

Aplicación de un Modelo primario y determinación de condiciones óptimas en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y producción de astaxantina

Autoras:

Vivian Daniela Pineda Amaya
Madelene Daniela Quevedo Guerrero

Asesora:

Magister. Ana Graciela Lancheros Díaz

Grupo de investigación Bioprocesos y control
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C ,2021



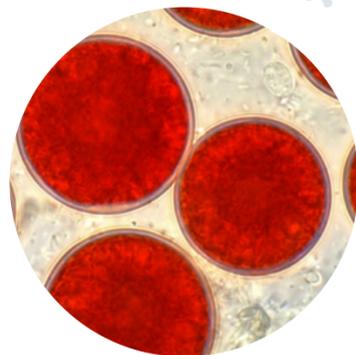
INTRODUCCIÓN

Haematococcus pluvialis

Microorganismo unicelular

Ciclo de vida sujeto a cambios frecuentes

Condiciones de estrés



Sectores productivos

La microbiología predictiva que intenta describir el comportamiento de un microorganismo

Modelo primario Gompertz

Comparación de los datos de cada uno de los trabajos

Incremento en la obtención de biomasa

OBJETIVOS

Aplicar el modelo primario Gompertz realizando un ajuste estadístico a la producción celular obtenida en los diferentes estudios con diversas condiciones de cultivo, con el fin de analizar e identificar los mejores parámetros para la obtención de astaxantina.

Objetivos específicos

1

Determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de astaxantina

2

Valorar el crecimiento, la acumulación y la concentración de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis*

3

Identificar las variables del modelo Gompertz con el fin de establecer parámetros, que definan la constante de la tasa de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* para lograr una mayor obtención de astaxantina.

4

Ajustar un modelo primario para evaluar el crecimiento y la reproducibilidad de la microalga *H. pluvialis* para la obtención de astaxantina.

ANTECEDENTES

Modelos matemáticos de crecimiento

2015

Sancho

Lactococcus lactis subsp. lactis y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

4 modelos primarios

Mejor ajuste a los datos de crecimiento
Modelo Gompertz con un R^2 muy cercano a 1

2015

Albornoz

E. coli

Los modelos Gompertz modificado
y Bifásico lineal,

Presentaron ajuste
 R^2 de 0.9973 y 0.9969

2015

Chicata

S.aureus y *E. coli*

Modelo primario de Gompertz

R^2 de 0.9767

2015

González

Chlorella spp.

Modelo corregido Gompertz

R^2 0.994

2019

Delgado et al

Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Logístico Integrado y Gompertz modificado
 R^2 superiores a 0.9

2020

Ortiz et al

Nostoc ellipsosporum

Baranyi-Roberts, Modified Gompertz,
Modified Logistic y Richards

Trabajos de investigación
Haematococcus pluvialis
 2015-2020 UCMC

2015

Niño et al

Medios de cultivo: RM, OHM, BBM.
 Crecimiento celular: $7,5 \times 10^5$ cel/mL
 [] astaxantina: 8.3 µg/m

Modelo: Baranyi and Roberts

2016

Ríos et al

Medios de cultivo: BBM.
 Crecimiento celular: 1.12×10^6 cel/mL
 [] astaxantina:
 0,102 - 3,058 ug/ml

No se aplicó modelo matemático

2018

García

Medios de cultivo: RM
 Crecimiento celular: $2,0 \times 10^4$ cel/mL
 [] astaxantina: 2,530 µg/mL

No se aplicó modelo matemático

2018

Leiton

Medios de cultivo: RM, BBM.
 Crecimiento celular: $1,25 \times 10^5$ cel/mL
 Velocidad de crecimiento: 0.040 cel/día.

Modelo: Baranyi and Roberts

2019

Manrique et al

Medios de cultivo: RM, BBM.
 Crecimiento celular: $2,88 \times 10^7$ cel/mL
 [] astaxantina : 3,1 µg/mL

Modelo: Logístico

2019

Ayala et al

Medio de cultivo: RM.
 Crecimiento celular: $3,19 \times 10^5$ cel/mL
 [] astaxantina: 1,1 µg/ml

No se aplicó modelo matemático

2019

Hernández

Medio de cultivo: OHM, KOBAYASHI.
 Crecimiento celular: $1,26 \times 10^6$ cel/mL

Modelo: Logístico

2020

Barreto et al

Medio de cultivo: RM.
 Producción celular: $8,62 \times 10^9$ cel/ml.
 [] astaxantina 2,524 ug/ml.
 Velocidad de crecimiento: 1,19 cel/día.

