



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **Máster en Biotecnología Avanzada**

#### **Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

*Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la producción de luteína en microalgas*

*Estudo da influencia de distintas condicións de cultivo na produción de luteína en microalgas*

*Influence of different culture conditions on the production of lutein in microalgae*

**JESSICA MARTÍNEZ GARCÍA**

**Curso: 2016/2017 – Convocatoria: Febrero**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la  
producción de luteína en microalgas

Estudo da influencia de distintas condicións de cultivo na produción de  
luteína en microalgas

Influence of different culture conditions on the production of lutein in  
microalgae

*Empresa: Biomar microbial Technologies*

**biomar**  
MICROBIAL TECHNOLOGIES

Dr. Carlos Padilla Martínez, tutor externo, y Dr. Manuel Becerra Fernández, tutor académico de la alumna *Jessica Martínez García*, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *Estudio de la influencia de distintas condiciones de cultivo en la producción de luteína en microalgas*, para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 30 de Enero de 2017

Fdo. Dr. Carlos Padilla Martínez

Fdo. Manuel Becerra Fernández



# ABREVIATURAS

<b>A</b>	Absorbancia
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BG-11</b>	Denominación de Medio de cianobacterias
<b>C</b>	Concentración
<b>CHU</b>	Denominación de Medio de cianobacterias
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>Fe</b>	Hierro
<b>g/L</b>	Gramo por litro
<b>h</b>	Hora
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>J</b>	Denominación de Medio de cianobacterias
<b>l</b>	Longitud atravesada por la luz en el medio
<b>mAU·s</b>	Miliunidades de absorbancia por segundo
<b>mg</b>	Miligramos
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MP</b>	Pigmento macular
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>P</b>	Fósforo

<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TFA</b>	Trifluoroacético
<b>UA</b>	Unidades de absorbancia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>W</b>	Vatios
<b>%</b>	Porcentaje
<b>400x</b>	400 aumentos
<b>μE</b>	Microeinstein
<b>μL</b>	Microlitros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>ε</b>	Coefficiente de extinción molar

## Contenido

I.	Resumen .....	9
I.	Resumo .....	9
I.	Abstract.....	10
II.	Introducción.....	11
II.1	Características de las microalgas y aplicaciones biotecnológicas .....	11
II.2	Carotenoides .....	13
II.3	Luteína y sus propiedades .....	14
III.	Objetivos.....	15
IV.	Parte experimental .....	16
IV.1	Materiales y métodos .....	16
IV.1.1	Material biológico .....	16
IV.1.2	Medios y condiciones de cultivo .....	17
IV.1.3	Estudios realizados .....	17
IV.1.4	Técnicas analíticas .....	19
V.	Resultados y Discusión.....	20
VI.	Conclusiones.....	40
VII.	Bibliografía.....	42





## **I. Resumen**

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que están empezando a valorarse positivamente en diferentes sectores industriales. Para su definitiva implantación a nivel industrial es necesario un estudio previo y profundo sobre el crecimiento y la productividad de estos microorganismos. En el presente proyecto se ha estudiado la influencia de diversos factores modificando condiciones de cultivo y composición de medios de cultivo sobre el crecimiento y la producción de luteína en microalgas. El abordaje experimental se llevó a cabo usando técnicas de espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, las condiciones probadas pueden afectar tanto positiva como negativamente a los parámetros a estudiar, es decir, las microalgas pueden modular su crecimiento y producción de luteína en respuesta a modificaciones en el cultivo de estos microorganismos.

## **I. Resumo**

As microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que están empezando a valorarse positivamente en diferentes sectores industriais. Para a súa definitiva implantación a nivel industrial, é necesario un estudo previo e profundo sobre o crecemento e a produtividade de estos microorganismos. No presente proxecto estúdase a influencia de diversos factores modificando condicións de cultivo e composicións de medios de cultivo sobre o crecemento e a produción de luteína en microalgas. O abordaxe experimental levouse a cabo usando técnicas de espectrofotometría e cromatografía líquida de alta resolución. Según os resultados obtidos no presente traballo, as condicións probadas poden afectar tanto positiva como negativamente aos parámetros a estudar, é decir, as microalgas poden modular o seu crecemento e a produción de luteína en resposta a modificacións no cultivo de estos microorganismos.

## **I. Abstract**

Microalgae are microscopic photosynthetic organisms positively valued in different industrial sectors. Previously to industrial scale is necessary a deeply laboratory approach, improving growth and productivity. In this project it is tested the influence of different culture conditions and modifications of culture media monitoring growth and production of lutein in microalgae. The experimental approach was carried out using spectrophotometry and high performance liquid chromatography techniques. The results obtained show that the tested conditions can affect both positively and negatively on the parameters studied. Microalgae can modulate their growth and lutein production in response to modifications in culture conditions.

## II. Introducción

### II.1 Características de las microalgas y aplicaciones biotecnológicas

El término microalga define a microorganismos que realizan fotosíntesis oxigénica igual que las plantas. Incluyen tanto a microorganismos eucariotas (microalgas verdes, pardas y doradas) como a procariotas (cianobacterias y proclorofitas). Están distribuidas por todos los hábitats terrestres y acuáticos (tanto marinos como dulceacuícolas) (Richmond 2004) y son responsables de, al menos, la mitad del mantenimiento de la vida en el planeta gracias a la generación de oxígeno así como compuestos orgánicos reducidos (García C. 2014). Mayoritariamente, las microalgas son seres fotoautótrofos, es decir, utilizan una fuente inorgánica de carbono presente en el ambiente, como es el CO<sub>2</sub>, y la luz solar como fuente de energía para su crecimiento (García M. 2013).

En las últimas décadas, la biotecnología de microalgas ha adquirido una considerable importancia. Una de sus principales características es que crecen rápidamente y tienen el potencial de generar una gran cantidad de biomasa en un tiempo relativamente corto en comparación con las plantas superiores, pudiendo usar los mismos elementos nutritivos. Estos microorganismos presentan una gran capacidad de producción de biocompuestos de interés tanto en la industria petrolera (Chisti 2007), como en la industria alimentaria, cosmética, agrícola y/o farmacéutica (Bolaños 2008).

En el sector energético, los combustibles derivados del petróleo son considerados insostenibles debido al agotamiento de dichos suministros y a su contribución en la acumulación de dióxido de carbono en el medio ambiente. El biodiesel derivado de los cultivos oleaginosos es un potencial renovable y alternativo a los combustibles de petróleo. Éste puede obtenerse a partir de microalgas gracias a su rápido crecimiento y a la generación de grandes cantidades de ácidos grasos que éstas producen.

También se conoce el uso de microalgas como alimento en determinadas tribus de África y se ha reconocido su valor alimenticio. Por ello, en el sector alimentario, se investigan a las microalgas como fuente alternativa de proteínas y de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), en concreto los ácidos omega 3, para su

posible uso como complementos en la alimentación humana y animal (Becker 2004; Borowitzka 2013).

En el terreno agrícola, también existen referencias sobre el uso de la biomasa de las microalgas como fertilizantes y acondicionantes de suelos (Singh et al. 2011) así como para la detección de contaminantes. También tienen usos en la depuración de aguas residuales y gases contaminantes (Barker et al. 2009; Douskova et al. 2009; Van den Hende et al. 2012).

En la actualidad, el aspecto central de la biotecnología de microalgas se centra en la generación de productos con aplicación industrial. Muchas de ellas producen diferentes compuestos biológicos de elevado interés para diferentes sectores industriales como pueden ser los pigmentos, lípidos, polisacáridos y vitaminas (Naranjo 2014).

Las microalgas, como organismos fotosintéticos que son, contienen una serie de complejos proteicos en cuyo interior albergan moléculas captadoras de la luz (clorofilas, ficobilinas y carotenoides). Estos microorganismos presentan la capacidad de desarrollar estrategias para sobrevivir a condiciones ambientales adversas. Algunas pueden simularse en el laboratorio y así redireccionar el metabolismo celular hacia la biosíntesis de un determinado compuesto de potencial interés comercial (como es el caso de los pigmentos) (García M. 2013).

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, las microalgas poseen clorofilas como moléculas colectoras de luz, pero además están presentes otras moléculas como las ficobiliproteínas (pigmentos antena que se encuentran en cianobacterias y algas rojas) que se usan como colorante en la industria alimenticia, cosmética y textil (Moldovan 2016), así como en microscopía de fluorescencia e inmunoensayos (Kronick et al. 1983), y los carotenoides, que como se comentará más adelante, presentan un elevado interés en la industria alimenticia debido a su actividad antioxidante (Meléndez et al. 2004).

El trabajo presentado se centrará en la mejora de la producción de pigmentos de tipo carotenoideo, en concreto del carotenoide luteína, debido a cambios en las condiciones de cultivo: composición salina del medio de cultivo y diferentes condiciones lumínicas

## II.2 Carotenoides

En la naturaleza se pueden observar una inmensa variedad de colores. En las plantas, se observa distinta coloración en el fruto, en hojas y flores. Este fenómeno se debe a la presencia de diferentes pigmentos y su abundancia puntual. Los colores amarillo-anaranjados suelen corresponder a la presencia de carotenoides.

Los carotenoides son tetraterpenos constituidos por multitud de unidades de isopreno con un ciclohexano sustituido e insaturado en los extremos. Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y, las xantófilas, que si presentan algún grupo hidroxilo o cetónico. La cadena poliénica de la molécula, es un sistema de dobles enlaces conjugados que se denomina cromóforo, y es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región concreta del espectro de luz (Jáuregui et al 2011).

En las microalgas eucariotas, los carotenoides que se encuentran en la membrana tilacoidal de los cloroplastos son considerados carotenoides primarios, como la luteína. Pueden actuar como componentes estructurales y funcionales del aparato fotosintético de las células y por lo tanto son esenciales para su supervivencia en condiciones de cultivo normales; o también pueden acumularse en cuerpos lípidicos dentro o fuera de los cloroplastos entonces se denominan carotenoides secundarios y pueden acumularse en gran cantidad bajo diferentes condiciones de estrés (Fernández 2013).

Los carotenoides presentan un papel importante en la fotosíntesis, tanto de tipo estructural como funcional.

Estructuralmente, ayudan al mantenimiento de la integridad tridimensional de los complejos fotosintéticos dentro de las membranas tilacoidales, ya que, requieren de un adecuado ensamblaje de los complejos captadores de luz como en el caso de la luteína (Guerrero et al. 1999).

Funcionalmente, actúan como pigmentos accesorios que capturan la energía de luz no absorbida por las clorofilas, canalizándolas hasta ellas. También desempeñan un importante papel en la protección de las microalgas contra procesos foto-oxidativos, ya que atenúan especies reactivas de oxígeno, así como la clorofila en estado excitado.

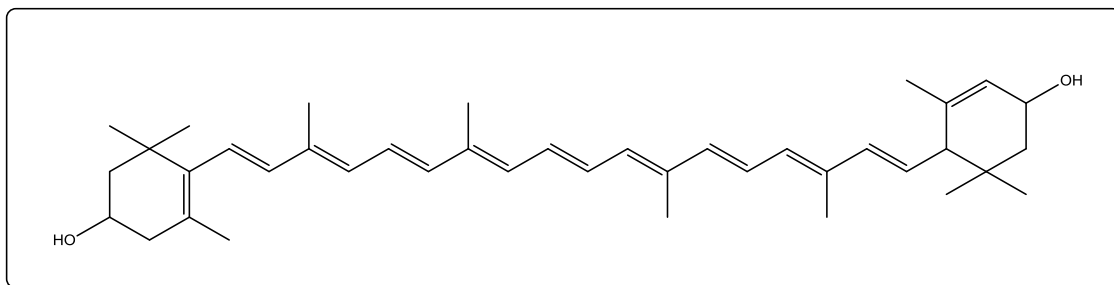
La importancia de este tipo de moléculas para los seres humanos radica en que no somos capaces de sintetizar carotenoides “de novo” y por lo tanto, deben obtenerse de

manera externa a través de la dieta (Delgado-Vargas et al. 2003; Granado-Lorencio et al. 2009).

Múltiples investigaciones manifiestan el papel de los carotenoides como antioxidantes relacionando el secuestro de radicales libres de oxígeno directamente con la mejora de enfermedades degenerativas. Por ello, se administran suplementos de determinados carotenoides como método preventivo en ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas relacionadas con la edad como las cataratas (Jáuregui et al. 2011).

### II.3 Luteína y sus propiedades

La luteína es un carotenoide perteneciente al grupo de las xantófilas, es decir, presenta en su estructura grupos hidroxilos. Es un pigmento amarillo-anaranjado presente en plantas superiores, microalgas y en bacterias fotosintéticas, que pueden acumularla como pigmento fotosintético y agente protector frente a la luz solar. Está ampliamente distribuida en frutas y verduras de consumo frecuente.



*Figura 1. Estructura de la luteína*

En los seres humanos, la luteína se acumula selectivamente en diferentes partes del ojo y es especialmente abundante en el centro de la retina (mácula), por eso es conocida como pigmento macular (MP) (Krinsky et al. 2003). Algunos estudios indican que la luteína protege contra enfermedades en la piel y los ojos (Rodríguez-Amaya 2001; Krinsky et al 2003; Roberts et al. 2009), debido al daño ocasionado por la luz solar (Lewis 2008; Snellen et al.2002). También estimula el sistema inmunológico (Dwyer et al 2001) disminuyendo los efectos degenerativos relacionados con el estrés oxidativo. El consumo de 6 a 14 mg de luteína por día se ha asociado con la reducción hasta un

50% del riesgo de degeneración macular y una disminución del 20% del riesgo de padecer cataratas (Snellen et al. 2002; Bone et al 2003; Carpentier et al. 2009).

