



PRODUCCION DE *Haematococcus pluvialis* EN UN BIORREACTOR TECFERM DE 5 L EN MEDIOS DE CULTIVO RM Y BBM.



YENI ANDREA LEITON ARCOS

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

Asesora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

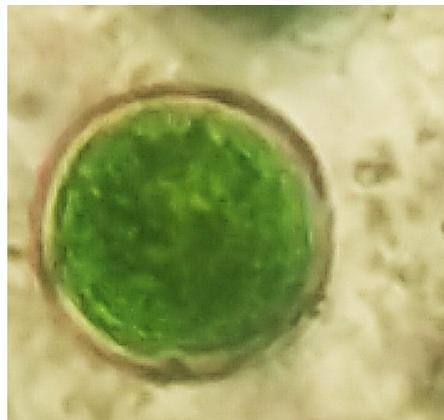
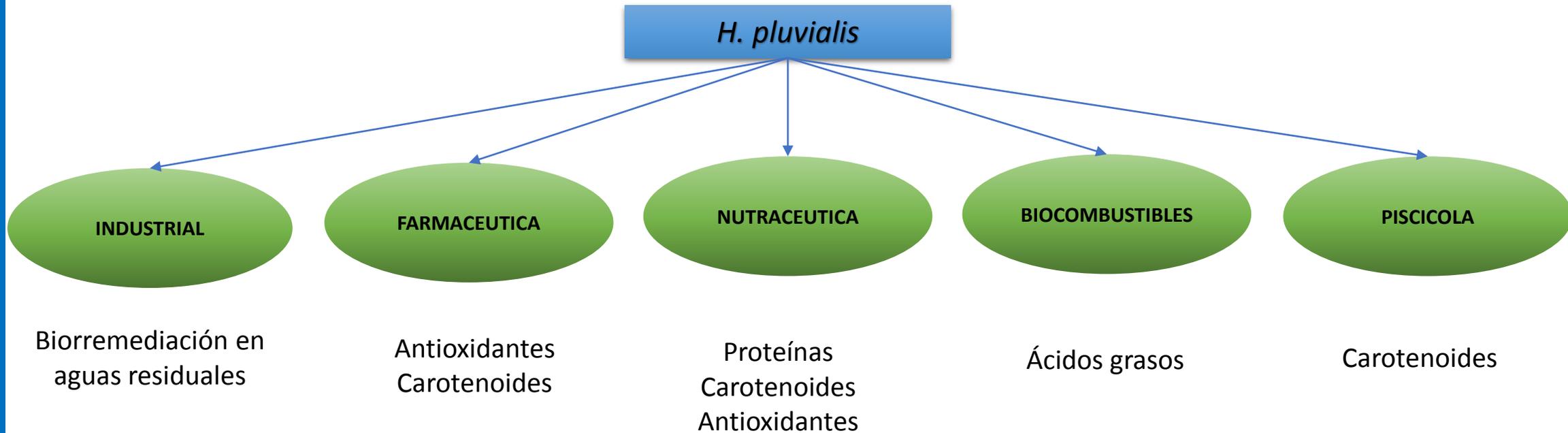
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO

CONTENIDO

- ✓ INTRODUCCION
 - ✓ OBJETIVOS
 - ✓ ANTECEDENTES
 - ✓ MARCO TEORICO
- ✓ DISEÑO METODOLOGICO
- ✓ RESULTADOS Y DISCUSION
 - ✓ CONCLUSIONES

INTRODUCCION



Fuente: Autora

- ✓ Ciclo de vida complejo
- ✓ Crecimiento lento
- ✓ Necesidad de condiciones adecuadas de cultivo

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biomasa adecuados en cantidad y calidad a partir de la microalga *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 litros.

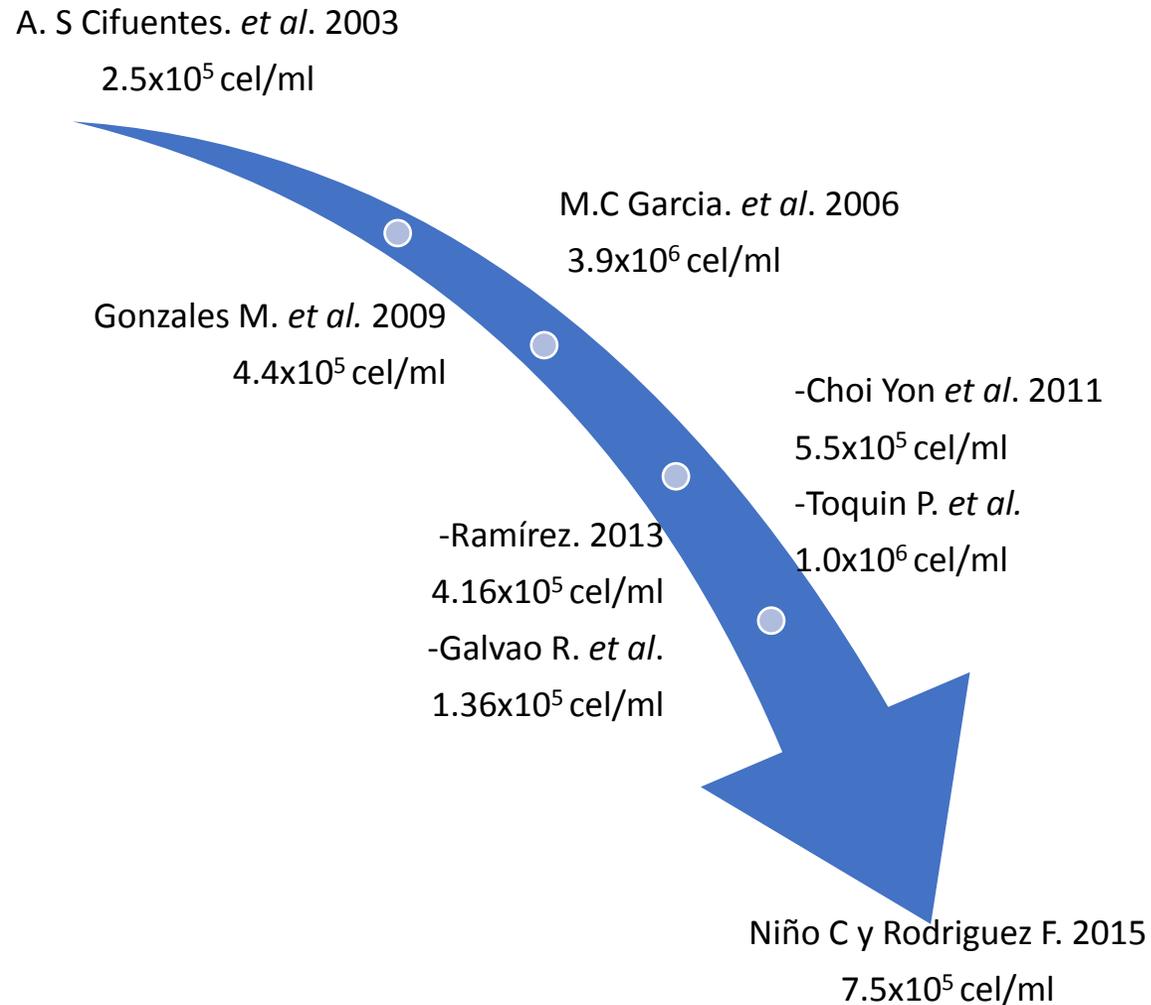
OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar el cultivo de *H. Pluvialis* en el biorreactor de 5 litros utilizando medios de cultivo RM y BBM, bajo condiciones previamente establecidas.

