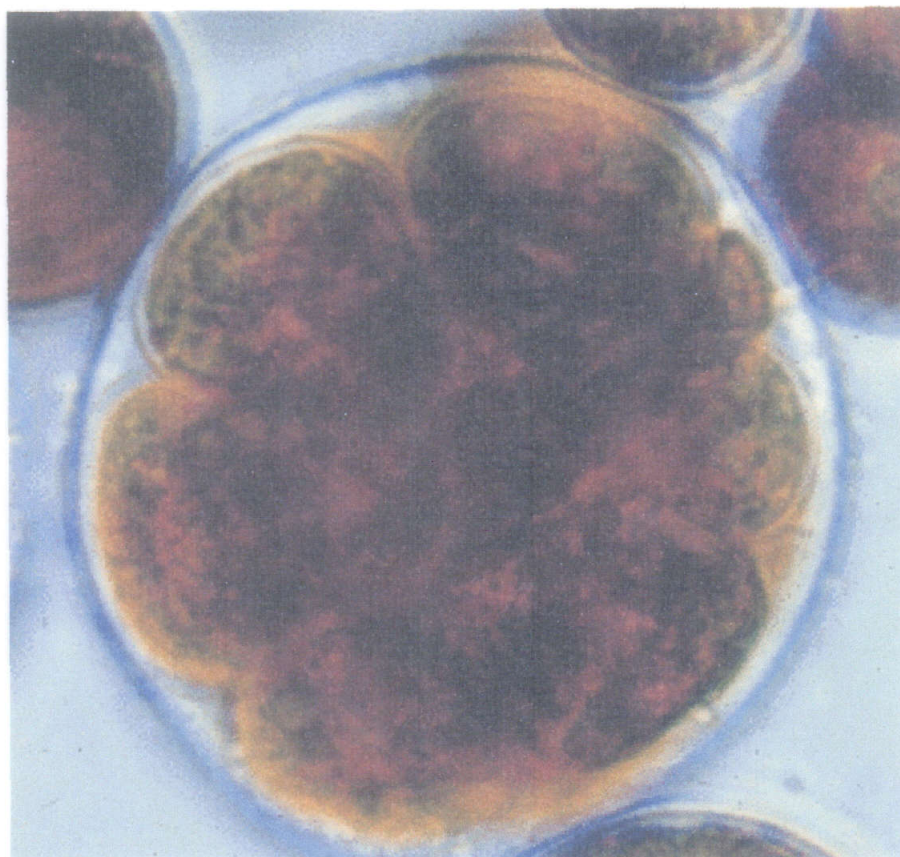




INSTITUTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y  
FOTOSÍNTESIS  
(CSIC-UNIV. SEVILLA)



**SELECCIÓN DE ESTIRPES DE MICROALGAS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE INTERÉS  
COMERCIAL. PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR LA  
CLOROFÍCEA *Muriellopsis* sp.**



**José Antonio del Campo Castillo  
Sevilla, 2000**

TD

7-11-2000

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
NEGOCIADO DE TESIS

---

Queda registrado este Título de Doctor al  
folio 32..... número 395..... del libro  
correspondiente.

Sevilla, **1 DIC. 2000**

El Jefe del Negociado.

*Alvaro Caffo*

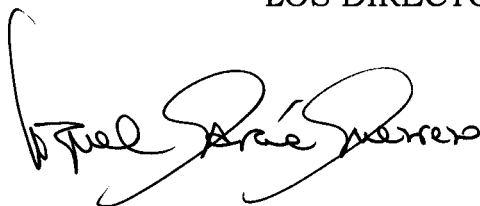
**SELECCIÓN DE ESTIRPES DE MICROALGAS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE INTERÉS COMERCIAL.  
PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR LA CLOROFÍCEA  
*Muriellopsis sp.***

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por el  
Licenciado José Antonio del Campo Castillo



Sevilla, Noviembre del 2000

**LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

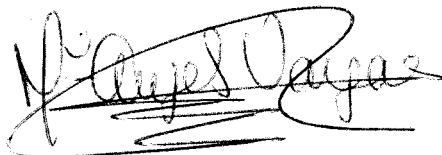


Prof. Miguel García Guerrero



Dr. Joaquín Rivas Florido

**EL TUTOR**



Prof. M<sup>a</sup> Ángeles Vargas Muñoz

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro mixto Universidad de Sevilla-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los profesores D. Miguel García Guerrero y D. Joaquín Rivas Florido, a quienes deseo expresar mi más sincero y profundo agradecimiento por haberme acogido en su grupo, así como por su demostración de interés y apoyo en mi formación científica.

Agradezco también al resto de componentes del grupo, Pilar Alcántara, Mercedes García, M<sup>a</sup> José Figueroa, José Moreno, Rocío Pérez, Herminia Rodríguez y M<sup>a</sup> Ángeles Vargas, su ayuda y colaboración tanto personal como profesional. No puedo dejar de mencionar el apoyo recibido de muchísimos componentes del Instituto, especialmente de D<sup>a</sup> Antonia Friend, quienes a lo largo de estos años han aportado su granito de arena para que este trabajo sea una realidad. Esta relación de personas sería bastante larga, y para evitar cometer el gran error de dejar alguno “fuera del saco”, digo simplemente GRACIAS.

También mi agradecimiento para aquellos que fuera del ámbito del Instituto, amigos y familiares, me han mostrado su apoyo e interés. Especialmente a M<sup>a</sup> Félix, gracias por todo.

Por último, mi gratitud a las siguientes instituciones y entidades por su apoyo económico y material: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, y Plan Andaluz de Investigación.

*a mis padres*

## ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
I.A. Biotecnología de microalgas.....	3
I.B. Cultivos de microalgas.....	6
I.C. Las microalgas como productores de compuestos de interés.....	9
I.C.1. Compuestos antioxidantes.....	10
I.C.2. Vitaminas.....	10
I.C.3. Ficobiliproteínas.....	11
I.C.4. Lípidos y ácidos grasos.....	12
I.C.5. Polisacáridos.....	13
I.C.6. Carotenoides.....	14
<b>II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
II.A. Material biológico.....	27
II.B. Composición del medio de cultivo.....	28
II.C. Cultivo en cámara climatizada.....	30
II.D. Cultivo en quimiostato.....	32
II.E. Cultivo en fotobiorreactor tubular cerrado.....	34
II.F. Métodos y determinaciones analíticas.....	37
II.F.1. Determinación del número de células.....	37
II.F.2. Determinación del peso seco.....	38
II.F.3. Determinación de clorofila.....	38
II.F.4. Determinación del crecimiento por turbidez.....	39
II.F.5. Determinación de componentes moleculares.....	40
II.F.5.1. Determinación de proteínas y carbohidratos.....	40
II.F.5.1.1. Extracción de proteínas y carbohidratos.....	40
II.F.5.1.2. Determinación de proteínas.....	40
II.F.5.1.3. Determinación de carbohidratos.....	41
II.F.5.2. Determinación de lípidos y ácidos nucleicos.....	43
II.F.5.2.1. Extracción de lípidos y ácidos nucleicos.....	43
II.F.5.2.2. Determinación de lípidos.....	43
II.F.5.2.3. Determinación de ARN total.....	45

II.F.5.2.4. Determinación de ADN.....	46
II.F.5.3. Determinación de carotenoides.....	48
II.F.5.4. Saponificación de extractos.....	50
II.F.6. Análisis elemental.....	51
II.F.7. Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación.....	54
II.F.8. Determinación de la producción de pigmento en cultivo continuo.....	54
II.F.9. Medidas espectrofotométricas.....	55
II.F.10. Medida de la luz incidente en los cultivos.....	55
II.G. Determinación de actividades enzimáticas.....	55
II.G.1. Determinación de la actividad glutamina sintetasa.....	55
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
III. 1. Selección de estirpes.....	59
III. 2. El caso de <i>Muriellopsis</i> sp.....	62
III. 2.1. Efecto de factores ambientales y nutricionales sobre el crecimiento y contenido de carotenoides de <i>Muriellopsis</i> sp. ....	62
III. 2.1.1. Efecto de la intensidad de luz.....	62
III. 2.1.2. Efecto de la concentración de NaCl.....	65
III. 2.1.3. Efecto conjunto de la irradiancia y adición de NaCl.....	67
III. 2.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno y su concentración.....	69
III. 2.1.5. Inhibición de la asimilación de nitrógeno.....	76
III. 2.1.6. Efecto de la temperatura.....	78
III. 2.1.7. Efecto del pH.....	82
III. 2.1.8. Cultivos mixotróficos de <i>Muriellopsis</i> sp. ....	84
III. 2.1.9. Efecto de radicales de oxígeno.....	86
III. 2.2. Cultivo en Fotoquimiostato.....	88
III. 2.2.1. Producción de luteína en cultivo continuo.....	88
III. 2.2.2. Efecto de la tensión de oxígeno sobre la producción de luteína.....	92





<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>131</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>155</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>159</b>

# INTRODUCCIÓN

## I. Introducción

Las microalgas constituyen un grupo amplio de microorganismos procarióticos y eucarióticos, que tienen como denominador común contener clorofila *a* y otros pigmentos, siendo capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica, empleando el agua como donador de electrones. Algunas microalgas pueden utilizar el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno. Son las cianobacterias, o algas verde-azuladas fijadoras de dinitrógeno.

Las microalgas conforman un grupo bastante heterogéneo, con gran variedad de formas y tamaños, y poblando la práctica totalidad de ecosistemas acuáticos, encontrándose también en suelos, rocas, plantas, cortezas de árboles, etc. Actualmente se conocen unas 30.000 especies de microalgas, cuya clasificación ha ido modificándose significativamente con el tiempo (South y Whittick, 1987; Ben-Amozt y Avron, 1989; Richmond, 1990).

### I.A. Biotecnología de microalgas

A lo largo de la Historia, las microalgas han venido empleándose para distintos fines, encontrándose entre los primeros su uso como alimento para consumo animal y humano. Las primeras noticias acerca de la utilización de las microalgas como alimento por el hombre se remontan al siglo XVI. En esta época, Bernal Díez del Castillo describió uno de los muchos productos que se vendían en el mercado de Tenochtitlán, población que dio origen a la actual capital de México, como sigue: *“pues pescaderas y otros que vendían unos panecillos que hacen de uno como lama (cieno del agua) que cogen de aquella gran laguna (lago Texcoco), que se cuaja y hacen panes dello que tienen un sabor a manera de queso”*. No hay duda que ese producto que utilizaba el pueblo azteca como alimento se componía de materia seca de *Spirulina máxima* (Foto 1), alga verde-azulada con forma espiral, que en

la actualidad sigue empleándose como base de una serie de complementos dietéticos disponibles en establecimientos especializados.

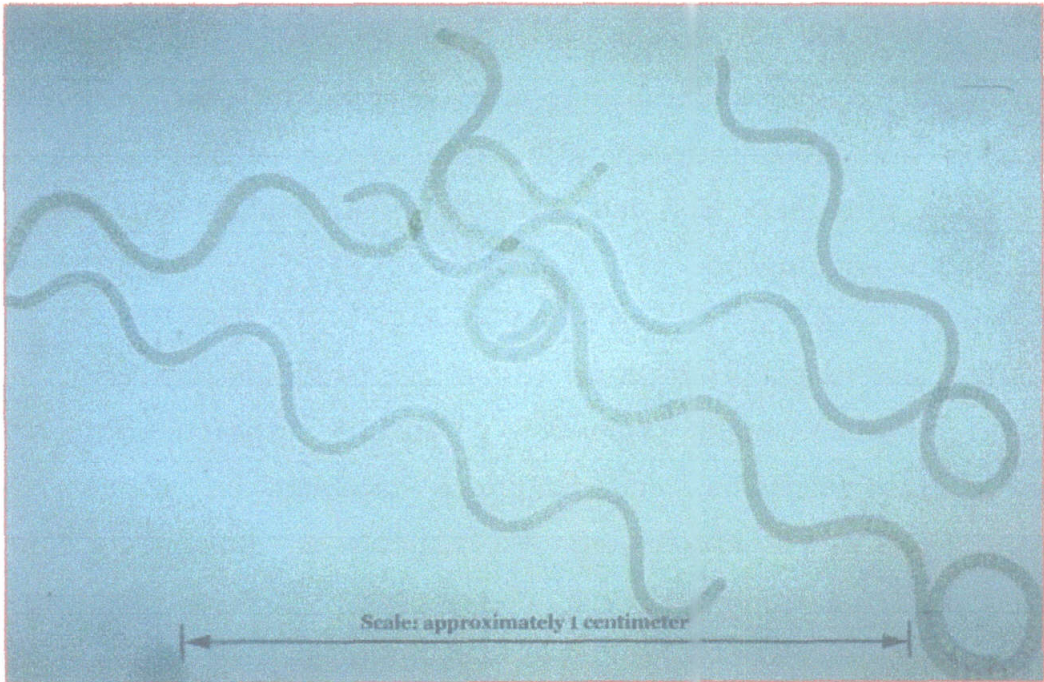


Foto 1. *Spirulina* sp., una de las microalgas de mayor impacto comercial dada la gran variedad de productos de tipo dietético que de ella se pueden obtener.

La idea de producir microalgas a gran escala tuvo su origen en Alemania, en los años cuarenta, donde se llevó a cabo el cultivo en masa de diatomeas, que mostraban la capacidad de acumular cantidades apreciables de lípidos bajo condiciones de laboratorio, en cultivos limitados en nitrógeno (Harder y von Witsch, 1942). Durante estos años, también tuvo gran importancia la investigación sobre el potencial del alga verde *Chlorella*, observándose que podía doblar su biomasa varias veces al día cuando se cultivaba a alta intensidad de luz, en condiciones de laboratorio. La meta principal fue la utilización de esta microalga para la producción de proteína (“single cell protein” SCP), intentando mantener, para sistemas de cultivo a gran escala, la alta productividad observada en el laboratorio. Esta incipiente investigación fue realizada por un grupo de científicos en la *Carnegie Institution of Washington*, quienes reunieron sus experiencias en el ya

clásico manuscrito "*Algal culture from laboratory to pilot plant*" (Burlew, 1953).

Otro centro importante en esos años fue el Instituto Tokugawa de Tokio, en el que se llevaron a cabo una serie de estudios de laboratorio y planta piloto al aire libre sobre el cultivo de *Chlorella*. Se evaluó el coste de la producción de una tonelada de alga seca de *Chlorella*, resultando ser considerablemente más alto que la producción de materiales proteicos convencionales tales como la harina de soja o de pescado (Tamiya, 1957). A pesar de esto, desde los años setenta se comercializa con éxito el alga *Chlorella* en Japón y Taiwan, con una gran aceptación como alimento dietético y medicinal. El tradicional consumo de algas macroscópicas en el Lejano oriente favoreció la aceptación de las microalgas, convirtiéndose así Japón en el primer país en que se comercializó una microalga.

A lo largo del tiempo se han planteado usos alternativos a la aplicación alimentaria, indicada anteriormente, para las microalgas. Así, a principios de los años cincuenta se planteó el uso de cultivos de microalgas a gran escala para el tratamiento de aguas residuales urbanas, acoplada a la producción simultánea de biomasa rica en proteínas para el ganado. Como resultado final se pretende la depuración del agua y la producción de una biomasa de algas y bacterias susceptible de posterior aplicación práctica (Oswald, 1988).

Durante los años 70 se hicieron notables esfuerzos encaminados a la utilización de fuentes alternativa de energía, en previsión de la escasez y encarecimiento de productos derivados del petróleo. Así, la conversión biológica de la energía solar atrajo gran interés a escala mundial (Guerrero, 1982). Dado que las microalgas constituyen un sistema eficiente para la captación de la energía solar, existe un continuo interés en el empleo de sistemas de algas para la producción de compuestos de interés energético.

A consecuencia de los problemas económicos encontrados en la aproximación de la producción de microalgas con fines alimenticios, se desarrollaron distintas experiencias encaminadas a la reducción del costo de la producción de biomasa de microalgas. Siguiendo otro enfoque, en lugar de intentar producir sustancias proteicas de bajo valor comercial, se desarrollaron esfuerzos para la generación de compuestos de alto valor añadido liberados al medio o integrantes de la biomasa de algunas microalgas. Aunque hasta el momento son pocos los compuestos de microalgas que han tenido éxito comercial, todavía existe un gran número de especies de microalgas en las que evaluar su capacidad para producir compuestos de interés.

Actualmente, la gran mayoría de las plantas industriales para el cultivo de microalgas está localizada en Asia. Existen alrededor de 110 productores comerciales de microalgas en la costa asiática del Pacífico, cuya mayoría ha entrado en funcionamiento en los últimos 10 años, con una capacidad de producción anual entre 3 y 500 toneladas, lo que supone la mitad de la producción mundial. Esta rápida y reciente expansión se puede atribuir, en parte, al creciente mercado para los productos dietéticos y, en parte, al cierre a mediados de los años 90 de la mayor planta de producción de *Spirulina*, Sosa Texcoco de México (área de cultivo de 430.000 m<sup>2</sup> con una producción de unas 300 t por año).

En la actualidad no existen plantas de producción comercial fuera de la costa del Pacífico con una producción anual superior a las 25 t, a excepción de la Nature Beta Technologies, Ltd (NBT) en Eilat, Israel, con un área de producción de 50.000 m<sup>2</sup> y que produce 25 t de *Dunaliella bardawii* ó 1,5 t de  $\beta$ -caroteno, aunque es de propiedad japonesa (Nikken Sosa Corporation). Existen algunas pequeñas plantas de producción en la República Checa y Alemania (Lee, 1997).

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

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

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

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

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

Por último, en Australia existen dos compañías productoras de *Dunaliella*. Betatene Ltd. tiene una superficie de estanques de cultivo sin agitación de 4.600.000 m<sup>2</sup> que producen entre 7 y 10 t de  $\beta$ -caroteno al año. Esta compañía comercializa gran variedad de productos. La otra planta de producción pertenece a la Western Biotechnology Pte. Ltd, con una superficie de cultivo de 2.500.000 m<sup>2</sup> y una producción aproximada de 6 t de  $\beta$ -caroteno. Los principales mercados para estos productos son Japón, Estados Unidos, Corea y Europa.

### I.B. Cultivo de microalgas

La productividad de los cultivos de algas a la intemperie viene principalmente determinada por dos variables medioambientales que son prácticamente incontrolables: temperatura y luz solar. Existen, sin embargo, factores biológicos y tecnológicos con gran influencia sobre la productividad de los cultivos de algas, cuya optimización debe considerarse en el diseño y operación de plantas de cultivo masivo. De



hecho, la carencia de un conocimiento profundo de los principios biológicos subyacentes al cultivo de microalgas representa una de las principales limitaciones al desarrollo de la biotecnología de estos organismos.

Los nutrientes han de estar presentes a concentraciones que no sean limitantes para el crecimiento, debiendo asimismo conseguirse que las células del cultivo aprovechen en forma óptima la energía solar incidente. Otro factor de gran importancia es la cuidadosa selección del alga a cultivar. De hecho, las estirpes de microalgas que se han utilizado hasta ahora para su cultivo con propósitos prácticos, representan una fracción mínima de los muchos miles de especies existentes, debiendo considerarse seriamente el empleo de otras nuevas. A la hora de seleccionar microalgas para su cultivo a la intemperie debe prestarse especial atención a factores tales como la velocidad de crecimiento, tolerancia a extremos de temperatura e irradiación solar, calidad de la biomasa, resistencia al estrés ambiental, facilidad de recogida y cualquier otra característica selectiva de interés, teniendo muy en cuenta las condiciones prevalentes en el lugar específico de cultivo. Por otra parte, se hace imperativo establecer condiciones que beneficien concretamente el crecimiento del alga seleccionada e impida el de otros organismos que puedan contaminar el cultivo. A este respecto, debe perseguirse el empleo de estirpes de microalgas, a ser posible autóctonas de la zona en que se realicen los cultivos, con tolerancia a una serie de condiciones que sean restrictivas para el desarrollo de otras algas o depredadores y, en general, con alta resistencia ambiental frente a las alteraciones del medio, naturales o inducidas (Becker, 1994).

Para el cultivo de microalgas a gran escala se han diseñado y empleado distintos sistemas abiertos al aire, que incluyen estanques horizontales de varios tipos, así como unidades de cultivo inclinadas. El cultivo en sistema abierto combina características típicas de cultivos

agrícolas (uso extensivo del terreno, agua y nutrientes, así como dependencia del clima y la radiación solar) con otras propias de procesos industriales para el cultivo de microorganismos, tales como operación continua, suministro de nutrientes a concentración óptima y control de procesos.

El sistema de cultivo más empleado actualmente a escala industrial es, sin duda, el de tipo intensivo, consistente en un estanque horizontal de poca profundidad abierto al aire, constituido por dos o más pistas niveladas, de 2 a 10 m de ancho y 15-30 cm de profundidad. Estos canales tienen el piso y las paredes recubiertos por una capa de polietileno o cloruro de polivinilo y se disponen contiguos y separados por tabiques, pudiendo adoptar la forma de un sistema de meandros. Cada unidad de cultivo cubre un área que oscila entre varios cientos y varios miles de metros cuadrados. La turbulencia necesaria se crea por acción de paletas, hélices o bombas, que determinan que la suspensión celular fluya a lo largo de los canales a una velocidad de 0,2-0,5 m s<sup>-1</sup>. El sistema se opera extrayendo la suspensión de manera continuada o intermitente y devolviendo al estanque el líquido sobrante una vez recogidas las células. La concentración de los diferentes nutrientes se mide a intervalos regulares, corrigiéndose para mantener valores óptimos. El suministro de CO<sub>2</sub> puede controlarse por medio de pHstato y una válvula solenoide, de forma que insufla CO<sub>2</sub> cuando el pH suba por encima de un valor crítico, hasta establecer el pH deseado. Este sistema intensivo es el mayoritariamente utilizado en las plantas de producción de microalgas por las distintas compañías establecidas comercialmente, incluyendo a las productoras de β-caroteno, Microbio Resources Inc. (EE.UU) y Natura Beta Technology (Israel).

Otros sistemas de cultivo de microalgas al exterior son los de tipo extensivo, que utilizan estanques de gran superficie (entre 5 y 50 ha) sin agitación mecánica, orientados de forma que la turbulencia ocasionada por los vientos predominantes en la zona permita una cierta

homogeneización y movimiento de la masa líquida. El medio de cultivo es de tipo basal, con adición de fuentes de nitrógeno y fósforo, aunque no CO<sub>2</sub>. La velocidad de crecimiento y densidad celular del cultivo son lógicamente menores que en los otros sistemas descritos. La tecnología extensiva (también denominada semi-intensiva) sólo se ha puesto en práctica a nivel comercial en Australia por las compañías Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd., para la producción de *Dunaliella* con alto contenido en β-caroteno (Borowitzka L.J., 1992; Borowitzka M.A., 1992).

Hace unos años se han puesto en funcionamiento, con carácter experimental una variedad de fotobiorreactores cerrados, entre los que predominan los sistemas tubulares, consistentes en ensamblajes de tubos de polietileno transparente dispuestos en el suelo o sumergidos en agua, que actuaría como elemento termostatizador del cultivo (Boussiba, 1993). Los reactores cerrados (sistema de cultivo hiperintensivo) se aplicarían fundamentalmente al caso de productos de alto valor comercial, ya que tanto la instalación como su mantenimiento comportan mayores costos que los de los sistemas abiertos, si bien permiten mantener altas densidades celulares y la axenia del cultivo, así como un control más estricto y automatizado de las condiciones de crecimiento y del proceso de producción.

### I.C. Las microalgas como productores de compuestos de interés

La generación de productos de interés comercial (pigmentos, sustancias antioxidantes, vitaminas, ácidos grasos, etc.) constituye un aspecto central de la biotecnología de microalgas, microorganismos autotróficos para los que se han descrito una amplia variedad de aplicaciones prácticas (Cohen, 1986; Benemann y col., 1987; Richmond, 1990; Rodríguez y Guerrero, 1992). Estos pueden acumularse como parte de la biomasa de microalgas o, en algunos

casos, liberarse al medio externo. Las microalgas han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas, tales como sintetizar sustancias mucilaginosas extracelulares para protegerse del estrés hidrodinámico o acumular pequeñas moléculas intracelulares para solventar problemas de osmorregulación en medios salinos. Del mismo modo, pueden variar su contenido en pigmentos fotoprotectores o accesorios a la fotosíntesis, para adaptarse a cambios en la irradiancia, así como acumular productos específicos para protegerse de situaciones de limitación de algún nutriente, etc. Por tanto, si estas condiciones se simulasen en los sistemas de cultivo, podría conseguirse que el metabolismo celular se dirija hacia la biosíntesis de productos de interés comercial (Gudin y Thepenier, 1986). Los compuestos relativamente bien estudiados son pocos, entre los que destacan carotenoides, ficobiliproteínas, lípidos y polisacáridos, provenientes de las microalgas más consideradas hasta ahora a este respecto, tales como *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Porphyridium*. Entre estos compuestos con interés comercial sobresalen los carotenoides, pigmentos fotosintéticos accesorios, que pueden presentarse en cantidades sustanciales en las células de determinadas microalgas, y para los que estos organismos representan una fuente biológica idónea y casi exclusiva. Dado que estos compuestos constituyen el eje central de esta memoria, se tratarán posteriormente con mayor detalle.

#### I.C.1. Compuestos antioxidantes

En lo concerniente a la producción de sustancias antioxidantes, existen una variedad de sistemas antioxidantes biológicos de gran interés en farmacología y cosmética, tales como superóxido dismutasa, peroxidasa, vitaminas (C y E), etc., para los que las microalgas pueden representar interesantes sistemas productores (Cohen, 1986). La superóxido dismutasa, que desintoxica las células del anión superóxido, se utiliza comercialmente como alimento dietético y como agente

terapéutico contra el cáncer y otras enfermedades. Este enzima se ha purificado de *Spirulina* y *Porphyridium*, estando actualmente en el estado de ensayos clínicos. También en este caso se requiere la realización de estudios de selección de estirpes y de condiciones de sobreproducción, aunque en general las condiciones que favorezcan los procesos (foto)oxidativos deben resultar en la acumulación de uno o más de los compuestos y sistemas antioxidantes biológicos indicados.+

### I.C.2. Vitaminas

Algunas vitaminas de alto interés comercial, en concreto B<sub>12</sub> y E, se producen por algunas microalgas, aunque de hecho son pocos los estudios realizados respecto al contenido vitamínico de las microalgas o de su excreción al medio de cultivo. Tampoco se conoce mucho acerca de las condiciones que favorecen la síntesis de alguna vitamina en particular (Borowitzka M.A., 1988). Bajo algunas condiciones de cultivo, se han detectado en *Haematococcus pluvialis* y *Porphyridium cruentum*, mezclas de tocoferoles y derivados, presentes en la fracción liposoluble no saponificable, demostrándose que un mol de tocoferol puede proteger 220 moles de ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación. Las principales fuentes de tocoferoles son actualmente aceite de soja (930-1000 ppm), aceite de semilla de algodón (870-950 ppm) y aceite de girasol (1000 ppm). Las microalgas parecen ser una fuente más rica de estos compuestos, entre las cuales destacan, por su contenido: *Tetraselmis suecica* (6200 ppm), *Haematococcus pluvialis* (4500 ppm), *Porphyridium cruentum* (4200 ppm) y *Chaetoceros calcitrans* (1600 ppm). Por ello, aunque en principio las microalgas pueden resultar una fuente idónea para la producción comercial de algunas vitaminas (especialmente aquellas con alto valor de mercado), es necesario desarrollar un completo estudio a fin de seleccionar las estirpes más adecuadas, así como las condiciones idóneas de producción.

### I.C.3. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son pigmentos hidrosolubles, presentes en algunos grupos de algas tales como cianofíceas, rodofíceas (algas rojas) y criptofíceas. Atendiendo a sus características espectrales pueden dividirse en tres grupos principales: ficoeritrinas (PE), que presenta un máximo de absorción a 565 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 580 nm; ficocianinas (PC), con un máximo de absorción a 615-620 nm y máximo de emisión de fluorescencia a 650 nm, y aloficocianina (APC), con un máximo de absorción a 650 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 660-680 nm. Su principal función es actuar como pigmentos secundarios o antena, captando la energía luminosa y transferirla, vía PE→PC→APC, a los centros de reacción. Estos pigmentos tienen su máximo de absorción en la zona del espectro electromagnético en el que la luz solar es más intensa (verde-amarillo), lo que le confiere una clara ventaja al organismo que los posee, al posibilitar una más amplia captación de la energía luminosa (Glazer, 1987, 1994; Holzwarth, 1991; MacColl y Guard-Friar, 1987).

Las ficobiliproteínas tienen especial relevancia desde el punto de vista comercial por su carácter de colorantes naturales, utilizados en la industria alimentaria y cosmética. Adicionalmente, poseen también una interesante aplicación en microscopía de fluorescencia e inmunoensayos. Las ficobiliproteínas presentan una alta eficiencia cuántica en su fluorescencia, siendo además muy estables en amplios márgenes de pH y temperatura, pudiendo conjugarse fácilmente a una amplia variedad de biomoléculas sin que se alteren sus características de absorción y emisión de luz. Las ficobiliproteínas presentan muchas ventajas con respecto a los marcadores fluorescentes tradicionales, debido a que su fluorescencia anaranjada es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde de los tejidos. Esta y otras propiedades de las ficobiliproteínas convierten a estos compuestos en excelentes trazadores

fluorescentes para su aplicación en diagnóstico e investigación biomédica, con una demanda creciente (Callegari, 1989; Glazer y Stryer, 1984; Glazer, 1994).

#### I.C.4. Lípidos y ácidos grasos

En lo referente a la obtención de lípidos y ácidos grasos esenciales a partir de microalgas, la idea inicial fue la de su empleo como combustibles alternativos a los derivados del petróleo (Harder y Von Witsch, 1942). Esta idea se ha sustituido por la de obtener selectivamente ácidos grasos con interés aplicado. Desde el punto de vista comercial, los ácidos grasos poliinsaturados son los más importantes en general, y los ácidos grasos esenciales en particular, tales como los ácidos linoleico, araquidónico,  $\gamma$ -linolénico y eicosapentanoico (EPA). Excepto el ácido linoleico, estos ácidos grasos son poco frecuentes en animales y plantas superiores, estando presentes en cantidades sustanciales sólo en algunas especies de microalgas y peces (Richmond, 1990; Becker, 1994; Vargas y col., 1998). En este sentido, algunas estirpes marinas de *Chlorella*, así como de *Porphyridium* y, especialmente, *Isochrysis galbana* (Molina Grima y col., 1993, 1994) presentan elevados niveles celulares de EPA siendo el alga roja *Porphyridium* la fuente natural más rica de ácido araquidónico, con niveles del orden del 60% del peso seco. En *Spirulina*, por otro lado, el ácido  $\gamma$ -linolénico constituye el 11% de su peso seco (Borowitzka, M.A., 1988; Callegari, 1989).

Varios de estos ácidos grasos esenciales, como los ácidos EPA,  $\gamma$ -linolénico y araquidónico son precursores de las prostaglandinas, incrementándose así su importancia en la industria farmacéutica. Además, se han constatado efectos beneficiosos del EPA en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como es la arteriosclerosis, debido a que disminuye la concentración de colesterol en la sangre (Dyerberg, 1986).

### I.C.5. Polisacáridos

Las microalgas, especialmente las cianobacterias, producen un material extracelular de tipo mucilaginoso, de naturaleza polisacáridica (Bertocchi y col., 1990) que también posee interés comercial. Algunas microalgas tienen la capacidad de modular la producción de polisacárido exocelular en respuesta a factores externos (De Philippis y col., 1991; Plude y col., 1991; Moreno y col., 1998). La producción de polisacáridos de origen microbiano puede proporcionar una alternativa válida a las fuentes convencionales, ya sea a través del desarrollo de productos con propiedades análogas a los ya usados o incluso con mejores características reológicas (Thepenier y Gudin, 1985; Sutherland, 1986). Por lo general, se considera que la síntesis de polisacárido exocelular (EPS) es una estrategia metabólica para la supervivencia y crecimiento de ciertos microorganismos, especialmente bajo condiciones ambientales extremas, siendo su función todavía desconocida en algunos casos (Vincenzini y col., 1990). Entre las funciones más frecuentemente adscritas a los EPS se encuentran las de protección frente a la desecación (Barclay y Lewin, 1985; Flaibani y col., 1989), agentes quelantes de cationes esenciales para la vida celular (Dudman, 1977) y adhesión celular a superficies sólidas (Barclay y Lewin, 1985).

Los polisacáridos se emplean para modificar las características reológicas de los sistemas acuosos, formando soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones, o bien formando geles. Otra aplicación consiste en su utilización para la preconcentración, adsorción, detección y eliminación de iones metálicos en aguas residuales. Asimismo, pueden emplearse en el acondicionamiento y recuperación de suelos para su uso agrícola (Flaibani y col., 1989).



## I.C.6. Carotenoides

Los carotenoides están presentes de forma universal en todos los organismos fotosintéticos y de forma esporádica en algunas bacterias no fotosintéticas y en eucariontes. En términos evolutivos, la capacidad de síntesis de carotenoides parece haberse desarrollado inicialmente en bacterias fototróficas anoxigénicas y en cianobacterias (Pierson y Olson, 1989). En eucariontes, la capacidad para sintetizar carotenoides debió aparecer como resultado del establecimiento de simbiosis con bacterias o con cloroplastos (Stanier, 1970). Los animales no son capaces de sintetizar estos compuestos, aunque sí pueden modificarlos por oxidaciones o isomerizaciones transformándolos en vitamina A y retinoles (Johnson y Schroeder, 1995).

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides liposolubles, accesorios en la fotosíntesis, cuya coloración varía del amarillo al rojo. Los dos grupos generales de carotenoides son carotenos (carecen de oxígeno) y xantofilas (contienen oxígeno en diferentes formas –grupos hidroxilo, epoxi, etc.-). Otras clasificaciones dividen a los carotenoides en primarios, que son aquellos presentes en los tejidos vegetales fotosintéticamente activos, y secundarios, que son los que se presentan en flores y frutos.

El primer paso específico en la ruta biosintética de los carotenoides es la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl-pirofosfato, para formar prefitoeno-pirofosfato (Sandmann, 1991). Tras la pérdida del grupo pirofosfato, el compuesto resultante de 40 átomos de carbono se reorganiza y da fitoeno. Los sucesivos pasos de la ruta para dar  $\alpha$ - o  $\beta$ -caroteno implican 4 reacciones de desaturación (introducción de dobles enlaces alternativos) y dos de ciclación. El producto resultante de las reacciones de desaturación se denomina licopeno. Las siguientes reacciones de ciclación del licopeno, que ocurren en ambos extremos de

la molécula, pueden dar lugar a dos tipos de anillos, el  $\beta$  y el  $\epsilon$ . Los denominados  $\alpha$ -carotenos poseen un anillo  $\beta$  y otro  $\epsilon$ ; los  $\beta$ -carotenos poseen dos anillos  $\beta$ . Las xantofilas son los productos de la oxidación de los  $\alpha$  y  $\beta$ -carotenos.

Las cada vez más restrictivas regulaciones del uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria han estimulado la investigación y desarrollo en la producción y empleo de pigmentos de origen biológico como aditivos en alimentos, así como en cosmética. La acuicultura, una de las áreas de mayor desarrollo actual en el campo de la producción alimentaria, demanda también cantidades crecientes de carotenoides. Por otra parte, ensayos clínicos están poniendo de manifiesto las propiedades beneficiosas de algunos carotenoides en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, así como de otros antioxidantes.

De entre los más de 600 carotenoides que se conocen, sólo unos pocos tienen uso comercial, principalmente como agentes colorantes, entre los cuales se encuentran astaxantina, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina. El escaso número de carotenoides disponibles comercialmente en gran escala refleja las dificultades y alto costo que implica su síntesis, más que una falta de aplicabilidad (Borowitzka, 1988). De hecho, las aplicaciones comerciales de los carotenoides son muchas y variadas. Su empleo como colorante natural en alimentación se extiende a una gran variedad de productos, tales como mantequilla, margarina, quesos y otros derivados lácteos, bebidas refrescantes, pasta, etc. Algunas xantofilas, tales como astaxantina, cantaxantina y luteína se emplean como aditivos en piensos para incrementar la coloración de salmónidos, otros peces y mariscos, así como la pigmentación de pollos y yemas de huevo. La demanda de carotenoides para acuicultura aumenta cada vez más, habiéndose valorado en unas 100 toneladas para el año 2000 (Benemann, 1992). Los carotenoides tienen asimismo amplia aplicación

en la industria cosmética (Bauerfeind y col., 1971; Cohen 1986; Borowitzka, 1988; Harvey, 1988).

Además de actuar como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, los carotenoides desempeñan un importante papel en la protección de las microalgas contra procesos fotooxidativos. Estudios recientes han puesto de manifiesto la poderosa actividad antioxidante, tanto de  $\beta$ -caroteno como de oxicarotenoides tales como astaxantina y cantaxantina (Terao, 1989; Borowitzka, 1992) secuestrando radicales libres de oxígeno. Los daños causados por estos radicales parecen estar implicados en la generación de algunos tipos de cáncer, problemas cardiovasculares, cataratas y otras enfermedades asociadas al envejecimiento. El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos recomienda un alto consumo de  $\beta$ -caroteno, lo que está resultando en el aumento de la demanda de este compuesto como complemento nutritivo. El  $\beta$ -caroteno natural producido por la microalga *Dunaliella salina* difiere en algunos aspectos del producto sintetizado químicamente (por Hoffmann-La Roche) y que representa la gran mayoría del producto comercializado. Así, el  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella* es una mezcla de isómeros cis y trans (mientras que el sintético corresponde exclusivamente al isómero trans), y contiene asimismo pequeñas cantidades de otros carotenoides como  $\alpha$ -caroteno y zeaxantina. Estas diferencias se han invocado como responsables de la superioridad del  $\beta$ -caroteno natural en sus efectos antioxidantes en tejidos (Avron y Ben-Amotz, 1992).