La fuente comercial más abundante de este bioproducto es la flor de la caléndula (*Tagetes erecta* L.). Sin embargo el contenido de luteína es bajo, lo que hace que la consideración de otras fuentes de abastecimiento puedan ser económicamente competitivas.

En los últimos años, ha surgido un gran interés en las microalgas como productoras de luteína (García-Cañedo 2011), estos microorganismos constituyen una fuente importante para la producción de carotenoides. La generación de luteína es diferente en cada especie microalgal, es decir, es especie dependiente, debido a sus diferentes capacidades bioquímicas.

En algunos casos, la síntesis de la luteína parece estar ligada a la generación de la biomasa, de forma que la producción de la luteína es máxima si también lo es su crecimiento. (García M. 2013).

Algunas de las especies de microalgas que contienen luteína son *Muriellopsis* sp. (del Campo et al. 2001,2007), *Chlorella zofigiensis*, (Del Campo et al. 2000) *Chlorella protothecoides* (Shi et al. 2000) y *Scenedesmus almeriensis* ( Sánchez-Fernández 2008).

### III. Objetivos

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster ha sido el de estudiar el efecto de distintas condiciones de cultivo en el crecimiento microalgal así como en la producción de la luteína.

El trabajo puede dividirse en dos bloques:

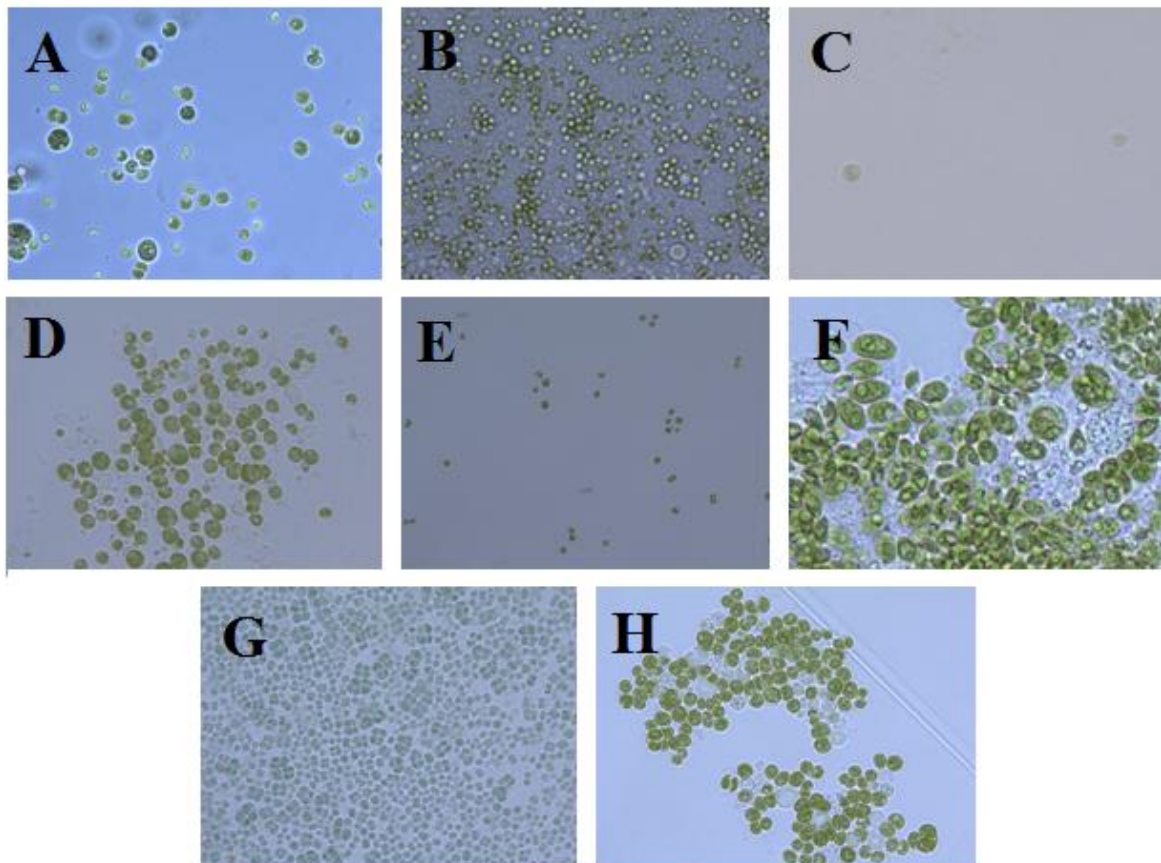
- 1) Selección de las microalgas con mayor velocidad de crecimiento en un medio de cultivo seleccionado como control.
- 2) Estudio de la influencia de diferentes medios de cultivos en el crecimiento y en la producción de luteína en las microalgas seleccionadas en el punto anterior.

## IV. Parte experimental

### IV.1 Materiales y métodos

#### IV.1.1 Material biológico

A partir de la colección de microalgas que posee Instituto Biomar S.A, que actualmente consta de 3885 cepas obtenidas de muestras de origen marino y terrestre a través de más de 60 expediciones realizadas por todo el mundo, se preseleccionaron 8 cepas de microalgas para llevar a cabo este trabajo, puesto que en cultivos rutinarios mostraban poseer luteína entre sus carotenoides. En la *Figura 2*, se muestran imágenes de cada una de las microalgas seleccionadas obtenidas con un microscopio *Leica DM 2500* a 400x.



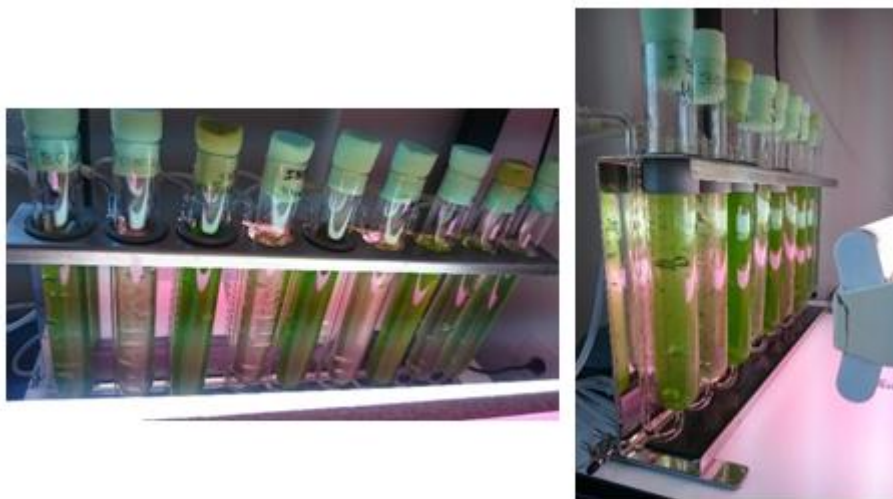
*Figura 2.* A) 438; B) 3597; C) 3267; D) RP028; E) 3707; F)3668; G)3696; H) 3667



#### IV.1.2 Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo empleado a lo largo del trabajo para el crecimiento de las microalgas así como su mantenimiento es el medio denominado BG-11 (Waterbury, J. B. & Stanier, R. Y., 1981).

Las microalgas se cultivaron en una habitación climatizada a 25°C en tubos de cristal de 250 mL con aireación forzada y constante, fotoperiodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y una intensidad lumínica entre 60-80  $\mu$ E. Los fluorescentes utilizados para la iluminación fueron *Sylvania GRO-LUX* de 18W.



*Figura 3. Cultivo de las distintas microalgas en los tubos de cristal con aireación forzada*

Para el estudio de la influencia de los medios de cultivo se han utilizado medios BG-11 modificados (para la descripción de las modificaciones ver más adelante el apartado "IV.1.3 Estudios realizados: Ensayos con diferentes condiciones de cultivo") así como medio J (UTEX Culture Collection of Algae), medio CHU (UTEX Culture Collection of Algae), agua del grifo y en diferentes condiciones lumínicas.

#### IV.1.3 Estudios realizados

- Elección de cepa para los ensayos

Debido a la limitación temporal para la realización del presente trabajo, a partir de las 8 cepas seleccionadas se decidió hacer una segunda selección en función de su velocidad

de crecimiento. Se cultivaron las 8 cepas candidatas en tubos de cristal de 250 mL durante 7 días a partir de una concentración inicial equivalente a una densidad óptica (DO) de 0.2 UA a 750 nm.

Se controló su crecimiento cada 48 h midiendo la absorbancia de los cultivos a 750 nm utilizando un espectrofotómetro de doble haz.

Las dos microalgas que presentaron una mayor velocidad de crecimiento fueron las seleccionadas para los ensayos posteriores. La velocidad de crecimiento es proporcional a la DO medida a 750 nm.

- Ensayos con diferentes condiciones de cultivo

Las dos cepas seleccionadas se cultivaron durante una semana en las siguientes condiciones:

- En medio BG-11 en ausencia de Mg (-Mg)
- En medio BG-11 en ausencia de Fe (-Fe)
- En medio BG-11 con exceso de P (balance N/P 1:1)
- En medio BG-11 en ausencia de  $\text{NO}_3^-$  (-NO<sub>3</sub>)
- En medio BG-11 con NaCl 3g/L (+NaCl)
- En medio J
- En medio CHU
- Con agua de grifo
- En medio BG-11 con NaCl 3g/L con luz continua
- En medio BG-11 con luz continua
- En medio BG-11 sin luz

Todas estas condiciones fueron monitorizadas a las 48 h y 96 h desde su inicio midiendo su DO a 750 nm. Al finalizar el cultivo se tomaron alícuotas de 5 mL, se centrifugaron y el sedimento obtenido se conservó congelado a -20 °C para su posterior análisis cromatográfico.

#### IV.1.4 Técnicas analíticas

- Determinación de la biomasa

La biomasa se determinó cualitativamente mediante métodos espectrofotométricos. Existe una relación directa entre el número total de microorganismos presentes con la turbidez que presenta la muestra. Siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A=\epsilon Cl$$

aunque no se ha obtenido la concentración de la biomasa, se puede aplicar el valor de absorbancia como dato cualitativo para decidir que cepa crece más en un periodo de tiempo determinado.

Los pigmentos presentes en el cultivo absorben a distintas longitudes de onda, sin embargo a 750 nm no existe interacción de ningún componente del cultivo, por lo que la absorbancia a esa longitud de onda es directamente proporcional a la biomasa en suspensión.

Las medidas realizadas en este trabajo se realizaron con el espectrofotómetro *Pekin Elmer Precisely, Lambda 25 UV-Vis*.

- Determinación del contenido en luteína

La determinación de la cantidad de luteína presente en las distintas condiciones de crecimiento, se realizó de manera cualitativa utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) unida a un detector de diodos (DAD) que detecta los compuestos según su absorción de luz obteniendo un espectro de longitudes de onda entre 200 y 800 nm.

A partir de las alícuotas recogidas y que contenían el sedimento de 5 mL de cultivo, se obtienen sus extractos resuspendiendo las muestras en 1 mL de metanol, para provocar su rotura celular. Después se agita en vórtex durante 30 min y se centrifuga a 14000 rpm durante 4 min. Se toman 0.5 mL de sobrenadante, se filtran y se inyectan 20  $\mu$ L para obtener su perfil químico utilizando HPLC.

Las condiciones del método de elución son las siguientes:

Canal A	Agua miliQ + 0.01% TFA
Canal B	Acetonitrilo
Flujo	2.5mL/min
Columna	Kinetex 2.5 micras 4.5x50mm

*Tabla 1. Condiciones del método utilizado en HPLC*

Se utiliza un gradiente de 8 min con composición inicial de 85:15 (A:B) y final de 0:100 (A:B). Para los análisis, el cromatógrafo utilizado ha sido *HPLC Agilent Technologies 1100 series*.

## V. Resultados y Discusión

- Elección de las cepas para los ensayos

Como se mencionó anteriormente, usando espectrofotometría, se hizo un barrido de longitudes de onda desde 340 a 800 nm para obtener el espectro de longitudes de onda de cada una de las muestras y observar las bandas correspondientes a los pigmentos presentes en ellas. Debido a las diferencias estructurales existentes entre ellos, cada pigmento presenta distinto espectro de absorción de luz con uno o varios puntos de absorción máxima. En la siguiente tabla se reflejan los máximos de absorbancia de los distintos pigmentos que contienen las microalgas:

Pigmentos	Longitud de onda (nm)
Clorofila <i>a</i>	680 y 420
Clorofila <i>b</i>	650 y 450
Filicobiliproteínas	600
Carotenoides	420 y 480

*Tabla 2. Longitudes de onda a las que absorben los distintos pigmentos (Collazo M. 2006)*

Como ya se comentó anteriormente, a 750 nm, no existe interferencia de pigmentos fotosintéticos, por lo que la absorbancia (densidad óptica) obtenida es directamente proporcional a la cantidad de biomasa presente.

