

Producción de Compuestos Orgánicos de Valor Comercial a partir de la Biomasa Microalgal de *Scenedesmus Dimorphus*

Resumen: Las microalgas son una prometedora fuente de compuestos orgánicos de valor comercial, ya que su cultivo se puede integrar con el aprovechamiento de corrientes residuales industriales, potenciando tanto la sustentabilidad como la rentabilidad de los procesos productivos.

En este trabajo se estudió el rendimiento de extracciones secuenciales, con solventes *n*-hexano, etanol y acetona, de la biomasa de *Scenedesmus dimorphus*, cultivada en condiciones control y de estrés nutricional. El contenido lipídico fue de 162,6 mg/g y 265,8 mg/g respectivamente. Se observa que, sometido a falta de nutrientes, el cultivo produce una acumulación no solamente de lípidos (aumento de 344% p/p), sino de carbohidratos, astaxantina y sus ésteres.

Los resultados muestran que a partir de cultivos de *S. dimorphus* es posible obtener distintos metabolitos orgánicos de interés, con métodos y solventes de extendido uso industrial, que no son los que frecuentemente se encuentran en la bibliografía de estudios microalgales.

Palabras Claves: *Scenedesmus dimorphus*, biorrefinería, microalgas, carotenoides.

Abstract: Microalgae are a promising source of commercial organic compounds since its culturing could be integrated to existing industrial processes, promoting joint goals of sustainability and profitability.

Yield of serial extractions with *n*-hexane, ethanol and acetone of *Scenedesmus dimorphus* was studied. Samples of algal biomass cultured under normal and stressed conditions were taken and lipid content obtained was 162,6 mg/g and 265,8 mg/g, respectively. It was also observed that culture deprived from nutrients not only accumulates lipids (344% w/w increase) but also carbohydrates, astaxanthin and its esters.

Results show that it is possible to obtain different organic products from *S. dimorphus* cultures, with solvents and techniques commonly used in the industrial field but rarely found in microalgae current bibliography.

Keywords: *Scenedesmus dimorphus*, biorefinery, microalgae, carotenoids.

María C. Cuello⁽¹⁾, Juan I. Gori⁽²⁾, Navid R. Moheimani⁽³⁾, Ester R. Chamorro⁽¹⁾

⁽¹⁾Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica, Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica (CONICET-UTN), Universidad Tecnológica Nacional, Resistencia, Argentina.

⁽²⁾Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

⁽³⁾Algae Research Group, School of Biological Sciences & Biotechnology, Murdoch University, Perth, Australia.

Mail: carolinacuello@gmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El extendido uso de microorganismos que existe en biotecnología, se debe, principalmente, a su activo metabolismo y a la posibilidad que tienen éstos de crecer en condiciones simples y de bajo costo (Vílchez et al. (1997)).

Dentro de este grupo, se encuentran hoy en activo desarrollo, las microalgas. Son organismos unicelulares fotosintéticos, con o sin núcleo, que vienen siendo cultivadas hace mucho tiempo, dado su eficiencia en convertir la energía solar en un gran número de metabolitos de interés comercial (Borowitzka y Moheimani (2013)).

Más recientemente, han recibido atención como una prometedora fuente sustentable de lípidos y carbohidratos para la producción de biocombustibles, ya que pueden crecer en tierra no apta para la agricultura, usando agua no potable y producir aceites mucho más eficientemente que las plantas superiores oleaginosas (Chisti (2007), Fon Sing et al. (2013)). Inicialmente, el biodiesel era el producto principal buscado, pero desde el año 2012, un gran número de compañías comenzaron a orientarse al desarrollo de estrategias de producción tanto de biocombustibles como de otros productos derivados de microlagas a los efectos de alcanzar negocios rentables. Estos productos involucran nutraceuticos, productos químicos especiales y para el cuidado personal elaborados a partir de carotenos, xantófilas, proteínas y carbohidratos microalgales (Brennan y Owende (2010)).