Sin embargo, en determinados organismos como es el caso de *H. pluviialis*, existen ciertas discrepancias respecto a la función que desempeña el principal carotenoide que lo compone, la astaxantina. Unos autores afirman que al igual que el  $\beta$ -caroteno, las pequeñas vesículas de astaxantina que se acumulan en el citoplasma, fuera del cloroplasto, de las células de *Haematococcus*, constituyen una pantalla que protege a los fotosistemas del exceso de luz (Yong y Lee, 1991), con

el fin de evitar el daño por fotooxidación. Otros autores, sin embargo, ven una función algo más compleja que el simple apantallamiento para este pigmento (Hagen et al., 1993). Se ha comprobado (Kobayashi et al., 1991) que no sólo la elevada irradiancia induce una acumulación de astaxantina, sino que como demuestran numerosos trabajos, cualquier condición de estrés para las células provoca un cambio morfológico en *H. pluvialis*, que pasa de ser una célula pequeña (~5 µm) y móvil a una de mayor tamaño (15-20 µm) que pierde su motilidad, forma una gruesa pared celular y acumula gran cantidad de astaxantina (hasta 600 pg·célula<sup>-1</sup>). Una de las hipótesis propuestas (Fan et al., 1998) explica que determinadas circunstancias, tales como la elevada intensidad de luz o la falta de algún nutriente esencial, provoca un exceso de energía que no puede ser aprovechada por la maquinaria fotosintética. Esto conlleva la aparición de radicales libres de oxígeno por parte de la cadena de transporte electrónico. Dichos radicales actuarían a modo de señal, que llegaría hasta el núcleo de la célula, en el que se activarían una serie de genes cuya expresión culminaría en la acumulación de astaxantina. El conjunto de reacciones de biosíntesis de astaxantina sería el encargado de eliminar los radicales de oxígeno (Boussiba, 2000), muy perjudiciales para la integridad funcional de la célula. La astaxantina sería pues, un producto resultante de un proceso de eliminación de elementos nocivos, más que un fin en sí mismo. Otros autores proponen que la astaxantina “per se” es capaz de secuestrar radicales libres de oxígeno (Lee y Ding, 1995).

Respecto a otros carotenoides, cabe destacar el denominado ciclo de las xantofilas, que incluye a la anteraxantina, violaxantina y zeaxantina. Estos pigmentos están implicados en la disipación del exceso de energía que tiene lugar cuando los tejidos vegetales se iluminan con alta irradiancia, por medio de una serie de reacciones de interconversión (epoxidación y deepoxidación) entre ellas. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en plantas superiores (Demmig-Adams, 1990; Gilmore, 1997; Niyogi et al., 1997a) y también en la microalga

eucariota *Chlamydomonas reinhardtii*, mediante el empleo de mutantes que carecen de alguna de las actividades enzimáticas epoxidasa o deepoxidasa, mostrándose así sensibles a elevadas intensidades de luz.

Para otros carotenoides, sin embargo, el papel que desempeñan en los tejidos no está tan claro. Particularmente, a la luteína se le ha asignado un papel meramente estructural, si bien en este sentido no se ha aclarado completamente la existencia de una funcionalidad. La luteína constituye un dímero en los centros de reacción del fotosistema II. Estudios con mutantes de *Chlamydomonas* deficientes en luteína parecen indicar que esta xantofila puede ser sustituida por otra sin que ello conlleve serios problemas para el crecimiento de los organismos (Niyogi et al., 1997a). Se ha comprobado que no existen actividades enzimáticas epoxidasa ni deepoxidasa "in vitro" cuando este pigmento se utiliza como sustrato (Gilmore, comunicación personal).

Con relación a la utilización comercial de los carotenoides, hay que hacer notar que el mercado para el  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella* aumenta progresivamente, a pesar de que su precio es del orden del doble que el producto sintético. En todos los casos los sistemas de producción son abiertos y basados en medios hiperhalinos (Ben-Amotz y Avron, 1990; Avron y Ben-Amotz, 1992; Borowitzka L.J., 1992). No existe actualmente ningún sistema de producción comercial en nuestro país, aunque sí hay varios grupos que trabajan a escala de planta piloto.

A diferencia del caso de  $\beta$ -caroteno, no se ha desarrollado todavía un sistema comercial de producción de alguna xantofila de interés basado en microalgas. Por ello, se dedican en la actualidad considerables esfuerzos en distintos laboratorios, públicos y privados, dirigidos a este fin. La mayoría de los intentos giran alrededor de la estirpe perteneciente al orden Volvocales *Haematococcus pluvialis*, que puede contener niveles de astaxantina de hasta el 2% del peso seco en algunas condiciones. La astaxantina de *Haematococcus* (que se presenta

como el isómero 3S, 3'S) es efectiva en promover la coloración de salmónidos y crustáceos (Bubrick, 1991; Benemann, 1992; Borowitzka M.A., 1992). Los conocimientos existentes sobre la síntesis de astaxantina en *Haematococcus* son todavía muy escasos, siendo ésta una de las limitaciones fundamentales que encuentra la comercialización de este producto, junto a la baja velocidad de crecimiento de esta microalga y a la escasez de experiencia en su cultivo masivo.

En lo referente a microalgas productoras de otras xantofilas de interés, tales como luteína y cantaxantina, la información disponible es aún más escasa, habiéndose descrito algunas especies de *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Coelastrum* y *Haematococcus* que acumulan cantaxantina en respuesta a deficiencia en nitrógeno y alta irradiancia (Arad y col. 1993). En nuestro laboratorio disponemos de algunas microalgas aisladas de hábitats naturales y no pertenecientes a las estirpes señaladas, cuya caracterización profunda de su crecimiento y contenido de pigmento en distintas condiciones, así como su cultivo masivo a la intemperie marcan los principales objetivos de la presente memoria.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados con microalgas de interés comercial han seguido un enfoque fisiológico y bioquímico, obteniéndose células con altos contenido en productos de interés, mediante selección de estirpes y modificación de factores ambientales y nutricionales. Sin embargo, hasta la fecha se han llevado a cabo muy pocas investigaciones con aproximación genético-molecular utilizando microalgas de interés aplicado, limitándose casi exclusivamente al alga verde *Chlamydomonas*, que en principio no posee aplicación comercial.

El propósito de este trabajo ha sido el de, en primer lugar, realizar una búsqueda de estirpes de microalgas que pudiesen ser de interés en

base a su contenido cualitativo y cuantitativo de carotenoides, y que pudiesen constituir una fuente apropiada de estos pigmentos para su uso comercial. Seguidamente, se ha realizado una caracterización fisiológica tanto del crecimiento, como de la síntesis de carotenoides en las estirpes seleccionadas, con el fin de optimizar ambos parámetros. A continuación, se ha llevado a cabo una evaluación de la producción de carotenoides por parte de dichas estirpes, en distintas modalidades de cultivo (estanco, semicontinuo y continuo), tanto en condiciones controladas de laboratorio, como en cultivos a la intemperie en un fotobiorreactor tubular cerrado.

Parte de los resultados que se recogen en esta memoria han sido objeto de comunicación en varios congresos nacionales e internacionales. Asimismo, también se han presentado en las siguientes publicaciones:

Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J. Biotech.* 76, 51-59.

Del Campo, J.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J. Biotech.* (en prensa)

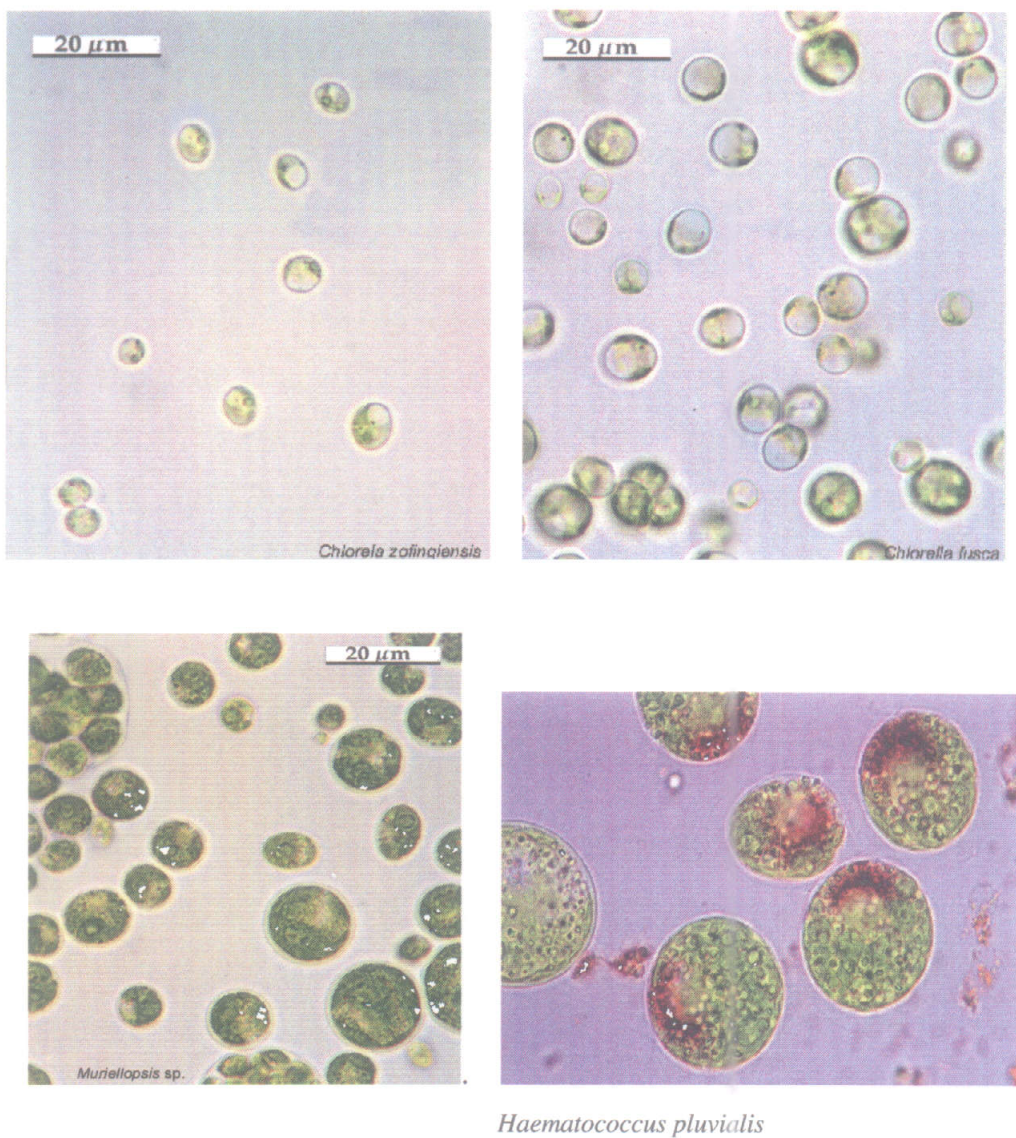
# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## II.-MATERIALES Y MÉTODOS

### II.A. MATERIAL BIOLÓGICO

Las estirpes de microalgas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: *Muriellopsis* sp y *Tetracystis* sp. han sido aisladas de las marismas del Empordá en Cataluña y del río Amerigo de la Antártida, respectivamente, por el Prof. M.C. Hernández Mariné (Dpto. de Botánica, Univ. Central de Barcelona), quien asimismo clasificó estas estirpes, de acuerdo con Broady (1982) y Bourrelly (1990), respectivamente. Estas estirpes han sido purificadas hasta cultivo axénico por nuestro grupo. Las estirpes *Chlorella fusca* SAG 211-8b y SAG 211-8c, *Chlorococcum citriforme* SAG 62.80, *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum* SAG 217-2, *Coelastrum proboscideum* var. *gracile* 217-3, *Haematococcus lacustris* SAG 192.80, *Muriella aurantiaca* SAG 249-1, *Muriella decolor* SAG 249-2, *Neosporangiococcum gelatinosum* SAG B 64.80, *Tetracystis aplanosporum* SAG 91.80, *Tetracystis intermedium* SAG 94.80 y *Tetracystis tetrasporum* SAG 98.80, provienen de la Colección de Cultivos de la Universidad de Göttingen (Alemania); las estirpes *Chlorella zofingiensis* CCAP 211/14 y 211/51, provienen de la Culture Collection of Algae and Protozoa del Insitute of Freshwater Ecology de Ambleside (Reino Unido).



**Fotografía 2.** Micrografía de las estirpes de microalgas utilizadas en este trabajo.

## II.B. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Las diferentes estirpes fueron cultivadas en el medio de cultivo descrito por Arnon y col. (1974), que presenta la siguiente composición:

Compuesto	Concentración	
	(g l <sup>-1</sup> )	mM
NaNO <sub>3</sub>		20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,697	4,0
NaCl	0,117	2,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,124	0,5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,015	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,9 · 10 <sup>-3</sup>	46,3 · 10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,8 · 10 <sup>-3</sup>	9,1 · 10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,3 · 10 <sup>-3</sup>	5,2 · 10 <sup>-3</sup>
NaVO <sub>3</sub>	0,2 · 10 <sup>-3</sup>	1,9 · 10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 · 10 <sup>-3</sup>	0,8 · 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,1 · 10 <sup>-3</sup>	0,3 · 10 <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,04 · 10 <sup>-3</sup>	0,2 · 10 <sup>-3</sup>

El medio contiene además 1 ml de solución Fe-EDTA por litro de medio de cultivo. La solución de Fe-EDTA se preparó disolviendo 16 g de EDTA (forma ácida) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua, y mezclándola con otra disolución que contenía 13,7 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 364 ml de agua. La disolución resultante, de color amarillo-verdoso, se burbujeaba con aire durante 10-12 horas, a fin de oxidar completamente el hierro, dando así lugar a la disolución final, de color pardo oscuro, cuyo pH era aproximadamente 4, y que contenía 5 mg de Fe<sup>3+</sup> y 13 mg de K<sup>+</sup> por ml (Arnon y col., 1974).

Como fuente de nitrógeno combinado se emplearon NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a las concentraciones indicadas según los casos, abarcando una gama de concentraciones desde 5 a 40 mM. En determinadas ocasiones, según se indica, se suplemento el medio de cultivo con NaHCO<sub>3</sub> 10 mM.

La conservación y mantenimiento de las distintas estirpes en condiciones de esterilidad se efectuó en placas de Petri, así como en

tubos de agar inclinados, conteniendo medio sólido suplementando el descrito con BACTOAGAR-DIFCO al 1,5% (p/v).

Para la realización del rastreo y selección de estirpes adecuadas, se empleó el medio standard tal y como se ha descrito anteriormente, empleando  $\text{NaNO}_3$  20 mM como fuente de nitrógeno.

Para esterilizar los medios de cultivo se colocaba la solución de nutrientes en el recipiente de cultivo adecuado, a excepción del fosfato y el bicarbonato, cuando se usó éste. Los recipientes se tapaban con algodón hidrófobo que se atravesaba por una varilla de vidrio hueca, cuyo extremo inferior llegaba al fondo del recipiente, prolongándose el superior por un tubo de goma, en el que se intercalaba un trozo de varilla rellena de algodón hidrófobo que servía como filtro de aire. Además, se colocó un filtro Millipore de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. La esterilización se llevó a cabo en autoclave calentando durante 20 minutos a la presión de 1 atmósfera (120°C). El fosfato y el bicarbonato, en su caso, se esterilizaban por separado para evitar su precipitación y se añadían, una vez fríos, al recipiente de cultivo, manteniendo las condiciones de esterilidad. El mismo procedimiento se utilizó en el caso de los cultivos sólidos. Los cultivos se examinaron periódicamente al microscopio para asegurar que estaban libres de contaminación por bacterias u otros microorganismos.

## II.C. CULTIVO EN CÁMARA CLIMATIZADA

Los cultivos en tubos de agar inclinado y placas de Petri destinados a la conservación y mantenimiento de las estirpes se mantuvieron a 25°C con iluminación continua empleando tubos fluorescentes (daylight-20W Philips) que suministraban en la superficie de los cultivos una irradiancia variable entre 20 y 40  $\text{W m}^{-2}$ , según la distancia a la fuente de luz. Se realizaban nuevas resiembras cada 30 días.

Los cultivos líquidos empleados para los distintos ensayos, así como los que servían de inóculo para mayores volúmenes, se cultivaron fotoautotróficamente en cámara climatizada a 25°C, utilizando frascos cilíndricos de 4,5 cm de diámetro y 200 ml de capacidad con base cónica, conteniendo 150 ml de medio, o frascos de Roux de 5,5 cm de profundidad y 1 l de capacidad, con 750-800 ml de volumen útil. Los cultivos se realizaron burbujando a través de la suspensión celular aire suplementado con 1% (v/v) de CO<sub>2</sub> como fuente de carbono a un caudal de 100 l·(l cultivo)<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Cuando la temperatura de los experimentos fue distinta de 25°C, se emplearon baños con agua termostatizados a la temperatura indicada.

En los experimentos encaminados a analizar el efecto de la intensidad de luz sobre el crecimiento y producción de luteína en *Muriellopsis* sp., así como la intensidad de luz (500 μmol-fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) empleada para el rastreo de estirpes adecuadas para la producción de carotenoides, se empleó una lámpara de haluro de mercurio (MH 400 50/2 E, 25-400 W, METAL-MAZDA), variándose la distancia entre el cultivo y la fuente de iluminación e interponiendo un filtro anticalórico, por el que se hacía circular agua para prevenir el sobrecalentamiento de la suspensión celular.

Cuando se estudió el efecto de factores ambientales o nutricionales sobre el crecimiento y producción de carotenoides en las distintas estirpes, las células se aclimataban previamente a dichos factores durante tres días, a fin de evitar largos periodos de latencia como consecuencia de la adaptación de las células a las nuevas condiciones de cultivo.

era suministrado por una bomba peristáltica P-3 de PHARMACIA, ya que ésta suministraba un flujo más apropiado.

El recipiente de reserva consistía en un frasco de 10 litros de capacidad, cerrado mediante tapón de algodón hidrófobo, atravesado por una varilla de vidrio hueca por la que se suministra el medio. En el fondo del frasco se colocaba un agitador magnético a fin de evitar la precipitación de las sales que constituyen el medio. El reactor se inoculaba en la campana de flujo laminar, empleando como inóculo un cultivo de 150 ml crecido para el reactor de dos litros, o un frasco de Roux con 750 ml de cultivo crecido, para el reactor de cinco litros.

La toma de muestras de cultivo se realizaba mediante un tubo en U, provisto de válvula de cierre, alojamiento para el frasco receptor y pera de goma para succionar. Para mantener la esterilidad del cultivo, se presionaba la pera con la válvula cerrada, se encajaba herméticamente el frasco receptor y se abría la válvula. Una vez succionada la cantidad de muestra requerida, se cerraba la válvula y se retiraba el frasco con la muestra.

## II.E. CULTIVO EN FOTOBIORREACTOR TUBULAR CERRADO

Se han realizado una serie de cultivos de la estirpe *Muriellopsis* sp. a la intemperie en un fotobiorreactor tubular cerrado. Este sistema de cultivo consta de varios módulos de captación de luz solar constituidos por tubos de material transparente (plexiglás rígido) de 2,4x3,0 cm de diámetro y una longitud total de 90 m, con una superficie fotosintéticamente activa de 2,2 m<sup>2</sup> y 55 l de volumen útil. En este sistema de cultivo, la suspensión celular a través de los tubos por la acción de la impulsión de aire (air-lift) a presión. Para evitar el depósito de células en las paredes de los tubos, se hacían circular dos bolas de

caucho de diámetro ligeramente inferior al diámetro interior de los tubos a una velocidad de  $0,3 \text{ m s}^{-1}$ .

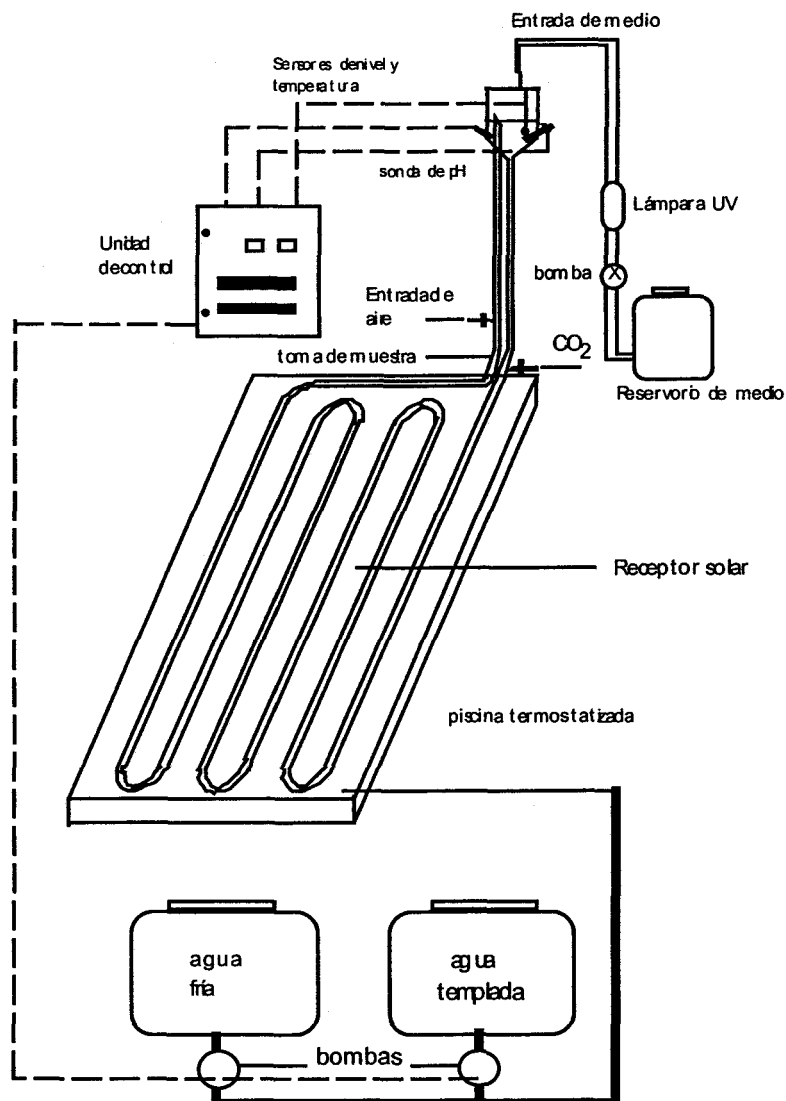
El sistema de cultivo está constituido por 3 componentes principales. Un compresor de aire a presión, que provoca la circulación y agitación de la suspensión celular, tubos transparentes, donde se realiza mayoritariamente la fotosíntesis, situados en paralelo y conectados entre sí por medio de piezas en forma de "u" del mismo material. Estos tubos se encuentran sumergidos en agua, que actúa como elemento termostatizador del cultivo, en una piscina de dimensiones  $1,8 \times 6,0 \times 0,15 \text{ m}$ , provista de circuito cerrado de circulación con elementos calefactores y enfriadores. El sistema impulsor de aire (air-lift) termina en un cilindro de 52 cm de alto por 26 de diámetro externo, situado a 2,8 m de altura desde la horizontal del reactor, donde el cultivo se desgasifica después de su recorrido por los tubos del reactor. En el "air-lift" (**esquema 2**) se encuentran los orificios de salida de gas, el cual está protegido por un filtro de 0,2 micras, entrada para llenado rápido del reactor, entrada de medio fresco para operar en cultivo continuo, sensor de nivel, rebosadero para recolección de la suspensión celular y entrada de aire, previo paso por un filtro de 0,2 micras, además de las sondas de pH y temperatura.

El air-lift está conectado al sistema tubular de captación de luz del fotobiorreactor mediante dos tubos formando un ángulo de  $90^\circ$ , situados fuera de la piscina con los siguientes elementos: llaves para mantener abierto o cerrado el flujo de líquido a través de los tubos, válvula de inoculación, entrada de  $\text{CO}_2$  provista de válvula antirretorno de líquido, toma de muestras estéril, válvula de vaciado del biorreactor e inmovilizador de las bolas de caucho.

El sistema puede operar de forma continua mediante un sensor de nivel situado en el cilindro degasificador, que se coloca a distinta altura mediante un tubo que se puede desplazar a través de la tapadera del cilindro. Este sensor se activa cuando aumenta el volumen de la suspensión celular por la adición continuada de medio fresco al sistema, que se realizaba mediante una bomba conectada a una célula fotoeléctrica, de manera que se activaba al amanecer y se detenía al anochecer, añadiendo así medio fresco al sistema sólo cuando las células pueden crecer, mediante una señal enviada a una electroválvula situada en la llave de vaciado del fotobiorreactor, que permitía la salida de un determinado volumen de la suspensión celular.

El pH del cultivo se mantenía a un determinado valor por medio de un controlador de pH (pHstato). Cuando éste se elevaba por acción de la actividad fotosintética de las células por encima de un valor de referencia, el controlador envía una señal a una válvula solenoide que deja pasar CO<sub>2</sub> puro al cultivo hasta que se restablecía de nuevo el valor de pH prefijado anteriormente.





**Esquema 2.** Principales elementos que constituyen el fotobiorreactor tubular empleado.

## II.F. MÉTODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### II.F.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

La densidad celular de los cultivos se determinó empleando un contador automático de partículas COULTER-COUNTER modelo Z-1. Este sistema se basa en la aplicación de un campo eléctrico en el entorno de un microporo realizado en un tubo de vidrio, inmerso en la

suspensión celular diluida convenientemente en una solución electrolítica. Aplicando una presión negativa en el interior del tubo, se obliga a la suspensión a pasar del exterior al interior del tubo. Cuando una célula atraviesa el poro del tubo, se produce un cambio en la impedancia, que es interpretado como una partícula (o célula). Dicho cambio es proporcional al tamaño de la célula, de forma que se pueden establecer así clases de tamaño.

#### II.F.2. DETERMINACIÓN DE PESO SECO

Para la determinación del peso seco de las células en los cultivos se utilizaron filtros de microfibra de vidrio WHATMAN GF/C de 1,2  $\mu\text{m}$  de poro. Los filtros se secaban en una estufa a 80°C durante al menos 24 h, colocándose en un desecador donde se enfriaban, hasta alcanzar la temperatura ambiente, antes de tararse en una balanza de precisión, para así evitar distorsiones de peso debido a la humedad ambiental. Se filtraban 5 ml de las suspensiones celulares a través de dichos filtros, lavándose a continuación las células retenidas en el filtro con el mismo volumen de agua destilada y secándose a 80°C durante 24-48 h. Una vez transcurrido ese tiempo se pasaron los filtros al desecador antes de proceder al pesado de los mismos. El peso seco de las células se determinó por diferencia de peso.

#### II.F.3. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

Para la determinación del contenido de las clorofilas *a* y *b* en el cultivo, se utilizó el método de Mackinney (1941), como sigue: se centrifuga 1 ml de cultivo a 3500 rpm, descartándose el sobrenadante. Se añaden 2 ml de metanol al sedimento, agitándose fuertemente y dejando las muestras en un baño termostático a 70°C durante 15 minutos. Entonces, se centrifugan, recogiendo el sobrenadante. Los

sedimentos resultantes se tratan de nuevo con 2 ml de metanol caliente durante otros 15 minutos, centrifugándose a continuación. Se mezclan ambos sobrenadantes y se miden las Absorbancias a 665 y 650 nm.

Las concentraciones de clorofila *a* y *b* en el extracto metanólico se calculan utilizando como coeficientes de extinción a 665 nm, 74,46 y 18,3 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup>, respectivamente, y a 650 nm, 27,6 y 36,4 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Los contenidos en clorofila *a* y *b* de las células en el cultivo y su contenido respecto al peso seco se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

Clorofila a:

$$(\mu\text{g clorofila a/ml cultivo}) = 66 \times A_{665} - 33,2 \times A_{650}$$

$$\text{Clorofila a (\% del peso seco)} = \frac{(\mu\text{g clorofila a/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 5 ml}}$$

Clorofila b:

$$(\mu\text{g clorofila b/ml cultivo}) = 135,04 \times A_{650} - 50 \times A_{665}$$

$$\text{Clorofila b (\% del peso seco)} = \frac{(\mu\text{g clorofila b/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 5 ml}}$$

#### II.F.4. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO POR TURBIDEZ

Para estimar el crecimiento de las microalgas se empleó también un método espectrofotométrico, basado en la absorción de luz por los organismos en una longitud de onda fuera del rango comprendido por la absorción de las clorofilas u otros pigmentos. Se utilizó una longitud de onda de 760 nm, empleando como referencia agua destilada.

## II.F.5. DETERMINACIÓN DE COMPONENTES MOLECULARES

### II.F.5.1. Determinación de proteínas y carbohidratos

#### II.F.5.1.1 Extracción de proteínas y carbohidratos

Se tomaron 5 ml de cultivo y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se añade al sedimento NaOH 1 M a las muestras correspondientes en la proporción de 1 ml de NaOH 1 M por cada 8  $\mu$ g de clorofila. Se colocan a 70°C durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se enfrían y se usan para las determinaciones.

#### II.F.5.1.2 Determinación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras tratadas con NaOH se utiliza el método de Lowry y col., (1951), modificado por Herbert y col., (1971). El método se basa en la formación de un producto coloreado como consecuencia de dos reacciones: la reacción del biuret -de las sales de cobre con las sustancias que presentan dos o más enlaces peptídicos, fundamentalmente proteínas-, y la reacción de reducción de los iones fosfomolibdato y fosfotungstato, presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteu, por los restos de tirosina y triptófano de las proteínas. El procedimiento es como sigue:

Preparación de los reactivos. Reactivo A: Inmediatamente antes de su utilización, se mezclan 50 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% con 2 ml de solución de ión cúprico. La solución de ión cúprico se prepara mezclando iguales volúmenes de CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O al 1% y Tartrato sódico potásico al 2%. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.

Reactivo B: se diluye el reactivo Folin-Ciocalteu comercial con agua destilada (1:1).

Procedimiento espectrofotométrico. Se colocan 0,1 ml de las muestras tratadas con NaOH en tubos de ensayo, y se añaden 0,4 ml de agua destilada. Se adicionan entonces 0,3 ml de NaOH 1 M y, después de agitar, 2,0 ml del Reactivo A a cada tubo. Tras homogeneizar por agitación, se dejan estar 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionan 0,4 ml del Reactivo B a cada tubo y, tras homogeneizar se dejan estar 30 minutos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 750 nm frente a un blanco con 0,4 ml de agua destilada tratado de la misma forma que las muestras problema.

La cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ ) en las muestras analizadas se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones que contenían de 50 a 400  $\mu\text{l}$  de una solución de seroalbúmina  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y tratados de la misma forma que las muestras problema

$$(\mu\text{g proteína/ml cultivo}) = \frac{(\mu\text{g proteína muestra}) \times 10 \times (\text{vol NaOH})}{(\text{vol cultivo})}$$

$$\text{Proteína (\% peso seco)} = \frac{(\mu\text{g proteína/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 5 ml}}$$

### II.F.5.1.3 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Para determinar la concentración de carbohidratos en las muestras tratadas con NaOH se utiliza el método de Dubois y col., (1956) siguiendo la técnica descrita por Kochert (1978). El método se basa en la reacción del grupo reductor libre de los carbohidratos con el fenol en

medio ácido (ácido sulfúrico) para producir un complejo de color anaranjado. El procedimiento es el siguiente:

Preparación del reactivo del Fenol. Se disuelven 8,1 g de fenol en agua destilada hasta un volumen total de 10 ml.

Procedimiento espectrofotométrico. Se colocan 0,1 ml de las muestras tratadas con NaOH en tubos de ensayo y se añaden 0,9 ml de agua destilada. Se adicionan entonces 25 µl de reactivo del fenol a cada tubo y, después de agitar, 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (98% p/p) a cada tubo. Tras homogeneizar por agitación, se dejan estar 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 485 nm frente a un blanco de 1,0 ml de agua destilada, tratado de la misma forma que las muestras problema.

La cantidad de carbohidratos (µg) en las muestras analizadas se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones preparados de acuerdo con el siguiente protocolo y tratados de la misma forma que las muestras problema:

	B	1	2	3	4	5	6
H <sub>2</sub> O	1,0 ml	980 µl	970 µl	960 µl	950 µl	940 µl	930 µl
<b>Glucosa</b>							
(0,5 mg/ml)	--	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl

La concentración de carbohidratos en el cultivo y su contenido respecto al peso seco se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$(\mu\text{g carbohidrato/ml cultivo}) = \frac{(\mu\text{g carbohidrato muestra}) \times 10 \times (\text{vol NaOH})}{(\text{vol cultivo})}$$

$$\text{Carbohidrato (\% peso seco)} = \frac{(\mu\text{g carbohidrato/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{Peso seco (mg) en 5 ml}}$$

## II.F.5.2. Determinación de lípidos y ácidos nucleicos

### II.F.5.2.1 Extracción de lípidos y ácidos nucleicos

Se tomaron 7 ml de cultivo que se centrifugan a 3500 rpm durante cinco minutos, desechándose el sobrenadante. Al sedimento se añade etanol absoluto en la proporción de 1 ml de etanol por cada 10  $\mu\text{g}$  de clorofila. Se agitan bien y se separan de cada muestra dos alícuotas de 3 y 9 ml, que se colocan a 80°C durante 2-3 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugan las alícuotas: los sobrenadantes de ambas se mezclan y se emplean en la determinación de lípidos. El sedimento de la alícuota de 3 ml se emplea en la determinación de ARN y el de la otra, en la determinación de ADN.

### II.F.5.2.2 Determinación de lípidos

Para determinar la concentración de lípidos en las muestras preparadas se utiliza el método de Zöllner y Kirsch (1962), siguiendo la técnica propuesta por la firma Boehringer Mannheim (1984). El método se basa en que el calentamiento a 100°C de los compuestos lipídicos con ácido sulfúrico origina iones carbonilo altamente reactivos, capaces de producir con el grupo carbonilo de la fosfovainillina un producto de color rosa. El procedimiento es como sigue:

Preparación del reactivo: se mezclan 494 mg de vainillina con 50 ml de agua destilada y se añaden 200 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85%, guardándose en frío.

Procedimiento espectrofotométrico: se colocan alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes (muestras extraídas con etanol) en tubos de ensayo y

se adicionan 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (98%, p/p) a cada tubo. Tras homogeneizar por agitación, se colocan los tubos a 100°C durante 15 minutos. Después de la hidrólisis con sulfúrico, se enfrían los tubos y se toman de cada uno 0,5 ml, se adicionan 2 ml del reactivo y, tras homogeneizar por agitación, se dejan estar 30 minutos a 30°C. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 530 nm frente a un blanco de 1 ml de etanol, tratado de la misma forma que la muestra problema.

La cantidad de lípidos (µg) en las muestras analizadas se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones preparados de acuerdo con el siguiente protocolo y tratados de la misma forma que las muestras problema:

	B	1	2	3	4	5	
Etanol	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	-	ml
Solución patrón	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	ml

La solución patrón se prepara diluyendo 0,2 ml de la solución "Standard de Boehringer" (que consiste en una mezcla de los ácidos palmítico, esteárico y oleico) hasta 5 ml con etanol. La concentración final de lípidos en la solución patrón así obtenida es de 0,4 mg/ml.

La concentración de lípidos en el cultivo y su contenido respecto al peso seco se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$(\mu\text{g lípidos/ml cultivo}) = \frac{(\mu\text{g lípidos muestra}) \times (\text{vol extr. etanólico})}{(\text{vol cultivo})}$$

$$\text{Lípidos (\% peso seco)} = \frac{(\mu\text{g lípidos/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 5 ml}}$$



### II.F.5.2.3 Determinación de ARN total

Para determinar la concentración de ARN en los sedimentos libres de lípidos, se utiliza el método de Lin y Schejeide (1969), siguiendo la técnica descrita por Kochert (1978). El método se basa en la formación, a 100°C, de un compuesto de color verde, entre el orcinol y el ARN hidrolizado en medio básico. El procedimiento es como sigue:

Preparación del reactivo: inmediatamente antes de su utilización, se mezclan 2 ml de solución de orcinol con 100 ml de solución de ión cúprico. La solución de orcinol se prepara disolviendo 12,5 g de orcinol en etanol al 95% hasta un volumen final de 25 ml, y se guarda en frío. La solución de ión cúprico se prepara disolviendo 0,15 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de HCl concentrado, y se guarda en frío.

Extracción e hidrólisis del ARN. Se añaden 3 ml de KOH 0,3 M a los sedimentos correspondientes (extracción de lípidos). Después de agitar bien, se colocan a 30°C durante 18-24 h. Tras la hidrólisis con KOH, se colocan las muestras en un baño de hielo y se añaden 0,15 ml de  $\text{HClO}_4$  concentrado. Después de agitar, se centrifugan y se usan los sobrenadantes para la determinación de ARN.

Procedimiento espectrofotométrico: se colocan 0,5 ml de los sobrenadantes anteriores en tubos de ensayo y se añaden 0,5 ml de agua destilada. Se adiciona entonces 1 ml de reactivo a cada tubo y, después de homogeneizar por agitación, se colocan los tubos a 100°C durante 35 minutos. Transcurrido este tiempo, se enfrían los tubos con agua e hielo, se adicionan 4 ml de agua destilada a cada tubo, se agitan y se mide la absorbancia a 665 nm frente a un blanco de 1 ml de agua destilada, tratado de la misma forma que las muestras problema.

La cantidad de ARN ( $\mu\text{g}$ ) en las muestras analizadas se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones de ARN de levadura, preparados de acuerdo con el siguiente protocolo y tratados de la misma forma que las muestras problema:

	B	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O	1,0	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	-	ml
ARN (100 $\mu\text{g/ml}$ )	-	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	ml

La concentración de ARN en el cultivo y su contenido respecto al peso seco se calculan a partir de las siguientes ecuaciones empíricas:

$$(\mu\text{g ARN/ml cultivo}) = \frac{(\mu\text{g ARN muestra}) \times 2,1 \times (\text{vol extr. etanólico})}{(\text{Vol cultivo})}$$

$$\text{ARN (\% peso seco)} = \frac{(\mu\text{g ARN/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 50 ml}}$$

#### II.F.5.2.4 Determinación de ADN

Para determinar la concentración de ADN en los sedimentos libres de lípidos se utiliza el método de la difenilamina (método de Burton (1968)), siguiendo la técnica descrita por Kochert (1978). El método se basa en la reacción de la difenilamina con la 2-deoxirribosa del ADN en medio ácido (ácido perclórico) que da lugar a la formación de un complejo de color violeta. El procedimiento es como sigue:

Preparación del reactivo: inmediatamente antes de su utilización, se mezclan 0,1 ml de solución de acetaldehído con 20 ml de solución de difenilamina.

La solución del acetaldehído se prepara añadiendo 0,5 ml de acetaldehído frío a 25 ml de agua destilada fría. La solución es estable a 4°C durante varios meses. La solución de difenilamina se prepara disolviendo 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial. Se añade entonces 1,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (98%, p/p). La solución es estable a 4°C unos meses.

Preparación de las muestras: se añaden 3 ml de HClO<sub>4</sub> 0,5N a los sedimentos correspondientes (extracción de lípidos), se agitan y se colocan a 70°C durante 45 minutos. Después de enfriar, se centrifugan y se usan los sobrenadantes para la determinación de ADN.

Procedimiento espectrofotométrico: se colocan alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes en tubos de ensayo y se adicionan 2,0 ml del reactivo a cada tubo. Tras homogeneizar por agitación, se colocan los tubos a 30°C durante 16-20 h. Transcurrido ese tiempo, se mide la absorbancia a 600 nm frente a un blanco de 1 ml de HClO<sub>4</sub> 0,5 N, tratado de la misma forma que las muestras problema.

