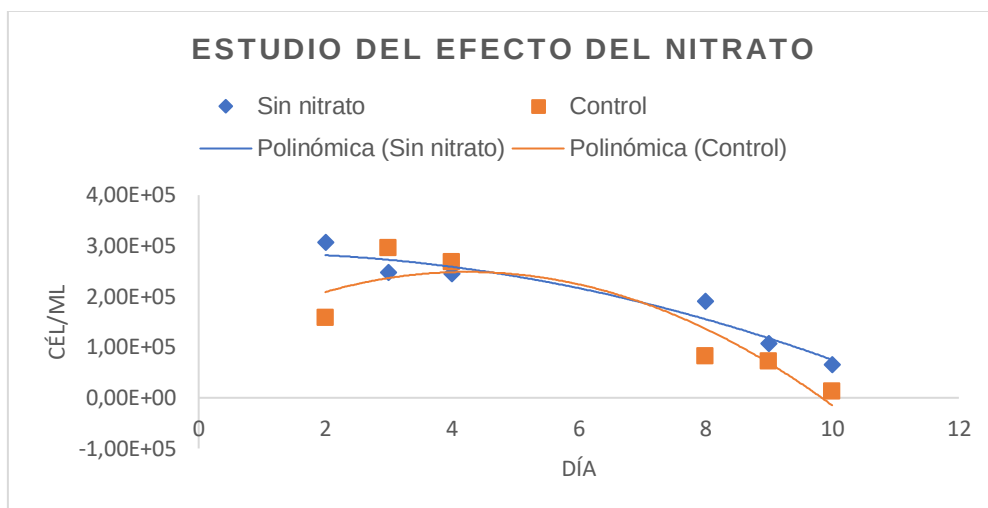


Figura 16. Efecto del cultivo en medio 539 sin nitrato sobre el crecimiento de *Haslea spicula*. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $40 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.

5.4- Crecimiento de *Haslea spicula* en biorreactor

Se realizó el crecimiento de *Haslea spicula* en un mayor volumen de medio en un biorreactor. El cultivo fue realizado en modo batch en un volumen total de 2 L de NSW (1:7) a una irradiancia de $190 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ y este experimento se repitió por triplicado (biorreactor 1, 2 y 3). A continuación, en la Figura 17 se muestra el seguimiento del crecimiento en cada biorreactor y, al igual que en placa, se puede observar que el ciclo celular de *Haslea spicula* se caracteriza por poseer fases denominadas bloom intercaladas por fases denominadas bust (Huysman et al., 2014). La densidad celular máxima que fue capaz de alcanzar en estas condiciones es de aproximadamente 1×10^6 cél/mL, mayor que en placa.

Quizás lo más interesante se da en el biorreactor 2, ya que, a la vista de lo obtenido en el experimento en placa con la adición de glicerol, se decidió añadir al biorreactor también glicerol en concentración 1 g/L a partir del décimo día y se bajó la irradiancia a $8 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\text{s}$ consiguiendo mantener durante un determinado periodo de tiempo

la densidad celular constante, lo cual sería tremendamente beneficioso a nivel industrial.

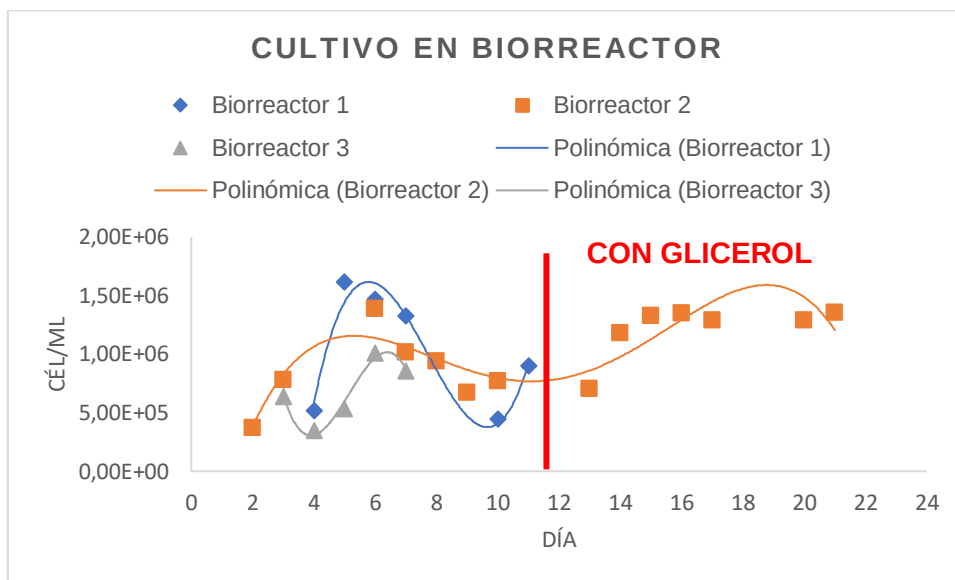


Figura 17. Resultados del cultivo de *Haslea spicula* en biorreactor en modo batch con iluminación continua. En el experimento 3 (biorreactor 2) se añadió glicerol y nutrientes F/2 al comienzo de la fase bust sin renovación completa del medio de cultivo.

5.5- Perfil lipídico: contenido de ácidos grasos de interés

Debido a la gran cantidad de muestras y, por consiguiente, de datos obtenidos, sólo se discutirán aquellos que son de interés a la vista de los resultados obtenidos en los estudios del crecimiento de *Haslea spicula*. La toma de muestra se realizó cuando se comenzó a observar el decaimiento de la población, es decir, al comienzo de la fase bust.

A continuación, en la Tabla 2 se muestran los porcentajes relativos de triacilglicéridos obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS. Se identificaron un total de 33 triacilglicéridos (TAGs) y 3 diacilglicéridos (DAGs), de los cuales 7 TAGs poseen al menos una cadena de EPA (C20:5), DHA (C22:6) o ARA (C20:4). En la Figura 18 se pueden observar los cromatogramas para los TAGs que poseen EPA o DHA. Los triacilglicéridos metabolizados mayoritariamente por *Haslea spicula* son: TAG (16:0/16:0/18:1), TAG (14:0/16:1/18:2), TAG (16:0/16:1/16:1) y TAG (16:0/16:0/16:1). Lo cual es razonable, ya que los ácidos grasos predominantes en las diatomeas son C14:0, C16:0, C16:1 y C20:5 (Zulu et al., 2018). Se puede observar que el ácido graso C20:5 (EPA) no se encuentra entre los TAGs más mayoritarios, pero se encuentra en una proporción importante. Además, en comparación con los ácidos grasos C20:4 (ARA) y C22:6 (DHA), el EPA es el que más abunda (Figura 19).