El abanico de productos posibles de obtener, se debe, por un lado, a que la composición bioquímica de la biomasa algal puede ser manipulada variando las condiciones de crecimiento, induciendo el enriquecimiento de determinada fracción biomolecular en el cultivo que después será extraído. Por ejemplo, la limitación en el suministro de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, puede aumentar el contenido de lípidos o de carbohidratos que luego pueden ser

convertidos en biocombustibles (biodiesel de aceites microalgales o bioetanol de sus carbohidratos). Por otro lado, la biomasa extraída, agotada, puede ser utilizada para suplementar biofertilizantes o alimento animal, agregando un porcentaje de rentabilidad mayor al proceso.

Algunos de estos compuestos, conocidos como carotenos y xantofilas, son un grupo de moléculas ampliamente utilizadas como pigmentos, que en recientes estudios comenzaron a destacarse por sus propiedades antioxidantes (Rodic et al. (2012)). Las microalgas son una fuente natural de éstos, ya que los mismos conforman las organelas celulares encargadas de recibir fotones para el proceso de fotosíntesis. Investigaciones demuestran que el α - y β -caroteno, el licopeno y la astaxantina protegen las células y tejidos de las especies dañinas de radicales oxígeno, como oxígeno singulete, radicales peróxido, y nitrógeno reactivo (Di Mascio et al. (1989), Krinsky y Yeum (2003), Stahl y Sies (2003), Kim et al. (2009)).

Este diseño de biorrefinería, es decir, el aprovechamiento integral de los cultivos microalgales para obtener energía, biocombustibles y productos de alto valor agregado a través de la transformación de la biomasa (Bharathiraja et al. (2015)) está destinado a ser una de las formas más sustentables y adecuadas de producción, ya que todo el proceso es neutral en emisiones de carbono y puede ser acoplado al saneamiento ambiental.

Pero para que este concepto de uso integral tenga sentido, es necesario estudiar y establecer un mapa claro del proceso así como de los productos a obtener (Trivedi et al. (2015)). Es decir, será necesario el estudio de la mejor secuencia en el procesamiento de la biomasa para obtener máximo rendimiento de los productos elegidos a un costo aceptable.

Mucha de la investigación orientada al estudio de la producción y cultivo de microalgas está confinada a las condiciones de laboratorio (de-Bashan et al. (2002)). Los métodos y reactivos utilizados allí no son fácilmente transferibles a la industria, en algunos casos. A veces dado su elevado costo y otras dada su elevada toxicidad, ya que implica operadores con mayor grado de formación para tareas sencillas, debido a los requerimientos de higiene y seguridad laboral. El estudio y desarrollo de procedimientos de procesamiento de la biomasa algal teniendo en cuenta la futura apropiación de dichas técnicas por parte de la industria, es fundamental para la factibilidad de la transferencia tecnológica al medio.

Scenedesmus dimorphus es una microalga que, junto con *Chlorella sp.*, corresponden a las más utilizadas desde hace tiempo en el tratamiento de aguas residuales (Zeng et al. (2015)). Una de las razones que llevan a elegir *Scenedesmus sp.* es su flexibilidad a adaptarse a la variable disponibilidad de nitrógeno y fósforo que presentan regularmente en las aguas residuales a lo largo del tiempo.

Aunque *Scenedesmus dimorphus* no es una de las microalgas más comúnmente explotadas en la producción de carotenoides, también los acumula bajo condiciones de inducción (estrés) y es una microalga que se recupera rápidamente a la fase de crecimiento normal luego que las condiciones de stress desaparecieron (Qin et al. (2008)). Por ello, aunque poco estudiada, se trata de una especie muy interesante a los fines de las estrategias de integración de procesos antes mencionadas (Zhang et al. (1997)).

