



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO Y ALTA IRRADIANCIA COMO FACTOR DE ESTRÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* POR MEDIO DE CULTIVOS REALIZADOS EN EL BIORREACTOR BIostat® A PLUS

AUTORES

**MÓNICA ALEJANDRA MANRIQUE PINZÓN
DAVID LEONARDO MARÍN CORREDOR**

ASESORA INTERNA

**JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN
MSC. DOCTORA EN BIOCIENCIAS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a:

- UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA, lugar donde se desarrolló el proyecto.
- Doctora en biociencias JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN, asesora del proyecto.
- Al Grupo de Bioprocesos y Control por la logística y apoyo material del proyecto.
- Al Laboratorio central de la universidad y a los ingenieros biomédicos RICARDO ANDRES ALFONSO Y DANIEL ALFONSO de SMM INGENIERIA S.AS
- DOCENTES Y DIRECTIVOS UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA – FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.

DEDICATORIAS

A Dios por darme el milagro de esta vida, por ponerme en ella a las personas necesarias para construir mi camino y por ser luz en los momentos más oscuros.

A mi madre, quien ha sido la persona que me regala oportunidades día a día para ser mejor, el impulso más grande para culminar esta etapa académica me lo da ella.

A mi padre, quien desde pequeña me inculcó valores grandes que me han servido para llegar hasta este punto.

A mis hermanas y mis sobrinitos, por siempre creer en mis capacidades y estar ahí de muchas formas cuando lo necesito.

A mi pareja, por ser mi roca y siempre darme el aliento que necesito cuando todo va mal.

A mi ángel, que llegó a mi vida para enseñarme miles de cosas, para darle un giro total a todo, eres fuerza.

A mis abuelitos, que desde el cielo sonrían por mis logros como lo hacían en vida.

A ustedes gracias por ser parte de mi vida, por forjarme como persona, por amarme incondicionalmente y por nunca soltarme aun cuando mi caminar sea lento. Les dedico uno de mis logros porque son ustedes quienes lo merecen. Con todo mi amor y respeto.

Mónica Alejandra Manrique Pinzón

Escribir intentando agradecer resulta difícil cuando no se cuenta con la pericia que demanda tal acto, pero intentaré expresar brevemente lo que viene a mi mente al saber que puedo tomar un poco de espacio para dedicar, en un trabajo que en su momento requeriría más sacrificios de los que me fueron advertidos; asimismo, es difícil incluir a todos aquellos que intervinieron no sólo a lo largo del desarrollo de este proyecto, sino de mi proceso como estudiante universitario. Esto va para aquellas personas a las que acudí cuando creía y me convencía a mí mismo de no lograrlo.

Especialmente a Angela Patricia Corredor, mi mamá, quien siempre tuvo la palabra precisa y la manera correcta de corregirme, es ella a quien debo lo esencial, lo indeleble: los principios. A Carlos Urbina y Juan Pablo Díaz, cuyas familias parecieran formar una sola con la mía; a ellos por permanecer sin excusa alguna cuando era necesaria otra perspectiva, cuando hacía falta un empujón que despertara las fuerzas para no detenerme.

A Michelle Pérez, Felipe Marín y la profesora Martha L. Posada, quienes, a lo largo de mi paso por la universidad, me han brindado herramientas para cambiar positivamente mi manera de ver el mundo. También este espacio sirve para dedicar a alguien especial que significó y sigue siendo un pequeño impulso, Sofia Marulanda, alguien que representa fuerza y esperanza.

Debo agradecer a mi papá, hermano, abuelos, tía y primo, porque aún en distintos modos, están presentes y por ellos continuaré.

Soy, en esencia, todo lo que éstas y muchas más personas, que sería imposible nombrar ya que perdería brevedad el texto, han construido. Sus enseñanzas y cada una de las experiencias vividas con ellos, han forjado lo que soy hasta el momento y me dan las bases necesarias para marcar una referencia de lo que quiero llegar a ser.

A la universidad, en especial al laboratorio central y la profesora Judith Camacho, por brindar los espacios propicios en los que se desarrolló el proyecto.

David Leonardo Marín Corredor.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. ANTECEDENTES	17
4. MARCO REFERENCIAL.....	18
4.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	24
4.1.1 Fases de crecimiento.....	24
4.1.2 Requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.....	25
4.1.3 Factores que estimulan el crecimiento de <i>H. pluvialis</i> y su producción de astaxantina	26
4.2 Clorofila	28
4.3 Carotenoides	28
4.3.1 Fuentes naturales de carotenoides.....	29
4.3.2 Efectos positivos sobre la salud.....	31
4.4 Astaxantina.....	31
4.4.1 Biosíntesis, ruta metabólica y genes relacionados.....	32
4.4.2 Beneficios para la salud.....	34
4.5 Biorreactores	34
4.5.1 Clases de biorreactores.....	35
4.5.2 BIOSTAT® A PLUS:.....	35
4.6 Modelos de crecimiento.....	37
5. DISEÑO METODOLÓGICO	39
5.1 TIPO DE ESTUDIO	39
5.1.1 UNIVERSO.....	39
5.1.2 POBLACIÓN.....	39
5.1.3 MUESTRA.....	39
5.2 Hipótesis.....	39
5.3 Variables.....	39
5.3.1 VARIABLES DEPENDIENTES.....	39

5.3.2 VARIABLES INDEPENDIENTES	39
5.4. METODOLOGÍA	39
6. RESULTADOS.....	45
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES.....	67
9. RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Fuentes alimenticias de carotenoides. ^{60, 61}	29
Tabla 2 Carotenoides obtenidos industrialmente ⁵⁶	30
Tabla 3 Descripción partes del biorreactor BIOSTAT® “Culture Vessels and Equipment UniVessels®” ⁷⁷	37
Tabla 4 Principales modelos matemáticos de crecimiento. “Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae <i>Dunaliella tertiolecta</i> ” ⁷⁸	38
Tabla 5 Composición del medio de cultivo MES volvox ⁸⁰	40
Tabla 6 Composiciones de los medios de cultivo RM y BBM. ⁷⁸	41
Tabla 7 Determinación de la velocidad de crecimiento en el medio BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018	49
Tabla 8 Registro fotográfico de los cambios macroscópicos de los cultivos en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.....	50
Tabla 9 Registro fotográfico de los cambios microscópicos de los cultivos en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.	54
Tabla 10 Tabla resumen de los resultados obtenidos en los cultivos de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo celular <i>H. pluvialis</i> “Astaxantina, el oro rojo de la microalga <i>H. pluvialis</i> , 2006” ³⁰	24
Figura 2 Estadios del ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i> A) Célula vegetativa procedente de aplanospora; B) Aplanospora; C) Palmella; D) Célula vegetativa “Astaxantina, el oro rojo de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> , 2006” ³⁰	25
Figura 3 Estructura química de la astaxantina “Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones, 1999” ⁶⁶	31
Figura 4 Ruta de biosíntesis de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> “A technical review of <i>Haematococcus algae</i> , 1999” ⁶⁸	33
Figura 5 Genes relacionados con la producción de astaxantina “Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga <i>Haematococcus pluvialis</i> , 2001” ⁴¹	34
Figura 6 Biorreactor BIOSTAT® A plus “El biorreactor compacto autoclavable” ⁷⁶ ..	36
Figura 7 Partes del biorreactor BIOSTAT® “Culture Vessels and Equipment UniVessels®” ⁷⁷	36
Figura 8 Inoculo de <i>H. pluvialis</i> en medio MES volvox. Tomada por los autores, 2018.	46
Figura 9 Formas vegetativas biflageladas de <i>H. pluvialis</i> en medio MES Volvox. Tomada por los autores, 2018. Tamaño 10X	46
Figura 10 Panel de luces LED multicolor. Tomada por los autores, 2018.	50

TABLA DE GRAFICAS

Gráfica 1 Crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en medio MES Volvox. Elaborada por los autores, 2018.	45
Gráfica 2: Gráfica 2 Crecimiento comparativo de <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM vs. RM. Elaborada por los autores, 2018.....	47
Gráfica 3 Variación en los niveles de pH para los medios BBM y RM durante el estudio. Elaborada por los autores, 2018.....	48
Gráfica 4 Concentración de clorofila en $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018	56
Gráfica 5 Concentración de astaxantina $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018	57
Gráfica 6 Concentración de nitratos en $\mu\text{g}/20\text{mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018	59

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1 Conteo celular de <i>H. pluvialis</i> en medio BBM. Elaborada por los autores, 2018.	77
Anexo 2 Conteo celular de <i>H. pluvialis</i> en medio RM. Elaborada por los autores, 2018.	78
Anexo 3 Curva de calibración para la determinación de la concentración de clorofila. Elaborada por Niño et al, 2017 ⁸⁹	79
Anexo 4 Curva de calibración para la determinación de la concentración de astaxantina. Elaborada por Niño et al, 2017 ⁸⁹	80
Anexo 5 Concentración de clorofila y astaxantina para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.	81
Anexo 6 Curva de calibración para la determinación de la concentración de nitratos. Elaborada por Leiton, 2018 ⁹⁴	82
Anexo 7 Concentración de nitratos para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.	83
Anexo 8 ANOVA crecimiento celular	84
Anexo 9 ANOVA concentración de clorofila	85
Anexo 10 ANOVA producción y acumulación de astaxantina	86
Anexo 11 Concentración de nitratos en los medios BBM y RM	87

RESUMEN

Cuando las condiciones de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* no son las adecuadas, sufre un proceso de enquistamiento del cual se deriva un carotenoide de gran interés como lo es la astaxantina. Este metabolito secundario es utilizado en diferentes industrias como colorante y aditivo nutricional. La microalga presenta un complejo ciclo de crecimiento, por lo que en el proyecto se buscó evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factores de estrés para la producción de astaxantina, por medio de cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de 5 litros, con el fin de producir biomasa en calidad y cantidad adecuada. Se realizó a escala de laboratorio en medios de cultivo como el BBM y RM, usando las siguientes variables de crecimiento: pH 6,8; temperatura 20 ± 2 °C; fotoperiodo 18 horas luz: 6 horas oscuridad; luz blanca, azul y roja con LEDS; irradiancia 180 hasta 210 lux; aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min y agitación 100 rpm. Se realizó observación de la morfología, cuantificación de crecimiento celular en células/mL, y determinación de la producción de clorofila y astaxantina por métodos espectrofotométricos. Se determinó la concentración de nitrógeno durante el cultivo mediante el método de colorimetría por nitración con ácido salicílico.

En el estudio realizado con el medio de cultivo BBM se observó una producción de biomasa de $2,88 \times 10^7$ cel/mL a los 36 días de crecimiento; concentración de clorofila de 28,3 µg/mL y una concentración de astaxantina de 3,1 µg/mL. El medio RM presentó una biomasa de $2,43 \times 10^7$ cel/mL; concentración de clorofila de 21,8 µg/mL y una concentración de astaxantina de 2,9 µg/mL a los 36 días de crecimiento. Se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (*F*: 1,38; *Valor p*: 0,253; *gl*: 1).

El uso del biorreactor bajo las condiciones trabajadas permitió obtener una biomasa en calidad y cantidad adecuadas de la microalga, la cual puede ser utilizada para obtener productos derivados de gran interés.

Palabras clave: Microalga, carotenoide, condiciones de cultivo, medios de cultivo biorreactor.

1. INTRODUCCIÓN

Un gran número de colorantes utilizados en la industria alimenticia han sido retirados últimamente de la lista internacional de colorantes autorizados debido a sus actividades mutagénicas y cancerígenas. Durante mucho tiempo, la industria ha optado por utilizar colorantes sintéticos en lugar de los naturales, debido a su bajo costo y su alta capacidad de colorear los productos. Recientemente se ha observado un cambio en esta práctica por las graves repercusiones en la salud.

En las industrias se emplean diversas sustancias sintéticas que son capaces de proporcionar un color visualmente llamativo, por ejemplo: el amarillo quinoleína conocido en la industria alimentaria como E-104, el cual se emplea para generar un color naranja en bebidas y que no es bien asimilado por el aparato digestivo; el rojo cochinita o E-120, que puede ocasionar alergia y síndrome de hiperactividad; y el azul de sulfán o E-131, el cual proporciona una coloración azul violeta que puede causar anafilaxia; entre otros.

La tartrazina es un colorante artificial azoico amarillo anaranjado, usado ampliamente en la industria textil, alimentaria y cosmética; en la industria alimentaria se emplea como aditivo en la fabricación de productos que presenten coloración amarilla, desde bebidas hasta galletas. El problema radica en que se ha observado que el consumo de este colorante puede causar reacciones alérgicas como el asma y la urticaria, además de ser posible carcinógeno.

El reemplazo de los colorantes artificiales es posible gracias a que se ha evidenciado que se pueden obtener de manera natural compuestos que no sean tóxicos para la salud y que además posean las características de producción de color, por ejemplo, los carotenoides se emplean para sustituir los tonos rojizos, anaranjados y amarillentos. Es el caso de la astaxantina, un pigmento carotenoide producido por síntesis química o naturalmente por una microalga llamada *H. pluvialis*. Dicho pigmento es de gran utilidad en las industrias enfocadas a la producción de medicamentos, alimentos y cosméticos, pero su producción se ve limitada debido a que la microalga produce este pigmento en condiciones de estrés como mecanismo de resistencia. *H. pluvialis* se ha sometido a diversos tipos de estrés como la falta de nutrientes; altas concentraciones de sales; variabilidad en la cantidad de luz penetrante; entre otros.

El interés biotecnológico que se ha venido despertando en los últimos años hacia la microalga *H. pluvialis*, ha permitido conocer diversos factores que desencadenan un mecanismo de producción de un metabolito secundario: la astaxantina; pigmento rojo producido como mecanismo de defensa durante un proceso de enquistamiento de la microalga en respuesta a diferentes factores de estrés como la alta irradiancia, la deficiencia de elementos básicos para su crecimiento, la presencia de algunos medicamentos y el aumento en la salinidad de su medio, entre otros. El potencial de la astaxantina producida por *H. pluvialis* se debe a su amplia aplicabilidad en diversas áreas de la industria alimentaria, por ejemplo, su empleo en lugar de la tartrazina, compuesto químico del cual se ha comprobado un efecto cancerígeno en humanos. También en la industria acuícola puede ser utilizada para proporcionar tonalidades rojizas a cultivos de salmónidos y crustáceos; así como en otras líneas de producción como la cosmética y farmacéutica.

Para obtener una producción de astaxantina, primero se debe proporcionar a la microalga un ambiente óptimo que permita su crecimiento y desarrollo para luego someterla a un tipo de estrés que induzca a la producción de la misma. Debido a esto, se busca la generación de condiciones óptimas de estrés para *H. pluvialis* que favorezcan la acumulación de astaxantina como mecanismo de resistencia. Los cambios morfológicos por los cuales atraviesa la microalga en su proceso de enquistamiento, además de ser evidenciados en la proporción clorofila-carotenoide intracelular, se pueden evidenciar en cuatro puntos clave: crecimiento de la célula vegetativa; enquistamiento parcial de la célula vegetativa; maduración del quiste; y germinación.

Por lo anterior, la pregunta a responder con el desarrollo de este trabajo es: ¿Qué cantidad de astaxantina es generada y acumulada en la microalga *H. pluvialis* luego de ser sometida a factores de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiación, a lo largo del cultivo en biorreactor BIOSTAT® A PLUS?

La ingesta de alimentos que contengan agregados químicos como colorantes artificiales pueden desencadenar graves repercusiones en la salud, una de ellas es el cáncer gástrico, el cual está asociado a una mala alimentación y al consumo de aditivos químicos presentes en los alimentos, entre otros factores. Según la OMS, para el año 2015, 745.000 personas fallecieron a nivel mundial por este problema. En Colombia, el Instituto Nacional de Cancerología reportó también para el año 2015 que el cáncer de estómago fue la causa principal de muertes, tanto en hombres como en mujeres representando el 14,1% de las defunciones por cualquier tipo de cáncer. Solamente en hombres el cáncer de estómago fue la primera causa de muerte con 27.226 defunciones.

La tartrazina es un colorante ampliamente utilizado para proporcionar una gama de colores entre tonos amarillos y rojos en la industria de alimentos, sin embargo se ha cuestionado su uso por la estrecha relación de su consumo con la aparición de reacciones adversas, predominantemente en personas que sufren de procesos alérgicos como rinitis, asma, urticaria y pacientes con sensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), debido a esto se busca generar sustitutos para frenar su consumo. También se ha visto relacionado a procesos de hiperactividad en niños, dermatitis por contacto, problemas nasales, sudoración, irritabilidad, y somnolencia.

Con el pasar de los años, las tendencias de una alimentación saludable se han puesto en auge y en el campo industrial la sustitución de los colorantes artificiales por pigmentos naturales en diversos campos de producción, cada vez toma más fuerza. Se han desarrollado investigaciones sobre diferentes colorantes o pigmentos de origen natural como clorofilas, antocianinas y pigmentos terpenoides como los carotenos y el licopeno, que puedan reemplazar a los sintéticos utilizados hoy en día.

La astaxantina es producida naturalmente por la bacteria *Paracoccus marcusii*, algunas algas de los géneros *Ankistodesmus*, *Haematococcus* y *Scenedesmus*, plantas del género *Adonis* y la levadura *Phafia rhodozyma*. Este carotenoide es utilizado como colorante natural para la pigmentación y nutrición de diferentes

especies de peces y crustáceos en acuacultivos; debido a sus funciones antioxidante, inductora inmunológica y reproductiva, se ha utilizado también en el desarrollo de huevos de peces de la familia *Salmonidae* y se ha reportado como un promotor de la vitamina A, generando peces más sanos y resistentes al estrés oxidativo generado por especies de oxígeno reactivo.

La producción de astaxantina por parte de la microalga *H. pluvialis* inicia con la formación de un quiste en el momento en que las condiciones en su hábitat se vuelven desfavorables y se da en respuesta a diferentes tipos de estrés dentro de los que se destacan la deficiencia de nutrientes, una alta radiación solar y la desecación. La astaxantina posee múltiples beneficios y aplicaciones, por lo cual puede ser utilizado como colorante natural, protector UV y antioxidante, está relacionada a la prevención de enfermedades como el cáncer, enfermedades inflamatorias, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Se han estudiado diferentes factores de estrés que inducen a una mayor producción y acumulación de astaxantina en la microalga, tales como altas temperaturas, deficiencias de nutrientes, intensidades variables de luz, incremento de concentraciones de sales y estrés oxidativo, lo que conlleva a un mayor uso de *H. pluvialis* en la industria biotecnológica.

A nivel de laboratorio se vienen realizando estudios para la generación de pigmentos naturales saludables con potencial para reemplazar los colorantes artificiales que se utilizan en las diferentes industrias, como es el caso de *Dunaliella salina* y su capacidad para producir β -caroteno. Muchas condiciones que favorezcan la producción de astaxantina por parte de la microalga *H. pluvialis* se pueden generar en cultivos *in vitro*, como primer paso se deben proveer las condiciones específicas de crecimiento de la microalga como son el medio de cultivo, pH, requerimientos atmosféricos y ciclos de luz-oscuridad hasta que alcance una biomasa adecuada y seguido a esto se debe someter a condiciones de estrés favorables para la producción y acumulación celular de astaxantina. En este proyecto el uso del biorreactor BIOSTAT® A PLUS con medios de cultivo como el BBM y RM nos asegura la generación de un ambiente propicio para el desarrollo y crecimiento de *H. pluvialis* y además nos garantiza un mayor control de las condiciones del cultivo como aireación, temperatura, pH, agitación, hermeticidad que protege de la contaminación y el suministro de iluminación con LEDs de colores.

Debido a las severas repercusiones en la salud de la población consumidora se ha querido ampliar la investigación en el tema de búsqueda de alternativas naturales para con ello incentivar el uso de sustancias que posean la capacidad de proporcionar las características organolépticas deseables en los alimentos, pero que a su vez no sean tóxicos al momento de su consumo sino por el contrario favorables en la salud, para así disminuir los efectos adversos en las personas que los ingieren.

Este estudio se fundamenta en la búsqueda de un producto cuya obtención sea sustentable y no requiera de procesos químicos para su síntesis; que no sólo logre sustituir el uso de colorantes tóxicos para los consumidores, sino que también sea saludable, ya que en otras investigaciones se ha determinado una actividad

antioxidante, anticancerígena y capaz de prevenir enfermedades isquémicas por parte de la astaxantina superior a diversos compuestos incluyendo vitaminas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factores de estrés para la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, por medio de los cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS, a escala de 2L.
- Evaluar el cambio morfológico de la microalga durante los 36 días del periodo de estudio de cada cultivo.
- Determinar las concentraciones de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio.
- Determinar la concentración de nitrógeno durante el periodo de estudio.

3. ANTECEDENTES

En el año 2009 Gómez y colaboradores, realizaron un estudio para evaluar el efecto que tenía la exposición de *H. pluvialis* en fase de crecimiento exponencial, a campos magnéticos (0.03T) en relación al tiempo (15 min, 30 min y 1 h) en condiciones de óptimas y carentes de nitrógeno, se realizó una evaluación de parámetros como el crecimiento, la viabilidad celular y la composición pigmentaria de las células. Logrando evidenciar que la aplicación del campo magnético favoreció el crecimiento de la microalga en la fase de producción de astaxantina reduciendo el tiempo de cultivo, además se observó una mejoría en el crecimiento, viabilidad celular y acumulación de astaxantina en una condición estrés de ausencia de nitrógeno ¹.

Para el mismo año (2009) González *et. al.* estudiaron el cultivo 4 cepas de *H. pluvialis* aisladas en Chile en medio Bristol, en condiciones autotróficas y mixotróficas, con adición de 2 y 10 mM de acetato de sodio, a una temperatura de 22 ± 1 °C. y a dos densidades diferentes de flujo fotónico (DFF) (20 y 85 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). En los resultados se apreció que la mayoría de las cepas crecieron de manera más óptima en condiciones autotróficas y las más altas tasas de crecimiento exponencial se presentaron a la mayor DFF en todas las cepas, además el peso seco algal estimado el día 14 no mostró correlación significativa ².

