



*PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* BAJO EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO DE SODIO*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ, 2019



*PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* BAJO EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO DE SODIO*

LAURA JOHANNA RODRÍGUEZ ROMERO

Asesor

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN QF. M.Sc. Doctor en Biociencias

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, 2019

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
1. Antecedentes.....	5
2. Marco referencial.....	16
2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	16
2.1.1 Taxonomía y localización.....	16
2.1.2 Ciclo biológico.....	17
2.1.3 Usos.....	20
2.1.4 Cultivo de <i>H. pluvialis</i> para la producción de astaxantina.....	20
2.2 Astaxantina.....	21
2.2.1 Usos de astaxantina.....	23
2.2.2 Ruta metabólica para producir astaxantina.....	24
2.3 Clorofila.....	27
2.4 Factores que promueven el crecimiento de <i>H. pluvialis</i>	31
2.4.1 Cultivos.....	31
2.4.1.1 Cultivo fotoautotrófico.....	31
2.4.1.2 Cultivo mixotrófico.....	32
2.4.2 Luz.....	33
2.4.3 Temperatura.....	33
2.4.4 Nitrógeno.....	34
2.4.5 Fosforo.....	35
2.4.6 Hierro.....	36
2.5 Factores que promueven la producción de astaxantina y clorofila en <i>H. pluvialis</i>	36
2.5.1 Luz.....	36
2.5.2 Sales.....	38
2.6 Métodos de medición de biomasa.....	39
2.6.1 Cámara de Neubauer.....	39
2.6.2 Peso seco.....	40
2.6.3 Densidad óptica.....	40
2.6.4 Epifluorescencia.....	41
2.7 Métodos de medición de astaxantina y clorofila.....	41

2.7.1	Espectrofotómetro.....	41
2.7.2	HPLC.....	41
2.8	Métodos de medición de proteínas.....	42
2.8.1	Electroforesis.....	42
2.8.2	Western blot.....	43
2.8.3	PCR.....	44
3.	Diseño metodológico.....	45
3.1	Universo población, muestra.....	45
3.2	Hipótesis, variables e indicadores.....	45
3.3	Técnicas y procedimientos.....	46
3.3.1	Fase 1 Crecimiento de <i>Haematococcus pluvialis</i>	46
3.3.2	Fase 2 Cambios morfológicos celulares.....	47
3.3.3	Fase 3 Cuantificación de astaxantina y clorofila.....	47
4.	Resultados.....	48
4.1	FASE 1 Evaluación crecimiento de <i>H. pluvialis</i>	48
4.2	FASE 2 Evaluación cambios morfológicos macroscópicos y microscópicos de <i>H. pluvialis</i>	53
4.3	FASE 3 Cuantificación astaxantina y clorofila.....	61
5.	Discusión.....	66
6.	Conclusiones.....	72
	Recomendaciones.....	74
	Referencias bibliográficas.....	75
	Anexos.....	85
	Agradecimientos.....	90

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Taxonomía <i>pluvialis</i>	16
Tabla 2 Composición del medio RM.....	20
Tabla 3. Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas.....	31
Tabla 4 Metabolismos en microalgas y ecuaciones estequiométricas.....	31
Tabla 5 Variables e indicadores del experimento.....	45
Tabla 6 Tratamientos.....	46
Tabla 7 Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los tratamientos realizados.....	52
Tabla 8 Tabla resumen de los tratamientos realizados.....	65

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Fig. 1 Imágenes microscópicas de las fases que atraviesa <i>H. pluvialis</i>	18
Fig.2 Ciclo de vida <i>H. pluvialis</i>	19
Fig. 3 Estructura química de la astaxantina.....	23
Fig. 4 Biosíntesis de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	26
Fig 5 Fosforilación no cíclica.....	28
Fig. 6 Curva de crecimiento RM1 Control.....	48
Fig. 7 Curva de crecimiento RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L.....	49
Fig. 8 Curva de crecimiento RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L.....	49
Fig. 9 Curva de crecimiento RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L.....	50
Fig. 10 Curva de crecimiento RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L.....	51
Fig. 11 Curva de crecimiento RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L.....	51
Fig. 12 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Dia 1.....	53
Fig. 13 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Dia 7.....	54
Fig. 14 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Dia 15.....	55
Fig. 15 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 26.....	56
Fig. 16 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 28.....	57

Fig. 17 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 35.....	58
Fig. 18 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 49.....	59
Fig. 19 Cultivo <i>H. pluvialis</i> Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 56.....	60
Fig. 20 RM1 Control astaxantina y clorofila.....	61
Fig. 21 RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L astaxantina y clorofila.....	61
Fig. 22 RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L astaxantina y clorofila.....	62
Fig. 23 RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L astaxantina y clorofila.....	63
Fig. 24 RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L astaxantina y clorofila.....	63
Fig. 25 RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L astaxantina y clorofila.....	64

INDICE DE ANEXOS

				Pág
Anexo	1	Resultados	curva	de
crecimiento.....				85
Anexo 2		Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferentes concentraciones de sales en el crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i>		85
Anexo	3	Resultados	cuantificación	de
clorofila.....				86
Anexo 4		Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferentes concentraciones de sales de la microalga <i>H. pluvialis</i> respecto a la concentración de clorofila.....		86
Anexo	5	Resultados	cuantificación	de
astaxantina.....				87
Anexo 6		Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferentes concentraciones de sales de la microalga <i>H. pluvialis</i> respecto a la concentración de astaxantina.....		87
Anexo 7		Curvas ajustadas.....		88
Anexo 8		Concentración y absorbancia calibración astaxantina.....		88
Anexo 9		Curva de calibración astaxantina.....		89
Anexo 10		Concentración y absorbancia calibración clorofila.....		89
Anexo 11		Curva de calibración clorofila.....		89



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN Haematococcus pluvialis BAJO EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO DE SODIO

RESUMEN

H. pluvialis es una microalga utilizada para la producción de astaxantina, este es un betacaroteno y antioxidante en la industria. El objetivo del trabajo es utilizar diferentes factores de estrés para obtener una mayor producción de astaxantina, la microalga se cultivó en medio RM bajo condiciones de pH 6,8, temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos. Este estudio se realizó durante 56 días. Se determinó el crecimiento celular, el análisis de los cambios morfológicos y la cuantificación de astaxantina y clorofila por el método de espectrofotometría. Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA (95%).

Se evidenció una mayor producción de astaxantina al ensayo adicionado con 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio. Un 20% mayor superando los demás tratamientos con 7,3 $\mu\text{g/ml}$. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F=1,687$; $p=0,165$; $gl=5$). El tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L + cloruro de sodio 1,28 g/L presentó el mayor crecimiento celular de $1,64 \times 10^5$ células/ml, presentándose diferencias significativas entre tratamientos ($F=22,47$; $p=0,025$; $gl=5$), y se observó para la concentración de clorofila ($F=4,307$; $p=0,003$; $gl=5$), obteniéndose para este tratamiento 0,245 $\mu\text{g/ml}$. La mayor producción de astaxantina se logró utilizando acetato de sodio desde el inicio del cultivo, seguido por la adición de cloruro de sodio al finalizar su fase exponencial.

PALABRAS CLAVES: microalga, carotenoides, factores de estrés, estrés salino, luz

LAURA JOHANNA RODRIGUEZ ROMERO

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

2019

INTRODUCCIÓN

El alga unicelular *H. pluvialis* ha sido estudiada exhaustivamente debido a su capacidad para acumular astaxantina y otros carotenoides relacionados. La astaxantina es la fuente principal del color rojo de los peces salmónidos, ya que los animales no pueden sintetizar astaxantina, por lo tanto, debe agregarse en sus dietas para obtener la coloración de la carne deseada para mejor aceptación por parte del consumidor. También se ha demostrado que tiene efectos en la salud humana, ya que las propiedades antioxidantes de la astaxantina protegen contra la fotooxidación de la luz UV, la inflamación, el cáncer, el envejecimiento y a la degeneración macular relacionada con la edad con el aumento de la respuesta inmune, la función hepática y la salud del corazón, los ojos, las articulaciones y la próstata, por esto ha sido aprobada como aditivo colorante y suplemento dietético.

La acumulación de este antioxidante en la microalga *H. pluvialis* está relacionado con la evolución de diferentes etapas de la célula vegetativa a la aplanospora en el ciclo de la microalga, pero esta transición solo se da cuando esta ha sido sometida a diferentes condiciones de estrés. Actualmente se conocen diferentes condiciones de estrés como limitación de nitrógeno, deficiencia de magnesio, alta intensidad de luz, falta de fósforo y por último estrés salino, el cloruro de sodio y el acetato de sodio han demostrado ser una fuente importante de carbono, lo que mejora el crecimiento y la carotenogénesis, ya que afectan la ruta de la fotosíntesis y aumentan la expresión genética de la enzima BKT.

El estrés salino se puede realizar con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio para encontrar las concentraciones óptimas para la producción de biomasa y la obtención incrementada de astaxantina, siendo esta de un gran interés biotecnológico, ya que existen diferentes industrias como cosmética, farmacéutica y pecuaria que están interesadas en este carotenoide. - Se ha demostrado que el acetato de sodio regula negativamente los genes relacionados con las proteínas de antena de fotosíntesis y cuando está combinado con el cloruro de sodio producen una transcripción temprana y regulación máxima positiva del gen BKT (enzima β -caroteno cetolasa) que se encarga de la transformación de zeaxantina a adonixantina y adonixantina a astaxantina.

Por lo anterior, la investigación busca producir astaxantina utilizando recursos naturales de subproductos de microalgas como *H. pluvialis* que según la literatura e investigaciones realizadas obtiene un carotenoide de excelente calidad, ya que actualmente se sintetiza químicamente y esta forma sintética es de alto costo 2500 dólares por kilogramo, además esta ha sido prohibida en el mercado por la

Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) debido a su baja biodisponibilidad y seguridad. Estas preocupaciones son debidas a la estereoquímica diferente y el potencial arrastre de los intermedios de síntesis, haciendo que la astaxantina natural de *H. pluvialis* sea una buena opción de buena calidad frente a la forma química y con respecto a los otros microorganismos que son capaces de producirla.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto del acetato de sodio y cloruro de sodio sobre la producción de astaxantina en *H. pluvialis*

Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de *H. pluvialis* a escala de 400 ml por 56 días.
- Evaluar el cambio morfológico de *H. pluvialis* durante los 56 días de estudio bajo diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio
- Determinar la concentración de clorofila y astaxantina durante el periodo de estudio bajo estrés lumínico y estrés salino utilizando acetato de sodio y cloruro de sodio.