El objetivo de los análisis presentados aquí, fue evaluar el rendimiento de la biomasa algal de *Scenedesmus dimorphus*, en la producción de lípidos (aceites, carotenoides) y de carbohidratos, en condi-

ciones de crecimiento normal y en condiciones de estrés nutricional, utilizando para ello solventes empleados industrialmente para la extracción, pero que no son los que usualmente se describen en la bibliografía sobre estudios con microalgas (Molina Grima et al. (2013), Burja et al. (2007)).

METODOLOGÍA

Cultivo

En el presente trabajo se utilizó biomasa microalgal de la especie *Scenedesmus dimorphus*, cepa aislada de un efluente urbano local. El cultivo se realizó en la ciudad de Buenos Aires, durante los meses de junio-agosto de 2015, con temperaturas y luz impuestas por el ambiente, en un fotobiorreactor tubular de 70 Litros con aireación constante y sin inyección de dióxido de carbono. El medio de cultivo se preparó siguiendo la receta de Bold's Basal (Nichols y Bold (1965)) preparado en agua corriente sin esterilizar.

Al final del período de crecimiento exponencial, un tercio del cultivo de microalgas fue separado (cosecha) y floculado por elevación del pH a 13 con el agregado de NaOH, luego de lo cual se agitó durante 10 minutos a una velocidad de entre 30 y 80 rpm. Finalizada la agitación se dejó sedimentar alrededor de 30min. La pasta floculada fue filtrada y secada en estufa a 60°C, con vacío, obteniéndose así la biomasa algal para su extracción.

El volumen de un tercio no cosechado del cultivo, se conservó dentro del fotobiorreactor y fue sometido a estrés mediante dilución del mismo con dos tercios de agua corriente, sin adición de macronutrientes (NaNO₃ ni NaH₂PO₄) ni de micronutrientes. Las microalgas fueron cultivadas en estas condiciones por 10 días, momento que coincide con el comienzo de declinación del número de

células en el cultivo. Para esta determinación, diariamente se realizaron conteos del número de células en hemocitómetro bajo microscopio (Moheimani et al. (2013)).

Finalizado este período, las microalgas estresadas fueron cosechadas y tratadas de la misma manera antes descrita.

Extracción de lípidos

La extracción de lípidos de la biomasa algal seca, se llevó a cabo en proceso batch con solventes n-hexano, etanol y acetona, calidad pro-análisis, en este orden. Consistió en colocar 1g de biomasa en un tubo de ensayo y 50mL del primer solvente en cuatro porciones, molturando la biomasa con una varilla de vidrio, luego del agregado de cada porción. La mezcla de solvente y compuestos extraídos (extractivo) obtenida con este primer solvente es separada de la biomasa y el solvente de cada extracción, recuperado mediante rotavapor. El extracto libre de solvente obtenido es pesado y el contenido de extraíbles, en cada solvente, se expresa en porcentaje en base seca. Sobre la masa residual se repite este procedimiento con el segundo solvente y finalmente con el tercero.

La secuencia de solventes presentada, fue estudiada y puesta a punto en un trabajo anterior (Castro et al. (2015)), donde se realizaron extracciones de la misma biomasa con todas las posibles combinaciones de secuencia para los tres solventes. Los rendimientos del extractivo obtenido en cada caso fueron evaluados, resultando más eficiente la extracción realizada como se describió más arriba.

Determinación de Porcentaje de Extractivo

La evaluación cuantitativa de los componentes

extraídos por los diversos solventes (extractivos) se realizó por gravimetría. El extractivo resulta de pesar el tubo de ensayo (extracción batch) vacío y después de evaporar el solvente.

Caracterización y Cuantificación de Lípidos

La caracterización de los diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos se realizó por cromatografía en placa delgada (TLC por sus siglas en inglés), por comparación con muestras patrón conocidas y con TLCs publicadas en la bibliografía consultada (Jaime et al. (2010)).