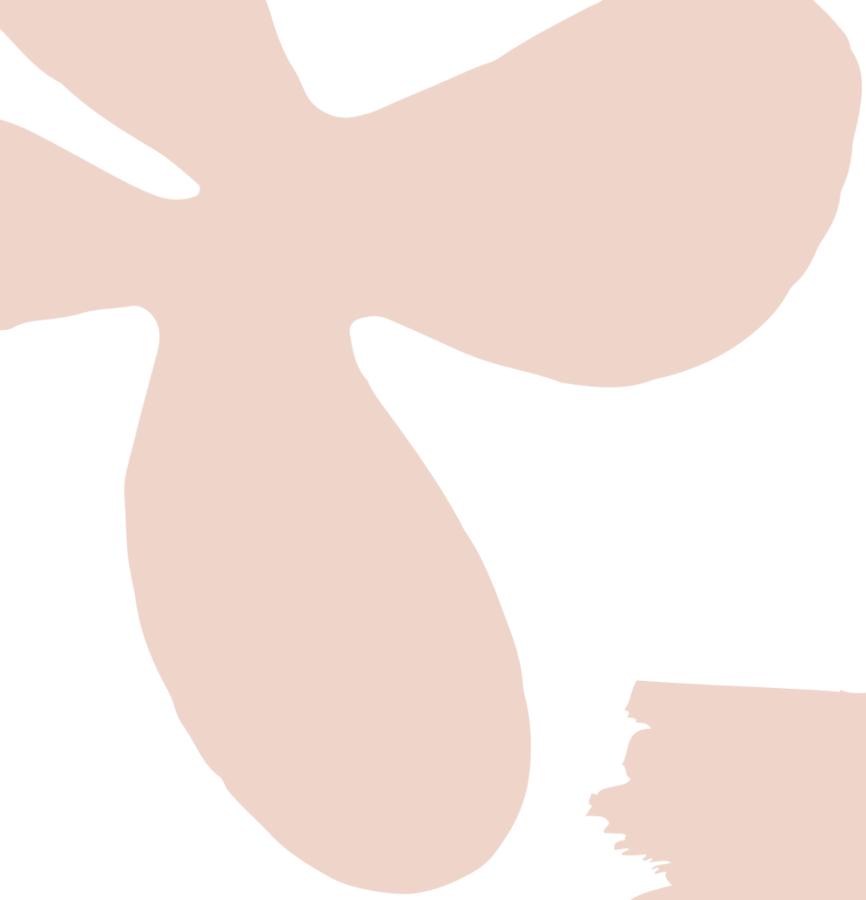
Modelo: Logístico

2020

Rodriguez

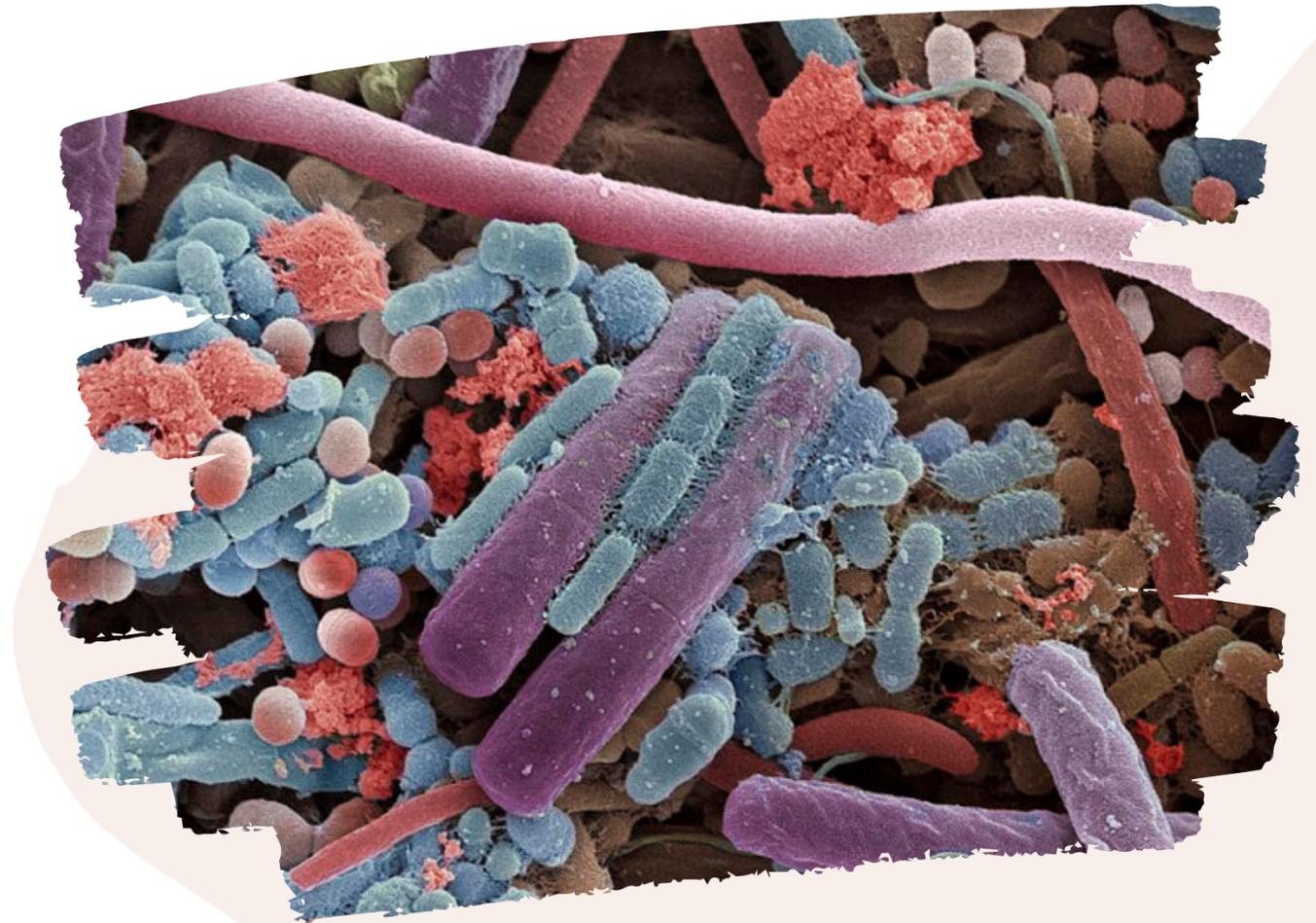
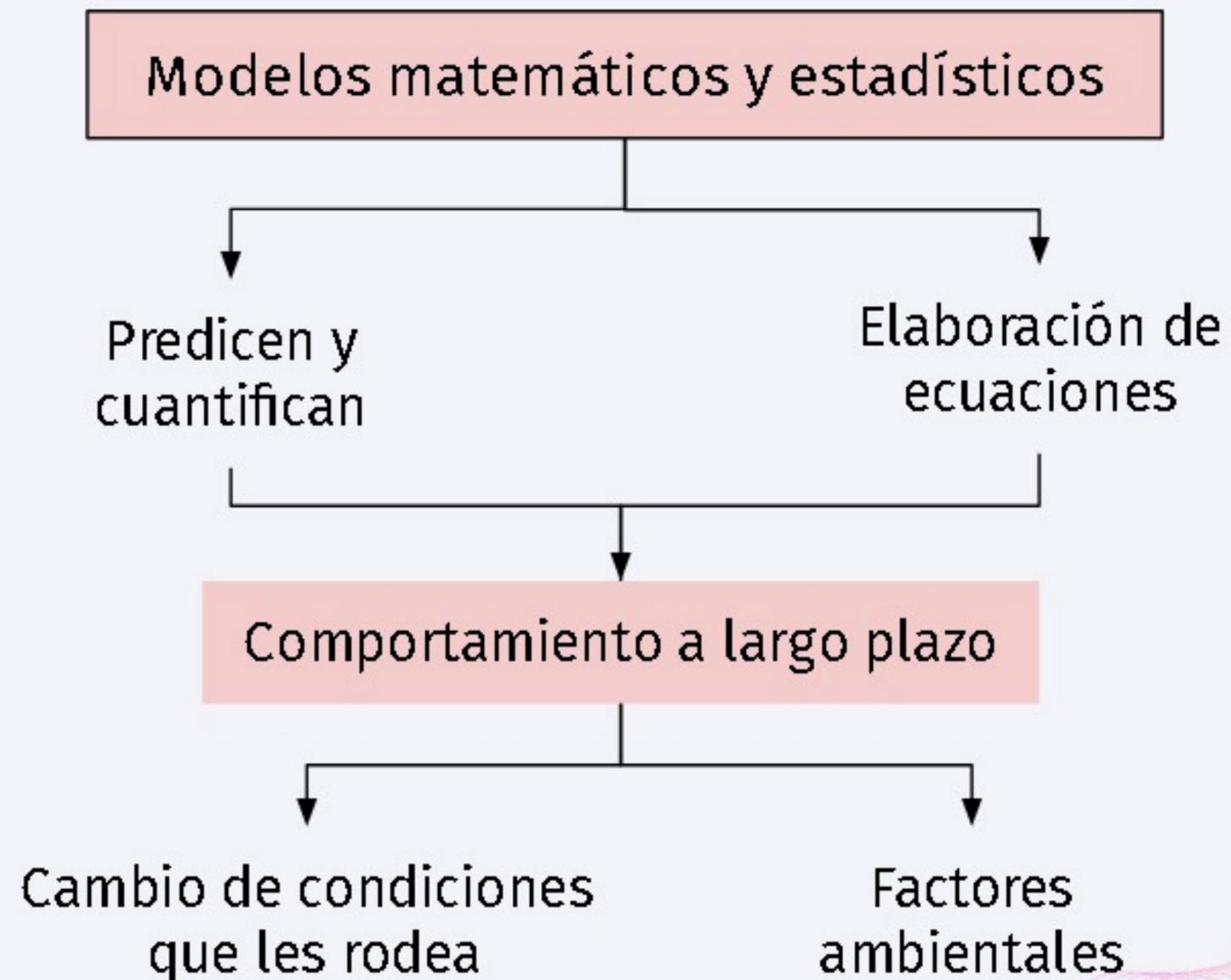
Medio de cultivo: RM.
 Crecimiento celular: $0,42 \times 10^5$ cel/mL
 [] astaxantina: 7,3 µg/ml

