

Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptothecodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno

Por H. Mendoza*, C. Molina Cedres, A. de la Jara,
L. Nordström, K. Freijanes y L. Carmona

Instituto Tecnológico de Canarias. Playa de Pozo Izquierdo, s/n 35119,
Pozo Izquierdo, Santa Lucía de Tirajana, Las Palmas, España.
Correo electrónico: hmendoza@itccanarias.org

RESUMEN

Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptothecodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno.

Cryptothecodinium cohnii, es un dinoflagelado marino heterotrófico estricto, que puede alcanzar contenidos en lípidos superiores al 40% de su peso seco, representando el DHA más del 40% del conjunto total de ácidos grasos. El objetivo del presente trabajo fue el de establecer el perfil de variación de los ácidos grasos en condiciones de óptima disponibilidad de nutrientes y de supresión de nitrógeno. Los resultados muestran que en condiciones de supresión de nitrógeno las células dejan de dividirse y empiezan a acumular lípidos, especialmente ácido docosahexaenoico (DHA). La disponibilidad de oxígeno en el medio también favorece este proceso. En los cultivos sin nitrógeno y con disponibilidad de oxígeno se alcanzó un contenido celular de ácidos grasos 3,18 veces superior al alcanzado en la condición control (con nitrógeno y aire) y 2,25 al observado en los cultivos sin nitrógeno no burbujeados. *Cryptothecodinium cohnii* puede constituir una óptima fuente de DHA para la elaboración de fitodietas en acuicultura.

PALABRAS – CLAVE: Ácidos grasos – *Cryptothecodinium cohnii* – Cultivo heterotrófico – DHA.

SUMMARY

Quantitative and qualitative variation of the fatty acid composition in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* under nitrogen starvation conditions.

Cryptothecodinium cohnii is a heterotrophic dinoflagellate that can achieve a lipid content greater than 20% on dry weight. DHA can represent up to 40% of the total fatty acids. Our objective was to investigate the variation in fatty acid content when growth conditions are optimal compared with when there is limited growth, due to the absence of nitrogen in the media. Nitrogen-limited growth conditions caused the cells to stop dividing and accumulate lipids, principally as docohexanoic acid (DHA). Oxygen availability in the culture favoured DHA accumulation. In the cultures without nitrogen and with oxygen availability there was a lipid cell content 3,18 times higher than in the control condition (with nitrogen and air), and 2,25 higher than those without nitrogen and air. *C. cohnii* can be used as an optimal DHA source for the production of phytodiets in aquaculture.

KEY – WORDS: *Cryptothecodinium cohnii* – DHA – Fatty acids – Heterotrophic culture

1. INTRODUCCIÓN

La producción de microalgas en cultivos intensivos constituye una de las claves en la sostenibilidad y en la rentabilidad de las explotaciones en acuicultura. La producción de especies acuícolas directamente dependientes del aporte de microalgas, en al menos alguna de sus fases de crecimiento y desarrollo, representa más del 20 % de la producción mundial (Muller-Feuga, 2000). Especial interés merece la producción de microalgas como fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, concretamente el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA), los cuales, junto con el ácido araquidónico (AA), constituyen los 3 ácidos grasos esenciales para el crecimiento y normal desarrollo de las fases larvianas de algunas de las especies de mayor interés en acuicultura (Sargent *et al.*, 1999; Harel *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998).

Además de su uso acuícola, las microalgas son consideradas como una alternativa a las fuentes tradicionales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, los aceites de pescado (Hinzpeter *et al.*, 2006), con importantes aplicaciones en nutrición humana (Pulz y Gross, 2004). Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados hasta la presente fecha, la producción masiva de microalgas se ha visto limitada por diversos problemas, como la inestabilidad y la baja productividad de los cultivos, o el elevado coste de los sistemas de producción y procesado de la biomasa (Radner y Parker, 1994; Molina Grima *et al.*, 2003).