1. ANTECEDENTES

A continuación, se presentan una serie de investigaciones realizadas utilizando la microalga *H. pluvialis* tras someterla a condiciones de estrés que contribuyen al presente objetivo del trabajo.

Steinbrenner *et. al.* (2001) se investigó la expresión de las enzimas fitoeno sintasa y carotenoide hidroxilasa, dos enzimas clave en la biosíntesis de astaxantina, a nivel transcripcional. La aplicación de estrés ambiental resultó en un aumento de los niveles de ARNm en estado estable de ambos genes. La intensidad de luz alta condujo a un aumento transitorio en el ARNm de la carotenoide hidroxilasa seguido de una acumulación moderada de astaxantina. En contraste, el estrés salino en combinación con luz alta dio como resultado un aumento sostenido en ambas transcripciones.⁸⁹

El equipo de Sarada *et. al.* (2002) buscaba estudiar la influencia del estrés en la producción de astaxantina por eso cultivo *Haematococcus pluvialis* bajo una intensidad de luz continua de 1,5 lux durante periodos de 6 y 9 días y se añadió NaCl a diferentes concentraciones (0,25, 0,5, 1,0 y 2,0% p/v) junto con acetato de sodio (2,2 mM). La influencia de la salinidad en la edad del cultivo se investigó a intervalos de 4, 8, 12 y 16 días con 0,25% de NaCl y 2,2 mM de acetato de sodio y luego se incubó durante un período de 12 días. Al final del período experimental, los cultivos se analizaron para determinar el contenido de biomasa y carotenoides. Adicionalmente se estudió la influencia del pH por eso durante 9 días se sometió a estrés añadiendo NaCl al 0,25% junto con acetato sódico 4,4 mM y el pH del medio basal se ajustó a 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0. Respecto a los resultados, la adición de NaCl junto con acetato de sodio mostró marcadas diferencias en el contenido de astaxantina en cultivos de 6 y 9 días de edad. Hubo un aumento en la producción de astaxantina de los cultivos de 4 a 16 días. Sin embargo, el aumento en la producción de astaxantina entre 4 y 8 días fue significativamente mayor que en otros cultivos. El contenido de carotenoides aumentó de 0.8 a 1.6% durante un período de 16 días. El contenido de clorofila disminuyó con la edad de los cultivos. La proporción de carotenoides / clorofila (un parámetro para distinguir entre células quísticas maduras, inmaduras y maduras) aumentó con la edad del cultivo de 0,9 a 3. 0 en culturas de 4-16 días.¹⁶

Cifuentes *et. al.* (2003) realizó un estudio en Nevada, Estados Unidos; su objetivo era descubrir las condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina. *H. pluvialis* creció en condiciones mixotróficas con 4, 8, 12 mM de acetato de sodio bajo dos densidades de flujo de fotones de 35 y 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La carotenogénesis fue inducida por tres condiciones: adición de NaCl 0.2 y 0.8%, privación de N y alta PFD 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para calcular los carotenoides totales utilizaron espectrofotometría y

astaxantina total por HPLC. Concluyeron que, al aumentar la concentración de acetato de sodio, se produjo un ligero incremento en el crecimiento solo a $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, también la luz fue el mejor factor inductivo carotenogénico, y la producción más alta de carotenoides de 4.9 mg l^{-1} y $25.0 \text{ pg célula}^{-1}$ y el NaCl provocó un aumento en el contenido de carotenoides por célula al aumentar las concentraciones pero también dio como resultado una alta mortalidad celular. El contenido más alto de carotenoides por célula de 22 pg y el contenido de astaxantina por peso seco $10,3 \text{ mg g}^{-1}$ se obtuvieron a $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 0,8% de NaCl. ¹⁴

Steinbrenner *et. al.* (2003) en su estudio concluyo que la combinación de estrés salino junto con una mayor iluminación dio lugar a la formación de células quísticas, una alta acumulación de astaxantina y una fuerte inducción de los genes de biosíntesis de carotenoides. El equipo aisló y caracterizó genes de *Haematococcus* en la ruta de biosíntesis de los carotenoides como licopeno β ciclasa, fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa y carotenoide hidroxilasa. Los cuatro genes revelaron niveles de transcripción más altos en respuesta a intensidades de luz aumentadas. Usando inhibidores específicos del transporte de electrones fotosintéticos, encontraron que no solo la inducción de la biosíntesis de astaxantina, sino también la expresión de genes en respuesta al aumento de las intensidades de luz se correlacionaba con el estado redox del transporte de electrones fotosintéticos. Sus resultados sugirieron que en *Haematococcus* no solo la vía específica de astaxantina, sino también la biosíntesis general de carotenoides están sujetas al control transcripcional por la luz. Los cambios en las intensidades de luz parecían percibirse a través del estado de reducción / oxidación (redox) de los componentes del transporte de electrones fotosintéticos. ⁹⁰

En el trabajo de Domínguez *et. al.* (2004) se analizó la influencia de diferentes factores ambientales, como la intensidad de la luz, la aireación y los nutrientes sobre el crecimiento y la producción de astaxantina de *H. pluvialis*, por eso cultivaron la microalga en BBM, BG-11, FAB con iluminación continua $177 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz fluorescente blanca 12h luz/12h oscuridad durante 8 días. Y en el medio BAR con iluminación continua $345 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con aireación y sin aireación durante 14 días. El crecimiento máximo obtenido fue el siguiente: BBM $1,8 \times 10^5$ células/ml; BAR $0,6 \times 10^5$ células/ml; FAB $0,97 \times 10^5$ células/ml; BG-11 $1,4 \times 10^5$ células/ml. Los valores más significativos de producción de astaxantina fueron: BG-11 $1,98 \text{ mg/g}$ y BAR $3,3 \text{ mg/g}$ sin aireación. Cuando los cultivos fueron aireados, la producción fue significativamente menor: BBM $1,1 \text{ mg/g}$; BAR $2,2 \text{ mg/g}$. En el medio BAR con $345 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la producción de astaxantina fue aproximadamente 80% menor en cultivos aireados, la producción de clorofila fue mayor, oscilando entre 200 y 250 h, en cultivos aireados alcanzando $3,3$ y $2,0 \text{ mg l}^{-1}$. En conclusión, los factores óptimos en la producción de astaxantina fueron una iluminación de mayor intensidad de $345 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cultivos no tratados y el uso de acetato de sodio como fuente de carbono inorgánico en el medio

BAR. Por el contrario, la aireación promovió la producción de clorofila y la presencia de acetato de sodio y una mayor intensidad de luz interfirieron en el ciclo celular de *H. pluvialis*, por lo tanto, limitaron su crecimiento y proceso fotosintético.¹²

Brinda *et. al.* (2004) expuso *H. pluvialis* a estrés salino NaCl 0,04% y acetato de sodio 4mM para inducir la formación de quistes y acumulación de carotenoides, en medio BBM, los cultivos se incubaron a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo una fuente de luz multidireccional de intensidad 2 ± 0.2 klux. Las células se tiñeron con azul brillante coomassie en las etapas vegetativa, intermedia y enquistada. El crecimiento en términos de recuento de células se determinó utilizando un hemocitómetro. Con una biomasa de 1,26 g/l, producción de astaxantina de 3,4 microgramos/ml y 0,233% de clorofila (w/w).⁶⁹

En el trabajo de Orosa *et. al.* (2005) se probó el efecto de la concentración de acetato en el crecimiento celular y la síntesis de pigmentos, se añadió en concentraciones de 0%, 0,25%, 0,5%, 1% y 2% (p/v), los cultivos se mantuvieron a una irradianza de $68,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un ciclo de 12h luz/12h oscuridad. Las tasas de crecimiento de *H. pluvialis* se incrementaron mediante la adición de acetato al 0,25% (p / v) con respecto a los cultivos de control sin este compuesto, pero una concentración de acetato superior al 0,5% causó inhibición del crecimiento. El contenido máximo total de carotenoides por volumen de cultivo se obtuvo en cultivos con bajas concentraciones de acetato 0,25%, 0,5% y 1%, la mayor acumulación de astaxantina se produjo en cultivos con acetato al 2%,. El acetato parece ser una fuente importante de carbono, que mejora tanto el crecimiento como la carotenogénesis en pequeñas cantidades. Sin embargo, el efecto del acetato dependió de la concentración, las concentraciones más altas inhibieron el crecimiento pero aumentaron notablemente el contenido de astaxantina por célula. La adición de acetato en exceso puede generar una escasez relativa de formación de quistes inductores de nitrógeno y acumulación de astaxantina desencadenada por una alta proporción de carbono / nitrógeno (C / N). Las células parecen reducir su absorción de nitrógeno y comienzan a utilizar el nitrógeno celular como en la deficiencia típica de N, aunque el nitrógeno existe en el medio de cultivo.⁹

Kim *et. al.* (2006) estudiaron el efecto de la luz en *H. pluvialis*, ya que la luz intermitente ha despertado un interés creciente como un método potencial para mejorar la eficiencia de la fotosíntesis y la productividad de los productos impulsados por algas. Se compararon experimentos comparativos para producir alta concentración de astaxantina usando luz intermitente y se compararon los contenidos de astaxantina por energía de luz para confirmar los beneficios de la luz intermitente interna y externa. Cuando se iluminó externamente, la luz intermitente tuvo una intensidad promedio de $65,6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y mejoró el rendimiento de astaxantina por fotón en al menos 60%. Para luz intermitente iluminada internamente, con una intensidad media de solo $16,4 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la intensidad de luz instantánea máxima de $1724 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la luz intermitente

aumentó la producción de astaxantina por fotón en al menos un 400% que bajo fuentes de luz continuas. Estos resultados indicaron que la luz intermitente puede mejorar drásticamente la productividad de astaxantina en *H. pluvialis*, especialmente cuando se usa luz intermitente internamente.³²