A continuación y a modo de ejemplo, se muestra el espectro de absorbancia obtenido para una de las microalgas utilizadas:

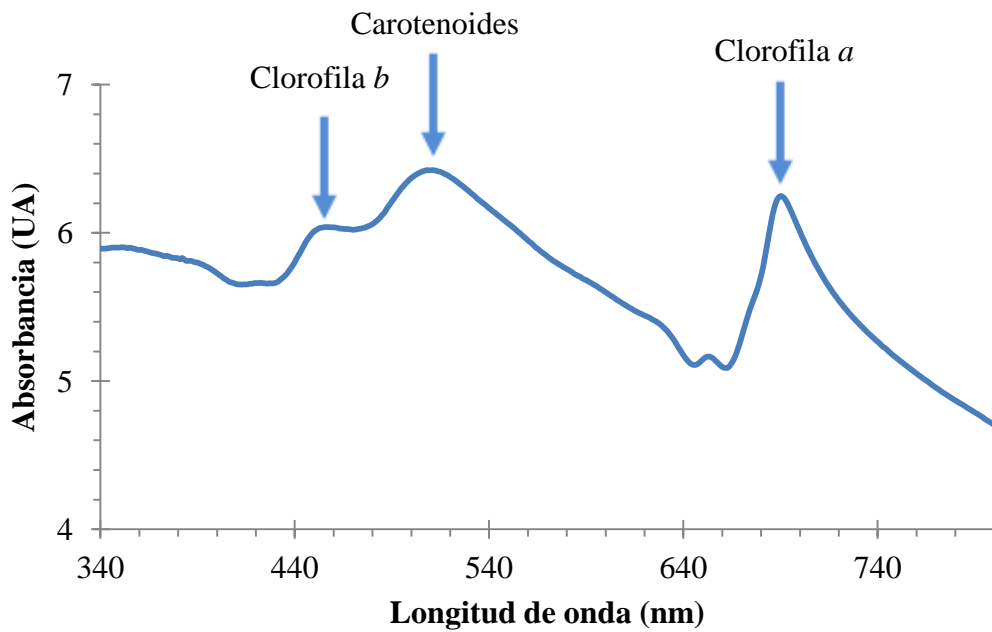


Figura 4. Espectro de absorbancia de la microalga 3707

Tras 4 días de cultivo, se mide la absorbancia a 750 nm a las 48 horas y 96 horas y representando gráficamente los datos, puede observarse (Figura 5) que las cepas 3707, 3267 y RP028 crecen mucho más rápido que el resto.

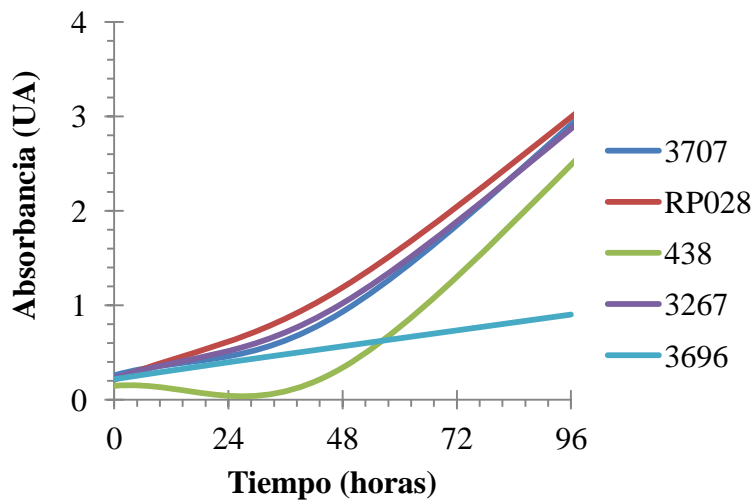


Figura 5. Crecimiento de biomasa de las 8 microalgas candidatas

Se decidió que para los estudios posteriores y para simplificar la programación de los experimentos solo se eligieron dos de las tres cepas, las elegidas fueron 3707 y RP028.

- Ensayos con distintas condiciones de cultivo:

Las cepas 3707 y RP028, fueron sometidas a diferentes condiciones manteniendo, en cada tanda de experimentos, un tubo de cultivo de cada cepa en condiciones estándar y que serán denominadas “control” para el resto de experimentos (medio BG-11 sin modificaciones, y en condiciones estándar de cultivo: fotoperiodo 16:8, 60-80  $\mu$ E de intensidad lumínica y 25°C). Se registran los valores de absorbancia a 750 nm cada 48 horas, con la finalidad de observar la influencia de estas condiciones sobre el crecimiento de biomasa. Posteriormente, se realizó un extracto de los cultivos con metanol y un análisis cromatográfico (HPLC) para observar la posesión del carotenoide luteína y como variaba su cantidad según el tiempo de cultivo y las modificaciones propuestas. Se identificó el carotenoide luteína en los perfiles químicos obtenidos por HPLC y se tomaron los datos del área de pico de la luteína presente en cada condición, observando así la influencia de los medios en la producción de la misma. El área de un pico cromatográfico es directamente proporcional a la cantidad del mismo presente en la muestra inyectada, por tanto puede tomarse esta medida, a efectos comparativos, como cantidad presente en la muestra.

Los ensayos se hicieron por duplicado en tres tandas de cultivo, en cada una de las tandas se incluían las cepas en las condiciones “control”.

- **Microalga 3707:**

En las siguientes gráficas se refleja el crecimiento de biomasa. Los valores representan la media de los valores obtenidos en cada uno de los duplicados en cuanto a su DO a 750 nm a 48 y 96 horas:

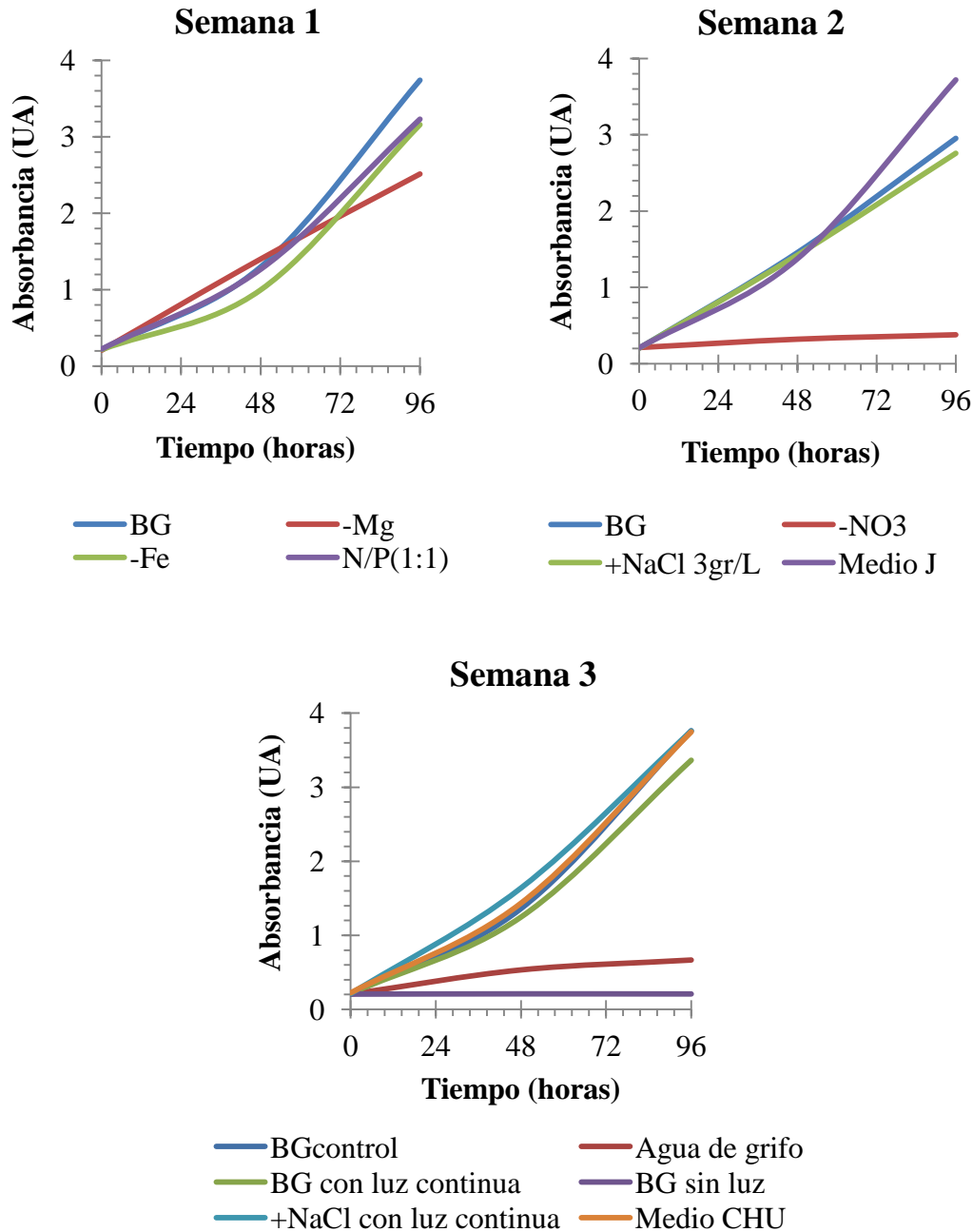


Figura 6. Crecimiento de biomasa para la cepa 3707. Los colores representan diferentes condiciones de cultivo

Observando las gráficas anteriores, parece que a tiempo final de cultivo, 96 horas, las condiciones usadas como “control” son las que producen una de las mayores velocidades de crecimiento.

En cuanto al uso de medio J, se obtiene un aumento del crecimiento de un 21 %, por tanto, sería un medio con unos componentes mejor balanceados que el medio usado como control (BG-11) para esta microalga en concreto. En presencia de sal y con

irradiación continua, así como en medio CHU, se obtienen valores de absorbancia similares al control, por lo que presentan un comportamiento similar a éste. La presencia de sal no parece mejorar la velocidad de crecimiento.

En cambio, el exceso de fósforo (P) así como la ausencia de hierro (-Fe) parecen disminuir dicha velocidad un 14 %.

El P juega un papel importante en todos los procesos que requieren transferencia de energía en la microalga. Los fosfatos de alta energía, que forman parte de la estructura química de ADP y de la de ATP, son la fuente de energía de una multitud de reacciones químicas: fotosíntesis, transporte de nutrientes, transferencia genética, etc. La condición N:P<sub>1:1</sub> aumenta la presencia de P respecto al balance del medio control, pero también se produce un desbalance de N, lo que podría provocar una escasez de este elemento afectando a la síntesis proteica, y por lo tanto a una disminución del crecimiento. Además, se puede observar que la ausencia de magnesio (-Mg), de nitratos (-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), de luz así como el uso de agua de grifo (con bajo contenido de sales) hacen disminuir el crecimiento de la microalga.

El magnesio es un componente básico de la clorofila, por lo que presenta un papel importante en procesos de fotosíntesis. Por tanto la deficiencia de magnesio se convierte en un factor vital que puede limitar el crecimiento del cultivo. Del mismo modo, los nitratos se convierten en la fuente principal de N, y en ausencia de ellos, la síntesis de proteínas se ve detenida y por lo tanto el crecimiento de la microalga.

La condición de luz continua, 24 horas de luz, parece afectar negativamente al crecimiento pero si se suplementa con NaCl este efecto se anula, y la absorbancia se ve incrementada.

Tras el estudio del crecimiento de la microalga, se realiza un análisis cromatográfico (HPLC), obteniendo el siguiente perfil:



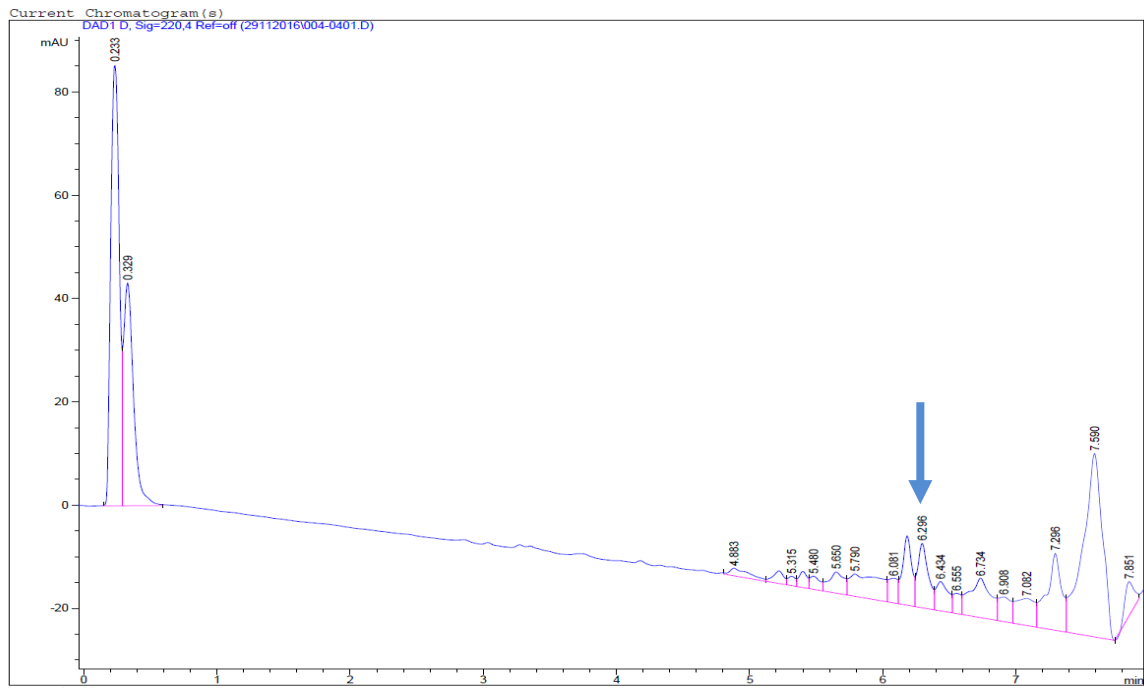


Figura 7. Cromatograma obtenido a 220 nm para la microalga 3707 en condiciones control. En la gráfica se señala el pico que corresponde a la luteína