En la actualidad se intenta desarrollar cultivos de microalgas de alta eficiencia en condiciones de crecimiento heterotrófico o mixotrófico en fermentadores industriales que, frente a los tradicionales sistemas de cultivo, permitan aumentar de forma sustancial la productividad y la calidad de la biomasa. Estos sistemas de producción no se ven sometidos al coste derivado de la elevada relación superficie/volumen propia de los cultivos de las especies fotoautotróficas estrictas (Richmon, 2000). No obstante, son pocas las microalgas plenamente adaptadas a estas condiciones, entre ellas destaca *Cryptothecodinium cohnii*, un dinoflagelado marino heterotrófico con elevados contenidos

en DHA, entre el 30 y 50 % del total de ácidos grasos (Henderson *et al.*, 1988), que, además, presenta un perfil de ácidos grasos menos complejo que el de otras microalgas (Swaaf *et al.*, 1999), lo que simplifica y reduce los costes de purificación de DHA, convirtiéndola en una especie de gran interés productivo.

Cryptocodinium cohnii es hoy día la base de una industria biotecnológica en expansión, la producción de DHA para consumo humano (Barclay *et al.*, 1994). Sin embargo, aún siguen siendo escasos los estudios sobre las condiciones de producción de esta microalga. Hasta los años 90 del pasado siglo gran parte de las referencias científicas sobre el cultivo de *Cryptocodinium cohnii* y la producción de ácidos grasos a partir de esta microalga eran patentes. Son escasos los trabajos en los que se evalúan en esta especie la utilización de técnicas tradicionales de producción de ácidos grasos a partir de microorganismos, como los cultivos en doble fase. Estos sistemas se caracterizan por alternar una primera fase de cultivo en condiciones de óptima disponibilidad de nutrientes, en la que se intenta alcanzar una elevada producción de biomasa, y una segunda en la que se induce la acumulación de ácidos grasos en condiciones de crecimiento limitado, generalmente por medio de la supresión de algún nutriente, fundamentalmente nitrógeno (Swaaf, 2003).

En el presente trabajo se ha evaluado el efecto de la supresión de nitrógeno en el medio sobre la composición de ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii*, así como sobre la productividad de DHA en los cultivos de esta especie y la posible utilización de sistemas de cultivos en doble fase.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Tratamientos y condiciones de cultivo

Cryptocodinium cohnii (Seligo) (CCMP 316), fue cultivado en medio f/2 +NMP sobre agua de mar artificial ASPM (Guillard *et al.*, 1975) con 5 g de glucosa por litro, en erlenmeyers de 500 ml a 20 ± 2 °C. Como fuente de nitrógeno orgánico el medio contenía extracto de levadura, peptona y triptona, alcanzándose una relación de carbono orgánico/nitrógeno de 9,14. Junto a las fuentes orgánicas de nutrientes el medio también estaba compuesto por macronutrientes inorgánicos, NaNO_3 y NaH_2PO_4 , a una concentración de 0,75 mM y 0,036 mM respectivamente.

Para el desarrollo del experimento se definieron 4 condiciones experimentales de cada una de las cuales se mantuvieron 3 replicados: Cultivos con disponibilidad de nitrógeno (medio f/2 + NMP) y aire (condición control), con nitrógeno y sin aire (en agitadores orbitales) (+N-A), sin nitrógeno y con aire (-N+A) y sin nitrógeno y sin aire (-N-A). En los cultivos burbujeados se mantuvo en todo momento una concentración de O_2 en el medio superior al 50 %.

La supresión de nitrógeno se realizó por medio de lavados sucesivos por centrifugación con medio ASPM de los cultivos en fase exponencial de crecimiento.

2.2. Determinaciones analíticas

Diariamente se controló la variación de densidad celular mediante el recuento directo en cámara Thoma.