La cantidad de ADN (µg) en las muestras analizadas se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones preparados de acuerdo con el siguiente protocolo y tratados de la misma forma que las muestras problema:

	B	1	2	3	4	5	
HClO <sub>4</sub> 0,5 N	1,0	0,95	0,9	0,85	0,8	0,75	ml
Sol. patrón							
ADN	-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	ml

La solución patrón de ADN se prepara mezclando 2,0 ml de ADN de timo bovino (0,4 mg/ml en NaOH 5 mM) con 2,0 ml de HClO<sub>4</sub> 1 N. Se agita y se coloca a 70°C durante 45 minutos. Después de enfriar, se centrifuga y el sobrenadante constituye la solución patrón de ADN.

La concentración de ADN en el cultivo y su contenido respecto al peso seco se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$(\mu\text{g ADN/ml cultivo}) = \frac{(\mu\text{g ADN muestra}) \times (\text{Vol extr. etanólico})}{3 \times (\text{vol cultivo})}$$

$$\text{ADN (\% peso seco)} = \frac{(\mu\text{g ADN/ml cultivo}) \times 0,5}{\text{peso seco (mg) en 5 ml}}$$

### II.F.5.3. Determinación de carotenoides

La determinación de los carotenoides se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo el método descrito por Mantoura y col. (1983), modificado posteriormente por Mínguez-Mosquera y col. (1992). Se centrifugó 1 ml de cultivo a 3500 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol puro. Se centrifugaba nuevamente y se guardaba el sobrenadante. Al sedimento se resuspendió en 2 ml de metanol puro y se colocaban a 70°C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se centrifugaban de nuevo las muestras, añadiendo el sobrenadante al anterior. Si el sedimento seguía presentando color, se repetía el proceso hasta obtenerlo blanco. Para las microalgas en las que este método no era efectivo, se procedió a una rotura en mortero con alúmina. Una vez rotas las células, se resuspendían en acetona pura y se centrifugaban a 3500 rpm durante cinco minutos y se recogía el sobrenadante. El extracto era evaporado bajo atmósfera de nitrógeno hasta sequedad y guardado a -20°C hasta su análisis. Justo antes de introducir los extractos en el HPLC, los sedimentos eran resuspendidos en 1 ml de acetona pura. Se centrifugaban a 13.000 rpm durante 5 minutos. A

continuación se tomaba una alícuota de 10  $\mu$ l que se introducía en un cromatógrafo líquido Waters 600-MS "System Controller". Las separaciones se realizaron en una columna C18 de fase reversa Novapack de 3,9 x 150 mm, con un tamaño de partícula de 4  $\mu$ m y 60 Å de tamaño de poro. Adicionalmente se colocó inmediatamente antes de la columna principal, una columna de protección de Nova-Pack C18 con el mismo tamaño de partícula.

Como fase móvil se utilizaron los siguientes solventes: solvente A: metanol-agua-tampón (8:1:1, v/v); solvente B: metanol-acetona (1:1, v/v). El tampón está formado por una solución de acetato de tetrabutilamonio (0,05 M) y acetato de amonio (1 M) en agua.

Los pigmentos se eluyeron empleando el gradiente esquematizado en la siguiente tabla, a un flujo de 1 ml/minuto y detectados mediante un sistema programable de fotodiodos en línea (*Photodiode array*) 991 de Waters, que permite, además de la identificación por comparación de los tiempos de retención con los patrones, obtener un espectro de absorción para cada pigmento entre 350 y 700 nm. El cromatógrafo líquido, junto con el controlador, están conectados a un PC equipado con el software "Waters 991 Photodiode Array Detector", del cual se obtienen los resultados de la integración de las áreas de los picos obtenidos para su cuantificación.

Los diferentes pigmentos eran identificados y cuantificados según una serie de patrones: astaxantina y cantaxantina fueron obsequio de los laboratorios Hoffman-La Roche.  $\beta$ -Caroteno y luteína se obtuvieron de Sigma Chemical Co., San Luis, USA. El patrón de violaxantina fue obsequio del Dr. Luis Lubián (Centro de Investigaciones Marinas de Cádiz).

Tabla I. ESQUEMA DE GRADIENTES UTILIZADOS PARA LA SEPARACIÓN DE LOS PIGMENTOS

Tiempo (min)	Fase móvil		Curva
	A (%)	B (%)	
Inicial	75	25	
8	25	75	Lineal
10	25	75	Isocrática
18	10	90	Convexa
23	0	100	Cóncava
30	75	25	Cóncava

#### II.F.5.4. Saponificación de extractos

Algunos carotenoides como por ejemplo la astaxantina, se presentan en forma de mono o diésteres, al esterificarse con ácidos grasos los grupos hidroxilo 3 y 3' de los anillos  $\beta$  de la xantofila. Para poder realizar una cuantificación exacta de este pigmento es necesario realizar una saponificación de los extractos. Para llevar a cabo dicho proceso los extractos se resuspenden en 1 ml de éter puro, al que se añade 1 ml de una solución de KOH al 2% en metanol puro y se agita. La mezcla se deja durante 15 minutos en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido ese tiempo se añaden 2 ml de una solución de NaCl al 10% en agua, se agita la suspensión y se separan las fases acuosa y apolar (que contiene los pigmentos) mediante 1-2 minutos de centrifugación a 3500 rpm. La fase acuosa se retira cuidadosamente con ayuda de una pipeta "Pasteur" y se descarta. A la fracción de éter se vuelve a añadir 2 ml de solución de NaCl y se repite el proceso. Se realiza un nuevo lavado de la fase apolar, tomando esta vez con una pipeta "Pasteur" la fase superior (éter) colocándola en otro tubo limpio y teniendo cuidado de no tomar nada de la fase acuosa inferior. La solución de éter con pigmentos se evapora bajo nitrógeno y

una vez seco el extracto, se resuspende en acetona pura para introducirlo en el cromatógrafo.

## II.F.6. ANÁLISIS ELEMENTAL

Se utilizó el Analizador Elemental CHN-O/S de CARLO ERBA STRUMENTAZIONE, modelo 1106/R, conectado a un integrador HEWLETT-PACKARD modelo 3390A. El aparato consta de dos columnas de cuarzo o reactores. Utilizando una columna se determina simultáneamente el contenido en Nitrógeno, Carbono e Hidrógeno de una muestra. La otra columna permite determinar el contenido en Oxígeno.

Para la determinación de N, C y H, la técnica utilizada se basa en una modificación del método clásico de Pregl y Dumas. Las muestras, colocadas en cápsulas de estaño, se introducen en una columna vertical de cuarzo, a 1030°C, a través de la cual pasa un flujo constante de helio. Cuando la muestra se introduce, el caudal de helio se enriquece temporalmente con oxígeno puro. Esto produce la combustión de la muestra, la cual se completa al pasar los gases producidos a través de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (material que contiene la columna correspondiente). En este paso, el C se oxida a  $\text{CO}_2$ , el H a  $\text{H}_2\text{O}$  y el N se queda como  $\text{N}_2$  y una mezcla de óxidos de nitrógeno. A continuación, los gases de la combustión se hacen pasar a través de la columna de reducción, a 650°C, que se encuentra rellena de cobre, con lo que se consigue eliminar el exceso de oxígeno y reducir los óxidos de nitrógeno a  $\text{N}_2$ . Por último, la mezcla de gases se hace pasar a través de una columna cromatográfica de Porapak QS, a 100°C, con lo cual se separan los distintos gases, que se eluyen sucesivamente ( $\text{N}_2$ - $\text{CO}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$ ), y se miden con el detector del aparato cuya señal es proporcional a la concentración del gas respectivo y que, convenientemente amplificada, se registra gráficamente.

Para la determinación de O, la técnica utilizada se basa en el método modificado de Unterzaucher. Las muestras, colocadas en sus cápsulas respectivas, se introducen en una columna de cuarzo a 1060°C, a través de la cual pasa un flujo constante de helio. Cuando la muestra se introduce, el oxígeno que contiene se convierte en monóxido de carbono, conversión que se favorece por carbón activo niquelado (material que contiene la columna). La mezcla de gases producida se hace pasar a través de una columna cromatográfica rellena de un tamiz molecular de 5Å, a 100°C, con lo cual se separa el CO de los otros gases producidos (N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>), y se mide con el detector.

Para el análisis elemental, se tomaron 10 ml de cultivo. Se centrifugan las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se guarda el sedimento en la estufa a 80°C durante al menos 48 h. Una vez secas las muestras, se colocan en un desecador y se dejan 30-60 minutos. A continuación se pesan, en una balanza de precisión, alícuotas de las muestras secas en las cápsulas previamente lavadas con cloroformo y acetona (para eliminar posibles residuos orgánicos) y se secan a 80-100°C. La cantidad pesada de muestra ha de estar comprendida entre 500 y 1500 µg. Una vez anotado el peso, se cierra la cápsula cuidadosamente con unas pinzas. Los análisis se efectuaron por duplicado, utilizando los siguientes patrones:

Patrón	Proporción teórica (%)			
	N	C	H	O
Acido benzoico	-	68,85	4,95	26,2
Sulfanilamida	16,27	41,84	4,68	18,58
Ciclohexanona- 2,4-dinitro fenil-hidrazona	20,14	51,79	5,07	23,0



En cada tanda de análisis se colocan los tres patrones, también en una cantidad entre 500 y 1500  $\mu\text{g}$ , en cápsulas independientes, y se emplea como blanco una cápsula vacía, que se coloca en el contenedor de muestras al final de toda la tanda de análisis.

El integrador representa los cromatogramas correspondientes y suministra asimismo, identificadas por sus tiempos de elución, las áreas integradas de los picos que aparecen, correspondientes a los gases  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , que se corresponden a su vez con los contenidos en N, C y H de las muestras. Para la determinación del contenido en oxígeno, se procede de la misma forma que se ha indicado antes, excepto que las cápsulas con las muestras pesadas, los patrones y la cápsula vacía se colocan en el contenedor correspondiente a la columna de O. Los picos del cromatograma y sus áreas integradas corresponden a los gases  $\text{N}_2$  y CO, siendo éste último el que representa el contenido en oxígeno.

Los contenidos en N, C, H y O de las muestras analizadas se calculan por referencia a los patrones. Los cálculos se hacen separadamente para cada elemento:

$$K_{\text{elemento}} = \frac{\% \text{ teórico} \times \text{Masa patrón en mg}}{\text{Área patrón} - \text{área cápsula vacía}}$$

$$\text{Elemento (\% peso seco)} = \frac{K_{\text{elemento}} \times (\text{Área muestra} - \text{área cápsula vacía})}{\text{Masa muestra en mg}}$$

## II.F.7. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE GENERACIÓN

En los cultivos estancos, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se determinó durante la fase exponencial o logarítmica del cultivo, según la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

donde  $x_1$  y  $x_2$  representan la densidad celular a tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Las dimensiones de la velocidad específica de crecimiento son tiempo<sup>-1</sup>. El tiempo de generación ( $t_g$ ) viene dado en función de  $\mu$ , según la fórmula siguiente:

$$t_g = \frac{0,693}{\mu}$$

## II.F.8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTO EN CULTIVO CONTINUO

En el proceso de cultivo continuo de microorganismos, se aporta el medio de cultivo (conteniendo los nutrientes) y se recolecta la suspensión celular a la misma velocidad. Esta técnica permite generar estados estacionarios en los que las condiciones de cultivo, la concentración de biomasa y su composición, así como la velocidad de crecimiento, permanecen constantes con el tiempo.

Para calcular la productividad de pigmento en cultivo continuo en fotoquimiostato Braun y fotobiorreactor tubular, se calcularon en primer lugar las tasas de dilución en función del volumen de cultivo medido a la salida del reactor. Conociendo el flujo de salida ( $l\ h^{-1}$ ), así

como la concentración media de pigmento en el cultivo ( $\text{mg l}^{-1}$ ), se calcula la productividad multiplicando ambas cantidades.

## II.F.9. MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Pharmacia LKB - Ultrospec Plus.

## II.F.10 MEDIDA DE LA LUZ INCIDENTE EN LOS CULTIVOS

La intensidad de luz a la que se sometieron los cultivos se midió con un radiómetro-fotómetro integrador portátil LI-COR, modelo LI-188B, dotado de un sensor plano.

## II.G. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### II.G.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Para el ensayo "in situ", un volumen de células equivalente a 5-10  $\mu\text{g}$  de clorofila se centrifugó a 12000 x g, durante 1 minuto a temperatura ambiente y las células se resuspendieron en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía: 66,7 mM de tampón HEPES-NaOH (pH 7); 40 mM de L-glutamina; 4 mM de  $\text{MnCl}_2$  y 0,5 mM de ADP. A esta suspensión se le añadieron 0,1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 20  $\mu\text{l}$  de una solución de MTA al 1,25% (p/v) en agua, para permeabilizar las células. Después de agitar vigorosamente durante 10 s la reacción se inició por adición de 50  $\mu\text{l}$  de una solución 0,4 M de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ . Como blancos se

realizaron ensayos en paralelo que contenían agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubó durante 5 ó 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de 2 ml de una solución de  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido (7,73 ml de HCl al 37%, 12 g de ácido tricloroacético y 33,3 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  llevados a un volumen final de 1 l con  $\text{H}_2\text{O}$ ). Esta solución también reacciona con el  $\gamma$ -glutamihidroxamato producido en la reacción, produciendo un complejo coloreado, cuya concentración se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de  $0,89 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una unidad de actividad transferasa de GS se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -glutamihidroxamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

# RESULTADOS

### III. RESULTADOS

#### III.1. SELECCIÓN DE ESTIRPES

En primer lugar, y tras evaluar el crecimiento celular en distintas condiciones, se ha procedido a la puesta a punto de los medios adecuados para un cultivo idóneo de las microalgas, así como métodos de rotura de células y extracción de pigmentos, ensayando distintos solventes orgánicos y métodos físicos.

La escasez de estirpes actualmente consideradas para la producción de carotenoides de interés comercial justificaba comenzar este trabajo con un rastreo y selección de estirpes que, en función de su composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides, presentaran potencial interés para la producción de tales compuestos. En este sentido, en base a algunos antecedentes bibliográficos y en el aislamiento de microalgas procedentes de hábitats naturales, se estudió la composición de pigmentos en 15 estirpes de microalgas eucariotas y algunas cianobacterias. Como principal criterio para la selección de las microalgas idóneas para la producción de carotenoides, se consideró la presencia de altos niveles de dichos pigmentos en las células. A este fin, se evaluó el contenido en pigmentos carotenoides en diversas condiciones de cultivo. La selección de las microalgas adecuadas ha implicado, para cada estirpe considerada, el establecimiento de condiciones óptimas de cultivo, tales como temperatura, concentración de nutrientes en el medio, irradiancia, etc., la optimización de los métodos de rotura de las células y extracción de los pigmentos correspondientes, así como el análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos. Adicionalmente, se han considerado como criterios complementarios de selección la facilidad de cultivo y recolección de células, así como su productividad y tolerancia a diversos factores ambientales.

Así, se ha analizado la composición pigmentaria de diversas estirpes, incluyendo tres de cianobacterias. La Tabla II recoge los valores máximos encontrados para los niveles de distintos carotenoides en cultivos de algunas de las distintas estirpes de algas analizadas.

TABLA II. NIVELES DE CAROTENOIDES EN CULTIVOS DE DISTINTAS ESTIRPES DE MICROALGAS

Estirpe	Carotenoide (mg l cultivo <sup>-1</sup> )				
	Violaxantina	Astaxantina	Luteína	Cantaxantina	β-caroteno
<b>Cianobacterias</b>					
<i>Anabaena variabilis</i> , ATCC 29413	-	-	-	1,5	<b>9,7</b>
<i>Anabaena sp.</i> , ATCC 33047	-	-	-	0,2	6,6
<i>Nostoc sp.</i> (Albufera)	-	-	-	2,1	7,3
<b>Clorofíceas</b>					
<i>Chlorella fusca</i> , SAG 211-8b	3,0	2,6	23,2	0,5	3,7
<i>Chlorella fusca</i> , SAG 211-8c	1,6	-	12,5	-	1,7
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211/14	3,1	<b>27,4</b>	18,8	<b>5,6</b>	4,1
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211/51	1,0	-	6,3	-	1,9
<i>Chlorococcum citrifforme</i> , SAG 62.80	7,9	1,3	<b>38,0</b>	1,8	6,1
<i>Chlorococcum echinozygotum</i> , SAG 213-5	-	-	0,1	-	-
<i>Coelastrum proboscideum</i> .var. <i>dilatatum</i> SAG 217-2	1,7	-	15,6	-	2,4
<i>Coelastrum proboscideum</i> . var. <i>gracile</i> SAG 217-3	2,1	1,7	11,0	-	2,2
<i>Haematococcus lacustris</i> , SAG 192.80	1,0	<b>170,6</b>	7,1	0,7	3,6
<i>Muriella aurantiaca</i> ,	4,2	0,1	17,2	-	5,7
<i>Muriella decolor</i> , SAG 249-2	-	-	5,0	1,5	0,6
<i>Muriellopsis sp.</i>	<b>7,3</b>	0,8	<b>29,8</b>	0,7	5,7
<i>Neosporangiococcum gelatinosum</i> , SAG B-64.80	5,7	-	<b>29,8</b>	-	4,4
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> , SAG 211-15	4,6	1,0	18,0	-	4,6
<i>Tetracystis aplanosporum</i> , SAG 91.80	0,9	-	3,4	-	3,0
<i>Tetracystis intermedium</i> , SAG 94.80	4,4	-	13,3	2,9	3,2
<i>Tetracystis tetrasporum</i> , SAG 98.80	2,2	-	14,0	-	3,2
<i>Tetracystis sp.</i>	1,9	0,1	13,7	-	3,4

Las células se cultivaron a 28°C, en el medio de cultivo descrito por Arnon et al. (1974) con NaNO<sub>3</sub> 20 mM como fuente de nitrógeno, con una irradiancia de 460 μmol-fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y burbujeadas con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v) a un flujo de 100 l (l cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Los cultivos se mantuvieron durante 15-20 días.

Los valores máximos encontrados para cada pigmento no coinciden en el tiempo durante el crecimiento, encontrándose generalmente que violaxantina, luteína y β-caroteno aparecen en una fase estacionaria temprana, mientras que los máximos de astaxantina y cantaxantina se registran en una fase más tardía del cultivo.

Entre las estirpes consideradas destacan *Chlorella fusca*, SAG 211-8b; *Chlorococcum citriforme*, SAG 62.80; *Muriellopsis* sp. y *Neosporangiococcum gelatinosum*, SAG B-64.80, por su alto contenido en luteína. En *Chlorella zofingiensis*, CCAP 211/14, aunque no es particularmente elevado el nivel de ningún carotenoide específico, resulta interesante la combinación en su composición de varios carotenoides de interés comercial (astaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno). Adicionalmente, se ha corroborado la presencia de astaxantina en elevadas cantidades en la volvocal *Haematococcus pluvialis*.

Las estirpes *Neosporangiococcum gelatinosum*, SAG B-64.80 y *Chlorococcum citriforme*, SAG 62.80, muestran niveles interesantes de pigmentos carotenoides, aunque se requiere la puesta a punto de metodología específica para determinaciones analíticas y de crecimiento, ya que las células de estas estirpes se agregan con mucha facilidad, lo que dificulta este trabajo. Entre los organismos de mayor interés destaca *Muriellopsis* sp., estirpe aislada de medios naturales y potencial productora de luteína a mediana y gran escala.



### III.2. EL CASO DE *Muriellopsis* sp.

En *Muriellopsis* sp. se conjuntan una serie de características que le confieren gran interés como potencial productora de carotenoides, a saber: a) su originalidad al haber sido aislada de su hábitat natural, sin estar disponible en colecciones de cultivo; b) alto contenido en luteína; c) facilidad de manipulación para estudios cuantitativos de biomasa al crecer uniformemente en suspensión, sin formar grumos, junto a d) una elevada velocidad específica de crecimiento ( $0.17-0.23 \text{ h}^{-1}$ ), se ha procedido a su caracterización en profundidad.

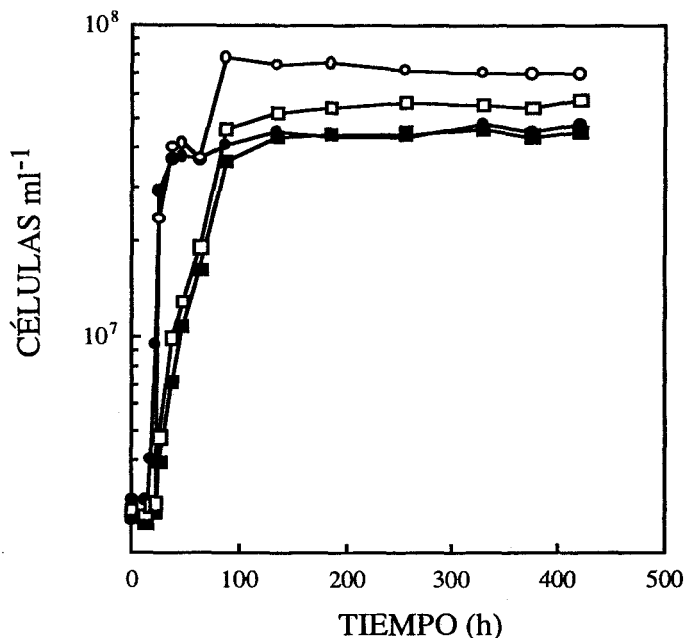
Los distintos trabajos realizados con *Muriellopsis* sp. se han agrupado en tres bloques: en primer lugar se analiza el efecto de diversos factores ambientales y nutricionales sobre el crecimiento y contenido en luteína en este organismo. Seguidamente se recogen los resultados obtenidos a partir de los ensayos de producción en cultivo continuo, a nivel de laboratorio en fotoquimiostato. En tercer lugar, se exponen los datos de productividad obtenidos de experimentos realizados a la intemperie, en un fotobiorreactor tubular cerrado, durante distintas épocas del año.

#### III.2.1 EFECTO DE FACTORES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAROTENOIDES DE *Muriellopsis* sp.

##### III.2.1.1 EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

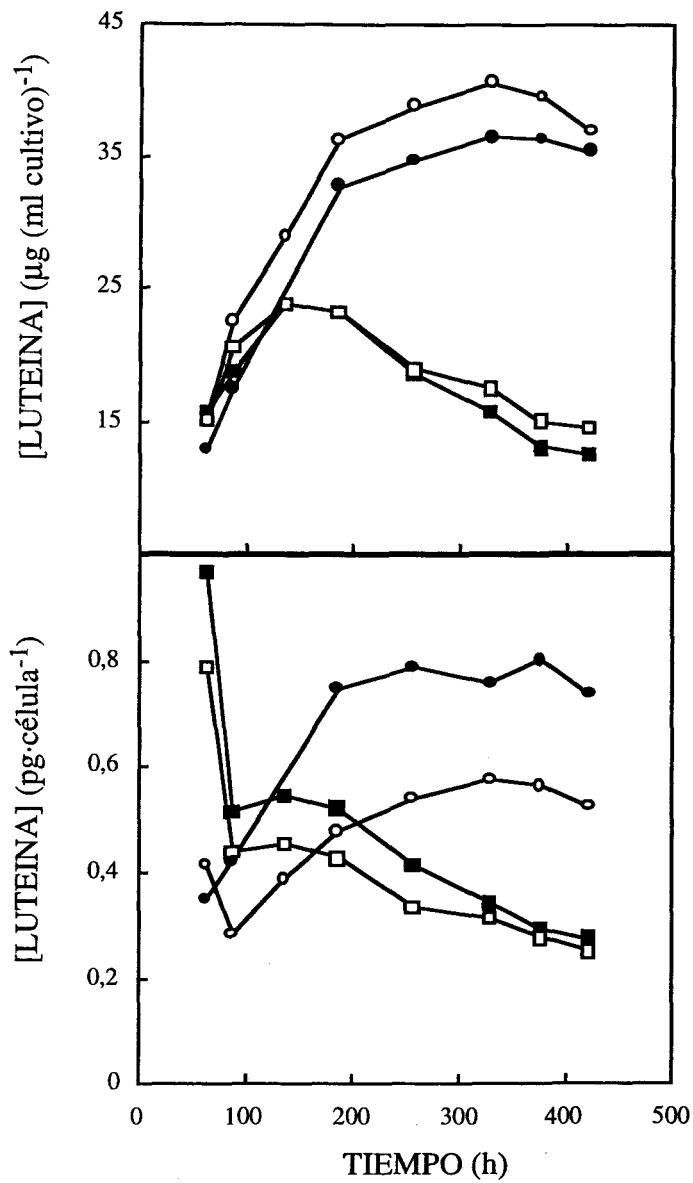
Son numerosos los trabajos que reflejan el papel de la intensidad de la luz sobre el contenido de carotenoides en microalgas, fundamentalmente en *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina*. Estos estudios concluyen que la intensidad de la luz es un factor primordial para la carotenogénesis. A fin de determinar el efecto de este

factor sobre el crecimiento y contenido de carotenoides en *Muriellopsis* sp., esta estirpe se cultivó a diversas irradiancias.



**Fig.1.** Efecto de la irradiancia sobre el crecimiento de *Muriellopsis* sp. (●) 180; (○) 460; (■) 1.265; (□) 1.725  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las células se cultivaron a 28°C, a las irradiancias indicadas, con  $\text{NaNO}_3$  20 mM como fuente de nitrógeno. Los cultivos se burbujearon con una mezcla de aire- $\text{CO}_2$  al 1% a un flujo de 100 l (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$ .

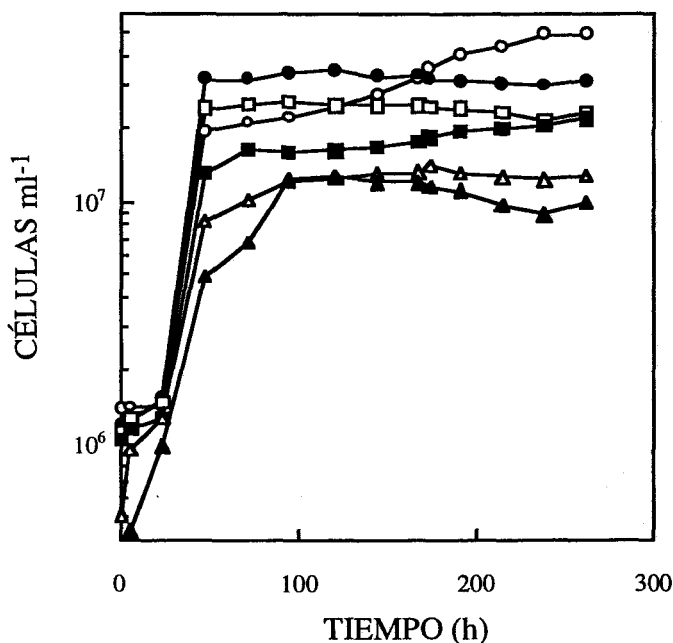
El crecimiento fue similar en los cuatro cultivos, si bien el expuesto a 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presentaba la mayor densidad celular en fase estacionaria (Fig. 1). Los niveles de luteína (tanto en  $\mu\text{g (ml cultivo)}^{-1}$  como en  $\text{pg}\cdot\text{célula}^{-1}$ ), eran más elevados en dicho cultivo, aunque similares al expuesto a 180  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 2). Los cultivos realizados a alta irradiancia (1265 y 1725  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) presentaban contenidos de luteína sensiblemente inferiores, alrededor de la mitad.



**Fig. 2.** Efecto de la irradiancia sobre el nivel de luteína en los cultivos de *Muriellopsis* sp. y el contenido por célula (●) 180; (○) 460; (■) 1265; (□) 1725  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la Fig. 1.

## III.2.1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl

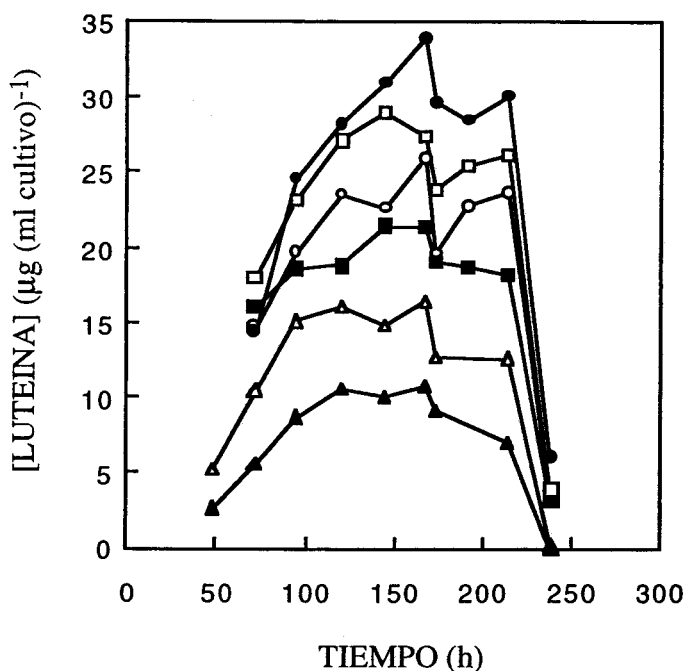
En *Haematococcus pluvialis*, pequeños incrementos en la concentración de cloruro sódico en el medio de cultivo (estrés salino), repercuten en un aumento del contenido en carotenoides, fundamentalmente astaxantina. Para ensayar el efecto de la concentración salina sobre el crecimiento y contenido en luteína en *Muriellopsis* sp., se cultivaron las células con suplementos de NaCl al medio de cultivo básico, que posee 2 mM NaCl.



**Fig. 3.** Crecimiento de *Muriellopsis* sp. a distintos suplementos de NaCl: (O) Control; (●) 35 mM; (□) 70 mM; (■) 100 mM; (Δ) 150 mM; (▲) 200 mM. El resto de las condiciones experimentales fueron iguales a las de la figura 1.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Se observa que en cuanto al crecimiento, la respuesta a 35 mM NaCl no fue significativa. Sin embargo, a suplementos de NaCl superiores, el crecimiento (referido a la máxima densidad celular alcanzada) resultó ser algo inferior.

En lo que se refiere a la concentración de luteína, el cultivo con 35 mM de NaCl presentó un ligero incremento respecto del control (Fig.4). Algo similar ocurre en el cultivo con 70 mM de NaCl. En el resto, se obtuvieron valores inferiores de contenido de luteína en el cultivo. El contenido celular en dicho pigmento expresado en  $\mu\text{g}\cdot\text{célula}^{-1}$  varió muy poco. Solo se observó un ligero incremento en los cultivos suplementados con 100 y 150 mM de NaCl.



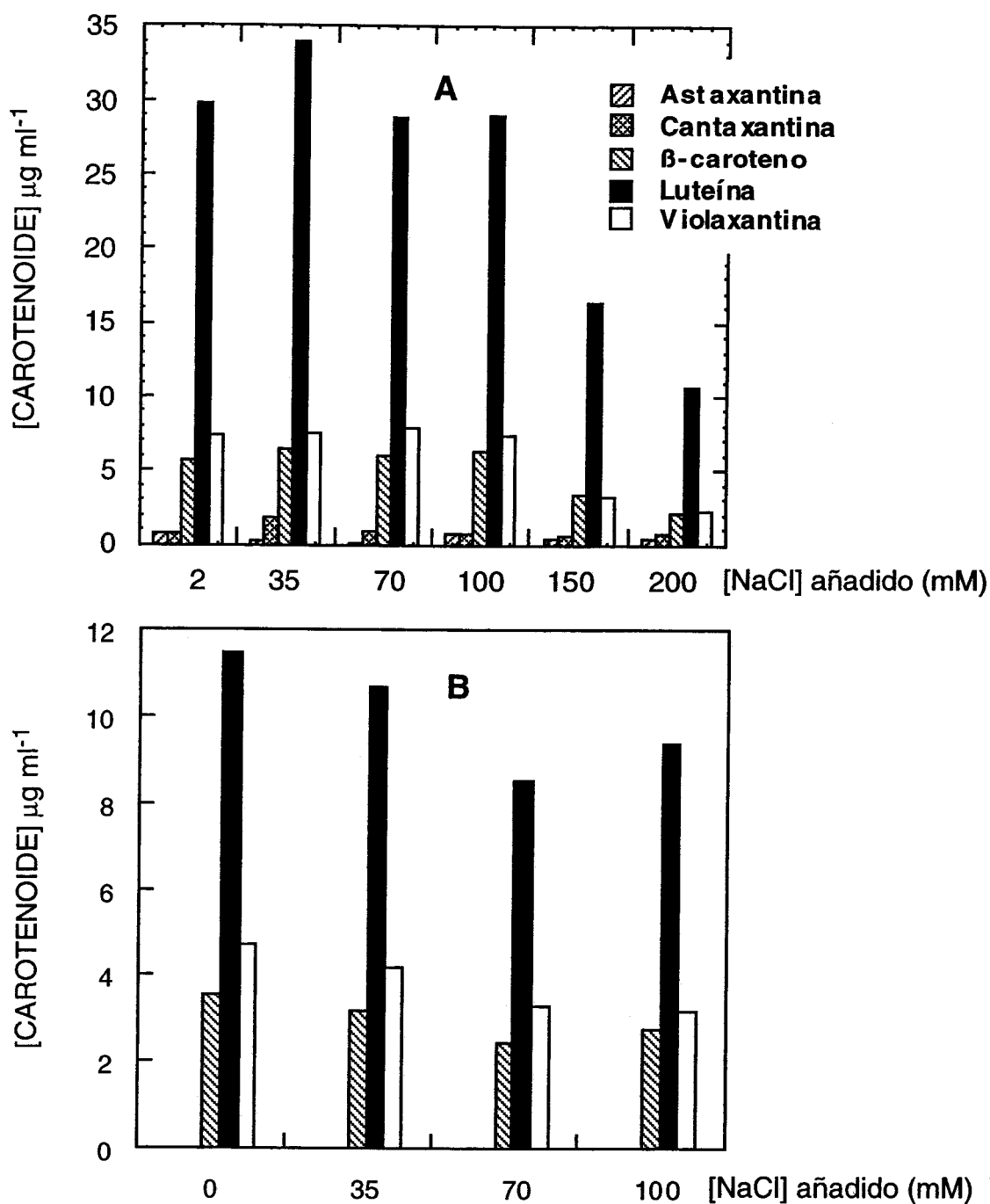
**Fig. 4.** Concentración de luteína ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en cultivos de *Muriellopsis* sp. con distintos suplementos de NaCl: (O) Control; (●) 35 mM; (□) 70 mM; (■) 100 mM; (Δ) 150 mM; (▲) 200 mM. Los cultivos se iluminaron a una intensidad de  $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Se puede concluir pues, que la concentración de NaCl en el medio de cultivo no repercute significativamente sobre el crecimiento del alga, así como tampoco sobre el contenido de luteína en las células. Esto es válido para concentraciones comprendidas entre 2 y 100 mM. Por encima de este valor, el efecto del NaCl es negativo sobre el crecimiento y acumulación de dicho pigmento.

### III.2.1.3 EFECTO CONJUNTO DE IRRADIANCIA Y ADICIÓN DE NaCl

Se ensayó el efecto de la adición de NaCl a dos intensidades de luz diferentes: baja ( $120 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y alta ( $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las concentraciones máximas de los cinco carotenoides individuales analizados se muestran en la figura 5 para cada condición ensayada.

Como se observa claramente, los contenidos en todos los carotenoides ensayados fueron mas altos en los cultivos expuestos a alta irradiancia. Aunque la luteína es el carotenoide mayoritario,  $\beta$ -caroteno y violaxantina se detectan también en todas las condiciones ensayadas, siendo sus contenidos, al igual que ocurría con la luteína, más altos en los cultivos a alta irradiancia. Por otro lado, astaxantina y cantaxantina aparecen a concentraciones muy bajas y solamente en los cultivos expuestos a alta irradiancia.

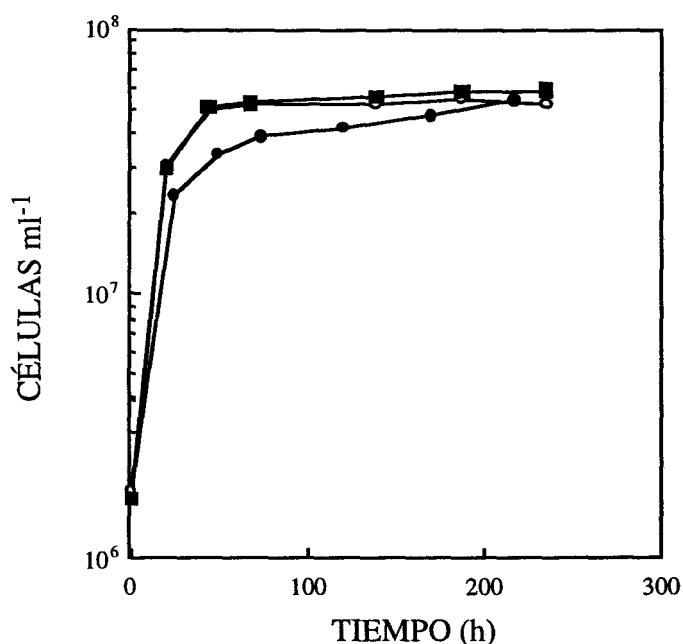


**Fig. 5** Efecto de la adición de NaCl sobre la acumulación de distintos carotenoides en *Muriellopsis* sp. cultivada a dos intensidades de luz: A,  $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y B,  $120 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las condiciones experimentales fueron las de la figura 1.

### III.2.1.4. EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y SU CONCENTRACIÓN

En una primera aproximación, se cultivó *Muriellopsis* sp. con diversas fuentes nitrogenadas, manteniéndose constante la concentración total de nitrógeno.

De los resultados, que se muestran en las Figs. 6 y 7, se concluye que no hay efecto aparente de la calidad de la fuente de nitrógeno empleada, tanto sobre el crecimiento (Fig. 6), como en el contenido máximo de luteína (Fig. 7). Además, la composición de carotenoides era muy similar para las distintas fuentes de nitrógeno utilizadas (nitrato, amonio o nitrato amónico).