Imamoglu E. *et. al.* en octubre 2009, publicaron un estudio donde cultivaron *H. pluvialis* en medio BG11 en condiciones de iluminación continua de 100 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 7 días, luego las células se sometieron a estrés en cuatro medios diferentes y dos intensidades lumínicas diferentes, de esta manera: medio RM sin nitrógeno (sin N), medio RM sin fosfatos (P-free), medio exento de nitrógeno y fosfato (NPfree) y también solo agua destilada con la adición continua de CO_2 y el estrés lumínico se probó con dos intensidades de luz: 445 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 546 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se estableció que el contenido de astaxantina era mucho más rápida en agua destilada (29.62 mg g^{-1}) con la adición de CO_2 y en medio libre de nitrógeno (30.07 mg g^{-1}) ³.

En enero del 2010 Martínez evaluó el crecimiento y la acumulación de pigmentos en *H. pluvialis* en dos medios de cultivo diferentes F/2 y fertilizante foliar (QF), manteniéndolos entre 4541,03 a 3766,26 lux de irradiancia, agitación manual, temperatura de 28°C, pH entre 8,37 y 8,42 y una conductividad eléctrica de 135,3 a 142,1 mV. Con este estudio logró evidenciar que la microalga logra adaptarse más rápidamente al medio de cultivo QF que al f/2, también que en el medio QF se generó mayor contenido de clorofila a y b, pero que en el medio f/2 se logró obtener mayor concentración de astaxantina que en el QF ⁴.

Li *et. al.* estudiaron en el 2010 el efecto que produjo la iluminación continua en unos cultivos de *H. pluvialis* de tipo silvestre (WT) y mutante (MT 2877), se sometieron a densidades de flujo de fotonos de 50, 125, 300, 600 $\mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y otros se mantuvieron a 20 $\mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los cuales sirvieron como controles. Luego de cinco días de iluminación se observó que la población de la cepa WT disminuyó en un 40%, 62%, 74% y 82% y en la cepa mutante disminuyó un 13%, 20%, 26% y 40% respectivamente; también se pudo apreciar que los cultivos mantenidos a 20 $\mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no presentaron producción de astaxantina,

todo lo contrario de los cultivos expuestos a mayores densidades de flujo fotónico. Se logró deducir que la cepa MT 2877 presentó mayor viabilidad que la WT, también que a mayor flujo de fotones más rápido se induce la producción de astaxantina en las células y que la cepa mutante logra acumular mayor cantidad de astaxantina en relación a la cepa silvestre ⁵.

En el 2013 Ramírez publicó un estudio en donde evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina en un fotobiorreactor tipo airlift, estableciendo en primera instancia las mejores condiciones para su crecimiento y luego el cultivo masivo en un fotobiorreactor. Primero estudió cinco medios de cultivo BBM, BG11, OHM, F1 y BBM:BG11 en los cuales no se evidenció diferencia significativa por lo tanto aconsejó el uso de BBM por su bajo costo, luego cultivó la microalga bajo estrés salino lo cual no mostró una gran acumulación de astaxantina pero sí que a una concentración de 2,5 g/L se genera muerte celular, también la sometió a diferentes intensidades lumínicas de lo cual concluyó que a mayores intensidades mayor acumulación de astaxantina, además estableció que la concentración de fósforo y la intensidad de la luz son factores estimulantes en su crecimiento; a partir de las deducciones anteriores realizó un cultivo en el fotobiorreactor en donde analizó el efecto de los flujos de aireación, encontrando que a flujos altos se inhibe el crecimiento de la microalga y que a flujos intermedios se incrementa la velocidad de crecimiento ⁶.

En el 2014, Zhang y colaboradores, realizaron un experimento donde cultivaron *H. pluvialis* en medio BG11 y a una intensidad de luz de 30 $\mu\text{mol fotones m}^2 \text{s}^{-1}$, con un método de biofilm inmovilizado con una concentración inicial de nitrato de sodio de aprox. 1,8 mM por m^2 de superficie de cultivo, con este método lograron obtener una concentración de astaxantina de 160 $\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$, la cual es una concentración muy alta ⁷.

En julio del 2014, Wan *et. al.* publicaron un estudio donde cultivaron la microalga *H. pluvialis* en medio NIES-C con 10 mM de acetato de sodio como fuente de carbono a 25 $\mu\text{mol fotones m}^2 \text{s}^{-1}$ a 25° C en un fotobiorreactor tipo columna de burbujeo con iluminaciones de lámparas de fluorescencia fría de 445, 504, 437 y 437 nm obteniendo una producción de astaxantina de 65.8 $\text{mg g m}^2 \text{d}^{-1}$. Este método resulta muy efectivo para producir astaxantina bajo un amplio rango de intensidades de luz por ello se considera una tecnología altamente eficiente para producir astaxantina a partir de *H. pluvialis* ⁸.

En septiembre del 2014 Wan y colaboradores publicaron un estudio en el cual analizaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *H. pluvialis* y su acumulación de astaxantina durante un cultivo cíclico en biorreactores en columna y en estanques al aire libre. En el cultivo del biorreactor las células se cultivaron en medio NIES-N, con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, con una temperatura diurna de 8 a 33°C y una temperatura nocturna de 28°C e invertido (diurna de 28°C y nocturna de 8 a 33°C), por otro lado en el cultivo al aire libre la intensidad de la luz y la temperatura en el proceso del experimento era natural y se registraba diariamente. Dedujeron que para que la microalga logre un aumento de biomasa y una acumulación de astaxantina considerablemente altas se debe brindar al cultivo una temperatura diurna entre 23 a 28 °C y una temperatura nocturna inferior a 28 °C ⁹.

Park *et. al.* publicaron en octubre del 2014 un estudio sobre el cultivo mixotrófico de *H. pluvialis* en un biorreactor BioTron en dos etapas con un aumento gradual de la intensidad lumínica con el fin de obtener una alta producción de astaxantina. Se suministraron diversas concentraciones de acetato (360, 720, 1.440, 2.880 y 5.760 mg/l), nitrato (80, 160, 320, 640 y 1280 mg/l) y fosfato (7, 14, 28, 56 y 112 mg/l), las células se cultivaron a altas irradiaciones por etapas (de 60 a 120 IE/m²/s en el proceso fed-batch y de 120 a 150 IE/m²/s en el proceso de perfusión), luego se realizó un cultivo para la inducción a la acumulación de astaxantina en un medio deficiente en nitrato (NIES-N) con 5% CO₂, aireación e irradiación gradual del rango de 150 a 450 IE/m²/s. Concluyeron que la combinación de un cultivo de perfusión durante la etapa vegetativa y el aumento gradual de la irradiancia durante la etapa de inducción es manera eficaz de obtener altas concentraciones de biomasa y astaxantina en microalgas ¹⁰.

Zhao y colaboradores publicaron en el 2015 un artículo donde identificaron una nueva cepa de *H. pluvialis* LUGU y la cultivaron con ácido fúlvico como inductor de la acumulación de astaxantina. La cepa se aisló del lago Lugu en la meseta de Yunnan - China y se cultivó bajo la influencia del ácido fúlvico sobre el aumento de biomasa y la producción de astaxantina relacionada con los genes biosintéticos de astaxantina (PDS, LCY y CHY). Lograron deducir que el contenido de astaxantina aumentó en un 86.89% en los cultivos tratados con ácido fúlvico y que los niveles transcripcionales de los genes PDS y CHY también se mejoraron en estos cultivos ¹¹.

En el 2015, Giannelli y colaboradores, estudiaron unos cultivos de *H. pluvialis* en medio C a temperaturas de 20° C, 23.5° C, 27° C y 30.5° C (temperatura óptima de 20° C), para evaluar los efectos de la acumulación de astaxantina sobre el metabolismo de las algas durante la fase de crecimiento. Se evidenció que a temperaturas más altas (27° C) es mayor la producción de biomasa y mayor acumulación de astaxantina en condiciones de inanición de nitrógeno ¹².

En el año 2015 Granda publicó un estudio donde cultivó *H. pluvialis* en tres medios de cultivo a base de fertilizantes orgánicos y bajo diferentes intensidades de luz con el fin de determinar las condiciones óptimas de producción de astaxantina. Los medios de cultivo utilizados fueron Nitrofoska foliar, Algaenzim y Fuerza verde, se usaron a tres concentraciones distintas (0.10%, 0.25% y 0.50%), periodo de luz-oscuridad 12:12 horas a una exposición lumínica con lámparas de luz blanca fluorescente entre 5000 y 8000 lux por 6 días y estaban conectados a un sistema de aireación constante. Se pudo concluir que en el medio Nitrofoska al 0.50% a una irradiancia de 4580 lux se produjo mayor producción de biomasa y que para la concentración y acumulación de astaxantina se requiere como factor de estrés una irradiancia de 8000 lux ¹³.

Sun y colaboradores publicaron en el 2016 un estudio donde cultivaron *H. pluvialis* en etapas en medio MCM, a un pH de 7,5, ciclos de luz- oscuridad de 12:12 horas con luces rojas y blancas a 2500 lux. Se realizó un cultivo por lotes con adición continua de nutrientes y uno sin adición bajo las condiciones ya mencionadas y también se realizó un cultivo repetido en dos etapas, en la primera la temperatura constante fue de 30°C y la luz fue una mezcla de azul y blanco a 7000 lux por 6 días

y en la segunda etapa el cultivo se devolvió a las condiciones iniciales con el fin de disminuir la disrupción celular y aumentar la productividad. Se logró evidenciar que el cultivo por lotes con adición continua de nutrientes y sometido a luz roja y blanca fue el que mejor biomasa produjo y que el cultivo repetido modifica la pared celular lo que hace posible que la degradación de la pared celular tratada sea más fácil y por lo tanto conseguir más eficazmente la extracción de astaxantina ¹⁴.

En marzo del 2016 fue publicado un artículo por Cheng *et. al.*, en el cual cultivaron la microalga *H. pluvialis* en medio BBM y la sometieron a estrés de irradiación nuclear (⁶⁰Co-) y altas concentraciones de CO₂ (2 - 10%) para promover su crecimiento y la posterior producción de astaxantina. La tasa de crecimiento de la cepa mutante fue un 15% mayor que la de la cepa original y la productividad de biomasa de la mutante con un 6% de CO₂ fue un 82% ¹⁵.

Haque *et. al.* publicaron en el 2016 un artículo donde utilizaron aguas residuales de la producción de bioetanol como medio de cultivo para *H. pluvialis*, previamente realizada una etapa de crecimiento en medio M1B5, a un pH 7 y se incubaron a 23 ± 2 ° C, con ciclos de luz / oscuridad y agitación suave dos veces al día. La inducción de la producción de astaxantina se realizó bajo iluminación continua durante tres semanas, luego de esto se extrajo mediante ultrasonidos con sustancias químicas (ácido acético, ácido cítrico, peróxido de hidrógeno e hidróxido de sodio) y disolventes de extracción de astaxantina (acetona, etanol y metanol) a diferentes duraciones de extracción (5-35 min). Como resultado se obtuvo que la máxima acumulación de astaxantina se dio en el Medio GroAst con iluminación continua con una mejora del 10,5% con respecto a los medios estándar ¹⁶.

Hexin y colaboradores en el mismo año, realizaron un estudio donde cultivaron la microalga *H. pluvialis* en tres fases de pigmentación: una fase verde, una fase amarilla y una fase roja, según el contenido de astaxantina y clorofila y la morfología celular. El cultivo inicial se realizó en medio BBM con una intensidad lumínica de 24 μmol / m² s para ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 24° C sin aireación. Los cultivos de las fases se realizaron así: -Fase verde: 24 μmol / m² s por 7 días; - Fase amarilla: 80 μmol / m² s por 14 días; -Fase roja: 80 μmol / m² s por 20 días. El contenido de algunos metabolitos citoprotectores como sacarosa, prolina y ácido glutámico se incrementó en la fase amarilla, con lo cual se propuso un modelo hipotético de regulación metabólica de *H. pluvialis* expuesta a alta luz ¹⁷.

Panis y Rosales en el 2016 realizaron un estudio teórico para evaluar los costos de producción de astaxantina con la creación de un modelo de cultivo fotoautotrófico a gran escala de *H. pluvialis* compuesto por un cultivo en fotobiorreactor tubular horizontal para el aumento de biomasa y un cultivo en un estanque abierto para la producción de astaxantina para dos ciudades europeas (Livadeia, Grecia y Amsterdam, Países Bajos). En las dos etapas del cultivo se tuvieron en cuenta los requerimientos nutricionales, el suministro lumínico, la temperatura, el pH, un estudio climático de las dos ciudades seleccionadas y entre otros análisis económicos para así lograr calcular la productividad teórica. Llegaron a la conclusión de que los costos por kilogramo de astaxantina natural para Livadeia serían de € 1536 / kg y para Amsterdam de € 6403 / kg lo cual indica que así sea un proceso óptimo de gran obtención de biomasa y acumulación de astaxantina de manera natural, no puede competir con una producción sintética que tiene un costo

de € 880 / kg de astaxantina ¹⁸.

Gao y colaboradores publicaron en el 2017 un estudio donde establecieron la distribución lumínica mediante diferentes métodos en un cultivo de *H. pluvialis* con el fin de aumentar la biomasa microalgal. Existen tres tipos de modelos para la productividad de las algas, los modelos de Tipo I predicen la tasa de fotosíntesis, los modelos de Tipo II calculan la productividad y los modelos de Tipo III consideran los impactos de los gradientes de luz y los ciclos de luz cortos. Utilizaron un medio de cultivo BG11, luz LED roja, aire rico en CO₂ y un modelo tipo II. Se concluyó que los mejores métodos para predecir con precisión la intensidad de la luz para un cultivo son el bootstrap y Newton-Gauss ¹⁹.

Sun *et. al.* publicaron un estudio en el año 2017 donde propusieron un método de cultivo de *H. pluvialis* por etapas en un biorreactor de tipo fed- batch. Las células se cultivaron a 22°C, con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, se usó luz mixta blanca-roja a 50 μmol m⁻² s⁻¹ durante los primeros 5 días, luego este medio de cultivo se filtró a través de una membrana de 5 μm y las células obtenidas se sembraron nuevamente manteniendo las condiciones anteriores pero se aumentó la intensidad lumínica a 80 μmol m⁻² s⁻¹, el día 9 el medio se ajustó a la misma concentración de nutrientes que el medio de cultivo fresco y el pH se ajustó a 7.5. Se concluyó que las características como la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos extracelulares son factores que limitan el crecimiento de la microalga y que crear un cultivo de tipo fed- batch, con un suministro de luz mixta blanca-roja y con cambio del medio de cultivo aumenta 1.16 veces la producción normal de biomasa ²⁰.

En un artículo publicado en el 2017 realizado en conjunto por universidades de España, Portugal, Italia, Chile y República Checa; Ación y colaboradores resaltan la importancia de conocer las demandas de *H. pluvialis* a la hora de realizar un cultivo con un fin biotecnológico. Teniendo en cuenta que la microalga es un microorganismo fotoautótrofo, la luz es el principal punto a tener en cuenta, pero no se deben pasar por alto elementos nutricionales como el carbono, nitrógeno y fósforo. Suministrar estas condiciones para el crecimiento del microorganismo y la producción de metabolitos secundarios de alto interés industrial se puede lograr a nivel de laboratorio y representa ventajas frente a los cultivos abiertos, pues condiciones como la temperatura, disponibilidad de luz, esterilidad, y aireación son más controlables que en un cultivo en sistema abierto, pero su costo es elevado ²¹.

Na Pang y Shulin Chen, publicaron en el 2017 un estudio donde cultivaron *H. pluvialis* en medio BG11 suplementado con acetato de sodio para evaluar el aumento de la tasa de crecimiento y la productividad de las algas, la utilización de carbono orgánico C5 por parte de la microalga se investigó en condiciones mixotróficas con diferentes intensidades de luz. En los resultados se observó que *H. pluvialis* tiene la capacidad de asimilar la ribosa como fuente de carbono, lo cual provocó un aumento en el contenido de biomasa y la actividad celular, generando condiciones favorables para su cultivo ²².

También en el 2017 Zheng *et. al.* estudiaron los efectos del selenito sobre la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, evidenciándose que la EC50 para la tasa de crecimiento de algas fue de 24 mg/L, a una dosis de 3 mg/L no dificulta el

crecimiento celular, pero a una dosis de 13 mg/L frena el crecimiento celular, también se observó que la microalga bioacumuló 380 y 646 $\mu\text{g/g}$ de selenito orgánico y total respectivamente. La actividad de la enzima antioxidante y la producción de astaxantina incrementaron, pero el tratamiento con altas concentraciones de selenito aumentó significativamente los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular lo que resulta tóxico para la célula ²³.

Nahidian *et. al.* publicaron en el 2018 un artículo donde evaluaron los efectos de los nutrientes sobre el crecimiento de *H. pluvialis*. Este estudio se realizó bajo cultivo discontinuo en tres medios diferentes, BBM, BG11 y 3NBBM en fotobiorreactores cilíndricos con aireación continua por 35 días y bajo iluminación continua de lámparas fluorescentes blancas frías ($20 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$). En un inicio se apreció que el medio BBM brindó las mejores condiciones para el crecimiento de la microalga, por lo cual se realizó un estudio de aplicación de diferentes niveles de nitrato y fosfato como macronutrientes y hierro y boro como oligoelementos y en esta etapa se observó que estas condiciones llevaron a un aumento del 86% en la tasa de crecimiento y a una densidad celular más alta. Todo esto evidencia una fuerte relación entre los nutrientes de los cultivos con la producción de biomasa ²⁴.

Christian *et. al.*, en el 2018 sometieron a dos condiciones de estrés (altas concentraciones de dióxido de carbono e iluminación leve) a la microalga *H. pluvialis* para generar un aumento en la bioacumulación de astaxantina. La microalga se cultivó en medio MES Volvox, en dos etapas, una de crecimiento donde *H. pluvialis* creció bajo iluminación de poca luz hasta que alcanzó la biomasa óptima y una etapa de inducción a la producción de astaxantina estresando las células con una combinación de iluminación de alta luz y niveles elevados de dióxido de carbono (5 o 15%). En los resultados se logró apreciar que el rendimiento de astaxantina fue de 2 - 3 veces mayor que usando cualquiera de los dos factores de estrés solo y esto sugiere que este método es óptimo para la inducción a la producción de este pigmento ²⁵.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 *Haematococcus pluvialis*

H. pluvialis también llamado *Haematococcus lacustris* o *Sphaerella lacustris* es un microorganismo eucariota que forma parte del orden *Volvocales* y familia *Haematococcaceae*; es una microalga unicelular de agua dulce la cual posee capacidad fotosintética para incrementar su biomasa y desarrollarse^{4, 26, 27}. Estas células tienen un tamaño que oscila entre los 8 y 50 μm , están caracterizadas por tener forma ovoidal, presentar flagelos que le brindan movimiento y reproducirse por división celular⁶.

Bajo condiciones ambientales extremas la microalga genera pigmentos carotenoides como mecanismo de resistencia debido a la disminución en la producción de clorofila y el aumento de la producción de astaxantina, pasando de un color intracelular verde a un color rojo anaranjado^{27, 28}.

4.1.1 Fases de crecimiento.

Durante su ciclo de vida, *H. pluvialis* atraviesa por tres fases de crecimiento las cuales presentan cambios morfológicos y bioquímicos en la célula. El primer estado de su vida es el vegetativo la célula es ovalada y verde por su contenido de clorofila, presenta flagelos y posee una matriz extracelular gruesa y traslúcida, gracias a factores ambientales favorables aumenta en tamaño por el proceso de fotosíntesis y pasa a un segundo estadio denominado palmella donde la célula aumenta la concentración de clorofila, se redondea y pierde los flagelos y finalmente al tercer estadio se le denomina aplanospora caracterizada por tener una membrana rígida, esta es la forma de resistencia de la microalga la cual le garantiza sobrevivir por largos períodos y es provocada como consecuencia de un entorno desfavorable que genera condiciones de estrés dentro de la célula y como resultado se produce la acumulación de astaxantina^{6, 29, 30}.

Una vez las condiciones vuelven a ser favorables para su crecimiento *H. pluvialis* transforma su estadio de aplanospora a célula vegetativa procedente de aplanospora y de una manera muy rápida comienza a sufrir cambios como la sustitución de su pared celular rígida por una gelatinosa y lábil e inicia a disminuirse la concentración de astaxantina. Desde el punto de vista investigativo este cambio resulta ser muy importante y clave ya que en la transición de un estadio a otro la célula aún presenta una alta acumulación de astaxantina y su pared es más frágil por lo tanto resulta más fácil la recuperación de este metabolito^{30, 31, 32}.

Figura 1 Ciclo celular *H. pluvialis* “Astaxantina, el oro rojo de la microalga *H.pluvialis*, 2006”³⁰.

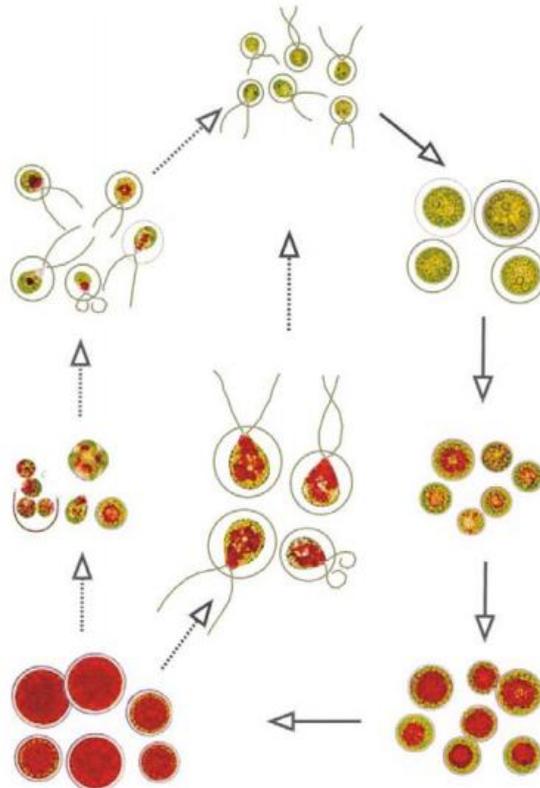
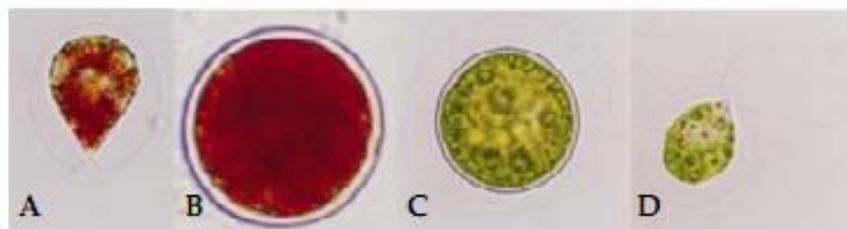


Figura 2 Estadios del ciclo de vida de *H. pluvialis* A) Célula vegetativa procedente de aplanospora; B) Aplanospora; C) Palmella; D) Célula vegetativa “Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, 2006”³⁰.