El cosechado de los cultivos en las diferentes condiciones experimentales se efectuó por medio de centrifugación (5 minutos, 2500 g), al inicio de la fase estacionaria de crecimiento celular en los cultivos con nitrógeno y a las 120 horas en los cultivos sin nitrógeno. Previamente se había estudiado la variación en el tiempo de los contenidos celulares en lípidos en respuesta a la supresión de nitrógeno en el medio. Para ello se estimó la composición lipídica de *Cryptocodinium cohnii* (contenidos celulares en lípidos polares y neutros), a intervalos de 24 horas tras la supresión de nitrógeno, por medio de citometría de flujo sobre células marcadas con Rojo de Nilo según el procedimiento descrito por de la Jara *et al.* (2003).

Junto a la estimación citométrica, los contenidos en lípidos también fueron cuantificados gravimétricamente mediante el método modificado de Folch *et al.* (1957). La extracción de la fracción lipídica se efectuó sobre una muestra alícuota del concentrado celular (50-100 ml) con una mezcla metanol/cloroformo (1:2 v/v) y posterior centrifugación. Los restos no lipídicos del extracto fueron eliminados por medio de fraccionamiento por centrifugación con una solución de ClNa (0,9% v/v) en una relación 1:5 ml con la mezcla metanol/cloroformo. El extracto lipídico fue evaporado a 85 °C y posteriormente cuantificado gravimétricamente en una balanza de precisión COBOS A-230-CSI

El contenido y composición en ácidos grasos se determinó por medio de cromatografía de gases con un equipo Varian cp-38 equipado con un detector FID y según el método descrito por Petkov *et al.* (1994). Con anterioridad al análisis cromatográfico se efectuó la transesterificación de lípidos directamente sobre un alícuota de las muestras (50 – 100 ml) con una solución de metanol saturada con HCl a 80 °C durante 90 minutos. Los ácidos grasos fueron purificados por medio de cromatografía en capa fina. La identificación de los ácidos grasos, según los tiempos de retención, se realizó por medio de la comparación con los obtenidos con patrones estándar (Supelco FAME. Mix C4-C24). Para el análisis cuantitativo se utilizó un estándar interno añadido en la fase de transesterificación, ácido pentadecanoico (15:0).

Análisis estadístico

La significación estadística de las variaciones observadas en las diferentes condiciones experimentales fue establecida por medio del test no paramétrico de varianza de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS

La más elevada tasa de duplicación celular se alcanzó en los cultivos burbujeados, con una tasa de división celular 2 veces mayor a la observada en los cultivos no burbujeados, así como una densidad celular, a los 7 días de cultivo, 1,93 veces mayor (figura 1). La supresión de nitrógeno en el medio produjo el cese de la división celular, (figura 1) apreciándose una progresiva pérdida de la motilidad de las células y un significativo aumento del peso (tabla 1). En los cultivos sin nitrógeno el contenido celular en materia seca era más del doble del observado en la condición de control, sin que se llegara a apreciar diferencias significativas debidas al burbujeo de los cultivos.