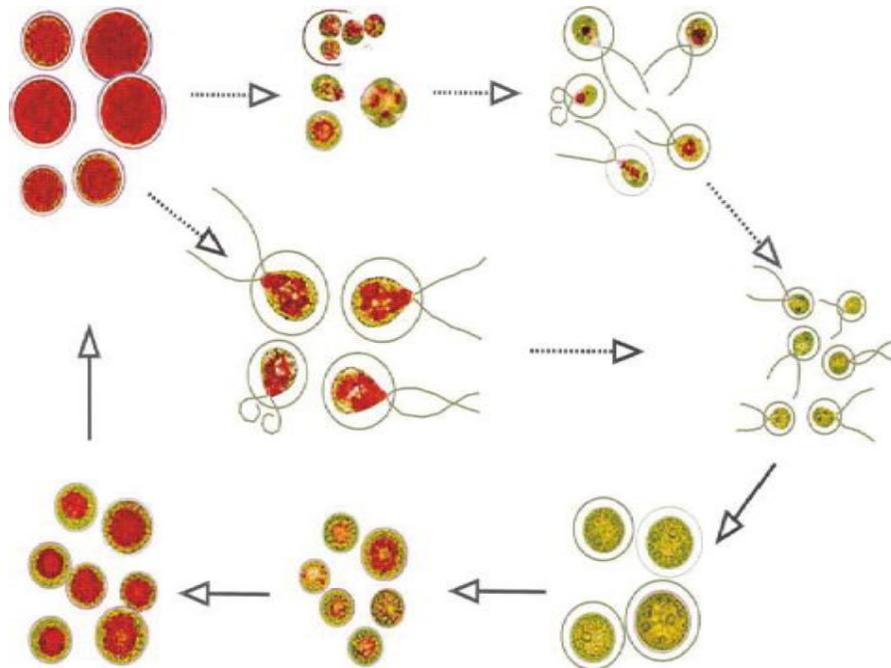
Evaluar la morfología de *H. Pluvialis* durante el cultivo en los diferentes medios ensayados.

Determinar el medio de cultivo adecuado y las condiciones de crecimiento para una buena producción de biomasa de *H. pluvialis* en el biorreactor utilizado.

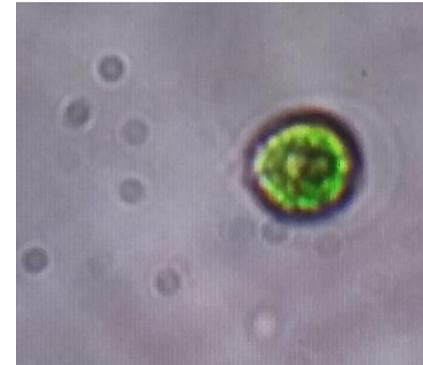
ANTECEDENTES



Haematococcus pluvialis



Ciclo celular *H. pluvialis* (22)



Fuente: Autora



Fuente: Autora

PHYLLUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GENERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>Pluvialis</i>

Clasificación taxonómica *H. pluvialis* (19)

CULTIVO DE *H. pluvialis*

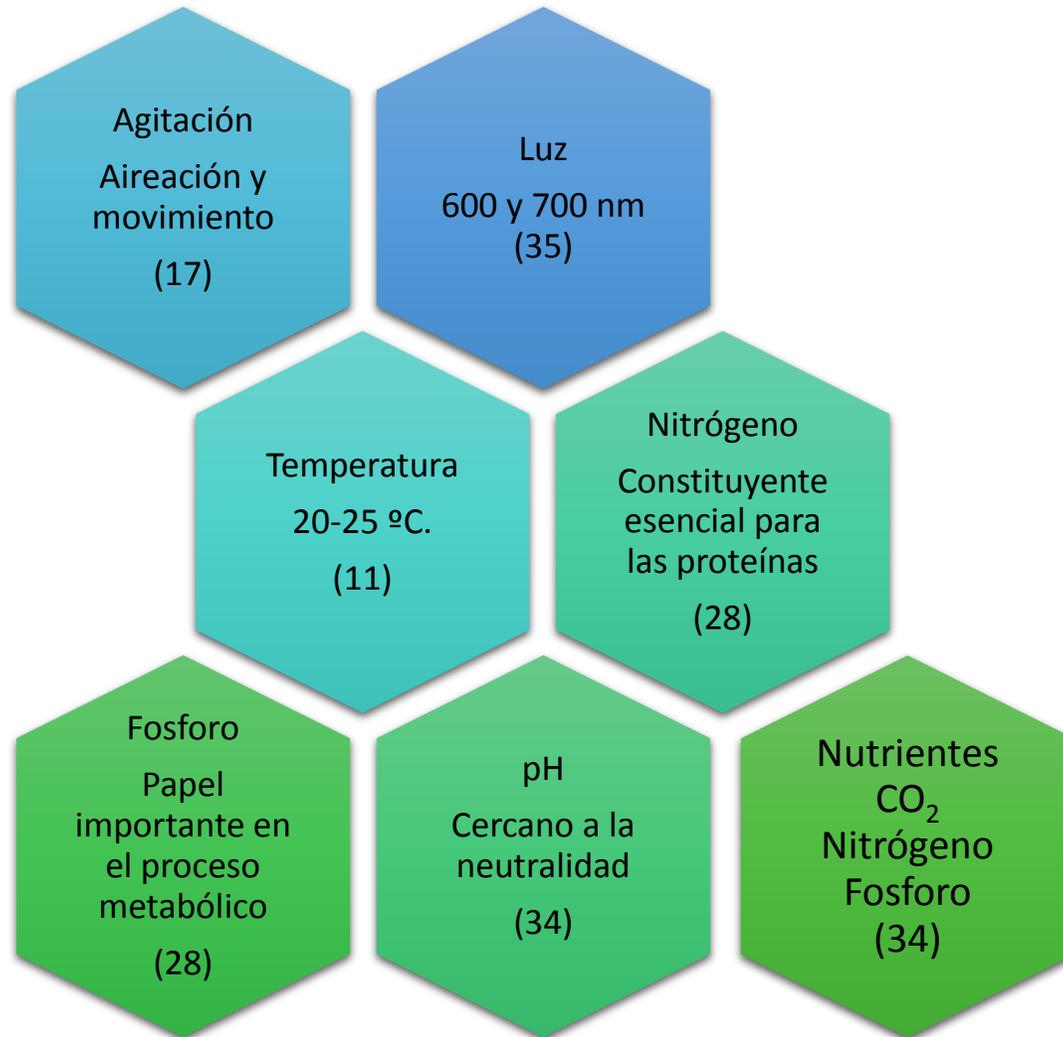
METABOLISMOS	FUENTE DE ENERGÍA	FUENTE DE CARBONO
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Mixótrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y orgánico

Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas (27)