Tabla 2. Porcentajes relativos al contenido total de triacilglicéridos (TAG) y diacilglicéridos (DAG) obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS. Se muestran los valores medios, ya que se realizó por triplicado. Los TAGs señalados con un asterisco son aquellos que poseen algún ácido graso de interés (EPA, DHA y/o ARA).

Especie más probable	PLACA (I=40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)				BIORREACTOR	
	Con Glicerol	Sin Nitrato	539	NSW	NSW	Con Glicerol
DAG (32:2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DAG (32:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DAG (32:0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (52:10)	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
TAG (16:1/16:1/16:1-OH)	0,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (52:9)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
TAG (54:10)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
TAG (56:11)	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
TAG (48:6)	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (58:12)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (50:7) Probable que tenga un C 18:4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*TAG (12:0/20:3/20:5)	0,5	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
*TAG (54:9)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (16:0/16:0/18:1)	17,3	23,6	24,5	22,8	22,6	97,8
TAG (14:0/16:1/18:4)	0,8	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0
*TAG (22:5/20:5/14:0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (14:0/18:2/18:4)	1,3	0,5	0,2	0,5	0,6	0,0
*TAG (16:1/16:1/20:5)	3,1	2,4	2,3	2,7	2,4	0,0
TAG (14:0/14:1/18:2)	1,5	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
*TAG (22:6/16:1/16:1) / (22:6/16:0/16:2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (16:1/16:1/16:2)	0,9	0,1	0,3	0,2	0,8	0,0
TAG (16:1/16:1/18:3)	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,0
*TAG (16:0/16:1/20:5)	2,7	3,6	3,2	2,9	3,7	0,0
TAG (14:0/14:0/16:1)	1,6	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
TAG (14:0/16:1/16:1)	9,6	3,2	2,7	3,2	4,9	0,5
TAG (14:0/16:1/18:2)	14,7	13,7	11,5	14,3	13,4	0,4
TAG (16:0/16:1/17:2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TAG (16:0/16:1/18:3)	0,5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0
TAG (14:0/14:0/17:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
*TAG (16:0/16:1/20:4)	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,0
TAG (14:0/16:0/16:1)	7,4	3,7	3,0	3,7	4,7	0,1
TAG (16:0/16:1/16:1)	24,7	29,3	30,2	33,3	22,3	1,0
TAG (15:0/16:1/16:1)	0,5	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0
TAG (15:0/16:0/16:1) / (13:0/16:0/18:1)	0,4	0,2	0,2	0,1	0,5	0,0
TAG (16:0/16:0/16:1)	10,2	18,3	20,5	15,1	21,5	0,2
TAG (16:0/16:0/18:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

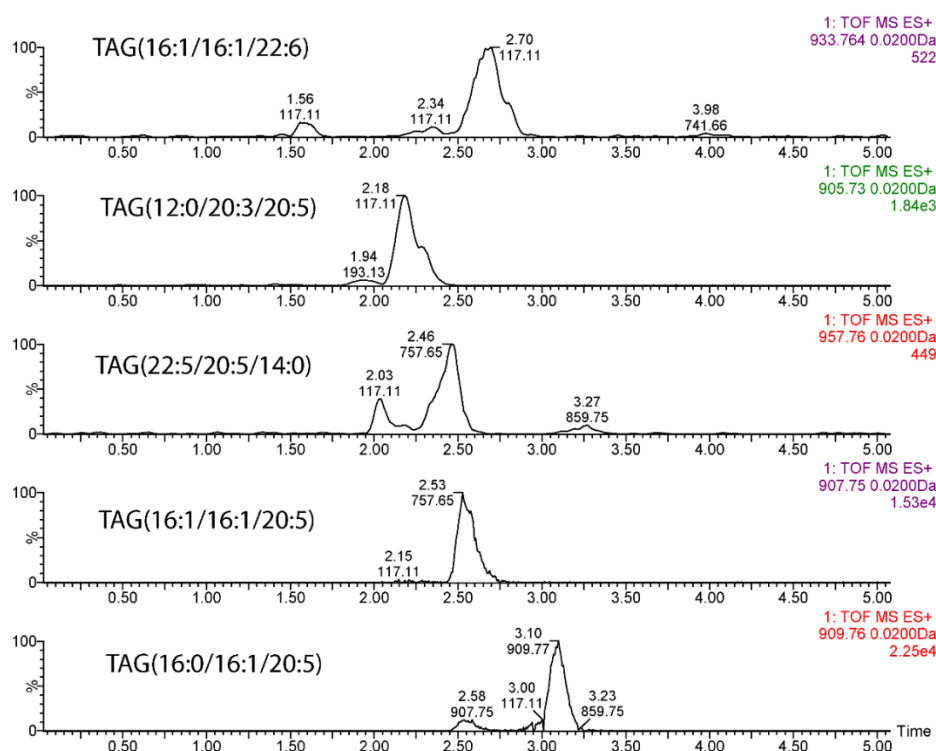


Figura 18. Picos cromatográficos específicos para los m/z 933,76, 905,73, 957,76, 907,75 y 909,76; que corresponden a los principales TAGs que contienen EPA (C20:5) o DHA (C22:6).

A grandes rasgos, no se observan diferencias marcadas entre los cultivos en placa en medio 539 y NSW ni entre el medio 539 con y sin aporte de nitrato. En el estudio de los efectos de la fuente de nitrógeno y la irradiancia sobre *Porphyridium cruentum* (Sánchez-Saavedra et al., 2018) encontraron que la combinación de una baja irradiancia ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) junto con la eliminación del nitrato del medio estimula la producción lipídica incrementando su valor nutricional. Y este efecto se puede observar en *Haslea spicula* en los TAG (16:1/16:1/20:5) y TAG (16:0/16:1/20:5) que aumentan su proporción levemente en el cultivo sin aporte de nitrato (Figura 19).