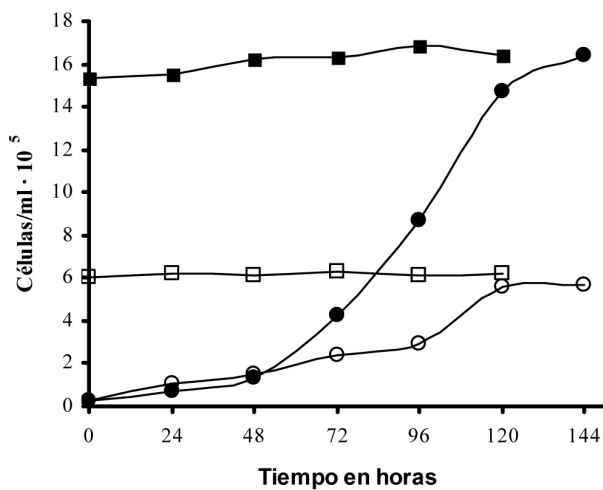


Figura 1

- Curvas de crecimiento de *Cryptocodinium cohnii* en las diferentes condiciones experimentales
- Condición control (cultivos burbujeados, con 0,75 mM de Na NO₃ y aporte de N orgánico)
 - Condición +N-A (cultivos sin burbujeo, con 0,75 mM de Na NO₃ y aporte de N orgánico)
 - Condición -N+A (cultivos burbujeados en los que se ha suprimido toda fuente de nitrógeno)
 - Condición -N-A (cultivos sin burbujeo en los que se ha suprimido toda fuente de nitrógeno)

Tras la supresión de nitrógeno se observó un aumento en los contenidos celulares de lípidos hasta alcanzar un contenido máximo a las 120 horas (figura 2), para a continuación mantenerse estable o disminuir ligeramente. Se produjo también una disminu-

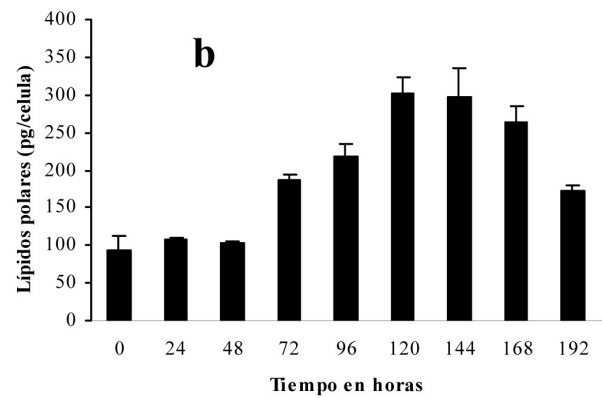
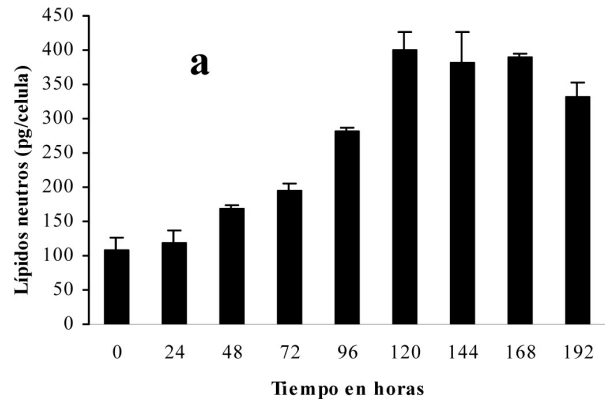


Figura 2

Variación, tras la supresión de nitrógeno en el medio, de los contenidos en celulares en lípidos neutros (a) y polares (b) estimados por citometría de flujo sobre células marcadas con Rojo de Nilo.

ción en el cociente polares/neutros tras la supresión de nitrógeno, pasando de un valor medio de 0,87 a 0,76, a las 120 horas, y a 0,52 cuando se alcanzaron las 192 horas tras la supresión de nitrógeno.

Los más elevados contenidos en ácidos grasos se alcanzaron en los cultivos sin nitrógeno, significativamente más altos a los observados en la condición control (tabla 1). La supresión de nitrógeno en el medio permitió alcanzar en los cultivos burbujeados los más elevados contenidos celulares en ácidos grasos, llegando a ser en la condición -N+A 3,18 veces mayor a los alcanzados en la condición control.