Jeon *et. al.* (2006) desarrollaron una investigación con el fin de analizar los efectos combinados de la intensidad de la luz y la concentración de acetato sobre el crecimiento de la microalga unicelular *H. pluvialis*. Las condiciones de cultivo mixotróficas se optimizaron parcialmente utilizando un diseño factorial secuencial, realizando varios experimentos hasta lograr la optimización. Los autores concluyeron que los puntos centrales (0, 0) se asignaron como $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz y 30 mM de acetato y una tasa de crecimiento hasta $0.243 \text{g L}^{-1} \text{día}$. La observación directa de la morfología celular indicó que la célula tendía a cambiar de la etapa vegetativa a la quística con mayor rapidez bajo un alto nivel de acetato. Cuando se suministró acetato a más de 50 mM, el color de las células de algas se decoloró y finalmente murió. Sin embargo, aproximadamente 30 mM de acetato no causó el blanqueo celular e incluso ayudó a las células a mantener una etapa vegetativa a baja intensidad de luz. Hasta ahora, era bien sabido que el acetato promovía el enquistamiento de las células de *H. pluvialis* y aumentaba la formación de astaxantina. El presente estudio informa que un nivel adecuado de acetato también puede mejorar la productividad volumétrica de la biomasa celular cuando la luz se suministra simultáneamente. Se observó que el acetato podría promover el crecimiento celular de algas, pero la concentración de acetato debe controlarse a un nivel apropiado para evitar la inhibición por acetato⁸

Huang *et. al.* (2006) presentaron la identificación y expresión de tres genes diferentes de β -caroteno ketolasa (bkt) que participan en la biosíntesis de astaxantina, β -caroteno ketolasa es la única enzima que participa exclusivamente en la vía secundaria de los carotenoides a la astaxantina en *Haematococcus*, esta enzima juega un papel esencial en la iniciación dependiente del estrés de la síntesis de astaxantina. Dos ADNc cetolasa β -caroteno diferentes BKT1 (anteriormente CRT0) y BKT2 (anteriormente bkt) fueron aisladas de dos cepas diferentes de *H. pluvialis* en diferentes condiciones inducidas. La irradiación con luz alta $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o 45 mM de acetato de sodio aumentó en gran medida la expresión de los genes *bkt* a 18 o 52 veces más que en las células en crecimiento normal, dando como resultado una acumulación de astaxantina sustancial alrededor de 6mg g^{-1} biomasa seca en 3 días. Se sugiere que la existencia de múltiples genes *bkt* y su fuerte regulación por diferentes condiciones de estrés es una de las razones por las cuales *H. pluvialis* acumula grandes cantidades de astaxantina en una respuesta instantánea a ambientes de estrés.⁷

Imamoğlu *et. al.* (2007) realizaron una comparación entre dos medios utilizados en el cultivo de *H. pluvialis* y son: BG11 y RM. La concentración celular máxima de 9.50×10^5

células ml^{-1} , se obtuvo en medio de cultivo RM a la intensidad de luz de $40 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentración celular disminuyó solo un 7% en el medio BM en comparación con el medio de cultivo RM bajo la misma intensidad de luz. También concluyeron que el acetato es una importante fuente de carbono que mejora tanto el crecimiento como la carotenogénesis.²⁷

En el trabajo de Vidhyavathi *et. al.* (2008) se hicieron intentos para comparar los cambios en el perfil de pigmento con la expresión de genes carotenogénicos bajo diversas condiciones de estrés en *H. pluvialis* utilizando la técnica de RT-PCR. La formación mejorada de quistes y la acumulación de astaxantina mediante la adición de acetato de sodio, indicaron el papel del acetato de sodio en el aumento de la relación C/N, mejorando así la acumulación de astaxantina. La adición de cloruro de sodio dio como resultado la reducción del contenido total de carotenoides y el contenido de astaxantina en comparación con el control. Sin embargo, la adición de cloruro de sodio/acetato de sodio aumentó el contenido de astaxantina. La expresión de genes carotenogénicos, fitoeno sinteasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasa (LCY), β -caroteno cetolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CHY) se regularon positivamente bajo todas las condiciones de estrés estudiadas. El estrés nutricional y la alta intensidad de luz indujeron la expresión de genes biosintéticos de astaxantina, BKT y CHY, de manera transitoria. Se observó una expresión mejorada de estos genes con acetato de sodio y cloruro de sodio/acetato de sodio, mientras que la expresión se retrasó con cloruro de sodio. Otra característica importante observada durante la formación de astaxantina inducida por estrés fue la disminución en el contenido de clorofila que puede deberse a la descomposición de clorofila inducida por deficiencia de nutrientes.⁶

Li *et. al.* (2008) estudiaron la expresión transcripcional de cinco genes de astaxantina en diferentes condiciones, la primera fue alta PFD, la segunda fue exceso de acetato de sodio y la tercera fue presencia de hierro. Se determinó mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real, y la acumulación de astaxantina se midió por HPLC. La evolución fotosintética del oxígeno, la peroxidación lipídica y la mortalidad celular también se investigaron en estas condiciones de estrés. Los resultados de los investigadores indican que la vía de biosíntesis de astaxantina puede consumir hasta 9,94% del oxígeno molecular desarrollado a partir de la fotosíntesis bajo estrés a través de al menos dos rutas distintas: procesos extensivos dependientes de oxígeno que conducen a la formación de astaxantina y conversión de oxígeno molecular en agua usando electrones derivados de desaturación.²⁹

Como el estudio realizado por Tran *et. al.* (2009) que pretendía identificar las proteínas que se regulan al alza durante la acumulación de astaxantina en *Haematococcus lacustris* para esto se cultivo en fotobiorreactores bajo una irradiación con luz normal de $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 6 días y luego se indujo a acumular astaxantina durante 3 días

más por exposición a una irradiancia alta continua de $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes como fuente de luz después de que las células alcanzaran la fase estacionaria en una condición de agotamiento de nitrógeno. Bajo esta condición, el contenido promedio de astaxantina por célula aumentó de 91 mg/l hasta 406 mg/l después de 3 días de inducción. Los datos de proteómica de una comparación electroforética bidimensional demostraron que una combinación de agotamiento de la fuente de nitrógeno y 1 h de luz alta ha cambiado significativamente el patrón de expresión de proteínas en *H. lacustris*. Se recogieron un total de 49 manchas de proteínas después de 1 h de inducción de estrés. Consistían en 13 proteínas reguladas por disminución y 36 proteínas reguladas por incremento. Los resultados apuntaron hacia proteínas interesantes que pueden perseguirse para un análisis más profundo de la vía de biosíntesis de astaxantina.⁹²

En el estudio de Goksan *et. al.* (2010) se adoptó un enfoque alternativo en *H. pluvialis* ya que esta es capaz de crecer mixotróficamente en acetato de sodio. En primer lugar, las células se cultivaron bajo fotones de $75 \text{ micromol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin acetato de sodio hasta la fase estacionaria y luego se expusieron a cinco regímenes de luz diferentes mediante la adición de acetato de sodio como 20, 40, 75 y fotones de $150 \text{ micromol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El acetato de sodio se añadió en el medio de cultivo de dos maneras: junto con los otros nutrientes inorgánicos al comienzo del cultivo como en la mixotrofia tradicional (TM) y al final de la fase logarítmica en modo fototrofo como mixotrofia alternativa (AM). En consecuencia, se usaron las mismas concentraciones de acetato de sodio (1 g/l) en ambos ensayos. El peso seco (DW), los pigmentos y especialmente el número de células en la mixotrofia alternativa (AM) fueron más altos que la mixotrofia (TM) tradicional. El número de células en AM casi se duplicó de $2,17$ a $4,29 \times 10^5 \text{ células mL}^{-1}$ durante 5 días de exposición a acetato de sodio, mientras que el aumento fue solo 1.2 veces en TM. La densidad celular máxima se alcanzó en fotones de $75 \text{ micromol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entre las intensidades de luz probadas. El equipo liderado por Goksan propone que AM tiene varias ventajas contra la TM, como una densidad celular mucho mayor en un período de cultivo discontinuo y un riesgo minimizado de contaminación debido a la menor exposición de las células a las fuentes de carbono orgánico.⁵

En la investigación de Hoang *et. al.* (2011) se construyó un ciclo de vida del modelo de 50 días de *H. pluvialis*, que consta de cuatro etapas celulares: crecimiento celular vegetativo de 0 a 10 días, enquistamiento de 10 a 40 días; maduración de 40 a 50 días y germinación de 2 días. Cada etapa de célula algal podría distinguirse entre sí por el perfil de pigmentos y el contenido de proteína intracelular. Durante el ciclo de vida de las algas, las células vegetativas contenían altos niveles de clorofila y proteína, pero tenían un contenido de carotenoides muy bajo, mientras que la maduración de las células del quiste fue acompañada por una biosíntesis de carotenoides especialmente astaxantina y una degradación de la proteína acelerada. Los contenidos de clorofila y

astaxantina tienden a aumentar lentamente en los primeros 20 días de cultivo y luego aumentan rápidamente. Después de 40 días de cultivo, el contenido de clorofila disminuyó, mientras que el contenido de astaxantina sigue aumentando y alcanzó su máximo después de 50 días de cultivo. El contenido máximo de astaxantina fue de 142,423 µg/ml en los medios RM.²⁵

En el estudio de Tufan *et. al.* (2014) los efectos del hierro y la intensidad de la luz sobre la biomasa y la síntesis de pigmentos de *H. pluvialis* se estudiaron en condiciones de laboratorio. En el medio de cultivo se compuso una intensidad de luz de 50, 200 y 475 µmol fotón m⁻² s⁻¹ y al suplementar con Fe⁺² y EDTA, la microalga que se sometió a 11h luz/13h oscuridad, los parámetros de crecimiento fueron determinados. Los experimentos se aplicaron en 2 procesos y durante el período de experimento se siguieron la densidad óptica, clorofila-a (mg L⁻¹), peso seco (g/ml⁻¹) y cantidad de astaxantina. Las conclusiones fueron que mientras la astaxantina aumentaba, la clorofila-a se reducía, también que el aumento de la intensidad de la luz y el suplemento Fe⁺² más EDTA aumentan la cantidad de astaxantina. El valor de astaxantina más alto fue de 0.768% es proporcionado por una intensidad de luz de 200 µmol de fotón m⁻² s⁻¹ con suplemento de Fe y EDTA (p <0.05).⁷³