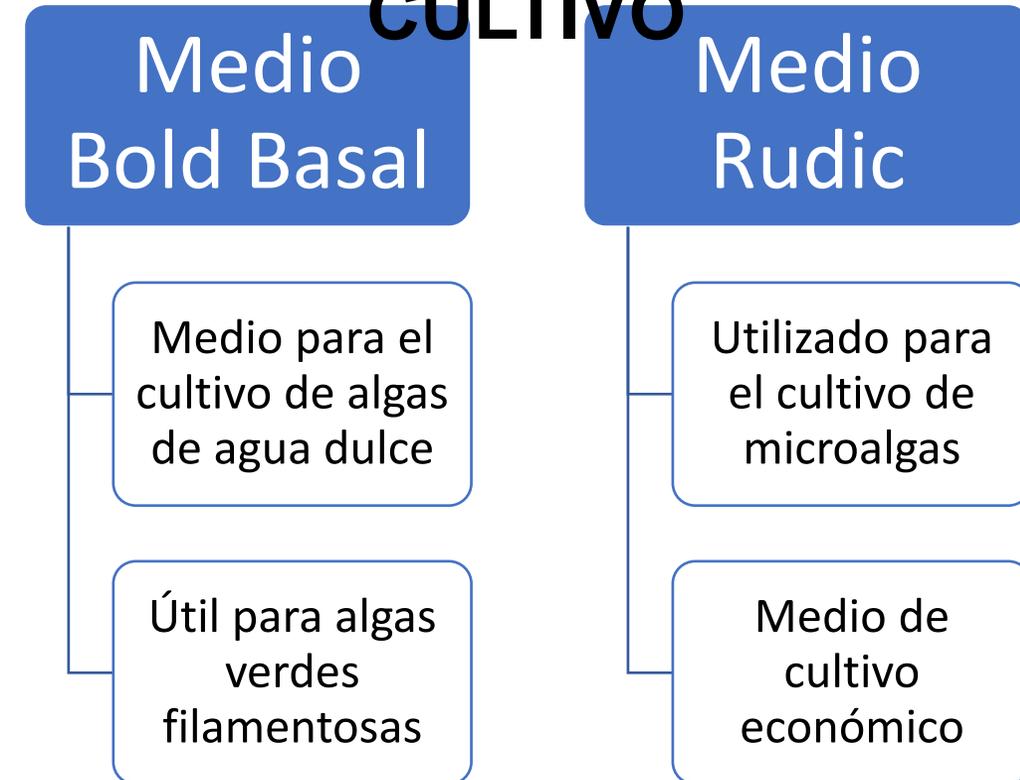
METABOLISMO	ECUACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA
Foto autótrofo	$\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{h\nu} \text{C}_{(biomasa)} + 1/2\text{O}_2 + 3\text{OH}^- \Rightarrow \text{pH incrementa}$
Heterótrofo	$(1 + a) \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{C}_{(biomasa)} + a\text{CO}_2 + (1+a) \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{pH disminuye}$
Mixotrofo	$b\text{HCO}_3 + c\text{CH}_2\text{O} \xrightarrow{h\nu} (b + (c-a)) \text{C}_{(biomasa)} + 3\text{OH}^- + a\text{CO}_2 \Rightarrow \text{los cambios no son significativos}$

Ecuaciones estequiométricas de los diferentes metabolismos en las microalgas. (27)

FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE *H. pluvialis*



MEDIOS DE CULTIVO

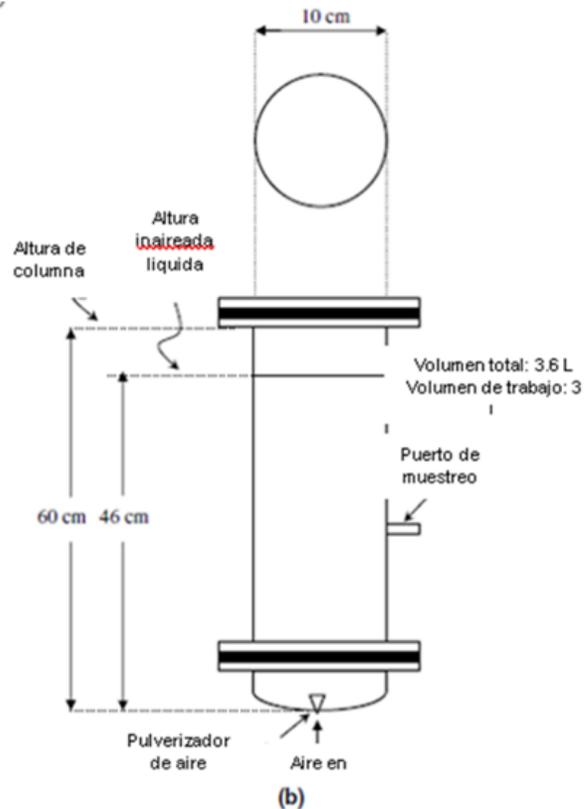


SISTEMAS DE CULTIVO

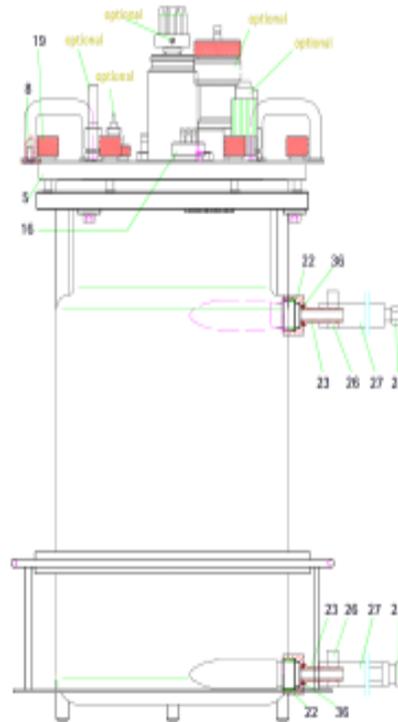
SISTEMAS ABIERTOS

Existen dos tipos de sistemas de cultivo para organismos fotoautótrofos

SISTEMAS CERRADOS



Biorreactor de Columna. (37)



Fuente: autora

VENTAJAS:

1. Facilidad para cultivar la biomasa.
2. Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
3. Mejor control de las condiciones de cultivo.
4. Menor inversión de capital

ASPECTOS CLAVE PARA EL DISEÑO DE FOTOBIOREACTORES:

- Distribución de luz
- Mezclado
- Uso de aire

BIORREACTOR TECFERM 5 L

- Sistema básico de investigación para el cultivo de bacterias y hongos
- Capacidad de 2, 5, 10 o 20 litros.
- Reactor tipo tanque de agitación, con capacidad total de 7.5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 5 litros.
- El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm, sin embargo, se recomienda operarlo entre 50 y 300 rpm.
- El rango de temperatura usual es entre 30 y 40 grados.
- El pH puede ser controlado automáticamente en un rango entre 0 y 14.
- Este sistema puede operar en forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno (39)