La cromatografía en placa se utilizó para evaluar cualitativamente la presencia de carotenos y xantófilas así como la presencia de lípidos saponificables y el orden de elución. Esta técnica se realizó sembrando los patrones y las muestras en Cromatofolios AL TLC 20 x 20 silicagel 60 F254 utilizando n-hexano:éter etílico (10+3) y n-hexano:acetona (7+3) como eluyentes y permanganato de potasio acidificado al 1% como revelador.

Los patrones fueron obtenidos de sus fuentes naturales más frecuentemente mencionadas en la bibliografía y por comparación con publicaciones de procesos de obtención de los mismos en las condiciones utilizadas para este estudio (Jaime et al. (2010)), a saber: el β -caroteno fue obtenido del extracto de zanahoria; el licopeno, del extracto de tomate; la luteína, del extracto de huevo; las clorofilas y feofitina, del extracto de espinaca; el aceite, de un patrón de aceite de girasol y la astaxantina, del extracto de salmón rosado. La metodología de extracción fue la misma que se mencionó anteriormente para las muestras, pero en este caso se separan los patrones por cromatografía en columna.

Determinación de Carbohidratos

La determinación de carbohidratos se llevó a cabo por la técnica de Kochert (1978) modificada por Ben Amotz et al. (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biomasa algal de *Scenedesmus dimorphus* presentó un contenido lipídico promedio de 162,6 mg/g de biomasa seca, cuando fue cultivada en condiciones de control (Tabla 1). De los cuales, 41 mg/g de biomasa seca corresponden a la fase extraída con hexano, es decir, la fase conteniendo los aceites que pueden ser utilizados para la generación de biocombustibles. El contenido lipídico se incrementó en un 344% cuando el cultivo fue sometido a estrés nutricional, llegando a 265,8 mg/g biomasa seca. Estudios de otros autores con *Scenedesmus dimorphus*, por ejemplo, Lee, Yoo et al. (2010), obtuvieron 133 mg/g de biomasa seca, realizando pre-tratamientos intensivos de ruptura de pared celular a la biomasa y utilizando los solventes metanol y cloroformo, que son, desde un punto de vista industrial, comparativamente tóxicos y de mayor costo que los utilizados en el presente estudio. En el

mismo trabajo, la microalga de mayor producción de lípidos, *Botryococcus braunii*, tuvo resultados de 320 mg/g de biomasa seca.

Los resultados del presente estudio resumidos en la Tabla 1, muestran que la situación de estrés nutricional no solamente indujo la mayor síntesis lipídica, sino también se evidenció un aumento en el contenido de carbohidratos. Los carbohidratos provenientes de microalgas, consisten principalmente en celulosa y almidones sin lignina, por ello, pueden ser una fuente directa de carbono para la industria de la fermentación (Yen et al. (2013)).

La inducción de una fase de estrés puede permitir el doble aprovechamiento de la biomasa algal, tanto para la extracción de lípidos como se discutió anteriormente, como la obtención de carbohidratos sin lignina para la generación de bioetanol.

Por otra parte, dado el potencial de significancia que tienen los carotenoides y la posibilidad de obtener éstos de microalgas cultivadas en efluentes no peligrosos (Zhou et al. (2015)), evaluar un método eficiente para su extracción a bajo costo haría posible la transferencia masiva de este tipo de tecnología para biorremediación, lo cual además de permitir el cumplimiento de la legislación vigente para descargar

	Solvente	% Extractivo sobre Masa Inicial [% p/p]	Total Lípidos [mg/g muestra]	Carbohidratos [mg/g muestra]
<i>Scenedesmus dimorphus</i> en fase de crecimiento (Control)	Fase hexánica	4,1	162,6 ± 4,1	220± 3,5
	Fase etanólica	10,9		
	Fase acetónica	1,2		
<i>Scenedesmus dimorphus</i> en fase de estrés de nutrientes	Fase hexánica	14,1	265,8± 4,8	420± 3,8
	Fase etanólica	10,4		
	Fase acetónica	2,0		

Tabla 1. Contenido de lípidos y carbohidratos del cultivo de *S. dimorphus* en fase de crecimiento (control) y en fase de estrés

efluentes a cursos de aguas, tendría una ventaja de rentabilidad asociada.

