

Protocol for the maintenance of strains and escalation in the production of microalgae of industrial interest

INGENIERÍA AMBIENTAL

Protocolo para el mantenimiento de cepas y escalamiento en la producción de microalgas de interés industrial

Ingri Y. Cardenas-Gutierrez ^{1§}, Fiderman Machuca-Martinez ², Janet Bibiana García-Martínez ¹

¹Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Programa de Ingeniería Ambiental, Cucuta, Colombia

²Centro de Excelencia en Nuevos Materiales, Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia

§ingriyurleicg@ufps.edu.co, fiderman.machuca@correounivalle.edu.co, Janetbibianagm@ufps.edu.co

Recibido: 8 de octubre 2020 – Aceptado: 3 de noviembre de 2020

Abstract

Scenedesmus sp. & *Chlorella sp.*, are two isolated microalgae from hot springs located in Norte de Santander, which are studied in order to explore their biotechnological potential. The present work aimed to design a protocol by evaluating two factors, the effect of light radiation stress and incubation time by staggering the culture from box to tube with 20 mL of medium and finally in a 200 mL reactor. From this, in order to obtain a higher production of carotenoids of industrial interest, therefore, a non-factorial central composite surface design was used; As results, it was determined that in *Scenedesmus sp.* microalgae the two factors influence carotenoid deposition and for *Chlorella sp.* the incubation time does not influence and the photoperiod is fundamental in the deposition of these metabolites, on the other hand the program in which evaluated the STATISTICA 7.0 design generates its respective equation from which the optimal incubation time and photoperiod for the studied microalgae were determined

Keywords: Microalgas, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, Carotenoides, Fotoperiodo tiempo de incubación.

Resumen

Scenedesmus sp. & *Chlorella sp.*, son dos microalgas aisladas de termales localizados en Norte de Santander, las cuales son estudiadas con el fin de explorar su potencial biotecnológico. El presente trabajo tuvo como objetivo diseñar un protocolo mediante la evaluación de dos factores, el efecto de stress por radiación lumínica y el tiempo de incubación mediante el escalonamiento del cultivo desde Caja Petri en Medio de cultivo Bold basal (BBM) con un tiempo de incubación de 15 días a un tubo Falcon de 15 mL con 10 mL de medio líquido y fue en esta parte donde se evaluó el parámetro de tiempo de incubación, por último fue escalado a un fotobioreactor utilizando un volumen de trabajo de

200 mL, empleando el mismo medio de cultivo con el fin de analizar las variables estudiadas se empleó un diseño de experimentos de superficie compuesto, central, no factorial en el software STATISTICA 7.0, a partir del cual se obtuvo una ecuación lineal que permitió determinar el tiempo de incubación y fotoperiodo óptimo para una mayor producción de microalgas y como resultados se determinó que en la microalga *Scenedesmus sp.* los dos factores influyen en la producción de carotenoides; para *Chlorella sp.* no influye el tiempo de incubación y el fotoperiodo es fundamental en la producción de estos metabolitos.

Palabras clave: Carotenoides, *Chlorella sp.*, Fotoperiodo tiempo de incubación, Microalgas, *Scenedesmus sp.*

1. Introducción

Las micro-algas son microorganismos con una amplia gama de aplicaciones y esto se debe principalmente a su capacidad fotosintética, en la cual convierte el dióxido de carbono (CO₂) en compuesto bioactivos como pigmentos, lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos, proteínas y vitaminas ⁽¹⁾. Los metabolitos que las microalgas producen han recibido considerable atención, propio a sus aplicaciones biotecnológicas y a sus posibles usos benéficos en la salud humana, procesamiento de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, presentando una alta demanda en el mercado ⁽²⁾.