Fuente: Autora



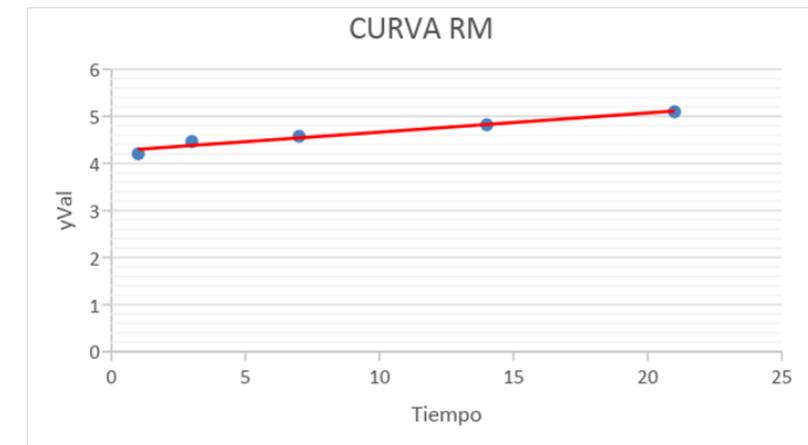
Fuente: Autora

MODELOS PARA AJUSTES DE CRECIMIENTO

Útil para ajustar los resultados prácticos obtenidos y determinar variables como

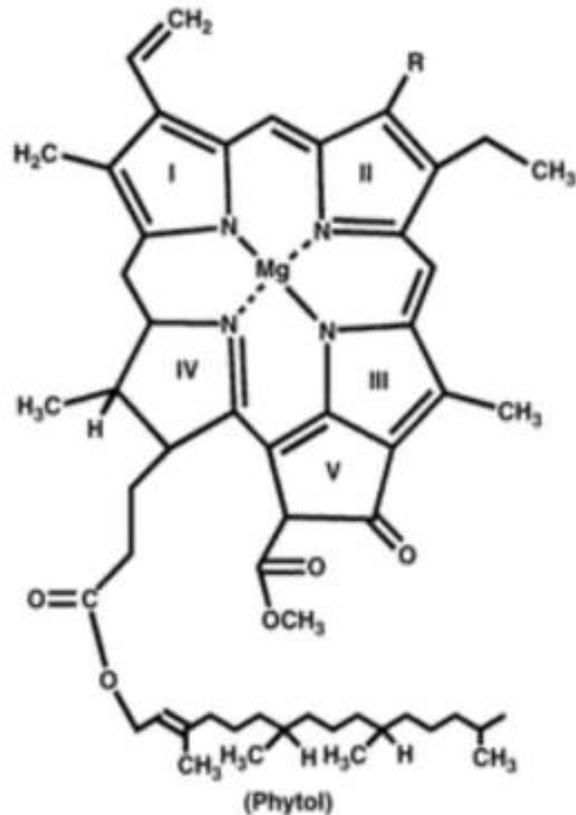
- Velocidad máxima de crecimiento
- Tiempo de duplicación
- Crecimiento máximo

MODELO	ECUACIÓN
Modelo de Gompertz:	$y = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$
Modelo de Baranyi:	$y = A + \mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0}\right) - \ln\left(1 + \frac{e^{\frac{\mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0}\right)} - 1}}{e^{(y_{\max} - A)}}}\right)$
Modelo logístico:	$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda - t) + 2\right]\right\}}$
Modelo de Huang	$y = A + y_{\max} - \ln\left(e^A + (e^{y_{\max}} - e^A)e^{-\mu_{\max} B(x)}\right)$ $B(x) = x + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-\alpha(x-\lambda)}}{1 + e^{\alpha\lambda}}$



Fuente: Autora

CLOROFILA



Estructura molecular de clorofila a y b. R= $-\text{CH}_2$ en clorofila a o $-\text{CHO}$ en clorofila b. (28)

Familia de pigmentos color verde presentes en cianobacterias y en aquellos microorganismos que contienen cloroplastos

Esencial en el proceso de fotosíntesis

Usada como colorante natural en industrias alimenticias y farmacéuticas, se encuentra relacionada con propiedades nutracéuticas, antiinflamatorias, antioxidantes y profilácticas.

FASE 1

REVISIÓN TEÓRICA PARA
ESTABLECER CONDICIONES DE
CULTIVO

PREPARACION DE INOCULO
EN MEDIO VOLVOX

Periodo de cultivo: 20 dias



Fuente: autora

10% de inculo en 500 mL de medio
Volvox

- ✓ Fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad luz blanca (lamparas fluorescentes blancas Phillips Master TL5 HO de 54W/827)
- ✓ Aire filtrado
- ✓ pH: 6.8
- ✓ Agitación manual, 10 seg/día
- ✓ Temperatura 20°C

1×10^4 cel/ml

ENSAYO EN BIORREACTOR
TECFERM DE 5L

Periodo de cultivo: 21 dias



Fuente: autora

Cultivo en medios RUDIC (RM) y BOLD BASAL
MEDIUM (BBM)

- ✓ Fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad luz blanca (lamparas fluorescentes blancas Phillips Master TL5 HO de 54W/827) Aire filtrado
- ✓ pH: 6.8
- ✓ Agitación 180 rpm
- ✓ Temperatura 20°C

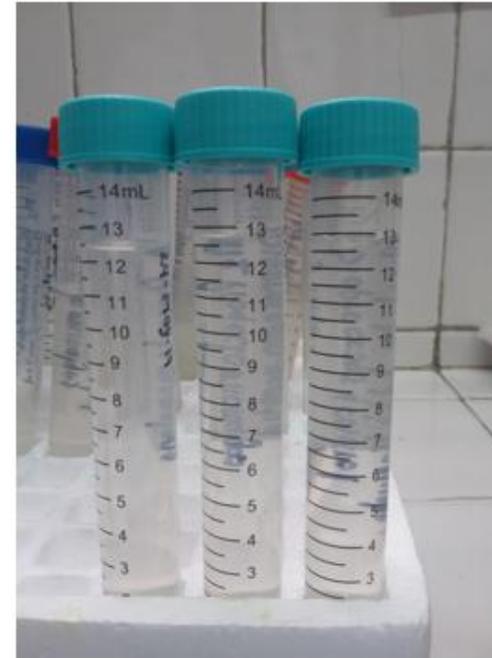
FASE 2

RECuento Y MONITOREO DE MORFOLOGIA EMPLEANDO CAMARA DE NEUBAUER



<https://www.auxilab.es/es/productos-laboratorio/camara-ce-neubauer-improved/>

Recuento por triplicado



Fuente: autora

Se realizo un ajuste de crecimiento basado en el modelo de Baranyi empleando el software DMFit

FASE 3

CLOROFILA

Se centrifugo 1 ml de muestra para la obtención de células

Adición de 1 mL de metanol al 90%, se incubo a 60°C por 10 minutos

Lectura en espectrofotómetro Jenway a 667 nm (mg/ml)

NITRATOS

Método colorimétrico de ácido salicílico

20 ul de muestra se incuban con ácido salicílico por 20 minutos

Neutralización con 500 ul de NaOH 3.8 M

Lectura en espectrofotómetro Jenway a 405 nm (ug/20 ml)

FOSFATOS

Por reacción con ácido ascórbico

Se mezclaron 50 ul de medio con 50 ul de solución

Acido ascórbico 2%
Molibdato de amonio 0.5%
Acido sulfúrico 0.6M

Lectura en espectrofotómetro Jenway a 750 nm (ug/ml)

pH

Por medio de potenciómetro

tomando 15 mL de muestra en tubo falcon.