4.1.2 Requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.

Para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* y su posterior producción y acumulación de astaxantina ya sea en un ambiente natural o artificial es necesario que en su entorno existan condiciones biológicas, químicas y físicas apropiadas. El crecimiento y la producción de astaxantina son dos procesos que, aunque sean llevados dentro de la misma célula, requieren condiciones diferentes que favorezcan cada etapa.

Inicialmente para que la microalga aumente su biomasa se debe tener en cuenta que el cultivo se lleve a cabo en un medio acuoso que les suministre a las células fuentes de carbono, oxígeno, nitrógeno, y minerales ³³. Como lograron inferir Camacho y colaboradores en una revisión bibliográfica, las mejores condiciones para el crecimiento de *H. pluvialis* son el uso de medios de cultivo que garanticen el suministro de los nutrientes necesarios como lo son el BG11, Optimal *Haematococcus* Medium (OHM) o Bold Basal Medium (BBM); y además de esto, asegurar que se cumplan condiciones tales como mantener un pH preferiblemente neutro o cercano, someter el cultivo a ciclos de luz (20 horas) - oscuridad (4 horas) con lámparas de luz blanca, proporcionar una temperatura promedio de 25 °C, aplicar agitación continua y proveer un 5% de CO₂ ³⁴.

Se han realizado muchas investigaciones al respecto para así evaluar factores óptimos en estos procesos que incluyen variaciones de diversas características como lo son la composición de los medios de cultivo, temperatura, pH, agitación, intensidad lumínica, aireación, concentraciones de diferentes sales, exposición a campos magnéticos entre otros.

4.1.3 Factores que estimulan el crecimiento de *H. pluvialis* y su producción de astaxantina

Para que *H. pluvialis* logre dividirse y aumentar su biomasa, las condiciones a su alrededor deben ser favorables, sin ningún tipo de factor que genere estrés en la célula; por otra parte, para que produzca astaxantina las condiciones en su entorno deben ser totalmente contrarias, desfavorables y estresantes. Existen algunas características claves en estos procesos como las que se describen a continuación:

- Disponibilidad de luz:

Las microalgas tienen una capacidad cuatro veces mayor que cualquier planta de utilizar la energía luminosa para generar energía química y tienen la característica de ser fotoautótrofas, fotoheterótrofas o mixotróficas. Normalmente en condiciones de cultivo las microalgas son organismos fotoautótrofos por lo tanto tienen una constante necesidad lumínica natural o artificial, ellas usan la luz como fuente de energía y el CO₂ presente como fuente de carbono para así llevar a cabo el proceso de fotosíntesis ^{13, 35, 36}.

H. pluvialis ha sido sometida a diversas investigaciones que han demostrado que las variaciones en la exposición lumínica y en los colores emitidos por las lámparas son elementos clave en su ciclo vital. Se ha evidenciado que brindar al cultivo una iluminación roja de 625 nm incentiva el aumento de la biomasa microalgal y que colores de luz entre azul y púrpura con longitudes de onda bajas entre 380 y 470 nm inducen un cambio morfológico de la célula y la acumulación de astaxantina ³⁷. Por otra parte Kim y colaboradores afirman que el factor más importante en la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* es la exposición lumínica y que el uso de luz intermitente mejora la producción y acumulación de la misma y en mayor medida si se utiliza un

método de iluminación interna ³⁸.

- **Suministro de nutrientes:**

Una característica importante en el aumento de biomasa en un cultivo de microalgas es la disponibilidad de nutrientes que el medio proporcione, lo cual ha sido un gran problema al momento de mantener una producción continua de células vegetativas en cultivos a gran escala. Fábregas *et. al.* lograron establecer el medio de cultivo OHM el cual resulta óptimo para este proceso ya que proporciona además de nutrientes algunas vitaminas tales como tiamina, biotina y cobalamina que en conjunto aumentan la productividad de las células del cultivo ³⁹.

En general las microalgas necesitan principalmente de nutrientes que aumenten su biomasa como el carbono que se incorpora en el medio normalmente como CO₂ o como alguna sal en forma de carbonato o bicarbonato, el nitrógeno que se suministra como nitratos, amonios o aminoácidos, el oxígeno que es obtenido por las células del mismo CO₂ y del agua del medio liberado como O₂ en la fotosíntesis, el hidrógeno presente en el agua del cultivo y el fósforo suministrado en forma de fosfatos, además de esto los cultivos algales necesitan de macronutrientes como el calcio, magnesio, azufre y potasio cuya función principal no es aumentar su biomasa sino mantener el equilibrio iónico y la presión osmótica adecuados en el medio y de micronutrientes como el hierro, manganeso, cobre, molibdeno y cobalto los cuales se agregan al medio en mínimas cantidades cuya función es actuar como cofactores de enzimas, adicionalmente estos cultivos también pueden requerir de un suministro vitamínico ^{4,33}.

Cuando la disponibilidad de nutrientes disminuye la célula se somete a un ambiente estresante lo cual resulta ser un factor estimulante en la producción de astaxantina, normalmente se han estudiado parámetros como lo son la limitación de las fuentes de nitrógeno, fósforo, azufre y magnesio y las altas concentraciones de sales ^{40, 41, 42}.

- **Temperatura:**

La temperatura es un factor que influye directamente en el crecimiento y en la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* debido a las variaciones a lo largo del tiempo, la importancia de esta radica en que es de suma importancia en la disociación de las moléculas de carbono para ser utilizadas en el proceso de fotosíntesis y también en que los cambios en la misma pueden alterar las rutas metabólicas incluyendo la biosíntesis de los carotenoides, por lo tanto alterar el equilibrio iónico del medio, el pH y la solubilidad del O₂ y del CO₂ ^{9, 43, 44}.

La temperatura óptima para el desarrollo de biomasa en las especies de microalgas es variable y oscila entre 28 a 35 °C ⁴⁵. Según Wan y colaboradores para que *H. pluvialis* logre un aumento de biomasa y una acumulación de astaxantina considerablemente altas se debe brindar al cultivo una temperatura diurna entre 23 a 28 °C y una temperatura nocturna

inferior a 28 °C ⁹.

- **pH y aireación con CO₂:**

El pH es un factor clave en el rendimiento y alta productividad de un cultivo de microalgas ya que si no se mantiene un valor óptimo puede provocar una inhibición del desarrollo celular, a un pH muy alto las células no logran absorber efectivamente los nutrientes esenciales del medio por lo tanto limitar su crecimiento y a un pH bajo las células en cultivo pueden morir ^{13, 43}.

Las microalgas requieren de un rango de pH que oscila entre 7 y 9 para crecer de manera óptima, pero lo más efectivo para especies de agua dulce es mantener un pH de 8 ^{45, 46}. A medida que el cultivo envejece se van acumulando minerales y oxidando compuestos lo cual causa un aumento en el pH del medio y por esto la forma más efectiva de controlarlo adecuadamente es suministrando aireación con CO₂ provocando una disminución del mismo, el pH también puede ser controlado con la adición de soluciones ácidas o básicas ^{43, 47}.

Además de lo anterior la adición de CO₂ también es de suma importancia en el cultivo de microalgas ya que es la mayor fuente de carbono que utilizan las células en su producción de biomasa ³³.

- **Agitación:**

La importancia de la agitación en el cultivo de microalgas radica en garantizar una mezcla homogénea de los nutrientes y del acceso a condiciones ambientales para todas las células al intervenir en su precipitación y al favorecer su intercambio gaseoso, este mezclado se puede generar de manera mecánica en los cultivos en fotobiorreactores y también por medio del proceso de aireación ^{48, 49}.

4.2 Clorofila

Las clorofilas son un grupo de pigmentos verdes tetrapirrólicos presentes en plantas y algas, organismos en los que cumplen un papel importante en el proceso fotosintético de donde obtienen la energía para llevar a cabo funciones de metabolismo, crecimiento y reproducción ⁵⁰. Estructuralmente son moléculas que poseen una parte con carácter hidrófobo y una parte con carácter hidrofílico, son porfirinas que están conformadas por un anillo plano de grupos pirroles unidos por 4 enlaces de puentes metilénicos que en su interior contienen magnesio ^{51,52}.

En este grupo de pigmentos la más importante y abundante en la naturaleza es la clorofila-*a*, junto con la clorofila-*b* son componentes esenciales del sistema de fotosíntesis de plantas y algas verdes, la clorofila-*a* es imprescindible en la fotoquímica y la clorofila-*b* es muy necesaria para estabilizar las proteínas captadoras de luz de la molécula ^{51, 53}. La clorofila-*a* está presente en algas azul-verdosas y algunas algas rojas, los otros tipos de clorofilas son pigmentos

accesorios de la clorofila-a y cumplen la función de transferir la energía lumínica hasta ella, por lo tanto trabajan conjuntamente; las clorofilas *a* y *b* están presentes en plantas superiores y algas verdes, las clorofilas *a* y *c* se hallan en diatomeas y algas pardas y las clorofilas *a* y *d* están en algunas algas rojas ^{54, 55}.

Según Streit *et. al.* la clorofila se usa como colorante natural en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos por estar altamente relacionada con procesos anti inflamatorios, antioxidantes, profilácticos, coagulantes (antiagregante plaquetario), vasoconstrictores y reductores en el riesgo de contraer cáncer ⁵¹.

4.3 Carotenoides

Los compuestos carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente natural, forman el segundo compuesto más abundante en la tierra luego de la clorofila y son sintetizados de manera natural en algunos organismos como plantas superiores, plantas inferiores, hongos, levaduras, y bacterias ^{49, 56}.

En general la estructura básica de un carotenoide es un tetraterpeno de 40 carbonos, lineal y simétrico, se dividen en dos grupos principales: los carotenos que son hidrocarburos (C₄₀H₅₆) como el α - caroteno, β -caroteno y licopeno y las xantofilas que son la variación oxigenada (C₄₀H₅₆O₂) como la astaxantina, luteína y cantaxantina ^{57, 58}.

Los carotenoides cumplen diversas funciones dentro de los organismos, algunas de ellas son brindar colores atractivos a diversas frutas, vegetales, flores, plumajes de aves, esqueleto de peces y crustáceos, pero la función más importante es en el proceso de fotosíntesis al lograr captar energía luminosa que no puede ser captada por la clorofila por sí sola, esto les confiere una característica protectora de los fotosistemas contra el daño oxidativo ^{49, 59}.

4.3.1 Fuentes naturales de carotenoides.

Ya que los animales y los humanos no tenemos la capacidad de sintetizar de manera natural los carotenoides debemos obtenerlos por medio de nuestra alimentación ⁵⁷. Los carotenoides están presentes en muchos alimentos como los vegetales de hojas verdes, las frutas, las flores, en algunos peces y crustáceos, en la tabla 1 se relacionan algunos alimentos con los carotenoides que contienen ^{60, 61}.

Tabla 1 Fuentes alimenticias de carotenoides. ^{60, 61}

Fuente alimenticia (nombre científico)	Carotenoides presentes
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	α - y β -caroteno
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Violaxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Violaxantina, β -caroteno
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Licopeno

Pimiento rojo (<i>Capsicum anuum</i>)	Capsantina, capsorrubina
Melocotón (<i>Prunus persica</i>)	β -criptoxantina, luteína
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	β -criptoxantina, β -caroteno
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	Licopeno, β -caroteno
Ciruela (<i>Spondias lutea</i>)	β -criptoxantina
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) Maiz (<i>Zea mays</i>) Tagetes (<i>Tagetes erecta</i>) Huevo de gallina	Luteína, zeaxantina
Salmón (<i>Salmo spp</i>) Crustáceos Microalgas Levaduras	Astaxantina
Crustaceos	Cantaxantina
Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)	Crocentina

Además de un consumo por parte de los mamíferos como requerimiento nutricional de fuentes naturales los carotenoides también son producidos y obtenidos sintéticamente para algunos fines industriales normalmente generados a partir del cultivo de microalgas que los producen, así se muestra en la tabla 2.

Tabla 2 Carotenoides obtenidos industrialmente ⁵⁶

Especie de microalga	Tipo de carotenoide	Usos y aplicaciones
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno.	Se conoce por su actividad antioxidante y es usada en cosméticos y en suplementos nutricionales.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina Cantaxantina Luteína	Antioxidante y fotoprotector. Se emplea en acuicultura para pigmentación en peces y ayuda al crecimiento del salmón y la trucha.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cantaxantina Astaxantina Luteína	Complemento dietético. Se emplea como combustible y colorante de alimentos naturales.
<i>Coelastrella striolata</i> <i>var. Multistriaa</i>	Cantaxantina Astaxantina β -caroteno	Evaluación de la contaminación de agua; es posible estimar espectrofotométricamente el contenido de nitrógeno en ésta.
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Luteína β -caroteno	Aditivos alimenticios, sector cosmético, además de emplearse en el sector energético y farmacéutico

<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Violaxantina Antheraxantina Zeaxantina	Superalimento y suplemento dietético. Se le atribuye propiedades como controlar el peso, prevenir el cáncer e incrementar las defensas del sistema inmunológico
<i>Spirulina platensis</i>	β -caroteno β -criptoxantina Astaxantina Zeaxantina Equinenona	Se usa como suplemento dietético, contiene proteínas, glúcidos, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas y algunos minerales.
<i>Chlorella zofingensis</i>	Luteína	Productor de astaxantina con aplicaciones en alimentos, piensos, nutracéuticos y la industria farmacéutica.

4.3.2 Efectos positivos sobre la salud.

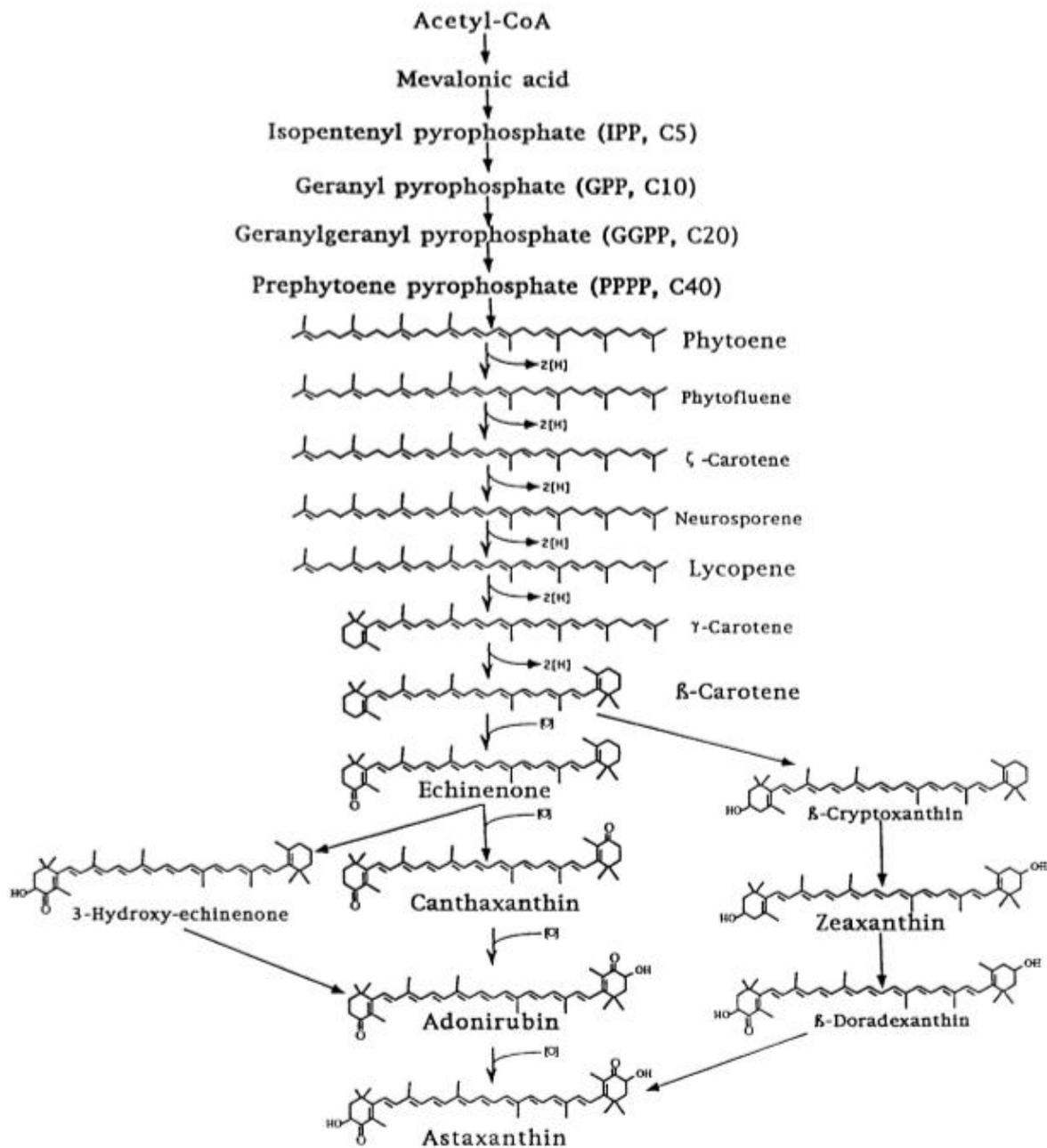
Normalmente los carotenoides se incorporan a la dieta para generar efectos saludables en el cuerpo, generalmente se obtienen del consumo de alimentos naturales o a manera de suplementos. Estos son potentes antioxidantes y su papel ha sido investigado como factor de prevención en enfermedades crónicas, el β -caroteno y el licopeno están relacionados a la prevención de enfermedades como el cáncer, cardiopatías, enfermedades de la piel y la osteoporosis, la luteína y la zeaxantina, por su parte, interfieren en los trastornos de la visión ^{62, 63, 64}.

4.4 Astaxantina.

Es un carotenoide xantófilo terpenoide, lo cual le otorga su característica de pigmento liposoluble. Se extrajo originalmente del cangrejo de río *Astacus* y se ha venido identificando en otras especies animales, algunos hongos, y algas productoras del pigmento como *H. pluvialis*.

Éste pigmento posee diferentes características entre las cuales se destaca la actividad antioxidante; esto debido a que es capaz de absorber la energía liberada por los radicales libres que se producen en las diferentes reacciones metabólicas del cuerpo humano dentro de la cadena carotenoide, protegiendo así los tejidos del daño que puede causar la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados; también se ha demostrado una mayor efectividad en comparación con la vitamina E y el β -caroteno para prevenir y tratar la fotooxidación; la inflamación; las úlceras causadas por la infección por *Helicobacter pylori*; e incluso el cáncer. Es responsable también de promover el buen funcionamiento del sistema inmunológico y diferentes órganos ⁶⁵.

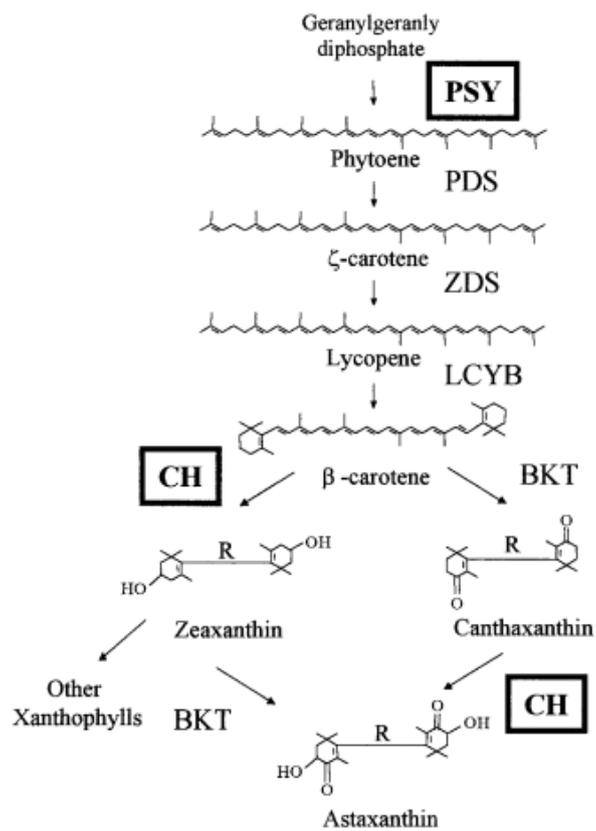
Figura 4 Ruta de biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis* "A technical review of Haematococcus algae, 1999" ⁶⁸.



La producción de astaxantina está regulada por una serie de procesos químicos que a su vez están mediados directamente por la expresión de dos genes principales para la síntesis de los carotenoides en general: el gen PSY, responsable de la producción de la enzima fitoeno sintasa, la cual condensará dos moléculas de GGPP (geranyl-geranyl difosfato) para producir fitoeno; y el gen PDS, que genera la enzima fitoeno desaturasa, que catalizará la conversión de fitoeno en zeta-caroteno. Dos genes implicados en la producción específica de astaxantina, luego de la acción de los anteriormente mencionados, son el BKT y CHY, β-caroteno cetolasa y caroteno hidroxilasa, respectivamente. Genes que codificarán para enzimas

encargadas de la conversión del β -caroteno en cantaxantina, para el caso de la enzima β -caroteno cetolasa, que cumple la función de adicionar dos grupos ceto a los carbonos de la posición 4 y 4'; y para el caso de la enzima caroteno hidroxilasa, la cual añade dos grupos hidroxilo a los carbonos 3 y 3' de los anillos β -ionona ubicados en cada extremo de la cadena, formando así la molécula de astaxantina^{70, 71}. Estos genes han sido identificados en diferentes especies de plantas superiores, microalgas, bacterias y levaduras, pero han demostrado ser mucho más eficientes en la producción de la astaxantina por parte de *H. pluvialis*⁷².