La mayor diferencia que se puede apreciar es en el cultivo con suplemento de glicerol, es decir, añadir glicerol al medio de cultivo no sólo influye en el crecimiento, sino que también en la clase de triacilglicéridos que metaboliza la diatomea estudiada. Y se puede observar que esta diferencia es más remarcada en el cultivo en biorreactor donde se puede observar que el TAG (16:0/16:0/18:1) predomina sobre los demás. De hecho, en el cultivo con glicerol del biorreactor no se aprecia que posea TAGs con EPA, DHA y/o ARA (Figura 20). Este hecho lleva a la conclusión de que, aunque se consiga en el biorreactor mantener la densidad celular aportando glicerol al medio de cultivo, esta condición no es buena, ya que no se consiguen producir los PUFAs beneficiosos para la salud (EPA, DHA y/o ARA).

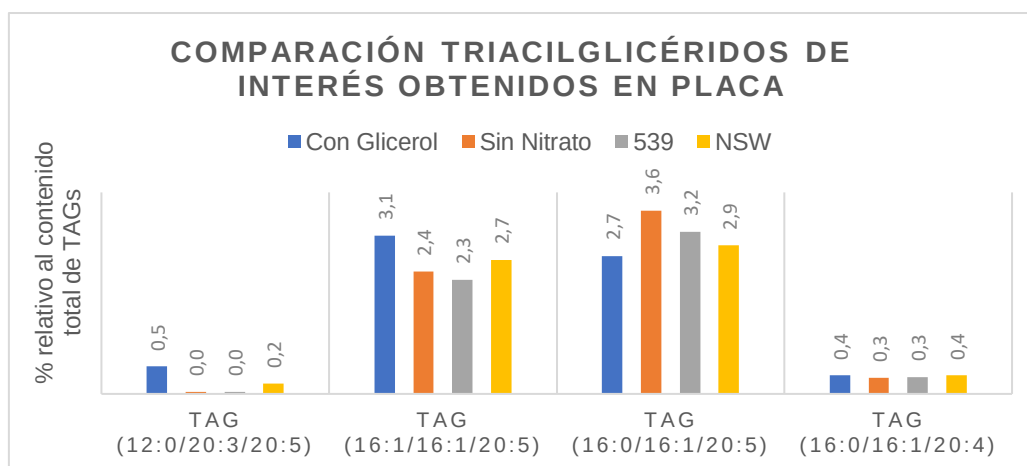


Figura 19. Comparación entre triacilglicéridos (TAGs) que poseen los ácidos grasos C20:5 (EPA) y C20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de *Haslea spicula* en placa.

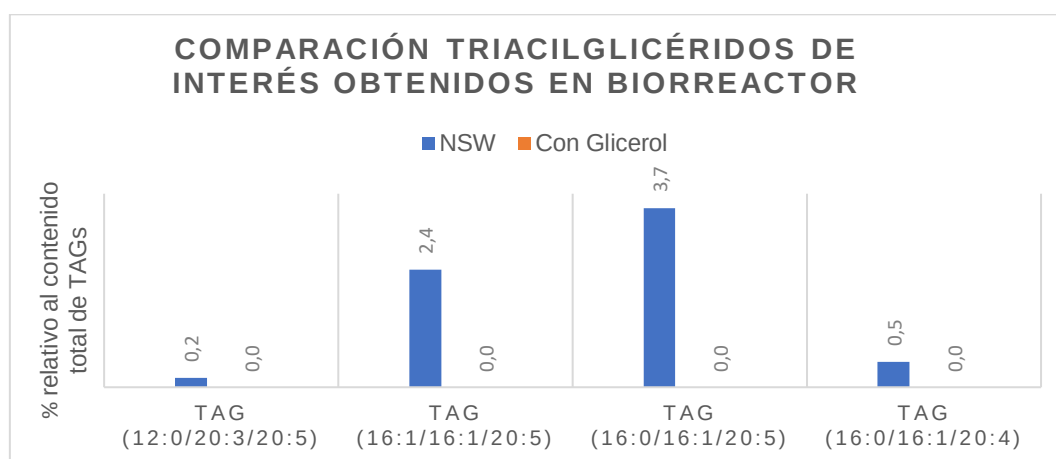


Figura 20. Comparación entre triacilglicéridos (TAGs) que poseen los ácidos grasos C20:5 (EPA) y C20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de *Haslea spicula* en biorreactor.

Y estas diferencias entre los cultivos con y sin glicerol se pueden observar en la Figura 21 donde el TAG (14:0/16:1/18:2) y el TAG (16:0/16:0/16:1) no aparecen en el cromatograma del cultivo con glicerol.

A continuación, en la Tabla 3 se muestran los porcentajes relativos obtenidos en el análisis de glicerolípidos polares (GLs) mediante UPLC-MS. Donde se muestra la identificación de 15 monogalactosil diacilgliceroles (MGDGs), 6 digalactosil diacilgliceroles (DGDGs), 5 sulfoquinovosildiacil glicerol (SQDG), 2 fosfatidildiacilgliceroles (PG) y 1 fosfatidiletanolamina (PE). Como se mencionó en la introducción, las estructuras predominantes son las del MGDG y DGDG (Christie, 2011), lo cual está en consonancia con lo obtenido, ya que se caracterizaron más especies con estas estructuras. Al contrario que para los TAGs, no fue identificada ninguna cadena de DHA perteneciente a algún GL, pero sí de EPA y ARA, habiendo más de estas en GLs que en TAGs. Y en total se identificaron 11 de estas especies que poseen al menos una cadena de EPA o ARA.