Por esta razón, las micro-algas están ganando interés conforme a su amplio espectro de productos útiles, dentro de ellos destacan los carotenoides, sus aplicaciones prácticas se pueden encontrar en la industria alimentaria como tinte natural en una variedad de productos para realzar su color (por ejemplo, jugos, yogures y confitería), también se emplean en la dieta de animales (por ejemplo, en aves los carotenoides contribuyen al color deseable de la yema de huevo y en los peces para promover el color rosado/rojo deseable de los crustáceos, salmónidos, entre otros), además de proporcionar color y nutrición son antioxidantes y esta propiedad los convierte en agentes de conservación para ralentizar el proceso de oxidación; en la industria cosmética se utiliza como principio activo en cremas y lociones, gracias a sus propiedades antioxidantes y a su valor nutricional para la piel y el cabello; por último, en la industria nutracéutica, puesto

que los carotenoides tienen una alta demanda como suplemento dietético ⁽³⁾. Sin embargo, la producción de carotenoides de micro-algas aún no es lo suficientemente rentable tanto para competir con los métodos sintéticos y químicos tradicionales, y otras tecnologías dentro de ellas la extracción de estos partiendo de plantas; no obstante, las microalgas combinan sus características típicas de plantas superiores, dando en evidencia su rápido crecimiento en cultivo líquido y la capacidad de acumular algunos metabolitos, es decir, estos microorganismos incorporan un atractivo en la obtención de altos componentes bioquímicos con potencial en diferentes industrias ⁽⁴⁾.

La aplicación comercial de microalgas es un tema que se ha evaluado a lo largo del tiempo, siendo *chlorella* y *Arthrospira (Spirulina)* la primera microalga y cianobacteria cultivada a gran escala con fines de suplemento alimenticio, hoy en día, un gran grupo de microalgas han sido estudiadas, generando desde entonces una infinidad de bioproductos y aplicaciones, entre ellas se encuentra *Dunaliella salina* como fuente de carotenoide (β -caroteno) usado como pigmento, pro-vitamina A y antioxidante; *Scenedesmus sp.*, en la producción de luteína, usada también como antioxidante y en la salud ocular; *Chlorella sp.*, para la obtención de Cantaxantina usado como pigmento en la industria de alimentos, acuicultura, avicultura y cosméticos ⁽⁵⁾.

Por lo anterior mencionado, las microalgas son consideradas fábricas de células ideales para la producción de carotenoides de alto valor, ya que

combinan el rápido crecimiento de organismos unicelulares con un metabolismo activo y una capacidad de almacenamiento ⁽⁶⁾. Por ende, los estudios a escala de laboratorio son esenciales ya permiten detectar e identificar las condiciones óptimas para el crecimiento y formación de compuestos con posible aplicación comercial ⁽⁵⁾. Actualmente, la mayor parte de los carotenoides se producen mediante métodos sintéticos, en especial el betacaroteno (molécula de 40 átomos de carbono, carotenoide tipo C40) y los métodos para su producción consisten en unir dos o tres moléculas más pequeñas para formar una cadena C40 y el betacaroteno sintético; no obstante, no es la única forma de producirlo, existen fuentes naturales como las microalgas, por ejemplo *Dunaliella salina* una de las mejores especies productoras de este metabolito ⁽⁷⁾.

Por consiguiente, es necesario realizar investigaciones de diversas microalgas productoras de metabolitos de interés industrial con el fin de estudiar que parámetros influyen en la obtención de estos, es por eso que este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del escalado del cultivo de *Scenedesmus sp.*, y *Chlorella sp.*, en la producción de carotenoides de interés industrial desde el mantenimiento de las cepas mediante la incorporación de stress por radiación lumínica y el comportamiento de la carotenogénesis en el tiempo.

2. Metodología

2.1. Microalga Estudiada

Chlorella sp., y *Scenedesmus sp.*, se obtuvieron de muestreos a termales localizados en el departamento de Norte de Santander. Las cepas se mantienen en caja Petri en medio de cultivo sólido BOLD ⁽⁸⁾ bajo un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y 27°C. Una vez cada 25 días se

reinoculan las cepas en cajas de Petri con medio fresco.