Figura 5 Genes relacionados con la producción de astaxantina “Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, 2001”⁴¹.



4.4.2 Beneficios para la salud.

La actividad antioxidante de la astaxantina se reportó como 10 veces más efectiva frente a otros carotenoides como la luteína y el β -caroteno en un estudio realizado por Miki en 1991, estudio en el cual la denominaron “súper vitamina E”⁷³. La astaxantina, así como la luteína y la zeaxantina, es de los únicos carotenoides que cuenta con la capacidad de atravesar la barrera hematorretiniana y allí ejercer su acción de antioxidante y fotoprotectora. Otras de las propiedades que se destacan por sobre los demás α - y β - carotenos es la de prevenir las enfermedades isquémicas, enfermedades asociadas al envejecimiento y el cáncer⁷⁴.

4.5 Biorreactores

Los biorreactores son equipos que llevan a cabo reacciones biológicas favorecidas por la generación de ambientes propicios para el cultivo *in vitro* de organismos y su posterior producción de sustratos para fines específicos ⁷⁵. La primera vez que se utilizó esta técnica para el cultivo de plantas fue en 1981 usando un biorreactor de columna de burbujas y desde entonces se ha venido estudiando la manera de mejorar este bioproceso para así aplicarlo de manera eficaz en campos afines.

La función de los biorreactores es asegurar que en su interior se mantengan condiciones óptimas en el cultivo que puedan ser analizadas y controladas de manera externa como pH, agitación, aireación, temperatura, suministro de nutrientes, transferencia lumínica y disminución del riesgo de contaminación, esto se logra con el uso de sistemas de control para las biorreacciones.

Actualmente a nivel industrial se están llevando a cabo bioprocesos a gran escala con el fin de generar compuestos de manera masiva, cada vez se incrementa más el uso de biorreactores con esta finalidad biotecnológica.

4.5.1 Clases de biorreactores

Principalmente los biorreactores se clasifican en tres según la manera en que se alimenta el sistema de cultivo:

- **Continuo:** Este cultivo consta de una línea de entrada para incorporar nutrientes y de una línea de salida para extraer productos, con el fin de asegurar una producción estable a través del tiempo.
- **Semicontinuo o fed-batch:** Es un cultivo que tiene una línea de entrada para así alimentarlo constantemente pero carece de una línea de salida, esto asegura una alta producción.
- **Discontinuo o batch:** En el inicio del cultivo se coloca en el biorreactor la carga total del proceso para el tiempo determinado, no se alimenta posteriormente.

4.5.2 BIOSTAT ® A PLUS:

Este biorreactor es utilizado en este proyecto de investigación ya que es adecuado para procesos de cultivo de microorganismos y células de manera continua o discontinua. Es un equipo compacto, autoclavable, de material de vidrio translúcido, cuenta con una capacidad de 5 L y con un sistema electrónico de control para pH, agitación, aireación, temperatura, etc., usado para el cultivo de bacterias, levaduras, hongos y de células animales y vegetales, ideal para proyectos educativos e investigativos (ver figura 6, 7 y tabla 3).

Figura 6 Biorreactor BIOSTAT® A plus “El biorreactor compacto autoclavable”⁷⁶



Figura 7 Partes del biorreactor BIOSTAT® “Culture Vessels and Equipment UniVessels®”⁷⁷

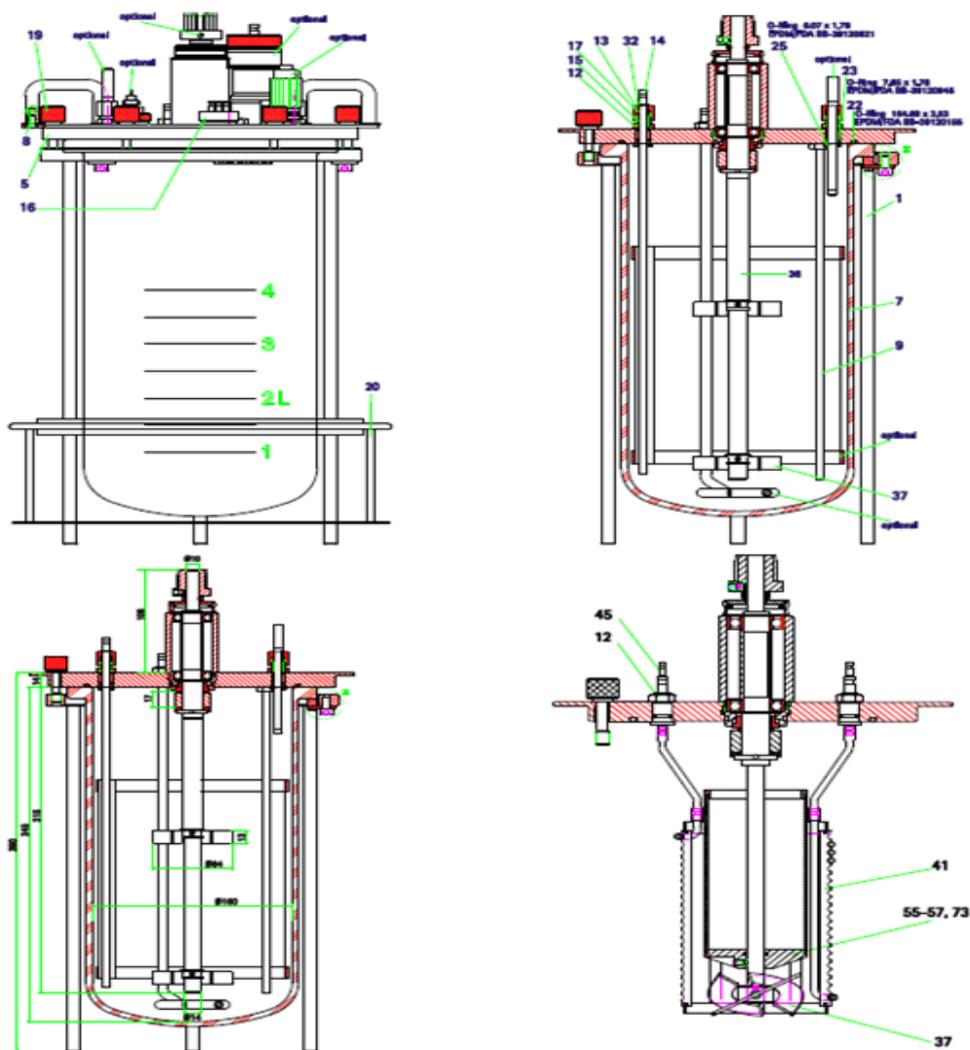


Fig.: UniVessel® 5.0 L, single walled, overview on design, dimensions and equipment

Tabla 3 Descripción partes del biorreactor BIOSTAT® “Culture Vessels and Equipment UniVessels®” ⁷⁷

ITEM	CANTIDAD	DESCRIPCION	REFERENCIA
1	1	Soporte para vaso de 5 L	BB-38244314
5	1	Placa superior, diámetro	BB-38351382
6	2	Manijas	BB-39200485
	1	Anillo	BB-39120155
7	1	Recipiente de reacción, pared simple, diámetro interno 160x345	BB-39204774
8	4	Tornillos avellanados	BB-39501876
19	6	Tornillo moleteado	BB-38352397
20	0	Soporte de botella	BB-8847436
27	6	Tornillos de cabeza ranurada	BB-39501140
28	3	Placa superior	BB-38533421
29	3	Soporte	BB-38413833
32	3	Tornillo de cabeza hexagonal	BB-39506231
62	0	Manta térmica 5L, 230 V/50 Hz/400 W	BB-8807552
63	0	Manta térmica 5L, 120 V/50 Hz/400 W	BB-8807551
64	1	Manta térmica 5L, 115 V/60 Hz/400 W	BB-8807434
65	1	Manta térmica 5L, 230 V/50 Hz/400 W	BB-8807426
66	0	Diodo de enfriamiento	BB-8847827

4.6 Modelos de crecimiento

Un modelo de crecimiento nos permite predecir el comportamiento poblacional que tendrá un microorganismo en un periodo de tiempo determinado. Las microalgas presentan un crecimiento similar al microbiano y generalmente se ve evidenciado en diferentes fases: en la primera, las células se multiplican hasta un límite máximo, correspondiente a la fase logarítmica; en la siguiente, las células mantienen un número poblacional estable, fase estacionaria; finalmente, entran en un periodo de muerte donde la tasa disminuye debido al agotamiento de nutrientes en el medio.

En una investigación se cultivó la microalga *Dunaliella tertiolecta* y se estudió su cinética de crecimiento, la cual se analizó por medio del uso de modelos matemáticos como el logístico; Gompertz modificado; Richards modificado; Schnute modificado; Baranyi-Roberts; Von Bertalanffy, con el fin de establecer el modelo más efectivo y preciso a la hora de predecir el comportamiento poblacional. Los resultados obtenidos evidenciaron que el modelo Baranyi-Roberts es adecuado para predecir el crecimiento de microalgas debido a su alta capacidad de ajuste y a que tiene en cuenta variables que pueden afectar el proceso (ver tabla 4) ⁷⁸.

Tabla 4 Principales modelos matemáticos de crecimiento. "Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*" ⁷⁸

MODELO	n	FORMULA
Modificado Logístico	3	$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp \left[\frac{4\mu_{max}}{A} (\lambda - t) \right] + 2 \right\}}$
Modificado Gompertz	3	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{max} e}{A} (\lambda - t) \right] + 1 \right\}$
Modificado Richards	4	$y = A \left\{ 1 + v \exp(1 + v) \exp \left[\frac{\mu_{max}}{A} (1 + v) \left(1 + \frac{1}{v} \right) (\lambda - t) \right] \right\}^{\left(\frac{-1}{v} \right)}$
Modificado Schunte	4	$y = \left(\mu_{max} \frac{(1 - \beta)}{\alpha} \right) \left[\frac{1 - \beta \exp(\alpha \lambda + 1 - \beta - \alpha)}{1 - \beta} \right]^{\frac{1}{\beta}}$
Baranyi- Roberts	4	$y = A + \mu_{max} x + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(e^{-\mu_{max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max} x - h_0} \right) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{max} x + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(e^{-\mu_{max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max} x - h_0} \right)}}{e^{(y_{max} - A)}} \right)$
Von Bertalanffy	3	$y = K \left[1 - \left[1 - \left(\frac{A^3}{K} \right) \right] \exp \left(- \left(\frac{m}{K^n} \right) \right) \right]^3$
Huang	4	$y = A + y_{max} - \ln \left(e^\lambda + (e^{y_{max}} - e^\lambda) e^{-\mu_{max} B(x)} \right)$ $B(x) = x + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-n(n-1)}}{1 + e^{n-1}}$
Buchanan Fase Tres Modelo Lineal	3	$Y = A \text{ IF } X < LAG$ $Y = A + K(X - \lambda) \text{ IF } \lambda \leq X \leq X_{max}$ $Y = Y_{max} \text{ IF } X \geq X_{max}$

nota:

a= asíntota bacteriana inferior

μ_{max} = tasa máxima de crecimiento específico

v= punto cerca del cual se presenta un crecimiento máximo asíntótico

λ = tiempo de retraso

y_{max} = asíntota bacteriana superior

e= exponente (2.718281828)

t= tiempo de muestreo

α, β, k = parámetros de ajuste de curva

h_0 = parámetro dimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células (dia^{-1}) puede ser calculado como $h_0 = \mu_{max}$

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental, porque como lo menciona Sampieri en su libro “Metodología de la investigación (2014) ⁷⁹” estos diseños se emplean cuando el investigador busca establecer el posible efecto de una causa que se manipula, por ello en este estudio se hizo una manipulación intencional de las variables independientes, una medición de las variables dependientes, se compararon dos grupos diferentes y se llevó a cabo un proceso de control y validez de los resultados.

5.1.1 UNIVERSO

Microorganismos productores de astaxantina y clorofila.

5.1.2 POBLACIÓN

Microalgas.

5.1.3 MUESTRA

La microalga *H. pluvialis*, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, universidad de Texas, Austin TX, EEUU “UTEX”); suministrada por la facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana.

5.2 Hipótesis

Mediante el uso del biorreactor BIOSTAT ® A PLUS, y la implementación de medios de cultivo como el BBM y RM en condiciones como pH 6,8; temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; fotoperiodo 18 h luz: 6 h oscuridad; luz blanca, azul y roja con leds; irradiancia 180 hasta 210 lux; aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min; agitación 100 rpm, se logrará obtener una biomasa adecuada en calidad y cantidad de la microalga *H. pluvialis*.

5.3 Variables

5.3.1 VARIABLES DEPENDIENTES

Crecimiento de las microalgas, astaxantina, clorofila

- Indicadores: cel/mL, astaxantina ug/mL, clorofila ug/mL.

5.3.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

H. pluvialis, luz y deficiencia de nitrógeno.

- Indicadores: 1×10^4 cel/mL (10% del inóculo),
- pH: 6,8;
- Temperatura: $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Fotoperiodo 18 h luz: 6 h oscuridad;
- Luz blanca, azul y roja con leds;
- Irradiancia: 180 hasta 210 lux;
- Aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min;
- Agitación: 100 rpm.

5.4. METODOLOGÍA

- FASE 1

Realización del cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio MES Volvox.

Se realizó el primer cultivo a partir de la cepa de referencia transferida a dos frascos Schott con 500 mL de medio de cultivo MES Volvox (Ver tabla 5) estéril ajustado a un pH de 6,8, con fotoperiodos de 18 horas de exposición a luz blanca con una lámpara fluorescente marca Philips de 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia ≈ 65 lux y 6 horas de oscuridad, a temperatura de $22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, aire filtrado y agitación manual diaria durante 10 segundos al día durante 12 días.

Tabla 5 Composición del medio de cultivo MES volvox ⁸⁰.

Medio MES volvox		
Buffer MES		1,95 g/L
Nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)		117,8 mg/L
Glicerofosfato sódico pentahidratado (Na_2 - glicerofosfato* $5\text{H}_2\text{O}$)		60 mg/L
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)		40 mg/L
Cloruro de potasio (KCL)		50 mg/L
Cloruro de amonio (NH_4Cl)		26,7 mg/L
Biotina (vitamina H)		0,0025 mg/L
Cianocobalamina (vitamina B12)		0,0015 mg/L
Solución madre de microelementos 6 ml/l	Ácido etilendiaminoacético disódico (Na_2EDTA)	750 mg/L
	Cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	97 mg/L
	Cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	41 mg/L
	Cloruro de zinc (ZnCl_2)	5 mg/L
	Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2 mg/L
	Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4 mg/L
pH= 6,7		

Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio BBM y RM

Se inoculó un volumen de 1×10^4 cel/mL en el Biorreactor BIOSTAT ® A PLUS en relación 1:10 con medios BBM y RM. Los primeros 15 días se ajustaron fotoperiodos de 18 horas luz - 6 horas oscuridad con lámpara fluorescente marca Phillips de 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia ≈ 65 lux y los siguientes días del cultivo se realizó un cambio a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux y un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad, dicho panel fue donado al proyecto por SMM INGENIERIA SAS, también se proporcionaron

otras condiciones durante todo el cultivo como lo fueron un ajuste de pH a 6,8, una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, agitación de 100 rpm y aire filtrado a 1,7 L/min. Los medios de cultivo BBM y RM presentan diferentes composiciones como se ve en la tabla 6, dicha composición del medio es la que le aporta a la microalga factores nutricionales requeridos en su crecimiento.

Tabla 6 Composiciones de los medios de cultivo RM y BBM. ⁷⁸

MEDIO RM		MEDIO BBM	
Nitrato de sodio (NaNO_3)	300 mg/L	Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	175 mg/L
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	80 mg/L	Cloruro de calcio (CaCl_2)	25 mg/L
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	20 mg/L	Sulfato de magnesio (MgSO_4)	75 mg/L
Sulfato de magnesio heptahidratado o sal de epsom ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 mg/L	Nitrato de sodio (NaNO_3)	250 mg/L
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	58.5 mg/L	Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	75 mg/L
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	7.5 mg/L	Cloruro de sodio (NaCl)	25 mg/L
Cloruro de sodio (NaCl)	20 mg/L	Ácido trioxobórico (H_3BO_3)	11.42 mg/L
Ácido trioxobórico (H_3BO_3)	0.3 mg/L	Sulfato de zinc (ZnSO_4)	8.82 g/L
Sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.5 mg/L	Dicloruro de manganeso (MnCl_2)	1.44 g/L
Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 mg/L	Trióxido de molibdeno (MoO_3)	0.71 g/L
Heptamolibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 mg/L	Sulfato de cobre (CuSO_4)	1.57 g/L
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.08 mg/L	Nitrato cobaltoso ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$)	0.49 g/L

Nitrato de cobalto (Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O)	0.26 mg/L	Sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético (Na ₂ EDTA)	50 g/L
Tricloruro de hierro hexahidratado (FeCl ₃ 6H ₂ O)	17 mg/L	Hidróxido de potasio (KOH)	3.1 g/L

- FASE 2

Evaluación del cambio morfológico de las microalgas.

Se evaluó el crecimiento del primer cultivo en medio MES volvox y de los dos cultivos siguientes en los medios BBM y RM por medio de microscopía en cámara de Neubauer, donde se observó el color, morfología y viabilidad celular cada tercer día durante 36 días tomando tres muestras cada día⁸⁹.

Curva de crecimiento.

Se realizó una curva de crecimiento de *H. pluvialis* teniendo en cuenta el número de células contadas en la cámara de Neubauer de las muestras de cada tercer día, desde el día cero hasta el día 16 para el inóculo en el medio mes volvox y para los dos siguientes cultivos en los medios BBM y RM desde el día 0 hasta el día 36.

pH.

Se realizó control en el cultivo con un pHmetro (Marca Hanna instruments) cada tercer día durante 36 días, cada día se realizó una medición por triplicado.

- FASE 3

Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio.

Los carotenoides suelen contener una alta conjugación de enlaces dobles los cuales se disocian por efecto de la luz, la temperatura y el aire, por ello se recomienda realizar su extracción en ausencia de luz y oxígeno a una temperatura ambiente o menor; otra característica es que son solubles en solventes apolares como el éter etílico, el benceno, el cloroformo, la acetona, el acetato de etilo apoyándose en la utilización de metanol o etanol seguido de una ebullición y una separación por filtración o centrifugación para que el procedimiento de extracción se realice con éxito⁸¹. En este proyecto de investigación se realizó el procedimiento de extracción con metanol al 90% que se describe brevemente a continuación el cual garantiza una mayor concentración de astaxantina.

Método de extracción Metanol 90%.

Se tomó 1mL de cada muestra tomada y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 1mL de metanol al 90% y se calentó durante 10 minutos a 60°C en baño serológico, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Según procedimiento APPA, 1992⁸².

Cuantificación de clorofila y astaxantina.

Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizaron las curvas de calibración respectivas (anexos 3 y 4) con patrones de referencia. Se hizo la lectura espectrofotométrica en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina; se hallaron concentraciones en µg/ml y µg/cel interpolando con la fórmula $y=mx+b$ los datos de las absorbancias a las curvas patrón realizadas (anexo 5). Para la elaboración de las gráficas se tuvo en cuenta la ecuación:

$$\frac{\text{Concentracion del metabolito } (\mu\text{g/mL}) \times \text{volumen muestreado (mL)}}{\text{Numero de celulas en conteo en camara (cel/mL)} \times \text{volumen muestreado (mL)}} = \mu\text{g/cel}$$

- FASE 4

Determinación de la concentración de nitrógeno en el periodo de estudio

Para la determinación de la concentración de nitratos en los dos medios de cultivo BBM y RM se empleó el método de colorimetría por nitración con ácido salicílico, según Filippini y colaboradores (2004) dicho método se basa en el principio de que: “El complejo formado por nitración de ácido salicílico bajo condiciones fuertemente ácidas presenta máxima absorción a una longitud de onda de 410 nm en soluciones básicas (pH > 12). La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de N-NO₃ presente en la muestra⁸³. “

El nitrato se valoró en los medios BBM y RM por medio de una reacción de colorimetría por nitración con ácido salicílico como se describe por Tocquin *et al.* Durante 20 minutos se incubaron 20 µL de medio de cultivo diluidos con 400 µL de ácido salicílico al 2,5% (p/v) en H₂SO₄ al 98%, transcurrido este lapso cada muestra se neutralizó con 500 µL de Hidróxido de sodio (NaOH) 3,8 M⁸⁴.

Cuantificación

Para la cuantificación de los nitratos se realizó la curva de calibración con patrones de referencia (anexo 6). Se hizo la lectura espectrofotométrica en el equipo Jenway 6405, a una longitud de onda de 405 nm, las concentraciones se hallaron en µg/20ml de medio interpolando los datos de las absorbancias a la curva realizada (anexo 7).

Análisis estadístico.

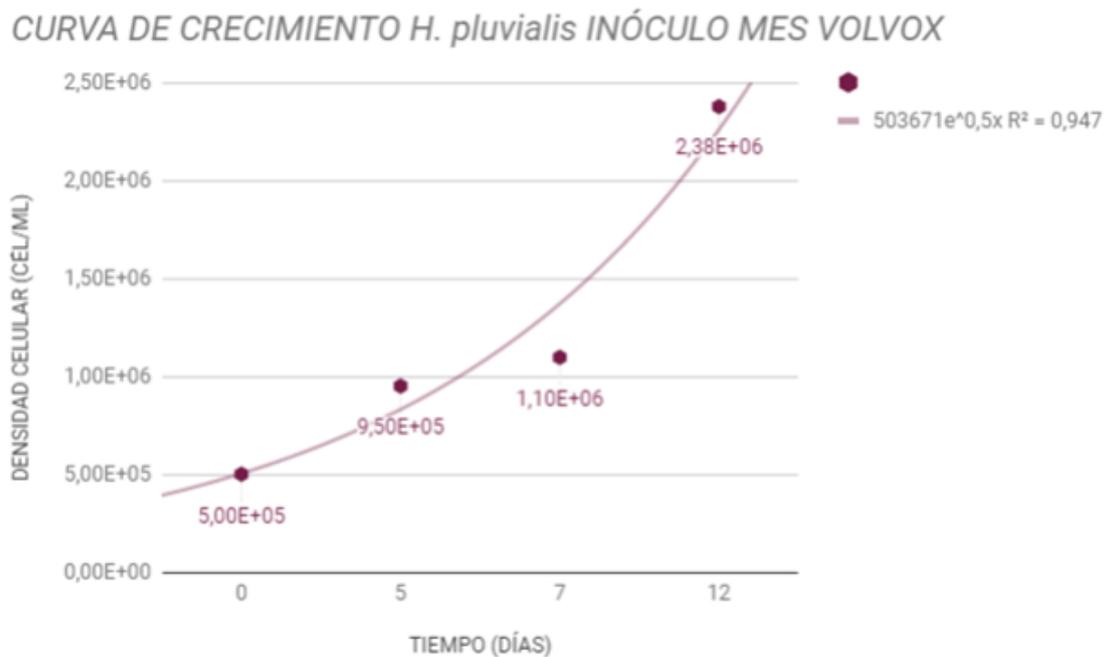
Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la producción de biomasa, la concentración de clorofila, la acumulación de astaxantina y la concentración de nitratos para los medios de cultivo BBM y RM utilizados en este estudio con un nivel de confianza del 95%. Para estos análisis se empleó el programa de Excel 2013 y el software Statplus.