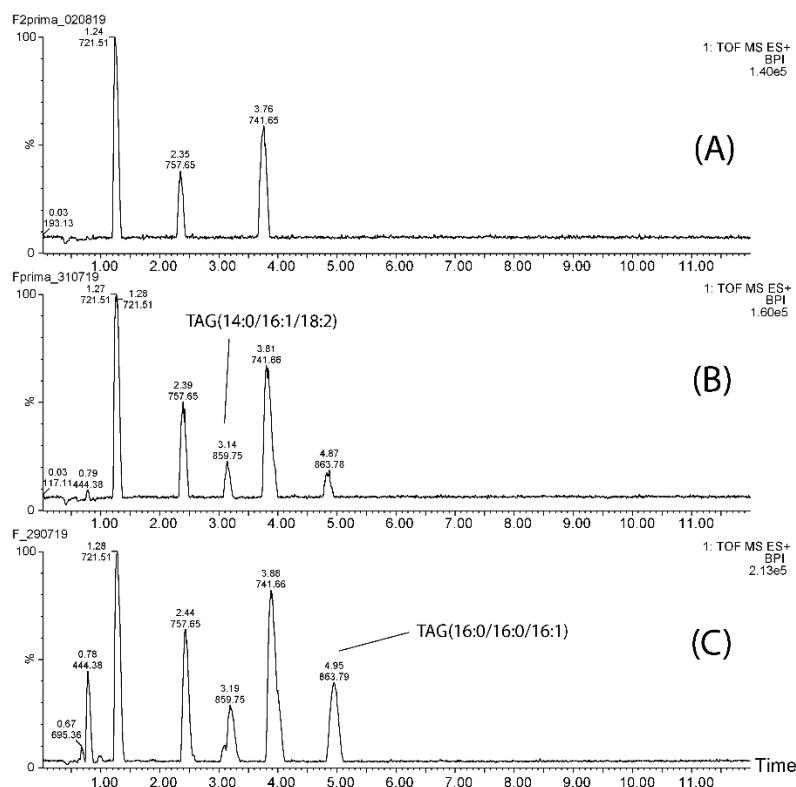


Figura 21. Cromatogramas del cultivo en biorreactor antes y después de añadir glicerol. A: con glicerol; B y C: sin glicerol.

En el caso de los MGDG se pueden observar diferencias entre los cultivos en placa y en biorreactor. Los mayoritarios en placa son el MGDG (16:4/20:5) y el MGDG (16:3/20:5)/(16:4/20:4). Sin embargo, en el biorreactor el contenido en MGDG (16:4/20:5) disminuye, aunque sigue contribuyendo de manera importante, y el MGDG (16:3/20:5)/(16:2/20:4) es el más abundante destacando sobre los demás. En ambos cultivos se puede observar que se obtienen buenos resultados de EPA (20:5) contenidos en los MGDG (16:1/20:5) y MGDG (16:2/20:5) (Figura 22 y Figura 23).

En cuanto a los DGDG, SQDG, PG y PE, no se observa tanta variabilidad entre muestras como en los MGDG. Así pues, los DGDG mayoritarios son el DGDG (16:1/20:5) y el DGDG (16:2/20:5), los cuales poseen EPA (20:5). En el caso de los SQDG, PG y PE llega a predominar una sola especie siendo los mayoritarios el SQDG (16:0/16:1), el PG (16:1/16:1) y la PE (16:0/16:0).

Tabla 3. Porcentajes relativos al contenido total de cada especie de glicerolípidos (GLs) obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS. Se muestran los valores medios, ya que se realizó por triplicado. Los GLs señalados con un asterisco poseen algún ácido graso de interés (EPA o ARA).

Especie más probable	PLACA (I=40 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$)				BIORREACTOR	
	Con Glicerol	Sin Nitrato	539	NSW	NSW	Con Glicerol
MGDG (18:4/16:1)	0,0	2,0	5,8	2,1	2,0	0,0
*MGDG (16:1/20:5)	3,7	7,0	5,4	6,6	14,0	12,0
*MGDG (16:1/20:4)	0,0	0,0	0,0	0,3	1,9	0,0
MGMG (16:1/0:0)	0,0	0,0	5,5	2,0	0,7	1,6
*MGDG (16:4/20:5)	45,8	40,1	35,4	39,5	8,5	5,7
*MGDG (16:3/20:5) / (16:4/20:4)	27,4	29,0	24,2	22,8	30,1	31,6
MGDG (16:1/16:4)	0,0	2,9	3,5	2,7	2,2	0,0
*MGDG (16:2/20:5)	6,0	5,7	4,4	5,6	7,8	4,5
MGDG (16:1/16:3) / (16:2/16:2)	3,7	3,8	3,7	2,6	6,5	7,0
MGDG (16:1/16:2)	6,0	0,6	0,0	2,8	4,7	3,2
MGDG (16:1/16:1)	7,5	7,3	6,3	10,1	16,6	10,6
MGDG (16:1/14:0)	0,0	0,0	0,7	0,6	2,4	9,6
MGDG (18:4/16:4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*MGDG (14:3/20:4)	0,0	1,5	3,0	2,2	1,3	0,0
MGDG (16:0/16:1)	0,0	0,0	1,9	0,0	1,2	14,3
*DGDG (16:1/20:5)	24,2	27,6	26,9	23,5	29,4	26,9
*DGDG (16:2/20:5)	46,4	46,3	43,1	45,7	46,3	65,6
DGDG (16:1/16:1)	7,4	12,0	18,0	16,2	19,3	7,5
DGDG (16:0/16:1)	0,0	2,3	2,9	4,3	2,0	0,0
*DGDG (16:4/20:5)	11,0	5,5	3,9	6,8	0,0	0,0
*DGDG (16:3/20:5)	11,0	6,3	5,3	3,5	2,9	0,0
SQMG (16:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SQMG (18:0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*SQDG (16:0/20:5)	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0
SQDG (16:0/16:1)	100,0	100,0	98,3	100,0	100,0	100,0
SQDG (18:3/18:0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PG (16:1/16:1)	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PG (18:1/18:1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PE (16:1/16:0)	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