2.2. Evaluación del tiempo de inoculación y stress por radiación lumínica

Para determinar el posible efecto del tiempo de inoculación y stress por radiación lumínica se realizó un escalamiento desde cajas de Petri hasta reactores de 500 mL con 200 mL de volumen de trabajo con 3 fotoperiodos, 3 tiempos de cultivo y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se evaluó el efecto de 3 fotoperiodos y tiempo de incubación mediante la aplicación de un diseño de experimentos (2³) en el programa STATISTICA 7.0 ⁽⁹⁾. Las variables del diseño se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables del diseño de experimentos

Niveles	Fotoperiodo	Tiempo de incubación (días)
-1	12:12	5
0	16:8	10
1	24:0	15

Inicialmente, las cajas de Petri se incubaron durante 14 días bajo los 3 fotoperiodos. Una vez finalizado el tiempo se inocularon en dos tubos FALCON® de 15 mL con 10 mL de medio BOLD estéril. Los tubos se sometieron al diseño de la Tabla 2. Una vez finalizado el tiempo de incubación el volumen de los tubos se transfirió a reactores de 500 mL con 200 mL de medio fresco estéril.

Cada uno de los reactores se acopló a un sistema de inyección de aire (0,6 vvm) y se mantuvo en el fotoperiodo del diseño de experimentos durante 30 días, completando el medio de cultivo con agua estéril hasta el volumen de trabajo.

2.3. Diseño de experimentos

Teniendo en cuenta la Tabla 1 variables del diseño de experimentos, se utilizó el software STATISTICA 7.0 y se realizó el diseño de experimentos el cual se observa en la Tabla 2 y a partir de estos se llevaron a cabo los 10 experimentos que el diseño propone.

Tabla 2. Diseño de experimentos

	Block	Fotoperiodo	Tiempo
10 (C)	2	16.0	10.0
1	1	12.0	5.0
5 (C)	1	16.0	10.0
7	2	24.5	10.0
2	1	12.0	15.0
4	1	24.0	15.0
3	1	24.0	5.0
9	2	16.0	17.1
6	2	7.5	10.0
8	2	16.0	2.9

2.4. Cuantificación de biomasa (peso seco) ⁽¹⁰⁾

Al finalizar el tiempo de cultivo se tomaron 20 mL de medio de cultivo, los cuales se filtraron utilizando filtros Whatman GF/C pre-combustionados durante 1 hora a 100°C. Una vez terminado el proceso los filtros se llevaron a horno durante 1 hora a 100°C seguido por 12 horas en desecador hasta que alcanzó un peso constante.

2.5. Cuantificación de carotenoides

Al final del tiempo de cultivo se centrifugaron las muestras a 3400 RPM durante 20 minutos. Para facilitar la extracción se adicionaron 2 gramos de perlas de vidrio (diámetro 0,5 mm) en cada tubo con 0.6 mL de buffer fosfato (8mM Na₂HPO₄,

2mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH 7.4), la muestra se homogenizó en vortex durante 4 minutos; para separar los carotenoides extraídos, se adicionó 3 mL de cloroformo y se centrifugó a 3400 RPM durante 8 minutos. El proceso se repitió hasta que las células queden sin color. Finalmente, la concentración de carotenos se obtuvo empleando la ecuación descrita por ⁽¹¹⁾:

$$\text{Carotenos}_{\text{mg/L}} = A_{464} - 0.0222 / 0.0325$$

2.6. Optimización de la producción de carotenoides vía stress

Una vez obtenidas las mejores condiciones de stress (tiempo y fotoperiodo) se corrieron los datos en el programa STATISTICA 7.0 y se consiguió una gráfica de superficie de respuesta y una gráfica de Pareto que permitió determinar (por medio de una ecuación) las mejores condiciones de stress.