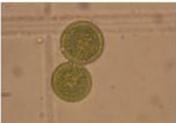
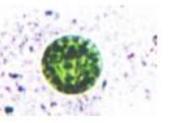
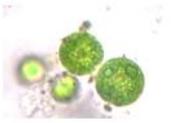
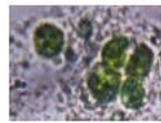
Análisis de costos para determinar el medio mas económico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

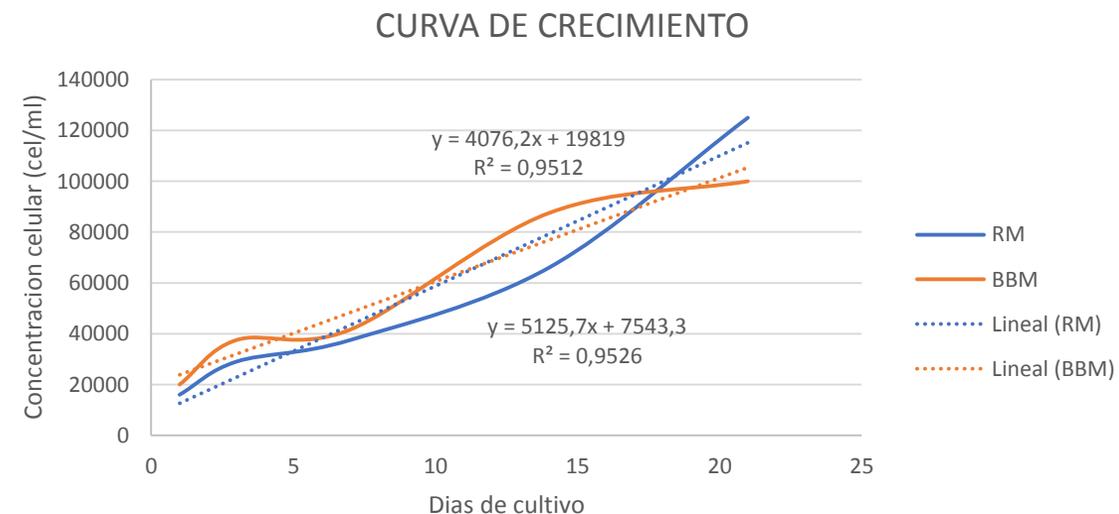
REVISION TEORICA

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Condiciones de cultivo	Densidad celular maxima	Fuente
Biorreactores de cristal de 500 mL	Medio Bristol	Temperatura 23°C intensidad de luz de 35 mmol m ⁻² s ⁻¹ , fotoperiodo 16:8 (L:O) agitada manualmente dos veces al día.	2.5x10 ⁵ cel/ml	6
Fotobiorreactor tubular y de columna de burbujas de 2L	medio de cultivo libre de acetato	Temperatura: 20 ° C pH: 8.0 por inyección de CO2	3.9x10 ⁶ cel/ml	8
Fotobiorreactor marca airlift	Medio OHM	Temperatura 22 °C Agitación a 180 rpm Iluminación continua con intensidad de 50 E m ⁻² s ⁻¹ con tubos fluorescentes blancos cálidos de 20 vatios Dióxido de carbono : 5%	5.5x10 ⁵ cel/ml	10
fotobiorreactor tipo airlift.	medio BBM , BG11, OHM, F1, BBM:BG11	Temperatura: 24 +/- 2 °C Luz blanca , lámparas fluorescentes Sylvania Daylight F48T12/D de 39W, fotoperiodo de 12:12 Luz:oscuridad Aireación: 0.5 vvm, aire atmosférico filtrado	4.1x10 ⁵ cel/ml	12
Fotobiorreactores de placas planas de 4 L.	Medio Rudic RM	Temperatura: 22 +/- 1 °C intensidad de luz, desde 2000 a 10000 lux Vol de reacción: 3.5 L de los cuales el inóculo constituía el 10% pH: 6.5 a 12.5	1.36x10 ⁵ cel/ml	13

CRECIMIENTO CELULAR

MEDIO	DENSIDAD CELULAR				
	Día 1	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21
RM	1.6X10 ⁴	2.9X10 ⁴	3.7X10 ⁴	6.6X10 ⁴	1.25X10 ⁵
					
BBM	2.0X10 ⁴	3.7X10 ⁴	4.1X10 ⁴	8.7X10 ⁴	1.0X10 ⁵
					

ANOVA 95% (P=0.918)



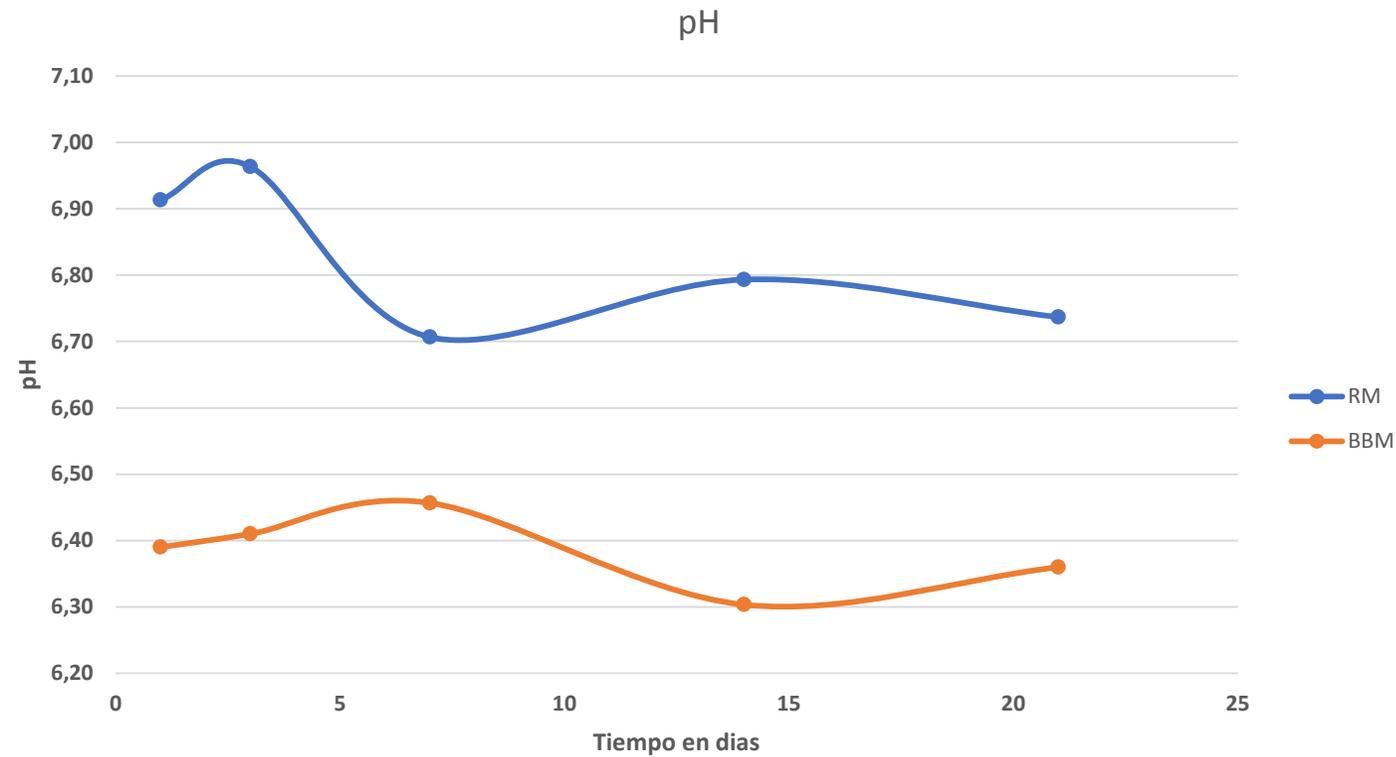
Coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM	5	4.204	5.096	0.040 cel/día	96%
BBM	5	4.301	5.000	0.032 cel/día	88%