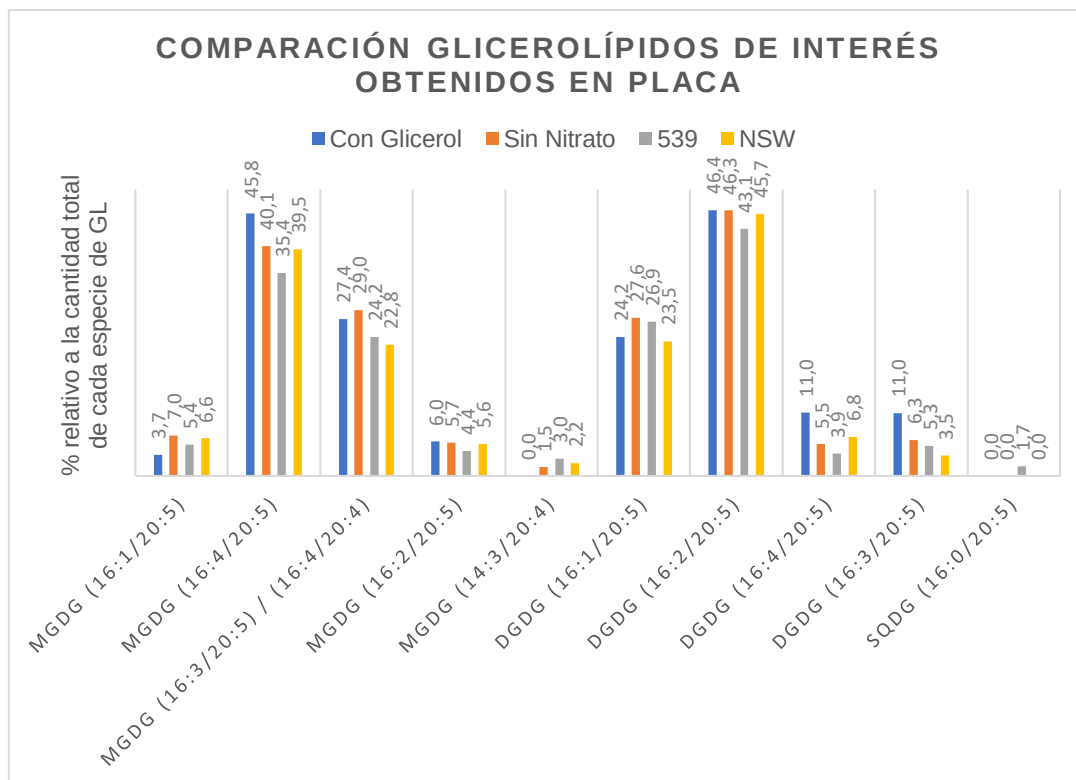


Figura 22. Comparación entre glicerolípidos (GLs) que poseen los ácidos grasos 20:5 (EPA) y 20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de *Haslea spicula* en placa.

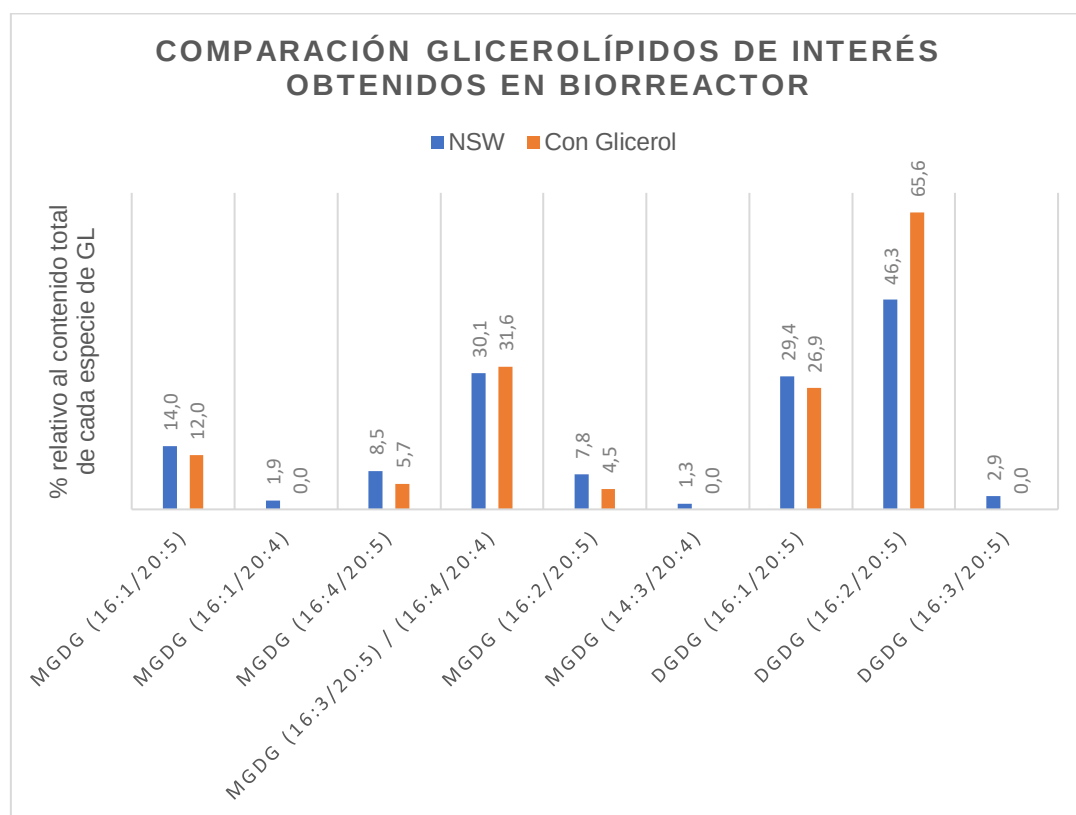


Figura 23. Comparación entre glicerolípidos (GLs) que poseen los ácidos grasos 20:5 (EPA) y 20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de *Haslea spicula* en biorreactor.

Si se comparan los cultivos con y sin aporte de nitrato, se observa que aumenta el contenido de los ácidos grasos de interés EPA y ARA, al igual que en el caso de los TAGs, habiéndose publicado un resultado similar para *Porphyridium cruentum* (Sánchez-Saavedra et al., 2018) (Figura 22). En el caso de comparar los cultivos con y sin suplemento de glicerol, tanto en placa como en el biorreactor, se observa que en unos GLs aumenta el contenido en el medio con glicerol, pero que en otros disminuye, obteniendo un contenido similar en EPA y ARA (Figura 22) para ambos cultivos. Por último, de manera similar, en los cultivos en 539 y NSW en placa se puede observar lo mismo que para el caso del glicerol, dando lugar a un contenido similar en EPA y ARA en ambos cultivos (Figura 22).

Como se ha podido observar, el ácido graso de interés mayoritario encontrado en *Haslea spicula* es el EPA. A continuación, se muestra en la Tabla 4 la cantidad de EPA en $\mu\text{g}/\text{biomasa}$ contenido en cada especie de glicerolípido, donde se puede observar que *Haslea spicula* contiene aproximadamente $30 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cél biomasa})$ de EPA y dependiendo de la condición de crecimiento esta aumenta o disminuye.