En la Figura 7, se observa a 6.295 min un pico con un espectro UV coincidente con el patrón de luteína:

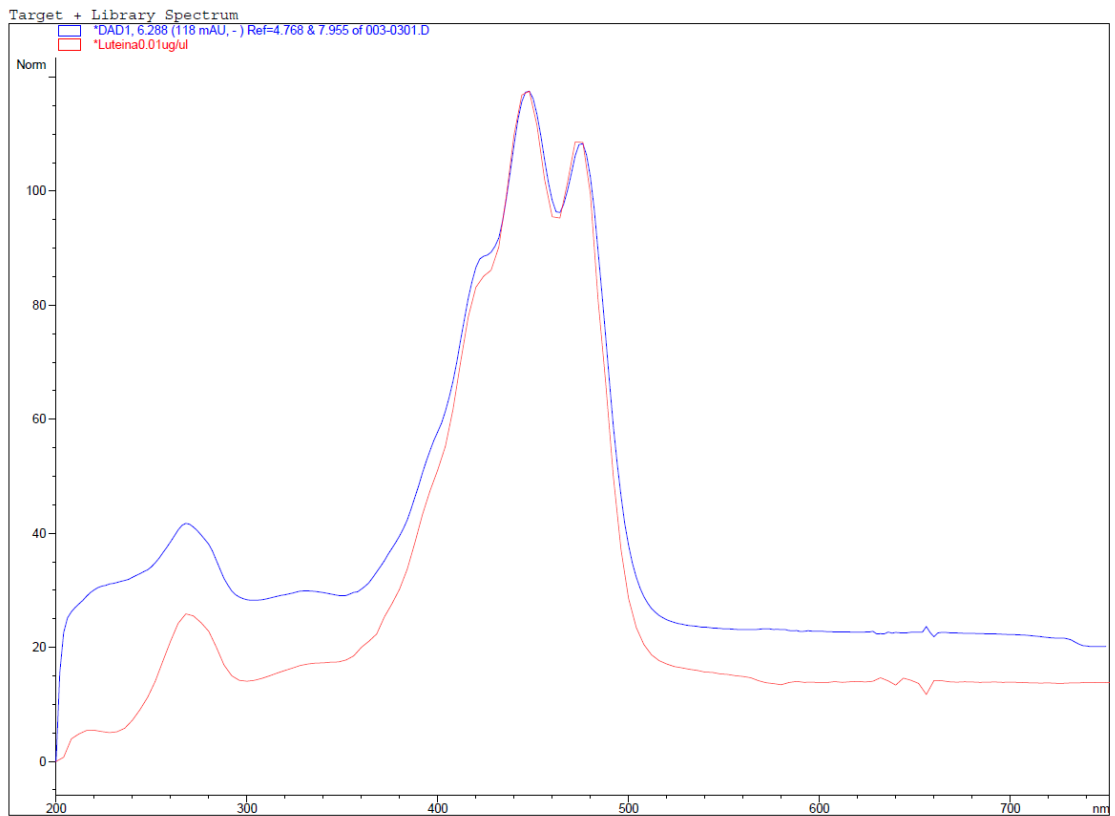
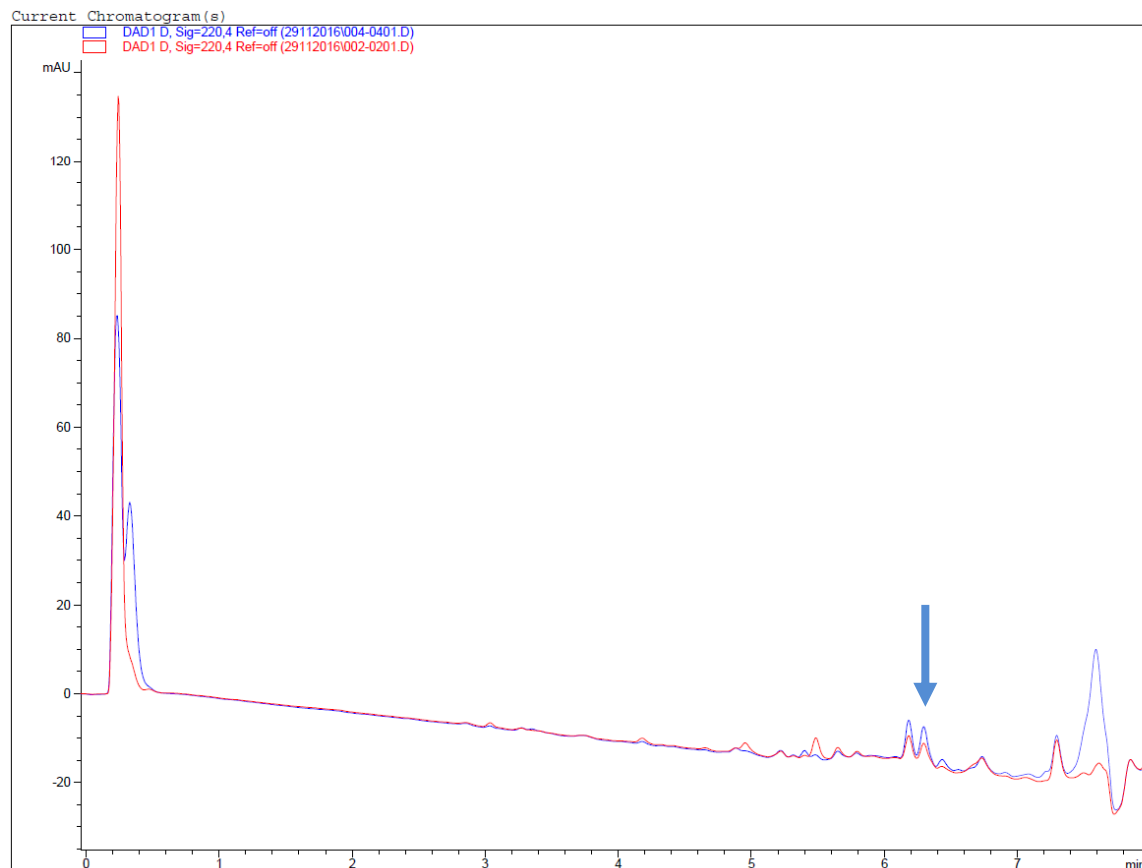


Figura 8. Solapamiento del espectro de UV del patrón de luteína y la muestra 3707 en condiciones control.

Por tanto, con la finalidad de observar las variaciones en la producción de luteína en las distintas condiciones, el análisis de HPLC se centrará en la observación del área de este pico.

Superponiendo los cromatogramas obtenidos para 48 y 96 horas se obtiene lo siguiente:



*Figura 9. Solapamiento de cromatogramas de la muestra 3707 en medio control a las 48h (rojo) y 96h (azul). La flecha indica el pico de luteína*

Se puede observar que se produce un aumento del pico de luteína a medida que aumenta el tiempo.

Se determina el área del pico de la luteína para cada condición y se representan las áreas obtenidas frente al tiempo obteniendo las siguientes representaciones:

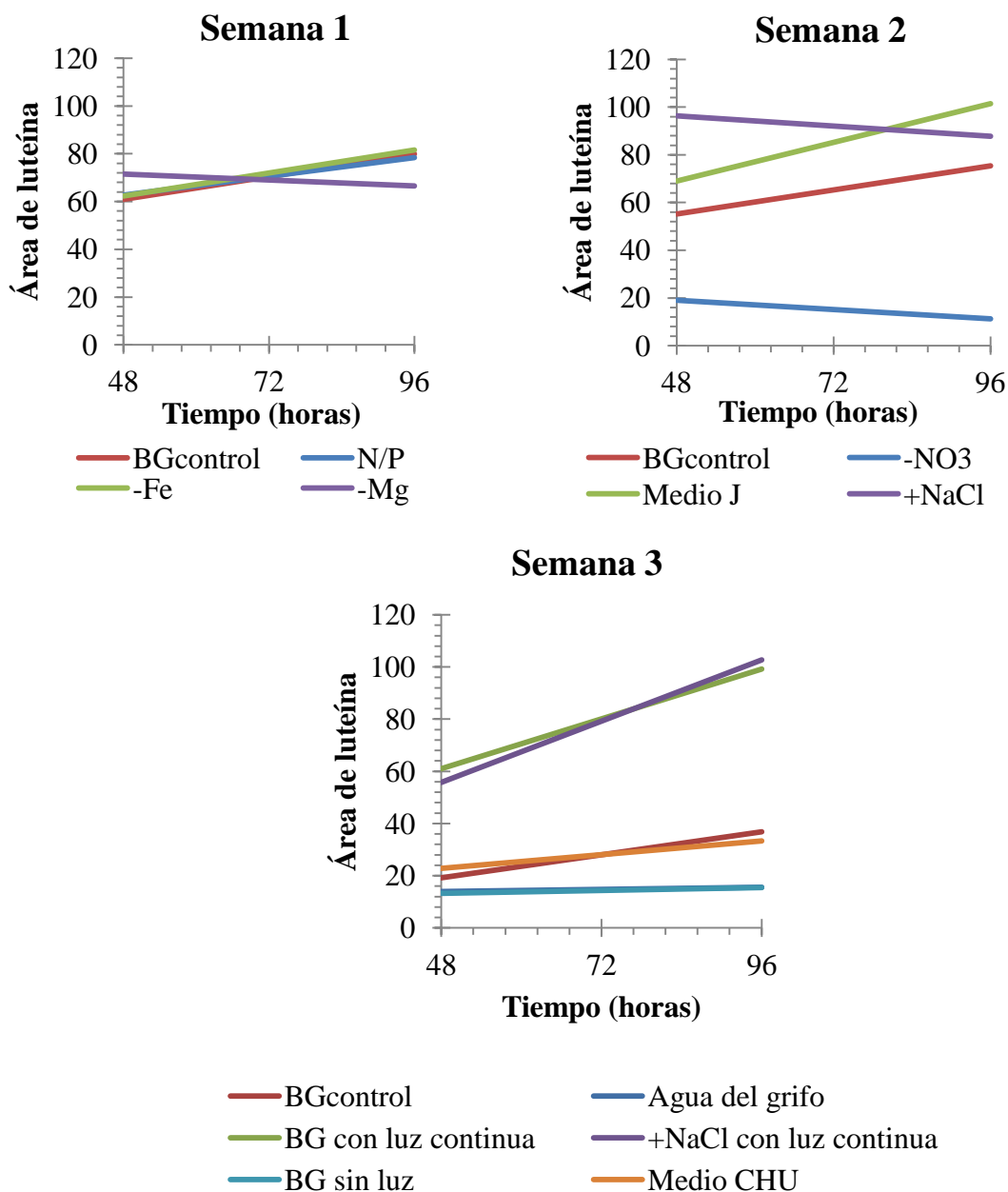


Figura 10. Producción de luteína para la cepa 3707. Los colores representan diferentes condiciones de cultivo

Observando el área de luteína obtenido para las 48 horas, podría decirse que inicialmente todas las condiciones presentan una velocidad de producción mayor que el control, a excepción de los nitratos, en agua de grifo y en ausencia de luz, los cuales presentan un área inferior al control.

En presencia de sal, a las 48 horas se observa un aumento en la producción de luteína confirmando los resultados obtenidos por Sánchez et al (2008), con un 57 % de

aumento. En cambio en estas condiciones, entre las 48 y 96 horas se produce un decrecimiento de la velocidad de producción.

Algo similar sucede en ausencia de magnesio que presenta un 15 % de aumento inicial respecto al control, que podría indicar que esta condición es estresante para las células, aunque posteriormente se produce una disminución obteniendo a las 96 horas un 18 % menos de luteína con respecto al medio control, probablemente debida a que el magnesio es fundamental para el crecimiento.

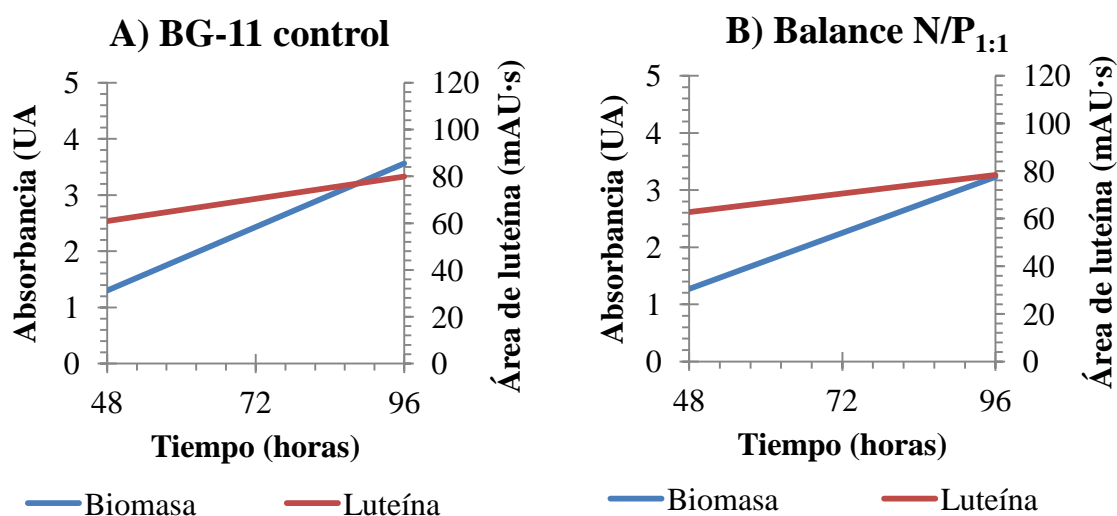
Por el contrario, la microalga en medio J parece producir mayor cantidad de luteína que en medio BG-11, obteniendo a las 96 horas un 26 % más del carotenoide de interés.