Tanto la supresión de nitrógeno en el medio como el burbujeo produjeron significativas modificaciones en el perfil de ácidos grasos (tabla 2). En ge-

Tabla 1
Variación de la composición de *Cryptocodinium cohnii* por efecto del burbujeo y la supresión del nitrógeno en el medio

Condiciones	Peso seco (pg/célula)	Ac. Grasos (pg/célula)	DHA (pg/célula)
Control	617,73 ± 40,97 ¹	174,72 ± 31,19	69,43 ± 17,97
-N+A	1350,91 ± 230,21	555,84 ± 115,17	141,72 ± 28,60
+N-A	744,18 ± 58,43	133,54 ± 18,77	24,25 ± 5,40
-N-A	1588,58 ± 45,73	247,17 ± 54,15	61,03 ± 33,75

¹ media ± desviación estándar (n = 3). Para abreviaturas, ver pie de figura 1.

neral se apreció un marcado aumento del contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los cultivos en los que se había suprimido el nitrógeno y en los cultivos no burbujeados, este incremento era especialmente marcado en estos últimos, no apreciándose diferencias significativas entre los cultivos no burbujeados determinadas por la disponibilidad de nitrógeno en el medio (condiciones +N-A y -N-A). El incremento en la concentración de ácidos grasos saturados se produjo fundamentalmente por el aumento en los contenidos de 12:0, 14:0 y 16:0.

La no disponibilidad de nitrógeno en el medio produjo una disminución en el porcentaje de DHA en el perfil de ácidos grasos (-N+A y -N-A), esta disminución en los contenidos de DHA respecto a la condición control también se apreció en la condición +N-A. Además, en las condiciones -N+A y -N-A se observó una significativa disminución en los contenidos de 18:3 ω 3 respecto al control.

Los más elevados porcentajes de DHA por peso seco se observaron en los cultivos burbujeados (control y -N+A), con un 11,23 % y un 10,49% respectivamente, alcanzándose los más altos contenidos absolutos en la condición -N+A, con un contenido celular 2,04 veces mayor al observado en la condición control (tabla 2).

Los más elevados niveles de productividad correspondieron a cultivos burbujeados, siendo en la

condición -N+A en la que se alcanzó el más alto nivel de producción de ácidos grasos (tabla 3).

4. DISCUSIÓN

La disponibilidad de oxígeno resultó determinante en la productividad de los cultivos de *Cryptocodinium cohnii*, al condicionar tanto la tasa de división celular como la composición en ácidos grasos. En trabajos anteriores ya se había relacionado una alta disponibilidad de O₂ en los cultivos con un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados y lípidos polares (Beach y Holtz, 1973), aunque también se había vinculado con un menor porcentaje de ácidos grasos en peso seco. Por el contrario, en el presente experimento se observaron los mayores contenidos de ácidos grasos en peso seco en las condiciones con una alta disponibilidad de O₂.

En general, en la mayoría de las especies de microalgas el contenido celular en ácidos grasos aumenta en condiciones de crecimiento limitado (Roessler, 1990; Reitan *et al*, 1994), especialmente de ácidos grasos de reserva, saturados y monoinsaturados.

La variación del tamaño y peso celular en las condiciones de supresión de nitrógeno indica una clara alteración metabólica, primando la acumulación de sustancias de reserva (lípidos e hidratos de

Tabla 2
Composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* (%) en diferentes condiciones de cultivo

Ac. grasos	Control	-N+A	+N-A	-N-A
C:10:0				2,63 (0,30)*
C:12:0		6,6 (2,11)*	9,49 (3,21)*	10,44 (4,01)*
C:14:0	10,27 (0,55) ¹	24,06 (6,00)*	21,36 (5,97)*	21,18 (3,76)*
C:16:0	15,14 (2,78)	22,25 (3,45)*	11,63 (3,63)	15,28 (2,07)
C:18:0	11,81 (0,64)	6,07(2,51)*	11,22 (3,02)	10,03 (4,00)
C:18:1	5,87 (0,68)	9,56 (3,33)	7,01 (2,45)	6,82 (1,35)
C:18:3W3	8,87 (2,61)	5,96 (2,41)*	10,69 (2,43)	3,41 (0,05)*
C:20:0	8,28 (2,57)		10,44 (3,00)	5,51 (2,10)
C:22:0	39,73 (9,05)	25,50 (3,00)*	18,16 (6,19)*	24,69 (5,68)*
pg/célula	174,72 (36,79)	555,84 (50,56)*	133,54 (18,74)	247,17 (43,89)*
Sat.+monoinsat.	51,37	68,54	71,16	71,9
Polinsaturados	48,6	31,46	28,84	28,1

¹ media (desviación estándar) n = 3; *diferencias significativas (P < 0.05) respecto al control. Para abreviaturas, ver pie de figura 1.