6. RESULTADOS.

Fase 1: Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medios Mes Volvox, BBM y RM

A partir de la cepa pura de referencia (UTEX), se realizó el inóculo de la microalga en medio MES Volvox, con el fin de obtener una densidad celular de mínimo 1×10^4 cel/mL. En este cultivo, el inóculo permaneció 12 días con las siguientes condiciones: fotoperiodo luz-oscuridad de 18 horas luz y 6 oscuridad con lámparas fluorescentes de luz blanca marca Phillips de $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia ≈ 65 lux, temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, pH 6.8 y agitación manual diaria durante 10 segundos. Se realizó la medición de la densidad celular obteniendo a los 12 días del cultivo $2,38 \times 10^6$ cel/mL (ver gráfica 1 y figura 8)

Luego se procedió a tomar el inóculo en una proporción del 10% para el cultivo en los medios BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS. En el inóculo se observaron formas vegetativas biflageladas de color verde correspondientes a la morfología característica de la microalga *H. pluvialis* (Ver figura 9), también es importante resaltar que en ningún momento del experimento se llegó a observar contaminación de algún tipo (ver tabla 9).

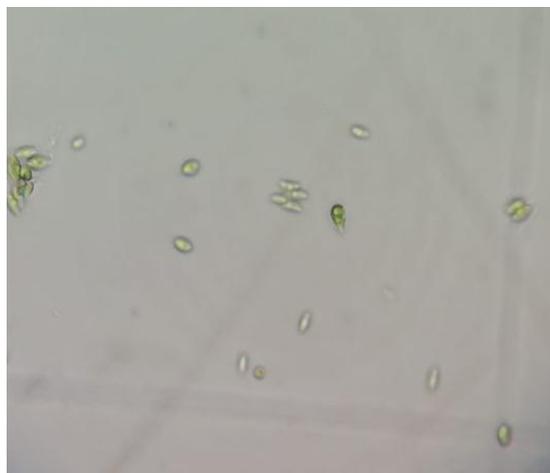


Gráfica 1 Crecimiento de *H. pluvialis* en medio MES Volvox. Elaborada por los autores, 2018.

Figura 8 Inoculo de *H. pluviialis* en medio MES volvox. Tomada por los autores, 2018.



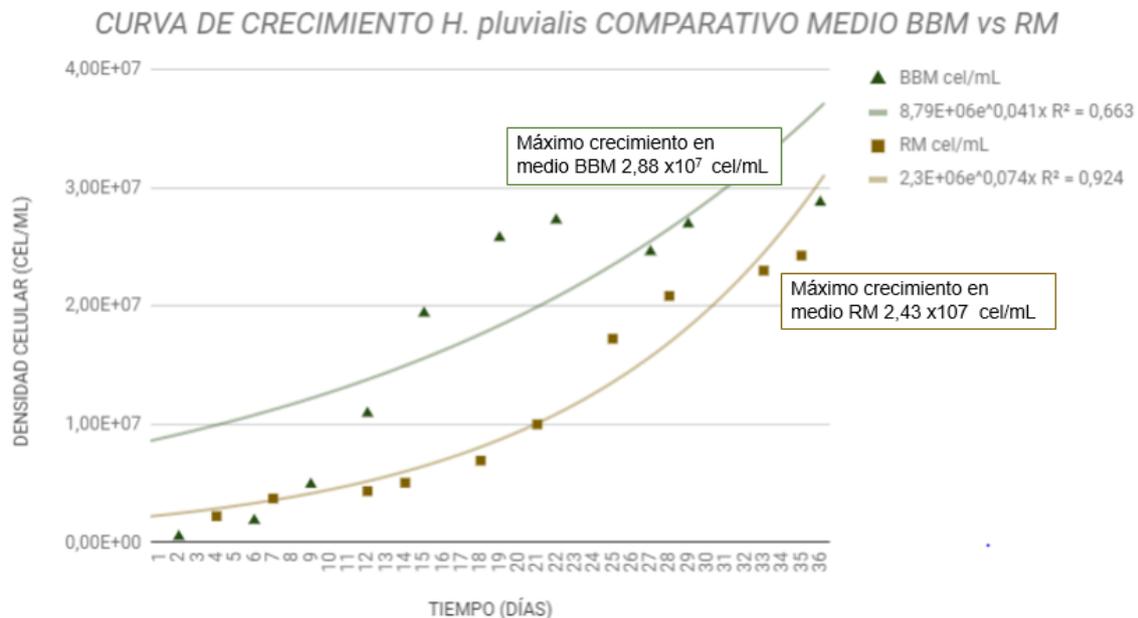
Figura 9 Formas vegetativas biflageladas de *H. pluviialis* en medio MES Volvox. Tomada por los autores, 2018. Tamaño 10X



Los cultivos realizados en los medios BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS se describen en la metodología; en ellos se pudo evidenciar un incremento en la biomasa de la microalga por el cambio colorimétrico producido en cada cultivo,

donde inicialmente presentaba un tenue color verde y a medida que el cultivo transcurría, éste se intensificaba hasta llegar a una coloración verde oscura (ver tabla 8). Lo anterior se confirmó con los conteos realizados en la cámara de Neubauer cuyos resultados arrojaron los datos que se pueden ver relacionados en los anexos 1 y 2.

El conteo celular del cultivo realizado durante 36 días de *H. pluvialis* en los medios BBM y RM se observa en la gráfica 2 y en los anexos 1 y 2.



Gráfica 2: Crecimiento comparativo de *H. pluvialis* en los medios BBM vs. RM. Elaborada por los autores, 2018.

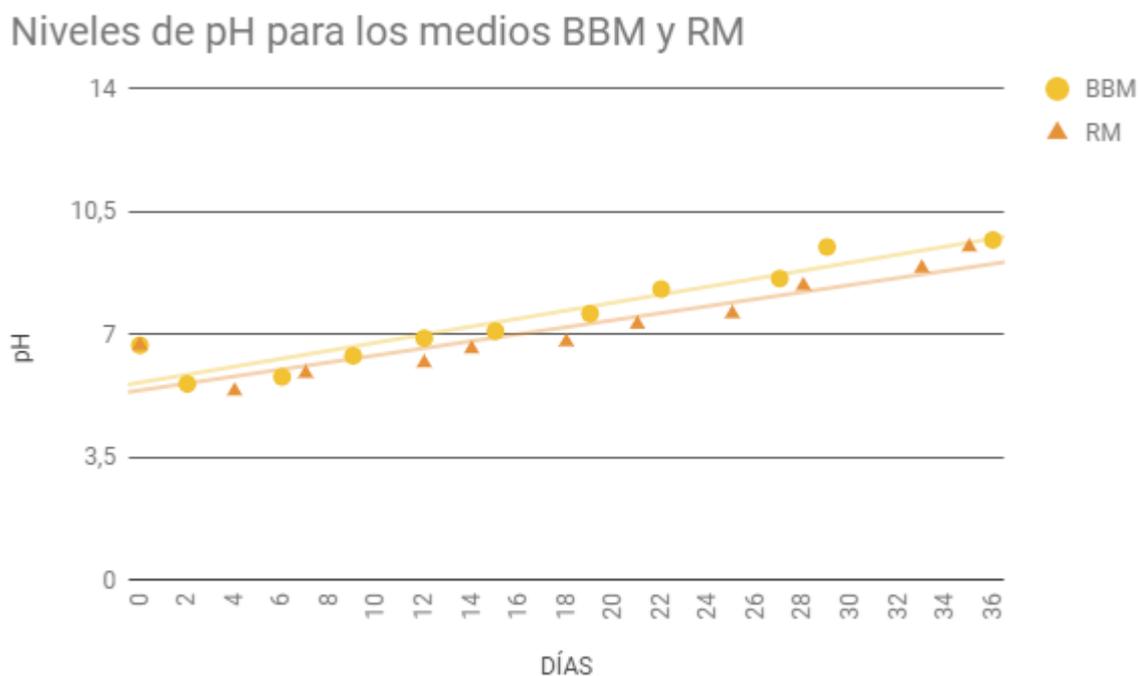
Se evidenció que en el medio RM, se obtuvo un crecimiento microalgal de $2,43 \times 10^7$ cel/mL a los 35 días del cultivo, mientras que en el medio BBM la población celular para el día 36 de cultivo fue de $2,88 \times 10^7$ cel/mL, lo cual representa un aumento en la densidad celular de un 15,62 % en el medio BBM en comparación con el medio RM.

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) del factor “crecimiento celular” (anexo 8), se estableció con un porcentaje de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre el uso del medio de cultivo BBM y el uso del medio de cultivo RM empleados en el experimento ($F: 1,38$; $Valor\ p: 0,25$; $gl: 1$). Esto nos indica que el uso de cualquiera de los dos medios de cultivo ya sea el BBM o el RM resulta muy efectivo para la producción de biomasa de *H. pluvialis* en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS y como característica importante se puede apreciar que el uso del biorreactor proporcionó una preservación de la morfología de la microalga durante todo el tiempo de cultivo resultando favorable en este estudio y no se presentó contaminación.

pH

En relación a las mediciones de pH se debe tener en cuenta que los medios de cultivo BBM y RM inicialmente se ajustaron a un pH de 6,8 (día 0) pero como se puede apreciar en la gráfica 3 dichos niveles disminuyen a 5,6 y 5,4 respectivamente a los dos días de cultivo, lo cual equivale a un porcentaje de disminución inicial para el medio BBM de 16,4 % y para el medio RM de 19,4% esto debido probablemente a un consumo acelerado de nutrientes por parte de la microalga *H. pluvialis* en los primeros días como mecanismo de adaptación al entorno que la rodea.

A medida que avanzaron los estudios se evidenció un aumento progresivo y similar entre los dos cultivos en el nivel de pH llegando hasta una medición de 9,7 para el cultivo en el medio BBM y a 9,5 para el cultivo en el medio RM a los 36 días, equivalente a un porcentaje de aumento al final de los estudios de 44,7% y de 41,7% respectivamente, lo cual es normal por la oxidación de compuestos en los medios de cultivo y por el proceso de fotosíntesis que realiza la microalga.



Gráfica 2 Variación en los niveles de pH para los medios BBM y RM durante el estudio. Elaborada por los autores, 2018.

Tendencia de crecimiento

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores de Y (densidad celular) a los cuales se les calculó el Logaritmo en base 10 para obtener Log vs Tiempo del crecimiento celular. Se realizó el ajuste con el fin de determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los medios probados (ver tabla 7). La velocidad de crecimiento se determinó mediante la fórmula:

$$vel. de crecimiento = (R2/Total días de cultivo) * 100$$

El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM con un aumento de 2,56 células/día, incrementándose en un 20,7% frente al crecimiento en el BBM por día, pero a pesar de esto también fue el medio RM el que tuvo una menor densidad celular de $2,43 \times 10^7$ cel/mL al final del cultivo, equivalente al 15,62% menos en relación al medio BBM que presentó una densidad celular de $2,88 \times 10^7$ cel/mL.

Tabla 7 Determinación de la velocidad de crecimiento en el medio BBM y RM.
Elaborada por los autores, 2018

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
BBM	10	5,7	7,5	2,03	73%
RM	10	6,3	7,4	2,56	92%

Fase 2: Caracterización macroscópica y microscópica de *H. pluvialis* en medio BBM y RM

El periodo de estudio fue de 36 días para cada tratamiento en medios BBM y RM por cultivos no simultáneos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, bajo las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia ≈ 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, agitación de 100 rpm, provisión de CO₂ al 5% y aire filtrado a 1,7 L/min. Luego a partir de ahí los siguientes días del cultivo se realizó un cambio a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux (ver figura 10) con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad para iniciar su fase de estrés y así estimular la acumulación de astaxantina, con esto se evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* en los dos medios realizando el conteo de las células microalgales como se mencionó en la metodología y realizando las curvas de crecimiento observadas en las gráficas 1, y 2 de la fase 1.

El registro fotográfico realizado se puede apreciar en la tabla 8 para los cambios macroscópicos y en la tabla 9 para los cambios microscópicos conforme avanzaba el tiempo, los cuáles fueron muy similares en los dos medios de cultivo.

Figura 10 Panel de luces LED multicolor. Tomada por los autores, 2018.

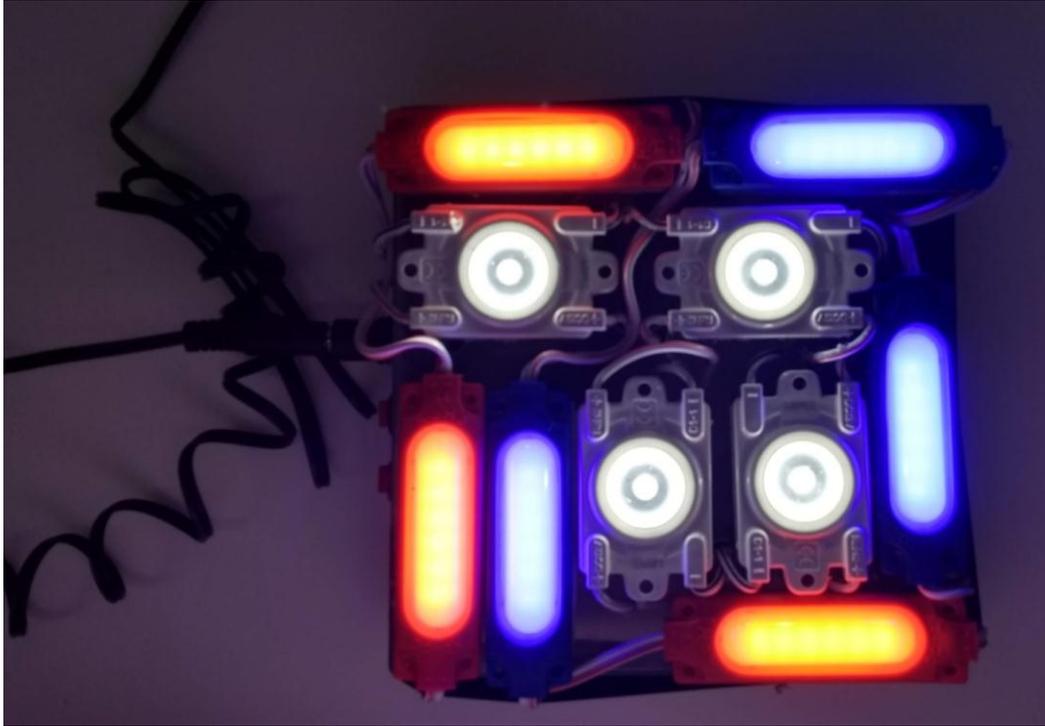


Tabla 8 Registro fotográfico de los cambios macroscópicos de los cultivos en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

Día de cultivo	Medio BBM	Medio RM
----------------	-----------	----------

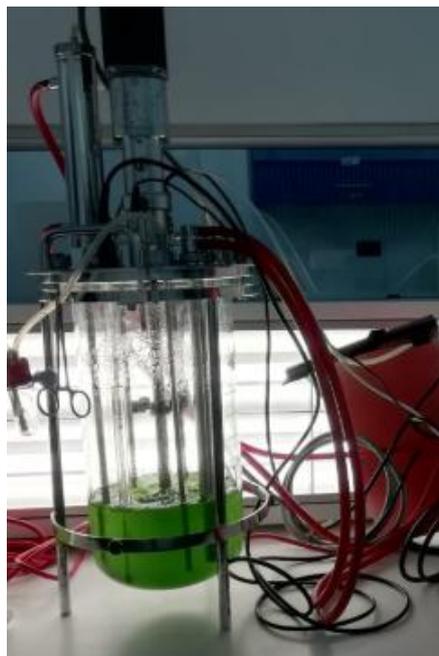
1



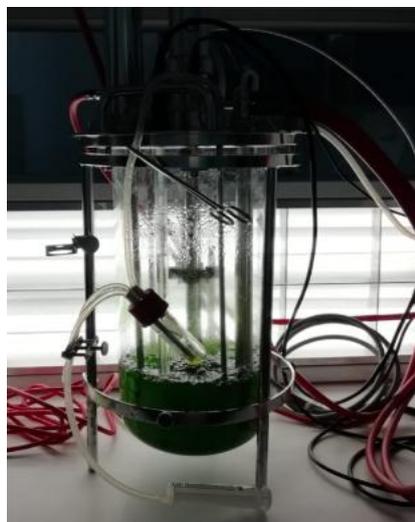
9



12



15



22



29



33



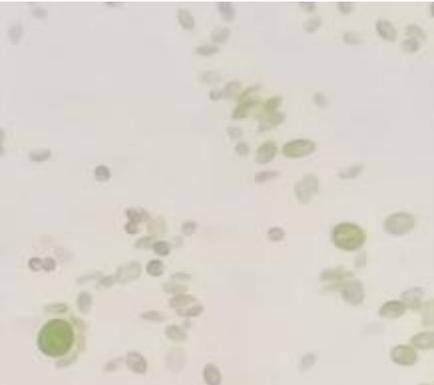
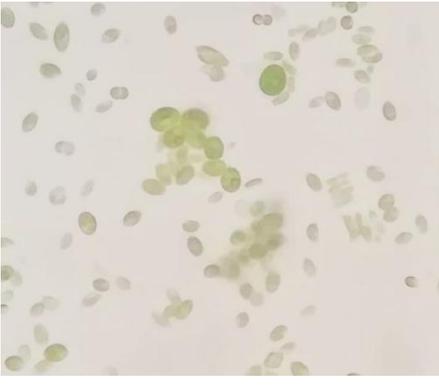
36

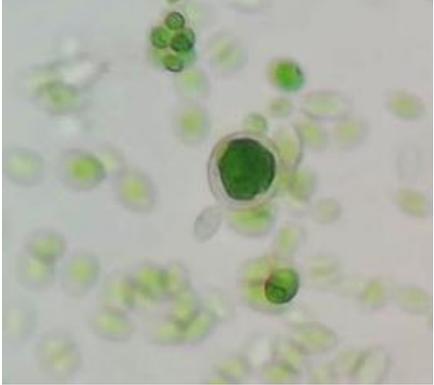
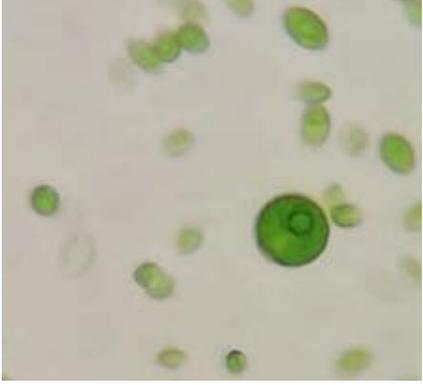
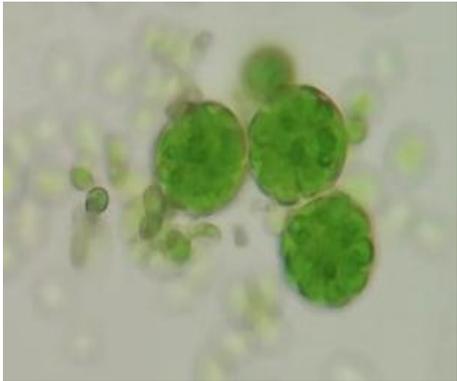
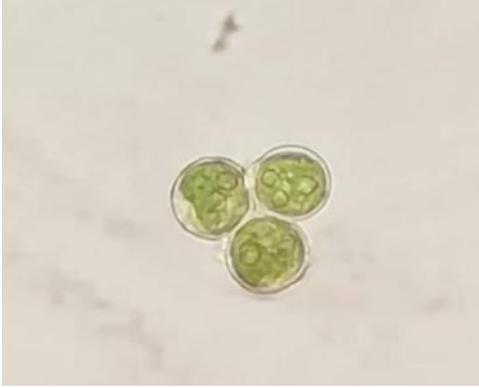
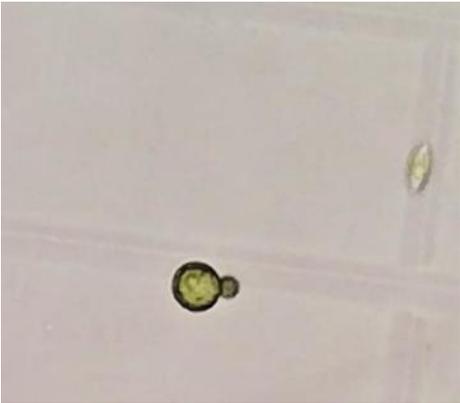


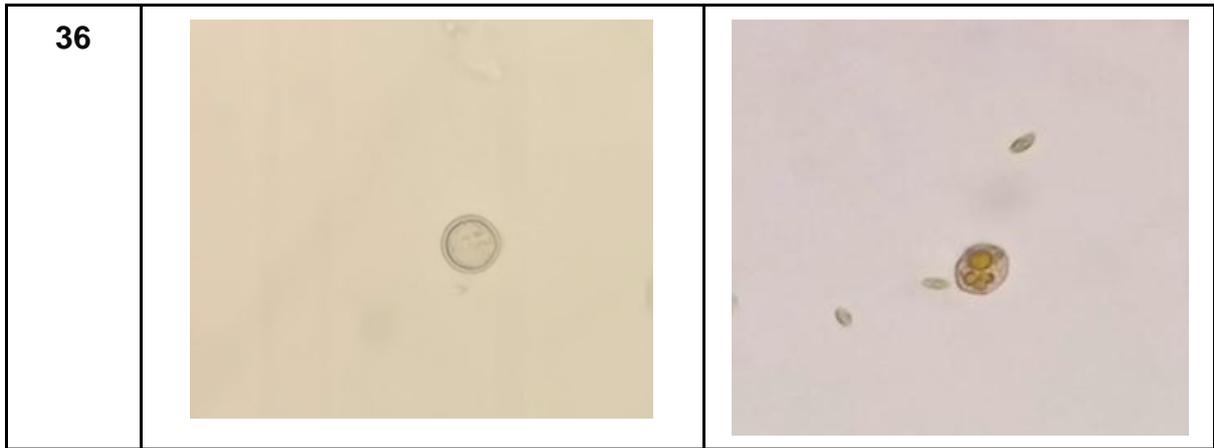
A medida que transcurría el tiempo de estudio para los dos cultivos en los medios BBM y RM se observó un cambio colorimétrico debido al incremento en la densidad celular de un verde tenue al inicio de cada cultivo a un verde oscuro en sus etapas finales (tabla 8), lo cual fue confirmado por conteo celular en cámara de Neubauer (anexos 1 y 2).