Su *et. al.* (2014) evaluaron los efectos de las diferentes combinaciones de condiciones de estrés como el acetato de sodio, Fe²⁺ y luz alta para la producción máxima de biomasa y astaxantina en *H. pluvialis* utilizando medio BM, se evaluaron diferentes condiciones de cultivo en el estudio: acetato de sodio + poca luz, sulfato de hierro + poca luz, acetato de sodio + sulfato de hierro + poca luz, acetato de sodio+ luz alta, acetato de hierro + luz alta, acetato de sodio + sulfato de hierro + luz alta, luz alta, y control. Las condiciones de estrés se aplicaron a *H. pluvialis* después de 4 días de cultivo en fase verde para iniciar el crecimiento en "fase roja". Los resultados mostraron que bajo condiciones de baja intensidad de luz, las células se volvieron ligeramente rojizas 4 días después de aplicar tensiones, incluso con acetato de sodio, Fe²⁺ o acetato de sodio+Fe²⁺, mientras que bajo condiciones de alta intensidad de luz las células se volvieron rojizas rápidamente después de solo 2 días después de aplicar el estrés, sin embargo, con un tratamiento de luz alta prolongado durante hasta 4 días, se observaron los cultivos rojos blanqueados y la muerte celular leve. Mientras tanto, los cultivos bajo condiciones de poca luz pueden seguir creciendo y produciendo astaxantina.⁴

Gwak *et. al.* (2014) realizó análisis lipidómicos y transcriptómicos congruentes de células de *H. pluvialis* en dos formas de ciclo de vida: macrozooides y hematocistos para revelar sus características genómicas y metabólicas. Se hizo especial hincapié en descifrar la regulación de la biosíntesis de astaxantina y el metabolismo lipídico durante el proceso de enquistamiento en condiciones de alta irradiancia a 400 µmol de fotón m⁻² s⁻¹

$2s^{-1}$ por 48h. Se analizó la clorofila y la astaxantina utilizando la técnica de HPLC. Los análisis lipidómicos revelaron que la síntesis del almacenamiento de lípido triacilglicerol (TAG) se estimuló sustancialmente bajo alta irradiación. Un hallazgo mayor fue la comparación de los transcriptomas entre la etapa verde y la etapa roja ya que los hematocistos estaban regulados por muchos más genes que las células verdes ante esta exposición de luz y que los hematocistos pueden ser más activos que los macrozoides con respecto a las vías y funciones metabólicas.²⁶

En el trabajo de Giannelli *et. al.* (2015) se cultivó a temperaturas de 20°C, 23.5°C, 27°C y 30.5°C, para evaluar los efectos de este factor sobre el metabolismo de las algas durante la fase de crecimiento junto con estrés donde la intensidad de la luz fue regulada a $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La tasa de crecimiento del cultivo disminuyó con los incrementos de temperatura por encima del nivel óptimo. Por el contrario, la productividad de la biomasa se incrementó en todas las condiciones de alta temperatura, probablemente reflejando el cambio del metabolismo de la duplicación celular a la acumulación de energía que se observa típicamente en cultivos de algas sometidos a estrés ambiental. Además, se observó un aumento en la capacidad de captación de luz del alga por medio del balance total de pigmento medida en las diferentes condiciones de cultivo. Los cultivos mantenidos a temperaturas más altas pudieron cosechar mejor y utilizar la luz impactante debido a la fotoaclimatación. Finalmente, las diferencias en el metabolismo de la astaxantina se aclararon sometiendo a los cultivos a la falta de nitrógeno a 20°C y 27°C. En el cultivo a 27°C, se observó un aumento de 1,4 veces en la productividad de astaxantina cuando se comparó con el de 20°C, y este último requirió casi dos veces más energía para la producción de astaxantina en comparación con el cultivo de 27°C.¹⁵

Suyono *et. al.* (2015) estudiaron el aumento de los carotenoides y la biomasa de la microalga mediante el uso de la combinación de azul, rojo y blanco con luces ultravioletas. La microalga *H. pluvialis* se cultivó en medio Bold Basal durante 14 días bajo irradiación de lámpara azul, roja y blanca de 1500 lux durante 21 horas y la irradiación de luz ultravioleta de 500 lux durante 3 horas. Como control, la microalga se cultivó en medio Bold Basal bajo irradiación de lámpara blanca de 1500 lux durante 12h luz/12h oscuridad. Cada tratamiento y control se repitió tres veces. Sus parámetros fueron el número de células, el contenido de clorofila y carotenoides. El número de células se contó con cámara de Neubauer 1 mm y clorofila, y el contenido de carotenoides se analizaron por espectrofotometría en la absorbancia de 700, 663, 645 y 478 nm. La combinación de luz ultravioleta y azul fue el mejor tratamiento para aumentar el contenido total de carotenoides y clorofila ya que el contenido total de carotenoides aumentó aproximadamente 8 veces el control y el contenido total de clorofila aumentó aproximadamente 2 veces el control, representaron 5,1 mg/L y 6,55 mg/L, respectivamente. Mientras tanto, la combinación de luz ultravioleta y roja

aumentó su biomasa hasta $0,14 \times 10^5$ células/ml, que fue aproximadamente 2 veces mayor que el control.³

Wong *et. al.* (2016) realizó una investigación donde *H. pluvialis* se cultivó en medio BG-11 durante 12 días bajo irradiación de luz blanca, luz de LED azul y luz de LED roja. El cultivo en dos etapas se aplicó exponiendo *H. pluvialis* a baja intensidad de luz primero, luego a la falta de nitrógeno y alta intensidad de luz de $40 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 3 días. Los resultados de la etapa verde indicaron que la luz blanca con un ciclo de luz/oscuridad de 24/0 fue la mejor condición para el crecimiento celular con una densidad celular máxima ($8,58 \pm 0,452 \times 10^5$ células/ml).¹⁰

En el trabajo de Pan-utai *et. al.* (2017) se estudiaron los efectos de los agentes inductores en el crecimiento de *H. pluvialis*, por eso se cultivó la microalga en medio NSIII. El cultivo se realizó en una columna de fotobiorreactor de vidrio transparente. La intensidad de la luz se mantuvo a $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fluorescentes de luz diurna de 18 vatios y el ciclo 16h luz/8h oscuridad. Se agregaron agentes inductores para inducir la acumulación de astaxantina en las células: acetato de sodio (NaOAc), acetato de potasio (KOAc), acetato de magnesio (MgOAc) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) en 10, 50 y 100 mM. Respecto a los resultados, la concentración de biomasa a diversas concentraciones de acetato no cambió significativamente después de 15-20 días de cultivo, pero la concentración de biomasa bajo inducción con bicarbonato de sodio aumentó. La concentración de clorofila aumentó al aumentar el tiempo de cultivo durante la fase de crecimiento (octavo día) pero disminuyó al aumentar el tiempo de cultivo después de agregar agentes inductores como fuentes de carbono para la producción de astaxantina. Para todos los agentes inductores químicos, la concentración más alta de astaxantina se obtuvo a una concentración de 10 mM. Los resultados mostraron que el acetato de sodio indujo la producción de astaxantina más bajo que los otros agentes inductores, mientras que la adición de acetato de potasio, acetato de magnesio y bicarbonato de sodio dieron las mayores concentraciones de astaxantina a 100 mM, 10 mM y 10 mM, respectivamente.²

Niño *et al.* (2017) determinaron el medio de cultivo más apropiado para el crecimiento y producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* se evaluó el efecto tres medios de cultivo: BBM, OHM y RM en biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1×10^4 cel./ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH. 6.7 a 7, CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, irradianza $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Se realizó una curva de crecimiento y un análisis de los cambios morfológicos de las células, dando como resultados que el mayor crecimiento celular se obtuvo en el medio RM con $7,5 \times 10^5$ cel/ml en el día 36, y la mayor producción de astaxantina se obtuvo en el medio RM con una concentración de $8.3 \mu\text{g}/\text{ml}$.²⁸

Sheng *et. al.* (2018) investigaron la distribución de la luz en la suspensión de *H. pluvialis* con una concentración de biomasa de 0.218 g/L a 2.5 g/L durante la etapa de acumulación de astaxantina ya que la luz es un factor de estrés importante para la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. El modelo Lambert-Beer y el modelo Cornet se emplearon para predecir la atenuación de la luz. El resultado mostró que el modelo Cornet podría describir y predecir un poco mejor la distribución de la luz en la suspensión de *H. pluvialis*. Además, E_a (coeficiente de absorción) y E_s (coeficiente de dispersión) se determinaron como $0.0126 \pm 0.0036 \text{ m}^2/\text{g}$ y $0.223 \pm 0.023 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente. E_s aumentó con el incremento en el contenido de astaxantina, mientras que E_a disminuyó con el aumento del contenido de astaxantina. El contenido de astaxantina fue el factor dominante a una concentración de masa relativamente baja de la suspensión de *H. pluvialis*.³¹

Christian *et. al.* (2018) plantearon un método económico de dos etapas para la producción de astaxantina natural de *H. pluvialis* sin una etapa de reemplazo del medio. En la etapa 1, *H. pluvialis* creció bajo iluminación de poca luz hasta que alcanzaron la biomasa óptima. En la etapa 2, las células se cambiaron a las condiciones de inducción de astaxantina utilizando la combinación de iluminación de alta luz y niveles elevados de dióxido de carbono (5 o 15%). La introducción de CO_2 alteró el equilibrio C/N creando una deficiencia de nutrientes sin un cambio de medios. El rendimiento de astaxantina resultante fue de 2 a 3 veces mayor en la etapa 2. Este método de inducción con astaxantina tiene muchas ventajas sobre los métodos actuales, que incluyen un corto tiempo de inducción de menos de cuatro días.³⁰

He *et. al.* (2018) obtuvo transcriptomas para cuatro grupos: irradiación con luz alta, adición de acetato de sodio 25 mM bajo luz alta, adición de Fe^{2+} 20 mM bajo luz alta y células normales en la fase verde, se encontraron 156.992 unigenes, las estadísticas para DEG (genes expresados diferencialmente) mostraron que hubo más de 10 mil DEG causados por alta luz y 1800-1900 DEG causados por acetato o Fe^{2+} . Los resultados del análisis DEG mostraron que, bajo condiciones de luz alta, la expresión de genes relacionados con muchas vías había cambiado como la vía de la biosíntesis de carotenoides, elongación de ácidos grasos, proteínas de fotosíntesis, fijación de carbono en organismos fotosintéticos, etc. El acetato de sodio podría inhibir la expresión de genes relacionados con la ruta de las proteínas de fotosíntesis, pero junto con alta luminosidad favorecer la expresión de β -caroteno hidroxilasa (*crtZ*) esta enzima desempeña un papel fundamental en la ruta de la biosíntesis de astaxantina. La alta cantidad de luz influyó en la expresión de más genes implicados en la vía de biosíntesis de carotenoides, incluidos PDS, *crtISO*, *LcyB*, *LUT1*, *LUT5* y *ZEP*, esto muestra que la luz alta es el principal impulsor de los cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides.¹