En condiciones de luz continua, parece que se produce un aumento de la producción de luteína, tanto en medio BG-11 como en presencia de sal. Sin embargo, no se observa diferencia significativa entre ambas, lo que parece indicar que la presencia de sal no mejora dicha producción si la presencia de luz es continua.

En ausencia de nitratos, en agua de grifo y en la condición de ausencia de luz los contenidos de luteína son muy bajos. Estas condiciones no favorecen en absoluto la producción y/o acumulación de dicho carotenoide.

El resto de condiciones testadas parecen no influenciar significativamente la producción de luteína.

Relacionando la biomasa con el área de luteína obtenida se obtienen las siguientes gráficas:



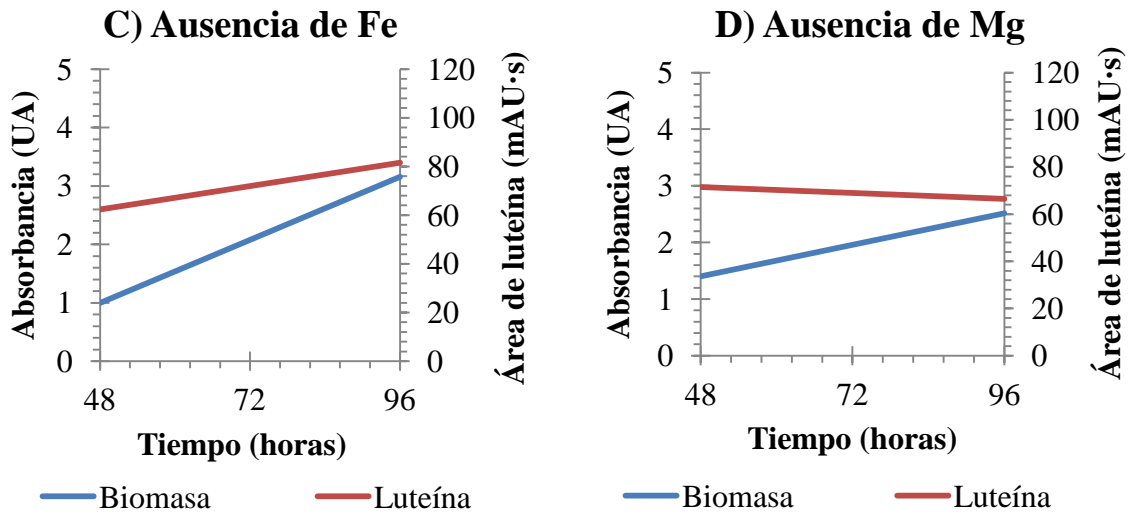
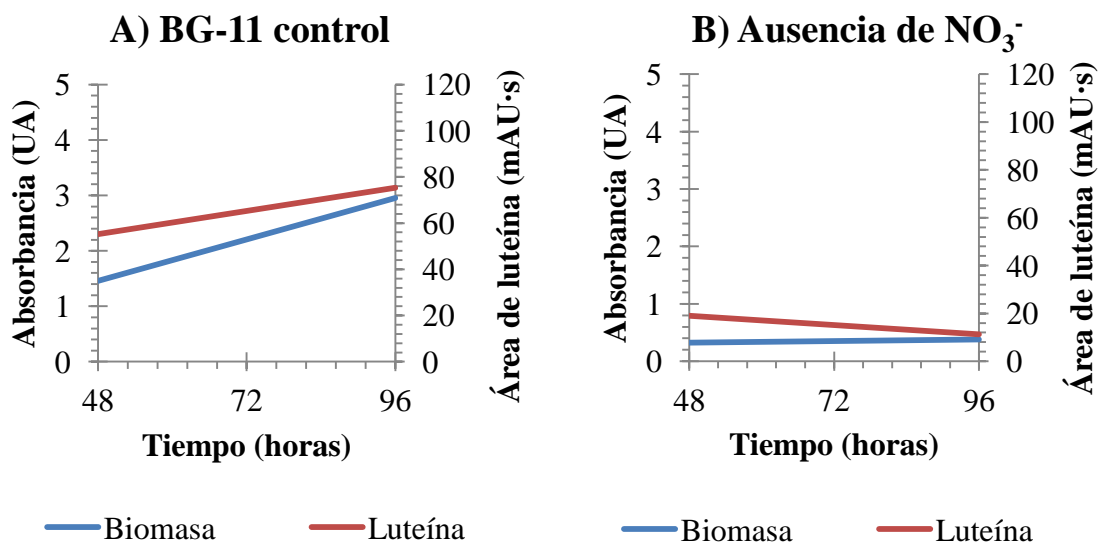


Figura 11. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 1)

Observando las representaciones anteriores, parece que la producción de luteína no está ligada a la producción de biomasa.

Se observa una disminución de la pendiente en la recta de la luteína, lo que indica que hay menos luteína por unidad de biomasa. Parece que en las condiciones seleccionadas no se mejora la producción de luteína. En cambio, se observa un efecto negativo en ausencia de magnesio. El magnesio también interviene en la síntesis de xantófilas y carotenoides, por lo que bajos niveles de este elemento provocarían una disminución de la producción del carotenoide de interés.

En el resto de condiciones no se observan diferencias significativas respecto a las condiciones control



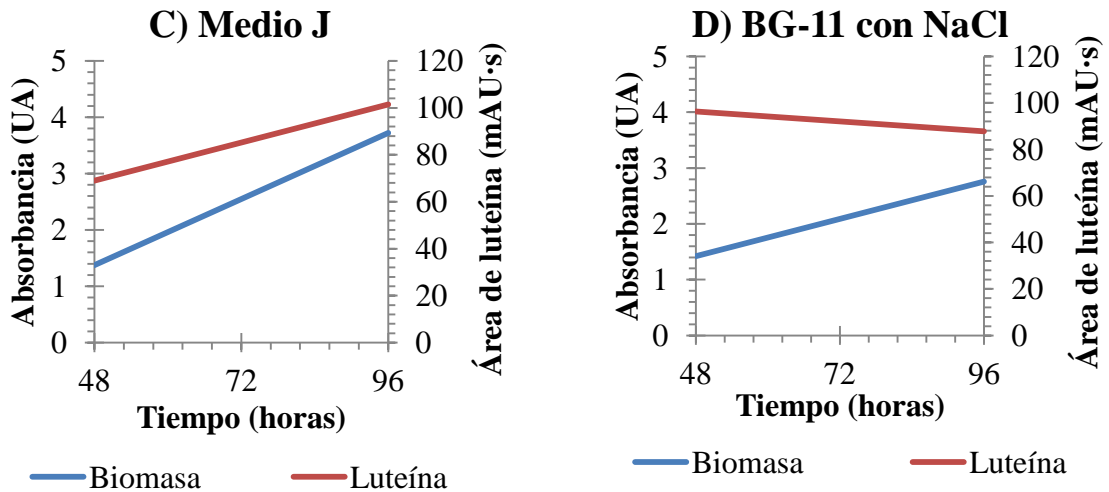
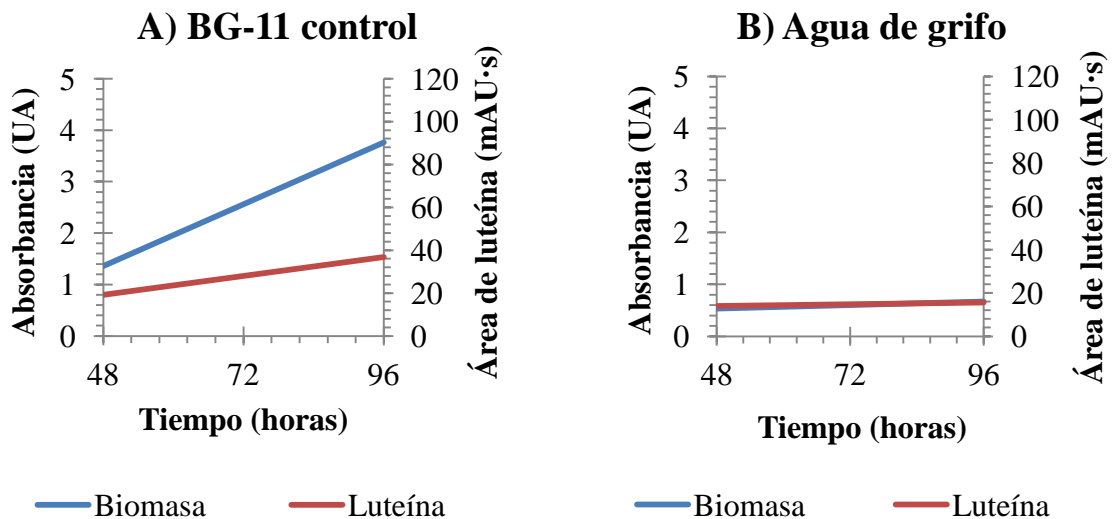


Figura 12. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 2)

En ausencia de nitratos tanto el crecimiento como las cantidades de luteína, se ven afectadas. Los nitratos parecen ser esenciales para mantener una fotosíntesis activa.

En presencia de sal se observa una disminución de los niveles de luteína.

En la Figura 6, en medio J se observa un aumento de biomasa con respecto al control y del mismo modo se produce un aumento de la cantidad de luteína. Este aumento sería de un 26 % con respecto al control.



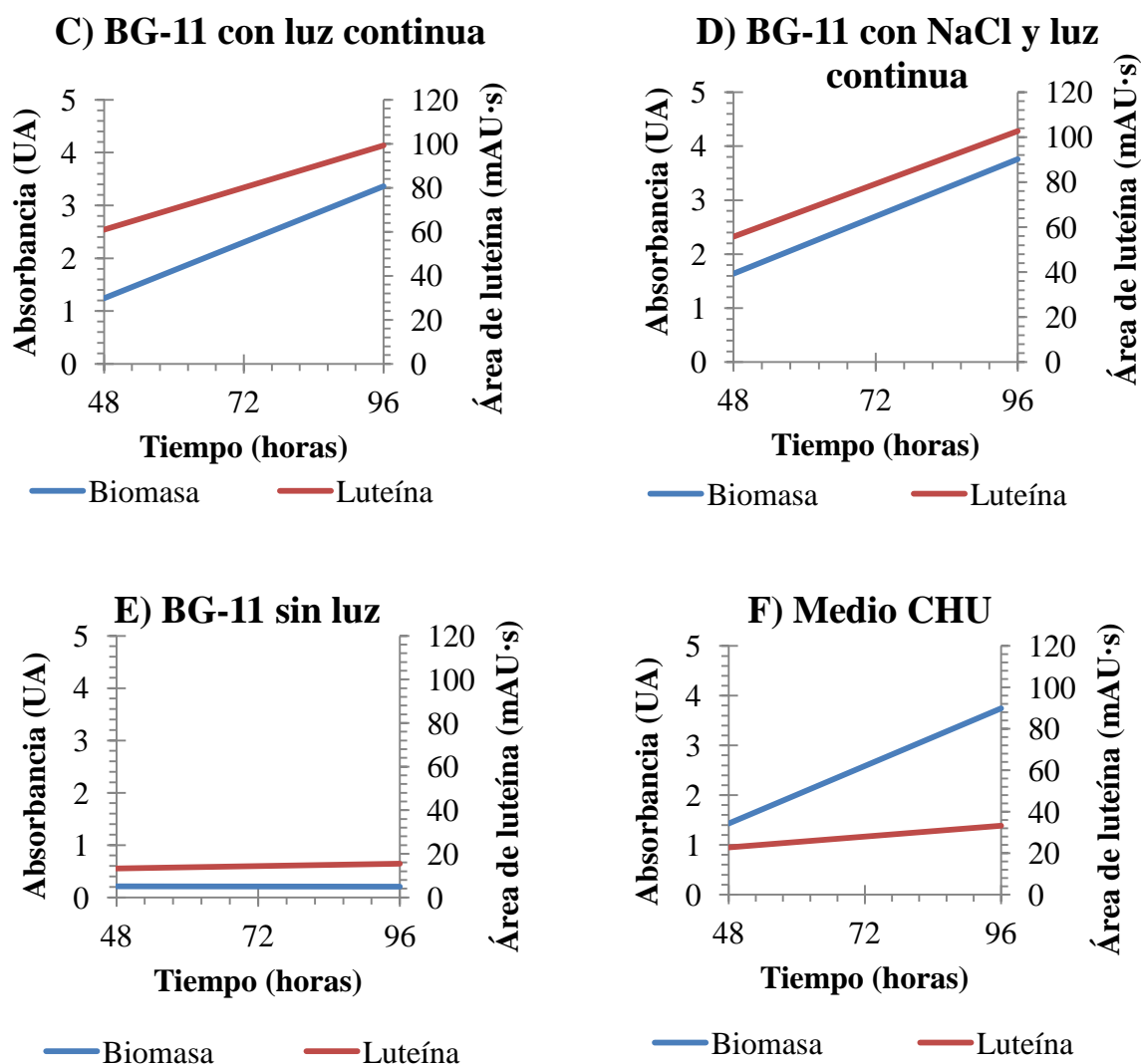


Figura 13. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 3)

La relación entre la biomasa y la producción de luteína generada se mantiene en todas las condiciones de la tercera tanda de cultivos.