En adición a la observación macroscópica, a la microscopía también se apreciaron cambios morfológicos en las células microalgales. Tanto en el medio de cultivo BBM como RM se observó la presencia en la primera mitad del cultivo de células vegetativas ovaladas, verdes, flageladas y con matriz extracelular capaces de reproducirse por división celular y así aumentar la población, luego además de las células vegetativas también se pudieron ver y algunas células que aumentaron su concentración de clorofila, se tornaron redondas y perdieron los flagelos denominadas palmellas y finalmente hacia la etapa final de los cultivos se pudieron observar esporádicamente aplanosporas que corresponden a las formas de resistencia caracterizada por la presencia de una membrana rígida con pérdida de la concentración de clorofila en su interior por cambio gradual en la acumulación de astaxantina (ver tabla 9).

Tabla 9 Registro fotográfico de los cambios microscópicos de los cultivos en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

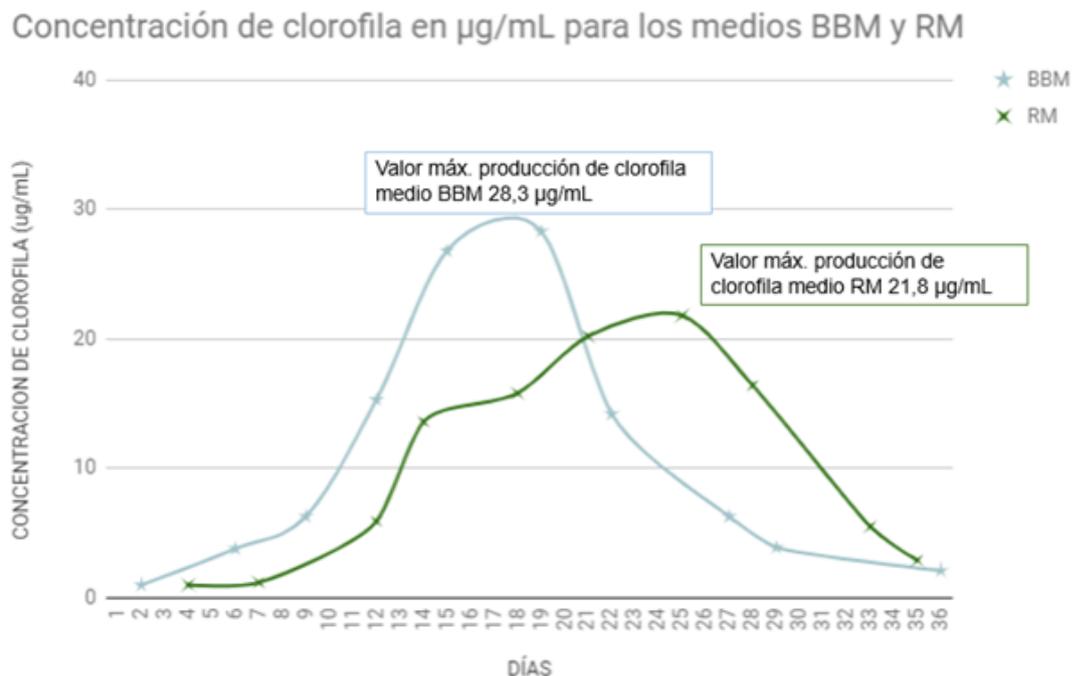
Día de cultivo	Medio BBM	Medio RM
5		
12		

15		
22		
29		
33		



FASE 3: Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio en los medios BBM y RM.

Teniendo en cuenta las curvas de calibración para la determinación de la concentración de clorofila (ver anexo 3) y de astaxantina (ver anexo 4), los resultados de la producción y acumulación de cada metabolito se ven organizados en la tabla del anexo 5. En la gráfica 4 se puede observar la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de clorofila vs los días de cultivo tanto para el medio BBM como para el RM y en la gráfica 5 la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina vs los días de cultivo para los mismos medios.

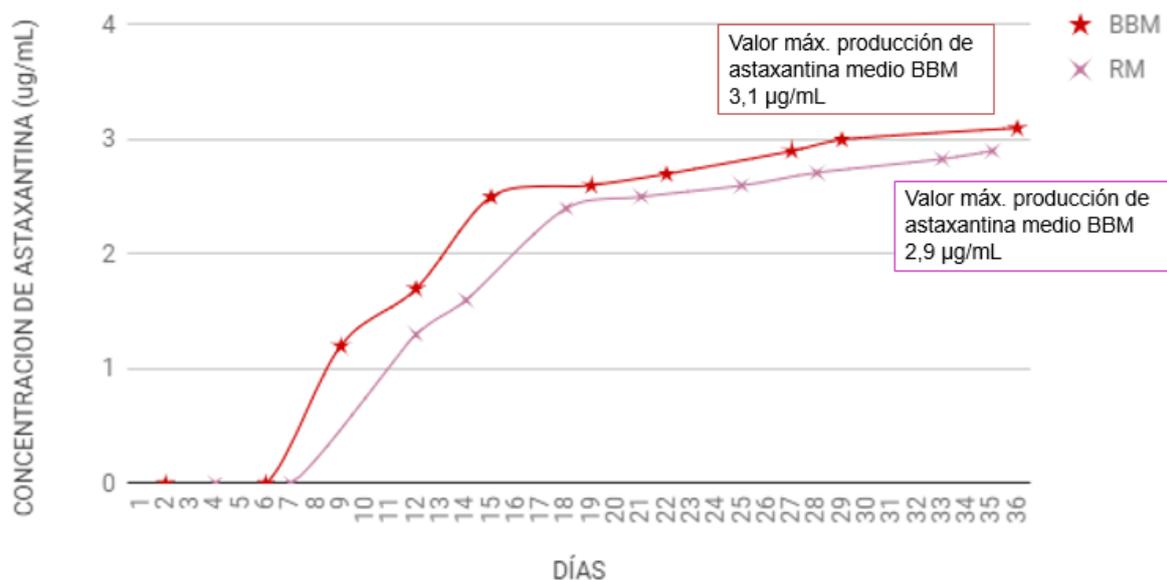


Gráfica 3 Concentración de clorofila en $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018

En cuanto a la producción y acumulación de clorofila, como era de esperarse a medida que avanzan los días del cultivo en medio BBM y en medio RM esta va aumentando su concentración hacia la mitad del tiempo de estudio y luego decrece progresivamente hasta el día 36. El mejor resultado se obtuvo en el medio BBM (ver gráfica 4), en el cual hacia el día 19 se llega hasta una acumulación de 28,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y como se había mencionado previamente por este tiempo la microalga se encuentra aún en su fase exponencial de crecimiento como se observa en la gráfica 2 , por otra parte en el medio RM se observa la mayor producción de clorofila de 21,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el día 25 porque posiblemente aún sigue latente una fase de crecimiento debido a múltiples factores del cultivo que pueden llegar a prolongar dicho estado, esta mejora en la producción de clorofila en el medio BBM representa un aumento del 22,96% en relación al medio RM.

Los resultados obtenidos a la hora de realizar el ANOVA del factor “concentración de clorofila” (anexo 9) para los medios BBM y RM permiten evidenciar con un porcentaje de confianza del 95% que no existe una diferencia significativa entre el uso de los dos medios de cultivo ($F: 0,008$; $\text{Valor } p: 0,92$; $gl: 1$). Previamente se estableció una diferencia entre el medio BBM y el medio RM en cuanto a la concentración de clorofila determinando que el medio BBM tiene una leve mejora en esta característica y resultado mejor para el cultivo de la microalga, pero como no es una diferencia drástica en relación al uso del medio RM se puede concluir que emplear cualquiera de los dos genera los efectos positivos deseados, lo cual se correlaciona con el crecimiento obtenido para esta microalga en el biorreactor.

Concentración de astaxantina $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los medios BBM y RM.



Gráfica 4 Concentración de astaxantina $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018

Con respecto a la producción y bioacumulación de astaxantina en las células microalgales, en ambos medios se obtuvieron resultados de acumulación muy

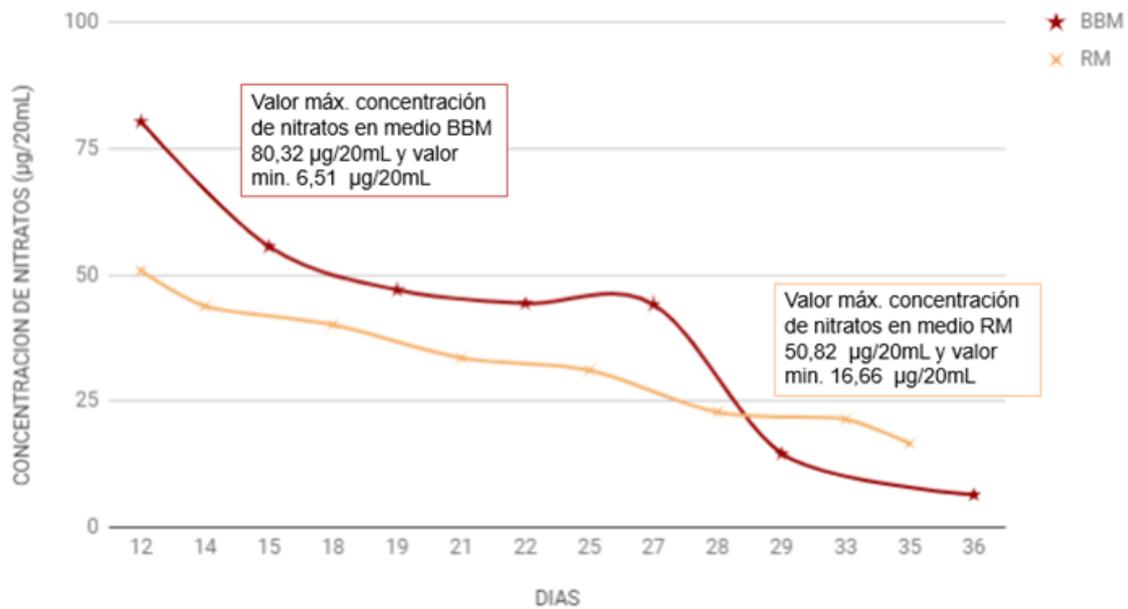
similares y crecientes a medida que pasaban los días del cultivo (ver gráfica 5); con una leve diferencia en cuanto a la efectividad del medio BBM para promover la síntesis y acumulación del caroteno por parte de la microalga, llegando hasta un valor de 3,1 µg/mL para el medio BBM e incrementándose solamente en un 6,4% frente al medio RM que alcanzó un valor de 2,9 µg/mL hacia el último día del cultivo donde se puede apreciar el aumento continuo del metabolito. En relación con las fotos de la tabla 6 de la caracterización microscópica se puede apreciar la presencia de aplanosporas enquistadas hacia la fase final del tiempo de estudio tanto para el medio BBM como para el medio RM como resultado de un ambiente estresante para la microalga generado por la deficiencia de nutrientes como la disminución de nitrógeno y también causado por factores como el aumento de la irradiancia y el cambio a luces de colores a partir del día 15 en que se pasó del uso de una lámpara blanca fluorescente marca Philips de 70 µE/m²s de irradiancia ≈ 65 lux a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux y por la variación del fotoperiodo en el mismo tiempo de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a 20 horas luz - 4 horas oscuridad . Se puede deducir que a medida que avanza el tiempo de los cultivos aumenta la acumulación del carotenoide mientras disminuye la concentración intracelular de clorofila, lo cual es un indicativo muy bueno de la eficiencia de los cultivos en el biorreactor BIOSTAT ® A PLUS.

Con el resultado que arrojó el ANOVA, tomando como variable la “producción y acumulación de astaxantina” (anexo 10); se logra concluir con un porcentaje de confianza del 95% que no existen diferencias significativas de la producción de astaxantina por *H. pluvialis* entre el medio BBM y RM ($F: 0,027$; $Valor p: 0,86$; $gl: 1$). Como ya se había mencionado el uso de cualquiera de los dos medios de cultivo ya sea BBM o RM resultan muy favorables porque se comportan según lo esperado acumulando el caroteno en mayor medida conforme pasan los días de cultivo y evidenciando al final una tendencia a seguir incrementándose.

FASE 4: Determinación de la concentración de nitrógeno

Para la determinación de la concentración de nitrógeno presente en los medios de cultivo BBM y RM se tuvo en cuenta la curva de calibración del anexo 6, los resultados de la concentración de nitratos se pueden ver en la tabla del anexo 7. En la gráfica 6 se puede observar la concentración de nitratos en µg/20 mL vs los días de cultivo tanto para el medio BBM como para el RM.

Concentración de nitratos en $\mu\text{g}/20\text{mL}$ para los medios BBM y RM.



Gráfica 5 Concentración de nitratos en $\mu\text{g}/20\text{mL}$ para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018

La concentración de nitratos para el doceavo día en el medio BBM fue de $80,32 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$ y para el medio RM fue de $50,82 \mu\text{g}/20\text{mL}$, para la fase final del cultivo las concentraciones de nitratos disminuyeron en los dos medios hasta un valor de $6,51 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$ y de $16,66 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$ respectivamente para cada medio. En el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de $91,89\%$ y en el medio RM fue de $67,21\%$. El medio BBM presentó un mayor consumo de los nitratos presentes debido probablemente a el tiempo del cultivo ya que este medio contenía menos cantidad de este nutriente y a que las microalgas lo utilizan como fuente de nitrógeno necesaria para su crecimiento y fue el mismo medio que logró generar una mayor producción de biomasa de *H. pluvialis* durante el tiempo de estudio, pero en general los dos medios presentaron un descenso esperado en la disponibilidad del nitrógeno presente en cada uno por el proceso de consumo de nutrientes que realiza la microalga.

Interpretando el resultado del ANOVA para la “concentración de nitratos en los medios BBM y RM” (anexo 11) se logra concluir con un porcentaje de confianza del 95% que el consumo de nitrógeno no presenta una diferencia significativa en el empleo del medio BBM relacionado al medio RM ($F: 0,88$; $Valor p: 0,36$; $gl: 1$). Este resultado relacionado con la producción de biomasa en los medios BBM y RM, el comportamiento de la concentración de clorofila y la acumulación de astaxantina revela la existencia de un efecto de estrés favorable generado en el entorno de la microalga *H. pluvialis* por factores como la disponibilidad de nutrientes, provocando un aumento en la biomasa microalgal que consume el nitrógeno presente en cada medio y que causa un cambio intracelular entre la acumulación de clorofila que decrece por una acumulación de astaxantina que aumenta constantemente a medida que avanza el tiempo de estudio, lo cual se puede observar desde el día 27 del cultivo.

Los resultados obtenidos con los análisis de varianza ANOVA sugieren que para una buena producción de astaxantina a nivel de laboratorio en un biorreactor BIOSTAT® A PLUS se puede emplear tanto el medio BBM como el RM, ya que si bien el BBM fue el medio que durante todo el experimento presentó un mejor aumento en la tasa de biomasa, una mayor concentración de clorofila, una efectiva acumulación de astaxantina y un mejor consumo de nitrógeno, no presenta diferencias significativas con respecto al uso del medio RM y por ello cualquiera de los dos medios resulta óptimo al momento de generar condiciones muy favorables en el cultivo y producción de astaxantina (metabolito de interés biotecnológico) por parte de la microalga *H. pluvialis*. Además, se estableció que el uso del biorreactor permitió obtener bajo las condiciones trabajadas una biomasa de *H. pluvialis* en cantidad y calidad adecuadas, lo cual indica que se puede seguir utilizando para escalar la producción de esta microalga y así obtener productos derivados de interés como es la misma biomasa o los colorantes como la clorofila y la astaxantina.

Tabla 10 Tabla resumen de resultados obtenidos en los cultivos de la microalga *H. pluviialis* en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

Característica	Resultados obtenidos en medio BBM	Resultados obtenidos en medio RM
Crecimiento celular	2,88 x10 ⁷ cel/mL	2,43 x10 ⁷ cel/mL
Velocidad de crecimiento	2,03 cel/día	2,56 cel/día,
Valor máximo de concentración de clorofila	28,3 µg/mL	21,8 µg/mL
Valor máximo de concentración de astaxantina	3,1 µg/mL	2,9 µg/mL
Porcentaje de consumo de nitrógeno	91,89%	67,21%,

7. DISCUSIÓN

En el campo industrial el interés que despierta la generación de cultivos de microalgas a gran escala es cada vez mayor, porque como ya hemos mencionado dichos microorganismos tienen la capacidad de aumentar en gran medida la producción de biomasa para fines de alimentación animal y humana y para fines de biorremediación, también pueden producir metabolitos secundarios como los carotenoides, ácidos grasos polisacáridos, compuestos bioactivos, antioxidantes y la producción de biocombustibles^{85,86}. La principal problemática que enfrentan estos cultivos es que no siempre el nivel de productividad llega a los valores esperados para que sea rentable en términos económicos es por esto que muchos estudios se han concentrado en las mejoras a nivel del suministro de nutrientes, el uso de biorreactores, la modificación de factores físicos que intervienen como lo son el pH, la disponibilidad de luz, el porcentaje de aireación, la velocidad de agitación y la temperatura, con la esperanza de generar el ambiente más propicio según la finalidad comercial del cultivo^{87,88}.

En cuanto al uso de los medios de cultivo muchos investigadores se han enfocado en analizar varios que difieren en sus composiciones y en relación a la concentración de cel/mL que pueden alcanzar. En este caso se analizó la producción de biomasa en cel/mL para dos medios de cultivo, el BBM y el RM durante 36 días obteniendo una producción final de 2.88×10^7 cel/mL y de $2,43 \times 10^7$ cel/mL respectivamente, lo cual en relación con lo reportado en varios estudios como por ejemplo uno realizado por Niño *et al* (2015) donde los medios BBM y RM habían alcanzado producciones de 3.8×10^5 cel/mL y de 7.55×10^5 cel/mL respectivamente⁸⁹, lo evidenciado en otros dos estudios separados donde el medio BBM llegó a una producción de 3.5×10^5 cel/mL⁹⁰ y a una producción de 2×10^4 cel/mL⁹¹ y con lo demostrado en otro estudio donde el medio RM pudo alcanzar un nivel de 9.50×10^5 cel/mL⁹², representa un aumento significativo para la concentración celular en los dos medios analizados en este estudio.

Lo anterior resulta muy favorable ya que la alta tasa de producción de biomasa de la microalga *H. pluvialis* es un factor necesario e importante en la productividad de un cultivo, esta notoria diferencia puede deberse a que en este estudio se empleó el biorreactor BIOSTAT® A PLUS que garantiza proporcionarle al cultivo una disponibilidad más amplia de luz por ser de un material de vidrio transparente y tener forma tubular, además de poder controlar según los requerimientos la agitación, el suministro de aire, de dióxido de carbono, el pH y la temperatura. Esto representa ser un factor determinante en muchos estudios donde se emplearon biorreactores de diversos tipos y donde también se manipulan otros factores además del medio de cultivo empleado como lo son el pH, la disponibilidad de la luz, la aireación suministrada, la temperatura proporcionada, la agitación, entre otros^{6,9,10,20}, en los cuales dicha característica principal influye positivamente en el aumento de la densidad celular y en la prolongación de una fase exponencial de crecimiento pasando los 15 días iniciales como lo vimos reflejado en este estudio.

En comparación con un estudio realizado por Ramírez en el 2013 donde se evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina en un fotobiorreactor tipo airlift, estableciendo en primera instancia las mejores condiciones para su crecimiento y luego una fase con mecanismos estresantes como lo fueron la

variación de medios de cultivo en los cuales no se evidenció diferencia significativa y por lo tanto se aconsejó el uso de BBM por su bajo costo y el continuo uso de fotobiorreactores por generar un mejor control de las condiciones del cultivo, los resultados fueron similares con este estudio donde también el biorreactor representó ser un factor favorable en los cultivos y el medio BBM resultó ser más eficiente con una productividad de $2,88 \times 10^7$ cel/mL⁶.