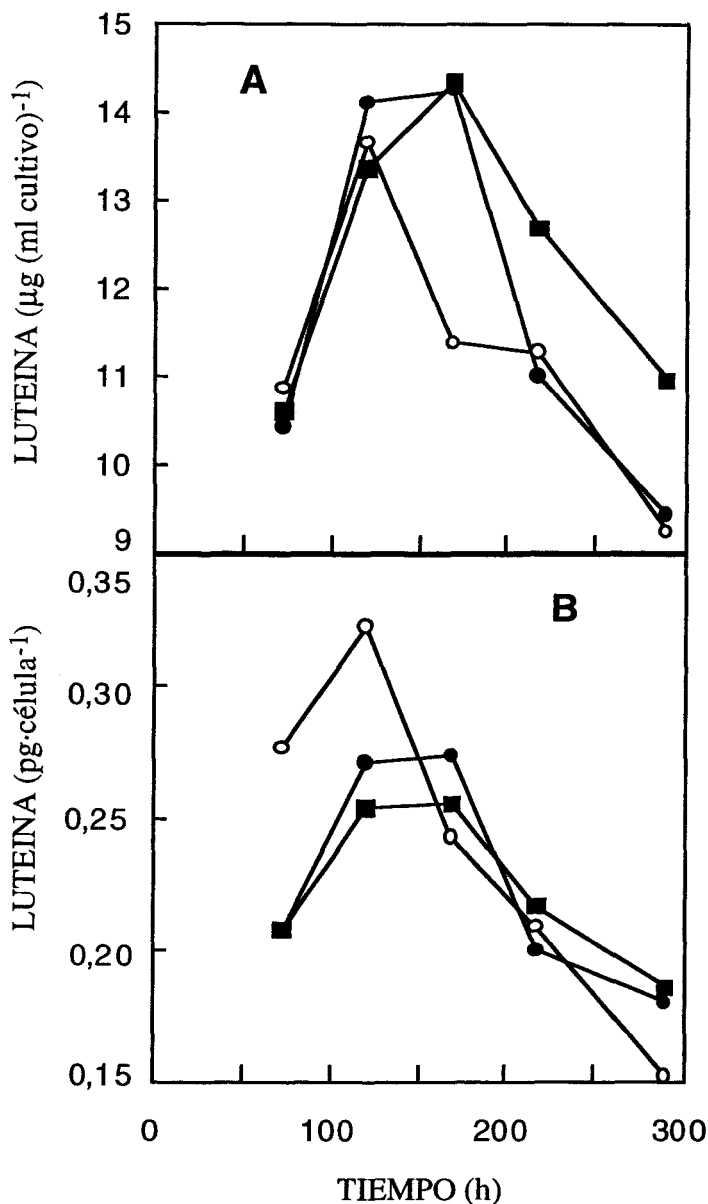


**Fig. 6.** Efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de *Muriellopsis* sp. (○) NaNO<sub>3</sub> 10 mM; (●) NH<sub>4</sub>Cl 10 mM; (■) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 5 mM. Las células se cultivaron a 28°C, a 460 μmol-fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Los cultivos se burbujearon con aire suplementado con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v) a un flujo de 100 l (l cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Sin embargo, la concentración de luteína en el cultivo era ligeramente más alta, en fase estacionaria avanzada, en el cultivo con



NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Por otro lado, el contenido celular de luteína en el cultivo realizado con NaNO<sub>3</sub>, en fase estacionaria temprana, era algo superior.



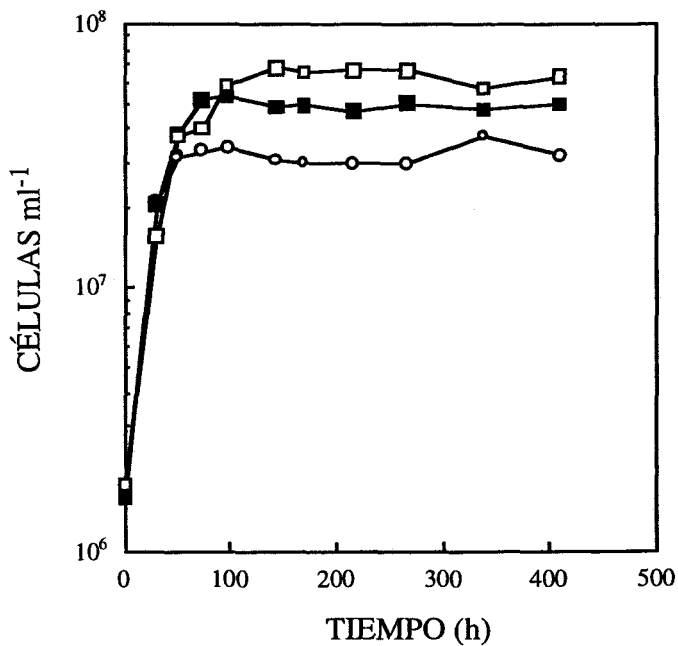
**Fig. 7.** Efecto de la fuente nitrogenada sobre el nivel de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp. (A) y el contenido por célula (B) (-O-) NaNO<sub>3</sub> 10 mM; (-●-) NH<sub>4</sub>Cl 10 mM y (-■-) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 5 mM. Las condiciones de cultivo fueron las indicadas en la figura 6.

Para completar este análisis, se consideró el efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno, utilizando NaNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

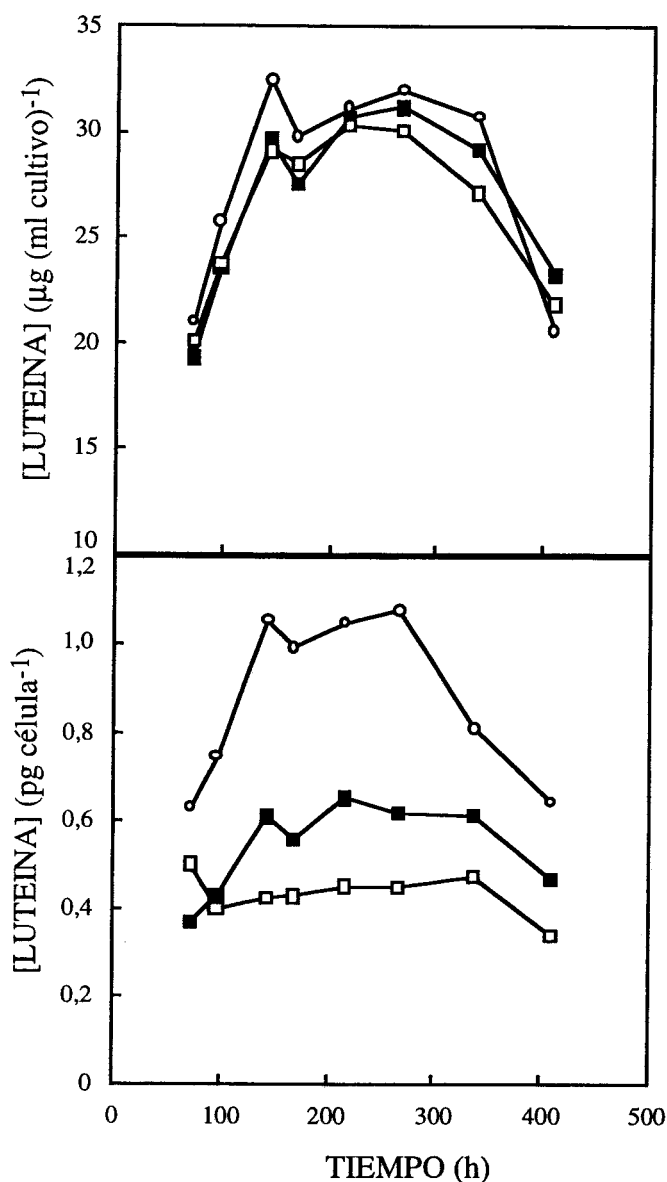
Las figuras 8 y 9 muestran, respectivamente, las curvas de crecimiento y de contenido en luteína de células de *Muriellopsis* sp.

cultivadas con  $\text{NaNO}_3$  30 mM y con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a dos concentraciones, 15 y 20 mM.

Se registraron diferencias significativas en cuanto al crecimiento, alcanzándose densidades celulares superiores en los cultivos que contenían  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fuente de nitrógeno, con respecto al cultivo con  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 8). Aunque los valores registrados de concentración de luteína en los cultivos fueron similares, el contenido de luteína por célula fue mayor en las cultivadas con  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 9).



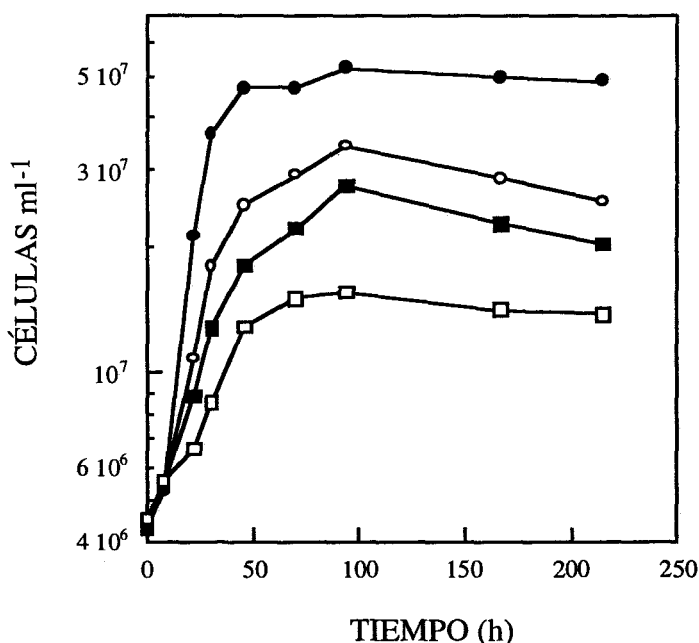
**Fig. 8.** Crecimiento de *Muriellopsis* sp. en medios con distintas fuentes y concentración de nitrógeno. (-○-)  $\text{NaNO}_3$  30 mM; (-■-)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  15 mM; (-□-)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20 mM. Otras condiciones experimentales como en la figura 6.



**Fig. 9.** Contenido en luteína de células de *Muriellopsis* sp. cultivadas con diversas fuentes de nitrógeno: (-○-)  $\text{NaNO}_3$  30 mM; (-■-)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  15 mM; (-□-)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20 mM. Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la figura anterior

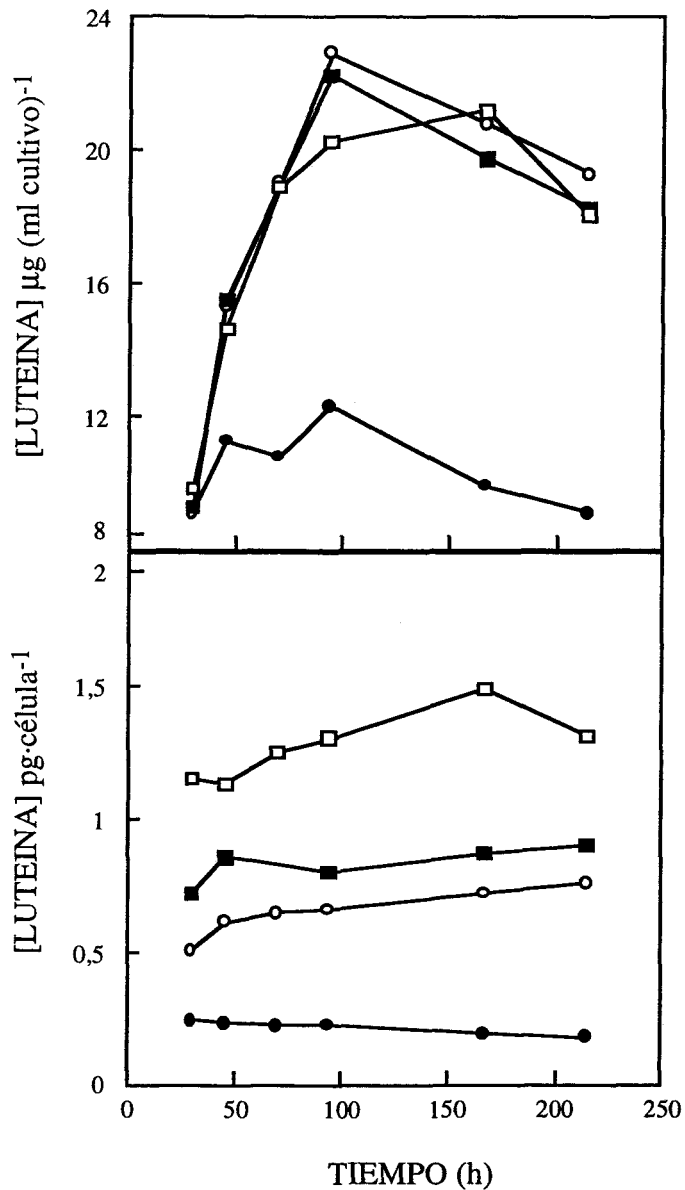
Para completar este análisis, se ensayaron diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ . Las figuras 10 y 11 muestran, respectivamente, las curvas de crecimiento y los contenidos en luteína de *Muriellopsis* sp. cultivada con diversas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo.

Los resultados mostraron una velocidad de crecimiento algo superior para el cultivo que poseía 10 mM de  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 10), que alcanzó también la densidad celular más elevada. Sin embargo, el contenido en luteína en este cultivo era relativamente bajo, aproximadamente la mitad que en los que contenían concentraciones superiores de  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 11). En los cultivos conteniendo 20 y 30 mM de nitrato el crecimiento fue muy similar, resultando algo menor en el que poseía la mayor concentración de nitrato ensayada (40 mM).



**Fig. 10.** Crecimiento de *Muriellopsis* sp. en cultivos con distintas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ : (●) 10 mM; (○) 20 mM; (■) 30 mM; (□) 40 mM. Otras condiciones experimentales fueron iguales a las indicadas en la figura 8.

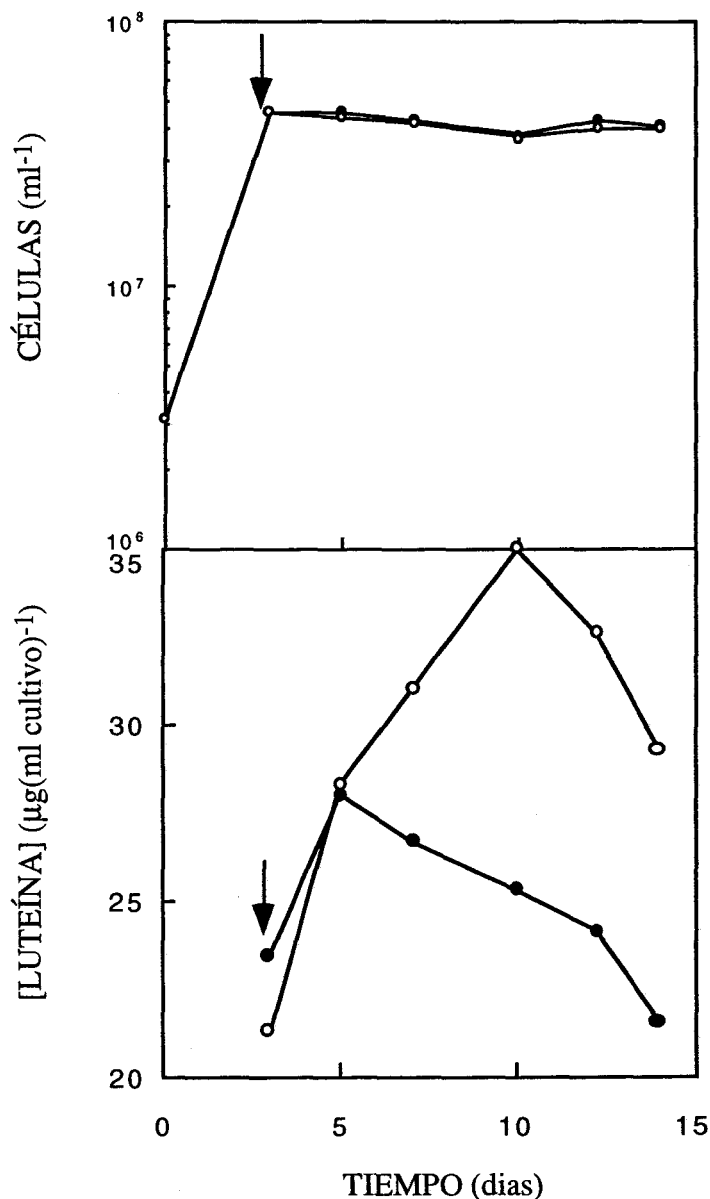
La concentración máxima de luteína en los cultivos con 20, 30 y 40 mM de  $\text{NaNO}_3$  fue muy similar, aproximadamente el doble que la del cultivo con 10 mM  $\text{NaNO}_3$ . Sin embargo, el contenido celular de luteína en el cultivo con 40 mM de nitrato era sensiblemente mayor, aproximadamente el doble de los encontrados en los cultivos con 20 y 30 mM  $\text{NaNO}_3$  (Fig. 11). Con 10 mM  $\text{NaNO}_3$  se presentaba el contenido celular de luteína más bajo.



**Fig. 11.** Efecto de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  sobre los niveles de luteína en los cultivos y en las células de *Muriellopsis* sp. (-●-) 10 mM; (-○-) 20 mM; (-■-) 30 mM; (-□-) 40 mM. El resto de las condiciones, como en figura 8.

A continuación, se estudió el efecto de la adición de nitrato sódico al cultivo, una vez transcurrido el tiempo suficiente como para que las células agotasen el nitrato inicialmente presente en el medio. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 12. La adición de dicho nutriente, realizada transcurridos tres días de cultivo, no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento, presentando los dos cultivos curvas de

crecimiento muy similares. Sin embargo, como se muestra en dicha figura, la concentración de luteína en los cultivos se vio afectada. El cultivo al que se añadió nitrato alcanzó concentraciones de luteína mayores que el control (sin adición), así como contenidos celulares más altos de dicho pigmento.



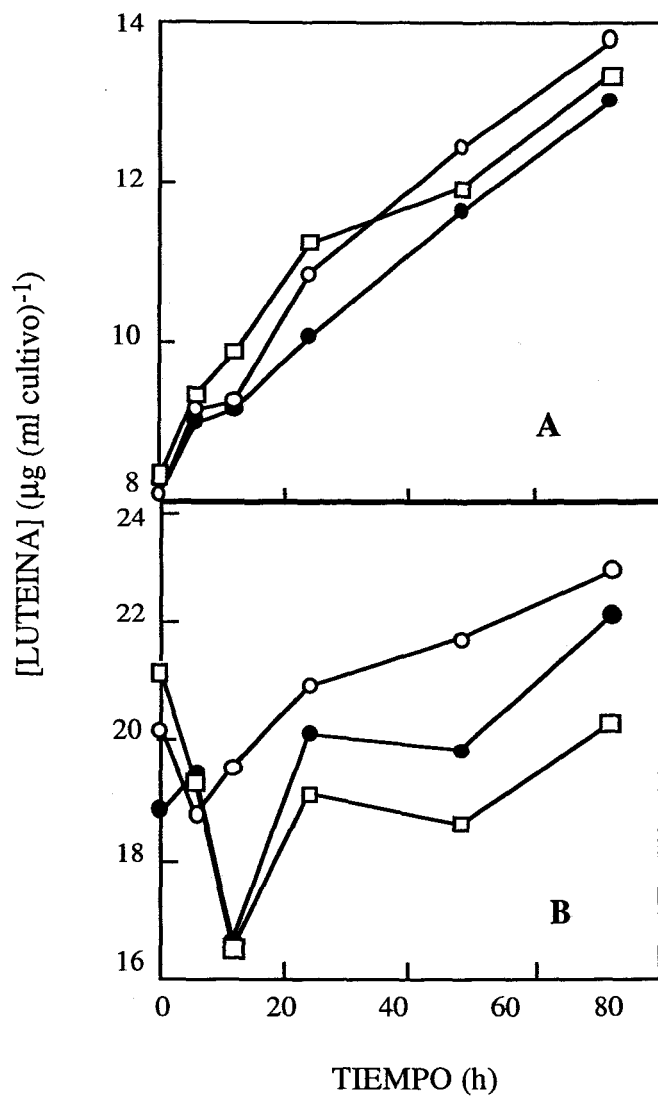
**Fig. 12.** Efecto de la adición de  $\text{NaNO}_3$  sobre el crecimiento y los niveles de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp. (●) Control; (○) adición de  $\text{NaNO}_3$  20 mM. Las células se cultivaron a  $28^\circ\text{C}$ , en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con  $\text{NaNO}_3$  20 mM, burbujando con aire suplementado con 1%  $\text{CO}_2$  a un caudal de  $100 \text{ l (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La flecha indica el momento de la adición.

### III.2.1.5. INHIBICIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO

Con el fin de indagar acerca de la influencia de la disponibilidad de nitrógeno sobre la carotenogénesis, se ensayó en *Muriellopsis* sp. el efecto de un inhibidor de la glutamina sintetasa, la D,L-metionina L-sulfoximina (MSX), sobre la síntesis de luteína. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto, en primer lugar, que el MSX a las concentraciones utilizadas, 0,5 y 1 mM, inactiva a la glutamina sintetasa celular hasta hacerla prácticamente nula, viéndose afectado negativamente el crecimiento (datos no mostrados). Además, como se desprende de los datos de la Fig. 13, el contenido de luteína en los cultivos era similar en todos los casos, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor. El nivel de luteína por célula, no obstante aumentaba ligeramente en presencia de MSX (un 10% aproximadamente).

Por otro lado, la intensidad de luz solo influye en una mayor acumulación general de pigmento, sin que exista, aparentemente, una interacción entre la intensidad de luz y la presencia del inhibidor.

Más adelante, en el apartado III.3.3, se estudia el efecto de otro inhibidor de la glutamina sintetasa, el glufosinato sódico, sobre el crecimiento y la acumulación de carotenoides en *Haematococcus pluvialis* y *Muriellopsis* sp. De los resultados se extrae la misma conclusión que para la metionina sulfoximina, es decir, que la inhibición de la asimilación de nitrógeno afecta negativamente a la síntesis de luteína.



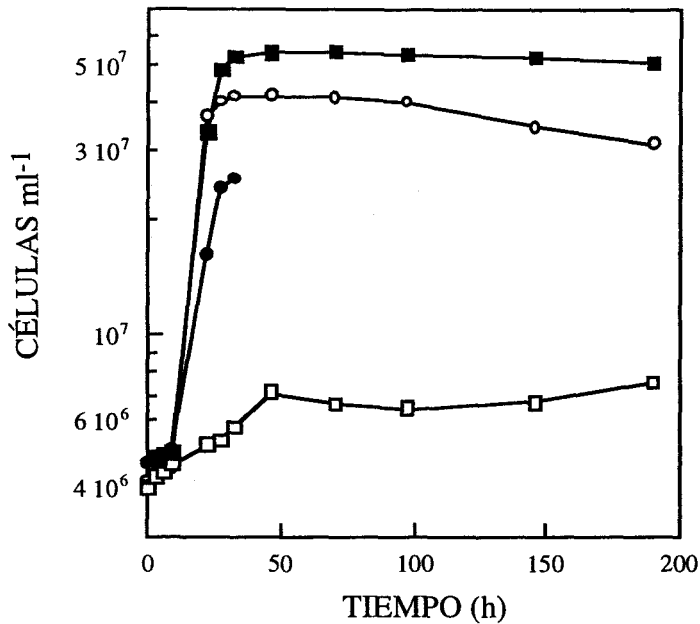
**Fig.13.** Evolución del contenido en luteína en células de *Muriellopsis* sp. en presencia y ausencia de MSX, a baja (A;  $160 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y alta (B;  $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) irradiancia. (●) control; (○) MSX 0,5 mM; (□) MSX 1 mM. Otras condiciones experimentales fueron como las indicadas en la figura 12.



### III.2.1.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA

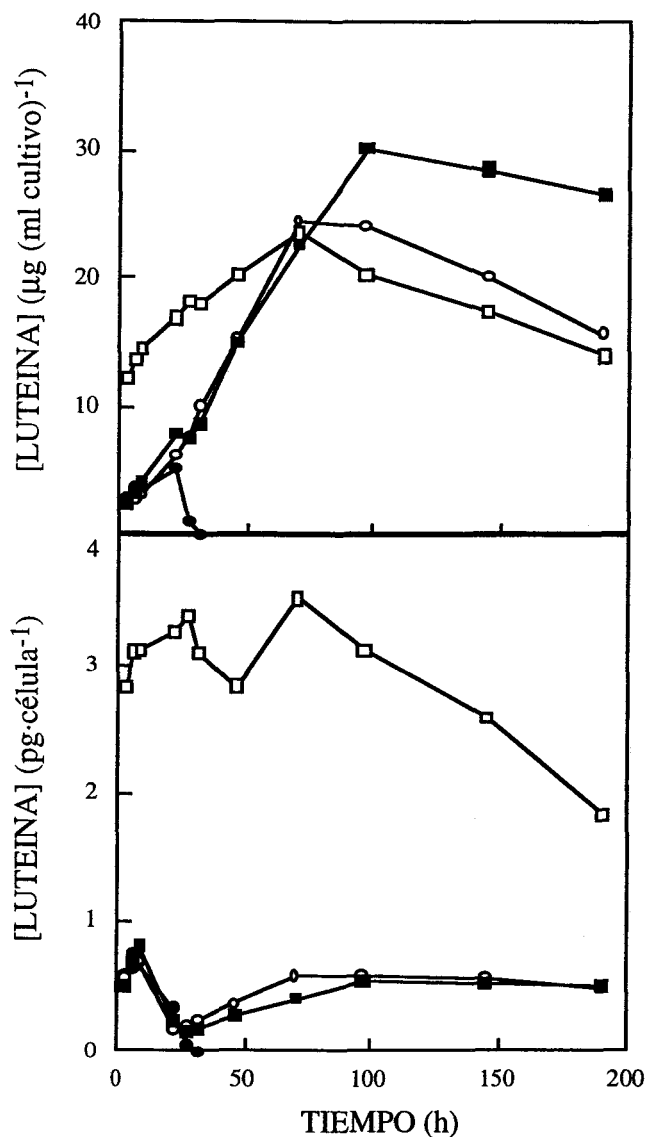
Se ha descrito que la temperatura es un factor ambiental que influye en la carotenogénesis). El estudio de Tjahjono y col., (1994) demuestra que un aumento de la temperatura del cultivo repercute en un incremento de pigmentos carotenoides, especialmente astaxantina, en las células de *Haematococcus pluvialis*. A fin de verificar el efecto de este factor sobre el crecimiento y contenido de carotenoides en *Muriellopsis* sp. se realizaron cuatro cultivos de esta microalga a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 14 y 15.

El cultivo mantenido a 28°C fue el que presentó la densidad celular más elevada (Fig. 14), seguido muy de cerca por el cultivo realizado a 24°C. A 33°C el cultivo experimentó un ligero incremento del número de células en los primeros dos días de cultivo, estabilizándose a continuación. En cuanto al contenido de luteína en los cultivos, el mantenido a 28°C presentó el valor más elevado (Fig. 15), seguido por el realizado a 24°C. El cultivo a 33°C presentaba no obstante una concentración de luteína, en fase exponencial y estacionaria temprana, superior a la del cultivo realizado a 28°C, si bien en fase estacionaria más avanzada, la concentración de luteína disminuía, haciéndose inferior a la del cultivo realizado a 28°C. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre el contenido celular de luteína era diferente, mostrando las células del cultivo mantenido a 33°C un valor claramente superior (5 veces) a las de cultivos mantenidos a otras temperaturas.

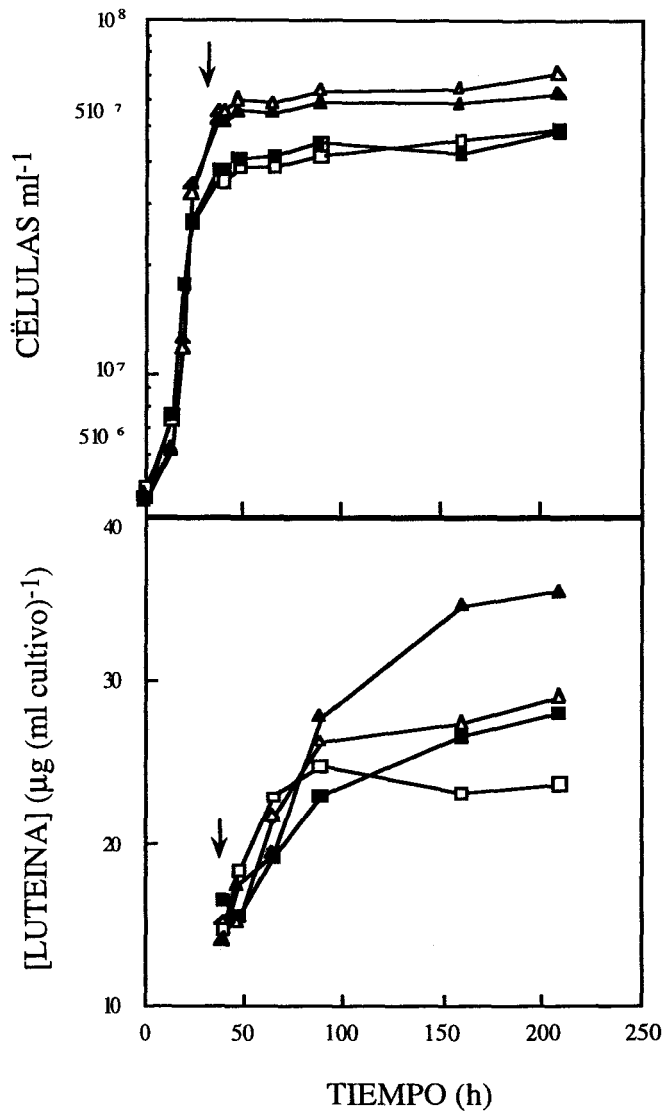


**Fig. 14.** Crecimiento de *Muriellopsis* sp. a distinta temperatura: (●) 20°C; (○) 24°C; (■) 28°C; (□) 33°C. Las células se cultivaron a 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los cultivos se burbujearon con aire suplementado con  $\text{CO}_2$  al 1% (v/v) a un flujo de 100 l (l cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Tomando estos datos como base, se planteó una estrategia de cultivo en dos fases. En una primera fase, se mantendría el cultivo a la temperatura óptima de crecimiento (28°C), para, una vez alcanzado un valor idóneo de densidad celular, incrementar la temperatura, a fin de conseguir un aumento del contenido celular de luteína por efecto de choque térmico (33°C). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16. Como se desprende de ellos, en respuesta al aumento de la temperatura del cultivo se registró un incremento en el contenido en luteína del cultivo de aproximadamente un 20%.



**Fig. 15.** Contenido en luteína de células de *Muriellopsis* sp. cultivadas a diversas temperaturas: (-●-) 20°C; (-○-) 24°C; (-■-) 28°C; (-□-) 33°C. Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la figura 14.



**Fig. 16.** Efecto del choque térmico sobre el crecimiento y contenido volumétrico de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp.: (-□-) 24°C; (-■-) 24°C → 33°C; (-△-) 28°C; (-▲-) 28°C → 33°C. Las demás condiciones experimentales fueron como las indicadas en la figura 14. La flecha indica el momento en que se incrementó la temperatura del cultivo a 33°C en las situaciones ■ y ▲.

No se consiguió un mayor incremento en luteína aumentando la temperatura del choque térmico. De la misma forma, tampoco se obtuvo un aumento en el contenido volumétrico de luteína en otras fases del cultivo distintas de la fase de deceleración.

### III.2.1.7. EFECTO DEL pH

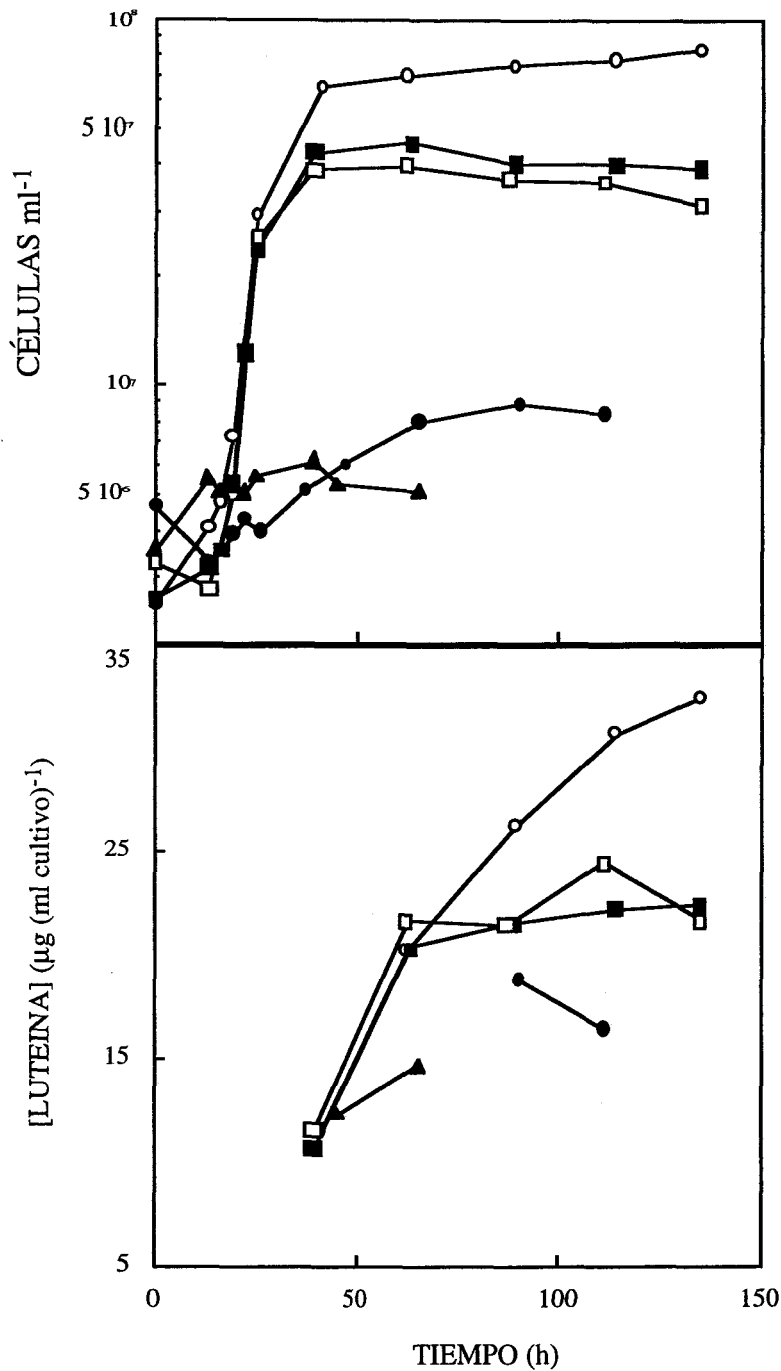
A fin de ensayar adecuadamente el efecto del pH sobre el crecimiento y acumulación de luteína, *Muriellopsis* sp. se cultivó en un fotoquimiostato, en régimen estanco, empleando una cuba de dos litros de capacidad, con agitación mediante un sistema de "air-lift", manteniendo el resto de las condiciones habituales y correspondientes a las óptimas para el crecimiento de esta microalga. En el sistema de cultivo empleado, equipado con una sonda de pH, el valor fijado de pH se mantiene en la suspensión celular mediante pulsos de CO<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17. Como se observa, tanto para el crecimiento como para la acumulación de luteína, el valor óptimo de pH fue de 6,5, seguido por los valores de pH 7 y 8. Sin embargo, el contenido de luteína por célula (Tabla IV) resultó mayor en los valores extremos de pH ensayados (6 y 9). A estos valores de pH, no obstante, la viabilidad de los cultivos fue muy baja

**Tabla IV.** EFECTO DEL pH DE CULTIVO SOBRE LOS CONTENIDOS CELULARES MÁXIMOS DE LUTEÍNA EN *Muriellopsis* sp.

pH	CONTENIDO DE LUTEÍNA
	(pg/célula)
6,0	2,1
6,5	0,4
7,0	0,6
8,0	0,7
9,0	2,8

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron a 28°C, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, burbujeado con aire a un caudal de 1,2 l min<sup>-1</sup>. Los datos mostrados son los valores medios de al menos tres determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.



**Fig 17.** Efecto del pH sobre el crecimiento y contenido en luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp. (●) pH 6 (○) pH 6,5; (■) pH 7; (□) pH 8; (▲) pH 9. La temperatura de los cultivos fue de 28°C. Otras condiciones experimentales fueron como las indicadas en la figura 16.

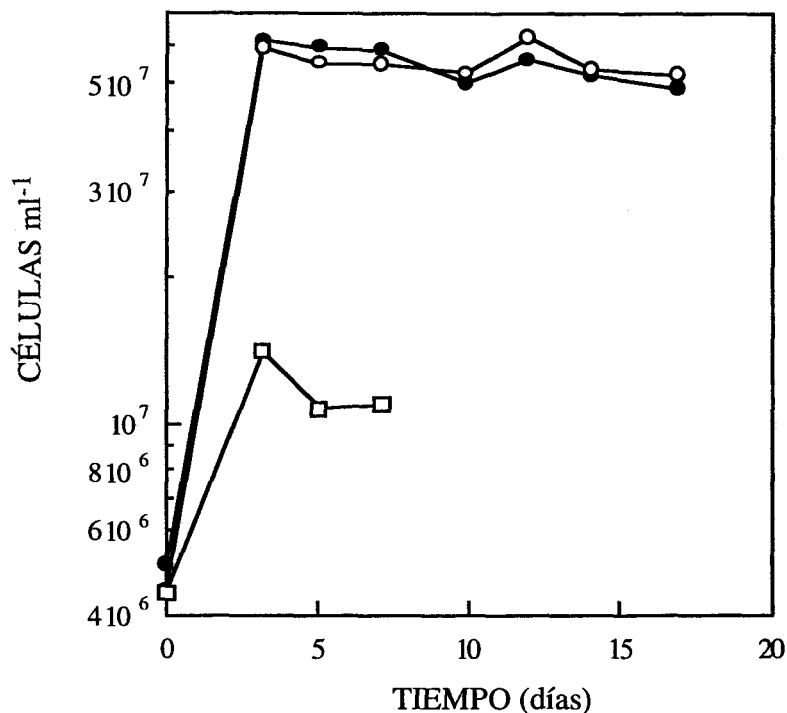
### III. 2.1.8. CULTIVOS MIXOTRÓFICOS DE *Muriellopsis* sp.

Existe abundante información en la bibliografía sobre el crecimiento mixotrófico de varias estirpes de microalgas, que suele resultar en un incremento del contenido en carotenoides en relación al cultivo fotoautotrófico. En particular, se ha utilizado acetato sódico en cultivos de *Haematococcus pluvialis*, con un incremento en la acumulación de astaxantina en presencia de esta fuente de carbono, suplementaria al CO<sub>2</sub>. Por otro lado, también se ha empleado glucosa como fuente de carbono suplementaria en cultivos de *Chlorococcum* sp., obteniéndose asimismo un incremento en la producción de carotenoides.

En primer término se ensayó el efecto de suplementar con acetato sódico el medio de cultivo convencional de *Muriellopsis* sp. Este compuesto, a las concentraciones utilizadas, 10 y 20 mM, no afectaba al crecimiento, obteniéndose unas curvas de crecimiento muy similares en ausencia o presencia de esta fuente de carbono. Tampoco se afectó significativamente el contenido en carotenoides.