2. MARCO REFERENCIAL

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que producen ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, lípidos y proteínas y se consideran de gran importancia en los ecosistemas.⁵³ Estos microorganismos poseen la capacidad intrínseca de absorber H₂O y CO₂, y con la ayuda de la luz solar, se convierten en compuestos orgánicos complejos que posteriormente se mantienen dentro o liberados de la célula. Son especiales porque combinan una fotosíntesis oxigenada eficiente y requisitos nutricionales simples con la capacidad de secretar o acumular metabolitos, siendo la principal razón para ser usado en procesos biotecnológicos.¹⁷

2.1 *Haematococcus pluvialis*

2.1.1 Taxonomía y localización de *H. pluvialis*

Tabla 1 Taxonomía *H. pluvialis*¹⁸

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Filo	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Volvocales</i>
Familia	<i>Haematococcaceae</i>
Genero	<i>Haematococcus</i>
Especie	<i>Pluvialis</i>

El filo Chlorophyta encierra una gran número de microorganismos con una gran variabilidad morfológica. Este a su vez, se divide en cuatro clases: *Chlorophyceae*, *Micromonadophyceae*, *Charophyceae* y *Ulvophyceae*. Ellas poseen una Clorofila *a* y *b* junto con diversos carotenoides, que pueden ser sintetizados y acumulados afuera del cloroplasto bajo condiciones de estrés, generando un color rojo o naranja en el alga. (Ver Tabla 1)

Droop realizó el primer análisis detallado de la nomenclatura de *H. pluvialis*. Según él, de los muchos sinónimos, solo *Volvox lacustris*, *Lepraria kermesiana* y *Disceraea purpurea* podrían considerarse como posibles sinónimos junto con las combinaciones de *L. lacustris* y *D. lacustris* tienen prioridad sobre *H. pluvialis*.⁶⁴

Haematococcus pertenece en este caso a la clase *Chlorophyceae*, esta es una microalga unicelular de agua dulce con células ovoides activamente móviles por dos

flagelos apicales liso. Durante sus etapas de crecimiento también ocurren células no móviles, o quistes. La peculiaridad de la célula es que el protoplasto está separado de la pared de la célula, al que está conectado mediante hilos de protoplasma radiantes. El cloroplasto suele ser similar a una copa, parietal, y contiene pirenoides y la mancha ocular. El contenido celular es generalmente verde con una pequeña parte de la célula pigmentada de rojo anaranjado debido a la acumulación de astaxantina cetocarotenoide en glóbulos fuera del cloroplasto. A medida que las condiciones se vuelven desfavorables, las células verdes y móviles se redondean, luego producen paredes más gruesas, sueltan los flagelos y finalmente dejan de nadar. En estos quistes, el protoplasto llena toda la célula y se produce un gran aumento en la dimensión celular junto con un cambio de pigmentación de verde a rojo anaranjado, debido al aumento de la deposición de astaxantina. Cuando las condiciones se vuelven favorables para el crecimiento, los quistes germinan liberando un gran número de nuevas células móviles. Según la literatura se ha demostrado que las células no móviles o quistes presentan mayor productividad celular que las células móviles, ya que tiene una mayor tolerancia al entorno adverso.¹³

La astaxantina representa un producto de alto valor no solo como agente colorante para peces y crustáceos en la acuicultura, sino que, dado que es un potente antioxidante natural, también puede encontrar importantes aplicaciones en la medicina.

La microalga de agua dulce *H. pluvialis* fue descubierta por J. Von Flotow en 1844, años después Tracy Elliot Hanzen la caracterizó.¹⁸

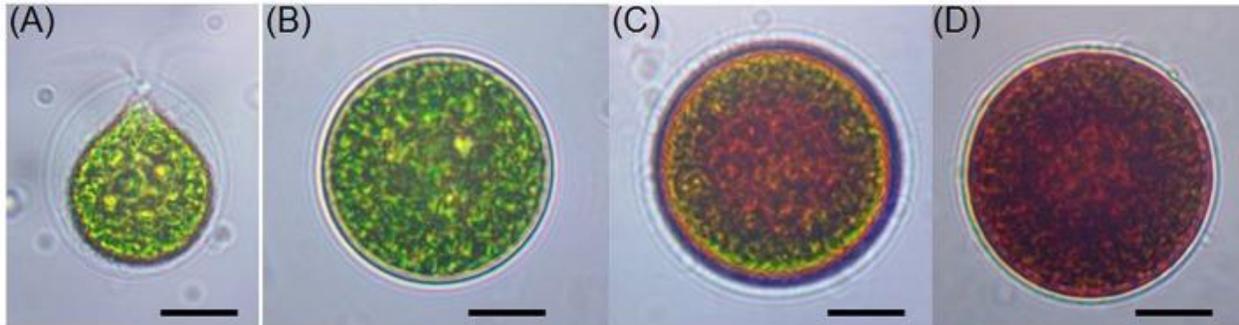
Respecto a su localización es frecuentemente encontrado en agua dulce, como piscinas de lluvia o artificiales y estanques sean naturales o artificiales, también se ha registrado su presencia en bebederos de pájaros. Es de resaltar que se ha encontrado en muchos más ambientes debido a la resistencia a la salinidad y temperaturas extremas, siendo esta una de las grandes diferencias con respecto a otras microalgas. Los hábitats más típicos de *Haematococcus sp.* son pequeños cuerpos de agua temporales, como piscinas de agua de lluvia en acantilados y costas rocosas de lagos y mares. Esta alga puede ser fácilmente reconocida por el color rojo sangre de las aguas habitadas por ellos. Se ha informado que una especie forma la nieve roja de las regiones alpinas. Al secarse tales charcas efímeras, las aplanosporas rojas o hematocistos permanecen en forma de incrustaciones de polvo seco o agregados gelatinosos. Estos se dispersan fácilmente por el viento o por las aves. Después de un descanso prolongado en condiciones adversas, germinan de nuevo durante las lluvias de primavera. El género se ha reportado en zonas templadas frías, principalmente en Europa y el sur de África.⁶⁴

2.1.2 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *H. pluvialis* se compone principalmente por cuatro fases: macrozoides también denominadas zoosporas, microzooides, palmelas y por último

hematocistos o también llamadas aplanosporas (Ver Fig. 1) Los tres primeros estadios corresponden a la fase vegetativa, asimismo designada fase verde; la última etapa se conoce como fase de enquistamiento donde se acumula el caroteno llamado astaxantina, también denominada fase roja.¹⁹

Fig. 1 Imágenes microscópicas de las fases que atraviesa *H. pluvialis*. A. Célula vegetativa B. Célula Palmella verde C. Célula Palmella en transición a aplanospora D. Aplanospora¹⁸



En primer lugar, los macrozoides o zoosporas se caracterizan por ser células esféricas o elipsoidales, en ocasiones presentan una forma de gota, en su interior se encuentran cloroplastos; presentan un tamaño aproximado de 20 micras. Estas son las células que predominarán en condiciones favorables. A medida que las condiciones del medio cambian, ella se adaptará y cambiará también su forma. Estos macrozoides se pueden dividir en 2-32 células hijas por mitosis. Estos al verse afectados por las modificaciones del medio en que se encuentran, crean una estructura de capas en la matriz extracelular, transformándose en una célula no móvil llamada palmella⁴⁵, esta fase se caracteriza por la observación del núcleo y cloroplastos altamente desarrollados en la periferia, pocos gránulos de astaxantina se encuentran. Siendo el final de su etapa vegetativa.

Con el continuo estrés ambiental, la palmella se convertirá en aplanosporas asexuales, en esta etapa es donde se acumularán grandes cantidades de carotenoides secundarios, especialmente astaxantina, este proceso ocurre en las gotas de lípidos que se encuentran en el citoplasma de la célula.

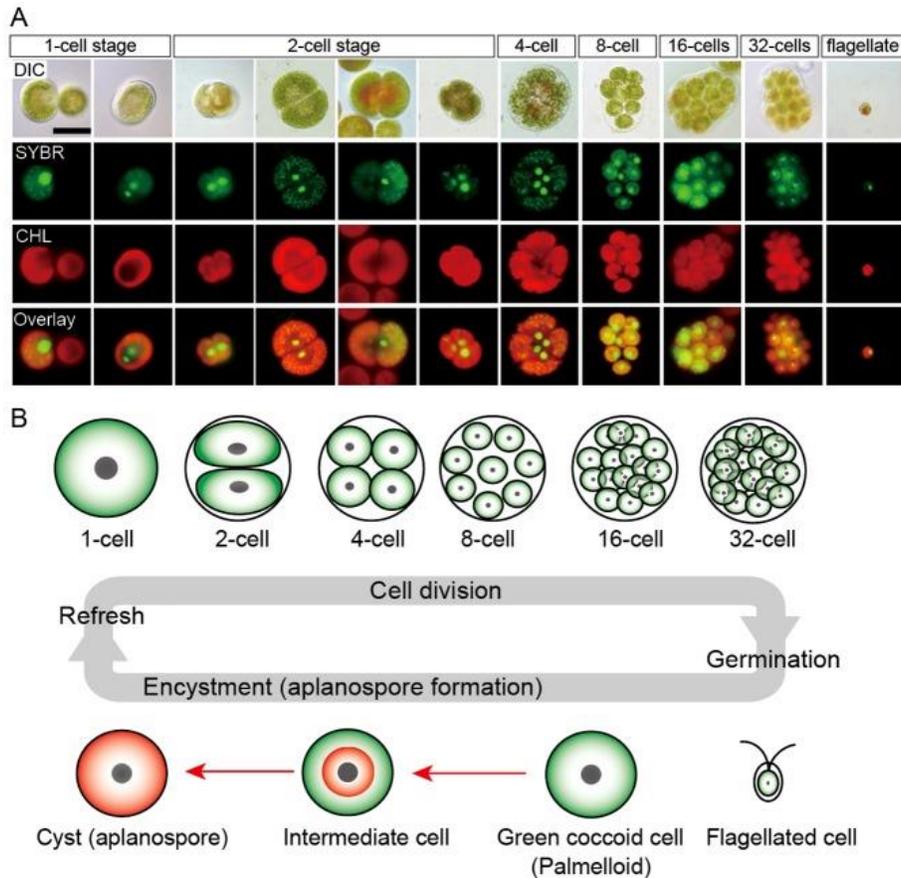
Cuando el entorno vuelva a ser ideal, pasaran de la fase roja nuevamente a la fase verde o vegetativa, es decir, las aplanosporas germinaran para formar zoosporas. Las aplanosporas pueden producir hasta 64 gametos conocidos como microzoides que miden aproximadamente 10 micras.¹⁸ (Ver Fig. 2) La morfogénesis adicional de la aplanospora da lugar a la formación de una pared celular voluminosa de múltiples capas. Se formó una vaina trilaminar dentro de la pared primaria y la parte más interna y gruesa fue una pared secundaria amorfa, que consiste principalmente en un manano.