Rosana M. 2013. 1.3 x10⁵
RM

Ramírez Landines. 2013.
4.0x10⁵ BBM

RM: 6.9-6.7
 BBM: 6.39-6.36

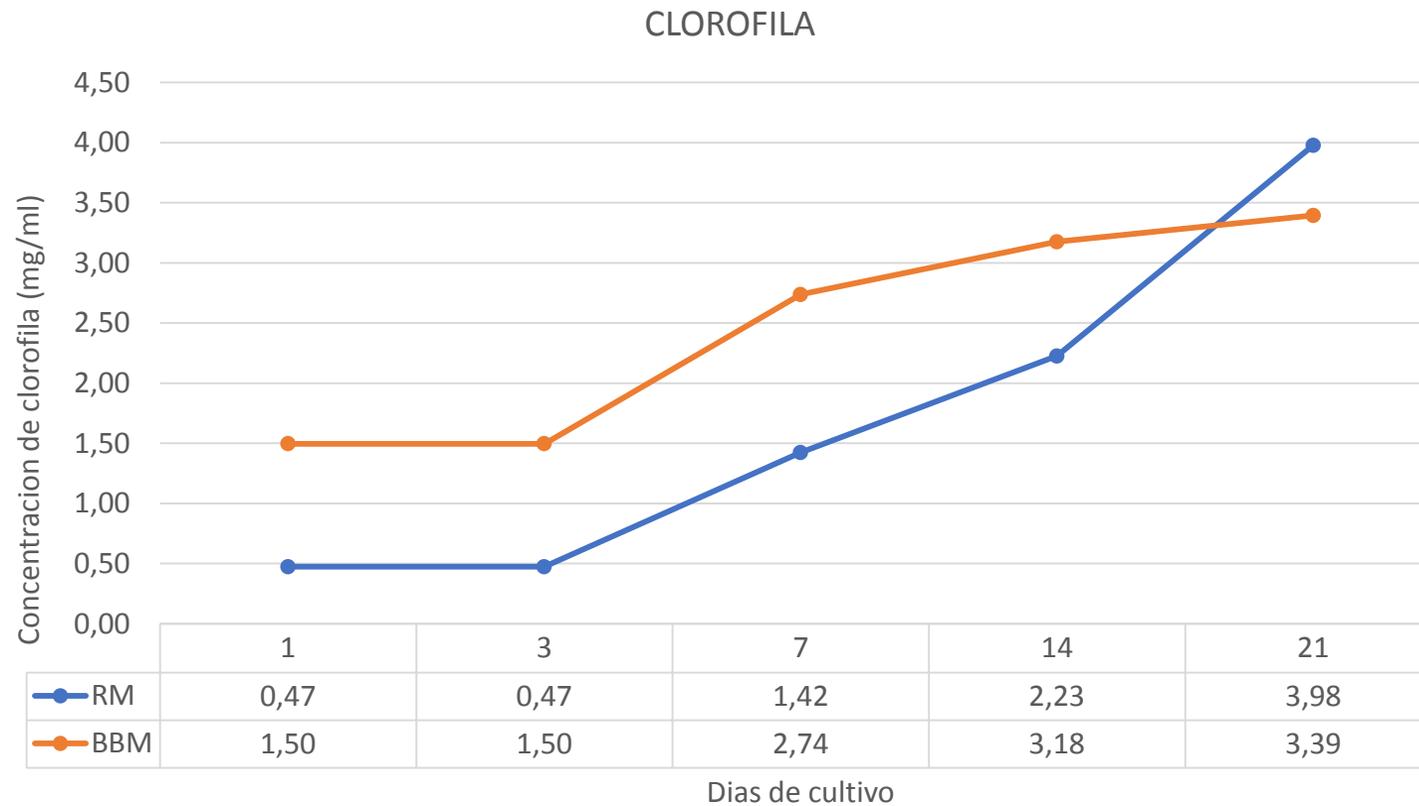


Santhose B. et al.
 2014
 pH:7-8

Sipauba Tavares.
 et al. 2013
 7-8

Niño C, Rodriguez
 F. 2015
 6.3-7.4

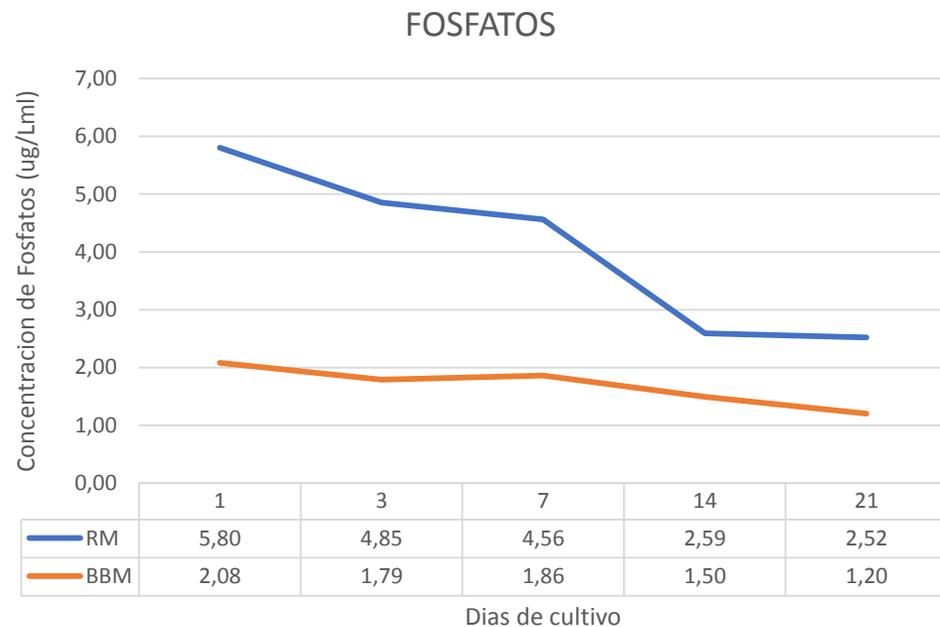
RESULTADOS



ANOVA (P=0.934)

Sibauba Tavares. *et al.*
2012
205,53 mg/L
Volumen total 13 L
13 días
WC

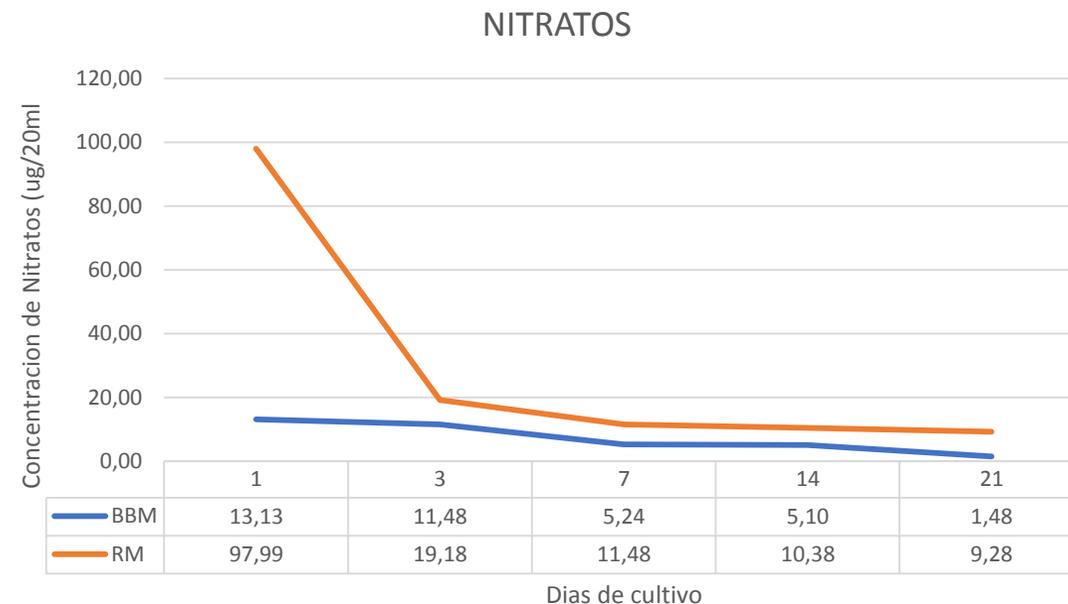
RESULTADOS



RM: 5.80 ug/ml – 2.52 ug/ml → 56 %
 BBM: 2.08 ug/ml – 1.20 ug/ml → 42 %
 ANOVA 95% (P=0.007)