3. Resultados y discusión

3.1. Cuantificación de carotenoides y biomasa

En la cuantificación de carotenoides se manejó la ecuación descrita por ⁽¹²⁾ y mediante el peso seco se determinó el porcentaje p/p (carotenoides/biomasa) para cada una de las microalgas evaluadas, una vez con este resultado se recurrió al software STATISTICA 7.0 en el cual se realizó el análisis del diseño y como resultado se adquirieron las gráficas de Pareto y Superficie de respuestas descritas en la Fig 1 y 2. A partir de esto se evidenció que las micro-algas *Scenedesmus sp.* & *Chlorella sp.*, no se comportaron igual y por consiguiente los factores de fotoperiodo y tiempo de incubación para *scenedesmus sp.*, influyen en la deposición de carotenoides pero en *Chlorella sp.*, solo interviene el fotoperiodo (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Cuantificación de carotenoides y biomasa de *Scenedesmus sp.*

	Biomasa g/L	Carotenoide mg/L	(carotenoides/ biomasa) % p/p
10(C)	1.435	21.08615	0.293883677
1	0.8075	30.57846	0.757361276
5(C)	1.435	21.08615	0.293883677
7	1.51	14.25538	0.188813041
2	1.155	61.74769	1.069224109
4	1.6	47.02462	0.587807692
3	1.2275	7.147692	0.116459345
9	1.2725	85.67077	1.346495391
6	0.6025	40.27077	1.33678902
8	1.285	31.94769	0.497240347

Tabla 4. Cuantificación de carotenoides y biomasa de *Chlorella sp.*

	Biomasa g/L	Carotenoide mg/L	(carotenoides/ biomasa) % p/p
10(C)	1.6425	20.7169231	0.25226086
1	0.79	21.3015385	0.53927945
5(C)	1.6425	20.7169231	0.25226086
7	1.4625	23.8092308	0.32559632
2	1.0725	35.3476923	0.65916443
4	2.02	64.9169231	0.64274181
3	0.96	10.8861538	0.22679487
9	1.1425	59.1938462	1.03621613
6	0.4575	67.7169231	2.96030265
8	1.0925	27.5476923	0.50430558

Teniendo en cuenta que los factores evaluados (tiempo de incubación y fotoperiodo) influyen en la producción de carotenoides de *Scenedesmus sp.*, el experimento 9 fue el que obtuvo mayor porcentaje peso/peso de 1.346% p/p, seguido del experimento 6 y 2 (1.337% p/p y 1.069% p/p) y revisando el diseño se tiene que las condiciones de dichos experimentos son fotoperiodo de 16, 7.5 y 12 horas luz y tiempo de incubación de 17, 10 y 15 días, a partir de esto se determinó que en *Scenedesmus sp.*, estos dos factores tienen relación en la deposición de carotenoides debido a que a mayor ciclo luz (excepto en 24 horas luz) se requiere un tiempo de incubación mayor; de este modo se puede afirmar que a mayor ciclo luz: oscuridad (24:0) y menor tiempo de incubación se

produce menor cantidad de carotenoides y mayor cantidad de biomasa en comparación con la cantidad de biomasa que se genera en los experimentos 6 tanto para *Scenedesmus sp.*, como para *Chlorella sp.*; ahora al observar los resultados de *Chlorella sp.*, de la cual mediante el diagrama de Pareto se dedujo que solo el fotoperiodo influye en la producción de carotenoides, se reporta que a menor cantidad de luz, es decir, a un ciclo luz: oscuridad de 7.5 : 16.5 se obtiene la mayor producción con 2.960% p/p en el experimento 6, además se reportó que a las condiciones del experimento 9 se obtiene 1.036% p/p, el cual también es considerable (Figura 1).