⁶⁵

Según la investigación de Zhekisheva *et. al.* (2002) la producción de cada picograma de astaxantina estuvo acompañada por la producción de ácidos grasos, respectivamente. En ambos casos, los ácidos grasos recién formados, que consisten principalmente en ácidos oleicos, palmítico y linoleico, se depositaron principalmente en triacilgliceroles. Además, la acumulación aumentada de ácido oleico se correlacionó linealmente con la de astaxantina. La astaxantina, que en su mayoría es monoesterificada, se deposita en glóbulos hechos de triacilgliceroles. Sugieren que la producción de triacilgliceroles ricos en ácido oleico por un lado y la esterificación de astaxantina por otro lado permiten que los glóbulos de aceite mantengan el alto contenido de ésteres de astaxantina. Peled *et. al.* (2012) realizó un ensayo simple para seguir la migración de los glóbulos, basado en el nivel de fluorescencia de clorofila, concluyó que los glóbulos de aceite ricos en astaxantina de *H. pluvialis* muestran una rápida migración periférica inducida por la luz que es exclusiva de este organismo y sirve para proteger el sistema fotosintético del exceso de luz. Se observó una rápida migración periférica inducida por la luz que está asociada con la extinción de la fluorescencia de la clorofila, mientras que la recuperación fue lenta. ⁶⁵

Gu *et. al.* (2013) concluyó que los cambios morfológicos de la célula vegetativa a enquistada, incluido el engrosamiento de la pared celular, la acumulación de almidón y lípidos no solo proporcionan una condición preferencial para la acumulación de astaxantina, sino que también mejoran en gran medida la tolerancia de las células al ambiente de estrés. ⁵²

Fig.2 Ciclo de vida *H. pluvialis* A. Imágenes de microscopia de fluorescencia que evidencian las etapas del ciclo B. Ilustración del ciclo de vida ²⁴



2.1.3 Usos

H. pluvialis puede acumular hasta 5% peso seco de astaxantina y se considera como la mejor fuente natural de este pigmento carotenoide de alto valor. La astaxantina natural de *H. pluvialis* está disponible en el mercado como un suplemento dietético debido a los posibles beneficios para la salud. La astaxantina natural de *H. pluvialis* parece ser más favorable que su contraparte sintética debido a la estructura, función, aplicación y seguridad.

Recientemente, este organismo también se ha convertido en una prometedora fábrica de células para biocombustibles debido a su capacidad para producir grandes cantidades de lípidos neutros, principalmente en forma de triacilglicerol (TAG). TAG es una materia prima para la producción de biocombustibles como biodiesel y combustible bio-jet, bioplásticos y otros productos químicos que actualmente se derivan de los combustibles fósiles. También se puede producir ácido aminobutírico a partir del cultivo mixotrófico de la microalga y cuando se suplementa el cultivo con sal aumenta este producto.¹¹

2.1.4 Cultivo de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina

Para lograr una producción de biomasa y de astaxantina se requieren del control de diversos parámetros como: el medio de crecimiento, luz, pH y temperatura. Teniendo en cuenta que para la producción de este carotenoide la célula debe estar sometida a condiciones de estrés que también deberán ser optimizadas. Respecto a los medios de crecimiento, actualmente los más comunes son: BBM (Bold Basal Medium), OHM (Optimal *Haematococcus* Medium) y RM. Según la investigación de Niño y sus colaboradores con el medio de cultivo RM se obtienen mejores tasas de crecimiento celular y también es el mejor medio para la aplicación de factores de estrés con una mayor producción de astaxantina.²⁸ En la Tabla 2 se observa la composición del medio RM formulado por Imamoglu y sus investigadores.

Tabla 2 Composición del medio RM²⁷

Composición del medio	
Constituyentes	RM (mg l⁻¹)
NaNO ₃	300
KH ₂ PO ₄	20
K ₂ HPO ₄	80
NaCl	20
CaCl ₂	47
MgSO ₄ 7H ₂ O	10
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ H ₂ O	1.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
H ₃ BO ₃	0.3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.3
FeCl ₃ 6H ₂ O	17
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	0.2
EDTA	7.5

Existen variados factores que generan un estrés celular y consecuente la producción de astaxantina, entre ellos se encuentra la privación de nitrógeno, la limitación del fósforo, la adición de sales como cloruro de sodio y acetato de sodio, la adición de Fe²⁺ y la exposición a luz.

Las condiciones ambientales de temperatura y pH, según los estudios realizados por Wan *et. al.*⁴¹ la temperatura adecuada está entre 20 y 28 grados centígrados donde se puede generar mayor producción de biomasa y respecto al pH según los estudios de Sarada *et. al.*¹⁶ que evidencian que el pH óptimo es de 7. Se suelen utilizar ciclos regulares de alternancia de luz y oscuridad 12h/12h o 16h/8h², uno de los factores de

estrés más común es la exposición a una intensidad de luz determinada, las intensidades que se han reportado utilizaron irradianza en diferentes rangos desde muy bajos hasta de 345^{12} y $480 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ²⁶.

2.2 Astaxantina

La astaxantina se puede encontrar en muchos de nuestros mariscos favoritos, como el salmón, la trucha, la dorada brisa, el camarón, la langosta y los huevos de pescado. También se encuentra en aves como el flamenco, la codorniz y otras especies. La astaxantina, como otros carotenoides, no puede ser sintetizada por los animales y debe proporcionarse en la dieta. Si bien los mamíferos y peces como el salmón o la trucha no pueden convertir otros carotenoides dietéticos en astaxantina, los crustáceos como los camarones y algunas especies de peces por ejemplo, la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) tienen una capacidad limitada para convertir los carotenoides dietéticos estrechamente relacionados en astaxantina, aunque se benefician enormemente de ellos, siendo alimentado directamente con astaxantina.⁸⁰

Se cree que *Haematococcus pluvialis*, una microalga clorofita, es el organismo que puede acumular los niveles más altos de astaxantina en la naturaleza. La función de la astaxantina parece proteger a las algas de los cambios ambientales adversos, como el aumento de la fotooxidación de la luz UV y la evaporación de las piscinas de agua en las que vive. *Haematococcus pluvialis* cultivado comercialmente puede acumular hasta 30 g de astaxantina por kg de biomasa seca, un nivel que es de 1.000 a 3.000 veces superior al que se encuentra en los filetes de salmón.⁸⁸

En la actualidad las microalgas han sido centro de atención por ser fuente de productos denominados pigmentos carotenoides. Los carotenoides son compuestos lipofílicos e isoprenoides y generalmente son de color amarillo, naranja o rojo y son los pigmentos más diversos y de mayor diseminación que se encuentran en la naturaleza. y se ven típicamente como pigmentos en frutas, flores, pájaros y crustáceos. Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides de novo, y dependen de la dieta como fuente de estos compuestos.

Los antioxidantes astaxantina, β -caroteno, luteína, licopeno y cantaxantina son los principales carotenoides del valor comercial que son producidos por microalgas.⁵⁴ Los carotenoides naturales ejercen sus funciones de diferentes maneras y en diferentes niveles. De hecho, pueden: actuar como atenuadores del singlete de oxígeno molecular; convertir hidroperóxidos en compuestos más estables⁸⁶; pueden prevenir la formación de radicales libres a través del bloque de reacciones de oxidación de radicales libres y la inhibición de la reacción en cadena de autooxidación y convertir derivados de hierro y cobre en moléculas inocuas, actuando como quelantes de metales.²⁰ La mayoría de los carotenoides comparten una estructura básica C_{40} común

2.2.1 Usos de astaxantina

Es utilizada en diversas industrias que comprenden acuicultura, alimentos, cosméticos, nutracéuticos y productos farmacéuticos. Esto ha promovido grandes esfuerzos para mejorar la producción de astaxantina a partir de fuentes biológicas en lugar de las sintéticas. La primera vez que se utilizó de forma comercial fue en la acuicultura con el objetivo de obtener un color característico naranja-rojo en los salmónidos.⁴⁷ De por sí, este compuesto ya es producido por animales marinos como los camarones y cangrejos de río, en estos animales marinos cumple con diferentes papeles como la pigmentación, protección contra los efectos de luz ultravioleta, comunicación, respuesta inmune, calidad reproductiva y tolerancia al estrés. La astaxantina comercial es principalmente de levadura *Phaffia*, microalga *Haematococcus* y mediante síntesis química. Los productos de astaxantina están disponibles en forma de cápsula, gel blando, tableta, polvo, biomasa, crema, bebida energética, aceite y extracto en el mercado.⁵¹ Según un ensayo realizado por Orosa *et. al.* (2001) donde concluyó que *Haematococcus pluvialis* demostró la mayor tasa de acumulación de astaxantina ($2,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y el contenido total de astaxantina ($22,7 \text{ mg g}^{-1}$ biomasa). La acumulación de astaxantina en *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chorella zofingiensis* y *Scenedesmus vacuolatus* fue respectivamente, 19.2, 14.3, 10.9, 6.8 y 2.7 mg astaxantina g^{-1} biomasa, respectivamente.⁸¹