Toquin P. *et al* 2011
 Medio M1B5, 2×10^6
 4.5 mg/ ml

RM y BBM
 K_2HPO_4 , KH_2PO_4



RM: 97.9 ug/ 20 ml – 10.3 ug/20 ml → 90 %
 BBM: 13.1 ug/ 20 ml – 1.48 ug/ 20 ml → 88 %
 ANOVA 95% (P=0.232)

Sipauba L, et al. 2015
 0.6 ug/ml W.C
 0.3 ug/ml NPK
 0.6 ug/ml M+npk

RM y BBM
 $NaNO_3$

ANALISIS DE COSTOS

RUDIC (RM)			MEDIO BOLD BASAL (BBM)		
Reactivos	mg/L	Precio (pesos)	Reactivos	mg/L	Precio (pesos)
NaNO ₃	300	11,4	KH ₂ PO ₄	175	52.5
K ₂ HPO ₄	80	0,95	CaCl ₂ •2H ₂ O	25	1.57
KH ₂ PO ₄	20	0,006	MgSO ₄ •7H ₂ O	75	18.6
MgSO ₄ • 7H ₂ O	10	2,5	NaNO ₃	250	9.5
CaCl ₂ • H ₂ O	58.5	3,69	K ₂ HPO ₄	75	0.89
EDTA	7.5	11,87	NaCl	25	0.25
NaCl	20	0,206	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	10	0.37
H ₃ BO ₃	0.3	0,005	KOH	6200	690
MnSO ₄ H ₂ O	1.5	0,049	FeSO ₄ •7H ₂ O	4.98	0.001
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.1	0,313	H ₂ SO ₄	1 mL	0,002
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ •4H ₂ O	0.3	0,006	H ₃ BO ₃	2.86	0.047
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.08	0,448	MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81	0.059
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.26	1,3	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22	0.68
FeCl ₃ •6H ₂ O	17	0,255	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.39	0,0001
TOTAL		32,9	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.079	0.44
			Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.049	0.24
			Vitamina B12	0.001	0.22
			Biotina	0.001	0.005
			Tiamina	0.200	22
			TOTAL		779.3

Sipauba L, et al . 2015
NPK y M+NPK: 5 vitaminas
WC: 2 vitaminas

Toquin p. et al 2011
Vitamina B12: 12 mg/L

TABLA RESUMEN

Medios	RM	BBM	ANOVA
Densidad celular (cel/ml)	1.25X10 ⁵	1.0X10 ⁵	P=0.918
Crecimiento máximo (cel/ml)	5.096	5,000	>0.05
Velocidad de crecimiento (cel/día)	0.0406	0.0327	>0.05
Fosfatos (ug/ml)	2.52	1.20	P=0.007
Nitratos (ug/ 20 ml)	9.28	1.48	P=0.232
Clorofila (mg/ml)	3.98	3.39	P=0.934

- ✓ Fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad luz blanca (lamparas fluorescentes blancas Phillips Master TL5 HO de 54W/827) Aire filtrado
 - ✓ pH: 6.8
 - ✓ Agitación 180 rpm
 - ✓ Temperatura 20°C



Fuente: autora



Fuente: autora

CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo adecuadas como pH 6.8 - 7.1, temperatura 20°C +/- 1°C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, luz blanca (lámparas marca) y fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad favorecen el crecimiento de la microalga al otorgar un ambiente óptimo para su desarrollo en los diferentes medios ensayados en el biorreactor TECFERM 5 L.

La morfología celular varió entre células flageladas y células palmeloides sin llegar a células enquistadas, lo que nos indica que las condiciones y medios de cultivo utilizados en este estudio fueron favorables y no generaron estrés en el desarrollo de la microalga.

El cultivo de la microalga se llevó a cabo de manera adecuada en los medios RM y BBM, estos permiten un buen crecimiento celular y producción de clorofila gracias a su contenido de nutrientes, observándose un mejor crecimiento con el medio RM.

El análisis de costos estableció que el medio menos costoso para el cultivo del *H. pluvialis* corresponde al RM, con el que se obtuvo un buen crecimiento y una mayor cantidad de clorofila y mejor aprovechamiento de los nutrientes.

RECOMENDACIONES

Utilizar el biorreactor Tecferm 5L, con las condiciones establecidas en este estudio para obtener los metabolitos de interés.

Seguir utilizando este biorreactor para otro tipo de investigaciones .

Revisar técnicas mas avanzadas para el monitoreo de morfología y determinación de parámetros