Tabla 4. Cantidad de EPA en unidades de $\mu\text{g}/(10^6 \text{ cél biomasa})$ contenido en cada especie de glicerolípido.

Especie	PLACA ($I=40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)				BIORREACTOR	
	Con Glicerol	Sin Nitrato	539	NSW	NSW	Con Glicerol
TAG (12:0/20:3/20:5)	0,09	0,01	0,01	0,04	0,04	0,00
TAG (22:5/20:5/14:0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TAG (16:1/16:1/20:5)	0,51	0,68	0,38	0,40	0,43	0,00
TAG (16:0/16:1/20:5)	0,45	1,01	0,54	0,44	0,66	0,00
MGDG (16:1/20:5)	0,95	2,30	1,10	2,61	3,06	0,62
MGDG (16:4/20:5)	12,09	14,35	7,30	15,86	1,87	0,30
MGDG (16:3/20:5)	7,32	10,07	4,96	9,17	6,60	1,73
MGDG (16:2/20:5)	1,63	2,08	0,90	2,24	1,70	0,29
DGDG (16:1/20:5)	1,15	2,83	2,08	2,94	1,34	0,28
DGDG (16:2/20:5)	2,22	4,73	3,35	5,78	2,10	0,48
DGDG (16:4/20:5)	0,52	0,57	0,33	0,87	0,00	0,00
DGDG (16:3/20:5)	0,52	0,64	0,41	0,41	0,13	0,00
SQDG (16:0/20:5)	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00

6- Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer del estudio llevado a cabo en el presente TFM son las siguientes:

- Los medios de cultivo 539 y NSW no muestran efectos diferenciables sobre el crecimiento de *Haslea spicula*.
- El crecimiento de *Haslea spicula* se caracteriza por poseer fases de bloom y bust intercaladas. La máxima densidad celular conseguida en placa es de aproximadamente 3×10^5 cél/mL y en biorreactor de 1×10^6 cél/mL.
- Altas irradiancias no aumentan el crecimiento, pero sí dan lugar a una fase de bloom en un menor tiempo llevando a un consumo acelerado de nutrientes.
- Añadir Glucosa o Acetato sódico no favorece el crecimiento de *Haslea spicula*.
- Eliminar el aporte de nitrato del medio no aumenta el crecimiento de *Haslea spicula*, pero sí aumenta el contenido en EPA y ARA por unidad de biomasa.
- Añadir Glicerol aumenta el crecimiento de *Haslea spicula* y permite mantener la densidad celular durante un determinado periodo de tiempo, pero disminuye el contenido en EPA y ARA por unidad de biomasa.
- Los lípidos mayoritarios que se pueden encontrar en *Haslea spicula* son: TAG (16:0/16:0/18:1), TAG (14:0/16:1/18:2), TAG (16:0/16:1/16:1), TAG (16:0/16:0/16:1), MGDG (16:4/20:5), MGDG (16:3/20:5)/(16:4/20:4), DGDG (16:1/20:5), DGDG (16:2/20:5), SQDG (16:0/16:1), PG (16:1/16:1) y PE (16:0/16:0).
- Los PUFAs de interés que se encontraron en el análisis lipídico de *Haslea spicula* fueron ARA, DHA y EPA, siendo este último el mayoritario.

Por lo tanto, el presente TFM aporta una primera aproximación a la aplicación biotecnológica de la diatomea *Haslea spicula* para la obtención de PUFAs como compuestos funcionales.

7- Agradecimientos

Quiero dar las gracias a Olimpio Montero y Marta Velasco por enseñarme y acompañarme en el proceso. Gracias por la oportunidad y hacer que mereciera la pena. A mi madre, Blanca, eterna luchadora que me ha dado el valor y el tesón para llegar hasta aquí y que me inspira cada día a superarme. Y a todas aquellas personas que han contribuido de forma directa o indirecta, que no necesitan ser nombradas pues ya saben quiénes son.

8- Bibliografía

- Bernaerts, T., Goiris, K., Gheysen, L., Goos, P., Van Loey, A., Foubert, I., & Lagae, N. (2018). Impact of *Nannochloropsis* sp. dosage form on the oxidative stability of n-3 LC-PUFA enriched tomato purees. *Food Chemistry*, 279, 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.026>
- Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bondoc, K. G. V., Lembke, C., Lang, S. N., Germerodt, S., Schuster, S., Vyverman, W., & Pohnert, G. (2019). Decision-making of the benthic diatom *Seminavis robusta* searching for inorganic nutrients and pheromones. *ISME Journal*, 13(2), 537–546. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0299-2>
- Christie, W. W. (2011). Mono- and Digalactosyldiacylglycerols and Related Lipids From Plants and Microorganisms. *Analysis*, 3, 1–8.
- Di Caprio, F., Altimari, P., Iaquaniello, G., Toro, L., & Pagnanelli, F. (2019). Heterotrophic cultivation of *T. obliquus* under non-axenic conditions by uncoupled supply of nitrogen and glucose. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.020>
- FAO. (2010). *Fats and fatty acids in human nutrition - Report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper 91, 2010* (Vol. 550). <https://doi.org/978-92-5-106733-8>
- Gacheva, G. V., & Gigova, L. G. (2014). Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Central European Journal of Biology*, 9(12), 1168–1181. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0350-x>
- Gammone, M. A., Riccioni, G., Parrinello, G., & D'orazio, N. (2019). Omega-3 polyunsaturated fatty acids: Benefits and endpoints in sport. *Nutrients*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu11010046>
- Gheysen, L., Bernaerts, T., Bruneel, C., Goiris, K., Van Durme, J., Van Loey, A., & Foubert, I. (2018). Impact of processing on n-3 LC-PUFA in model systems enriched with microalgae. *Food Chemistry*, 268, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.112>
- Guillard, R. L. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms: *Cyclotella nana*, *Hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve). *Journal of Microbiology*, 8, 229–239.
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679–684.