Si comparamos este estudio donde *H. pluvialis* en medio RM llegó a un recuento celular de $2,43 \times 10^7$ cel/mL, concentraciones de clorofila de 21,8 µg/ml y de astaxantina de 2,9 µg/ml, con disminución de 67,21% en el contenido de nitrógeno, bajo valores de pH entre 5,4 a 9,5, bajo las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de 70 µE/m²s de irradiancia ≈ 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de 20° C ± 2°C, agitación de 100 rpm, provisión de CO₂ al 5% y aire filtrado a 1,7 L/min, luego, a partir de ese momento, los siguientes días del cultivo se realizó un cambio a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad y observando células en estado vegetativo, palmella y aplanosporas enquistadas, con otro estudio realizado por Pérez y Ayala (2018)⁹³ donde también realizaron un cultivo de *H. pluvialis* utilizando el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de 5 litros, obteniendo la mayor biomasa en el medio RM con una concentración de 5% de nitrógeno, cuyo recuento celular fue de $3,19 \times 10^5$ cel/ml, concentraciones de clorofila de 13,15 µg/ml y de astaxantina de 1,1 µg/ml, en el cual las condiciones de pH se mantuvieron entre 5,6 y 7,0 durante los 28 días de tratamiento, donde se produjo una disminución del contenido de nitrógeno en un 40% de 2,18 mg/dl a 1,3 mg/dl, fotoperiodo luz 20 h y 4 h de oscuridad este estudio se utilizó luz blanca utilizando lámparas fluorescentes con irradiancia de 110 lux, pH 6,8, temperatura de 20°C ± 2 °C, aire filtrado a 1,7 L/minuto y agitación 100 rpm. La morfología que se presentó fueron formas vegetativas, palmella, aplanospora y formas enquistadas con mayor tamaño; se puede concluir y evidenciar que las condiciones propuestas en este estudio para el cultivo de *H. pluvialis* resultaron ser mejores en cuanto a productividad en el medio RM donde se logró obtener una biomasa mayor con mejor concentración de clorofila y acumulación de astaxantina que en el otro estudio aquí comparado.

El diseño del fotobiorreactor también resulta ser un factor importante en el cultivo y obtención de biomasa de la microalga en comparación con lo evidenciado por Yoo *et al*, en 2012⁹³ en un estudio donde cultivaron *H. pluvialis* en un fotobiorreactor tubular con fondo ovalado en posición diagonal con una pendiente de 60°, ellos demostraron la producción muy eficiente de células de microalgas y astaxantina en altas cantidades de 2.62 g/L y 78.37 mg/L, respectivamente, debido probablemente a que la inclinación proporciona una mejor distribución lumínica y con lo observado en este estudio en el que también se empleó un biorreactor tubular con fondo ovalado pero en posición vertical, con el panel de luces LEDS colocado en la parte inferior con lo cual posiblemente no se tuvo una eficiente distribución lumínica y donde se obtuvieron unas concentraciones de astaxantina para los medios BBM y RM de 28,3 µg/mL y de 21,3 µg/mL, por lo cual la sugerencia para mejorar el proceso realizado es colocar el biorreactor inclinado o cubrir el biorreactor con luces alrededor para un mejor efecto penetrante de la luz tanto en el crecimiento de la

microalga, como en el uso de ésta como factor de estrés para aumentar la acumulación de astaxantina.

En cuanto a la disponibilidad lumínica se suministró durante los primeros 15 días un fotoperiodo de 18 horas luz - 6 horas oscuridad de luz blanca con una lámpara puesta de manera paralela al biorreactor (ver tabla 8) de $70\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia siendo según la literatura el tiempo final de la fase exponencial de crecimiento de la microalga^{6,29,30} y a partir de ahí los siguientes días del cultivo se realizó un cambio a un panel de luces LED multicolor colocada debajo del biorreactor (ver tabla 8) que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux y un cambio a un fotoperiodo de 20 horas luz - 4 horas oscuridad, con la finalidad de iniciar su fase de estrés causada por el aumento de irradiancia, la variación de los fotoperiodos y los cambios a luces de colores y así estimular la acumulación de astaxantina^{3, 5, 10,13}. C

Como lo demostrado por Sun *et. al.* en el año 2017, cuando realizaron un estudio donde propusieron un método de cultivo de *H. pluvialis* por etapas en un biorreactor de tipo fed- batch, cultivaron las células a 22°C , con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, luz mixta blanca-roja a $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante los primeros 5 días, luego filtraron el medio a través de una membrana de $5\mu\text{m}$ y las células obtenidas las sembraron nuevamente manteniendo las condiciones anteriores pero les aumentaron la intensidad lumínica a $80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, el día 9 el medio fue ajustado a la misma concentración de nutrientes que el medio de cultivo fresco y el pH se ajustó a 7.5, finalmente se concluyó que las características como la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos extracelulares son factores que limitan el crecimiento de la microalga y que crear un cultivo de tipo fed- batch, con un suministro de luz mixta blanca-roja y con cambio del medio de cultivo aumenta 1.16 veces la producción normal de biomasa²⁰.

El hecho de que existiera una alta biomasa y de que la luz estuviera en una dirección de abajo hacia arriba pudo ser una causa probable de que las células interfirieran unas con otras y no logran captar eficazmente la emisión lumínica además de requerirse luces con mayor irradiancia, llevando a una etapa de estrés eficiente que se pudo apreciar visualmente en los cambios microscópicos expuestos en la tabla 6 al final del cultivo por la presencia de aplanosporas enquistadas y se determinó cuantitativamente como se observa en la gráfica 5 y en el anexo 5 una acumulación de astaxantina al final de los cultivos y también se dedujo que existió una mayor producción en el medio BBM frente al medio RM, sin embargo no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos.

Al observar los resultados expuestos en el anexo 5 para la determinación de la concentración de clorofila y astaxantina para los dos medios y las gráficas 4 y 5 donde se comparan los valores del medio BBM vs los del medio RM, se puede deducir que a medida que el cultivo envejece la clorofila en ambos casos llega a un pico máximo de acumulación pero después comienza a descender y por el contrario la concentración de astaxantina va aumentando progresivamente, esto es de gran importancia porque pone en manifiesto la efectividad que tuvieron los factores de estrés generados en los cultivos a la hora de estimular la acumulación del carotenoide en estudio, tal vez al aumentar el tiempo de estudio y mejorar otras condiciones de cultivo como el uso de lámparas que proporcionen una mayor irradiancia se genere un ambiente estresante más efectivo que lleve a una mayor

acumulación del metabolito.

Analizando otros estudios donde se utilizaron también biorreactores y en los que se estudió la producción de biomasa, concentración de clorofila y producción de astaxantina como en el realizado por Leiton (2018)⁹⁴ quien realizó el cultivo de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5L, utilizando las condiciones de temperatura 20 ± 1 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 (luz: oscuridad), lámparas fluorescentes de luz blanca (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH de 6.8- 7.1, donde el crecimiento celular obtenido fue de 1.25×10^5 cel/ml y 1.0×10^5 cel/ml en medio RM y BBM durante 21 días y una concentración de clorofila de 3.98 mg/ml y de 3.39 mg/ml respectivamente el medio BBM o como en el realizado por García (2018)⁹⁵ quien estudió un cultivo de *H. pluvialis* utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros utilizando dos concentraciones de acetato de sodio 0,299 mg/L y 1,6 mg/L, las cuales fueron evaluadas en el medio RM con la influencia de diferente condiciones como pH de 6.7, fotoperiodos 20h luz y 4h oscuridad, luz blanca, temperatura 25 ± 2 °C, aire filtrado y agitación a 100 rpm. Los resultados obtenidos con 0,299 mg/L de acetato de sodio determinaron un crecimiento celular máximo de $2,0 \times 10^4$ Cel/ mL y una concentración máxima de astaxantina de 2,530 µg/mL durante 34 días, mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular máximo de $3,5 \times 10^4$ Cel/mL y una concentración máxima de astaxantina de 1,9 µg/ml; ambos estudios resultan tener bajas producciones de las características analizadas comparados con el realizado en este trabajo donde en el medio BBM se llegó a una producción de biomasa de $2,88 \times 10^7$ cel/mL y en el medio RM de $2,43 \times 10^7$ cel/mL, con una acumulación de clorofila de 28,3 µg/mL y 21,8 µg/mL y de astaxantina de 3,1 µg/mL y 2,9 µg/mL respectivamente.

En este tipo de cultivos los niveles de pH son clave en el desarrollo microalgal ya que no mantener un nivel óptimo puede conllevar a una inhibición del desarrollo celular^{13, 43}. Como era de esperarse durante el tiempo de estudio en los dos medios de cultivo se observó un aumento en los niveles de pH al final de los estudios de 5,6 a 9,7 para el medio BBM y de 5,4 a 9,5 para el medio RM lo cual es normal por la acumulación de minerales y la oxidación de compuestos debido al proceso fotosintético de la microalga. En la literatura se describe que la manera más efectiva de controlar adecuadamente este aumento progresivo es suministrar aireación con CO₂ para así provocar una disminución del mismo y que también puede ser controlado con la adición de soluciones ácidas o básicas^{43, 47}, en este estudio el CO₂ se adicióno en el aire a una velocidad de 1,7 L/min por lo cual los niveles de pH fluctuaron entre valores de 5,4 a 9,7 que es un rango ideal para el crecimiento microalgal.

La disponibilidad de los nutrientes como el nitrógeno resulta ser otro factor clave en los cultivos de microalgas, los medios destinados para esta finalidad normalmente presentan altos contenidos de nitratos con el fin de incentivar el crecimiento celular. Como era de esperarse en este estudio la concentración de los nitratos disminuyó conforme pasaban los días de estudio en los dos medios utilizados, para el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de 91,89% disminuyendo de una concentración de 80,32 µg/20mL hasta 6,51 µg/20mL y para el medio RM un porcentaje de consumo de 67,21% disminuyendo de 50,82 µg/20mL a 16,66 µg/20mL, y llegando hasta una producción de astaxantina de 28,3 µg/mL y de 21,3

µg/mL respectivamente.

Similar a lo evidenciado en un estudio donde se cultivó la microalga en cuatro medios diferentes de esta manera: medio RM sin nitrógeno (sin N), medio RM sin fosfatos (P-free), medio exento de nitrógeno y fosfato (NPfree) y también solo agua destilada con la adición continua de CO₂ en el que llegaron a la conclusión que el contenido de astaxantina era mucho más rápida en agua destilada (29.62 mg g⁻¹) con la adición de CO₂ y en medio libre de nitrógeno (30.07 mg g⁻¹)³, lo cual resulta favorable en sentido de que las células van consumiendo los nutrientes del medio requeridos para su crecimiento y una vez los consumen en su totalidad el ambiente se va convirtiendo en un medio cada vez más estresante que estimula la bioacumulación intracelular de astaxantina.

Cada vez se pone más en manifiesto el efecto favorable del empleo de un biorreactor en el cultivo de microalgas cuando la finalidad es obtener una biomasa considerablemente buena en cantidad y calidad, ya que además de todo el biorreactor propicia las condiciones óptimas para evitar el daño celular^{96,97} como se evidenció en la tabla 9 de la observación microscópica de los cultivos de *H. pluvialis* en los medios BBM y RM, donde se pudo apreciar la morfología característica de la microalga, y se pudo establecer que el cultivo realizado en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de 5 litros, dio muy buenos resultados para el cultivo de la microalga obteniendo mayor cantidad de biomasa que otros biorreactores como el Tecferm de 5 litros y también el uso de los medios con todos sus componentes completos logró aumentar la biomasa, ya que como se mencionó previamente la deficiencia de nitrógeno afecta el crecimiento celular de esta microalga.

En general los dos medios de cultivo presentan efectos muy favorables en cuanto a la alta producción de biomasa, producción de clorofila y posterior acumulación de astaxantina bajo condiciones las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de 70 µE/m²s de irradiancia ≈ 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de 25° C ± 2°C, agitación de 100 rpm, provisión de CO₂ al 5% y aire filtrado a 1,7 L/min y luego a partir de ahí los siguientes días del cultivo se realizó un cambio a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad para iniciar su fase de estrés y así estimular la acumulación de astaxantina, en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS y notando que no existe ninguna diferencia significativa entre el uso del medio de cultivo BBM o RM.

8. CONCLUSIONES

El medio de cultivo BBM presentó una mayor biomasa de la microalga *H. pluvialis* hacia el día 36 del estudio con una densidad celular de $2,88 \times 10^7$ cel/mL en comparación al medio RM con un conteo de $2,43 \times 10^7$ cel/mL, sin embargo, estadísticamente no se presentó una diferencia significativa entre los tratamientos.

Se realizó un registro fotográfico de los cambios en los dos medios de cultivo para los cuales macroscópicamente se pudo apreciar una variación gradual en el color del medio desde un verde muy claro hasta un verde oscuro intenso por la alta producción de biomasa y microscópicamente se observó la presencia de células en fase vegetativa y en fase de palmella, algunas aplanosporas enquistadas en los cultivos realizados en los medios BBM y RM.

La distribución lumínica resultó ser un tanto ineficiente y se observó al compararse con otros estudios que colocar el biorreactor inclinado o cubrir el biorreactor con luces alrededor más potentes induce un mejor efecto penetrante de la luz para así lograr más crecimiento de la microalga y aumentar su acumulación de astaxantina.

En cuanto a la producción y acumulación de clorofila, el mejor resultado se obtuvo en el medio BBM, en el día 19 se llega hasta una acumulación de $28,3 \mu\text{g/mL}$ y por otra parte en el medio RM se observa la mayor producción de clorofila de $21,8 \mu\text{g/mL}$ en el día 25, todo esto porque posiblemente la microalga aún se encuentre en una fase exponencial de crecimiento. La acumulación de astaxantina en la etapa final de los cultivos también fue mayor en el medio BBM con una concentración de $3,1 \mu\text{g/mL}$ presentando un porcentaje de aumento de 6,4% en relación al medio RM que llegó a una acumulación de $2,9 \mu\text{g/mL}$. Entre los resultados obtenidos para cada tratamiento en los medios de cultivo BBM y RM no se observaron diferencias significativas lo cual establece una similitud en cuanto a la producción y acumulación de clorofila y astaxantina.

La disponibilidad de nitratos en el medio de cultivo BBM decreció en un 91,89% desde una concentración de $80,32 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$ hasta $6,51 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$, mientras tanto para el medio RM decreció en un 67,21% desde $50,82 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$ hasta $16,66 \mu\text{g}/20 \text{ mL}$, para la fase final del cultivo. Al someter estos resultados a un análisis de varianza ANOVA se pudo determinar que no existe ninguna diferencia significativa que marque diferencia entre el uso de un medio u otro.

9. RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos con el uso del biorreactor BIOSTAT® A PLUS y en beneficio de todas sus características como los sensores que posee para el control de pH, temperatura, aireación, agitación, el material de vidrio translúcido, su forma tubular y la capacidad de 5 L se recomienda su empleo para el cultivo de microalgas y la obtención de metabolitos con fines biotecnológicos.

En cuanto a las condiciones trabajadas se aconseja emplear ya sea el medio BBM o el RM porque no presentaron diferencias significativas en los resultados obtenidos, sin embargo, según los resultados obtenidos el medio BBM presentó mejores resultados de la producción de biomasa microalgal en calidad y cantidad adecuadas, mayores consumos de nitrógeno y mejores concentraciones de clorofila y de astaxantina.

Por otra parte, también se recomienda prolongar el periodo de cultivo y el uso de lámparas LED de mayor irradiancia y que aporten una cobertura más amplia alrededor del biorreactor para así estimular una fase de estrés más efectiva en la microalga *H. pluvialis* que lleve a una mejor acumulación de astaxantina.

Evaluar la expresión génica involucrada en el proceso de acumulación del caroteno y con ello tener una visión más amplia del campo de este estudio que abra las puertas a nuevos proyectos de gran interés biotecnológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luna, L. G., Menéndez, J., Álvarez, I., & Autor, F. (2009). Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno, 9(2), 105–117.
2. González, M. A., Cifuentes, A. S., & Gómez, P. I. (2009). GROWTH AND TOTAL CAROTENOID CONTENT IN FOUR CHILEAN STRAINS OF *Gayana Bot*, 66(1). [Internet]. Available from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/v66n1/art06.pdf>
3. Imamoglu, E., Dalay, M. C., & Sukan, F. V. (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 26(3–4), 199–204. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2009.08.007>
4. Silva, A. S. M. (2010) *EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y DE LOS PIGMENTOS OBTENIDOS DE LA MICROALGA Haematococcus pluvialis (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) CULTIVADA EN DIFERENTES MEDIOS*. [Internet]. Available from: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., & Hu, Q. (2010). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9453-6>
6. Ramírez, D. (2013). *Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluviales en un fotobiorreactor tipo airlift*. [Internet]. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
7. Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Lie, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 158, 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.02.044>
8. Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresource Technology*, 163, 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.04.017>
9. Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 167, 276–283. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.06.030>
10. Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M.-E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(10), 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
11. Zhao, Y., Shang, M., Xu, J.-W., Zhao, P., Li, T., & Yu, X. (2015). Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry*, 50(12), 2072–2077. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.09.004>
12. Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., & Yamaji, H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, 119(3), 345–350.

<https://doi.org/10.1016/J.JBIOESC.2014.09.002>

13. Granda G. (2015). *PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*. [Internet]. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
14. Sun, H., Guan, B., Kong, Q., Geng, Z., & Wang, N. (2016). Repeated cultivation: non-cell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*, 6(1), 20578. <https://doi.org/10.1038/srep20578>
15. Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology*, 204, 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.12.076>
16. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2016.03.002>
17. Lv, H., Xia, F., Liu, M., Cui, X., Wahid, F., & Jia, S. (2016). Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 20, 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.09.019>
18. Panis, G., & Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18, 175–190. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.06.007>
19. Gao, X., Wang, X., Li, H., Roje, S., Sablani, S. S., & Chen, S. (2017). Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Research*, 23, 20–27. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.12.018>
20. Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 233, 326–331. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.011>
21. Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
22. Pang, N., & Chen, S. (2017). Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Algal Research*, 21, 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.12.003>
23. Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., & Hu, Z. (2017). Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. *Aquatic Toxicology*, 183, 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2016.12.008>
24. Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M., & Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, 255, 229–237. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.01.130>
25. Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., & Peng, C.-A. (2018). Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology*, 256,

- 548–551. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.02.074>
26. Córdoba-castro, N. M., Acero-reyes, N. L., Duque-buitrago, L. F., Juliana, L., & Serna-jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*, 73–82. [Internet]. Available from: <http://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/download/426/729>
27. Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology*. [Internet]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118567166>
28. Ruiz, G. (2016). *Caracterización microbiológica y mantenimiento de dos cepas de microalgas para la producción de complemento alimenticio, lípidos y otros productos de valor agregado*. [Internet]. Available from: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/22400/RUIZ%20BECERRA%20C%20GABRIELA%20ANALI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37(2), 217–226. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003669>
30. Domínguez, A., Fábregas, J., & Otero, A. (2006). Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *ALGAS*, 35, 4–8. [Internet]. Available from: www.sefalgas.org/boletin.htm
31. Fábregas, J., Domínguez, A., Maseda, A., & Otero, A. (2003). Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1204-4>
32. Domínguez, A., Ferreira, M., Coutinho, P., Fábregas, J., & Otero, A. (2005). Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain. *Aquaculture*, 250(1–2), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.005>
33. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA. (2014). INGENIERÍA DE PROCESOS APLICADA A LA BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS. [Internet]. Available from: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>
34. Camacho J., Lancheros Ana., Huérfano M. (2015). CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1), 54–69.
35. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
36. Li, Y., Huang, J., Sandmann, G., & Chen, F. (2009). HIGH-LIGHT AND SODIUM CHLORIDE STRESS DIFFERENTIALLY REGULATE THE BIOSYNTHESIS OF ASTAXANTHIN IN *CHLORELLA ZOFINGIENSIS* (CHLOROPHYCEAE). *Journal of Phycology*, 45(3), 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
37. Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., & Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.016>
38. Kim, Z.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-S., & Lee, C.-G. (2006). Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and*

- Microbial Technology*, 39(3), 414–419.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.041>
39. Fabregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., & Otero, A. (1999). *Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis*. [Internet]. Available from:
<https://eurekamag.com/pdf/009/009930160.pdf>
 40. Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.-P., Zarka, A., & Chen, F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 21(7), 601–604.
<https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
 41. Steinbrenner, J., & Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 125(2), 810–817. [Internet]. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161038>
 42. Kurmen, J., C., Gonzalez, G., & Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés 1. *Nova*, 11(19), 91–102. [Internet]. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702013000100009&script=sci_arttext&tlng=pt
 43. Benavente, J., Montañez, J., Aguilar, C., Mendez, A., & Valdivia, B. (2012). Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7).
 44. Bouterfas, R., Belkoura, M., & Dauta, A. (2002). Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 489(1), 207–217. <https://doi.org/10.1023/A:1023241006464>
 45. Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.158>
 46. FAO. (2009). LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO Y SU IMPORTANCIA EN ACUACULTURA. [Internet]. Available from:
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>
 47. García, L. M. (2012). *ELIMINACIÓN DE CO2 CON MICROALGAS AUTÓCTONAS* [Internet]. Available from:
<https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ON-MART%25CDNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>
 48. CONTRERAS. C., PEÑA. J., FLORES. L., Cañizares. R. (2003). *AVANCES EN EL DISEÑO CONCEPTUAL DE FOTOBIORREACTORES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS* (Vol. 28). [Internet]. Available from:
<http://www.redalyc.org/pdf/339/33908304.pdf>
 49. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.09.009>
 50. Vallero, D. A. (2010). Systems. *Environmental Biotechnology*, 167–228.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375089-1.10004-2>
 51. Streit, N., Ramírez L, G., Zepka, L., Jacob-Lopes, E., & Queiroz, M. (2015) Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. Retrieved from
[http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N2_3Streit et al.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N2_3Streit%20et%20al.pdf)

52. Ropp, R. C. (2013). The Alkaline Earths as Metals. *Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59550-8.00001-6>
53. Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 968–976. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2011.01.002>
54. İnanç, A. L. (n.d.). *Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils*. Retrieved from <http://www.academicfoodjournal.com>
55. Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 13(11), 361–371. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00182-6)
56. Rubio Fernández, D., Barrera Flórez, N. A., Angélica, L., Buitrago, F., & Jaimes Baquero, C. E. (2017). Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 35–48. [Internet]. Available from: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6436/1/COL0046961-2017-1-IQ.pdf>
57. Hammond, B. R., Renzi, L. M., & Renzi, L. M. (2013). Carotenoids. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(4), 474–476. <https://doi.org/10.3945/an.113.004028>
58. Baldomero Fernandez. (2013). *Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en Chlorella zofingiensis*. universidad de sevilla. [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Baldo_Fernandez_Cordero/publication/308631830_Produccion_de_carotenoides_por_microalgas_y_caracterizacion_de_la_ruta_carotenogena_en_Chlorella_zofingiensis/links/5808cb7408aefaf02a2feaa5/Produccion-de-carotenoides-po
59. Martínez. A., Vicario. I., & Heredia. F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109–117. [Internet]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2007/2/art-2/>
60. Martínez. A, Vicario. I, & Heredia. F. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149–155. [Internet]. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003
61. Carranco. M, Calvo. M, & Pérez. F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3). [Internet]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
62. Johnson, E. J. (2002). The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in Clinical Care*, 5(2), 56–65. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5408.2002.00004.x>
63. Rao, A., & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
64. Linnewiel-Hermoni, K., Paran, E., & Wolak, T. (2016). Carotenoid Supplements and Consumption. In *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. 473–489). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00034-0>
65. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: Applications