Modelo: Logístico



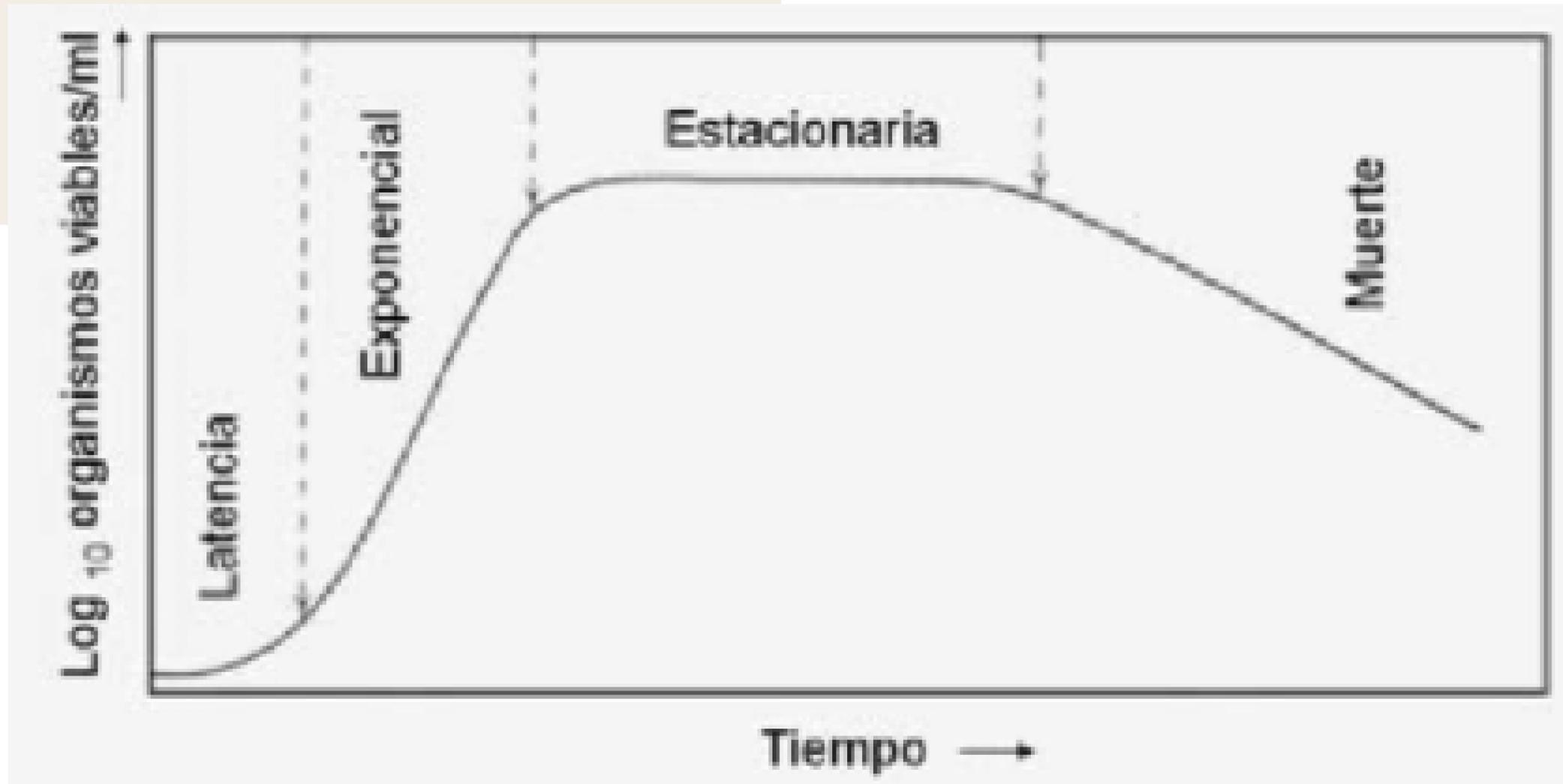
MARCO REFERENCIAL

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA



Estudia los factores, las condiciones y el comportamiento de los microorganismos

CURVAS DE CRECIMIENTO



LATENCIA



EXPONENCIAL



ESTACIONARIA



MUERTE



Evalúa e ilustra el crecimiento y desarrollo que alcanza un microorganismo durante su proceso de maduración.