- <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>
- Herrero, M., Vicente, M. J., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2009). Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 119–130. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Huysman, M. J. J., Vyverman, W., & De Veylder, L. (2014). Molecular regulation of the diatom cell cycle. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2573–2584. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert387>
- Kocielek, J.P.; Balasubramanian, K.; Blanco, S.; Coste, M.; Ector, L.; Liu, Y.; Kulikovskiy, M.; Lundholm, N.; Ludwig, T.; Potapova, M.; Rimet, F.; Sabbe, K.; Sala, S.; Sar, E.; Taylor, J.; Van de Vijver, B.; Wetzel, C.E.; Williams, D.M.; Witkowski, A.; W, J. (n.d.). DiatomBase. *Haslea spicula* (Hickie) L.Bukhtiyarova, 1995. Retrieved July 3, 2019, from <http://www.diatombase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=661359>
- Kuczynska, P., Jemioła-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*, 13(9), 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
- Levering, J., Broddrick, J., & Zengler, K. (2015). Engineering of oleaginous organisms for lipid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.001>
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G. M. 2019. (n.d.). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retrieved July 3, 2019, from <http://www.algaebase.org>
- Matsuda, Y., Hopkinson, B. M., Nakajima, K., Dupont, C. L., & Tsuji, Y. (2017). Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO₂ sensing in marine diatoms: A gateway to carbon metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0403>
- Mejdandžić, M., Bosak, S., & Ljubešić, Z. (2017). Blue Diatoms: Global Phenomenon of “Greening” in Shellfish and Record of Planktonic *Haslea* Species in the South Adriatic Sea. *Naše More*, 64(1), 38–44. <https://doi.org/10.17818/nm/2017/1.7>
- Menegol, T., Romero-Villegas, G. I., López-Rodríguez, M., Navarro-López, E., López-Rosales, L., Chisti, Y., & Molina-Grima, E. (2019). Mixotrophic production of polyunsaturated fatty acids and carotenoids by the microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Applied Phycology*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01828-3>
- Mouget, J. L., Gastineau, R., Davidovich, O., Gaudin, P., & Davidovich, N. A. (2009). Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea*

- ostrearia*. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2), 194–201. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00700.x>
- Norambuena, F., Skrzypczyk, V. M., Bellgrove, A., Hermon, K. M., Keast, R., & Turchini, G. M. (2018). Is Australian seaweed worth eating? Nutritional and sensorial properties of wild-harvested Australian versus commercially available seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 709–724. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1530-2>
- Perkins, R., Williamson, C., Lavaud, J., Mouget, J. L., & Campbell, D. A. (2018). Time-dependent upregulation of electron transport with concomitant induction of regulated excitation dissipation in *Haslea* diatoms. *Photosynthesis Research*, 137(3), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0508-x>
- Rey, C., Delpech, J. C., Madore, C., Nadjar, A., Greenhalgh, A. D., Amadieu, C., & Joffre, C. (2019). Dietary n-3 long chain PUFA supplementation promotes a pro-resolving oxylipin profile in the brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.025>
- Sánchez-Saavedra, M. del P., Castro-Ochoa, F. Y., Nava-Ruiz, V. M., Ruiz-Güereca, D. A., Villagómez-Aranda, A. L., Siqueiros-Vargas, F., & Molina-Cárdenas, C. A. (2018). Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 783–792. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1284-2>
- Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., & Huang, H. (2019). Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(4), 552–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.004>
- Talgatti, D., Sar, E. A., & Torgan, L. C. (2014). *Haslea sigma* (Naviculaceae, Bacillariophyta) a new sigmoid benthic species from salt marshes of Southern Brazil, 177(4), 231–238.
- UTEX Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. (n.d.). Retrieved July 3, 2019, from <https://utex.org/pages/algae-culture-media-recipes>
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

ANEXO I – ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la especie <i>Haslea spicula</i> (Kociolek, J.P.; Balasubramanian, K.; Blanco, S.; Coste, M.; Ector, L.; et al. (1995); M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, n.d.).	6
Tabla 2. Porcentajes relativos al contenido total de triacilglicéridos (TAG) y diacilglicéridos (DAG) obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS. Se muestran los valores medios, ya que se realizó por triplicado. Los TAGs señalados con un asterisco son aquellos que poseen algún ácido graso de interés (EPA, DHA y/o ARA).	20
Tabla 3. Porcentajes relativos al contenido total de cada especie de glicerolípidos (GLs) obtenidos en el análisis mediante UPLC-MS. Se muestran los valores medios, ya que se realizó por triplicado. Los GLs señalados con un asterisco poseen algún ácido graso de interés (EPA o ARA).	24
Tabla 4. Cantidad de EPA en unidades de $\mu\text{g}/(10^6 \text{ cél biomasa})$ contenido en cada especie de glicerolípidos.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los monogalactosildiacilgliceroles y digalactosildiacilgliceroles (Christie, 2011).	4
Figura 2. Estructura del sulfoquinovosildiacilglicerol (Christie, 2011).	4
Figura 3. Ciclo reproductivo de las diatomeas (Mejdandžić et al., 2017).	6
Figura 4. Foto de <i>Haslea spicula</i> vista al microscopio.	7
Figura 5. Cámara de cultivo MMM FRIOCELL.	8
Figura 6. Cultivo de <i>Haslea spicula</i> en biorreactor.	9
Figura 7. Cámara de Neubauer y su cuadrícula observada al microscopio con un aumento 10x.	10
Figura 8. Radiómetro.	11
Figura 9. Sistema bifásico de la extracción de lípidos según el método de Bligh and Dyer.	12
Figura 10. Equipo UPLC-MS.	13
Figura 11. Curva de crecimiento para el medio 539 a los volúmenes totales 10 y 20 mL. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $8 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.	14
Figura 12. Curva de crecimiento para los medios 539 y NSW (1:7) al volumen total de 10 mL. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de $40 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$.	14