Posteriormente se ensayó también el efecto de la glucosa como suplemento del medio de cultivo standard sobre el crecimiento y contenido en carotenoides de *Muriellopsis* sp. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 18 y en la tabla V. Como se observa en la Fig. 18, la presencia de glucosa en el medio de cultivo no afectó al crecimiento de *Muriellopsis* sp. en condiciones fotoautotróficas. En la figura se observa también que el crecimiento de esta microalga en condiciones heterotróficas es despreciable, indicando que la glucosa no puede sustentar un adecuado crecimiento de esta estirpe en la oscuridad. La tabla V recoge los contenidos en carotenoides mayoritarios de los correspondientes cultivos. Como se desprende de dichos datos, la presencia de glucosa en el medio de cultivo indujo un incremento notable en las concentraciones de astaxantina y de cantaxantina. Por el

contrario, el contenido en luteína disminuyó sensiblemente (alrededor de la mitad) con la presencia de glucosa en el medio de cultivo.



**Fig. 18.** Crecimiento de *Muriellopsis* sp. en las siguientes condiciones: (●) control (crecimiento fotoautotrófico); (○) luz + glucosa 0,2 M; (□) glucosa 0,2 M en oscuridad. Los cultivos se desarrollaron a 28°C y 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se burbujearon con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 1% a un flujo de 100 l (1 cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

**TABLA V.** EFECTO DE LA ADICIÓN DE GLUCOSA SOBRE EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES MAYORITARIOS EN CULTIVOS DE *Muriellopsis* sp.

[Carotenoides] (mg (1 cultivo) <sup>-1</sup> )			
Adición	Astaxantina	Cantaxantina	Luteína
<b>control</b>	0,8	1,8	29
<b>+ Glucosa</b>			
<b>0,2 M</b>	8,0	10,1	16
<b>+ Glucosa</b>			
<b>0,2 M,</b>	-	-	2,8
<b>oscuridad</b>			

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en las condiciones experimentales indicadas en la Fig. 18.



### III. 2.1.9. EFECTO DE RADICALES DE OXÍGENO

En la literatura se recoge abundante información sobre el papel que desempeñan los carotenoides en las membranas del cloroplasto, como secuestradores de radicales libres de oxígeno. Son numerosos los trabajos que apuntan a esta función como una de las más importantes de dichos pigmentos. De hecho, Kobayashi et al. (1993) ponen de manifiesto que los radicales oxígeno singlete, radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical peroxi, son capaces de reforzar la síntesis de astaxantina en células de *Haematococcus*. Por otro lado, Fan et al. (1998), defienden un papel de ciertos radicales de oxígeno en la activación de la carotenogénesis.

Con el objetivo de indagar en esta línea, se abordó el estudio del efecto de diferentes radicales de oxígeno sobre el crecimiento y composición de pigmentos en *Muriellopsis* sp. Con este fin se emplearon especies químicas productoras de radicales libres de oxígeno: el metil viológeno, productor de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el azul de metileno, productor de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

Para el estudio del efecto del metil viológeno sobre el crecimiento y contenido en carotenoides de *Muriellopsis* sp. se adicionó este compuesto a un cultivo de la estirpe considerada, en fase estacionaria temprana (al quinto día de cultivo). La adición de este compuesto a concentraciones 0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, no afectó el crecimiento de *Muriellopsis* sp. Por el contrario, la concentración de luteína en los cultivos disminuyó en aquellos expuestos a metil viológeno. Lo mismo ocurrió para el resto de los carotenoides analizados (astaxantina, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno y violaxantina).

Se realizó el mismo tipo de experimento, empleando azul de metileno. Al igual que en el caso del metil viológeno, la adición de azul

de metileno a concentraciones 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ , no tuvo efecto sobre el crecimiento de *Muriellopsis* sp.. Respecto al contenido de luteína, los resultados se recogen en la tabla VI. Como se observa, la presencia de azul de metileno prácticamente no incrementa los valores de contenido en luteína de cultivos ni células de *Muriellopsis* sp., si bien, en el caso del cultivo suplementado con 2  $\mu\text{M}$  de azul de metileno se registraron valores ligeramente superiores a los del control.

Tabla VI. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AZUL DE METILENO AL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CONTENIDO EN LUTEÍNA EN CULTIVOS Y CÉLULAS DE *Muriellopsis* sp.

[azul de metileno] ( $\mu\text{M}$ )	Contenido en luteína	
	(mg (l cultivo) <sup>-1</sup> )	(pg célula <sup>-1</sup> )
0	26,6	0,57
0,5	27,9	0,58
1	27,8	0,59
2	31,0	0,65

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron a 28°C, a 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con  $\text{NaNO}_3$  20 mM, burbujeado con aire a un caudal de 100 l (l cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Los datos mostrados son los valores medios de al menos tres determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

### III.2.2. CULTIVO EN FOTOQUIMIOSTATO

#### III.2.2.1 Producción de luteína en cultivo continuo

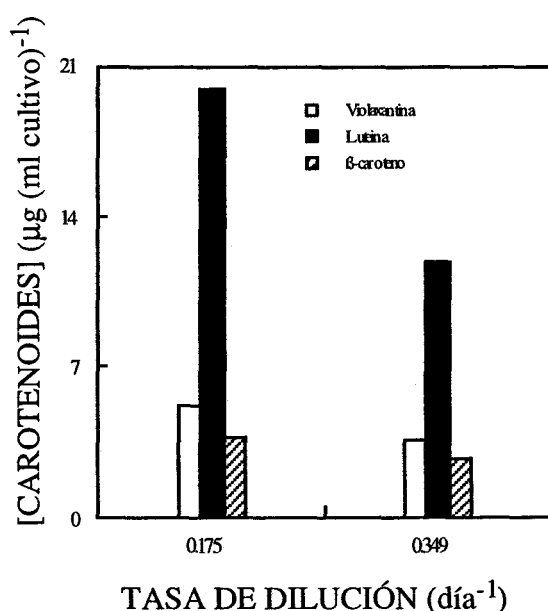
Una vez desarrollada la caracterización de las condiciones de crecimiento y síntesis de pigmentos en cultivo estanco, bajo condiciones controladas de laboratorio, se realizaron una serie de ensayos con el fin de evaluar la producción de luteína por *Muriellopsis* sp. en cultivo continuo. Para ello, en primer lugar, se cultivó esta estirpe en un fotoquimiostato equipado con un reactor de cinco litros de capacidad y dotado de un sistema de agitación mecánica, bajo condiciones controladas, como se describe en *Materiales y Métodos*. Las condiciones de cultivo fueron lo más similares posibles a las establecidas como óptimas en los experimentos anteriormente descritos, realizados en cultivo estanco, 28°C, pH 7, irradiancia  $\sim 500 \mu\text{mol-fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $\text{NaNO}_3$  20 mM como fuente de nitrógeno.

La tabla VII y las Figs. 19 y 20 recogen los resultados obtenidos. Como se desprende de los datos mostrados en la tabla y en la Fig. 20, las densidades celulares alcanzadas para las dos tasas de dilución utilizadas fueron prácticamente iguales. Sin embargo, los contenidos en luteína, tanto de los cultivos como de las células, disminuyeron al aumentar la tasa de dilución. El efecto conjunto de estas variaciones se tradujo en un aumento significativo en la producción de luteína en respuesta al incremento en la tasa de dilución. Tanto violaxantina como  $\beta$ -caroteno evolucionaron en forma análoga a la luteína (Fig. 20).

**Tabla VII. CONTENIDO Y PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA POR *Muriellopsis* sp. EN CULTIVO CONTINUO A DOS TASAS DE DILUCIÓN**

Tasa de dilución (d <sup>-1</sup> )	Densidad celular (N°células·ml <sup>-1</sup> )	Contenido en luteína		Producción de luteína (mg·(l cultivo) <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> )
		(mg·(l cultivo) <sup>-1</sup> )	(pg·célula <sup>-1</sup> )	
0,175	2,7 × 10 <sup>7</sup>	19,8	0,7	3,4
0,349	2,9 × 10 <sup>7</sup>	12,0	0,4	4,2

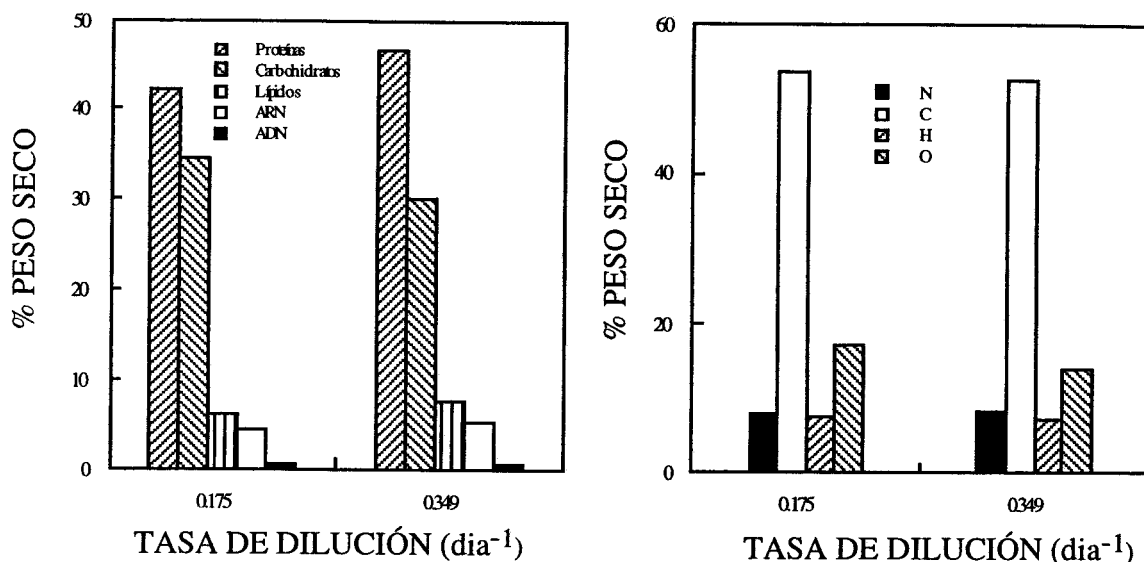
Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en cultivo continuo en un fotoquimiostato equipado con un recipiente de cultivo de 5 litros y agitación mecánica (200 rpm), a 28°C, pH 7, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, iluminadas con luz blanca de 500 μmol·fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, y burbujeados con aire a un caudal de 1,2 l min<sup>-1</sup>, con pulsos de CO<sub>2</sub> para mantener el pH. Los datos mostrados son los valores medios de tres determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.



**Fig. 19.** Concentración de carotenoides de cultivos continuos de *Muriellopsis* sp., a dos valores de tasa de dilución. Las condiciones fueron las mismas que las indicadas en la Tabla VII.

Se analizó también la composición molecular y elemental de la estirpe *Muriellopsis* sp. para las dos tasas de dilución ensayadas. Los datos se muestran en la Fig. 20. Como se observa, no hay diferencias notables a este respecto. Tan solo se aprecia un débil incremento en el

contenido en proteínas, con una disminución en el contenido de carbohidratos, al aumentar la tasa de dilución.



**Fig. 20** Composición molecular y elemental de *Muriellopsis* sp. en cultivo continuo, a dos tasas de dilución. Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la Tabla VII.

Al objeto de valorar la influencia del recipiente de cultivo y de la agitación mecánica, se realizó otra prueba de producción de luteína en cultivo continuo utilizando el fotoquimiostato con un recipiente de cultivo de dos litros de capacidad con sistema de agitación por "air-lift", y dotado de un sistema de iluminación por tubos fluorescentes de bajo consumo, que suministraban luz fría. Se utilizaron dos velocidades de dilución: 0,281 y 0,506 día<sup>-1</sup>. Las productividades de luteína obtenidas fueron del mismo orden que las conseguidas con el recipiente de cultivo de 5 litros: 2,64 y 4,4 mg (l cultivo)<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, respectivamente. Concluimos, por tanto, que los dos recipientes de cultivo son igualmente útiles para nuestras experiencias de cultivo continuo y que la agitación mecánica no tiene aparentes efectos negativos sobre las células del cultivo. Por simplicidad, se escogió para posteriores estudios el recipiente de 2 litros con agitación por "air-lift".

Se desarrollaron a continuación una serie de ensayos adicionales de cultivo continuo incrementando la tasa de dilución ( $D= 0,948 \text{ día}^{-1}$ ), y verificando también el efecto del pH (7 y 6,5). No se encontraron diferencias significativas ni en densidad celular ni en contenido de luteína. La productividad de luteína calculada duplicaba los valores obtenidos con las tasas de dilución anteriormente utilizadas, alcanzándose valores de  $8,8 \text{ mg (l cultivo)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

La productividad de luteína varía, pues, con la velocidad de dilución. Por ello, realizamos un estudio de la influencia de la tasa de dilución sobre la producción de luteína, con el objetivo de determinar condiciones de productividad máxima en cultivo continuo. Los resultados se recogen en la Tabla VIII.

Como se observa, la densidad celular disminuye al aumentar la velocidad de dilución. Sin embargo, la producción de luteína aumenta, en primer lugar, con la velocidad de dilución, hasta alcanzar un valor máximo, a partir del cual, el aumento en la velocidad de dilución se traduce en una disminución de la producción de luteína. En nuestras condiciones experimentales, el valor máximo de producción de luteína ( $9,32 \text{ mg} \cdot (\text{l cultivo})^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) se corresponde con una tasa de dilución de  $0,036 \text{ h}^{-1}$ .

**Tabla VIII.** PRODUCTIVIDAD DE LUTEÍNA POR *Muriellopsis* sp. EN CULTIVO CONTINUO A DIFERENTES TASAS DE DILUCIÓN.

TASA DE DILUCIÓN (d <sup>-1</sup> )	PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA [mg (l cultivo) <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> ]	DENSIDAD CELULAR (Nºcélulas ml <sup>-1</sup> )
0,47	6,43	3,87 x 10 <sup>7</sup>
0,82	8,05	2,43 x 10 <sup>7</sup>
0,86	9,32	2,77 x 10 <sup>7</sup>
1,05	8,93	2,63 x 10 <sup>7</sup>
1,15	8,81	2,05 x 10 <sup>7</sup>
1,34	8,12	1,71 x 10 <sup>7</sup>
1,77	7,60	1,42 x 10 <sup>7</sup>

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en cultivo continuo en un fotoquimiostato equipado con un recipiente de cultivo de 2 litros con sistema de agitación por "air-lift", a 28°C, pH 7, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, iluminados con luz blanca de 460 μmol-fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, y burbujeados con aire a un caudal de 1,2 l min<sup>-1</sup>, con pulsos de CO<sub>2</sub> para mantener el pH. Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

### III.2.2.2 Efecto de la tensión de oxígeno sobre la producción de luteína

Una vez determinadas las condiciones para una producción óptima de luteína en cultivo continuo, resultaba de interés estudiar el efecto de la tensión de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de luteína, ya que estudios previos realizados con la microalga *Haematococcus pluvialis*, mostraban un aumento en la acumulación de astaxantina cuando se sometían los cultivos a una tensión de oxígeno superior al 21% (Lee y col., 1991). Empleamos una tasa de dilución de 0,04 h<sup>-1</sup> óptima para la producción de luteína en nuestras condiciones experimentales. El cultivo de *Muriellopsis* sp. en dichas condiciones mantiene una tensión de oxígeno del 28%. Utilizando este valor como control, se ensayaron dos valores superiores de tensión de oxígeno. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX. Como se observa, el

aumento en la tensión de oxígeno no se traduce en aumento, sino en disminución del contenido en luteína y su productividad.

**Tabla IX.** CONTENIDO Y PRODUCTIVIDAD DE LUTEÍNA EN CULTIVOS CONTINUOS DE *Muriellopsis* sp. A DISTINTAS TENSIONES DE OXÍGENO.

Tensión de oxígeno (%)	Contenido en luteína (mg (l cultivo) <sup>-1</sup> )	Productividad de luteína (mg (l cultivo <sup>-1</sup> ) día <sup>-1</sup> )
28	11,3	9,6
40	7,3	6,9
50	2,7	2,5

Las células se cultivaron en las mismas condiciones experimentales que las indicadas en la Tabla VIII

### III.2.3 CULTIVO AL EXTERIOR EN FOTOBIORREACTOR TUBULAR CERRADO

#### III.2.3.1 Contenido en pigmentos a lo largo de un ciclo solar diario

Dados los interesantes resultados obtenidos en cuanto a los primeros ensayos de producción de luteína con *Muriellopsis* sp. en condiciones controladas de laboratorio, en cultivos tanto estanco como continuo, y considerando además las sobresalientes características que presenta este organismo –fundamentalmente su alta velocidad de crecimiento (tiempo de duplicación de unas 3 h) y su capacidad de producción de luteína– se procedió a verificar las características del cultivo de este microorganismo al exterior. Las experiencias se desarrollaron en el mes de Octubre (irradiancia media de alrededor de  $620 \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en un fotobiorreactor de 55 litros en cultivo continuo, a una tasa de dilución de  $0,36 \text{ día}^{-1}$ . Para esta tasa de dilución, y en base a los resultados de laboratorio, podría estimarse una productividad máxima de luteína de  $2,4 \text{ mg}\cdot(\text{l cultivo})^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  ( $63 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$ ). Se desarrolló un cuidadoso seguimiento del cultivo, con

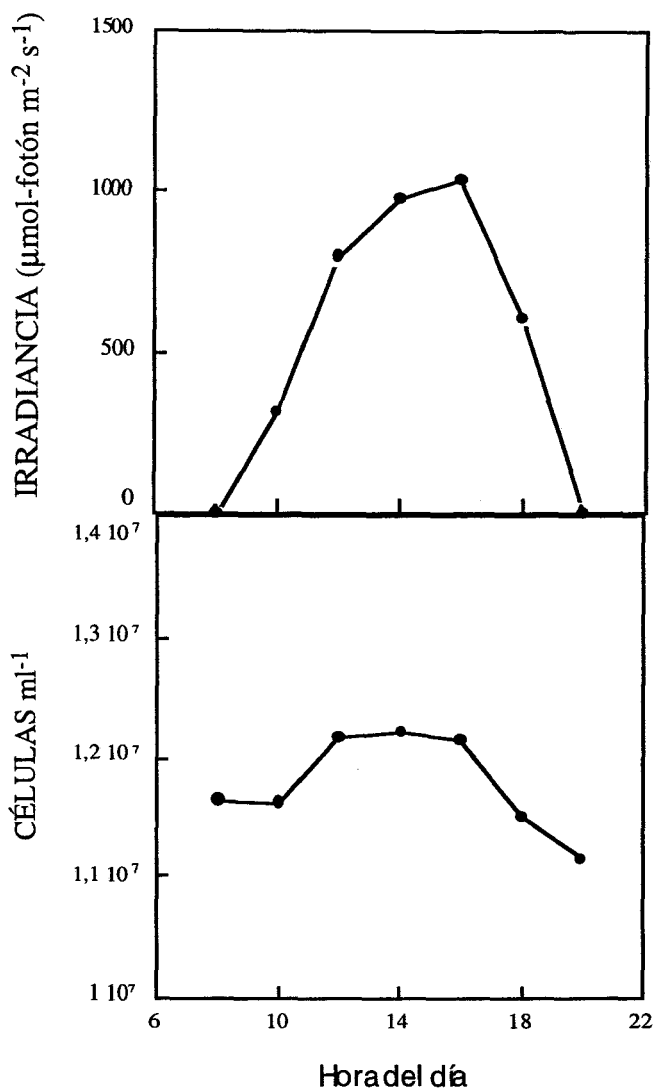


determinaciones de clorofila, número de células, peso seco, contenido en carotenoides, análisis molecular y elemental, a lo largo del periodo de luz, con el fin de determinar variaciones en dichos parámetros a lo largo de un ciclo solar diario. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 21 a 24.

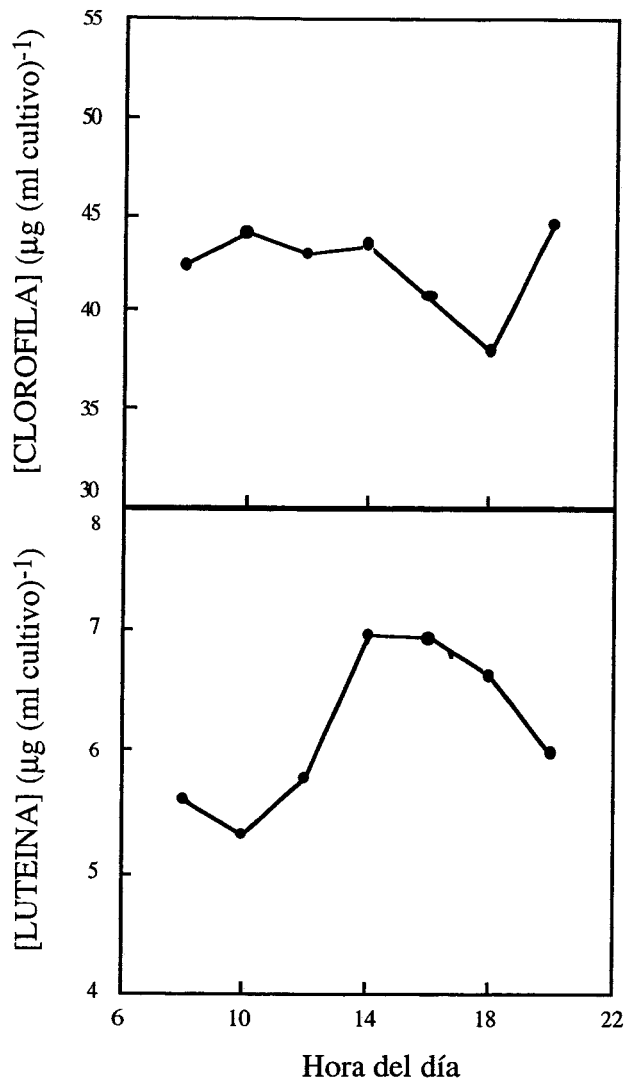
Como se observa en la Fig. 21, la densidad celular del cultivo se incrementa ligeramente entre las 12 y las 16 h, coincidiendo con las horas de mayor irradiancia, pero en general, la densidad celular se mantiene en el mismo orden (entre 1,1 y 1,2  $10^7$  células ( $\text{ml}^{-1}$ )) a lo largo del ciclo solar diario.

La Fig. 22 muestra la variación del contenido en clorofila y luteína del cultivo de *Muriellopsis* sp. a lo largo de un ciclo solar diario. Como se observa, la clorofila y la luteína tienen comportamiento opuesto; la primera decrece ligeramente a lo largo del día, produciéndose una subida al final de la tarde. La luteína, por el contrario, presenta en las primeras horas de la mañana niveles relativamente bajos, que aumentan a medida que avanza el día, para volver a bajar cuando disminuye la irradiancia.

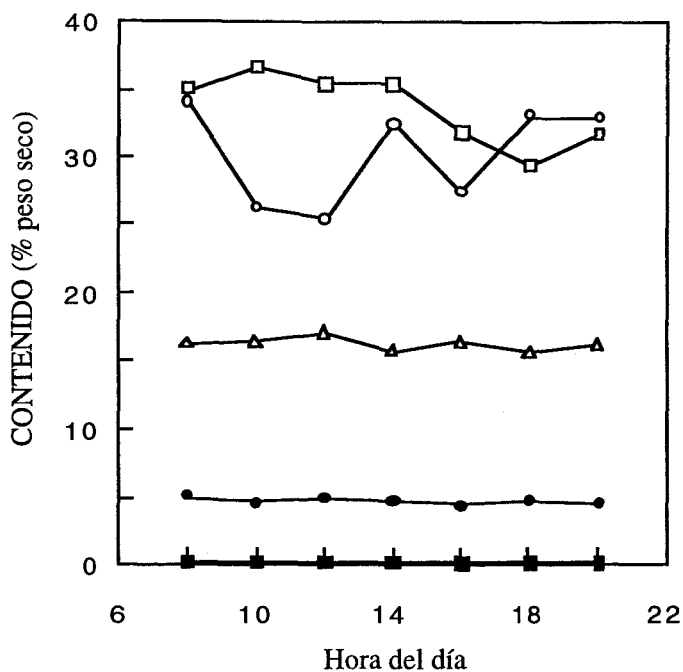
La concentración de luteína en el cultivo sigue un patrón bastante análogo al de la intensidad de luz, lo que viene a corroborar el hecho de que la alta irradiancia favorece la carotenogénesis.



**Fig. 21.** Variación de la irradiancia incidente y densidad celular de un cultivo continuo al exterior de *Muriellopsis* sp. a lo largo de un ciclo solar diario, durante el mes de Octubre. Las células se cultivaron a 28°C y pH 7, en un fotobiorreactor tubular dotado de un sistema de circulación por "air-lift" que era proporcionado por un flujo de aire de 250 l·h<sup>-1</sup>, con pulsos de CO<sub>2</sub> para controlar el pH.

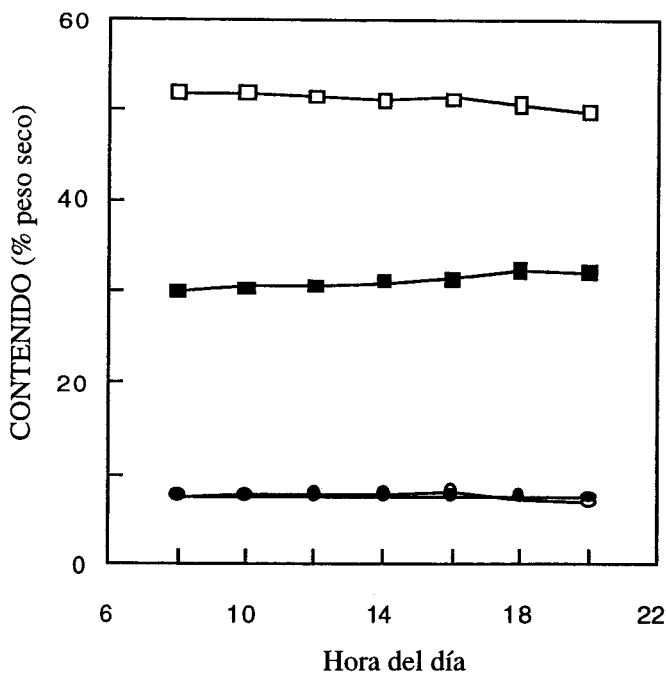


**Fig. 22.** Variación de los contenidos volumétricos de clorofila total y de luteína en un cultivo continuo de *Muriellopsis* sp a lo largo de un ciclo solar diario, durante el mes de Octubre. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Fig. 21.



**Fig. 23.** Variación de la composición molecular de *Muriellopsis* sp., en cultivo continuo, a lo largo de un ciclo solar diario, durante el mes de Octubre. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Fig. 21. Símbolos: (-O-) Proteínas; (-□-) Carbohidratos; (-Δ-) Lípidos; (-●-) ARN; (-■-) ADN.

Las Figs. 23 y 24 muestran la composición molecular y elemental de *Muriellopsis* sp. en cultivo continuo, a lo largo del ciclo diario. Como se observa, no se aprecian variaciones significativas a lo largo del tiempo en ninguno de los componentes analizados, con excepción de las proteínas. La razón C/N, permaneció prácticamente invariable durante el ciclo diario, con un valor de alrededor de 7.



**Fig. 24.** Variación de la composición elemental de *Muriellopsis* sp. en cultivo continuo, a lo largo de un ciclo solar diario, durante el mes de Octubre. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Fig. 21. Símbolos: (-O-) Nitrógeno; (-□-) Carbono; (-●-) Hidrógeno; (-■-) Oxígeno

### III.2.3.2 Producción de luteína a lo largo del año

Tras este ensayo preliminar, procedimos a determinar la producción de luteína por *Muriellopsis* sp. en el fotobiorreactor a distintas tasas de dilución, y en épocas del año diferentes, dado que la irradiancia y el número de horas de sol son factores que deben influir muy significativamente sobre la producción de pigmento.

#### III.2.3.2.a Efecto de la velocidad de la suspensión celular sobre la producción de luteína

En primer lugar, se estudió el efecto de la velocidad de circulación de la suspensión celular sobre la densidad celular y la productividad de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp. Para ello, se modificó el caudal de

aire que proporcionaba el sistema de "air-lift", al objeto de obtener distintas velocidades de circulación del cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.

**Tabla X.** EFECTO DE LA VELOCIDAD DE LA SUSPENSIÓN CELULAR SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE LUTEÍNA Y LA DENSIDAD CELULAR EN CULTIVO CONTINUO DE *Muriellopsis* sp. A DISTINTAS TASAS DE DILUCIÓN.

TASA DE DILUCIÓN	Velocidad suspensión celular	PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA		DENSIDAD CELULAR
(h <sup>-1</sup> )	(m·s <sup>-1</sup> )	(mg m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	(mg·(l cultivo) <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> )	(N <sup>o</sup> células·ml <sup>-1</sup> )
<u>Marzo-Abril</u>				
0,09	0,29	84	3,4	1,5 × 10 <sup>7</sup>
0,09	0,38	110	4,4	2,2 × 10 <sup>7</sup>
<u>Mayo-Junio</u>				
0,06	0,29	148	5,9	3,0 × 10 <sup>7</sup>
0,06	0,38	174	7,0	3,0 × 10 <sup>7</sup>
0,09	0,29	106	4,2	1,6 × 10 <sup>7</sup>
0,09	0,38	141	5,6	2,0 × 10 <sup>7</sup>

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en cultivo continuo en un fotobiorreactor tubular con sistema de agitación por "air-lift", a 28°C, pH 7, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, burbujeados con aire a caudales de 250 y 500 l·min<sup>-1</sup>, que proporcionaban velocidades de 0,29 y 0,38 m·s<sup>-1</sup> respectivamente. El pH se mantenía con pulsos de CO<sub>2</sub>. La irradiancia media del periodo Marzo-Abril fue de alrededor de 800 μmol·fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, en Mayo-Junio fue de 1200 μmol·fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

Como se desprende de los datos mostrados, en todos los casos se observó que el aumento de la velocidad de circulación de la suspensión celular se traducía en un incremento de la producción de luteína y, asimismo, de la densidad celular. En el periodo Mayo-Junio, con una tasa de dilución de 0,06 h<sup>-1</sup>, no se registraba un incremento en la densidad celular al aumentar la velocidad de circulación de la suspensión celular, debido posiblemente a que el cultivo era ya

suficientemente denso para la mencionada época del año. Por todo esto, escogimos para nuestros estudios la mayor velocidad de la suspensión celular, es decir,  $0,38 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , proporcionada por un caudal de aire en el "air-lift" de  $500 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ .

III.2.3.2.b Efecto de la tasa de dilución en distintas épocas del año.

Se ha analizado el efecto de la tasa de dilución sobre la producción de luteína en cultivo continuo de *Muriellopsis* sp., a lo largo de diferentes estaciones del año. Los resultados se recogen en las tablas XI, XII y XIII.

**Tabla XI.** EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA Y DENSIDAD CELULAR EN LOS MESES DE ENERO Y FEBRERO

TASA DE DILUCIÓN	PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA		DENSIDAD CELULAR MEDIA
	( $\text{h}^{-1}$ )	( $\text{mg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ )	[ $\text{mg (l cultivo)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ]
0,02	85,0	3,4	$3,0 \times 10^7$
0,04	83,3	3,3	$2,6 \times 10^7$
0,06	83,6	3,3	$2,2 \times 10^7$
0,09	75,5	3,0	$1,7 \times 10^7$
0,13	49,4	2,0	$0,7 \times 10^7$

Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en cultivo continuo en un fotobiorreactor tubular con sistema de agitación por "air-lift", a  $28^{\circ}\text{C}$ , pH 7, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con  $\text{NaNO}_3$  20 mM, burbujeados con aire a un caudal de  $500 \text{ l min}^{-1}$ , que proporcionaba una velocidad de circulación de la suspensión de  $0,38 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . El pH se mantenía con pulsos de  $\text{CO}_2$ . La irradiancia media del periodo considerado fue de alrededor de  $770 \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

**Tabla XII.** EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA Y DENSIDAD CELULAR EN LOS MESES DE MARZO Y ABRIL

TASA DE DILUCIÓN	PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA		DENSIDAD CELULAR MEDIA
	(h <sup>-1</sup> )	(mg·m <sup>-2</sup> ·día <sup>-1</sup> )	[mg·(1 cultivo) <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> ]
0,02	85	3,4	3,0 x 10 <sup>7</sup>
0,04	115	4,6	3,0 x 10 <sup>7</sup>
0,06	95	3,8	2,5 x 10 <sup>7</sup>
0,09	84	3,4	2,0 x 10 <sup>7</sup>

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Tabla XI. La irradiancia media del periodo considerado fue de alrededor de 800  $\mu\text{mol-fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

**Tabla XIII.** EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA Y DENSIDAD CELULAR EN LOS MESES DE MAYO Y JUNIO

TASA DE DILUCIÓN	PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA		DENSIDAD CELULAR MEDIA
	(h <sup>-1</sup> )	(mg·m <sup>-2</sup> ·día <sup>-1</sup> )	[mg·(1 cultivo) <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> ]
0,02	95	3,8	3,0 x 10 <sup>7</sup>
0,04	148	5,9	3,0 x 10 <sup>7</sup>
0,06	180	7,2	2,5 x 10 <sup>7</sup>
0,09	141	5,6	2,0 x 10 <sup>7</sup>
0,12	144	5,7	1,3 x 10 <sup>7</sup>

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Tabla XI. La irradiancia media del periodo considerado fue de alrededor de 1200  $\mu\text{mol-fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.



**Tabla XIV.** EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LUTEÍNA Y LA DENSIDAD CELULAR EN LOS MESES DE OCTUBRE Y NOVIEMBRE

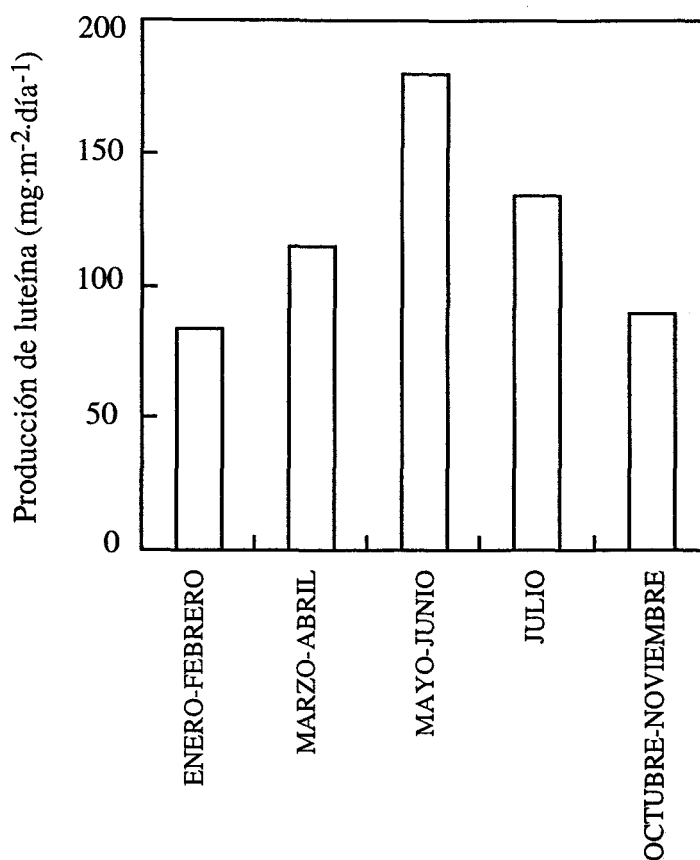
TASA DE DILUCIÓN	PRODUCTIVIDAD DE LUTEÍNA		DENSIDAD CELULAR MEDIA
	(h <sup>-1</sup> )	(mg·m <sup>-2</sup> ·día <sup>-1</sup> )	[mg·(l cultivo) <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> ]
0,04	75	3,0	3,1 × 10 <sup>7</sup>
0,06	78	3,1	2,5 × 10 <sup>7</sup>
0,09	90	3,6	1,9 × 10 <sup>7</sup>

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la Tabla XI. La irradiancia media del periodo considerado fue de alrededor de 650 µmol-fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

Como muestran los resultados obtenidos, los valores más altos de productividad de luteína se obtienen en la época de mayor radiación solar, donde también se registra un periodo de luz más largo. Dentro de esta época del año, el máximo de productividad se ha obtenido cuando se utilizó una velocidad de dilución intermedia (0,06 h<sup>-1</sup>).

A modo de conclusión, la figura 25 muestra la productividad más alta de luteína obtenida para cada época estudiada. Durante el mes de Julio, solamente pudieron obtenerse datos para una tasa de dilución, debido a que las altas temperaturas ambientales (superiores a 40°C), influyeron negativamente sobre la tasa de crecimiento de cultivo, conduciendo a una dilución del mismo.

De cualquier forma, los datos presentados indican la viabilidad de operación a lo largo del ciclo anual de un sistema de producción de luteína basado en el cultivo de *Muriellopsis* sp. a la intemperie, empleando un fotobiorreactor tubular cerrado, con tasas de producción no inferiores a 80-90 mg m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> y que pueden alcanzar valores de 170-180 mg m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> en las épocas más favorables.