MODELO PRIMARIO GOMPertz

P
A
R
Á
M
E
T
R
O
S

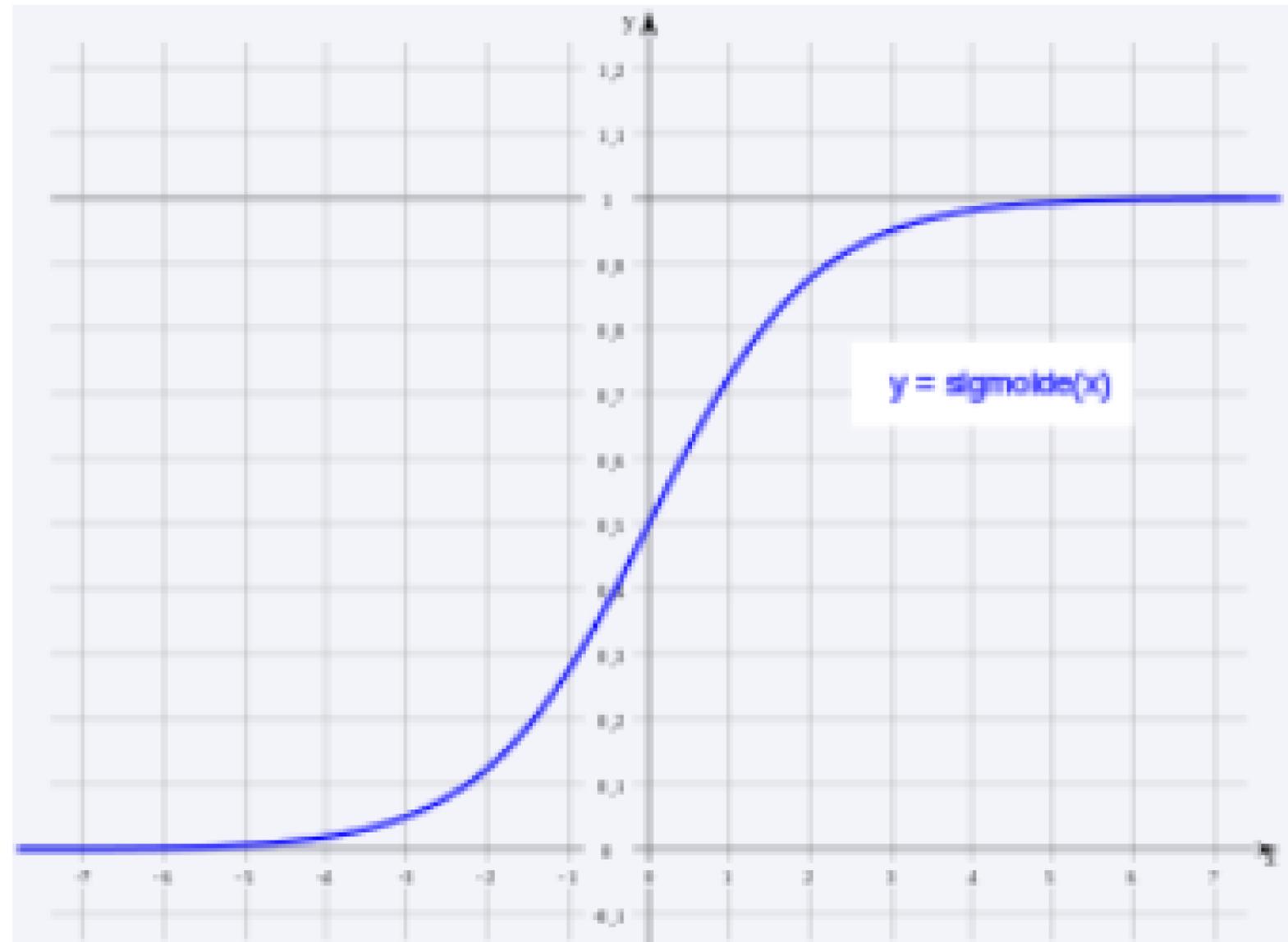
Fase de adaptación

Máxima
densidad celular

Velocidad de
crecimiento

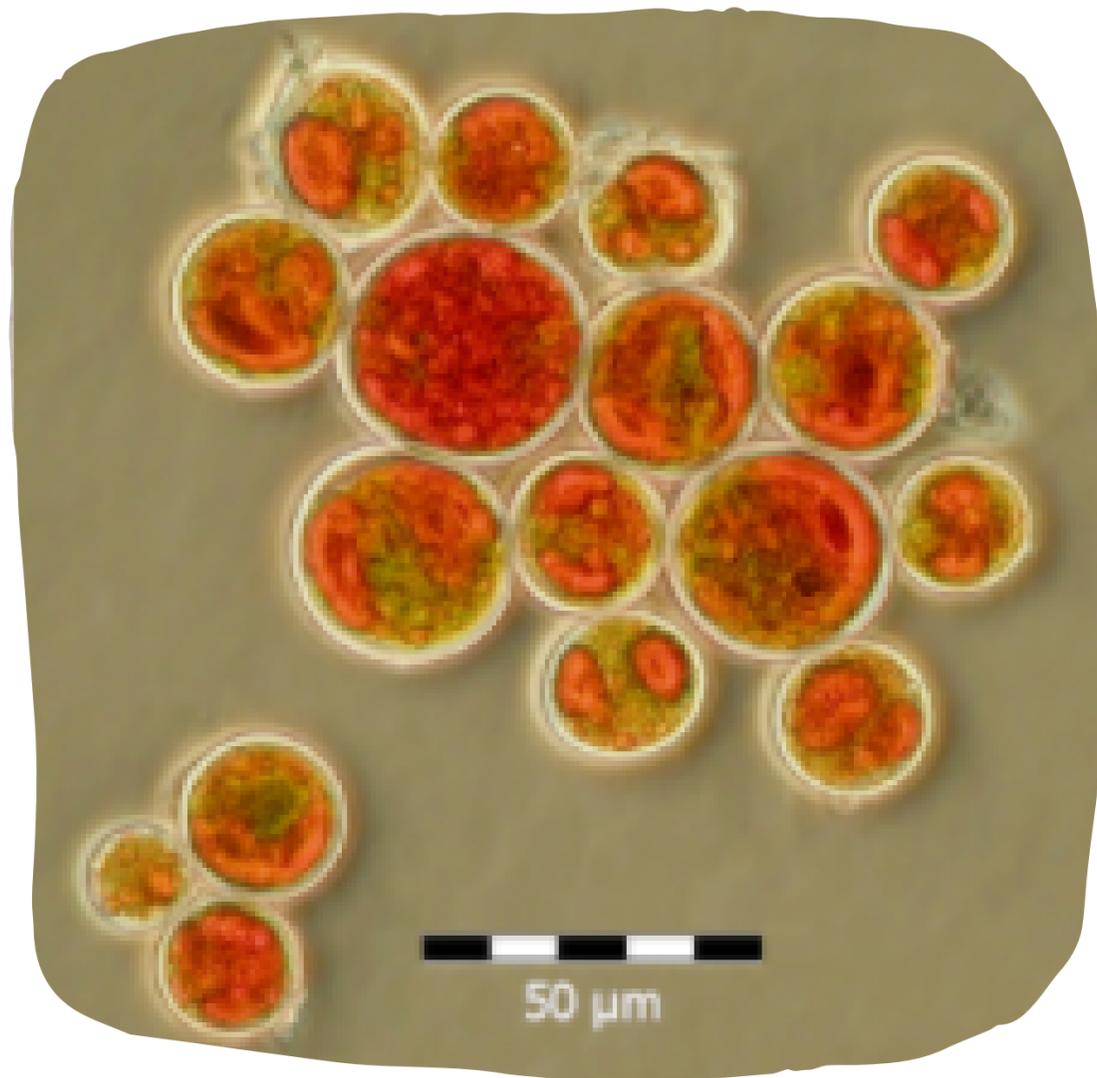
Maximo crecimiento

Tiempo de latencia
y generación



Relación tamaño de la población
microbiana (N) y el tiempo (t)