- for human health and nutrition. Trends Biotechnol [Internet]. 2003; 21(5):210–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903000787>
66. Sánchez, A, Flores-Contreras L. Langley, E. Martín, R., Maldonado G., y Sánchez S. Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. Revista Latinoamericana de Microbiología [Internet]. 1999; 41:175–91. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-1999/mi993j.pdf>
67. Kobayashi M. In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga Haematococcus pluvialis. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2000; 54(4):550–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000416>
68. Lorenz R. A technical review of Haematococcus algae. Naturese Tech Bull [Internet]. 1999; 1–15. Available from: <https://www.cyanotech.com/pdfs/bioastin/axbul60.pdf>
69. Zhu C, Naqvi S, Capell T, Christou P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2009; 483(2):182–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992217>
70. Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga. Plant Mol Biol [Internet]. 2003; 343–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12856941>
71. López Emparán A, Gajardo H, Stange CR, Federico ML. Ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en Brassica napus L. a través de la sobreexpresión semilla-específica de un gen PSY endógeno. Rev agronómica del noroeste argentino [Internet]. 2017; 37(2):133–43. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314-369X2017000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
72. Chang JJ, Thia C, Lin HY, Liu HL, Ho FJ, Wu JT, et al. Integrating an algal β -carotene hydroxylase gene into a designed carotenoid-biosynthesis pathway increases carotenoid production in yeast. Bioresour Technol [Internet]. 2015; 184:2–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25537137>
73. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem [Internet]. 1991; 63(1):141–6. Available from: <https://www.iupac.org/publications/pac/pdf/1991/pdf/6301x0141.pdf>
74. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J Agric Food Chem [Internet]. 2000; 48(4):1150–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775364>
75. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T., Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 231–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00007-8>
76. Sartorius. *Biostat*® *aplus* El fermentador biorreactor compacto autoclavable. Retrieved from www.sartorius-stedim.com
77. *BIOSTAT*® *A Your professional start in cell cultivation and microbial fermentation*. (2014). Retrieved from http://biofermenter.ru/d/708035/d/broch_biostat-a.pdf
78. Halmi, M., Shukor, M., Johari, W. and Shukor, M. (2014). *Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae Dunaliella*

- tertiolecta*. *Asian Journal of Plant Biology* (Vol. 2). Retrieved from <http://journal.hibiscuspublisher.com>
79. Sampieri, R. (2014). METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION (6ta ed.). Retrieved from <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
80. Biocyclopedia. Mes-Volvox Medium Composition / Algae Culture Media / Botany / Retrieved from: https://biocyclopedia.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvox_medium_composition.php
81. Sociedad Latinoamericana de Nutrición, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Archivos latinoamericanos de nutrición. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (Vol. 54). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011
82. APHA, American Public Health Association, American Waterworks, Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF). Standard Methods for Examination of Water and Sewage and Wastewater. 20a ed. New York; 1992. Retrieved from <https://store.awwa.org/store/productdetail.aspx?productid=28493774>
83. María, A. V., Filippini, F., Martí, L., & Salcedo, C. (n.d.). *Determinación de nitratos en vegetales COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS ANALÍTICOS DETERMINATION OF NITRATES IN VEGETABLES COMPARATION OF FOUR ANALYTIC METHODS*. Retrieved from http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/153/ValdesAgrarias1-04.PDF
84. Tocquin, P., Fratamico, A., & Franck, F. (2012). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>
85. Rodríguez H. Producción de Compuestos de Interés Industrial por Microalgas y Cianobacterias. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Retrieved from <https://www.ibvf.us-csic.es/producción-de-compuestos-de-interés-industrial-por-microalgas-y-cianobacterias>
86. Bolaños, E. (2015). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, Volumen 14, N.º 1. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/266730483_Aplicaciones_biotecnologicas_de_las_microalgas_Biotechnologic_uses_of_microalgae
87. Cobelas, M. A., & Gallardo, T. (1989). *Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas*. *Complutensis NY* (Vol. 15). Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/38807363.pdf>
88. Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 49, N°2: 157-173, agosto 2014. Retrieved from <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
89. Milena, C., Castillo, N., Carolina, F., Rivera, R., Díaz, L. E., Graciela, A., & Díaz, L. (2017). *Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis Artículo original producto de la investigación*. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>
90. Domínguez-Bocanegra, A., Guerrero Legarreta, I., Martínez Jerónimo, F., &

- Tomasini Campocoso, A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
91. Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., & Nagai, S. (1992). Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R)
92. Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis* Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*, (December 2015).
93. Erika Tatiana Pérez Zambrano y Yazmin Ayala Agudelo. Producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor BIOSTAT ® A PLUS de 5 litros. 2018 Trabajo de grado UCMC
94. Yeni Andrea Leiton Arcos. Producción de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM, 2018. Trabajo de grado. UCMC
95. Laura García Martín. Producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluviales*. 2018. Trabajo de grado. UCMC
96. Yoo, J. J., Choi, S. P., Kim, B. W., & Sim, S. J. (2012). Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 309–315. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0616-x>
97. Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>

ANEXOS

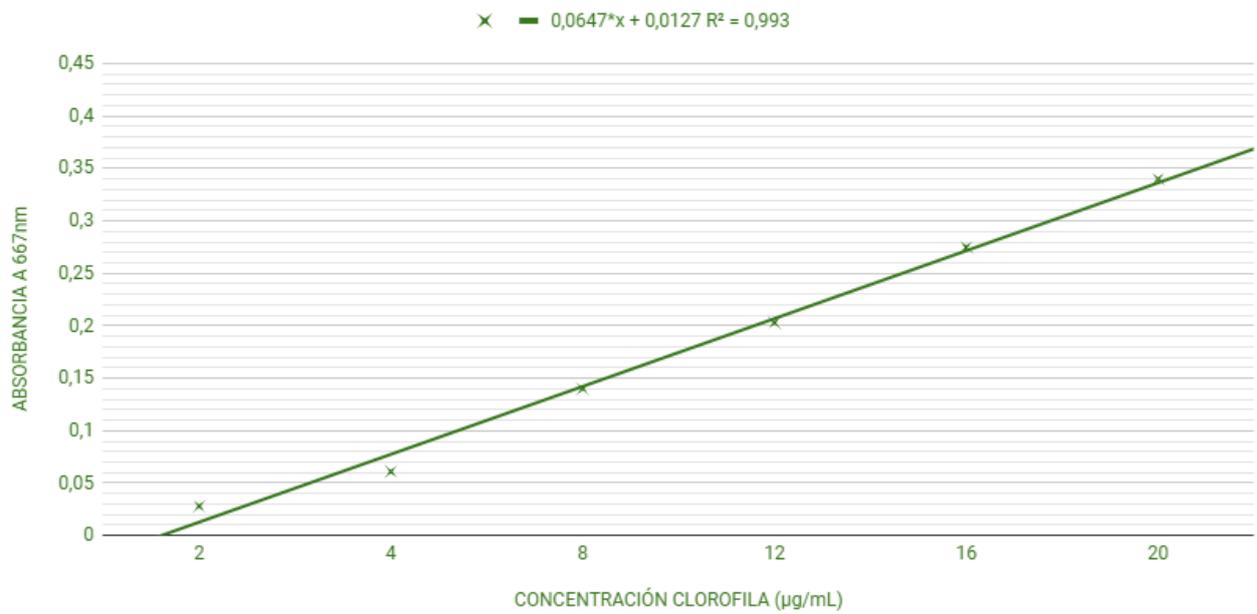
Anexo 1 Conteo celular de *H. pluvialis* en medio BBM. Elaborada por los autores, 2018.

FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
17/08/2018	2	5,66 X10 ⁷	4,33 X10 ⁷	5	5	5,00 X10 ⁵
21/08/2018	6	17	20,33 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	1,87 X10 ⁶
24/08/2018	9	56,33 X1 ⁶	38,66 X10 ⁶	52,66 X10 ⁶	49,22 X10 ⁶	4,92 X10 ⁶
27/08/2018	12	106,66 X10 ⁵	135	86,33 X10 ⁶	109,33 X10 ⁵	1,09 X10 ⁷
30/08/2018	15	153,33 X10 ⁵	203,66 X10 ⁵	225,33 X10 ⁵	194,11 X10 ⁵	1,94 X10 ⁷
03/09/2018	19	270,33 X10 ⁵	234,66 X10 ⁵	269	258	2,58 X10 ⁷
06/09/2018	22	319	264,66 X10 ⁵	235	272,88 X10 ⁵	2,73 X10 ⁷
11/09/2018	27	246,66 X10 ⁵	255,33 X10 ⁵	236,33 X10 ⁵	246,11 X10 ⁵	2,46 X10 ⁷
13/09/2018	29	308,33 X10 ⁵	238,66 X10 ⁵	261,66 X10 ⁵	269,55 X10 ⁵	2,70 X10 ⁷
20/09/2018	36	344,66 X10 ⁵	266,66 X10 ⁵	252,33 X10 ⁵	287,88 X10 ⁵	2,88 X10 ⁷

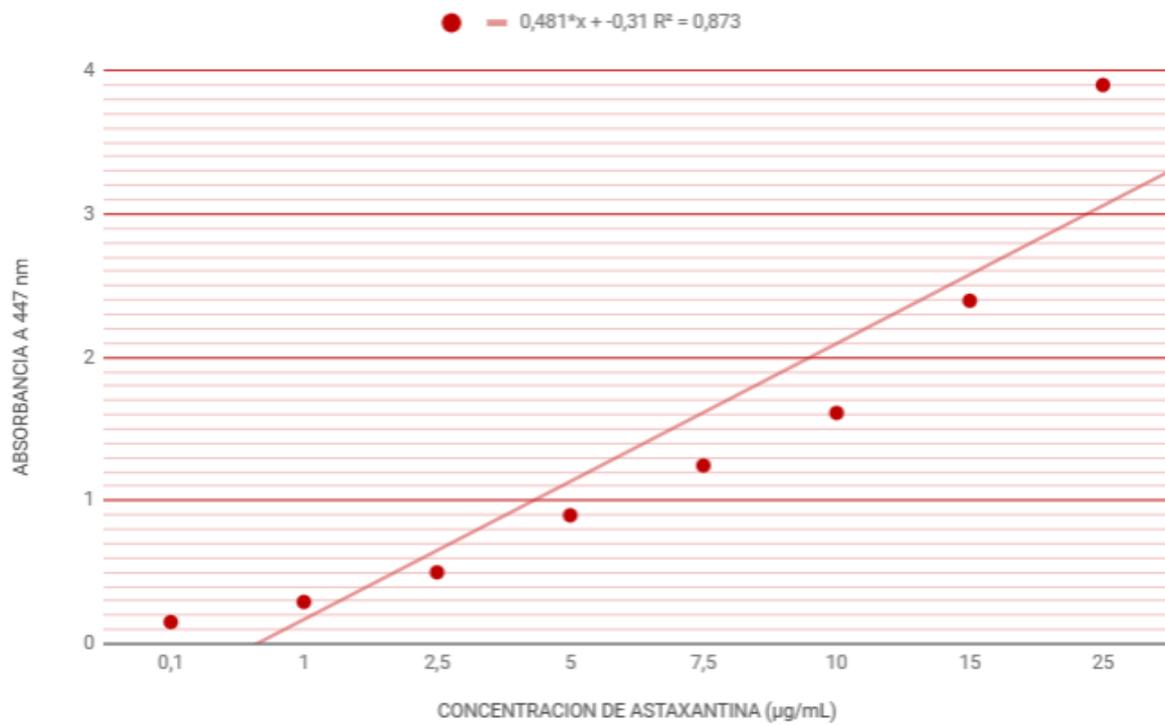
Anexo 2 Conteo celular de *H. pluvialis* en medio RM. Elaborada por los autores, 2018.

FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
08/10/2018	4	27	18	21,66 X10 ⁶	22,22 X10 ⁶	2,22 X10 ⁶
11/10/2018	7	30,33 X10 ⁶	19,33 X10 ⁶	62	37,22 X10 ⁶	3,72 X10 ⁶
16/10/2018	12	46	43	41,33 X10 ⁶	43,44 X10 ⁶	4,34 X10 ⁶
18/10/2018	14	48,66 X10 ⁶	50	53	50,55 X10 ⁶	5,06 X10 ⁶
22/10/2018	18	71,33 X10 ⁶	73	63,66 X10 ⁶	69,33 X10 ⁶	6,93 X10 ⁶
25/10/2018	21	100,33 X10 ⁶	98,66 X10 ⁶	101	100	1,00 X10 ⁷
29/10/2018	25	192,66 X10 ⁵	168,66 X10 ⁵	156	172,44 X10 ⁵	1,72 X10 ⁷
01/11/2018	28	211,66 X10 ⁵	204,33 X10 ⁵	210	208,66 X10 ⁵	2,09 X10 ⁷
06/11/2018	33	225,66 X10 ⁵	232	232,66 X10 ⁶	230,11 X10 ⁵	2,30 X10 ⁷
08/11/2018	35	241,33 X10 ⁵	241,66 X10 ⁵	245,66 X10 ⁵	242,88 X10 ⁵	2,43 X10 ⁷

Anexo 3 Curva de calibración para la determinación de la concentración de clorofila.
Elaborada por Niño et al, 2017⁸⁹.



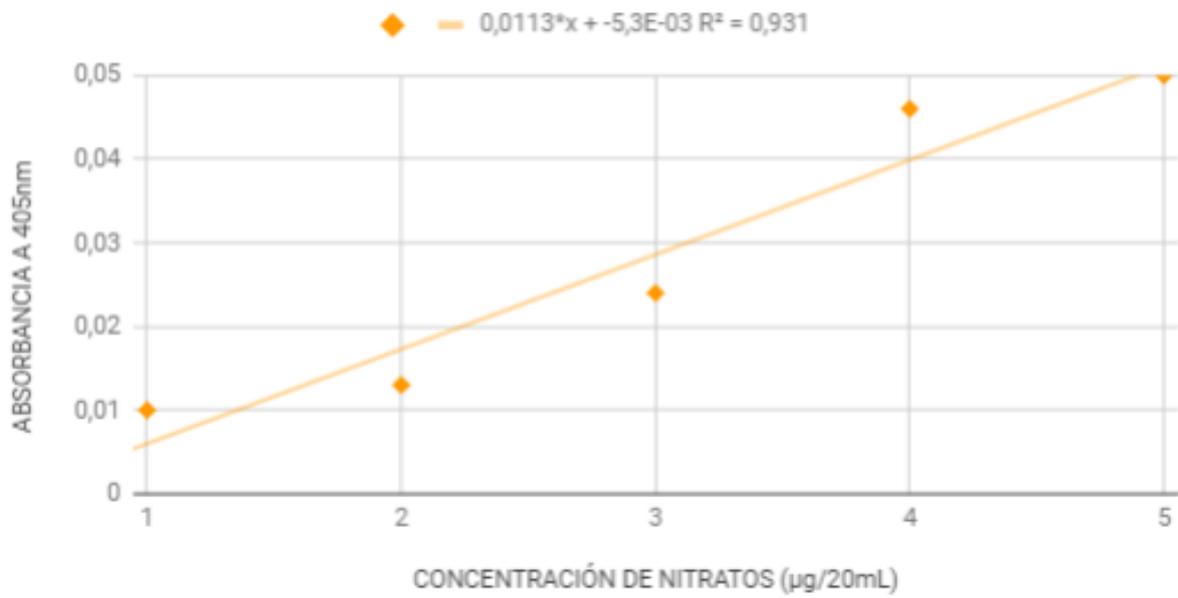
Anexo 4 Curva de calibración para la determinación de la concentración de astaxantina. Elaborada por Niño et al, 2017⁸⁹.



Anexo 5 Concentración de clorofila y astaxantina para los medios BBM y RM.
Elaborada por los autores, 2018.

MEDIO DE CULTIVO BBM				
DIA	CLOROFILA		ASTAXANTINA	
	µg/mL	µg/cel	µg/mL	µg/cel
2	1	2,00E-07	0	0,00E+00
6	3,8	2,04E-07	0	0,00E+00
9	6,3	1,28E-07	1,2	2,44E-08
12	15,3	1,40E-07	1,7	1,55E-08
15	26,8	1,38E-07	2,5	1,29E-08
19	28,3	1,10E-07	2,6	1,01E-08
22	14,2	5,20E-08	2,7	9,89E-09
27	6,3	2,56E-08	2,9	1,18E-08
29	3,9	1,45E-08	3	1,11E-08
36	2,1	7,29E-09	3,1	1,08E-08
MEDIO DE CULTIVO RM				
DIA	CLOROFILA		ASTAXANTINA	
	µg/mL	µg/cel	µg/mL	µg/cel
4	1	4,50E-08	0	0,00E+00
7	1,2	3,22E-08	0	0,00E+00
12	5,9	1,36E-07	1,3	2,99E-08
14	13,6	2,69E-07	1,6	3,16E-08
18	15,8	2,28E-07	2,4	3,46E-08
21	20,2	2,02E-07	2,5	2,50E-08
25	21,8	1,26E-07	2,6	1,51E-08
28	16,4	7,86E-08	2,71	1,30E-08
33	5,5	2,39E-08	2,83	1,23E-08
35	2,9	1,19E-08	2,9	1,19E-08

Anexo 6 Curva de calibración para la determinación de la concentración de nitratos.
Elaborada por Leiton, 2018 ⁹⁴.



Anexo 7 Concentración de nitratos para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

MEDIO DE CULTIVO BBM	
DIA	NITRATOS ($\mu\text{g}/20\text{mL}$)
12	80,32
15	55,63
19	47,04
22	44,39
27	44,18
29	14,68
36	6,51
MEDIO DE CULTIVO RM	
DIA	NITRATOS ($\mu\text{g}/20\text{mL}$)
12	50,82
14	43,83
18	40,14
21	33,59
25	31,14
28	22,85
33	21,47
35	16,66

Anexo 8 ANOVA crecimiento celular

Análisis de Varianza (Una Vía)							
Estadística Descriptiva							
Grupos	Tamaño muestral	Suma	Media	Varianza			
cel/mL (1)	10	171.090.000,0000	17.109.000,0000	1,3005E+14			
cel/mL (2)	10	117.670.000,0000	11.767.000,0000	7,5416E+13			
Total	20		14.438.000,0000	1,0484E+14			
ANOVA							
Origen de la Variación	d.f.	SS	MS	F	Valor p	F crit	Omega Cuadrado
Entre Grupos	1	1,4268E+14	1,4268E+14	1,3889	0,2539	4,4139	0,0191
Dentro de Grupos	18	1,8492E+15	1,0273E+14				
Total	19	1,9919E+15					
Error estándar de los residuos	10.135.806,9897						
Hartley Fmax (d.f. = 2, 9)	1,7245						
Cochran C (d.f. = 2, 9)	0,6330						
Bartlett Chi-square (d.f. = 1)	0,6254	Valor p	0,4291				

Anexo 9 ANOVA concentración de clorofila

Análisis de Varianza (Una Vía)							
Estadística Descriptiva							
<i>Grupos</i>	<i>Tamaño muestral</i>	<i>Suma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>			
BBM CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/mL}$	10	108,0000	10,8000	100,3222			
RM CONCENTRACION $\mu\text{g/ML}$	10	104,3000	10,4300	63,8779			
Total	20		10,6150	77,8150			
ANOVA							
<i>Origen de la Variación</i>	<i>d.f.</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Valor p</i>	<i>F crit</i>	<i>Omega Cuadrado</i>
Entre Grupos	1	0,6845	0,6845	0,0083	0,9283	4,4139	-0,0522
Dentro de Grupos	18	1.477,8010	82,1001				
Total	19	1.478,4855					
Error estándar de los residuos	9,0609						
Hartley Fmax (d.f. = 2, 9)	1,5705						
Cochran C (d.f. = 2, 9)	0,6110						
Bartlett Chi-square (d.f. = 1)	0,4308	Valor p	0,5116				
Post-hoc comparisons							
Pro versión requerida, actualiza por favor.							

Anexo 10 ANOVA producción y acumulación de astaxantina

Análisis de Varianza (Una Vía)							
Estadística Descriptiva							
Grupos	Tamaño muestral	Suma	Media	Varianza			
BBM astaxantina ($\mu\text{g/mL}$)	10	19,7000	1,9700	1,4268			
RM astaxantina ($\mu\text{g/mL}$)	10	18,8400	1,8840	1,2543			
Total	20		1,9270	1,2719			
ANOVA							
Origen de la Variación	d.f.	SS	MS	F	Valor p	F crit	Omega Cuadrado
Entre Grupos	1	0,0370	0,0370	0,0276	0,8699	4,4139	-0,0511
Dentro de Grupos	18	24,1294	1,3405				
Total	19	24,1664					
Error estándar de los residuos	1,1578						
Hartley Fmax (d.f. = 2, 9)	1,1375						
Cochran C (d.f. = 2, 9)	0,5322						
Bartlett Chi-square (d.f. = 1)	0,0354	Valor p	0,8508				

Anexo 11 Concentración de nitratos en los medios BBM y RM

Análisis de Varianza (Una Vía)

Estadística Descriptiva							
Grupos	Tamaño muestral	Suma	Media	Varianza			
BBM	7	292,7500	41,8214	615,9608			
RM	8	260,5000	32,5625	141,5795			
Total	15		36,8833	357,6337			
ANOVA							
Origen de la Variación	d.f.	SS	MS	F	Valor p	F crit	Omega Cuadrado
Entre Grupos	1	320,0503	320,0503	0,8877	0,3633	4,6672	-0,0075
Dentro de Grupos	13	4.686,8210	360,5247				
Total	14	5.006,8713					
Error estándar de los residuos	18,9875						
Hartley Fmax (d.f. = 2, 7)	4,3506						
Cochran C (d.f. = 2, 7)	0,8131						
Bartlett Chi-square (d.f. = 1)	3,0902	Valor p	0,0788				