**Fig. 25.** Máximas productividades de luteína en cultivo continuo de *Muriellopsis* sp. en diferentes periodos del año. La tasa de dilución a la que se registró la máxima productividad en cada periodo, fue: Enero-Febrero, 0,06 h<sup>-1</sup>; Marzo-Abril, 0,04 h<sup>-1</sup>; Mayo-Junio, 0,06 h<sup>-1</sup>; Julio 0,04 h<sup>-1</sup>; Octubre-Noviembre, 0,09 h<sup>-1</sup>. Las células de *Muriellopsis* sp. se cultivaron en cultivo continuo en un fotobiorreactor tubular con sistema de agitación por "air-lift", a 28°C, pH 7, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, burbujeados con aire a un caudal de 500 l·min<sup>-1</sup>, que proporcionaba una velocidad de circulación de la suspensión de 0,38 m·s<sup>-1</sup>. El pH se mantenía con pulsos de CO<sub>2</sub>. Los datos mostrados son los valores medios de 4 determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

### III.3. *Haematococcus pluvialis*

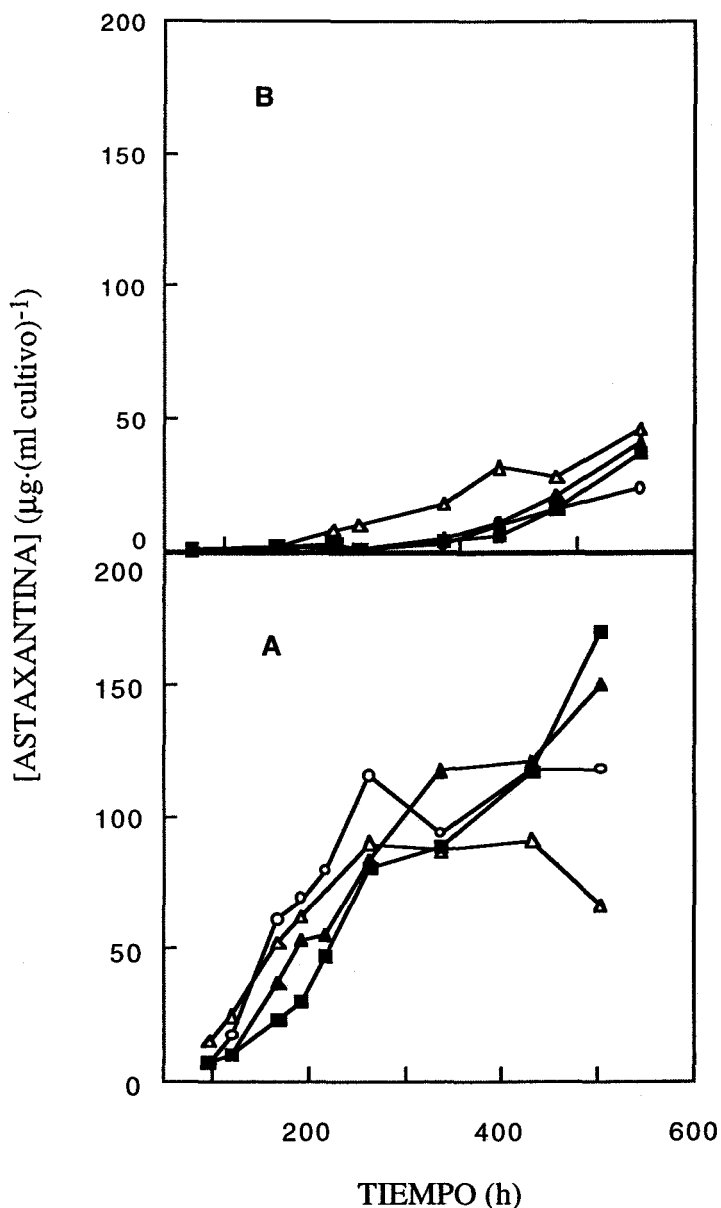
Junto a *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* es sin duda la estirpe que mayor atención ha recibido desde el punto de vista de la producción de carotenoides con interés comercial, ya que constituye una fuente idónea de astaxantina.

#### III.3.1 Efecto de la disponibilidad de nitrógeno combinado sobre la acumulación de astaxantina

A pesar de la abundante bibliografía disponible sobre acumulación de astaxantina en células de *Haematococcus*, aún existe cierta controversia y resultados contradictorios en lo referente al efecto de algunos factores ambientales y nutricionales sobre la acumulación de astaxantina en esta microalga. En esta memoria se recogen los resultados obtenidos acerca de la influencia sobre la carotenogénesis tanto del nitrógeno (básicamente su disponibilidad en el medio de cultivo), así como de la privación de fosfato. A tal fin, en primer lugar, se han realizado una serie de experiencias en las que se han ensayado el efecto de la concentración de nitrógeno combinado ( $\text{NaNO}_3$ ) en el medio de cultivo, en dos condiciones de iluminación: alta ( $520 \mu\text{mol-fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y baja ( $115 \mu\text{mol-fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) irradiancia. Los resultados se representan en la figura 26.

Como se observa en dicha figura, la mayor cantidad de pigmento (astaxantina) se ha obtenido en condiciones de alta irradiancia. Respecto al efecto de la concentración de nitrato sobre la tasa de acumulación de astaxantina en este microorganismo, cabe destacar que el nivel celular de astaxantina es mayor en el medio que contiene 10 mM de  $\text{NaNO}_3$  (alta irradiancia), aunque es el cultivo con 20 mM el que presenta un mayor contenido de astaxantina. La tasa de crecimiento a alta irradiancia fue muy similar en todos los casos, aunque aquellos

con mayor concentración de nitrato presentaron densidades celulares mayores.



**Fig. 26.** Astaxantina en cultivos de *Haematococcus pluvialis* a lo largo del tiempo. Las células se cultivaron a 20°C, en las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos, a alta (A: 520 µmol-fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) y baja irradiancia (B: 115 µmol-fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), con las concentraciones de NaNO<sub>3</sub> en el medio de cultivo que se especifican: Δ, 5 mM; ○, 10 mM; ▲, 15 mM; y ■, 20 mM.

El contenido de astaxantina por célula fue más elevado en los cultivos que contenían menor cantidad de nitrógeno combinado en el medio, tanto a baja como a alta intensidad de luz. A alta intensidad, el valor máximo de contenido de astaxantina registrado en el cultivo con 5 mM de nitrato sódico fue de 55 pg·célula<sup>-1</sup>. En el cultivo con 20 mM de nitrato dicho valor fue de 39 pg·célula<sup>-1</sup>.

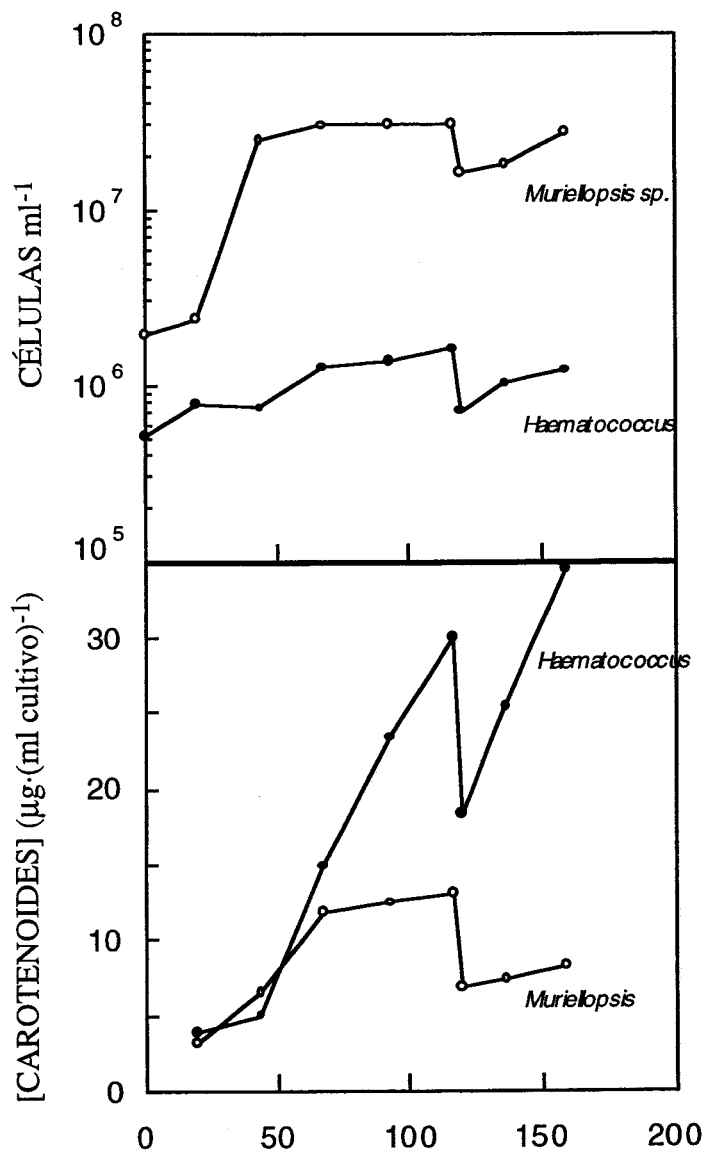
### III.3.2 Efecto de la privación de fosfato sobre la carotenogénesis en *Haematococcus pluvialis* y *Muriellopsis* sp.

A continuación, se estudió el efecto de la ausencia de fosfato sobre el crecimiento y contenido en carotenoides en *H. pluvialis* y *Muriellopsis* sp. Para ello, se recogieron las células de ambos cultivos de cuatro días de duración, se lavaron con medio fresco sin fosfato añadido y se resuspendieron en medio fresco libre de fosfato. Se analizó el crecimiento y contenido en carotenoides en ambas estirpes. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27. Como se observa en la figura, las respuestas respecto a los contenidos de astaxantina en cultivos de *H. pluvialis* y de luteína en los de *Muriellopsis* sp. frente a la privación de fosfato son diferentes. Así, mientras que en *H. pluvialis* se registra un incremento en el contenido de astaxantina en cultivos y células, en *Muriellopsis* sp. no se observa variación significativa en el contenido de luteína.

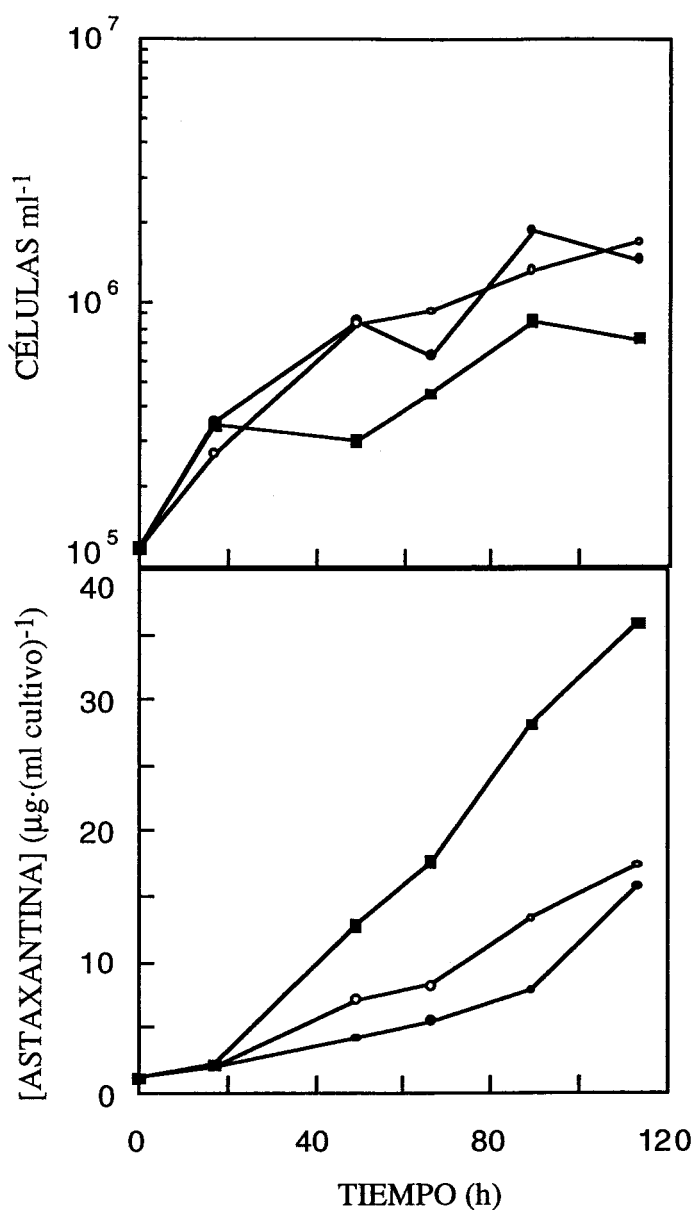
### III.3.3 Efecto de un inhibidor de la glutamina sintetasa sobre la carotenogénesis en *H. pluvialis* y *Muriellopsis* sp.

Se llevó a cabo un estudio, empleando estas dos estirpes, en el que se analizó el efecto de un inhibidor de la glutamina sintetasa (glufosinato amónico) sobre el crecimiento y contenido de pigmento en ambas estirpes. Los resultados obtenidos, recogidos en las figuras 28 y 29, muestran que, si bien no hay diferencias significativas en cuanto al efecto del inhibidor sobre el crecimiento, para ambas estirpes, sí lo hay

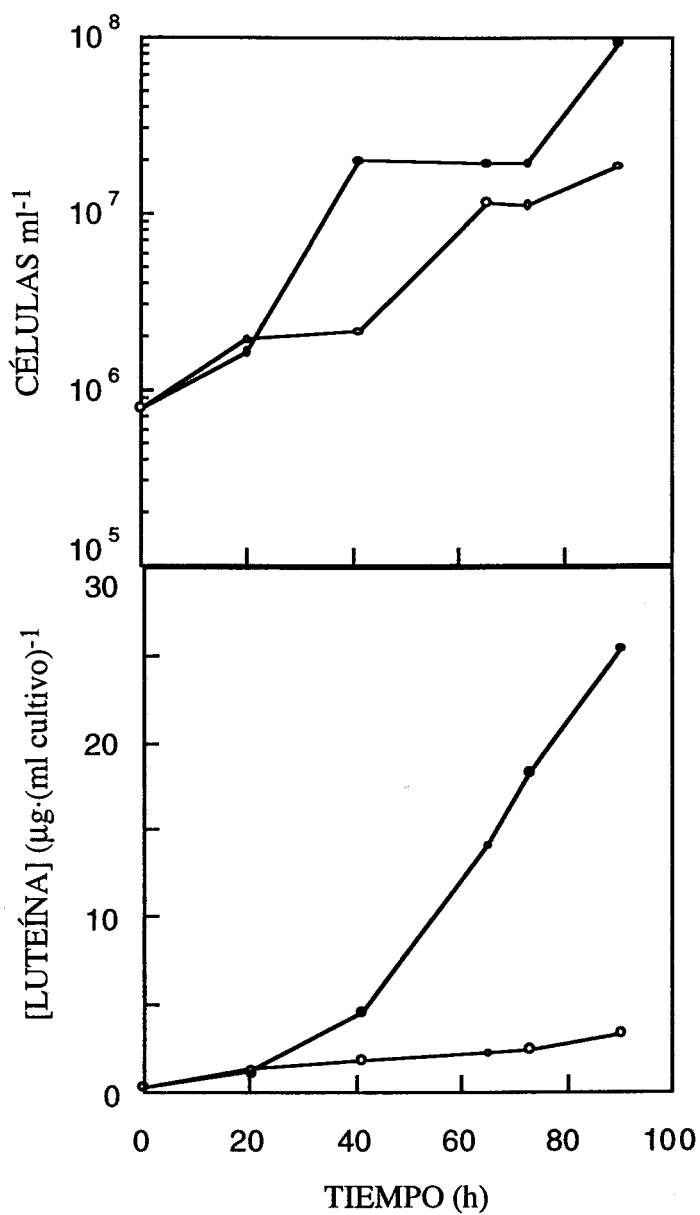
sobre el contenido de pigmento. En *Haematococcus*, el glufosinato provoca un efecto positivo sobre la síntesis de astaxantina, mientras que en *Muriellopsis* sp., por el contrario, el inhibidor reprime la acumulación de luteína.



**Fig. 27.** Evolución de la densidad celular y el contenido en astaxantina o luteína de cultivos de *H. pluvialis* o *Muriellopsis* sp., respectivamente, sometidos a privación de fosfato. Células cultivadas en las condiciones standard, descritas en Materiales y Métodos se recogieron por centrifugación y, después de ser lavadas en medio de cultivo sin fosfato, se resuspendieron en medio de cultivo sin fosfato añadido.



**Fig. 28.** Efecto de distintas concentraciones de glufosinato sobre el crecimiento y contenido de astaxantina en cultivos de *Haematococcus pluvialis*. Las células se cultivaron en las condiciones standard, descritas en Materiales y Métodos. La adición del inhibidor se realizó al tercer día de cultivo. Símbolos: ●, control; ○, 0,2 mg ml<sup>-1</sup> glufosinato; ■, 0,5 mg ml<sup>-1</sup> glufosinato.



**Fig. 29.** Efecto del glufosinato sobre el crecimiento y contenido de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales que las indicadas en la figura 28. Símbolos: ●, control; ○, 0,5 mg ml<sup>-1</sup> glufosinato.

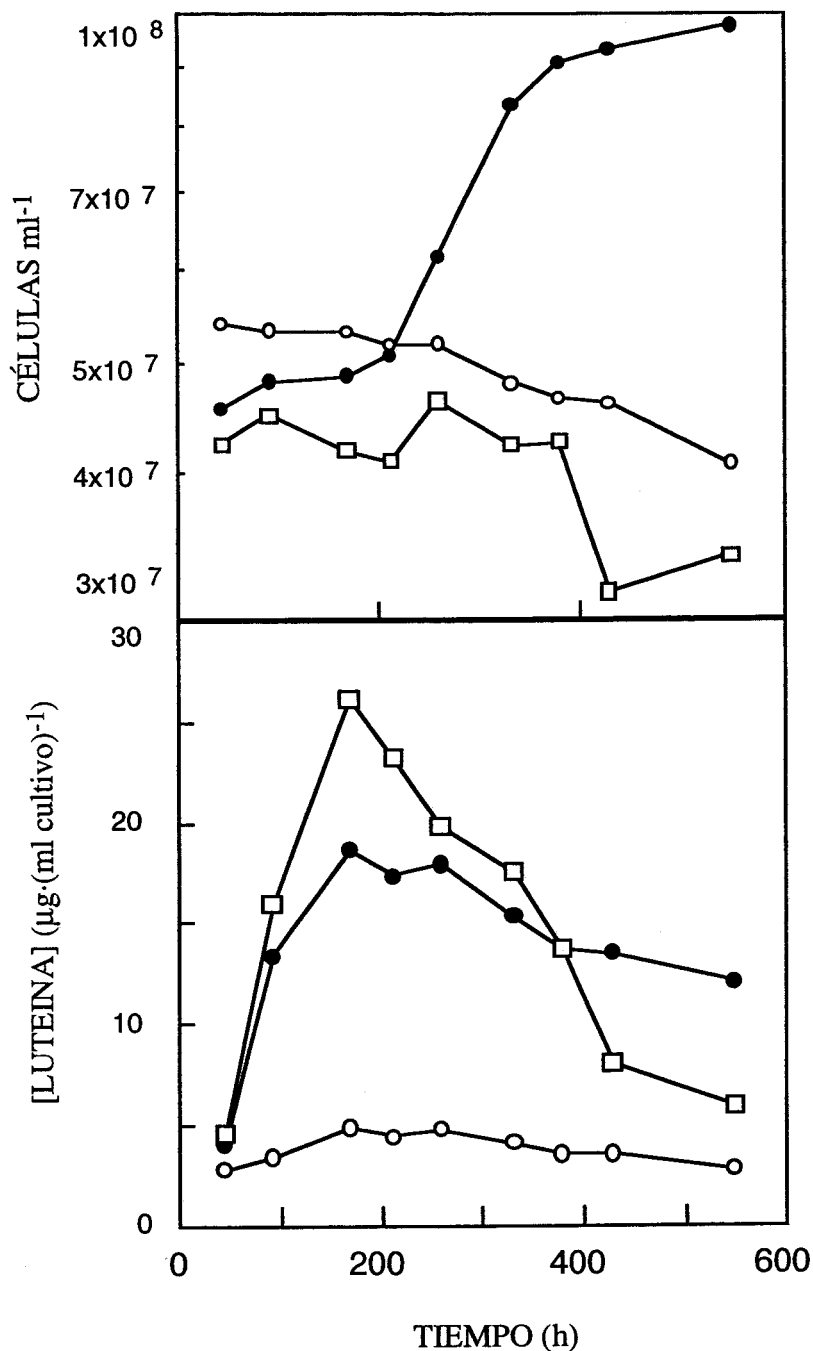


### III.4. *Chlorella fusca*

En el rastreo de estirpes desarrollado (ver apartado III.1), *Chlorella fusca* Göttingen 211-8b destacó por su elevado contenido en luteína. Por este motivo, se desarrollaron experiencias a fin de determinar los efectos de factores previamente analizados en relación a crecimiento y producción de luteína en *Muriellopsis* sp.

#### III.4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO COMBINADO SOBRE EL CONTENIDO EN LUTEÍNA DE *Chlorella fusca*

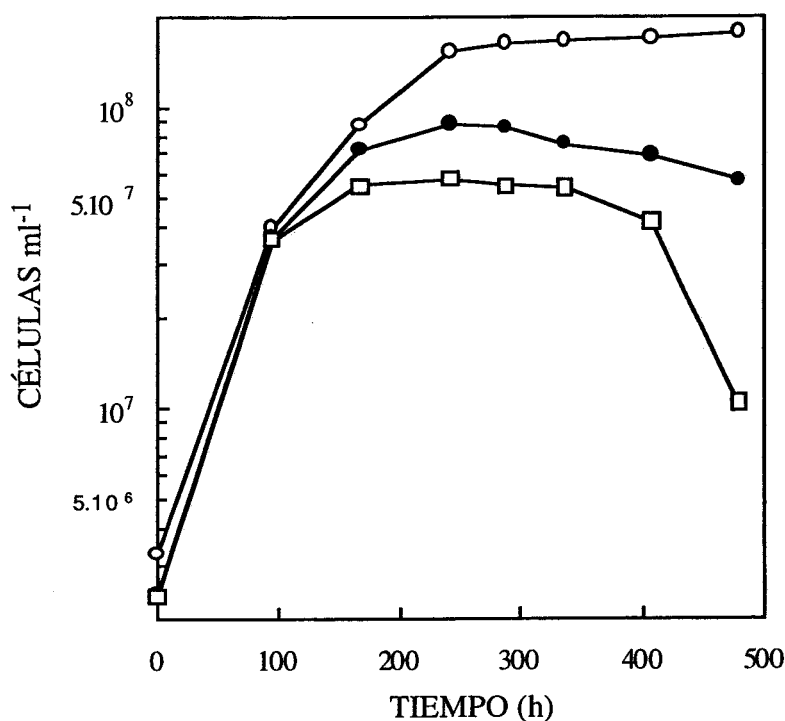
Se analizó el efecto de la concentración de nitrato sódico sobre el crecimiento y composición de pigmentos. Los cultivos de *Chlorella fusca* se desarrollaron en las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 30. En ésta se observa claramente que el cultivo con 20 mM de nitrato presentó un mejor crecimiento, alcanzando una elevada densidad celular ( $\sim 10^8$  células ml<sup>-1</sup>). La variación de la concentración de luteína en los cultivos se representa en la misma figura. Como se observa, el contenido de luteína del cultivo es máximo en la fase exponencial temprana, al contrario que en el caso de *Muriellopsis* sp. Además, se observa que el cultivo realizado con 30 mM NaNO<sub>3</sub>, en el que no se registró crecimiento, presentó una concentración de luteína superior al realizado en condiciones más favorables para el crecimiento.



**Fig. 30.** Crecimiento de *Chlorella fusca* y contenido en luteína en los cultivos para las distintas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ , empleadas: (-O-) 5 mM; (-●-) 20 mM; (-□-) 30 mM. Los cultivos se iluminaron con una intensidad de  $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$  y se burbujearon con una mezcla aire- $\text{CO}_2$  al 1% a un flujo de  $100 \text{ l (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

III. 4.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO SÓDICO SOBRE EL CONTENIDO EN LUTEÍNA DE *Chlorella fusca*

En cultivos de *Muriellopsis* sp. se había observado que ligeros incrementos de la concentración de NaCl en el medio provocaban un aumento en la concentración de luteína. Para analizar este efecto en *Chlorella fusca* se desarrollaron cultivos estancos en las condiciones empleadas habitualmente, pero con distintas adiciones de NaCl sobre la concentración convencional, 2 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 31 y en la Tabla XV. Como se observa en la Fig. 31, la adición de NaCl al medio de cultivo, a las concentraciones utilizadas, afecta negativamente al crecimiento de esta estirpe, puesto que, aunque la fase exponencial no se afecta significativamente por la concentración de NaCl, el cultivo control fue el que alcanzó la mayor densidad celular en fase estacionaria.



**Fig. 31.** Crecimiento de *C. fusca* a distintas concentraciones de NaCl en el medio: (-○-) NaCl 2 mM; (-●-) 35 mM; (-□-) 70 mM. La fuente de nitrógeno fue NaNO<sub>3</sub> 20 mM. El resto de las condiciones fueron las mismas que las de la figura 30.

Los valores máximos de concentración de luteína, expresados en ( $\text{mg l cultivo}^{-1}$ ), se presentan en la Tabla XV. Como se observa, la adición de NaCl al medio de cultivo afecta negativamente al contenido en luteína del cultivo, al contrario de lo que ocurría en *Muriellopsis* sp.

**TABLA XV.** EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl SOBRE EL CONTENIDO DE LUTEÍNA EN CULTIVOS DE *Chlorella fusca*.

<b>[NaCl]</b>	<b>[Luteína]</b>
(mM)	( $\text{mg l cultivo}^{-1}$ )
2	27,5
35	19,9
70	18,0

Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la figura 31.

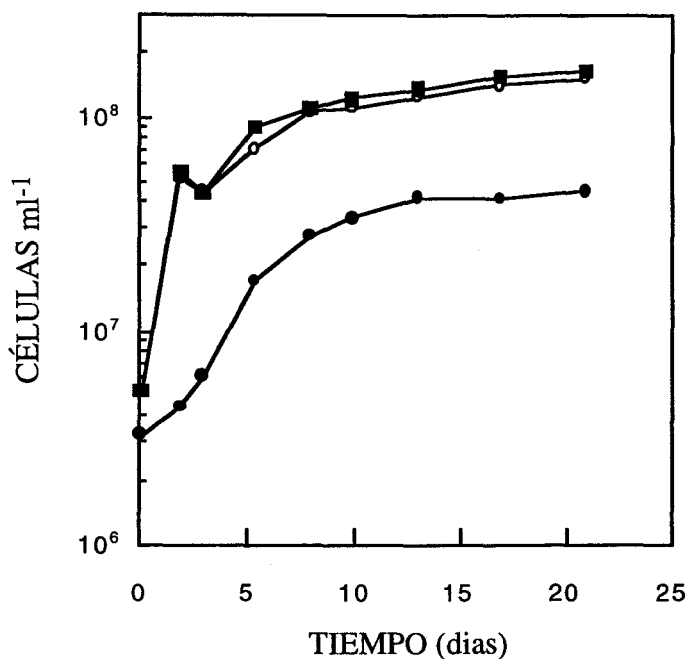
### III.5. EL CASO DE *Chlorella zofingiensis*

Esta estirpe de microalga (*Chlorella zofingiensis*, CCAP 211/14), posee también potencial interés biotecnológico, dada su composición de pigmentos que incluye astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina y luteína (Tabla II). Se han desarrollado un conjunto de experiencias a fin de determinar las condiciones óptimas para su crecimiento y producción de pigmentos.

En primer término, se ensayó el efecto de la intensidad de luz (irradiancia) sobre el crecimiento y contenido en carotenoides de esta microalga. La caracterización de estos parámetros continuó con los ensayos del efecto de la concentración de nitrógeno (en forma de nitrato sódico) en el medio de cultivo. Este nutriente es de esencial importancia, ya que su disponibilidad determina, tanto la cantidad como el perfil de carotenoides. Posteriormente se analizaron los efectos de la concentración de cloruro sódico en el medio de cultivo (estrés salino) y de la temperatura.

#### III.5.1 EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ

Se ensayó el efecto de la irradiancia sobre el crecimiento y el contenido en carotenoides de *Chlorella zofingiensis*, exponiendo los cultivos a tres intensidades: 90, 460 y 920  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los resultados se muestran en la Fig. 32 y tabla XVI. Se observa que el cultivo expuesto a 90  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fue el que presentó una menor tasa de crecimiento, alcanzando también la densidad celular más baja. Las curvas de crecimiento de los otros dos cultivos fueron muy similares.



**Figura 32.** Efecto de la irradiancia sobre el crecimiento de *C. zofingiensis*. (-●-) 90; (-○-) 460; (-■-) 920  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las células se cultivaron a 28°C, a las irradiancias indicadas, con 20 mM de  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno. Los cultivos se burbujearon con una mezcla de aire- $\text{CO}_2$  al 1% a un flujo de 100 l (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$ .

**Tabla XVI.** EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ SOBRE EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES DE *Chlorella zofingiensis*.

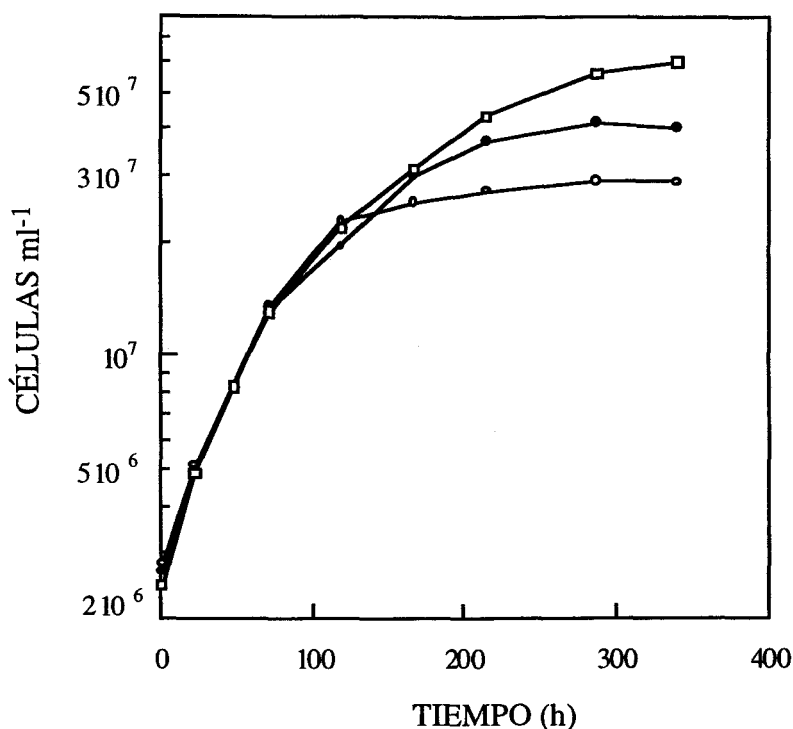
Intensidad de luz ( $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Luteína		Astaxantina		Carotenoides totales	
	mg (l cultivo) $^{-1}$	pg (célula) $^{-1}$	mg (l cultivo) $^{-1}$	pg (célula) $^{-1}$	mg (l cultivo) $^{-1}$	pg (célula) $^{-1}$
90	18,8	0,46	3,8	0,08	26,7	0,67
460	23,2	0,33	14,3	0,2	43,4	0,6
920	24,7	0,32	19,2	0,12	51,4	0,55

Las células se cultivaron en las mismas condiciones que en la figura anterior.

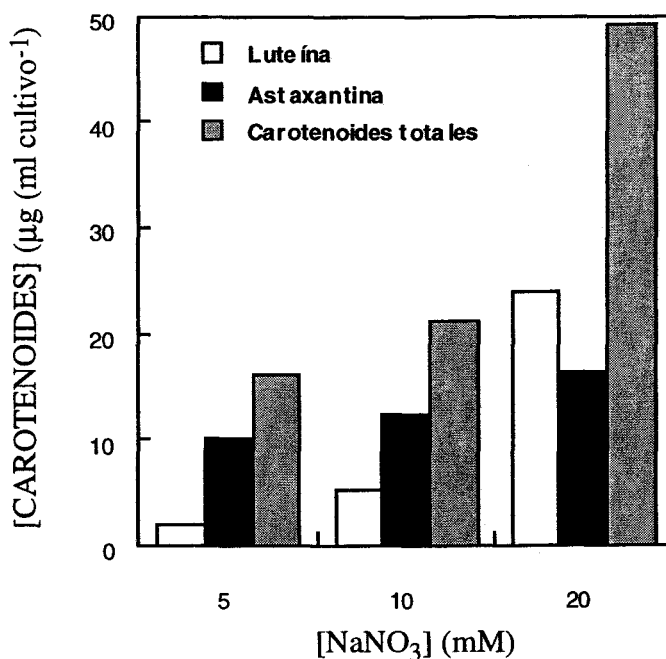
La tabla XVI refleja en papel crucial que desempeña la luz en la acumulación de carotenoides en *C. zofingiensis*. El cultivo expuesto a la irradiancia más alta ensayada (920  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fue el que registró los valores de concentración de carotenoides, tanto individuales como totales, más elevados.

### III.5.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO EN EL MEDIO

Para el estudio del efecto de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo sobre crecimiento y contenido de pigmentos carotenoides en *Chlorella zofingiensis*, se cultivó esta estirpe en las condiciones experimentales descritas para *Muriellopsis* sp. en Materiales y Métodos, excepto que el medio de cultivo se suplementó con diversas concentraciones de nitrato sódico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figs. 33 y 34. Como se observa en la Fig. 33, la concentración de  $\text{NaNO}_3$  prácticamente no afecta al crecimiento de *Chlorella zofingiensis* en las fases tempranas, pero presenta un efecto positivo sobre la densidad celular en la fase estacionaria. Respecto a los contenidos de los carotenoides mayoritarios en los cultivos, la Fig. 34 muestra los valores máximos de éstos. Como se aprecia, el aumento en la concentración de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo se traduce en una elevación de la concentración de astaxantina y luteína, siendo ésta última la más afectada.



**Fig. 33.** Curvas de crecimiento de *Chlorella zofingiensis* para las distintas concentraciones de NaNO<sub>3</sub> empleadas: (-○-) 5 mM; (-●-) 10 mM; (-□-) 20 mM. Otras condiciones de cultivo fueron las mismas que las indicadas en la figura 31.



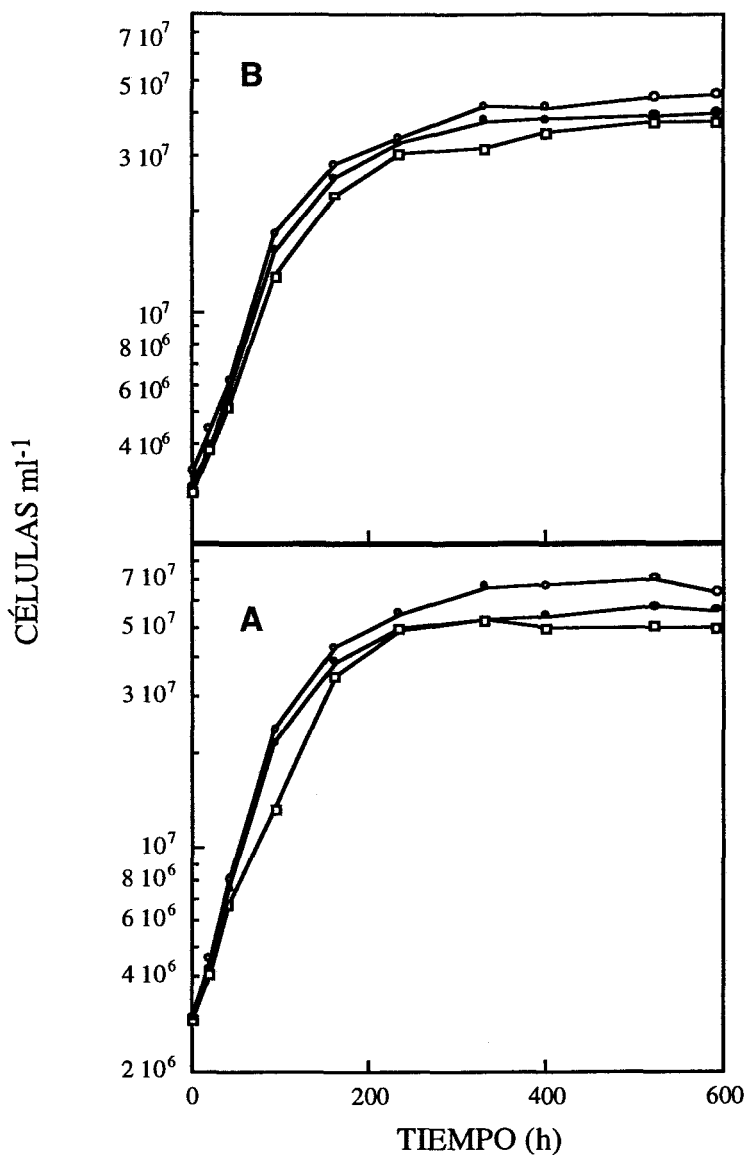
**Fig. 34.** Contenido de carotenoides en cultivos de *C. zofingiensis* para las distintas concentraciones de NaNO<sub>3</sub> empleadas. Los cultivos se iluminaron con una intensidad de 460 µmol-fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a una temperatura de 28°C y se burbujearon con una mezcla aire-CO<sub>2</sub> al 1% a un flujo de 100 l (l cultivo)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



### III.5.3 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO EN CAROTENOIDES DE *C. zofingiensis*

Para ensayar el efecto del estrés salino sobre *Chlorella zofingiensis*, se llevaron a cabo cultivos estancos de esta estirpe en las mismas condiciones empleadas habitualmente, pero con diferentes concentraciones de NaCl, adiciones sobre la concentración de NaCl del medio (2 mM), a baja irradiancia ( $90 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a alta irradiancia ( $460 \mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 35 y en la Tabla XVII. Como se observa en la Fig. 34, la adición de NaCl al medio de cultivo, a las concentraciones utilizadas, no afecta de forma significativa al crecimiento de *Chlorella zofingiensis*, ni a baja ni a alta irradiancia.

Los valores de concentración máxima de los carotenoides mayoritarios de *Chlorella zofingiensis* se muestran en la Tabla XVII. Las concentraciones de astaxantina y cantaxantina son superiores en los cultivos realizados a alta irradiancia. Además, la adición de NaCl al medio de cultivo, a las concentraciones empleadas, no afectó de forma significativa los contenidos de dichos carotenoides en los cultivos realizados a baja irradiancia. Sin embargo, la adición de NaCl al medio de cultivo parece incrementar ligeramente la concentración tanto de astaxantina como del total de carotenoides en los cultivos realizados a alta irradiancia.



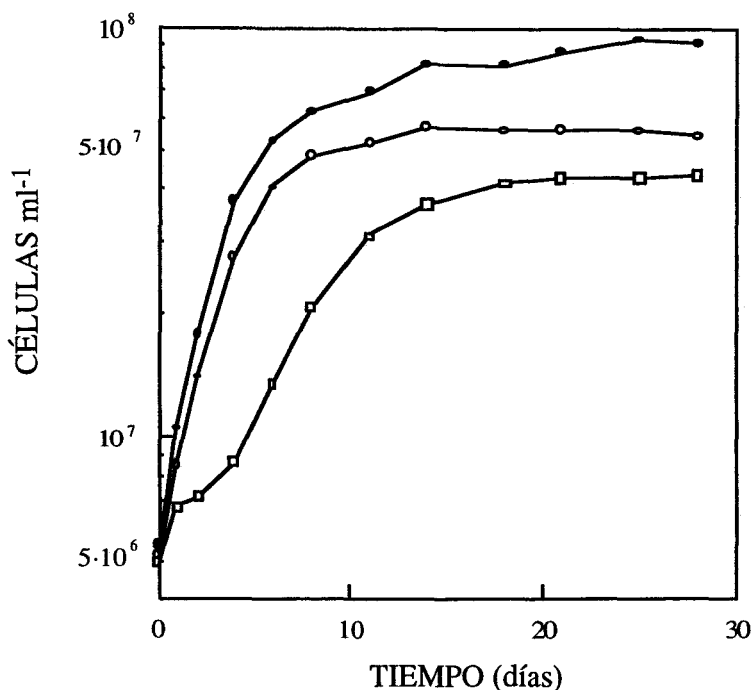
**Fig. 35.** Crecimiento de *Chlorella zofingiensis* a distintas concentraciones de NaCl. Las células se cultivaron a 28°C, en las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos, a baja (B: 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y alta irradiación (A: 460  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) con las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo que se especifican: (-○-) 2 mM; (-●-) 50 mM; (-□-) 100 mM.