Haematococcus pluvialis



TAXONOMIA

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Viridiplantae*

Filo: *Chlorophyta*

Clase: *Chlorophyceae*

Orden: *Chlamydomonadales*

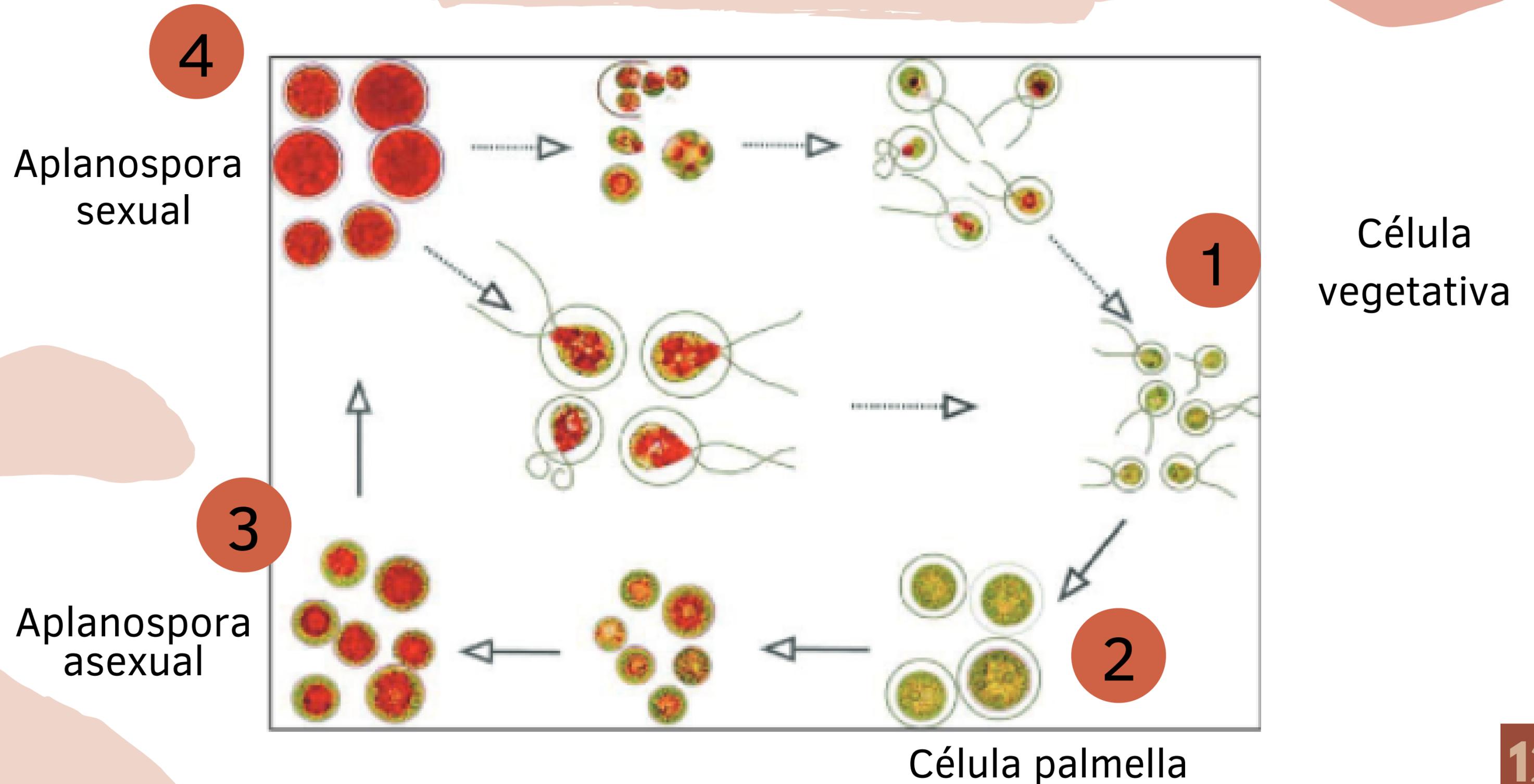
Familia: *Haematococcaceae*

Género: *Haematococcus*

Especie: *H. pluvialis*

Célula oleaginosa biflagelada, móvil en su estado vegetativo, unicelular y esférica con 8 -50 μm , con reproducción asexual

CICLO DE VIDA



ASTAXANTINA

B
E
N
E
F
I
C
I
O
S

Antiinflamatorio

Antioxidante

Componente
nutricional

Efecto terapéutico

Suplemento
dietético

Reducción del
estrés oxidativo



Formula: $C_{40}H_{52}O_4$

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Análisis de tipo cuantitativo.

ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

Descriptivo, no experimental, periodo de tiempo longitudinal.

VARIABLES

Independiente:

Tiempo (Días)

Dependiente:

Crecimiento celular.

POBLACIÓN

Trabajos realizados por el grupo bioprocesos y control de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en el periodo del 2015 al 2020.

MUESTRA

Datos de crecimiento celular obtenidos de 9 trabajos revisados

PROCEDIMIENTO

1

Se realizó la revisión 12 trabajos de investigación realizados por los estudiantes pertenecientes al semillero de Bioprocesos y control

2

En el periodo del 2015-2020 en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

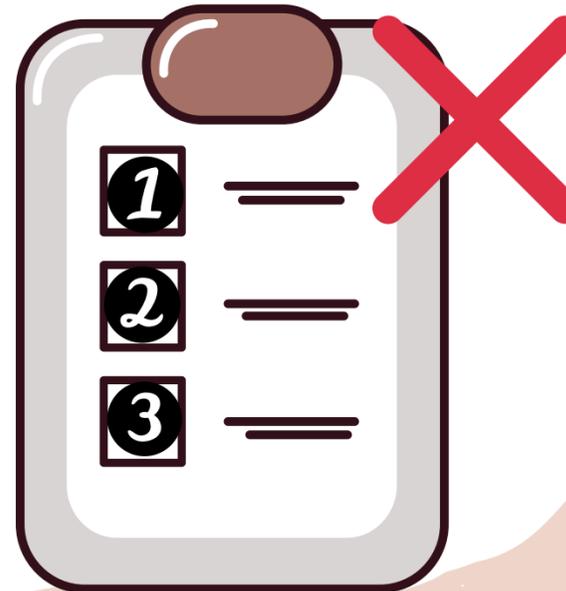
3

Modelo
Modelo Baranyi and Roberts
Programa software DMfit
Modelo logístico
Parámetros y resultados

4

Modelo seleccionado
Modelo matemático
Gompertz

5



6



A los resultados de los 9 trabajos que mostraron el mayor crecimiento o producción celular se les aplicó el modelo Gompertz permitiendo comparar las biomasa calculadas frente a los resultados del conteo microbiano obtenidos experimentalmente.

7



$$P = A e^{-B e^{-Kt}}$$

P= Biomasa obtenida experimentalmente con respecto al tiempo .

A= Biomasa máxima.

B= Dispersión de los datos, que permiten que la curva se desplace a la izquierda o derecha.

K= Tasa de crecimiento de la curva de crecimiento.