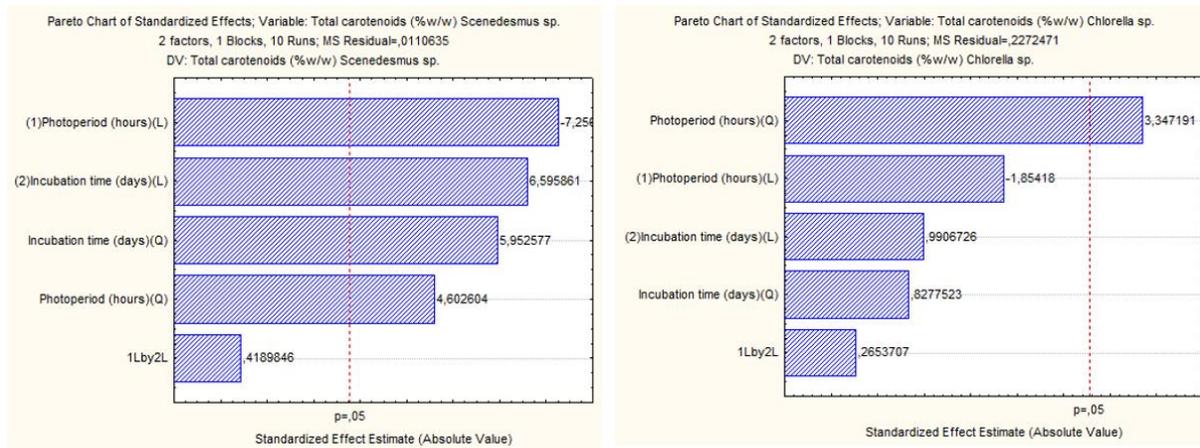


Figura 1. Diagrama de Pareto obtenido con base en el impacto de stress por radiación lumínica y efecto del tiempo en la deposición de carotenoides en (a) *Scenedesmus sp.* (b) *Chlorella sp.*

La superficie de respuestas permitió determinar los mejores resultados del diseño, esta es una gráfica en tres dimensiones de las cuales el eje Y representa el tiempo de incubación, el eje X el fotoperiodo y el eje Z el porcentaje peso/peso (Carotenoides/Biomasa), de la cual se observó que los mejores resultados se obtuvieron a un fotoperiodo de 7,5 horas luz y un tiempo de incubación de 10 días, del cual este último solo influye en la deposición de carotenoides de *Scenedesmus sp.*

Del mismo modo se utilizó la gráfica de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas para cada una de las microalgas estudiadas, mediante una ecuación lineal (Ec. 1) que genera el programa:

Para *Scenedesmus sp.*:

$$z = 3.67478292106 - 0.26158930474232x + 0.0057641925918843x^2 - 0.19367373537405y + 0.011556846197674y^2 + 0.00071491142834893xy \quad (\text{Ec.1})$$

X	4	12
Y	25	25
Z	5,173	3,9614

Al remplazar en la ecuación se determinan dos posibles óptimos para la deposición de carotenoides de *Scenedesmus sp.*, el primero es bajo condiciones de fotoperiodo de 4 horas luz y tiempo de incubación de 25 días, el segundo bajo condiciones de 12 horas luz y con el mismo tiempo de incubación (Ec. 2).

Para *Chlorella sp.*:

$$z = 7,8256349990076 - 0.75885514368507x + 0.018998468973176x^2 - 0.14834685694842y + 0.0072834624623272y^2 + 0.0020521557694966xy \quad (\text{Ec. 2})$$

X	13	8	7	6	5
Y					
Z	1,171	2,971	3,444	3,956	4,506

En *Chlorella sp.*, el tiempo de incubación no influye (Figura 2) en la producción de carotenoides lo cual muestra que para optimizar las condiciones del mismo se puede inocular directamente el reactor desde caja o manejar tiempos de incubación cortos, con el fin de que las