Tabla 3
Productividad media de *Cryptocodinium cohnii* en diferentes condiciones de cultivo.

Productividad (g/L por día)	Productividad (g/L por día)			
	Control	-N+A	+N-A	-N-A
Peso seco	0,205	0,200	0,154	0,142
Ac. Grasos	0,058	0,082	0,028	0,022
DHA	0,023	0,021	0,005	0,005

carbono) en detrimento de la división celular. El aumento del tamaño y peso celular en los cultivos limitados por nitrógeno fue similar en los cultivos burbujeados y en los no burbujeados. Sin embargo, en los cultivos con una alta disponibilidad de O₂ este incremento se produjo a expensas de un fuerte aumento en los contenidos de ácidos grasos, que alcanzaron una concentración en peso seco del 41,14%, 1,45 veces mayor a la concentración alcanzada en la condición control y 2,64 en los cultivos sin nitrógeno no burbujeados, lo que indicaría una diferente deposición en sustancias de reserva (lípidos o glúcidos) en función de la disponibilidad de O₂.

La pérdida de motilidad celular en los cultivos sin nitrógeno favorece la acumulación de ácidos grasos. Estos juegan un decisivo papel en la sostenibilidad de la motilidad al constituir una importante fuente de energía (Reed *et al.*, 1999). La selección de cepas de *Crypthecodinium cohnii* con una baja motilidad puede constituir una adecuada estrategia para la obtención de cultivos de esta especie con unos mayores niveles de producción de DHA. Por otra parte, una menor motilidad celular puede mejorar la aplicabilidad de esta especie en la elaboración de fitodietas vivas de uso en acuicultura.

Si bien ha sido tradicional la producción de ácidos grasos a partir del cultivo en doble fase de microorganismos heterotróficos (Kessell, 1969; Rattledge y Evans, 1989), son escasos los trabajos desarrollados en esta línea con *Crypthecodinium cohnii*.

La mayoría de trabajos anteriores parecen indicar una mayor productividad y rentabilidad de los cultivos en continuo en una sola fase (Swaaf, 2003). Los resultados del presente experimento indican la viabilidad de las técnicas de producción en doble fase en cultivos de *Crypthecodinium cohnii*, alcanzándose niveles de producción similares a los obtenidos en los cultivos en continuo, tanto de biomasa como de DHA. Los datos de productividad observados en el presente trabajo son menores a los descritos en estudios anteriores (Jiang *et al.*, 1999; Swaaf *et al.*, 1999), aunque gran parte de estos trabajos fueron realizados con concentraciones de glucosa muy superiores a las utilizadas en el presente estudio. Los niveles de producción están fuertemente determinados por la disponibilidad de carbono en los cultivos. Elevadas concentraciones de glucosa (40-70g/L) propician fuertes aumentos de los niveles de producción en los cultivos de *Crypthecodinium cohnii* (Jiang y Chen, 2000).

La acumulación de ácidos grasos fue máxima a las 120 horas de supresión de nitrógeno, siendo este el valor de referencia para la optimización de los sistemas de cultivo en doble fase, aunque no se pudo descartar variaciones en esta dinámica asociadas a la disponibilidad de nutrientes. Si bien se detecta una disminución en el cociente polares/neutros, la cual en *Crypthecodinium cohnii* se asocia a un menor contenido en DHA en el perfil de ácidos grasos (de la Jara *et al.*, 2003), esta disminución no afectó de forma sig-

nificativa a la productividad total, que resultó más elevada en los cultivos de doble fase.