1

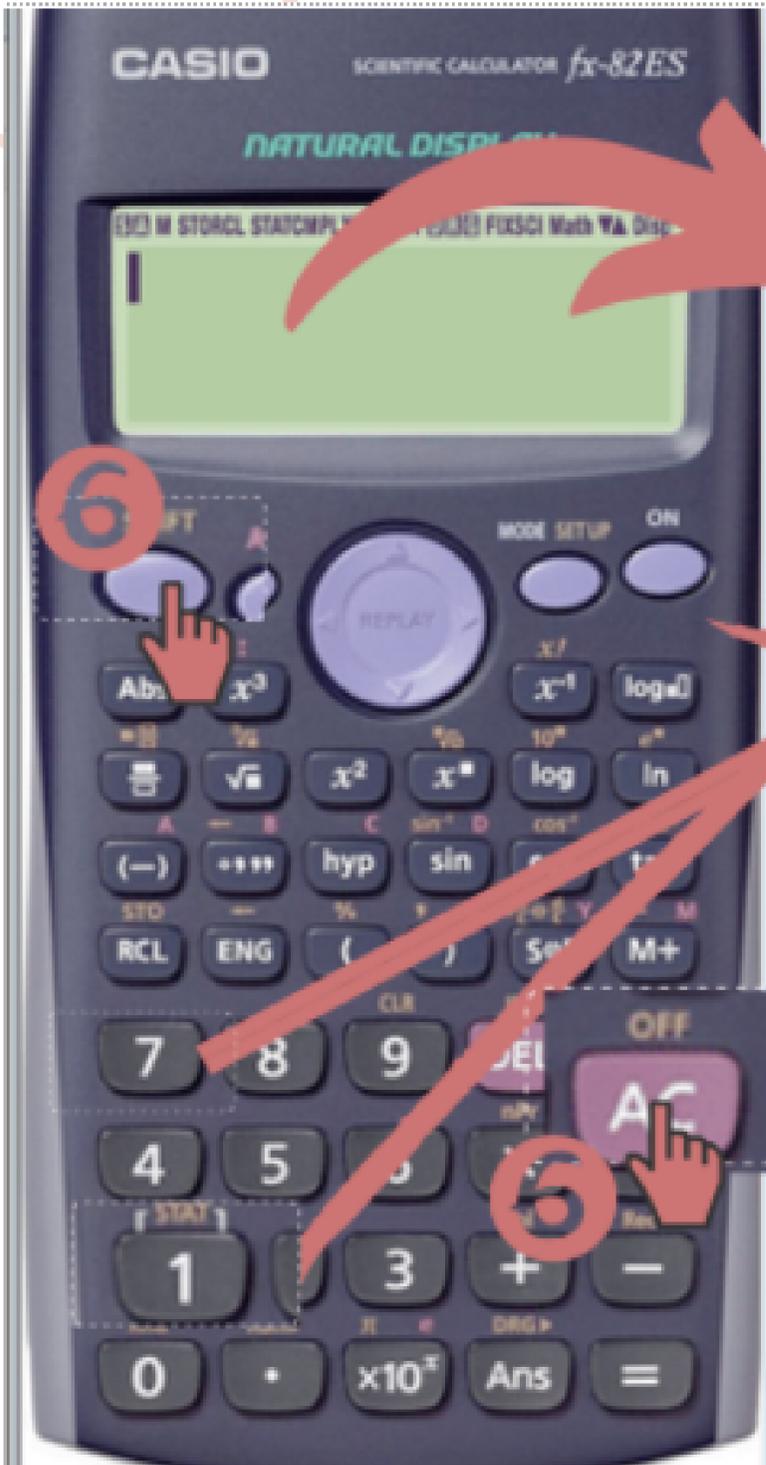
2

3

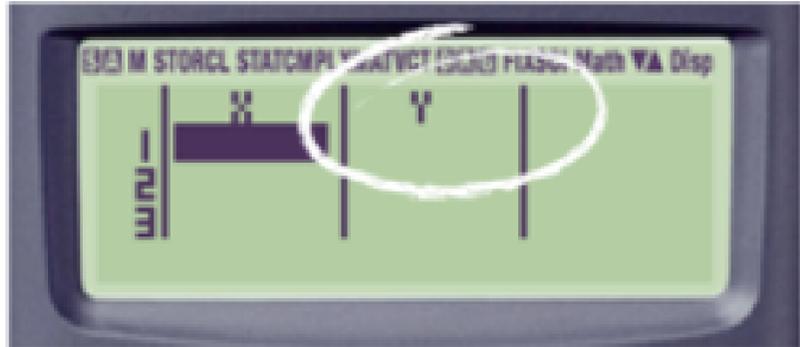
LN [LN [A / P]]

SUMA			=LN(LN(\$B\$17/B2))
	A	B	C
	TIEMPO (DÍAS)	Promedio Cel/ mL	Y
1			
2	1	5800000	=LN(LN(\$B\$17/B2))
3	5	7800000	1, LN(número)
4	7	27300000	1,750262435
5	11	270000000	1,242590785
6	16	603000000	0,978733028
7	21	1430000000	0,586435787
8	28	2620000000	0,175691449
9	32	3150000000	0,007811463
10	35	2550000000	0,198154835
11	49	2770000000	0,127862894
12	56	8230000000	-3,047899836
13	73	8600000000	-5,660061757
14	79	8620000000	-6,759835037
15			
16			
17	A	8630000000	

$$P = \hat{A}e^{-B}e^{-Kt}$$



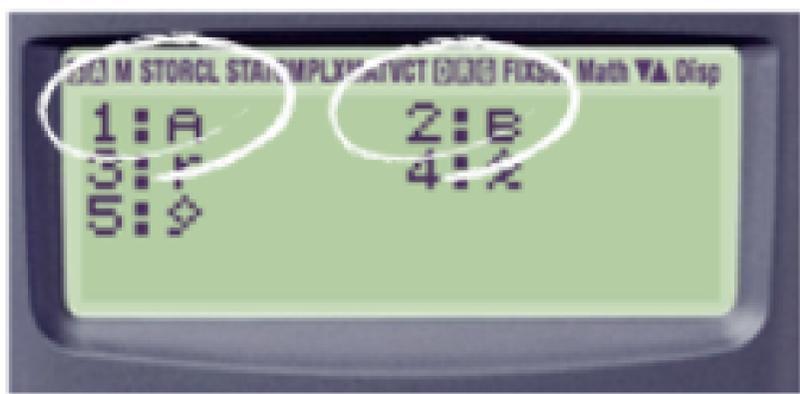
5



7



8



	A	B	C	D
1	TIEMPO (DÍAS)	Promedio Cel/ mL	Y	Promedio Cel/ mL Gompertz
2	1	5800000	1,988578465	=-\$B\$17*EXP(-\$B\$18*EXP(-\$B\$19*A2))
3	5	7800000	1,947177353	EXP(número) 3,571
4	7	27300000	1,750262435	2512533,66
5	11	270000000	1,242590785	40735222,13
6	16	603000000	0,978733028	361379419,8
7	21	1430000000	0,586435787	1317030315
8	28	2620000000	0,175691449	3497134797
9	32	3150000000	0,007811463	4763683165
10	35	2550000000	0,198154835	5591214011
11	49	2770000000	0,127862894	7807038955
12	56	8230000000	-3,047899836	8224257720
13	73	8600000000	-5,660061757	8560192489
14	79	8620000000	-6,759835037	8592683564
15				
16				
17	A	8630000000		A= 2,8299
18	B	16,94376636		B= -0,1047
19	k	0,1047		
20				

$$B = e^A$$

$$k = -B$$

Validación del modelo matemático R^2

Velocidad de crecimiento $\mu = \text{Ln}(N_t/N_0)/(t-t_0)$

Tiempo de duplicación $td = \text{Ln}(2)/\mu$

RESULTADOS

MEDIO DE CULTIVO	N° de trabajos en donde se utilizó	N° de trabajos en donde se comparó con otros medios de cultivo	N° de trabajos en donde se obtuvo el mejor resultado
RM	10	5	3
BBM	6	5	2
OHM	2	2	1
KOBAYASHI	1	1	0

Tabla elaborada por los autores

Tabla No 1.
Medios de cultivo utilizados en los diferentes trabajos de investigación

RESULTADOS	AUTOR (ES)
Crecimiento celular de $7,5 \times 10^5$ cel/mL en el día 36, producción de astaxantina de 8.3 µg/ml, velocidad de crecimiento de 0,092 cel/día.	Niño C. et al
Crecimiento celular de 1.12×10^6 cel/mL en el día 21 y producción de astaxantina de 0,102 - 3,058 ug/ml.	Ríos S, et al
Con 0,299 mg/L de acetato de sodio: Crecimiento celular de $2,0 \times 10^4$ cel/mL y concentración de astaxantina de 2,530 µg/mL en día 34.	García L.
Crecimiento celular de $1,25 \times 10^5$ cel/mL en el día 21 y una velocidad de crecimiento de 0.040 cel/día.	Leiton Y.
Producción de biomasa de $2,88 \times 10^7$ cel/mL en el día 36 y concentración de astaxantina de 3,1 µg/mL	Manrique M. et al
Crecimiento celular de $3,19 \times 10^5$ cel/mL con una concentración de astaxantina de 1,1µg/ml en el día 28	Ayala Y. et al
Crecimiento celular de $1,26 \times 10^6$ cel/mL en el día 14	Hernández A.
Crecimiento celular de $8,62 \times 10^9$ cel/ml, concentración de astaxantina de 2,524 ug/ml y una velocidad de crecimiento de 1,19 cel/día.	Barreto P et al.
Crecimiento celular de $0,42 \times 10^5$ cel/mL en el día 36 y una producción de astaxantina de 7,3 µg/ml con 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio.	Rodríguez L.