Un estudio realizado por Nguyen (2013) donde compara la astaxantina producida por algas y la producida sintéticamente, concluyo que la síntesis química consumió la menor cantidad de energía, ya que con algas se requieren 5 veces más, las emisiones de gases de efecto invernadero fueron nuevamente más bajas para la síntesis química, ya que las levaduras tienen 3 veces más. El costo de mercado por kg de astaxantina es de alrededor de \$ 2.000 y \$ 7.000 para síntesis química e inducción de algas respectivamente. Los valores de ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) para la astaxantina elaborada con algas son aproximadamente 3 veces más que la del producto sintético por esto es que sólo la astaxantina elaborada con algas está aprobada para el consumo humano, mientras que la forma sintética se utiliza principalmente para la alimentación animal, ya que como se había mencionado antes la astaxantina es un antioxidante que se utiliza también en el sector de la salud. Si bien el producto sintético parece ser el más económico y sostenible, todavía no puede satisfacer la demanda del mercado como un suplemento humano.⁶² También Capelli *et. al.* (2013) concluyo que la astaxantina natural a partir de microalgas es 20 veces más potente en la eliminación del radical libre que la astaxantina química, determinando que aun la sintética no ha establecido beneficios en la salud humana.⁶³

La astaxantina tiene características para ser utilizada en salud humana, ya que posee propiedades químicas únicas por sus grupos extremos polares que sacian los radicales libres, mientras que los dobles enlaces de su segmento medio eliminan los electrones

de alta energía, teniendo así una mayor actividad antioxidante que otros carotenoides. De hecho, en una ingesta dietética modesta se considera que contribuye a la integridad funcional de las mitocondrias de las células. Los compuestos bioactivos derivados de microalgas tienen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes.⁴⁷

En los últimos años, ha atraído interés en la industria farmacológica que incluyen actividades anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes. En la piel, se ha demostrado que la astaxantina mejora el estado de la piel al afectar la cadena de estrés oxidativo, inhibiendo los mediadores inflamatorios.²² Últimos estudios se ha determinado que tiene efectos en el transporte del colesterol.⁵⁸

2.2.2 Ruta metabólica para producir astaxantina

La biosíntesis de astaxantina depende principalmente del estrés efectuado en las condiciones ambientales a las que es sometido la microalga.

En primer lugar, la astaxantina es un tetraterpeno que es sintetizado a partir de unidades de isopreno. Eso quiere decir, que existe un compuesto que actúa como intermediario y es clave para la síntesis de carotenoides, se denomina isopentenil pirofosfato (IPP).

El IPP puede generarse utilizando dos vías: la primera es la vía de mevalonato situado en el citosol y la segunda es no mevalonato hallada en el cloroplasto. En estudios donde se han realizado análisis transcriptómico se revela que es más probable que utilice la vía no mevalonato, también llamada DOXP, esto porque en esta vía se forma el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP).

Básicamente en la vía DPOX se utiliza el piruvato y el glicerahildo-3- fosfato, productos derivados de la fotosíntesis, para producir IPP dentro de los cloroplastos. Cuando ya se ha sintetizado el IPP, este sufrirá una isomerización a dimetilalil difosfato (DMAPP). Según Gwak²⁶ esta reacción es catalizada por 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR). Posteriormente, se adiciona tres moléculas de IPP catalizadas por una enzima llamada geranilgeranil pirofosfato (GGPP) formándose así un compuesto C₂₀.

A partir de este producto, empieza en sí, la síntesis del carotenoide. En la primera etapa se formará un compuesto C₄₀, resultado de la condensación de la cabeza a la cola de dos moléculas de GGPP, esta reacción será catalizada por una enzima llamada fitoeno sintasa (PSY). Posteriormente, actuará las enzimas: fitoeno desaturasa (PDS) y ζ-caroteno desaturasa (ZDS) formando un compuesto desaturado, básicamente las reacciones de desaturación aumentan la cantidad de enlaces dobles carbono-carbono conjugados que forman el cromóforo en los carotenoides. Eso quiere decir que, la molécula de ζ-caroteno se convertirá en una molécula de licopeno de color rosa.

Después este licopeno se someterá a un proceso de ciclación que es un punto de ramificación de la biosíntesis de carotenoides, catalizada por dos enzimas licopeno ciclasas (LCY-e y LCY-b). A partir de esta ciclación, se generarán α -caroteno que corresponde a un precursor de la luteína y β -caroteno que es un precursor de carotenoides como la astaxantina.

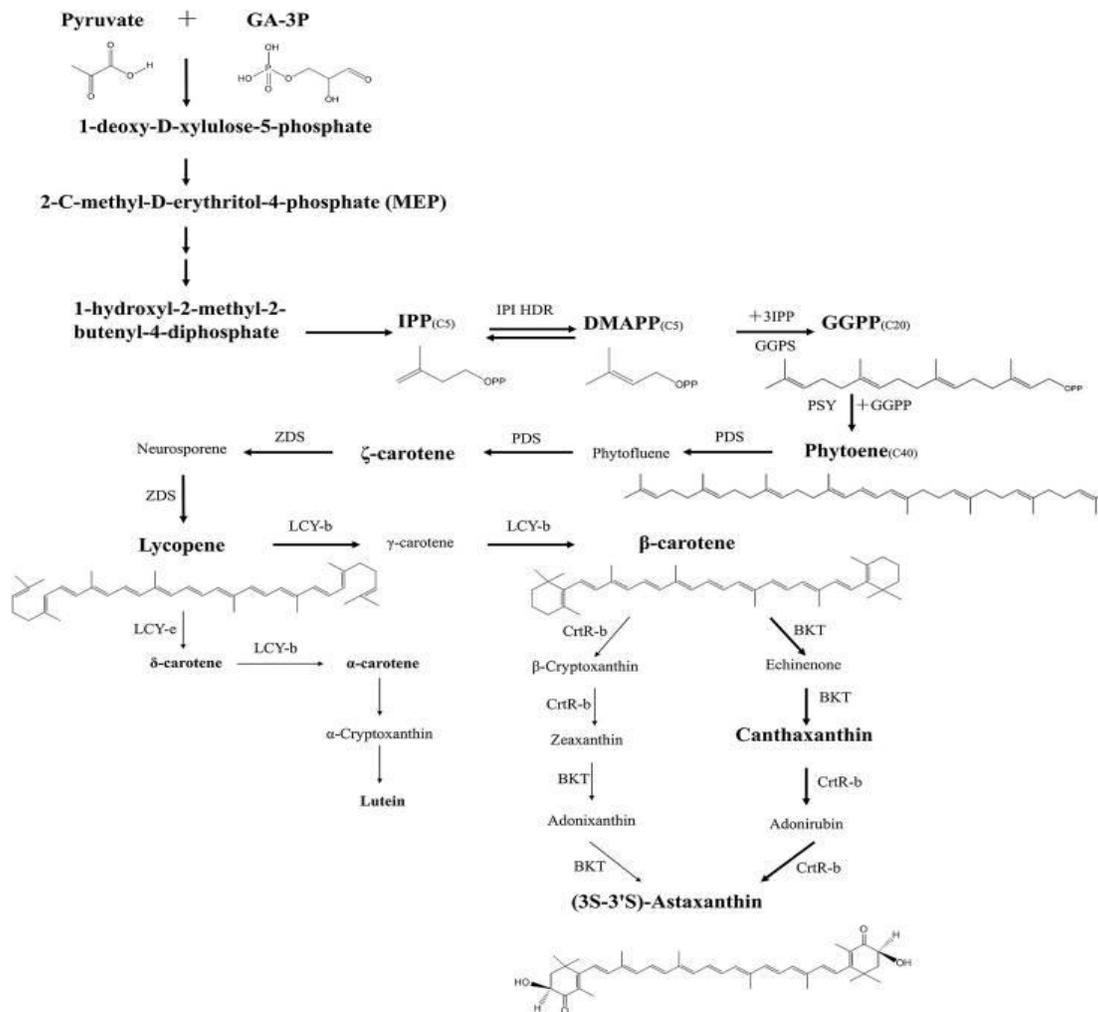
La última etapa en la síntesis de astaxantina corresponde a la oxigenación, en donde las enzimas β -caroteno cetolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) actuarán en el β -caroteno para la producción de astaxantina.⁸⁸

La astaxantina tiene dos centros quirales idénticos en las posiciones 3 y 3', eso quiere decir que produce tres isómeros diferentes: (3R,3'S), (3R,3R') y (3S,3'S), esto depende de la orientación de espacial de los grupos hidroxilo en el carbono quiral. *H. pluvialis* sintetiza el estereoisómero (3S, 3'S) de la astaxantina, siendo esta la isoforma natural, las demás corresponden a formas de síntesis química.¹⁸ (Ver Fig. 4). También se producen carotenoides como zeaxantina y adonixantina que se acumulan además de astaxantina, estos son productos de reacciones secundarias en lugar de precursores directos de astaxantina.⁹³

La proliferación de células vegetativas y la inducción de la síntesis de astaxantina tienen una correlación directa con cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Ya que en la investigación realizada por Li *et. al.* (2019) donde se determinó un análisis comparativo del transcriptoma en siete puntos de tiempo durante el crecimiento celular móvil de *Haematococcus pluvialis* y la acumulación de astaxantina, se dieron cuenta que en la fase vegetativa se expresaban en mayor proporción el gen *psy*, en la fase de transición de célula verde a roja se empieza a expresar en mayoría *lcyB* y cuando es aplanospora se expresa *bkt* en mayor medida en comparación con los otros momentos del ciclo de vida *H. pluvialis*.⁴⁴

En el estudio de Grunewald *et. al.* (2001) estudio la localización celular y la regulación de la enzima β -caroteno oxigenasa en *H. pluvialis* que cataliza la introducción de funciones ceto en la posición C-4 del anillo β -ionona de β -caroteno y zeaxantina. Usando el etiquetado inmunológico de las secciones ultrafinas y el análisis de transferencia Western de las fracciones celulares, descubrieron que en condiciones inductivas, la β -caroteno oxigenasa se localizaba tanto en el cloroplasto como en las vesículas lipídicas citoplásmicas, que según su composición lipídica derivan de membranas citoplasmáticas. Sin embargo, la actividad de la β -caroteno oxigenasa se limitó al compartimento de la vesícula lipídica. Debido a que una enzima carotenogénica temprana en la ruta, la fitoeno desaturasa, se encontró solo en el cloroplasto, los autores proponen un transporte de intermedios desde el sitio de los primeros pasos biosintéticos en el cloroplasto hasta el sitio de oxigenación y acumulación en vesículas lipídicas citoplásmicas.

Fig. 4 Biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*¹⁸



2.3 Clorofila

Fotosistemas

Las reacciones dependientes de la luz usan la energía lumínica para formar dos moléculas necesarias para la siguiente etapa de la fotosíntesis: la molécula de almacenamiento de energía ATP y el portador de electrones reducido NADPH. En las microalgas, las reacciones de la luz ocurren en la membrana de los tilacoides de organelos llamados cloroplastos.