ANEXO I – ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 13. Curvas de crecimiento para el cultivo de <i>Haslea spicula</i> en medio 539 (volumen total de 10 mL, siendo 8 del medio y 2 del inóculo) a las irradiancias de 8, 40 y 190 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$. Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado.	15
Figura 14. Efecto de la adición de Glucosa (5 g/L) sobre el crecimiento de <i>Haslea spicula</i> . Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de 8 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$..	16
Figura 15. Efecto de la adición de Glicerol (1 g/L) sobre el crecimiento de <i>Haslea spicula</i> . Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de 40 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$	17
Figura 16. Efecto del cultivo en medio 539 sin nitrato sobre el crecimiento de <i>Haslea spicula</i> . Se representan los valores medios, ya que cada experimento se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron a una irradiancia de 40 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$	18
Figura 17. Resultados del cultivo de <i>Haslea spicula</i> en biorreactor en modo batch con iluminación continua. En el experimento 3 (biorreactor 2) se añadió glicerol y nutrientes F/2 al comienzo de la fase bust sin renovación completa del medio de cultivo.	19
Figura 18. Picos cromatográficos específicos para los m/z 933,76, 905,73, 957,76, 907,75 y 909,76; que corresponden a los principales TAGs que contienen EPA (C20:5) o DHA (C22:6).	21
Figura 19. Comparación entre triacilglicéridos (TAGs) que poseen los ácidos grasos C20:5 (EPA) y C20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de <i>Haslea spicula</i> en placa.	22
Figura 20. Comparación entre triacilglicéridos (TAGs) que poseen los ácidos grasos C20:5 (EPA) y C20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de <i>Haslea spicula</i> en biorreactor.	22
Figura 21. Cromatogramas del cultivo en biorreactor antes y después de añadir glicerol. A: con glicerol; B y C: sin glicerol.	23
Figura 22. Comparación entre glicerolípidos (GLs) que poseen los ácidos grasos 20:5 (EPA) y 20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de <i>Haslea spicula</i> en placa.	25
Figura 23. Comparación entre glicerolípidos (GLs) que poseen los ácidos grasos 20:5 (EPA) y 20:4 (ARA) obtenidos en los cultivos de <i>Haslea spicula</i> en biorreactor.	25

ANEXO II – FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

FORMULACIÓN DEL MEDIO 539 (BG-11 modificado)

Nitrato sódico	1,5 g	Merck 106537
Hidrogenofosfato de dipotasio trihidratado	0,04 g	Merck 105099
Sulfato magnésico heptahidratado	0,075 g	Merck 105886
Cloruro cálcico dihidratado	0,036 g	Merck 102382
Solución de citrato amónico de hierro (III)/ácido cítrico monohidratado (III)*	5 mL	
Solución de titriplex magnésico dihidratado**	5 mL	
Carbonato sódico	0,04 g	Merck 106392
Trazas metálicas***	1 mL	
Agua destilada	1000 mL	(+)

Autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

*Solución de citrato amónico de hierro (III)/ácido cítrico monohidratado (III)

Citrato amónico de hierro (III)	300 mg	Merck 103761
Ácido cítrico monohidratado	300 mg	Merck 100244
Agua destilada	250 mL	(+)

Pesar la cantidad indicada de cada producto y disolver por separado en 75 mL de agua estéril. Mezclar todas las disoluciones y enrasar al volumen final. Conservar 10 días en oscuridad.

**Solución de titriplex magnésico dihidratado

Titriplex magnésico dihidratado	0,1 g	Merck 108409
Agua destilada	500 mL	(+)

Conservar 3 meses a 4 °C.

***Trazas metálicas

Ácido bórico	2,86 g	Merck 100165
Cloruro magnésico tetrahidratado	1,81 g	Merck 105927
Sulfato de zinc heptahidratado	0,222 g	Merck 108883
Molibdato sódico dihidratado	0,39 g	Merck 106521
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0,079 g	Merck 102790
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado	0,049 g	Merck 102554
Agua destilada	1000 mL	(+)

Disolver cada compuesto en la mínima cantidad de agua estéril. Mezclar cada

ANEXO II – FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

disolución en el orden indicado. Conservar 6 meses a 4 °C.

FORMULACIÓN DEL MEDIO 539 SIN NITRATO SÓDICO

Exactamente igual que el medio 539, pero añadiendo 0.5 g de Cloruro sódico en lugar de 1.5 g de Nitrato sódico.

FORMULACIÓN DEL MEDIO AGUA DE MAR (NSW) DILUIDA 1:7

Agua de Mar®	100 mL	Lactoduero® S.A.
--------------	--------	------------------

Agua mili-Q	600 mL	
-------------	--------	--

Autoclavar a 120 °C durante 20 minutos y conservar a 4 °C.

ANEXO III – MÉTODOS DE ANÁLISIS

MÉTODO DE ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs)

MODO IONIZACIÓN	ES +
COLUMNA	ACQUITY UPLC® HSS T3 1,8 µm 2,1x100 mm
DISOLVENTES	Acetonitrilo:Isopropanol:Metanol (3:4:3) + 0,1% Hidróxido de amonio Acetonitrilo:Isopropanol (3:7) + 0,1% Hidróxido de amonio
A1	
B1	
PARÁMETROS DEL MASAS	
Capilaridad	1,2 kV
Voltaje del cono	15
Cono de extracción	4,0
Temperatura de la fuente	90 °C
Temperatura de desolvatación	300 °C
Flujo del gas de cono	50 L/h
Flujo del gas de desolvatación	900L/h
PARÁMETROS DEL UPLC	
Temperatura de la columna	35 °C
Temperatura de las muestras	15 °C
Tiempo carrera	18 min
Flujo	0,40 mL/min
GRADIENTE DE DISOLVENTE	
Tiempo (min)	%A1
0	99,9
3	99,9
6	98
8	98
9,5	95
11	95
16	99,9
18	99,9

ANEXO III – MÉTODOS DE ANÁLISIS

MÉTODO DE ANÁLISIS DE GLICEROLÍPIDOS (GLs)

MODO IONIZACIÓN	ES -
COLUMNA	ACQUITY UPLC® HSS T3 1,8 µm 2,1x100 mm
DISOLVENTES	
A1	Metanol:Agua mili-Q:Ácido fórmico (50:50:0.5) + 5% Formiato amónico
B1	Metanol:Acetonitrilo:Ácido fórmico (59:40:0.5) + 5% Formiato amónico

PARÁMETROS DEL MASAS

Capilaridad	1,8 kV
Voltaje del cono	20
Cono de extracción	4,0
Temperatura de la fuente	100 °C
Temperatura de desolvatación	320 °C
Flujo del gas de cono	30 L/h
Flujo del gas de desolvatación	800 L/h

PARÁMETROS DEL UPLC

Temperatura de la columna	30 °C
Temperatura de las muestras	10 °C
Tiempo carrera	12 min
Flujo	0,30 mL/min

GRADIENTE DE DISOLVENTE

Tiempo (min)	%A1
0	99,9
1	99,9
2,5	20
4	20
5,5	0,1
8	0,1
10	99,9
12	99,9