Tabla elaborada por los autores

Tabla No 2.
Resumen de los resultados obtenidos en los 9 trabajos analizados

Variables obtenidas Gompertz	Trabajo 1	Trabajo 2	Trabajo 3	Trabajo 4	Trabajo 5	Trabajo 6	Trabajo 7	Trabajo 8	Trabajo 9
A	757.000	1.127.000	20.500	126.000	29.000.000	320.000	1.231.000	8.630.000.000	43.000
B	9,6697263	10,964908	0,220469	4,4736293	7,3927516	9,02681868	0,7532184	16,9437664	1,000710252
K	0,1496	0,26554	-0,0612	0,2488	0,1782	0,2467	0,1588	0,1047	0,0235

Tabla elaborada por los autores

Tabla No 3. Variables obtenidas para aplicar la ecuación de Gompertz

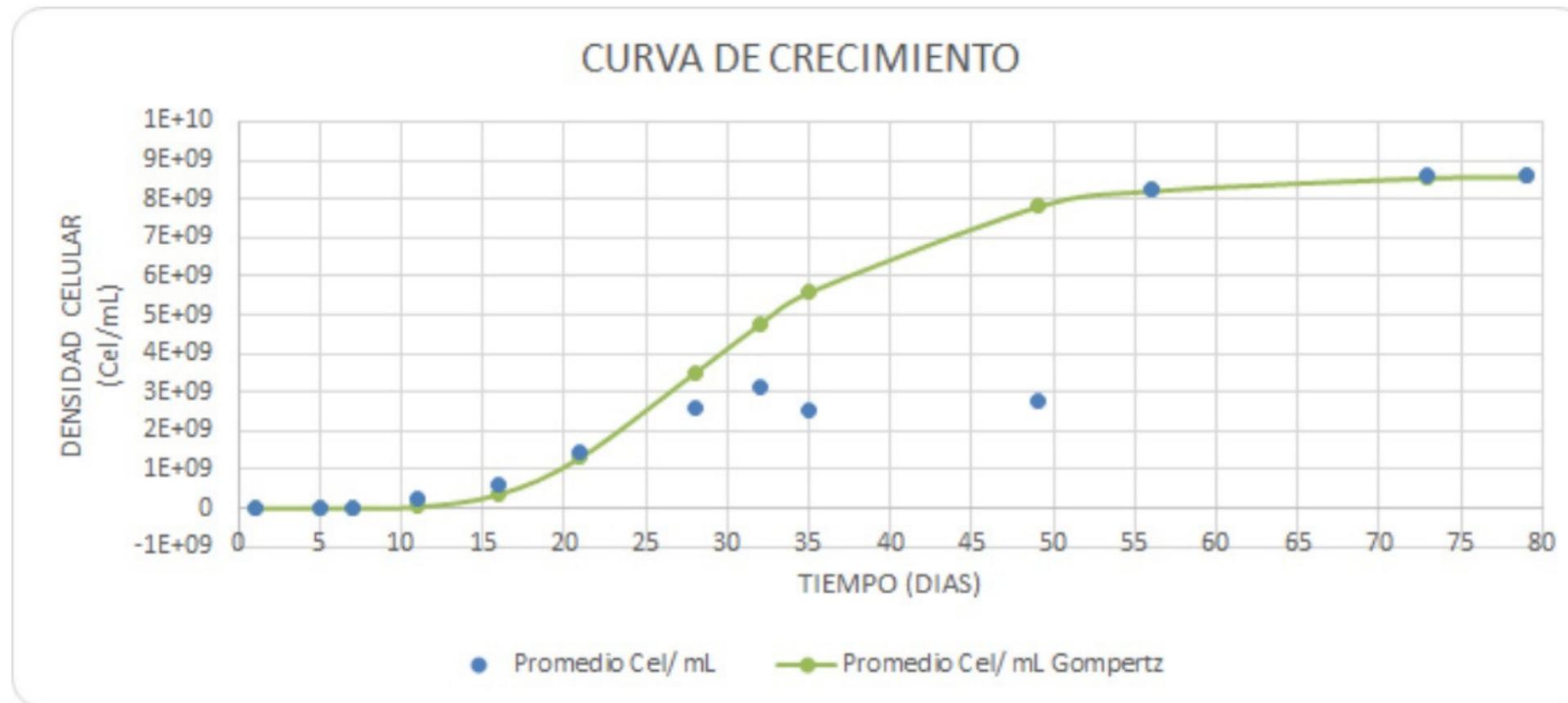
Indicadores estadísticos	Trabajo 1	Trabajo 2	Trabajo 3	Trabajo 4	Trabajo 5	Trabajo 6	Trabajo 7	Trabajo 8	Trabajo 9
Coefficiente de correlación múltiple	0,982669	0,973264	0,997922	0,999827	0,981981	0,950759	0,998917	0,955705	0,997263
Coefficiente de determinación R ²	0,965639	0,947243	0,995848	0,999655	0,964286	0,903942	0,997835	0,913371	0,994535
R ² ajustado	0,958767	0,920865	0,99308	0,99931	0,952381	0,711827	0,993505	0,896046	0,992349
Velocidad de crecimiento (cel/día)	0,0923	0,1334	-0,0394	0,0924	0,2163	0,1885	0,0426	0,3916	0,0133
Tiempo de duplicación (td) (h)	7,509720	5,196005	-17,59256	7,501592	3,204563	3,677173	16,27106	1,770038	52,11632
Observaciones	13	7	6	5	9	4	4	13	8

Tabla elaborada por los autores

Tabla No 4. Indicadores estadísticos

Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo los factores de estrés deficiencia de fosfatos, deficiencia de nitratos y alta irradiancia utilizando el biorreactor Biostat A plus de 5 litros.

Barreto Forero Paula Andrea, Ortiz Basante Tatiana, 2020



Producción de biomasa
8,62x10⁹ cel/ml
Concentración de astaxantina
2,524 ug/ml.
Velocidad de crecimiento
1,19 cel/día.

Figura elaborada por los autores

Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio.