En medio CHU se observa el mismo comportamiento, aunque a pesar de obtener una velocidad de crecimiento similar al medio control, la producción de luteína se ve disminuida en un 12 % respecto al control.

En cambio, la disponibilidad de luz las 24 horas del día, tanto en medio BG-11 como en presencia de sal, parece afectar positivamente a la cantidad de luteína producida, observando un incremento de 63 % y 64 % respectivamente. De hecho, puede observarse que se obtiene un crecimiento y una producción de luteína con una pendiente muy similar lo cual indicaría que en estas condiciones el crecimiento de la cepa y la producción de luteína están acoplados.

Sin embargo, en agua de grifo así como en ausencia de luz se observa un comportamiento distinto. A pesar de producirse un estancamiento en la generación de la biomasa se observa que hay mayor cantidad de luteína por unidad de biomasa, aunque las cantidades son muy pequeñas.

○ **Microalga RP028:**

Usando el mismo esquema que el seguido con la cepa 3707, se representa la media de las absorbancias frente al tiempo obteniendo los siguientes gráficos para el crecimiento de biomasa:

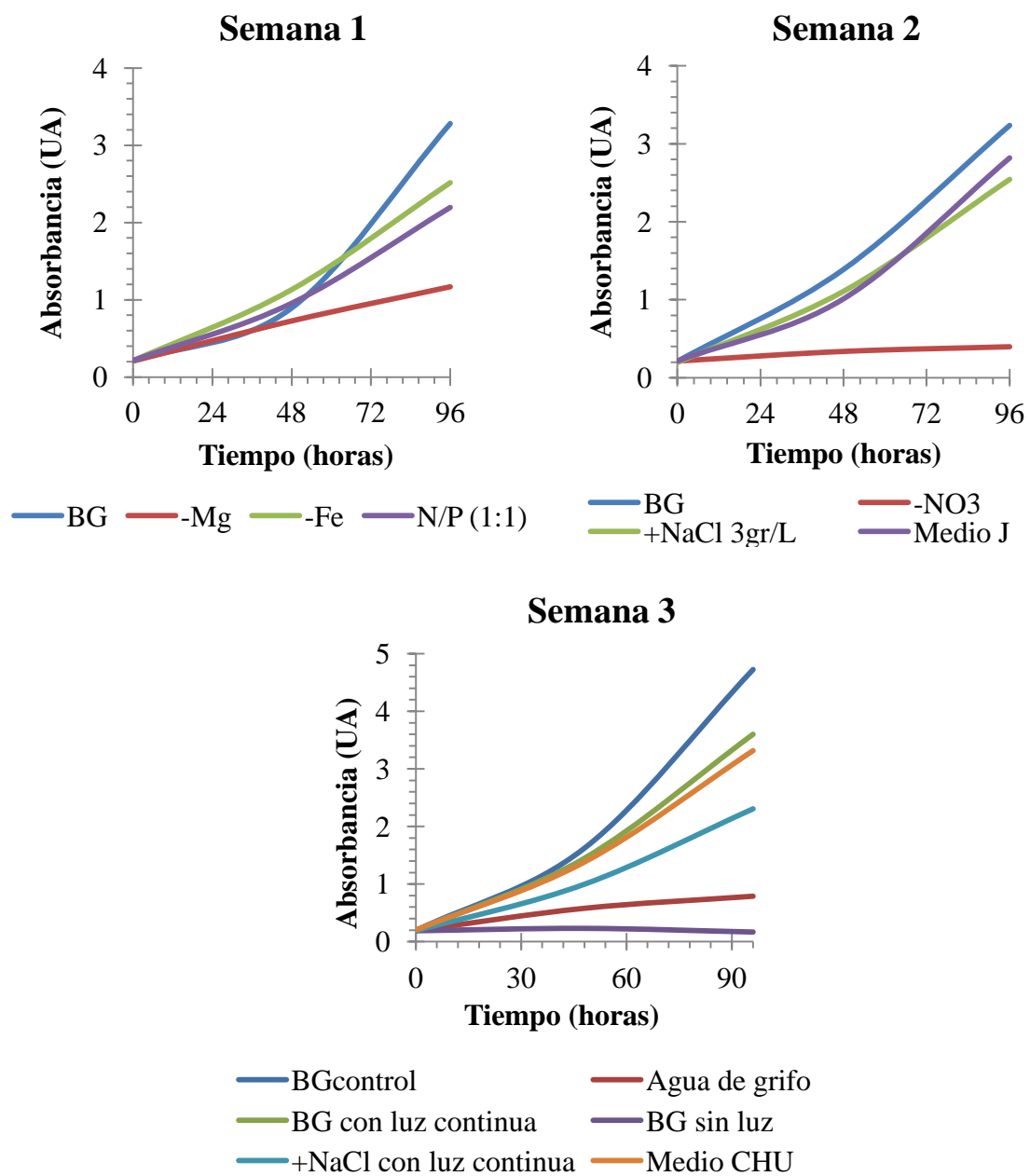


Figura 14. Crecimiento de biomasa para la cepa RP028. Los colores representan diferentes condiciones de cultivo



En esta cepa se observa que la mejor condición para la generación de biomasa es el medio BG-11 en las condiciones utilizadas como control. Además en medio J también se obtiene una buena velocidad de crecimiento, siendo tan solo un 13% menor que el control, como también ocurre en el caso de la cepa 3707 explicado con anterioridad.

La disponibilidad de luz de forma continua, genera en RP028, un retraso en la velocidad de crecimiento siendo este hasta un 24% más lento. Lo mismo sucede en presencia de sal donde se observa una disminución significativa de la velocidad de crecimiento, de un 51%.

A diferencia de la microalga 3707, la presencia de luz en la cepa RP028 parece afectar de manera negativa al crecimiento.

La ausencia de hierro en el medio provoca una disminución de crecimiento entorno al 24% y el exceso de fósforo parece producir aun un mayor efecto negativo, disminuyendo hasta un 33%.

La ausencia de magnesio, de luz, de nitratos así como en un medio con muy pocas sales (agua del grifo) parece afectar de forma similar en ambas microalgas, produciéndose un estancamiento en la generación de biomasa.

De la misma manera que en la cepa 3707, se determina la cantidad de luteína por HPLC, a modo de ejemplo se muestra en la *Figura 15* el cromatograma obtenido para la muestra BG-11 control, señalando el punto donde aparece la luteína:

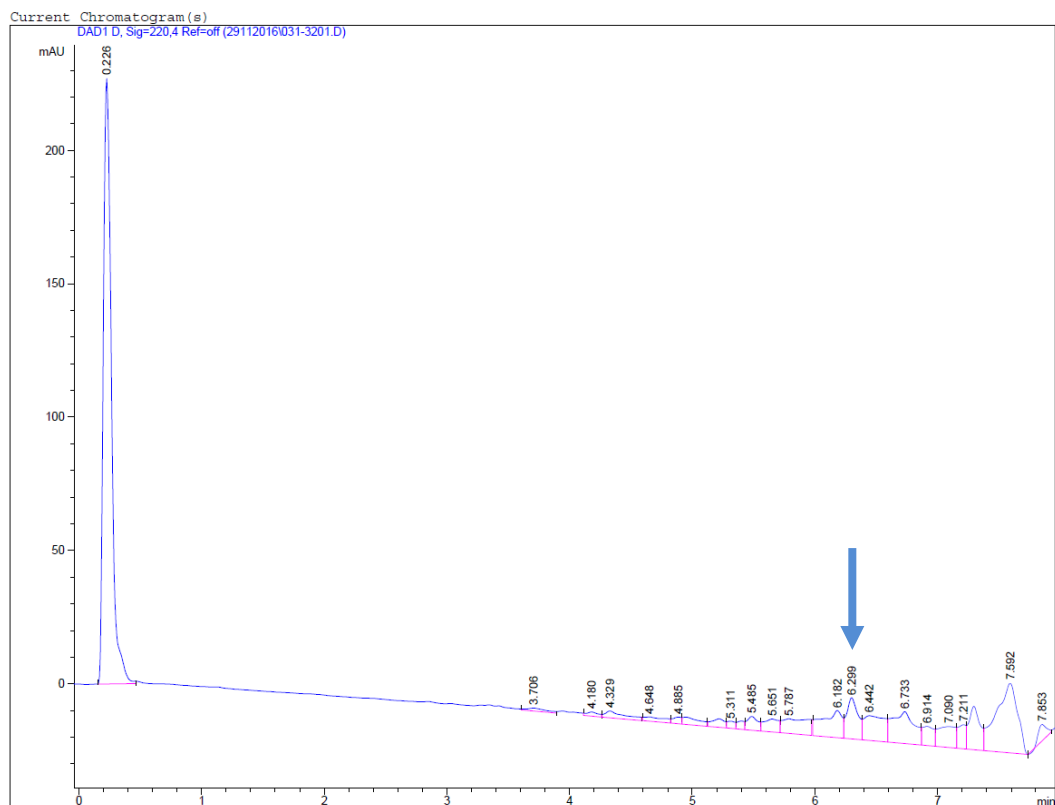


Figura 15. Cromatograma obtenido para la muestra control de la microalga RP028. La flecha indica el punto donde eluye la luteína

Si se solapan los cromatogramas obtenidos para las 48 y 96 horas en la cepa RP028 se obtiene:

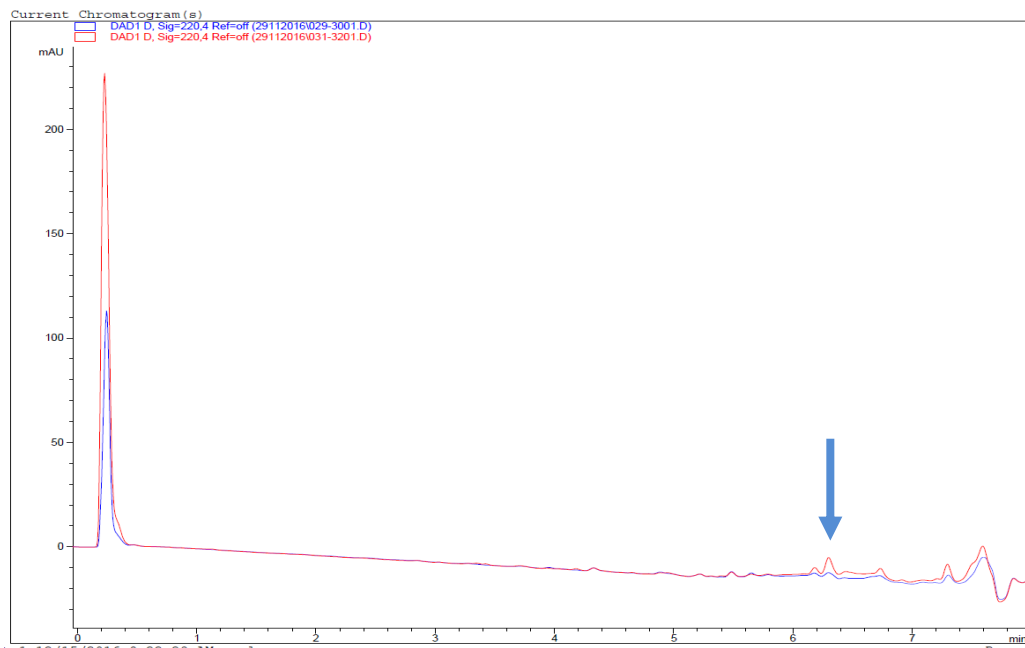


Figura 16. Solapamiento de cromatogramas de la muestra en medio control a las 48h (azul) y 96h (rojo). La flecha indica el pico que sitúa al carotenoide luteína

Como en la cepa 3707, se observa un aumento del pico de luteína a medida que transcurre el tiempo de cultivo.