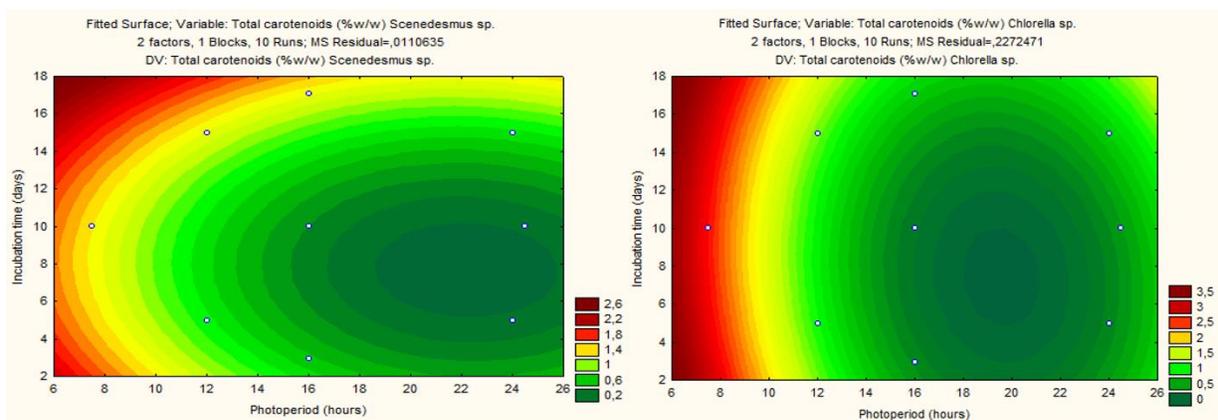


Figura 2. Superficie de respuestas sobre el impacto de stress por radiación lumínica y efecto del tiempo en la producción de carotenoides en (a) *Scenedesmus sp.* (b) *Chlorella sp.*

células se adapten al medio líquido y este se use como pre-inóculo del bioreactor, por tanto el óptimo del diseño da a conocer que hay mayor deposición de carotenoides bajo fotoperiodos cortos de luz, y desde parámetros de luz de 13 horas la producción de carotenoides es viable, pero por consiguiente aumenta a medida que disminuye el ciclo luz: oscuridad, es decir, entre menos cantidad de luz se exponga esta micro-alga mayor va hacer la producción de carotenoides, y un posible optimo seria bajo fotoperiodo 5:19 (luz : oscuridad).

Según ⁽¹³⁾, la luz es uno de los factores más importantes para el crecimiento y rendimiento del producto de las células fotosintéticas, es por eso que el ciclo luz: oscuridad es un factor crítico en el crecimiento de las mismas, además informan que a intensidades de luz moderada en un cultivo de *chlorella vulgaris*, *chlorella pyrenoidosa* y *alphaphys* la tasa de crecimiento aumentó a medida que aumentaba la duración de la luz. Entonces se podría afirmar que se obtiene mayor cantidad de biomasa a condiciones de luz más largas con base en los resultados obtenidos de biomasa en g/L en los fotoperiodos de 24:0 y 16:8 para las dos microalgas estudiadas; por otra parte, la producción de carotenoides se ve influenciada por los fotoperiodos más cortos como es el de 7.5:16.5 y 12:12, siendo el ciclo luz de 7,5 horas el que dió mayor rendimiento.

Adicional a lo anterior, los carotenoides sirven como pigmentos accesorios en el proceso de recolección de luz y como prevención de los pigmentos contra el daño fotooxidativo. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de la luz sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides ⁽¹⁴⁾. Los resultados de Bohne y Linden ⁽¹⁴⁾ sugieren que la acumulación de carotenoides parece depender multifactorialmente de la expresión de los genes correspondientes, la biosíntesis de clorofilas, el desarrollo del aparato fotosintético, la destrucción de pigmentos por fotooxidación y La longitud de onda y la intensidad de la luz. Sin embargo, también se informa que una mayor intensidad de luz y una duración respectivamente pueden conducir a un menor contenido de carotenoides asociado con un menor contenido de clorofila ⁽¹⁵⁾.