Rodriguez Laura Johanna, 2020

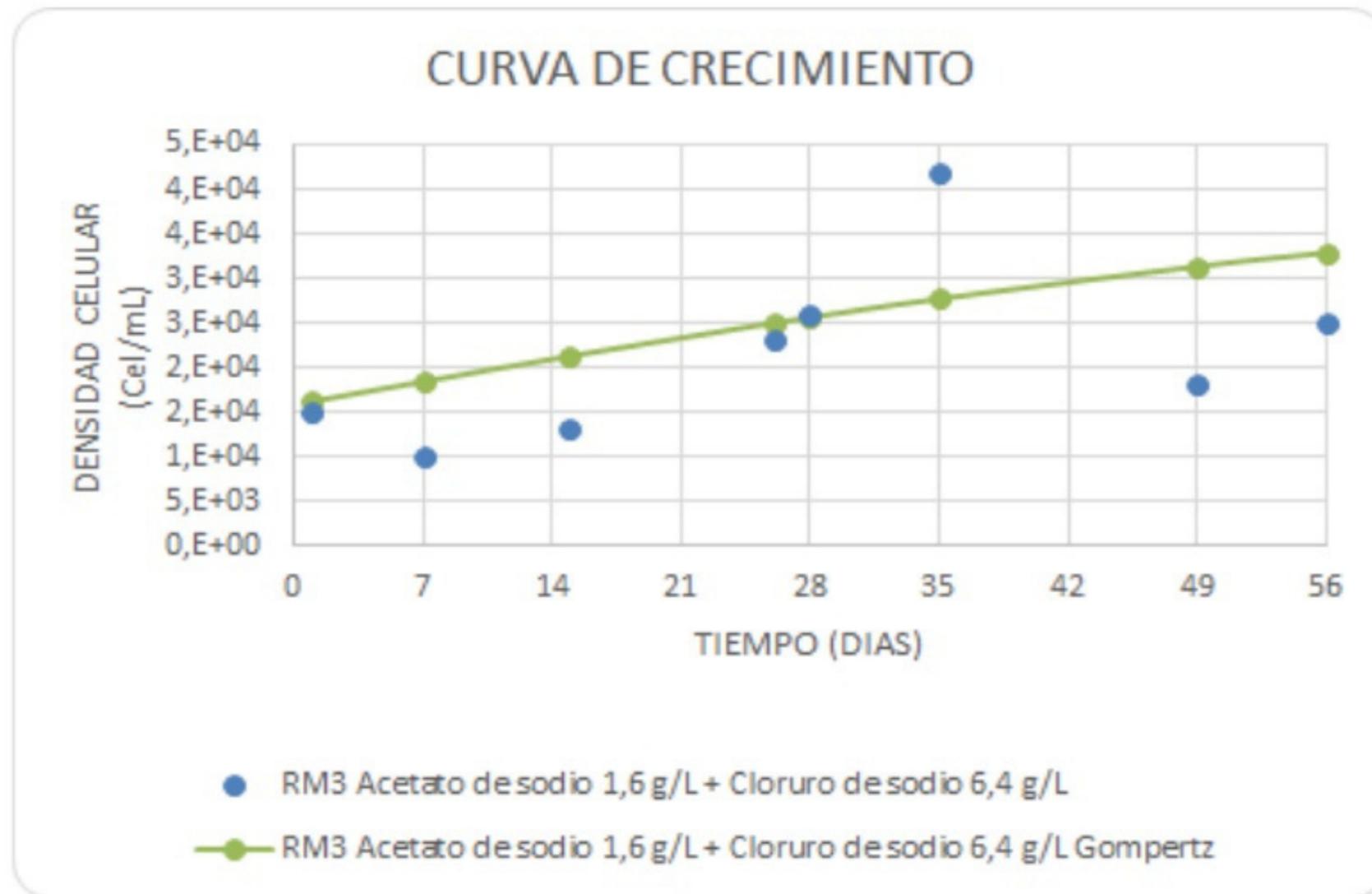


Figura elaborada por los autores

Crecimiento celular
 $0,42 \times 10^5$ cel/mL en el día 36

Producción de astaxantina
7,3 μ g/ml con 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio.

CONDICIONES DE ESTRÉS

BARRETO	RODRIGUEZ
pH 6.8 y Temperatura 20°C	pH 6.8 y Temperatura 20°C
Deficiencia de nitratos 5%	Cloruro de sodio 6,4 g/L
Irradiancia da 280 lux con LED azul, rojo y blanca	Irradiancia de 70
Deficiencia de fosfatos 10%	Acetato de sodio 1,6 g/L
Agitación 100 rpm	Medio RM
Luz blanca	Luz blanca
Medio RM	Fotoperiodo 20:4h luz/oscuridad
Fotoperiodo 20:4h luz /oscuridad	Aire filtrado
Aire filtrado velocidad 1,7L/min esteril	

Tabla elaborada por los autores

Tabla No 2. Condiciones de estrés de los trabajos analizados

PARÁMETROS	CRITERIOS DE TRABAJO
pH	6.8
Temperatura	20±2°C
Fotoperiodo luz/oscuridad	20h luz/ 4h oscuridad
Medio de cultivo	RM (Rudic's Medium)
Aireación	Aire filtrado
Irradiancia	70 - 140 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Iluminación	Luz blanca
Deficiencia de nutrientes	Nitratos 5%
	Fosfatos 10%
Agitación	100rpm
Cloruro de sodio	1,28 g/L
Acetato de sodio	1,6 g/L

Tabla No 5.
Condiciones de estrés determinados para la obtención de astaxantina, producción y crecimiento celular.

Tabla elaborada por los autores

CONCLUSIONES

- ✓ El modelo primario Gompertz establece las condiciones de cultivo por medio de un ajuste estadístico que permitió un análisis e identificación de parámetros adecuados para alcanzar la mayor concentración de astaxantina, producción y crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis*.
- ✓ Gracias a los trabajos de Barreto y Rodríguez se lograron determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de astaxantina. Los parámetros propuestos por los autores son: pH 6.8, temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 20h luz/ 4h oscuridad, aire filtrado, irradiancia de $70 - 140 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, luz blanca, agitación de 100 rpm, deficiencia de nutrientes como fosfatos del 10% y nitratos de 5%, adición de cloruro de sodio de 1,28 g/L y acetato de sodio de 1,6 g/L en el medio de cultivo RM. Así estos parámetros, favorecen el crecimiento celular.
- ✓ Es posible realizar el ajuste del modelo primario Gompertz con el fin de evaluar el crecimiento y la reproducibilidad de la microalga para la obtención de astaxantina, lo que permitió realizar un análisis comparativo sobre los diferentes trabajos investigados.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVA

- Para estudios posteriores se recomienda emplear los parámetros propuestos por en el presente estudio para mayor producción celular y obtención de astaxantina.
- Profundizar en los diferentes metodos de uso del modelo de Gompertz con el fin de analizar las variables que puedan afectar el crecimiento y producción de la astaxantina.
- Se recomienda a los docentes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca profundizar en modelos matematicos de predicción no lineal en el pensum del programa de Bacteriología y laboratorio clinico, con el fin de enriquecer conocimientos y competencias de los estudiantes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos expresar nuestro agradecimiento a la docente Ana Graciela Lancheros Díaz por la dedicación, el apoyo y la dirección que ha brindado a este trabajo. Gracias a nuestros familiares y amigos cercanos que siempre nos han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión. Gracias a Juan Cifuentes, Valentina Perdomo y Daniela Quintero por su apoyo, paciencia, Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos las bases necesarias para el desarrollo del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Niño CM, Rodríguez FC. (2015) Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* Microalgae. Tesis de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
2. García Martín L. (2018) Producción biotecnológica de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* en biorreactor TEC-FERM de 5 litros. Tesis de grado Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
3. Hernández A. (2019) Realización del cultivo de *H. pluvialis* en biorreactor Tecferm de 5 litros. Tesis de grado Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
4. Barreto PA, Ortiz T. (2020) Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo los factores de estrés deficiencia de fosfatos, deficiencia de nitratos y alta irradiancia utilizando el biorreactor Biostat A Plus de 5 litros. Tesis de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
5. Rodríguez L. (2020) Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio. Tesis de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.