Una síntesis del diseño de proceso buscado en este trabajo, dentro del concepto de biorrefinería, se expresa en la Figura 1.

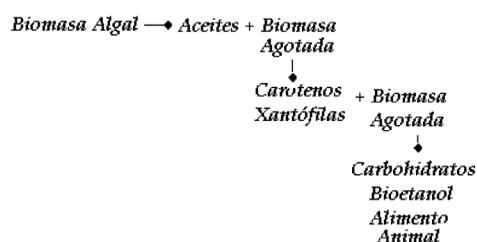


Figura 1. Biorrefinería Microalgal: produciendo múltiples productos de biomasa algal.

Mediante la extracción con hexano se favoreció la recuperación de los lípidos saponificables y la fracción de α - y β - caroteno. La elución con hexano:éter, permitió la mejor separación de estas sustancias del resto de los carotenoides. Esto deberá ser tenido en cuenta al momento de realizar un fraccionamiento de componentes en columna cromatográfica (Figura 2.a y b).

Las placas reveladas con permanganato de potasio (Figura 2 - Placas rosadas) permiten observar la fracción de lípidos saponificables (aceites) presentes en la muestra que, por ser incoloros, no se observan en las placas sin revelar (Figura 2, placas blancas).

Comparando los resultados de las muestras del cultivo sin estresar (Figura 2 a y c) con las muestras del cultivo estresado nutricionalmente (Figura 2 b y d) se puede evidenciar cualitativamente el aumento significativo de estos componentes, al evaluar el tamaño de la “mancha” del extractivo hexánico en comparación con la “mancha” del patrón de aceite.

Cuantitativamente, esta diferencia se presenta en la Tabla 1. En la misma tabla, se evidencia que la extracción con los solventes etanol y acetona, permite

aumentar el rendimiento global (mayor porcentaje de extraíbles) de las muestras. También se recuperan con estos solventes, las fracciones más polares (ésteres de astaxantina, luteína, etc). Esto se visualiza en las Figura 2 c y d.