Los presentes resultados demuestran la gran plasticidad de la composición en ácidos grasos de *Crypthecodinium cohnii*, así como la posibilidad de aplicar sistemas de producción de doble fase de cultivo para optimizar la producción de DHA por medio de la alteración de la relación carbono/nitrógeno en los medios. Esta, junto a una óptima disponibilidad de O₂ en los cultivos, se presenta como un factor determinante en la optimización productiva de los cultivos de *Crypthecodinium cohnii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Barclay WR, Meager KM y Abril JR. 1994. Heterotrophic production of long Chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.* **6**, 123-129.
- Beach DH y Holz GG. 1973. Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerol and phosphatidylcholine of heterotrophic, marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Biochimica et biophysica acta Amsterdam* **316** (1) 56-65.
- De la Jara A, Mendoza H, Martel A, Molina C, Nordström L, de la Rosa V y Díaz R. 2003. Flow cytometric determination of lipid content in marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.* **15**, 433-438.
- Folch S, Lee M y Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-504.
- Guillard RRL. 1975. Culture of phytoplankton of feeding marine invertebrates. Plenum Press, New York.
- Harel M, Koven W, Lein I, Yoav B, Behrens P, Stubblefield J, Zohar Y y Place A. 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichments materials for marine aquaculture using single cells heterotrophs. *Aquaculture* **213**, 347-362.
- Henderson RJ, Letfley JW y Sargent JR. 1988. Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Phytochemistry* **27** (6) 1679-1683.
- Hinzpeter I, Shene C y Massa L. 2006. Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas Aceites* **57** (3) 336-342.
- Jiang Y, Cheng F, Liang SZ. 1999. Producción potencial de docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Process Biochem.* **34**, 633-637.
- Jiang Y y Cheng F. 2000. Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Crypthecodinium cohnii*. *Process Biochem.* **35**, 1205-1209.
- Kessell RHJ. 1968. Fatty acids of *Rhodotorula gracilis*: fat production in submerged culture and particular affect of pH value. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 220-231.
- Molina Grima E, Belarbi EH, Fernández FGA, Robles Medina A y Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* **20**, 491-515.
- Muller-Feuga A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* **12**, 527-534.
- Petkov GD, Klyachko-Gurvich GL, Furnadzhieva ST, Prokina NA y Ramazanov ZM. 1990. Genotypic differences and phenotypic changes of lipid fatty acid compo-

- sition in strains of *Dunaliella salina*. *Soviet Planta Physiol.* **3**, 268-272.
- Pulz O y Cross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 635-648.
- Radmer RJ y Parker BC. 1994. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* **6**, 93-98.
- Ratledge C y Evans CT. 1989. Lipids and their metabolism. 2nd Ed., Academic Press. Londres.
- Reed D, Brzezinski MA, Coury DA, Graham WM y Petty RL. 1999. Neutral lipids in macroalgae spores and their role in swimming. *Marine Biology* **133**, 737-744.
- Reitan KI, Rainuzo JR y Olsen Y. 1994. Effect of nutrient limitation of fatty acid and lipid content of marine microalga. *J. Phycol.* **30**, 972-979.
- Richmon A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millenium: a personal view. *J. Appl. Phycol.* **12**, 441-451.
- Rodríguez C, Pérez JA, Badia P, Izquierdo MS, Fernández Palacios H y Hernández L. 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Spaurus aurata L.*) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture.* **169**, 9-23.
- Roessler PG. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* **26**, 393-399.
- Sargent J, Bell G, McEvoy L, Toucher D y Estévez A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**, 191-199.
- Swaaf ME. 2003. Docohexaenoic acid production by marine alga *Cryptocodinium cohnii*. University Press. Netherlands.
- Swaaf ME, de Rijk TC, Egingk G y Syjtsma L. 1999. Optimisation of docohexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J. Biotechnol.* **70**, 185-192.

Recibido: 23/07/07
Aceptado: 19/9/07