**TABLA XVII.** CONTENIDOS MÁXIMOS DE LOS CAROTENOIDES MAYORITARIOS EN CULTIVOS DE *Chlorella zofingiensis* CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NaCl.

[NaCl] (mM)	Astaxantina	Cantaxantina (mg (l cultivo) <sup>-1</sup> )	Luteína
<b>BAJA IRRADIANCIA</b> (90 $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )			
2	3,8	0,9	18,8
50	4,3	0,9	20,4
100	3,9	1,0	20,0
<b>ALTA IRRADIANCIA</b> (460 $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )			
2	14,4	2,3	19,6
50	14,3	2,2	19,5
100	17,2	3,3	18,8

El medio de cultivo empleado es el descrito en Materiales y Métodos, enriquecido con  $\text{NaNO}_3$  20 mM. Otras condiciones experimentales fueron iguales a las indicadas en la Fig. 35.

De los resultados anteriores se deduce que la irradiancia juega un papel determinante en la determinación de la concentración de carotenoides en el cultivo, así como que el estrés salino puede también incrementar dicho nivel. Para contrastar esta hipótesis se realizó otro experimento, a alta intensidad de luz, incrementando aún más la concentración de NaCl en los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 36, 37 y 38. Las curvas de crecimiento de *Chlorella zofingiensis* para las distintas concentraciones de NaCl empleadas se representan en la figura 36. Como se observa, la adición de NaCl al medio de cultivo, a las concentraciones indicadas, afecta negativamente al crecimiento de esta estirpe, puesto que tanto la velocidad de crecimiento como la densidad celular alcanzada en la fase estacionaria por el cultivo control, fueron superiores a las alcanzadas por los otros cultivos, suplementados con NaCl.

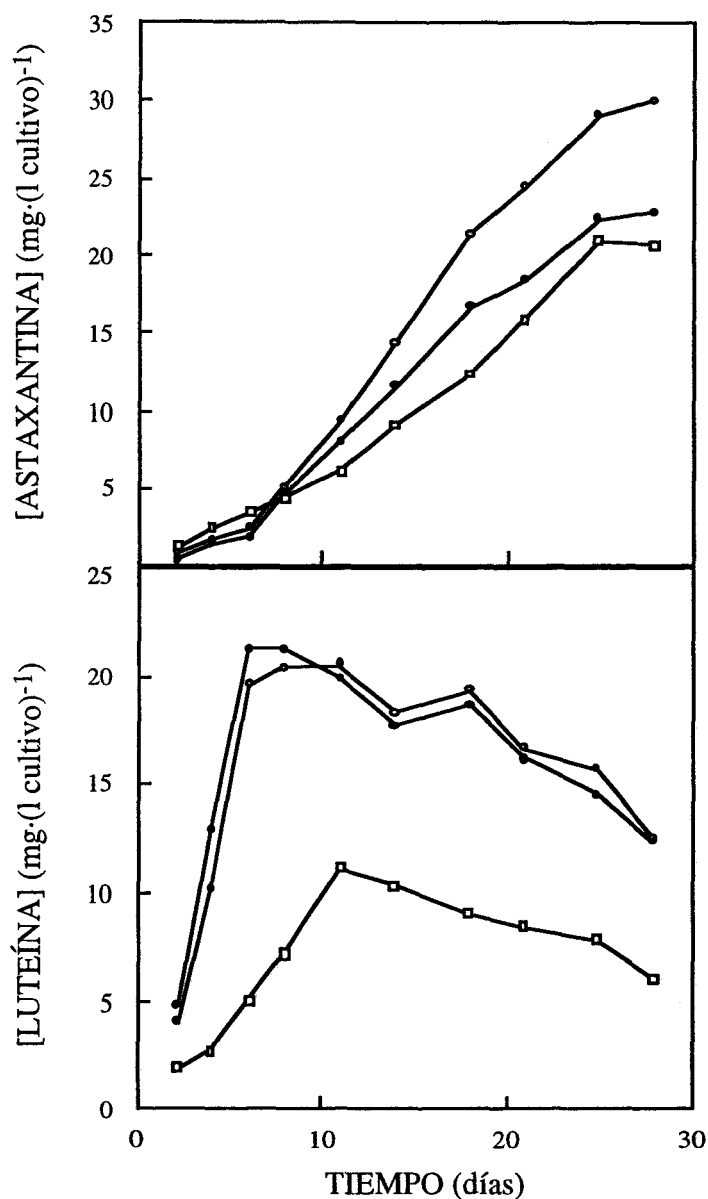


**Fig. 36.** Curvas de crecimiento de *Chlorella zofingiensis* para las distintas concentraciones de NaCl: (-●-) Sin adición; (-○-) 0,2 M; (-□-) 0,4 M. Los cultivos se mantuvieron a 28°C, iluminados con una intensidad de 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y se burbujearon con aire enriquecido con  $\text{CO}_2$  al 1% a un flujo de 100 l (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$

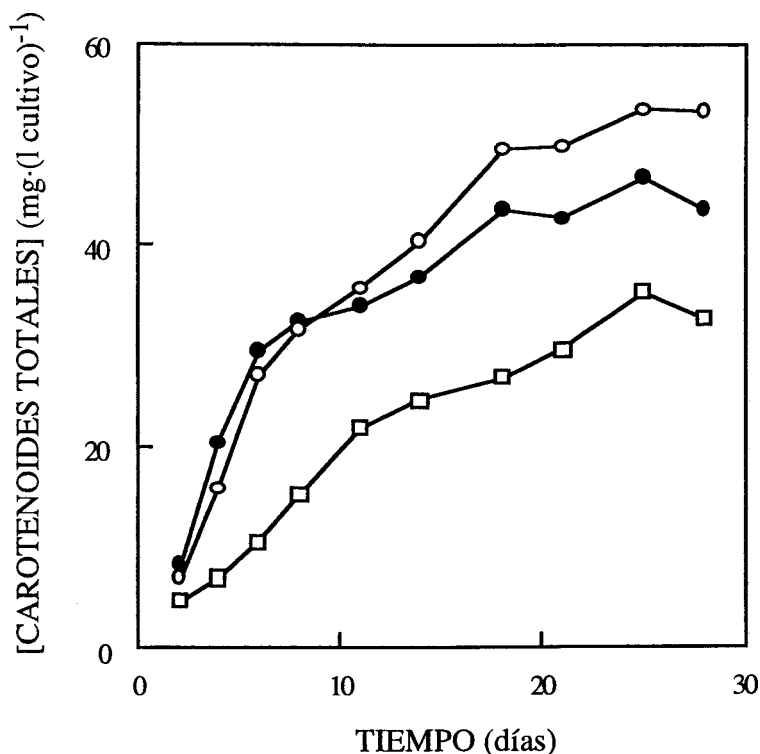
En relación a los carotenoides, los más importantes desde el punto de vista cuantitativo fueron la astaxantina y la luteína. En las figuras 37 y 38 se representan la variación de la concentración de estos dos pigmentos a lo largo del crecimiento con diversas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo, así como la variación del total de carotenoides, incluidos los minoritarios. Como se observa en la Fig. 37, la adición de NaCl al medio de cultivo, a las concentraciones que se indican afecta en forma diferente a los contenidos volumétricos de astaxantina y de luteína. Así, mientras que la adición de 0,2 M de NaCl al medio de cultivo produce un incremento de la concentración de astaxantina, dicha adición prácticamente no afecta a la concentración de luteína. La adición de 0,4 M de NaCl tiene efecto negativo sobre los niveles de astaxantina y luteína en los cultivos, si bien el efecto sobre el contenido de luteína es más acusado. En cuanto al contenido celular de estos pigmentos, se observa un incremento de más de dos veces en

astaxantina en los cultivos sometidos a estrés salino ( $0,5 \text{ pg}\cdot\text{célula}^{-1}$ ) respecto del control ( $0,2 \text{ pg}\cdot\text{célula}^{-1}$ ). Respecto al contenido de luteína por célula, las diferencias no son significativas respecto del control.

La Fig. 38 muestra la variación, con el tiempo de cultivo, de los carotenoides totales de *Chlorella zofingiensis*, incluidos los minoritarios, para diversas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Como se observa, la adición de 0,2 M de NaCl produce un ligero incremento en el contenido de carotenoides totales en cultivos en fase estacionaria, mientras que la adición de 0,4 M NaCl produce una disminución del contenido de los carotenoides totales en todas las fases del crecimiento.



**Fig. 37.** Concentración de astaxantina y luteína en cultivos de *Chlorella zoofingiensis* para las concentraciones de NaCl indicadas. (●) Sin adición; (○) 0,2 M; (□) 0,4 M. El resto de las condiciones fueron las mismas que en la figura 36.

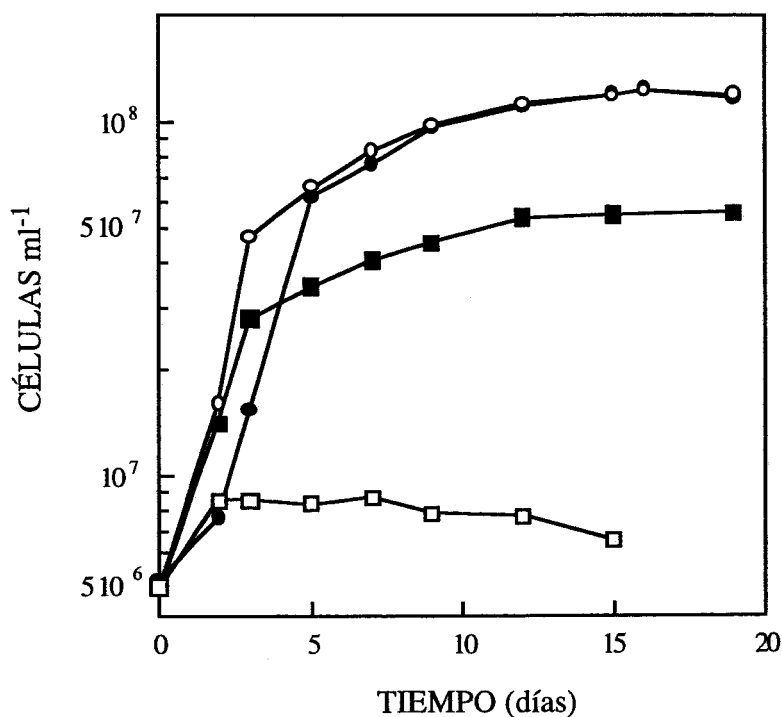


**Fig.38.** Carotenoides totales en cultivos de *C. zofingiensis*. (●) Sin adición de NaCl; (○) 0,2 M; (□) 0,4 M. El resto de las condiciones experimentales fueron las mismas que en la figura 36.

#### III.5.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO EN CAROTENOIDES DE *Chlorella zofingiensis*

Con objeto de ensayar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y concentración de carotenoides en cultivos de *Chlorella zofingiensis*, se llevaron a cabo cultivos estancos de esta estirpe en las mismas condiciones empleadas habitualmente, pero a diversas temperaturas, entre 20 y 32°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 39 y en la Tabla XVIII. Las curvas de crecimiento se representan en la figura 39. Como se observa, el crecimiento de esta estirpe es prácticamente igual a 20 y 24°C, si bien, el cultivo desarrollado a 20°C presentó una ligera fase de latencia que no se observó en el de 24°C. El crecimiento de los cultivos a 28°C y 32°C fue claramente inferior que en los realizados a 20 y 24°C. Respecto al

contenido en carotenoides, la Tabla XVIII recoge las concentraciones máximas de los carotenoides mayoritarios de *Chlorella zofingiensis*. Como se observa, astaxantina y luteína presentan valores máximos en cultivos a 28 y 24°C, respectivamente. Sin embargo, el contenido celular de astaxantina y luteína es mayor a 32°C, la temperatura más alta ensayada .



**Fig. 39.** Crecimiento de *Chlorella zofingiensis* a distinta temperatura: (●) 20°C; (○) 24°C; (■) 28°C; (□) 32°C. El resto de las condiciones fueron las mismas que las de la figura 36.

**Tabla XVIII.** CONTENIDOS MÁXIMOS DE LOS CAROTENOIDES MAYORITARIOS EN CULTIVOS DE *Chlorella zofingiensis* A DIVERSAS TEMPERATURAS

Temperatura (°C)	Luteína		Astaxantina		Carotenoides totales	
	mg (l cultivo) <sup>-1</sup>	pg (célula) <sup>-1</sup>	mg (l cultivo) <sup>-1</sup>	pg (célula) <sup>-1</sup>	mg (l cultivo) <sup>-1</sup>	pg (célula) <sup>-1</sup>
20	16,0	0,19	13,3	0,1	37,1	0,35
24	<b>18,0</b>	0,2	15,9	0,13	41,1	0,4
28	14,0	0,37	<b>20,0</b>	0,36	<b>41,4</b>	0,75
32	5,6	0,67	3,9	0,47	12,6	1,5

Las células se cultivaron como se indica en Materiales y Métodos a una irradiancia de 460  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



### III.5.5 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES DE *Chlorella zofingiensis*

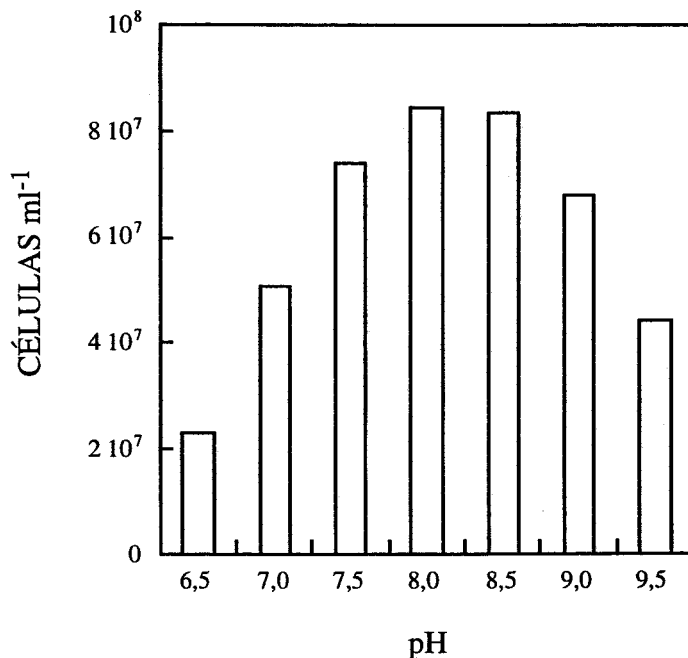
A fin de ensayar el efecto del pH sobre el crecimiento y acumulación de carotenoides en *C. zofingiensis*, se desarrollaron una serie de cultivos en régimen continuo, en un fotoquimiostato. Los distintos valores de pH ensayados, entre 6,5 y 9, se mantenían mediante un sistema de pHstato.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 40 y 41. En la Fig. 40 se representan los valores medios de las densidades celulares máximas alcanzadas para cada valor de pH ensayado. Como se puede observar, los valores más altos se obtuvieron a pH 8-8,5. Por encima y por debajo de estos valores, las densidades celulares alcanzadas eran inferiores, resultando así óptimo para el crecimiento el intervalo de pH antes señalado.

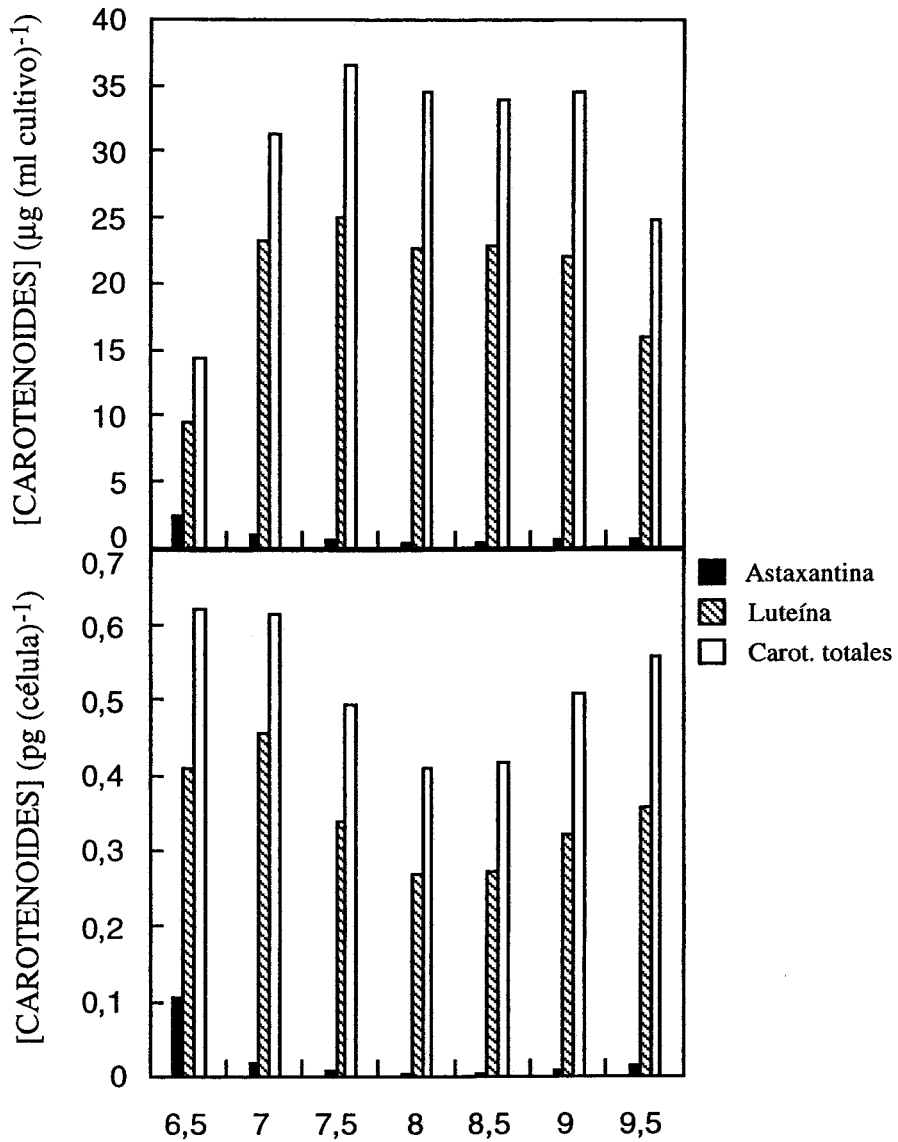
En cuanto al contenido en carotenoides de los cultivos, de los datos de la Fig. 41 se puede apreciar que los valores más altos de carotenoides totales se registraron en el intervalo de pH comprendido entre 7,5 y 9. El valor máximo de contenido en luteína se obtuvo a pH 7,5. Por el contrario, el contenido más elevado en astaxantina se registró a pH 6,5. La respuesta al pH del contenido celular en carotenoides sigue un patrón diferente al del contenido de los cultivos (Fig. 41). Los contenidos celulares más altos se registraron a valores de pH extremos.

Se han calculado los valores de producción de biomasa y carotenoides totales en cultivo continuo, para los distintos valores de pH ensayados. Los resultados se muestran en la tabla XIX. Como se puede observar, la producción de biomasa más alta se obtiene a pH 8,5, confirmándose así este valor como el óptimo para el crecimiento de *C.*

*zofingiensis*. Por el contrario, los valores de producción de carotenoides no presentan un máximo claro, localizándose en un amplio intervalo de valores de pH, entre 7 y 9.



**Fig. 40.** Densidades celulares máximas alcanzadas a distintos valores de pH en cultivos continuos de *C. zofingiensis*. Las células se cultivaron a 28°C, y a una irradiancia de 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con  $\text{NaNO}_3$  20 mM, burbujeadado con aire a un caudal de 1,2 l  $\text{min}^{-1}$ . Los datos son los valores medios de al menos tres determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.



**Fig. 41.** Contenido en carotenoides de *C. zoofingiensis* en cultivo continuo a distintos valores pH. El resto de las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Fig. 40.

**Tabla XIX.** PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CAROTENOIDES POR *C. zofingiensis* EN CULTIVO CONTINUO A DISTINTOS VALORES DE pH

pH	Producción de biomasa (g peso seco (l día) <sup>-1</sup> )	Producción de carotenoides (mg (l día) <sup>-1</sup> )
6,5	0,35	2,03
7,0	0,70	4,46
7,5	0,82	4,87
8,0	0,86	4,32
8,5	0,93	4,56
9,0	0,82	4,43
9,5	0,74	3,09

Las células se cultivaron en las mismas condiciones a las indicadas en la Fig. 40. Los datos representados son valores medios de al menos tres determinaciones independientes, siendo la desviación standard inferior al 10%.

### III.5.6. CULTIVO EN FOTOQUIMIOSTATO DE *C. zofingiensis*. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS EN CULTIVO CONTINUO

A fin de profundizar en el estudio sobre el cultivo de *C. zofingiensis* para la producción de pigmentos con interés comercial, se realizaron una serie de experiencias para evaluar la producción de carotenoides en régimen de cultivo continuo en fotoquimiostato. A tal fin, se evaluó el efecto de distintas tasas de dilución sobre el crecimiento y la acumulación de pigmentos en este organismo. Los ensayos se llevaron a cabo a pH 8,5. Los resultados se muestran en la tabla XX.

Como se puede observar, a la tasa de dilución más baja ensayada, se obtiene la mayor producción de astaxantina. Con la luteína ocurre lo contrario, aumentando la producción de pigmento al incrementarse la tasa de dilución. Este comportamiento se relaciona con el hecho de la acumulación diferencial de uno u otro pigmento en distintas etapas del crecimiento celular. La luteína lo hace en una fase estacionaria

temprana, mientras que la astaxantina se acumula en fase estacionaria tardía.

**Tabla XX.** PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN CULTIVO CONTINUO POR *C. zofingiensis* A DISTINTAS TASAS DE DILUCIÓN

Tasa de dilución (h <sup>-1</sup> )	Producción de	
	astaxantina (mg (l día) <sup>-1</sup> )	Producción de luteína (mg (l día) <sup>-1</sup> )
0,003	0,22	1,89
0,01	0,16	5,44
0,02	-	7,01

Las células se cultivaron a 28°C, y a una irradiancia de 460 μmol-fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en el medio de cultivo descrito en Materiales y Métodos, con NaNO<sub>3</sub> 20 mM, burbujado con aire a un caudal de 1,2 l min<sup>-1</sup>, manteniéndose el pH a 8,5. Los datos mostrados son los valores medios de al menos tres determinaciones, siendo la desviación standard inferior al 10%.

# DISCUSIÓN

#### IV. DISCUSIÓN

Cuando se iniciaron los trabajos que se recogen en la presente memoria, muy pocas estirpes de microalgas eucariotas, a excepción de *Dunaliella* y *Haematococcus*, habían recibido atención desde el punto de vista biotecnológico en relación a la producción de pigmentos carotenoides con interés comercial (Arad y col., 1993; Zhang y Lee, 1997). Resultaba, pues, de gran interés desarrollar una búsqueda y selección de estirpes potencialmente interesantes para su aplicación biotecnológica en base a su composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides.

Como resultado de este rastreo, además de corroborar la presencia de altas concentraciones de astaxantina en cultivos de *Haematococcus pluvialis*, se seleccionaron cinco estirpes de interés para nuestros propósitos: *Chlorella fusca*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum citriforme*, *Muriellopsis* sp. y *Neosporangiococcum gelatinosum*. A excepción de *Chlorella zofingiensis*, el resto de estirpes destacaron por su alto contenido de luteína. *Chlorella zofingiensis* presentaba una interesante mezcla de las xantofilas astaxantina, cantaxantina y luteína, con una elevada concentración total de carotenoides.

La estirpe *Muriellopsis* sp. se mostró particularmente interesante, ya que además de su alto contenido en luteína, posee una elevada tasa de crecimiento, alcanzando densidades celulares del orden de  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Comparada con *Haematococcus*, *Muriellopsis* triplica su tasa de crecimiento, duplicando además la densidad celular máxima en los cultivos. Adicionalmente, esta estirpe presenta la particularidad de haber sido aislada de hábitats naturales y purificada en nuestro laboratorio, no procediendo de colecciones de cultivo.

La estirpe de *Chlorella fusca*, también estudiada en este trabajo, presenta asimismo un contenido elevado en luteína, si bien no alcanza

las elevadas tasas de crecimiento que presenta *Muriellopsis* sp. Este hecho es particularmente interesante desde el punto de vista de la producción de pigmento en cultivo continuo. Los organismos con mayor tasa de crecimiento permiten trabajar a tasas de dilución más elevada en cultivo continuo, lo que repercute positivamente en la productividad. Al igual que *Muriellopsis* sp., *C. zofingiensis* también alcanza elevada densidad celular en cultivo estanco. Su alto contenido en astaxantina y luteína la hacen muy interesante para la producción de estos carotenoides. Sin embargo, su tasa de crecimiento es significativamente menor que la de *Muriellopsis* sp., obteniéndose pues, una menor producción de luteína en cultivo continuo. Para la producción de astaxantina, *C. zofingiensis* habría de cultivarse en cultivo estanco, ya que como se ha comprobado en las experiencias realizadas, este pigmento se acumula en una fase estacionaria tardía. En este sentido, *C. zofingiensis* presenta un comportamiento muy similar a *Haematococcus pluvialis*. En ésta última, la acumulación de astaxantina también ocurre en fase estacionaria tardía, resultando así el cultivo estanco la mejor opción para la producción de esta xantofila. También se ha propuesto el cultivo en dos fases como la estrategia idónea de cultivo para la producción de astaxantina por *Haematococcus*.

Los diferentes ensayos realizados, encaminados a determinar las condiciones óptimas tanto para el crecimiento como para la producción de luteína en *Muriellopsis* sp., nos han llevado a concluir que, en general, existe un paralelismo entre crecimiento y producción de luteína, hecho que no ocurre en otros géneros como *Dunaliella* o *Haematococcus* (Avron y Ben-Amotz, 1992) para  $\beta$ -caroteno y astaxantina, respectivamente, en que las condiciones favorables para el crecimiento de las microalgas no coinciden con aquellas que lo son para la producción de pigmentos. En este sentido, la literatura refleja que las estrategias de producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella salina* se basan en los denominados cultivos en dos fases (Ben-Amotz, 1995), que consisten en cultivar en primer lugar las microalgas en condiciones



óptimas para su crecimiento, sometiendo posteriormente al cultivo, en una segunda fase, a condiciones que induzcan la síntesis de carotenoides, generalmente de deficiencia en algún nutriente esencial, como el nitrógeno o el fósforo (Richmond, 1986; Borowitzka, 1988; Avron y Ben-Amotz, 1992).

En el caso de *H. pluvialis* los avances han sido menores que con *Dunaliella*. Así, hasta la fecha, no se dispone de ningún sistema de comercialización a gran escala de astaxantina producida por esta microalga, aunque todo sugiere que finalmente el proceso de producción estará también basado en el cultivo de dos fases. La gran desventaja de *Haematococcus* respecto a *Dunaliella* estriba en la facilidad con la que se contaminan los cultivos en sistemas abiertos, debido a la composición del medio de cultivo, que carece de características restrictivas que impidan el crecimiento de otros microorganismos. Por esta cuestión, los trabajos que se realizan en la actualidad sobre producción de astaxantina por *Haematococcus* se centran en el empleo de biorreactores cerrados (Boussiba, 2000).

En *Muriellopsis* sp. se han establecido las siguientes condiciones como óptimas, tanto para el crecimiento como para la producción de luteína: 28°C, nitrato sódico 20 mM como fuente de nitrógeno y una intensidad de luz de 460  $\mu\text{mol-fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (100 W  $\text{m}^{-2}$ ) en condiciones de laboratorio. La concentración de NaCl en el medio puede estar comprendida entre 2 y 35 mM. Para *C. fusca* las condiciones coinciden en general con las de *Muriellopsis* sp. En el caso de *C. zoofingiensis*, se ha comprobado que la temperatura óptima para el crecimiento (25°C), difiere ligeramente de la óptima para la acumulación de carotenoides (28-30°C). Sin embargo, y puesto que el objetivo que se persigue es la producción de carotenoides, se ha optado por una temperatura de 28°C para el cultivo de esta estirpe. Asimismo, se ha comprobado que otros factores como la concentración de NaCl, influyen de forma significativa en la acumulación de pigmentos, aunque afectan negativamente al

crecimiento como se discute posteriormente. En *Haematococcus pluvialis*, la temperatura óptima para el crecimiento es de 20°C, si bien un aumento de la temperatura sobre este valor provoca un incremento en la acumulación de pigmentos (Fan y col., 1994; Tjahjono y col., 1994), aunque reduce considerablemente el crecimiento.

El análisis del efecto de la irradiancia luminosa sobre el crecimiento y concentración de pigmentos en *Muriellopsis* sp. muestra que el valor óptimo está en torno a 100 W m<sup>-2</sup> (Fig. 2). Aunque las diferencias en cuanto al crecimiento en el margen de irradiancia ensayado no son importantes, el efecto sobre la acumulación de luteína si es notable, siendo mayor en el cultivo iluminado con la citada intensidad. Los datos de contenido de pigmento por célula resultan más altos en los cultivos iluminados con menor irradiancia, y viceversa. Estos datos no concuerdan con la hipótesis de una función fotoprotectora de la luteína en las membranas tilacoidales del cloroplasto, en cuyo caso, cabría esperar resultados contrarios a los observados.

Resultados similares se obtienen también en el caso de cultivos de *Muriellopsis* sp. al exterior, en un fotobiorreactor tubular cerrado. En cultivo continuo, al incrementarse la tasa de dilución, y por tanto la relación luz/célula, la cantidad de luteína por célula fue menor que cuando el cultivo presentaba mayor densidad celular, o lo que es igual, a menor tasa de dilución, y por tanto con una relación luz/célula más baja. Este hecho se ha verificado para distintas épocas del año. Según estas observaciones, la luteína presenta un comportamiento similar al de la clorofila, incrementándose su contenido celular cuando disminuye la cantidad de luz que llega al cultivo, o en términos de cultivo continuo, cuando se trabaja a velocidades de dilución bajas. Sin embargo, al analizar el ciclo solar diario en cultivo continuo realizado al exterior en un fotobiorreactor tubular cerrado (Figs. 21 y 22), se observó que el contenido celular de luteína se incrementaba en las horas

centrales del día, coincidiendo con el periodo de mayor irradiancia. Esto se debe a un ligero incremento de la densidad celular, simultáneo con el de los carotenoides, que conlleva una disminución de la relación luz/célula y se traduce en un mayor contenido celular de luteína.

En *Haematococcus pluvialis* se ha corroborado que la elevada irradiancia determina una mayor acumulación de astaxantina en los cultivos (fig. 25), con independencia de otros factores, como la disponibilidad de nitrógeno. El papel que desempeña este pigmento en las células está claramente relacionado con la intensidad de luz a la que se someten los cultivos, hecho que ha sido constatado por varios autores (Hagen y col., 1993; Kobayashi y col., 1992, 1997). Resultados similares se obtienen con la estirpe *Chlorella zofingiensis*. La concentración de luteína en los cultivos apenas cambia con la irradiancia. Sin embargo, las concentraciones de astaxantina y cantaxantina son más altas en los cultivos expuestos a alta irradiancia. Este hecho indica que los mecanismos que controlan la síntesis de uno y otro carotenoide (luteína y astaxantina) son diferentes, respondiendo de forma distinta a los mismos estímulos. Esto puede estar relacionado con las distintas funciones que puedan desempeñar estos pigmentos en las células (Niyogi y col., 1997b). En este sentido, *Chlorella zofingiensis* representa un sistema biológico ideal para realizar este tipo de estudios, ya que ambos pigmentos se encuentran en concentraciones importantes en el mismo organismo.

A diferencia de lo que ocurre en otros organismos como *Haematococcus* (Lee y Soh, 1991), se ha comprobado que el estrés salino repercute negativamente sobre la síntesis de luteína en *Muriellopsis* sp. Como se ha mencionado anteriormente, las condiciones de crecimiento y de producción de luteína generalmente coinciden. La concentración de cloruro sódico en el medio considerada como óptima para los cultivos de *Muriellopsis* se sitúa entre 2 y 35 mM. Por encima de este valor, el estrés salino afecta negativamente al crecimiento de

esta microalga, y por tanto a la concentración de luteína en el cultivo. El contenido celular en el pigmento sin embargo, no se afecta de forma significativa.

En *Chlorella fusca* se han obtenido resultados muy similares (Fig. 31). El aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo de 2 mM a 35-70 mM provoca un efecto negativo sobre el crecimiento y sobre el contenido en luteína.

La estirpe *Chlorella zofingiensis* muestra mayor tolerancia a la presencia de cloruro sódico en el medio de cultivo. Hasta una concentración de 100 mM, el crecimiento no se ve afectado, así como tampoco la composición de pigmentos (pág. 52-R). Concentraciones mayores de NaCl (200 y 400 mM) en el medio de cultivo afectan a la tasa de crecimiento y a la concentración de astaxantina, que se incrementa ligeramente en células cultivadas en presencia de 200 mM de NaCl. Con esta misma concentración salina no se ve afectado el contenido de luteína. Estas observaciones muestran nuevamente la diferencia entre acumulación de luteína y de astaxantina. El estrés salino induce la acumulación de astaxantina, mientras que la de luteína no se ve afectada.

El nitrógeno representa, junto con el carbono, el elemento más importante cuantitativamente en la nutrición de microalgas. La fuente combinada de nitrógeno que se incluye en los medios de cultivo constituye un factor esencial en la preparación de los mismos (Becker, 1994). Generalmente las microalgas son capaces de utilizar nitrato, amonio y otras fuentes de nitrógeno orgánico como la urea. También se puede emplear nitrito, pero su toxicidad a elevadas concentraciones le hace menos apropiado.

Con el fin de determinar la fuente de nitrógeno más adecuada para los cultivos de *Muriellopsis* sp. y su posible efecto sobre la composición

cualitativa y cuantitativa de carotenoides, se realizaron una serie de ensayos en los que se emplearon distintas fuentes de nitrógeno combinado (nitrato sódico, cloruro amónico y nitrato amónico) en el medio de cultivo, y a diferentes concentraciones. En primer lugar, se ha comprobado que la calidad de la fuente empleada no tiene efecto aparente sobre la tasa de crecimiento, así como tampoco sobre la concentración máxima de luteína en los cultivos (Figs. 6 y 7), aunque el contenido por célula fue algo mayor en el cultivo realizado con nitrato sódico.

Tras realizar varios ensayos modificando las concentraciones de partida de las distintas fuentes de nitrógeno, se estableció que la fuente y concentración óptimas tanto para el crecimiento como para la producción de luteína era el nitrato sódico 20 mM.

La posterior adición de este nutriente al medio de cultivo, una vez transcurrido el tiempo necesario para que las células agotasen el de partida, se tradujo en un incremento de la concentración de luteína en el cultivo del 30% aproximadamente (pág. 17). La densidad celular en los cultivos no se vio alterada, aunque sí lo hizo el contenido celular. El aumento de la concentración de nitrato sódico por encima de 20 mM, no se traduce en una mayor concentración de luteína en el cultivo (Fig. 12), aunque se incrementa el contenido celular de dicho pigmento. Si se disminuye la concentración de nitrato a 10 mM, el crecimiento mejora sensiblemente respecto al cultivo con 20 mM, pero la concentración de luteína disminuye de forma drástica.

Estos resultados nos permiten concluir que si bien la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo no es muy crítica para el crecimiento de *Muriellopsis* sp., sí lo es para la síntesis de luteína, que claramente requiere una cierta disponibilidad de nitrógeno. El mismo resultado se obtiene en la estirpe *C. fusca*.

En *Haematococcus pluvialis* se ensayó el efecto de la concentración de nitrato sódico sobre el crecimiento y síntesis de astaxantina. Los resultados mostraron que la mayor concentración de pigmento se obtuvo con la concentración más alta de  $\text{NaNO}_3$  ensayada (20 mM). Sin embargo el contenido de astaxantina por célula fue más alto en el cultivo que tenía la concentración de nitrato más baja. El comportamiento de la síntesis de astaxantina con respecto a la disponibilidad de nitrógeno en *Haematococcus* es pues, opuesto al de la síntesis de luteína en las otras estirpes estudiadas.

Estos datos aclaran la relevancia del nitrógeno para la síntesis de astaxantina. En relación al crecimiento, a mayor disponibilidad de nitrato, se obtiene una concentración de astaxantina más alta en el cultivo, lo cual es necesario si se quiere obtener una alta producción de astaxantina en cultivo estanco. La limitación por nitrato induce la síntesis de astaxantina (Borowitzka y col., 1991; Boussiba y Vonshak, 1991). Pudiera ocurrir que en los cultivos con mayor concentración de nitrato, a medida que éste se va agotando, se produzca el mismo efecto que en los cultivos limitados por este elemento, es decir, que se induzca la síntesis de pigmento hasta alcanzar los contenidos por célula que se obtienen en los cultivos de menor disponibilidad de nitrógeno. Desde un punto de vista biotecnológico, la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* requeriría la utilización de concentraciones no limitantes de nitrógeno combinado, puesto que en estas condiciones se obtienen mayores concentraciones de astaxantina.

En la estirpe *C. zoofingiensis* se pone nuevamente de manifiesto la necesidad de utilizar una concentración no limitante de nitrógeno en los medios de cultivo, para obtener así mayores cantidades de carotenoides en los mismos. Esta observación es válida tanto para la luteína como para la astaxantina, de manera que en la concentración de  $\text{NaNO}_3$  más alta ensayada (20 mM) se han registrado la mayor densidad celular y la mayor concentración de carotenoides en los cultivos. Estos resultados

contrastan con los obtenidos por Rise y col. (1994). Estos autores concluyen que una baja disponibilidad de nitrógeno favorece el crecimiento de esta estirpe, así como el contenido en carotenoides de los cultivos. Las diferencias observadas con respecto a nuestros resultados, pueden deberse a distintas condiciones de cultivo (temperatura, pH, etc.), que en nuestro caso se han optimizado para la síntesis de carotenoides.

El empleo de un inhibidor de la glutamina sintetasa, el glufosinato amónico, demostró que la deficiencia de nitrógeno, al estar inhibida su asimilación (Aflalo y col., 1999), induce la síntesis de astaxantina en *Haematococcus* (Figs. 27 y 28), pero no la de luteína en *Muriellopsis*. Esta es una prueba adicional de un control diferencial de la síntesis de ambos pigmentos.