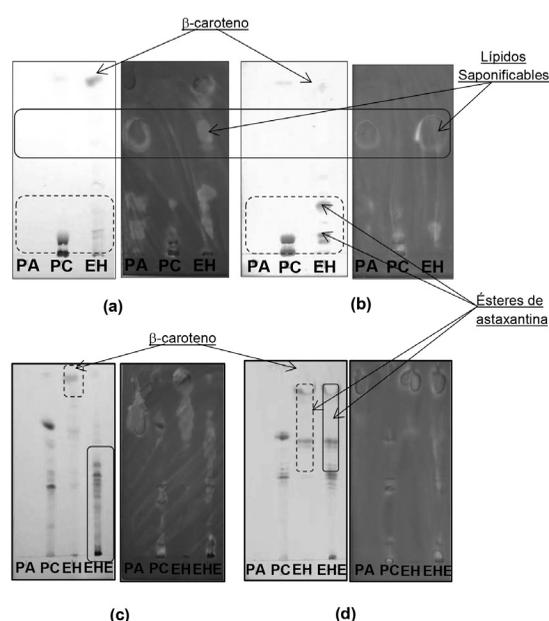


Figura 2. Cromatografías en capa delgada (TLC) de los extractos de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en fase de crecimiento (a y c) y en fase de estrés nutricional (b y d). Los patrones de aceite (PA) y de carotenoides (PC) se siembran en simultáneo para permitir la comparación de los componentes del extractivo obtenido con n-hexano (EH) y el obtenido con la secuencia n-hexano/etanol (EHE). Luego, las muestras de cada extractivo son eluidas con hexano:éter etílico (arriba) y en otro caso, con n-hexano:acetona (abajo). Se aprecia que, según los solventes utilizados para la extracción, se favorece la separación de los compuestos menos polares, como β -caroteno (c, línea punteada) o los más polares como clorofilas, luteína, feofitinas (c, línea entera). Las mismas TLCs son reveladas con permanganato de potasio (placas rosadas) que permite observar la fracción incolora de lípidos saponificables (aceites) presentes en la muestra (a y b línea entera) y el incremento de los mismos en el cultivo estresado (b, placa rosada). También se evidencia la producción de mono y diésteres de astaxantina en el cultivo estresado (d, líneas entera y punteada).

Los ésteres de astaxantina, de elevado valor comercial hoy en día, debido a sus múltiples propiedades antioxidantes, son principalmente obtenidos de la

microalga *Haematococcus pluvialis* (Liu (2003)). Pero en el caso de este estudio, las muestras del cultivo estresado de *S. dimorphus* mostraron una acumulación significativa de los mismos (Figura 2 b y d). La identificación se realizó por comparación con los patrones descritos y con TLCs realizadas en idénticas condiciones encontradas en la bibliografía (Jaime et al. (2010)).

CONCLUSIONES

Los grupos de sustancias obtenidas por extracción secuencial de biomasa microalgal de *S. dimorphus* con los solventes n-hexano, etanol y acetona, evidenciaron cuali- y cuantitativamente diferentes grupos de sustancias lipídicas de interés bioenergético, alimenticio, farmacéutico y cosmético. El contenido lipídico obtenido de la biomasa control, $162,6 \pm 4,1$ mg/g muestra, y de la biomasa estresada, $265,8 \pm 4,8$ mg/g muestra, comparativamente con la bibliografía existente, se evalúan como adecuados rendimientos de producción, sobre todo teniendo en cuenta que esta especie de microalga está especialmente indicada para procesos de tratamiento de efluentes.

La biomasa agotada aún puede ser fuente de carbohidratos para la obtención de bioetanol o complemento del alimento animal. La misma presentó un contenido de $220 \pm 3,5$ mg/g muestra, biomasa control, y de $420 \pm 3,8$ mg/g muestra, biomasa estresada.

En la biomasa estresada el contenido de la fracción de aceites y α/β caroteno aumentó en un 344% y además, se indujo la producción de astaxantina, mono- y diésteres. Estos compuestos tienen un alto valor comercial y son resultados alentadores para el desarrollo de una estrategia de integración de procesos de producción de biomasa con una biorrefinería microalgal.

Dado que gran parte de nuestro país pertenece al

denominado "Cordón Solar" (International Energy Agency (2011)), es decir, que recibe radiación directa de entre 2000 y 3000 KWH/m² por año, adecuada para el cultivo de microalgas (Comprehensive Oil Algae Report (2015)), y que las mismas pueden ser utilizadas para alcanzar objetivos conjuntos de remoción de nutrientes de aguas residuales y obtención de metabolitos de interés comercial a partir de la biomasa algal allí cultivada, el diseño de procesos integrados donde los sistemas de tratamiento de efluentes sean productores de la materia prima de una biorrefinería microalgal es parte de un enfoque de integración para que Producción y Ambiente no sean dos ámbitos excluyentes del otro.

Los resultados obtenidos son muy alentadores en este momento en que, mundialmente, se persigue la producción de compuestos orgánicos de valor comercial, mediante procesos integrados, sustentables ecológicamente y rentables económicamente.

El estudio del desempeño de esta microalga en aguas residuales que no contengan metales pesados en comparación con los resultados aquí presentados, permitirá establecer la base de una ecuación económica para dar sustento al diseño y optimización de una biorrefinería microalgal acoplada a servicios de tratamiento de efluentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dra. Verónica Beligni por proveernos la cepa en estudio. A la Universidad Tecnológica Nacional por el otorgamiento de la Beca Doctoral a la Ing. Carolina Cuello y a las Universidades Tecnológica Nacional y Buenos Aires, por el financiamiento de los proyectos de investigación dentro de los cuales se inscribe el presente trabajo.