En las siguientes gráficas se representan las áreas obtenidas para la luteína frente al tiempo:

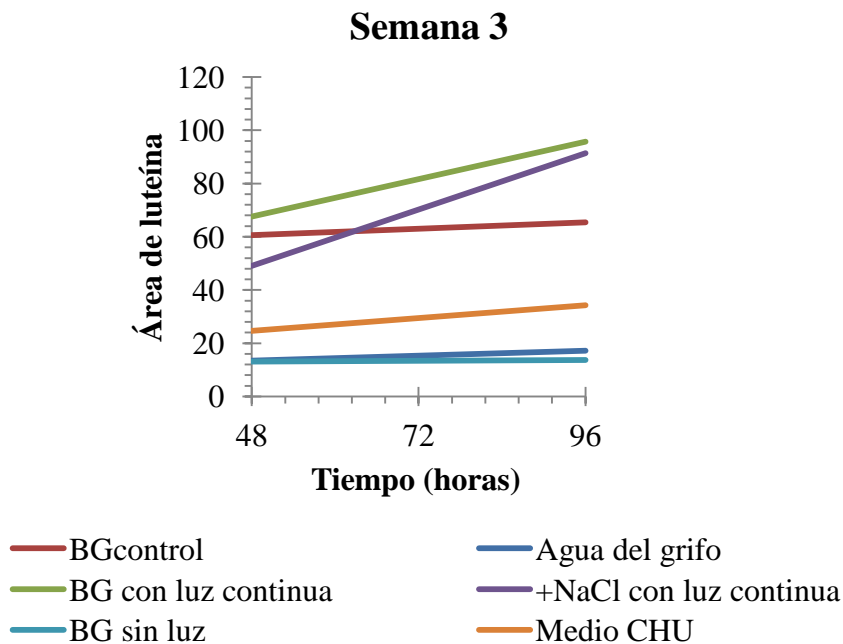
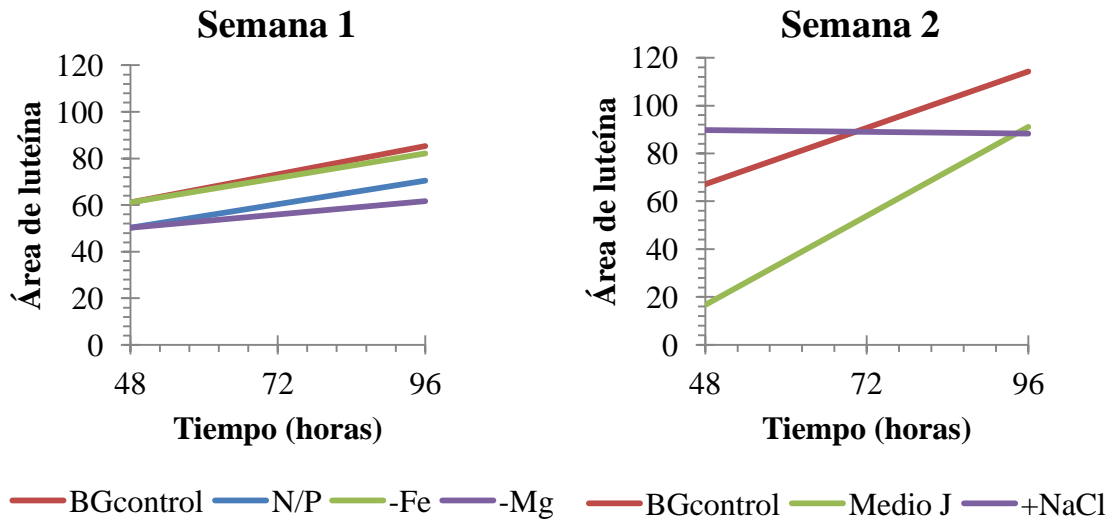


Figura 17. Producción de luteína en las distintas condiciones cultivo

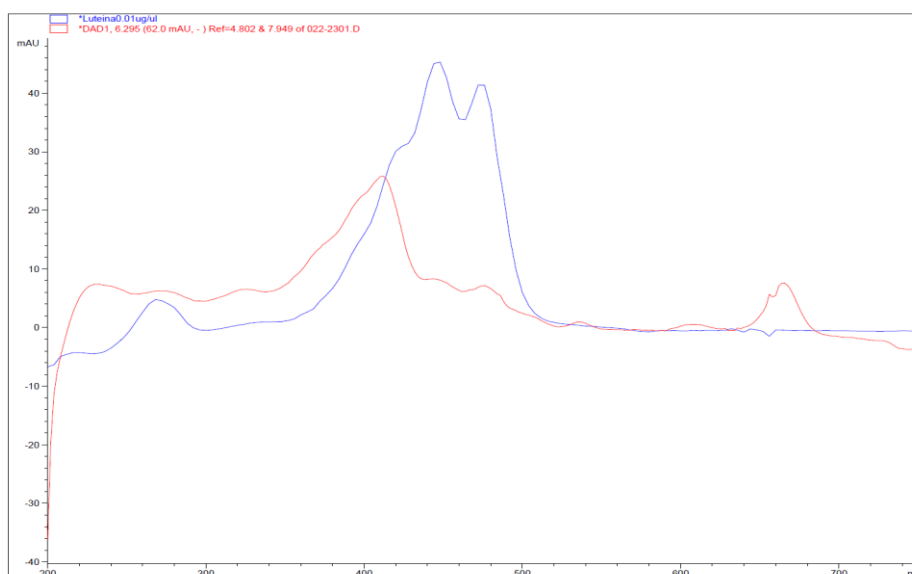
Durante las primeras 48 horas, en la microalga RP028, las condiciones de ausencia de hierro y, en presencia de NaCl y en medio BG-11, ambas con luz continua, es donde se observa una mayor velocidad de producción de luteína. En cambio, en las siguientes 48

horas, hasta las 96 horas finales, la presencia de sal parece ralentizar la producción mientras que las otras dos condiciones provocan un aumento de la misma.

La disponibilidad continua de luz durante 24 horas parece favorecer la producción, obteniendo un 32% más de cantidad de luteína. En presencia de sal y luz continua, el aumento de luteína es un 28% mayor que en el control. En medio J, se observa una menor producción en las primeras 48 horas respecto al control, en cambio posteriormente, en las 48 horas siguientes, la velocidad de producción es mayor que en las demás condiciones que se han probado, pero aun así, se obtiene menos cantidad de luteína que en las condiciones control.

El resto de condiciones (ausencia de magnesio, ausencia de luz, balance N/P<sub>1:1</sub>, presencia de sal y fotoperiodo, en agua del grifo y medio CHU) se observa que todas ellas afectan negativamente en la producción de luteína, obteniendo valores inferiores al control.

En este caso, no se han dando valores de luteína en el medio en ausencia de nitratos debido a la co-elución (dos compuestos con el mismo tiempo de retención en la columna cromatográfica) de dos compuestos diferentes en los perfiles de HPLC. Como se observa en el cromatograma de la *Figura 18* y comparando el espectro de absorción de diferentes secciones del pico de interés con el patrón de luteína se obtiene lo siguiente:



*Figura 18. Solapamiento del espectro de UV de la muestra en medio en ausencia de nitratos y de la clorofila.*

En este caso, se observan máximos de absorbancia de la luteína (cromatograma de color rojo) pero hay también máximos de absorbancia entorno a 400 nm y 680 nm que coinciden con los máximos de absorción de la clorofila *a*. Por tanto, se produce un solapamiento en la elución de los compuestos luteína y la clorofila *a*. Parece que la ausencia de nitratos reduciría la producción del carotenoide de interés.

Si se representa la biomasa en relación con el área de luteína presente en la muestra se obtienen los siguientes gráficos:

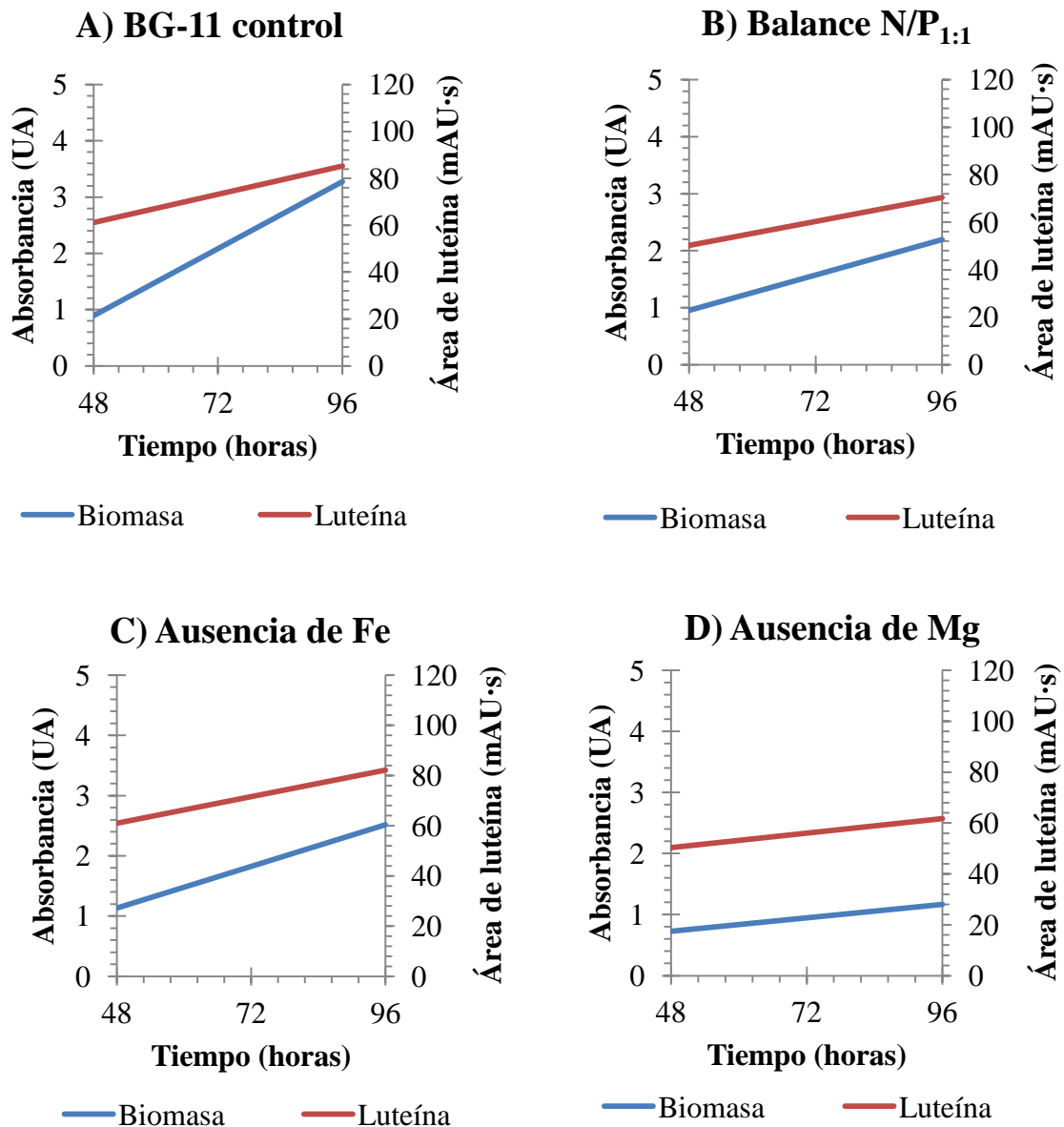


Figura 19. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 1)

Las condiciones de cultivo no parecen afectar de manera muy significativa en la producción de luteína con respecto al control.

La velocidad de producción de luteína es creciente en todos los casos aunque menos pronunciada en el caso de la ausencia de magnesio. Por tanto, parece que la ausencia de magnesio no disminuye la cantidad de luteína por unidad de biomasa, aunque el crecimiento se ve muy ralentizado por la ausencia de este elemento

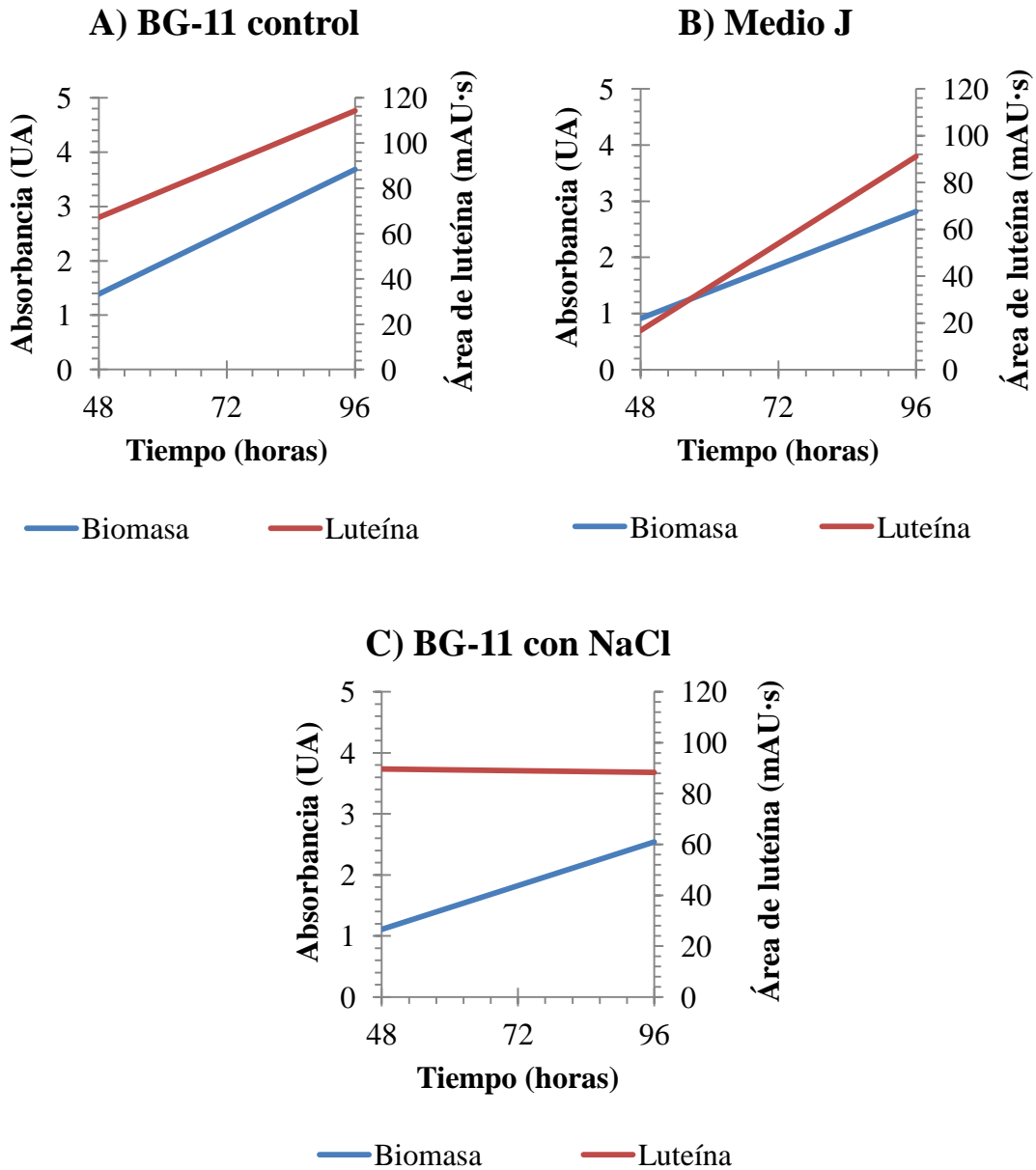


Figura 20. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 2)

En la Figura 20 (B) en la que se usa medio J, se obtiene una mayor velocidad de producción con respecto a la generación de biomasa. La pendiente indica un aumento en la velocidad de producción.