El fósforo, en forma de ortofosfato, constituye también un nutriente esencial, y su disponibilidad determina en hábitats naturales una limitación a la producción primaria, aún en presencia de nitrógeno suficiente. La influencia de este nutriente en el crecimiento y síntesis de luteína en *Muriellopsis* no se ha analizado con la misma profundidad que el nitrógeno. Sin embargo, cuando se sometió un cultivo de *Muriellopsis* a privación de fosfato, la síntesis de luteína se estancó, a diferencia de lo que ocurre con la síntesis de astaxantina en *Haematococcus*, donde se incrementa notablemente (Fig. 28). De esto se deduce que una limitación del crecimiento debido a la ausencia de algún nutriente esencial (nitrógeno o fósforo), se traduce en una acumulación de astaxantina en las células de *Haematococcus*, no siendo así el caso para *Muriellopsis* sp.

La temperatura ambiental es un factor al que la biomasa de microalgas responde de forma continua. La temperatura de las células se iguala a la temperatura del medio de cultivo, a diferencia de lo que ocurre con otros parámetros como por ejemplo el pH. Además de afectar

las tasas metabólicas celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. Un factor importante a tener en cuenta en la producción en masa de microalgas es el hecho de que la amplitud de la dependencia de la temperatura decrece considerablemente a medida que se incrementa la biomasa del cultivo, esto es, con el descenso de la irradiancia disponible para las células en el cultivo (Richmond, 1986).

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la carotenogénesis se ha estudiado en las estirpes *Muriellopsis* sp. y *C. zofingiensis*. De los estudios realizados en el presente trabajo en *Muriellopsis* sp., se desprende que, en un intervalo de temperaturas comprendido entre 20 y 28°C, la tasa de crecimiento no cambia de forma significativa (Fig. 13). Por el contrario, ésta disminuye enormemente al incrementar la temperatura del cultivo a 33°C. La mayor concentración de luteína, así como la densidad celular más alta, se obtuvo en el cultivo realizado a 28°C, por lo que se tomó este valor como óptimo para el cultivo de *Muriellopsis* sp.

Sin embargo, resulta notorio el efecto que tiene la temperatura sobre el contenido celular de luteína (Fig. 14). Este comportamiento nos llevó a plantear ensayos consistentes en elevar la temperatura de los cultivos de 24 ó 28°C a 33°C, en distintas fases de la curva de crecimiento, a fin de analizar el efecto de ese choque térmico sobre el contenido en pigmento. El choque térmico era efectivo cuando se pasaban los cultivos de 28 a 33°C, una vez superada la fase exponencial. El incremento del contenido en luteína tanto en el cultivo como en las células, fue del 20% respecto del control. Estos resultados concuerdan con lo observado en *Haematococcus*, si bien en este organismo se registra un incremento aún mas espectacular (aproximadamente seis veces) del contenido de pigmento por célula (Fan y col., 1994; Tjahjono y col., 1994) en condiciones semejantes.



En *Chlorella zofingiensis* la mayor tasa de crecimiento se registró a 24°C (Fig. 37). A esta temperatura también se obtuvo la mayor concentración de luteína en el cultivo. La concentración de astaxantina fue, sin embargo, mayor en el cultivo realizado a 28°C. Este resultado refuerza la hipótesis sobre la diferencia que hay entre ambos pigmentos en cuanto a la regulación de su síntesis.

El efecto de la temperatura cobra una especial relevancia cuando se trata de escalar el cultivo de organismos a biorreactores situados en el exterior, donde el control de la temperatura puede efectuarse tan sólo de forma parcial, por razones técnicas. En nuestra latitud se alcanzan durante la primavera y el verano temperaturas ambientales que superan los 35°C. Por encima de este valor, la tasa específica de crecimiento de numerosas microalgas eucariotas es muy baja, o prácticamente nula. Este criterio resulta pues esencial con vistas a la selección de microorganismos adecuados para su cultivo en sistemas al exterior.

Un criterio importante para el cultivo de microalgas a gran escala es que el organismo presente un amplio intervalo de pH óptimo para su crecimiento. Se ha estudiado el efecto del pH sobre el crecimiento y acumulación de carotenoides en las estirpes *Muriellopsis* sp. y *C. zofingiensis*. En *Muriellopsis* sp. se analizó en cultivos estancos, empleándose un fotoquimiostato equipado con un electrodo y controlador de pH. Los valores más altos de crecimiento y de concentración de luteína se obtuvieron a pH 6,5, sin embargo, fueron los valores extremos de pH (6 y 9) los que provocaron un incremento del contenido celular de pigmento (tabla IV), aunque la tasa de crecimiento en estas condiciones fue muy baja, mostrando los cultivos escasa viabilidad. Parece pues, que una condición de estrés de pH induce la carotenogénesis en *Muriellopsis* sp. En la bibliografía sobre *Haematococcus* no se recogen datos sobre el efecto del pH en la carotenogénesis. Existen algunas evidencias sobre el efecto del pH en la

síntesis de astaxantina y cantaxantina en estirpes de *Chlorella* (Borowitzka, 1988): un pH inferior a 6,5 favorece la síntesis de carotenoides. En una estirpe de *Chlorococcum* sp. (Zhang y col., 1997), en la que se analizó el efecto del pH sobre el crecimiento y acumulación de astaxantina, el pH óptimo para el crecimiento de dicho microorganismo (pH 8) difería del valor de pH (6) al que se obtiene la mayor concentración de astaxantina en cultivo estanco. Idénticos resultados se han obtenido para la estirpe *C. zofingiensis*. Estos datos corroboran el hecho de que las condiciones de crecimiento óptimas no coinciden, generalmente, con aquellas que sí lo son para la acumulación de carotenoides de interés en las microalgas.

El crecimiento mixotrófico se recoge en la bibliografía como condición inductora de la carotenogénesis (Borowitzka y col., 1991; Kakizono y col., 1992). Concretamente, en *Haematococcus pluvialis*, se ha empleado el acetato sódico como fuente de carbono complementaria al CO<sub>2</sub>. Se ha comprobado que la adición de este compuesto al medio de cultivo provoca un incremento del contenido de astaxantina en las células de esta microalga, promoviendo el cambio morfológico característico (Kobayashi y col., 1993). Por otro lado, también existen evidencias de un incremento de la producción de luteína en estirpes de *Chlorella* cultivadas en presencia de glucosa (Shi y col., 1997).

En *Muriellopsis* sp. se han ensayado estos efectos. Mientras que la adición de acetato sódico al medio de cultivo no produjo ningún efecto sobre el crecimiento ni sobre la acumulación de luteína, el perfil cromatográfico de los pigmentos de las células cultivadas en presencia de glucosa sufrió una importante variación. En primer lugar, la concentración de luteína, carotenoide mayoritario de *Muriellopsis* sp., sufrió una drástica disminución, quedando aproximadamente en los cultivos mixotróficos a la mitad que en los cultivos control. Por otro lado, las concentraciones de astaxantina y cantaxantina, que, en condiciones normales de crecimiento (las denominadas anteriormente

como óptimas), están a concentraciones muy bajas, sufren un notable incremento, de 10 y 5 veces respectivamente, en los cultivos mixotróficos. La explicación a esta diferencia podría estar en el estrés osmótico que supone la presencia de glucosa en el medio. A este respecto, hay que resaltar el hecho, bien conocido, que las condiciones de estrés inducen la síntesis de astaxantina en *Haematococcus* (Borowitzka y col., 1991; Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi y col., 1991). Análogamente, ésto podría estar ocurriendo en *Muriellopsis* sp. Nuevamente se pone de manifiesto la acumulación diferencial de la luteína respecto a astaxantina y cantaxantina.

Además de funcionar como pigmentos accesorios a la fotosíntesis, se atribuye a los carotenoides la función de secuestradores de radicales libres de oxígeno, como el anión superóxido,  $O_2^-$ , o el oxígeno singlete,  $^1O_2$  (Kobayashi y col., 1993; Lee y Ding, 1995; Kobayashi y col., 1997). En *Haematococcus* existen numerosas evidencias a favor de esta hipótesis, puesto que la presencia en el medio de sustancias que inducen la generación de estos radicales, favorece la síntesis de astaxantina (Kobayashi y col., 1993; Fan y col., 1998). El empleo de metil viológeno -agente productor de radicales de anión superóxido- no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de los cultivos de *Muriellopsis* sp. Por el contrario, disminuyó la cantidad de carotenoides en los mismos, no sólo de luteína, sino también las de astaxantina, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno y violaxantina. Cuando se utilizó azul de metileno -agente productor de oxígeno singlete- tampoco hubo efecto sobre el crecimiento, aunque en esta ocasión se provocó un ligero incremento de la concentración de luteína, así como de su contenido celular, sin afectar al resto de los carotenoides. Estos hechos podrían indicar una cierta especificidad del radical de oxígeno sobre la síntesis de carotenoides, respondiendo positivamente la síntesis de luteína frente al oxígeno singlete en *Muriellopsis* sp.

Por otro lado, Lee y Ding (1995) han descrito para *Haematococcus pluvialis* que el aumento de la tensión de oxígeno a la que se somete el cultivo repercute positivamente sobre el contenido de astaxantina de las células. Cuando se ensayó el efecto de la tensión de oxígeno sobre la producción de luteína por *Muriellopsis* sp. en un fotoquimiostato, los datos obtenidos pusieron de manifiesto un comportamiento diferente, puesto que el aumento de O<sub>2</sub> en el cultivo provocaba un descenso tanto de la tasa de crecimiento como de la concentración de luteína, con lo que la productividad de este carotenoide se vio claramente disminuida.

El modo diferencial en que se ven afectados los procesos de síntesis de luteína con respecto a los de cantaxantina o astaxantina, y que se han puesto de manifiesto en numerosas ocasiones en este trabajo, puede tener relación con la distinta función que desempeñarían estos carotenoides en las células. A la astaxantina y cantaxantina se les considera carotenoides secundarios (Zhang y col., 1997; Margalith, 1999; Boussiba, 2000). En este sentido, y dada la ubicación de la luteína en los fotosistemas (Niyogi y col., 1997b), podría considerarse a esta xantofila como carotenoide primario, con una función todavía por esclarecer.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de luteína en *Muriellopsis* sp. se realizaron ensayos de producción en cultivo continuo, en condiciones controladas de laboratorio. En los cultivos en régimen continuo se mantienen estados de equilibrio determinados por el valor de una velocidad de dilución establecida. Cuando la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se iguala a la velocidad de dilución (D), se genera un estado de equilibrio, manteniéndose una determinada densidad celular, de manera que se compensa la generación celular por crecimiento con la dilución producida por aporte de medio fresco. Si se disminuye el valor de D, la concentración celular aumenta, disminuyendo a su vez la iluminación específica disponible para cada célula, produciéndose eventualmente

una situación de limitación por luz, de manera que el valor de  $\mu$  disminuye hasta igualarse al de  $D$  y se establece un nuevo estado de equilibrio, con una concentración celular superior a la anterior. Por el contrario, si  $D$  aumenta, ocurre el efecto inverso, pudiendo sufrir el cultivo una dilución excesiva (Pirt, 1975; Van Liere y Walsby, 1982).

La densidad celular de cultivos de *Muriellopsis* sp en régimen continuo disminuye al aumentarse la velocidad de dilución (Tabla VIII). Sin embargo, al aumentar ésta también lo hace la productividad tanto de biomasa como de luteína. Este incremento puede explicarse en base a la existencia de un efecto de limitación por luz en los cultivos más densos, que paulatinamente desaparece al aumentar la velocidad de dilución, repercutiendo de manera positiva en la productividad. La elevada tasa específica de crecimiento de *Muriellopsis* sp. (con un tiempo de generación alrededor de 3 horas) permite operar a altas velocidades de dilución.

Del barrido de tasas de dilución efectuado, al objeto de optimizar la producción de luteína por *Muriellopsis* sp. en cultivo continuo y en nuestras condiciones experimentales, se obtuvo un valor óptimo de 0,82 día<sup>-1</sup>. Hay que hacer notar que la producción de pigmento en cultivo continuo es un compromiso entre la generación de biomasa del microorganismo productor en base a su tasa de crecimiento, y de la concentración celular del pigmento.

En *Muriellopsis* sp. hemos comprobado que la concentración máxima de luteína en cultivo estanco se obtiene en fase estacionaria temprana. Un cultivo continuo mantenido en esta condición presentaría, pues, el mayor contenido volumétrico de luteína y por consiguiente, el mayor valor de producción de luteína. Empleando una tasa de dilución más baja, el cultivo estaría en condiciones similares a las de fase estacionaria tardía, con lo cual disminuiría su contenido celular de luteína, que unido a un flujo de salida menor, se traduciría

en una disminución de la productividad de luteína. Aumentando la tasa de dilución, el cultivo se encontraría en condiciones análogas a las de fase exponencial. En este estado, el cultivo no poseería la suficiente concentración de luteína para rendir una buena productividad.

El análisis de la composición elemental y molecular de las células de cultivos mantenidos a distintas tasas de dilución, puso de manifiesto que no había diferencias significativas en cuanto a la composición elemental. Sí se apreció alguna diferencia en cuanto a la composición molecular, siendo el contenido en proteínas mayor con la tasa de dilución más alta empleada. Por el contrario, el contenido en carbohidratos fue algo menor a esta tasa de dilución. Estas diferencias podrían explicarse en base a la fase del crecimiento en la que se encuentran las microalgas a las tasas de dilución utilizadas, de manera que a la mayor velocidad de dilución utilizada, las células se encontrarían en fase logarítmica de crecimiento. En esta fase, la velocidad específica de crecimiento es muy alta, siendo la proporción de productos hidrocarbonados menor. Por el contrario, en fase de crecimiento estacionaria, las células acumulan sustancias de reserva, como son los carbohidratos (Richmond, 1986).

Existen pocos datos en la bibliografía sobre producción de carotenoides en cultivo continuo, en condiciones controladas de laboratorio. Los trabajos de Lee y Soh (1991) y Lee y Ding (1995), proporcionan información sobre la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. Las productividades que de ellos se derivan son del mismo orden que las obtenidas con *Muriellopsis* sp, que incluso mejoran los valores publicados. En este sentido, los resultados obtenidos son suficientemente alentadores como para plantear el cultivo a la intemperie de *Muriellopsis* para la producción de luteína.

En el cultivo de microalgas a la intemperie, además de los factores ambientales considerados, temperatura e irradiancia, cuyos valores

vienen impuestos por la estación de año, existen otros parámetros, tales como profundidad, agitación o turbulencia de la suspensión y densidad celular, cuya manipulación y optimización es decisiva para llegar a establecer condiciones en que las células utilicen de forma óptima la luz solar incidente sobre el cultivo (Richmond, 1988; Vonshak y Richmond, 1988).

En la biotecnología de microalgas, la consecución de un sistema eficiente de cultivo en masa a la intemperie resulta de crucial importancia, ya que la posibilidad de utilizar de forma óptima la irradiancia solar, tanto para la obtención de biomasa como la de compuestos de interés a partir de la misma, supone un factor esencial en la economía del proceso de producción. En nuestra latitud, la elevada disponibilidad de horas de luz, así como su intensidad, además de las cálidas temperaturas que se registran durante buena parte del año, son factores que favorecen la implantación y operación de sistemas de cultivo de microalgas a la intemperie. Las características del crecimiento de *Muriellopsis* sp., así como la composición del medio de cultivo, no hacen posible, en principio, el empleo de sistemas abiertos, ya que la contaminación de los cultivos por otros microorganismos afectaría sensiblemente al crecimiento de las microalgas. Por tanto, y dado que el grupo dispone de un fotobiorreactor tubular cerrado, cuya eficacia ha sido previamente descrita para la producción de biomasa de cianobacterias, mejorando sensiblemente la obtenida en sistemas abiertos (Moreno, 1995), se optó por dicho sistema. Estos sistemas tubulares cerrados permiten mantener altas densidades celulares debido a la pequeña sección (espesor del cultivo) a la que se opera, así como la axenia del cultivo, dificultando la contaminación con otros microorganismos, y posibilitando además un control más estricto y automatizado de las condiciones de crecimiento y del proceso de producción. La posible disminución de productividad causada por la alta densidad celular en el sistema tubular, donde el efecto de ensombrecimiento celular mutuo es alto, se compensa por el reducido

diámetro de los tubos del sistema, permitiendo una alta tasa de exposición de las células a la luz (Boussiba, 1993). El cultivo de microalgas en biorreactores cerrados (sistema de cultivo hiperintensivo) se utiliza básicamente en la producción de compuestos de alto valor comercial, como es el caso de los pigmentos carotenoides, ya que tanto su instalación como su mantenimiento conllevan mayores costos que en los sistemas de cultivo abierto.

Para obtener un buen rendimiento en la producción al exterior de biomasa o de productos de interés que se derivan de la misma, es necesario maximizar el uso de la energía solar disponible. Asimismo, la optimización de la tasa de dilución representa un objetivo esencial, tanto biológico como técnico (Hu y col., 1996; Molina-Grima y col., 1996) para estos fines. En este trabajo hemos estimado los valores máximos de productividad, tanto de biomasa como de luteína, a distintas tasas de dilución, a lo largo del año. De esta forma, en el mes de Mayo, con altas irradiancias, las productividades máximas se obtuvieron a velocidades de dilución más bajas que en periodos del año de menor disponibilidad de luz (Noviembre). Este hecho refleja la limitación por luz que ocurre en éste último periodo, que es más acusado a densidades celulares más altas, es decir, a menor tasa de dilución. El marcado descenso de la productividad de luteína que tiene lugar en épocas de mayor intensidad de luz (primavera-verano), cuando se trabaja a baja velocidad de dilución ( $0,02 \text{ h}^{-1}$ ), es una consecuencia de la reducción de la tasa de crecimiento de las microalgas debida a la limitación por luz, impuesto por el auto-ensombrecimiento al que están sometidas las células. Por otro lado, parece ser que en esta época existe un ligero efecto de fotoinhibición cuando se utiliza una tasa de dilución elevada (superior a  $0,06 \text{ h}^{-1}$ ), ya que la productividad desciende ligeramente. Las productividades máximas de luteína y biomasa se obtienen a la misma velocidad de dilución. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el laboratorio, que indicaban una general



coincidencia de las condiciones óptimas de crecimiento y alto contenido de luteína en cultivos de *Muriellopsis* sp.

Merece la pena destacar que los valores máximos de productividad de luteína obtenidos en cultivo continuo en el fotobiorreactor tubular, alrededor de  $180 \text{ mg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  ( $7,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ), son mayores que los recogidos en la literatura para la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* ( $140 \text{ mg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ), empleando un sistema similar de cultivo (Chaumont y Thepenier, 1995). Esta mayor productividad de pigmento registrada en *Muriellopsis* con relación a *Haematococcus* se debe con toda probabilidad a la mayor tasa de crecimiento y tolerancia a elevadas temperaturas que presenta *Muriellopsis*, lo que permite compensar su menor contenido celular de carotenoides con respecto a la misma estirpe.

La velocidad de flujo (agitación o turbulencia) de la suspensión celular es un factor que también debe optimizarse para obtener máximas productividades en cultivos de microalgas al exterior. Una adecuada agitación o tasa de mezcla de la suspensión celular (velocidad de circulación del cultivo en el fotobiorreactor) permite el correcto mezclado de la misma, necesario tanto para que las células reciban un régimen apropiado de luz, como para conseguir una distribución homogénea de nutrientes en el cultivo. Es de especial relevancia la distribución del  $\text{CO}_2$ , en su doble papel de nutriente y de factor regulador del pH. Una adecuada turbulencia de la suspensión contribuye asimismo a facilitar la remoción del oxígeno producido fotosintéticamente, así como a evitar la sedimentación de las células, impidiendo igualmente el establecimiento de una estratificación térmica (Richmond, 1990; Hu y col., 1996; Tredici y Chini-Zitelli, 1998).

En *Muriellopsis* sp. la productividad de luteína más alta se obtuvo a la mayor velocidad de circulación ensayada ( $0,4 \text{ m s}^{-1}$ ). Esta velocidad lineal permite un régimen de luz más apropiado, sin que exista rotura

celular. La fragilidad celular se ha observado en algunas estirpes de microalgas cultivadas en fotobiorreactor tubular, como *Haematococcus* y *Dunaliella*. Así, la velocidad lineal idónea para un cultivo de *Haematococcus*, cultivado en un fotobiorreactor análogo al nuestro (Chaumont y Thepenier, 1995), fue de  $0,25 \text{ m s}^{-1}$ . Para velocidades superiores a ésta, se observó el citado fenómeno de rotura celular.

Los cultivos de microalgas a la intemperie están sometidos a considerables fluctuaciones, tanto diarias como estacionales, en el valor de la irradiancia incidente. De hecho, a determinadas horas del día la irradiancia es tan elevada que puede tener efectos negativos sobre los cultivos, causando daños a las células, entre los que destacan aquellos de carácter fotoinhibitorio. Dependiendo del momento del día y/o de la estación, la irradiancia puede ser limitante, saturante o inhibitoria para el crecimiento celular (Vonshak y Richmond, 1988; Vonshak y Guy, 1992).

El seguimiento de cultivos a la intemperie de *Muriellopsis* sp. a lo largo del ciclo solar diario, puso de manifiesto que la concentración de células no se incrementa en las primeras horas de la mañana, pero sí lo hace después del mediodía, hasta alcanzar los valores máximos en las primeras horas de la tarde. Estas observaciones coinciden con las realizadas por otros autores, quienes han sugerido que la productividad de cultivos a la intemperie de microalgas está principalmente limitada por su dificultad para responder rápidamente a la variación de la iluminación que tiene lugar en un ciclo diario (Lee y Low, 1992; Tredici y Materassi, 1992; Molina-Grima y col., 1995; Tredici y Chini-Zitelli, 1998). Las pérdidas de biomasa durante la noche por respiración fueron elevadas, en torno al 20-25%, valores similares a los descritos por otros autores (Torzillo y col., 1991 a, b). En cuanto al contenido en luteína, se registró un rápido incremento de ésta durante las primeras horas del día, transcurriendo paralelo al de la irradiancia. El valor máximo se registraba al mediodía. En este punto también se registra el máximo

cociente de la relación luteína/clorofila. Estos datos pueden potenciar la idea de un posible papel para la luteína como protector del exceso de irradiancia. Esta función fotoprotectora de algunos carotenoides, como agentes que previenen a las células de algunos daños ocasionados por la alta irradiancia, se ha descrito ampliamente (Ben-Amotz y col., 1989; Bidigare y col., 1993; Chaumont y Thepenier, 1995; Eskling y col., 1997). Estudios realizados con mutantes de *Chlamydomonas* han demostrado que además del ciclo de las xantofilas, la luteína, que constituye un componente estructural de los complejos captadores de luz en las membranas tilacoidales, contribuye a la disipación del exceso de energía luminosa mediante un proceso amortiguador o de “quenching” no fotoquímico de la fluorescencia de la clorofila, así como a la protección de las células de microalgas de daños fotooxidativos (Niyogi y col., 1997b).

## **CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

1- A partir de la consideración y estudio de una serie de estirpes de microalgas en base a su contenido en carotenoides, se han seleccionado sendas estirpes de *Chlorella zofingiensis*, por su alto contenido en astaxantina y luteína, y de *Muriellopsis* sp. y de *Chlorella fusca*, por su elevado contenido en luteína, habiéndose corroborado, asimismo, una notable acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*.

2- Para las distintas estirpes consideradas en este trabajo, se ha comprobado la ocurrencia de una acumulación diferencial de carotenoides a lo largo del crecimiento celular. De este modo, la luteína se acumula en una etapa temprana de la fase estacionaria, mientras que otros carotenoides, como astaxantina y cantaxantina, lo hacen en una etapa más tardía de dicha fase.

3- Los niveles de luteína y astaxantina responden en distinta forma a cambios en distintos factores ambientales y nutricionales, tales como intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes esenciales o salinidad, indicando diferencias en el control de la síntesis de estos pigmentos.

4- La disponibilidad de nutrientes esenciales, especialmente nitrógeno combinado, en el medio de cultivo, resulta de crucial importancia para la biosíntesis de carotenoides. Así, la síntesis de luteína es mayor cuando hay abundancia de nitrógeno en el medio. Por el contrario, la biosíntesis de astaxantina se favorece en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, y desde el punto de vista de la producción de pigmentos, una alta disponibilidad de nitrógeno redundará en mayor productividad de astaxantina tanto en cultivos de *Haematococcus pluvialis* como de *Chlorella zofingiensis*.

5- Se han establecido las condiciones óptimas tanto para el crecimiento como para la producción de luteína en *Muriellopsis* sp. en cultivos

estanco y continuo. En general, las condiciones más adecuadas para el crecimiento, también lo son para la producción de luteína. Sin embargo, condiciones severas de pH o temperatura inducen una mayor acumulación celular del pigmento.

6- Se han caracterizado también las condiciones de crecimiento y síntesis de carotenoides en *Chlorella zofingiensis*. En esta estirpe, al igual que ocurre con *Muriellopsis* sp., las condiciones óptimas para el crecimiento coinciden, generalmente, con aquellas que también lo son para la síntesis de luteína. Sin embargo, la mayor acumulación de astaxantina se registra en condiciones ambientales y nutricionales desfavorables para el crecimiento.

7- Se ha puesto a punto un sistema de producción de luteína por *Muriellopsis* sp. a la intemperie, en un fotobiorreactor tubular cerrado. Las productividades de luteína obtenidas nunca han sido inferiores a 80 mg m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>, alcanzando valores de hasta 180 mg m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> en épocas favorables del año. Estos valores son similares a los de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aflalo, C., Bing, W., Zarka, A. y Boussiba, S.** (1999). The effect of the herbicide Glufosinate (BASTA) on astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Z. Naturforsch.* 54c, 49-54.
- Arad, S., Cohen, E. y Ben-Amotz, A.** (1993). Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiol. Plant.* 87, 232-236.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y. y Wada, K.** (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* 357, 231-245.
- Avron, M. y Ben-Amotz, A.**, eds. (1992). *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bartley, G. E. y Scolnik, P.A.** (1995). Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual attraction and Human Health. *The Plant Cell*, 7, 1027-1038.
- Bauerfeind, J.C., Brubacher, G.B., Kläni, H.M. y Marusich, W.L.** (1971). Use of carotenoids. En: "Carotenoids" (Isler, O. ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 743-770.
- Becker, E. W.** (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben-Amotz, A.** (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for  $\beta$ -carotene production. *J. Appl. Phycol.* 7, 65-68.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M.** (1989). The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. En: *Algal and Cyanobacterial Technology* (Cresswell R.C., Rees T.A.V. y Shah N., eds.), Longman Scientific and Technical Press, pp. 90-114.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M.** (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnol.* 8, 121-126.
- Benemann, J.R.** (1992). Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4, 233-245.
- Benemann, J.R., Tillet, D.M. y Weissman, J.C.** (1987). Microalgae biotechnology. *Trends Biotech.* 5, 47-53



- Bertocchi, C., Navarini, L. y Césaró, A.** (1990). Polysaccharides from cyanobacteria. *Carbohydrate Polimers.* 12, 127-153.
- Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E., Kennicutt II, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hoham, R.W. y Macko, S.A.** (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29, 427-434.
- Boehringer Mannheim** (1984). Instrucciones de trabajo con el test-combinación de lípidos totales, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania.
- Borowitzka, L.J.** (1992). Commercial *Dunaliella* production: History and development. En: "Profiles on Biotechnology", (Villa, T.G. y Abalde, J., eds.) Servicio de publicaciones universidad de Santiago, Santiago, pp. 233-245.
- Borowitzka, M.A.** (1988). Vitamins and fine chemicals from microalgae. En: "Microalgal Biotechnology" (Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp 153- 196.
- Borowitzka, M.A.** (1992). Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial strategies. En: "Profiles on Biotechnology" (Villa, T.G. y Abalde, J., eds.), Servicio de publicaciones Universidad de Santiago, Santiago, pp. 301-310.
- Borowitzka, M.A., Huisman, J.M, y Osborn, A.** (1991). Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1. Effect of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3, 295-304.
- Bourelly, P.** (1990). Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique, vol 1. Les algues Vertes. Societé Nouvelle des éditions Boubée, Paris.
- Boussiba, S.** (1993). Production of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* in a closed tubular reactor for rice farming. *Microb. Releases.* 2, 35-39.
- Boussiba, S.** (2000) Carotenoids in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108, 111-117.
- Boussiba, S. y Vonshak, A.** (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1077-82.
- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J-P., Zarka, A. y Chen, F.** (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotech. Lett.* 21, 601-604.

- Boussiba, S. y Vonshak, A.** (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1077-1082.
- Broady, P.A.** (1982). New records of chlorophycean microalgae cultured from Antarctic terrestrial habitats. *Nova Hedwigia* 36, 445-479.
- Bubrick, P.** (1991). Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technol.* 38, 237-239.
- Burlew, J.S.** (1953). Algal culture. From laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, publication n° 600, Washington.
- Burton, K.** (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. *En: Methods in Enzimology*, vol 12B (Grossman, L. y Moldave, K., eds.), Academic Press, New York, pp. 163-166.
- Callegari, J.P.** (1989). Feu vert pour les microalgues. *Biofutur.* 76, 25-40.
- Chaumont, D. y Thepenier, C.** (1995) Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *J. Appl. Phycol.* 7, 529-537.
- Cohen, Z.** (1986) Products from microalgae. *En: Handbook of Microalgal Mass Culture* (Richmond, A., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 421-454.
- De Philippis, R., Sili, C., Tassinato, G., Vincenzini, M. y Materassi, R.** (1991). Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. *Bioresource Technology.* 38, 101-104.
- Demmig-Adams, B.** (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1-24.
- Droop, M.R.** (1955). Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* *Nature*, 175, 42.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F.** (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Dyerberg, J.** (1986). Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutrition Reviews.* 44, 125-134.
- Eskling, M., Arvidson, P. y Akerlund, H.** (1997). The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* 100, 806-816.

- Fabregas, J., Dominguez, A., Alvarez, D.G., Lamela, T. y Otero, A.** (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotech. Lett.* 20 623-626.
- Fan, L., Vonshak, A. y Boussiba, S** (1994). Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 30, 829-833.
- Fan, L., Vonshak, A., Zarka, A. y Boussiba, S.** (1998). Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage? *Z. Naturforsch.* 53, 93-100.
- Gilmore, A.M.** (1997). Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99, 197-209.
- Glazer, A.N.** (1987). Phycobilisomes: Assembly and attachment. En: *The Cyanobacteria* (Fay, P. y Van Baalen, C., eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 69-94.
- Glazer, A.N.** (1994). Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6, 105-112.
- Glazer, A.N. y Stryer, L.** (1984). Phycofluor probes. *Trends Biochem. Sci.* 9, 423-427.
- Goodwin, T. W.** (1980). *The Biochemistry of Carotenoids*. Chapman and Hall, London, New York.
- Gudin, C. y Chaumont, D.** (1991). Cell fragility - The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 145-151
- Gudin, C. y Thepenier, C.** (1986). Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv. Biotechnol. Processes.* 6 73-110.
- Guerrero, M.G.** (1982). Aprovechamiento de la energía solar mediante su conversión biológica. En: *Energías Renovables y Medio Ambiente*, Monografías 16, (C.E.O.T.M.A., ed.), Simancas Eds, S.A., Madrid, pp 23-36.
- Hagen, C., Braune, W. y Greulich, F.** (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. *J. Photochem. Photobiol.* 20, 153-160.

- Hagen, C., Braune, W., Vogel, K. y Hädder P.P.** (1993). Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Giröd) Rostafinski (Volvocales). V. Influences on photomovement. *Plant Cell Environ.* 16, 991-995.
- Harder, R. y von Witsch, H.** (1942). Über massenkultur von diatomeen. *Ber. Bot. Ges.* 60, 146-152.
- Harvey, W.** (1988). Cracking open marine algal's biological treasure chest. *Biotechnol.* 6, 488-492.
- Herbert, D., Phipps, P.J. y Strange R.E.** (1971). Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in Microbiology*, vol 5B (Norris, J.R. y Ribbons, D.W., eds.), Academic Press, Londres, pp. 209-344.
- Holzwarth, A.R.** (1991). Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Physiol. Plant.* 83 518-528.
- Hu, Q., Guterman, H. y Richmond, A.** (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 51-60.
- Johnson, E.A. y Schroeder, W.A.** (1995). En: "Advances in biochemical engineering biotechnology", vol 53 (Fiechter, A., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 119-178.
- Kakizono, T., Kobayashi, M. y Nagai, S.** (1992). Effect of carbon-nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 6, 403-405.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S.** (1991). Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis*, accompanied by morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 335-339.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S.** (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cysts cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* *Appl. Environm. Microbiol.* 59, 867-873.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. y Nagai, S.** (1992). Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 61-63.

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y. y Tsuji, Y.** (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 351-356.
- Kochert, G.** (1978). Protein determination by dye binding. En Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods (Hellebust, J.A. y Craigie, J.S., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 91-93.
- Lee, Y.K.** (1997). Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. J. Appl. Phycol. 9, 403-411.
- Lee, Y.K. y Ding, S.Y.** (1994). Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). J. Phycol. 30, 445-449.
- Lee, Y.K. y Ding, S.Y.** (1995). Effect of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). J. Phycol. 31, 922-924.
- Lee, Y.K. y Low, C.S.** (1992). Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 40, 1119-1122.
- Lee, Y.K. y Soh, C.W.** (1991). Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). J. Phycol. 4, 575-577.
- Lin, R.I. y Schejeide, O.A.** (1969). Microestimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction. Anal. Biochem. 27, 473-483
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- MacColl, R. y Guard-Friar, D.** (1987). Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Mackinney J.** (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140, 315-322.
- Margalith P.Z.** (1999). Production of ketocarotenoids by microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 431-438.
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J.M. y Acién Fernández, F.G.** (1994). Effect of growth rate on EPA and DHA content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 23-27.

**Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J.M. y Acién Fernández, F.G.** (1996). Productivity análisis of outdoor chemostat culture in tubular air-lift photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 8, 369-380

**Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., García Sánchez, J.L. y López Alonso, D.** (1993). n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 599-605.

**Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J.M., Acién Fernández, F.G. y Urda Carmona, J.** (1995). Biomass and icosapentanoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaedactylum tricornutum* UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 658-663.

**Mantoura, R.F.C. y Llewellyn, C.A.** (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 151, 297-314

**Moreno, J.** (1995). Optimización del cultivo a la intemperie y producción de exopolisacárido por el alga verde-azulada (cianobacteria) *Anabaena* sp. ATCC 33047. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

**Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J. y Guerrero, M.G.** (1998). Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* 60, 175-182.

**Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. y GallardoGuerrero, M.L.** (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 40, 60-63

**Niyogi, K.K., Björkman, O. y Grossman, A.R.** (1997a). *Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *The Plant Cell* 9, 1369-1380.

**Niyogi, K.K., Björkman, O. y Grossman, A.R.** (1997b). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14162-14167.

**Oswald, W.J.** (1988). Micro-algae and waste-water treatment. En: *Microalgal Biotechnology* (Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 305-328.

- Pierson, B.K. y Olson, J.M.** (1989). En: "Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities". American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 402-420.
- Plude, J.L., Parker, D.L., Schommer, O.J., Timmerman, R.J., Hagstrom, S.A., Joers, J.M. y Hnasko, R.** (1991). Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C 3-40. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1696-1700.
- Renstrøm, B., Borch, G., Skulberg, O.M., y Liaaen-Jensen, S.** (1981). Optical purity of (3S, 3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* *Phytochemistry.* 20, 2561-2564.
- Richmond, A.** (1986). *Handbook of Microalgae Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Richmond, A.** (1990). Large scale microalgal culture and applications. En: "Progress in Phycological Research" vol 7, (Round, M. y Chapman, S., eds.), Biopress Ltd, pp. 269-330.
- Rise, M., Cohen, E., Vishkautsan, M., Cojocar, M., Gottlieb, H.E. y Arad, S.** (1994). Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J. Plant Physiol.* 144, 287-292.
- Rodríguez, H. y Guerrero, M.G.** (1992). Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). En: "Profiles on Biotechnology" (Villa, T.G. y Abalde, J. eds.), Servicio de publicaciones Universidad de Santiago, Santiago, pp. 247-260.
- Rowan, K.S.** (1989). *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sandmann, G.** (1991). Biosynthesis of cyclic carotenoids: Biochemistry and molecular genetics of the reaction sequence. *Physiol. Plant.* 83 186-193.
- Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R.** (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology* 17, 910-922.
- Shi, X.M., Chen, F., Yuan, J.P. y Chen, H.** (1997). Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *J. Appl. Phycol.* 9, 445-450.
- South, G.R. y Whittick, A.** (1987). *Introduction to Phycology*. Blackwell Scientific Publication, Canada.

- Stanier, R.Y.** (1970). Twentieth symposium of the society for general microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1.
- Sutherland, I.W.** (1986). Industrially useful microbial polysaccharides. *Microbiol. Sciences.* 3, 5-8.
- Tamiya, H.** (1957). Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8, 309-334.
- Thepenier, C. y Gudin, C.** (1985). Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Mircen J.* 1, 257-268.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. y Nagai, S.** (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotech. Lett.* 16, 133-138.
- Terao, J.** (1989). Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids.* 24, 659-661.
- Torzillo, G., Sacchi, A. y Materassi, R.** (1991). Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology* 38, 95-100.
- Torzillo, G., Sacchi, A., Materassi, R. y Richmond, A.** (1991). Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 3, 103-109.
- Tredici, M. R. y Chini Zittelli, G.** (1998). Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 2, 187-197.
- Tredici, M.R. y Materassi, R.** (1992). From open pods to vertical alveolar panels: The italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4, 221-231.
- Vargas, M.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J. y Guerrero, M.G.** (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 34, 812-817.
- Vonshak, A. y Guy, R.** (1992). Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant Cell and Environment.* 15, 613-616.



**Vonshak, A. y Richmond, A.** (1988). Mass production of the bluegreen alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*. 15, 233-247.

**Yong, Y.Y.R. y Lee, Y-K.** (1991). Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta)? *Phycologia*, 30, 257-261.

**Zhang, D.H., Lee, Y.K. Ng, M.L. y Phang, S.M.** (1997). Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 9, 147-155.

**Zhang, D.H. y Lee, K.** (1997). Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of green algae, *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 9, 459-463.

**Zöllner, N. y Kirsch, K.** (1962). Ubre die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels ver vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z. ges. Exp. Med.* 135, 545-561.


# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. JOSÉ ANTONIO DEL CAMPO CASTILLO titulada SELECCIÓN DE ESTIRPES DE MICROCALIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE INTERÉS COMERCIAL. PRODUCCIÓN DE LUTEINA POR LA CLOROFICEA *Muciellopsis* SP. acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CON LAUDE

Sevilla, 9 de MARZO


2001

El Vocal,

  
PEDRO JOSÉ APARICIO ALONSO  
El Presidente

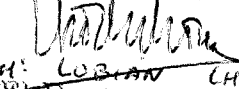
  
JOSÉ M. VEGA PIQUERES


El Vocal,

  
EMILIO MOLIM GRIJÓN  
El Secretario,

  
JOSÉ E. ABALDE ALONSO

El Vocal,

  
LUIS M. LOBIAN CHACIDO  
El Doctorado,

  
JOSÉ ANTONIO DEL CAMPO CASTIELLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672190