Aumentar el volumen de producción de biomasa en el biorreactor utilizado

BIBLIOGRAFIA

- M, Moreno D, Pérez J. Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia [Internet]. 2013 jun;30. [consultado: 27 mayo 2017]. disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/ambienteydesarrollo/articulo/view/6049>
- Biblioteca digital. Moreno J, Evaluación del crecimiento y carotenogenesis de cuatro cepas de microalgas marinas bajo condiciones de estrés por iluminación a temperatura y salidas constantes [Internet]. [consultado 11 abril 2017]. Disponible en: <http://www.bidi.uson.mx/TesisIndice.aspx?tesis=20804>
- Medina Jasso, A., P. Piña Valdez, M. Nieves Soto, J.F. Arzola González y M. Guerrero Ibarra. La importancia de las microalgas. CONABIO. Biodiversitas, 103:1-5 [Internet]. 2012. [consultado: 11 abril 2017]. Disponible en: http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/_9_articulosrevistasdifusion/22.pdf
- Cyanotech Corporation. Lorenz T. A technical review of Haematococcus Algae. [Internet]. 1999. [consultado 11 abril 2017] Disponible en: <https://www.cyanotech.com/pdfs/bioastin/axbul60.pdf>
- Rost EJ, Perez LB, Cartens MR, Perales SG. producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor discontinuo en escala piloto de configuración variable en régimen de incremento lineal de la concentración. [Internet]. 2013. [consultado 26 abril 2017] Disponible en: http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/04_025/papers/02a/02a_1487_520.pdf
- Cifuentes A, Gonzales M, Vargas S, Hoeneisen M. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Biol Res 2011; 36: pp. 343-357
- Tsang S K. Optimal harvesting strategy for Haematococcus pluvialis using a stella-based model [Internet]. 2004. [consultado 26 abril 2017] Disponible en: http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/handle/10125/10395/uhm_ms_3938_r.pdf?sequence=1
- García M C, Del Río E, Casas J, Fernández F, Fernández J, Rivas J, et al. Comparative analysis of the outdoor culture of Haematococcus pluvialis in tubular and bubble column photobioreactors [Internet]. 2006 [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: https://www.academia.edu/4108592/Comparative_analysis_of_the_outdoor_culture_of_Haematococcus_pluvialis_in_tubular_and_bubble_column_photobioreactors
- Gonzales M, Cifuentes A, Gómez P. Growth and total carotenoid content in four Chilean strains of Haematococcus pluvialis Flotow, under laboratory conditions. [Internet]. 2009. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/4796/1/Tesis%20JORGE%20%20SANCHEZ%20MARTINEZ.pdf>
- Choi Y, Yeoung-Sang Y, Moon J, Ji-Won Y. Multistage Operation of Airlift Photobioreactor for Increased Production of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Journal of microbiology and biotechnology
- Tocquin P, Fratamico A, Fabrice F. Screening for a low-cost Haematococcus pluvialis medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. [Internet]. 2011. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <https://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/103905/1/2011-JAPH-2.pdf>
- Ramirez D. Universidad Nacional de Colombia. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift. [Internet]. 2013. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/Proyecto.xhtml?idProyecto=11978>
- Galvao R, Santana T, Fontes C, Sales E. Modeling of biomass production of Haematococcus pluvialis. Scientific Research. Agosto 2013, 4: pp 50-56
- Sipauba L, Millan R, Berchirli F. Effects of some parameters in upscale culture of Haematococcus pluvialis Flotow. Brazilian Journal of Biology. Agosto 2013; 73(3), pp 585-591
- Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. Attached cultivation of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production. Bioresource Technology. 2014, pp 329-335
- Santhos B, Elumalai S, Kanna G. Airlift Photobioreactor Cultivation of a New Strain of Haematococcus pluvialis Collected from High Altitude Regions of Himalayas. International Journal of Science and Research (IJSR). 2014; 3, pp 2289-2289
- Sipauba L, Berchirli F, Scardoeli B. Growth of Haematococcus pluvialis Flotow in alternative media. Brazilian Journal of Biology. 2015; 75(4): pp 796-803
- Granada P, Granada R. Producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis. [Internet]. 2015. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015_04%28S%29.pdf
- Niño C, Rodríguez F. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO CELULAR Y FACTORES DE ESTRÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA Haematococcus pluvialis. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca, Septiembre 2015.
- Litao Z, Fang S, Chunhui Z, Fengying G, Jianguo L. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis grown outdoors in tubular photobioreactors. [Internet]. 2016. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297668/>
- Cajamar ADN Agro, ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. [Internet]. 2015. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.fundacioncajamar.es/pdf/bd/comun/transerencia/microalgas-1444391623.pdf>

BIBLIOGRAFIA

- Thalgo la beaute marine, Thalgo Alemania. [consultado 26 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.thalgo.es/algues/index.0-h.html>
- Instituto tecnológico de Sodora, Mc Gahey L, Uzziel A. Produccion de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. [consultado 07 de septiembre de 2017]. Disponible en <https://es.scribd.com/document/333299378/Haematococcus-pluvialis-1>
- Mahfuzur R, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*. Abril 2016; 531(7): pp 5-8
- Anónimo. Cuantificación de clorofila a. [Internet]. [consultado 07 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEWjft4STusnWAHUBXyYKHQ6DqgQFgg0MAI&url=http%3A%2F%2Fwww.cofes.org.ar%2Fdescargas%2Frelas%2F5_jornada%2F4_CLOROFILA.pdf&usg=AFQjCNEMSU5arxW-6mzz_XiPeP-RvPYZg
- Ecosistemas. Manrique E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>
- Richmond A. Handbook of Microalgal Culture. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=SM6m4GZ_Ok0C&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+Microalgal+Culture+Amos+Richmond&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook+of+Microalgal+Culture+Amos+Richmond&f=false
- V. Lallana, M. Lallana. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal [Internet]. 2003. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwib55MvsnWAHUFMyYKHVRVAPQFggIMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fca.uner.edu.ar%2Ffiles%2Fademica%2Fdeptos%2Fatedras%2Ffisiologiaveg%2Fm_didactico%2Fmanual_practicas%2Fcrecimiento_AED.pdf&usg=AFQjCNGOjOcutOP7e1zPzyqChtWZuFegmQ
- Nivia S. Nivia, R Luis, Q leila, L Eduardo, Q María, Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. [Internet]. 2015. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwin7qGjv8nWAHUDZCYKHa4ADV8QFggIMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uteq.edu.ec%2Frevistacyt%2Fpublico%2Farchivos%2FC2_V8%2520N2%25203Streit%2520et%2520a.pdf&usg=AFQjCNGbOStXJeiJ8fucyKOMV2uScjFQjg
- Andex Biotechnology, FRANKLIN STREET 567, MANHATTAN, NEW YORK, USA. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.andexs.org/lineas-de-investigacion/haematococcus-pluvialis/>
- Albade J, Orosa M, Torres E, Cid A. LA MICROALGA *Haematococcus* COMO FUENTE DE ASTAXANTINA. [Internet]. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10777/CC%2048%20art%205.pdf?sequence=1>
- Gómez L, Moreno B, Velásquez M, Aguirre C, Aguado G. CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN. ESTABLECIMIENTO Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN. 2014; 37(2): pp 166,167
- Hernandez A, Labbè J. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2014; 49(2): pp 157-173
- University of Waterloo, Waterloo ON, Canada [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <https://uwaterloo.ca/canadian-phycolgical-culture-centre/cultures/culture-media/bolds-basal-medium>
- Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Universidad de Almería [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>
- Lopez F, Rojas R. Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. [Internet]. 2010. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6563/2/133250.pdf>
- K Kamonpan, S Artawan, P Sorawit, P Prasert Pavasant. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*. 2007; 98: pp 288-295.
- Zuluaga D. Curso: operación fermentador Tecferm 5L
- J Cristhian. Microbiología predictiva: una ciencia en auge. . [Internet]. 2013. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/312656779_Microbiologia_predictiva_Una_ciencia_en_auge
- L. Santtiesteban, A. Lopez. Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramienta para la conservación de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 2008; pp 14-26
- M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. *Asian Journal of Plant Biology* 2014; 2 (1): pp. 01-06
- Hernandez R, Fernandez C, Baptista P. Metodología de la investigación. México McGRAWHILLINTERAMERICMA Biocyclopedia; 2003 [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: http://www.eplantscience.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvox_medium_composition.php
- Biocyclopedia [Internet]. 2012. [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: http://www.eplantscience.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvox_medium_composition.php
- 45. Imamoglu E, Vardar F, Conk. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 2007; 1 (3): pp. 05-09
- 46. Universidad Autónoma de Tamaulipas, tutorial de análisis de agua. México [consultado 30 abril de 2017]. Disponible en: <http://arturobola.tripod.com/ph.htm> López-Roldán P. Efecto del consumo de Astaxantina en la salud. 2014.

AGRADECIMIENTOS

- A la universidad Colegio mayor de Cundinamarca, al laboratorio central y su personal y al grupo de bioprocesos y control por ser un apoyo para el desarrollo de este proyecto
- A la profesora Judith Elena Camacho Kurmen por su guía y apoyo en la ejecución de este proyecto.
- A los jurados por su asistencia y atención prestada para llevar a cabo la culminación de este trabajo.
- A Cristian Jiménez por su amor y apoyo, sin el no hubiera sido posible culminar este proyecto, a mi bebe por ser la principal motivación para no decaer ente los obstáculos y las adversidades.