En cambio, la presencia de sal en esta microalga no favorece la producción de luteína. Se observa un estancamiento de la cantidad de luteína con respecto a la biomasa.

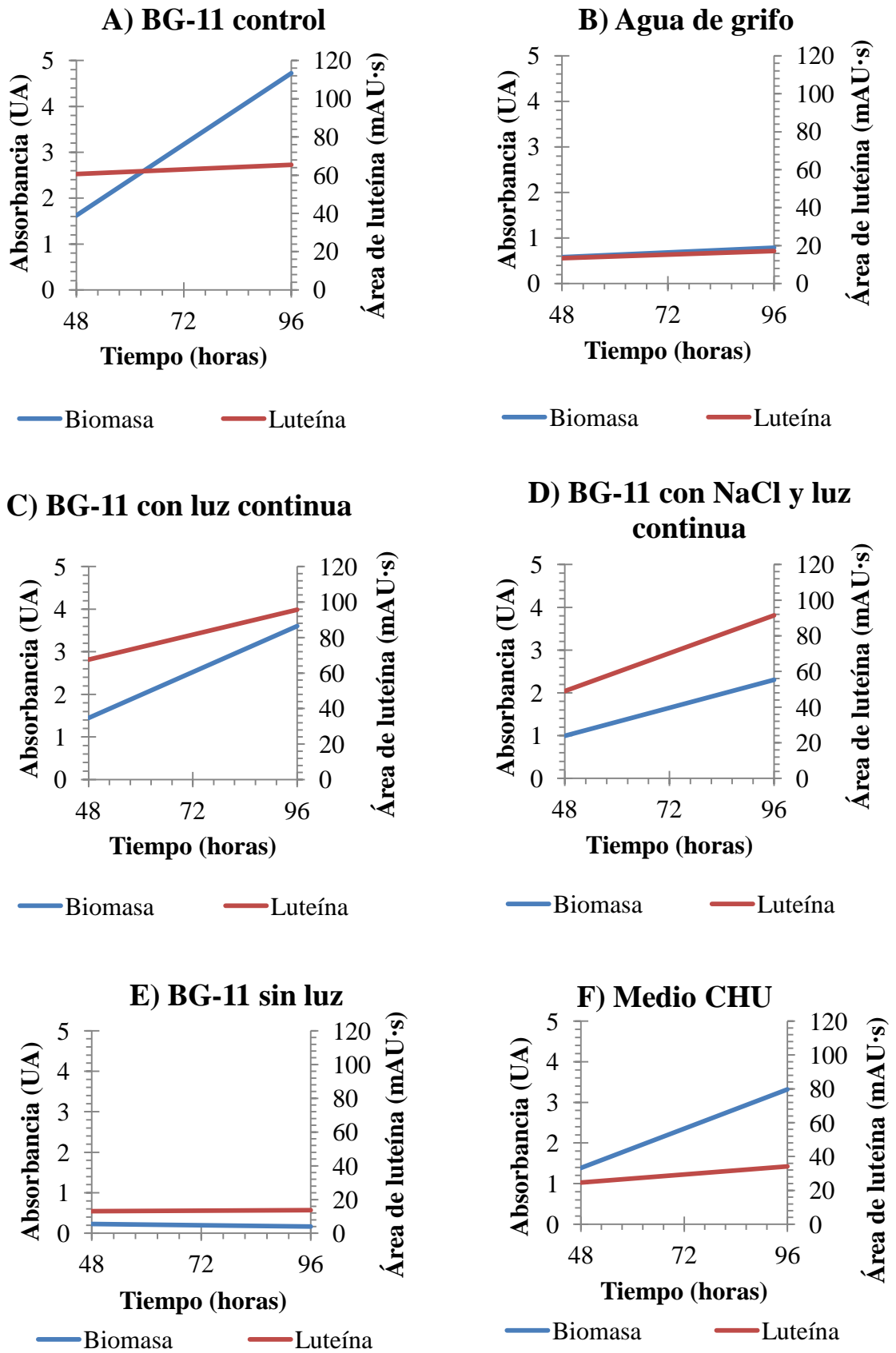


Figura 21. Relación entre el crecimiento de biomasa y la producción de luteína (semana 3)

En este caso es difícil explicar los resultados obtenidos en el medio control, es posible que este cultivo no haya seguido un patrón como en los casos anteriores. En la experimentación con microalgas, este es un factor que se presenta en algunos casos y debido a la premura de tiempos, no era posible la repetición de estos experimentos que habría sido necesaria para la correcta comparación con el resto de condiciones.

La disponibilidad de luz durante 24 horas parece mejorar la producción de luteína tanto en ausencia como en presencia de sal, aunque el crecimiento es más lento.

En cambio el medio CHU parece disminuir dicha producción. Se observa un aumento en la generación de biomasa pero se produce un estancamiento en la producción de luteína.

En ausencia de luz y de sales se observa un comportamiento distinto. A pesar de producirse una disminución en la generación de la biomasa se observa que hay mayor cantidad de luteína por unidad de biomasa, aunque las cantidades son muy pequeñas. Se observa una relación biomasa-luteína acoplada, puesto que existe un paralelismo en las rectas obtenidas.

## **VI. Conclusiones**

Tras los resultados obtenidos y discutidos en el apartado anterior, se puede concluir que:

- Las microalgas cultivadas en medio BG-11 con mayor velocidad de crecimiento son la 3707 y RP028.

- El medio BG-11 y el medio J son, en ambas microalgas, las 2 mejores condiciones para el crecimiento de biomasa.

- La disponibilidad de luz las 24 horas no afecta de la misma manera en ambas cepas: En la microalga 3707, parece haber una mejora del crecimiento, mientras que en RP028 se produce una disminución del mismo.

- La ausencia de luz, de nitratos y el uso de agua de grifo, provocan un comportamiento similar en ambas microalgas. Se produce un estancamiento del crecimiento, aunque la cantidad de luteína con respecto por unidad de biomasa aumenta



-La presencia de sal en el medio no mejora el crecimiento en ninguna de las dos microalgas.

- En un exceso de P (balance N/P<sub>1:1</sub>), ausencia de hierro y ausencia de magnesio, tienen un mayor efecto negativo en la microalga RP028 que en el caso de 3707.

- En cuanto a la producción de luteína, con respecto al control, la disponibilidad de luz continua tanto en el medio BG-11 como en presencia de sal producen un aumento de dicho carotenoide.

- En medio J, la cepa 3707 produce un aumento de la cantidad de luteína con respecto al control. En cambio en RP028 inicialmente la velocidad de producción es lenta pero después se produce un incremento considerable de la misma.

-La ausencia de nitratos, de magnesio, de luz, el uso de agua de grifo como medio de cultivo y la presencia de sal, provocan una disminución de la cantidad de luteína en ambas cepas. La ausencia de magnesio en RP028 produce una parada de producción de luteína.

-El resto de condiciones (ausencia de hierro, exceso de P y uso de medio CHU) no parecen afectar la producción de luteína con respecto a las medidas obtenidas en las condiciones control.

Las condiciones más favorables obtenidas podrían plantear otra serie de experimentos, como son los cultivos en dos fases: una primera fase con un medio que permitiese un crecimiento muy rápido, como se obtiene con el medio J y después retirar este medio y usar las condiciones que si bien producen una ralentización de crecimiento también aumentan la producción de luteína como cuando se usa oscuridad, o agua del grifo.

Estas ideas se comprobarán más adelante en Instituto Biomar S.A a partir de los resultados obtenidos en este trabajo para seguir el proceso de mejora de la producción de luteína en estas cepas.

## VII. Bibliografía

- Barker, D. J., Turner, S. A., Napier-Moore, P. A., Clark, M., Davison, J. E. (2009). "CO<sub>2</sub> Capture in the Cement Industry." *Energy Procedia*, 1(1), 87-94.
- Becker, E. W. (2004). "Microalgae in Human and Animal Nutrition." En: Richmond, A., Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, pp.312.
- Bolaños, E. R. A. (2008). "Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas". *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14(1), 8-12.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Guerra, L. H., Ruiz, C. A. (2003). "Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans". *The Journal of Nutrition*, 133(4), 992-998.
- Borowitzka, M. A. (2013). "High-value products from microalgae their development and commercialisation." *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756.
- Carpentier, S., Knaus, M., Suh, M. (2009). "Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 313-326.
- Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Collazo M., Rodés R. (2006). "Manual de prácticas de fotosíntesis". Las prensas de ciencias, pp.17.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2003). "Natural Colorants for Foods and Nutraceutical Uses", CRC Press, pp.113-157.
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. (2000). "Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta)". *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51-59.
- Del Campo, J. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. Á., Rivas, J., Guerrero, M. G. (2001). "Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor". *Journal of Biotechnology*, 85(3), 289-295.
- Del Campo, J. A., García-González, M., Guerrero, M. G. (2007). "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1163-1174.
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., Vitova, M. (2009). "Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 179-185.
- Dwyer, J. H., Navab, M., Dwyer, K. M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Merz, C. N. B. (2001). "Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis the Los Angeles atherosclerosis study". *Circulation*, 103(24), 2922-2927.
- Fernández Cordero, B. (2013). "Producción de Carotenoides por Microalgas y Caracterización de la Ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*". Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- García, M. D. C. C. (2013). "Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales". *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, (5), 87-105.
- García-Cañedo, J.C., Flores-Ortiz, C. M., Cañizares-Villanueva, R. O. (2011). "Carotenoid Profile and Content of the Green Microalgae *Scenedesmus incrassatulus*". *Journal of the American Dietetic Association*, 111(9), A94.
- García Cubero, R. (2014). "Producción de biomasa de microalgas rica en hidratos de carbono acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>". Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Acién-Fernández, G., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J. M., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I. (2009). "In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*". *Food Chemistry*, 114(2), 747-752.

Guerrero, M. G., Rodriguez, H., Vargas, M., García-González, M., Campo, J. A. D., Moreno, J., Rivas, J. (1999). "Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial". En: Herrero, C., Abalde, J., Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados. Universidad de A Coruña, pp.215-232

Jáuregui, M. E. C., Carrillo, M. D. L. C. C., Romo, F. P. G. (2011). "Carotenoides y su función antioxidante: Revisión". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233.

Krinsky, N. I., Landrum, J. T., Bone, R. A. (2003). "Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye". *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 171-201.

Kronick, M. N., Grossman, P. D. (1983). "Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates". *Clinical chemistry*, 29(9), 1582-1586.

Lewis, B. (2008). "Promoting eye and skin health through intake of the natural carotenoid lutein". En: De Meester, F., Ross Watson, D., Wild-type food in health promotion and disease prevention. Humana Press pp. 331-342.

Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., Mira, H. (2004). "Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (2), 149-154.

Moldovan, S. (2016). "Colorantes naturales para fibras textiles a partir de algas". Tesis de máster. Universidad Politécnica de Valencia.

Naranjo, V. (2014). "Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido". Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.

Richmond, A. (2004). "Biological principles of mass cultivation". En: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, pp.125-177.

Roberts, R. L., Green, J., Lewis, B. (2009). "Lutein and zeaxanthin in eye and skin health". *Clinics in Dermatology*, 27(2), 195-201.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). "A guide to carotenoid analysis in foods", ILSI press, pp. 65.

Sánchez, J. F., Fernández-Sevilla, J. M., Acién, F. G., Cerón, M. C., Pérez-Parra, J., Molina-Grima, E. (2008). "Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 719-729.

Sánchez J.F., Fernández, J.M., Acén F.G., Rueda A., Pérez-Parra J., Molina E. (2008) " Influence of culture condicions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*" *Process Biochemistry*, 43(4), 398-405.

Shi, X. M., Zhang, X. W., Chen, F. (2000). "Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources". *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3), 312-318.

Singh, J. S., Pandey, V. C., Singh, D. P. (2011). "Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development". *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3), 339-353.

Snellen, E. L. M., Verbeek, A. L. M., Van Den Hoogen, G. W. P., Cruysberg, J. R. M., Hoyng, C. B. (2002). "Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake". *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 80(4), 368-371.

UTEX Culture collection of Algae, The University of Texas at Austin. "Chu's Medium". Recuperado de <http://utex.org>

UTEX Culture collection of Algae, The University of Texas at Austin. "J Medium". Recuperado de <http://utex.org>

Van Den Hende, S., H. Vervaeren, N. Boon (2012). "Flue gas compounds and microalgae: (bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities". *Biotechnology Advances*, 30(6), 1405-1424.

Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1981). "Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments". En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., *The prokaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 221-223.