4. Conclusión

Mediante el diseño compuesto central no factorial se logró determinar la importancia de los dos factores evaluados en la deposición de carotenoides, evidenciando que un fotoperiodo más bajo aumenta el rendimiento en la producción de los mismos para las dos microalgas estudiadas; así mismo, se evidenció que la microalga *Chlorella sp.* se puede cultivar bajo periodos de luz cortos desde el cultivo en caja Petri y mediante esto se obtiene mayor rendimiento y menos costos adicionales por iluminación artificial, para el

escalado este pasaría por un tiempo de incubación corto, debido a que el tiempo de incubación es un factor que no influye en la producción de carotenoides, pero si se debe considerar para que no afecte la velocidad de crecimiento de la micro-alga; por otro lado, la micro-alga *Scenedesmus sp.*, muestra una relación entre el tiempo de incubación y el fotoperiodo, considerando unas condiciones óptimas de 4 horas luz y un tiempo de incubación de 25 días y un proceso de escalado desde caja Petri, inoculo en medio líquido y posteriormente crecimiento en reactor, con el fin de mejorar el rendimiento en la producción de carotenoides.

5. Referencias

- (1) Cezare-Gomes EA, Mejia-da-Silva L del C, Pérez-Mora LS, Matsudo MC, Ferreira-Camargo LS, Singh AK, et al. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;188:602–634. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-02945-4>.
- (2) Torregrosa-Crespo J, Montero, Z., Fuentes J, Reig García-Galbis M, Garbayo I, Vílchez C, Martínez-Espinosa R. Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganism. *Mar Drugs.* 2018;16(6):203. <https://doi.org/10.3390/md16060203>.
- (3) Novovesk L, Ross M, Stanley M, Pradelles R, Wasiolek V, Sassi J. Microalgal Carotenoids : A Review of Production , Current Markets , Regulations , and Future Direction. *Mar Drugs.* 2019;17(11):640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>.
- (4) Gong M, Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol Adv.* 2016;34(8):1396–412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.
- (5) Borowitzka M. Commercial-Scale Production of Microalgae for Bioproducts. In: La Barre S, Bates S, editors. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules.* rev. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2018. p. 51–2.
- (6) Alvensleben N, Heimann K. The Potential of Microalgae for Biotechnology: A Focus on Carotenoids. In: La Barre S, Bates S, editors. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules.* rev. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2018. p. 131–2.
- (7) Pourkarimi S, Hallajisani, A Alizadehdakhel A, Nouralishahi A. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;29:101771. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>.
- (8) Andersen R, Berges J, Harrison P, Watanabe M. Appendix A—Recipes for Freshwater and Seawater Media. In: Andersen R, editor. *Algal Culturing Techniques.* Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2005. p. 429–538.
- (9) Statsoft I. STATISTICA (data analysis software system) [Internet]. 2004. Available from: <https://www.statsoft.de/en/statistica/statistica-software>.
- (10) Moheimani N, Borowitzka M, Isdepsky A, Fon-Sing S. Standard methods for

- measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka M, Moheimani N, editors. Algae for biofuels and energy. Springer, Dordrecht; 2013. p. 265–284.
- (11) Příbyla P, Cepáka V, Kaštánek P, Zachleder V. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. *Algal Res.* 2015;11:22–7. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020>
- (12) Příbyla P, Pilnýb J, Cepáka V, Kaštánek P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Res.* 2016;16:69–75. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.028>.
- (13) Wang S, Stiles AR, Guo C, Liu C. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Eng Life Sci.* 2014;14:550–9. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300170>.
- (14) Bohne F, Linden H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1579(1):26–34. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00500-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00500-6).
- (15) Scharff C, Domurath N, Wensch-Dorendorf M, Schröder F. Effect of different photoperiods on the biochemical profile of the green algae *C. vulgaris* and *S. obliquus*. In: *ISHS Acta Horticulturae 1170: International Symposium on New Technologies and Management for Greenhouses - GreenSys2015.* 2017. p. 1149–56. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.148>.