REFERENCIAS

- Ben Amotz, A., Tornabene T., Thomas, W. (1985). *Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. Journal of Phycology*, 21, 72-81.
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., Praveen Kumar, R., Palani, S. (2015). *Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 634-653.
- Borowitzka, M. (1998). *Limits to Growth. En: Wastewater Treatment with Algae. Berlin Heidelberg: Springer.*
- Borowitzka, M. , Moheimani, N. (2013). *Sustainable biofuels from algae. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18, 13-25.
- Brennan, L., Owende, P., (2010). *Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577
- Burja A., Armenta R., Radianingtyas H., Barrow C. (2007). *Evaluation of fatty acid extraction methods for Thraustochytrium sp. ONC-T18. Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 4795-4801.
- Castro, E., Blanc, D., Cuello, M. (2015). *Metabolitos de interés industrial obtenidos de biomasa algal: Optimización de solventes por tipo y secuencia de extracción. XX Congreso Nacional de Estudiantes de Ingeniería Química y Primer Binacional Argentina-Chile. San Juan: Asociación Sanjuanina de Estudiantes de Ingeniería en Alimentos y Química.*
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Comprehensive Oilgae Report (2015). Web: <http://www.oilgae.com>*
- de-Bashan, L., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V., Bustillos, J. (2002). *Increased pigment and lipid content, lipid variety and cell and population size of the microalgae Chlorella spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense. Canadian Journal of Microbiology*, 48, 514-521.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274, 532-538.
- Fon Sing, S., Isdepsky, A., Borowitzka, M., Moheimani, N. (2013). *Production of biofuels from microalgae. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18, 47-72.

- International Energy Agency (2011). Web: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Solar_Energy_Perspectives2011.pdf
- Jaime, L., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E., Señorans, F. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 105-112.
- Kim, Y., Kim, Y., Yokozawa, T. (2009). Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8793-8797.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *Physiological and Biochemical Methods. Handbook of phycological methods*. London: Cambridge University Press.
- Krinsky, N., Yeum, K. (2003). Carotenoid-radical interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 754-760.
- Lee, J., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C., Oh, H. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, 75-77.
- Liu G. (2003). Isolation, characterization and development of astaxanthin-rich lipid bodies from algae. PhD Thesis. China: Institute of Hydrobiology.
- Moheimani, N., Borowitzka M., Isdepsky A, Fon Sing M. (2013). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. En: *Algae for Biofuels and Energy*. Netherlands: Springer.
- Molina Grima, E., Ibáñez González, M., Giménez Giménez A. (2013). Solvent Extraction for Microalgae Lipids. En: *Algae for Biofuels and Energy*. Netherlands: Springer.
- Nichols, H., Bold, H. (1965). *Trichsarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 1, 34-38.
- Qin, S., Liu, G., Hu, Z. (2008). The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry*, 43, 795-802.
- Rodic, Z., Simonovska, B., Albrecht, A., Vovk, I. (2012). Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Applied Chromatography*, 1231, 59-65.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D., Kaul, S., Garg, S. (2015). Algae based biorefinery—How to make sense?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307.
- Vílchez, C., Garbayo, I., Lobato, M., Vega, J. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 562-572.
- Yen, H., Hu, W., Chen, C., Ho, S., Lee, D., Chang, J. (2013). Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135, 166-174.
- Zeng, X., Guo, X., Su, G., Danquah, M., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., Lin, L. (2015). Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1385-1392.
- Zhang, D., Ng, Y., Phang, S. (1997). Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 9, 147-55.
- Zhou, Q., Zhang, P., Zhang, G., Peng, M. (2015). Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of photoperiod. *Biore-sources Technology*, 190, 196-200.