Los fotosistemas son grandes complejos de proteínas y pigmentos que absorben la luz y son clave en las reacciones luminosas. Hay dos tipos de fotosistemas: fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII). Ambos fotosistemas contienen muchos pigmentos que ayudan a recolectar la energía de la luz, así como un par especial de moléculas de clorofila en el centro de reacción del fotosistema. El par especial del fotosistema I se llama P700, mientras que el del fotosistema II se llama P680.

Los pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a*, la clorofila *b* y los carotenoides, son moléculas que absorben la luz y se encuentran en las membranas de los tilacoides en los cloroplastos. Como ya se mencionó, los pigmentos están organizados junto con proteínas en complejos llamados fotosistemas. Cada fotosistema tiene complejos que absorben la luz que contienen proteínas, 300-400 clorofilas y otros pigmentos. Cuando un pigmento absorbe un fotón, pasa a un estado de excitación; es decir, uno de sus electrones se eleva a un orbital de mayor energía.

La mayoría de los pigmentos de un fotosistema actúa como un embudo de energía, y pasa la energía hacia el interior a un centro de reacción principal. Cuando la luz excita uno de estos pigmentos, transfiere energía a un pigmento vecino a través de las interacciones electromagnéticas directas en un proceso llamado transferencia de energía por resonancia. El pigmento vecino, a su vez, puede transferir energía a uno de sus propios vecinos y así, el proceso se repite varias veces. En estas transferencias, la molécula receptora no puede necesitar más energía para la excitación que el donante, pero sí menos, es decir, puede absorber luz de una longitud de onda más larga.

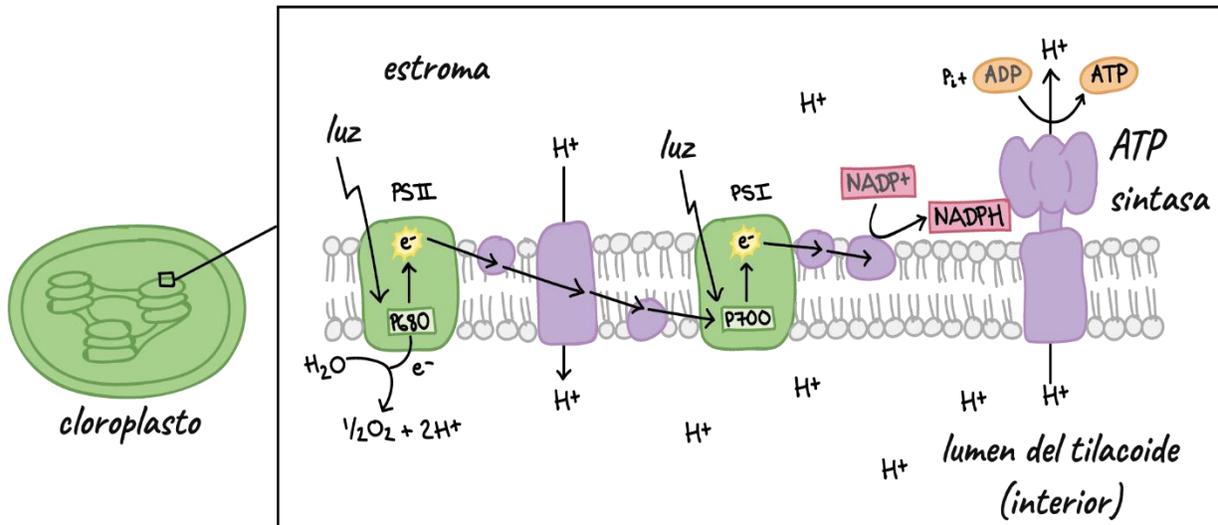
En un proceso llamado fotofosforilación no cíclica que es la forma "estándar" de las reacciones dependientes de la luz, se toman electrones del agua y pasan a través del PSII y PSI antes de terminar en NADPH. Este proceso requiere que se absorba luz dos veces, una vez en cada fotosistema, y crea ATP. De hecho, se llama fotofosforilación porque implica el uso de energía de la luz para crear ATP a partir de ADP (fosforilación). (Ver Fig. 5). A continuación, los pasos básicos:

1. Absorción de la luz en PSII: Cuando uno de los muchos pigmentos del fotosistema II absorbe luz, la energía pasa de un pigmento a otro hacia el interior hasta alcanzar el centro de reacción. Allí, la energía se transfiere a P680, lo cual impulsa un electrón a un alto nivel de energía. El electrón de alta energía pasa a una molécula aceptora y es reemplazado por un electrón del agua. Esta división del agua libera el O₂ que respiramos.
2. Síntesis de ATP: el electrón de alta energía recorre una cadena de transporte de electrones y pierde energía a medida que avanza. Parte de la energía liberada impulsa el bombeo de iones H⁺ del estroma hacia el interior de los tilacoides y forma un gradiente (los iones H⁺ de la división del agua también se incorporan al gradiente). A medida que los iones H⁺ fluyen a favor de su gradiente hacia el estroma, pasan a través de la ATP sintasa, que estimula la producción de ATP en un proceso conocido como quimiosmosis.
3. Absorción de la luz en PSI: el electrón llega al fotosistema I y se une al par especial de clorofilas P700 en el centro de reacción. Cuando los pigmentos absorben la energía lumínica y esta pasa hacia el centro de reacción, el electrón en P700 es impulsado hacia un nivel muy alto de energía y se transfiere a una molécula aceptora. El electrón que falta del par especial es reemplazado por un

nuevo electrón de PSII (que llega a través de la cadena de transporte de electrones).

4. Formación de NADPH: el electrón de alta energía recorre un segundo tramo breve de la cadena de transporte de electrones. Al final de la cadena, el electrón pasa al NADP^+ (junto con un segundo electrón de la misma vía) para formar NADPH.

Fig.5 Fosforilación no cíclica⁸⁵



El efecto neto de estos pasos es convertir la energía luminosa en energía química en forma de ATP y NADPH. El ATP y NADPH de las reacciones dependientes de la luz se utilizan para formar azúcares en la próxima etapa de la fotosíntesis, el ciclo de Calvin. En otra forma de las reacciones dependientes de la luz, denominada fotofosforilación cíclica, los electrones siguen un camino circular diferente y solo se produce ATP (no NADPH).

En la fotofosforilación cíclica, un electrón excitado abandona el fotosistema I y viaja una distancia corta hacia la segunda parte de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, en lugar de que pase a la enzima que reduce NADP^+ en NADPH, el electrón regresa a la primera parte de la cadena de transporte de electrones. Viaja por esa primera parte hacia el fotosistema I, donde se puede repetir el proceso cuando se absorbe más energía luminosa. Los electrones que fluyen cíclicamente generan ATP porque el paso por la primera parte de la cadena de transporte de electrones causa el bombeo de protones hacia el lumen de los tilacoides, y así se establece un gradiente. Sin embargo, el flujo ciclo de electrones no forma NADPH, y tampoco está implicado en la descomposición del agua ni en la producción de oxígeno.

Es importante tener en cuenta que la transferencia de electrones de las reacciones dependientes de la luz se produce por la absorción de la energía luminosa, y en

realidad es posible debido a ella. Es decir, la transferencia de electrones del PSII a PSI y del PSI a NADPH solo se produce "cuesta abajo" desde el punto de vista energético (libera energía y, por lo tanto, es espontánea), porque la absorción de energía luminosa lleva a los electrones de P680 y P700 a niveles de energía muy altos.

En conclusión, las moléculas de pigmento recolectan energía y la transfieren hacia la parte central del fotosistema llamada centro de reacción. El centro de reacción de un fotosistema contiene un único par de moléculas de clorofila *a*, que suele denominarse par especial. Una vez que la energía alcanza el par especial, ya no pasará a otros pigmentos mediante la transferencia de energía por resonancia, sino que el par especial podrá perder un electrón al excitarse y pasarlo a otra molécula del complejo llamada aceptor primario de electrones. Con esta transferencia, el electrón comenzará su recorrido por una cadena de transporte de electrones.⁸⁵

Según la investigación de Mascia *et. al.* (2017) concluyeron que la transición a los quistes ricos en astaxantina conduce a la desestabilización de los fotosistemas. Sorprendentemente, se encontró que la astaxantina estaba unida al fotosistema I y II, sustituyendo parcialmente el β -caroteno, y demostrando así la posible biosíntesis de astaxantina en los plastos o el transporte desde el citoplasma al cloroplasto. Sin embargo, la unión de astaxantina a los fotosistemas no mejora su fotoprotección, sino que reduce la eficiencia de la transferencia de energía de excitación a los centros de reacción. Por lo tanto, los investigadores proponen que la unión de astaxantina desestabiliza parcialmente el fotosistema I y II.⁸⁷

Según Tan *et. al.* (1995) el nivel de citocromo *f* disminuye considerablemente en las células rojas en comparación de las células verdes, lo que se espera que afecte en gran medida el flujo de electrones lineal del fotosistema PSII a PS I. Ya que la función de las moléculas de citocromo es aceptar y liberar alternativamente electrones, que pasan a otro citocromo en una cadena de reacciones químicas llamada transferencia de electrones, que funciona con liberación de energía. Esta energía se almacena en forma de trifosfato de adenosina (ATP). Cuando la célula necesita energía, la toma de sus reservas de ATP. La tasa de respiración de los cultivos rojos fue mucho mayor que la de células verdes, a pesar de la disminución de la evolución de O₂ en los glóbulos rojos, los fotosistemas aún eran funcionales. Postulamos que la disminución de O₂, la evolución en las células rojas es atribuible en gran medida a un aumento en la tasa de respiración y al deterioro del flujo de electrones lineales de PS II a PS I y, en cierta medida, a una disminución en los componentes de los fotosistemas.⁹¹

Clorofila

La Clorofila *a* y la clorofila *b* hacen parte del sistema de *H. pluvialis*. La clorofila *A* ha ocupado el puesto más alto hasta hace poco, asumiendo el papel fotoquímico tanto en el fotosistema I (PSI) como en el fotosistema II (PSII), también Tiene la composición

$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$.⁵⁵ Exhibe un color visual verde-hierba, y los picos de absorción están a 430nm y 662nm, se da en todos los organismos fotosintéticos. La clorofila-b tiene la composición $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$, que se diferencia de la clorofila-a, en la sustitución de un grupo metilo, por un CHO y los picos de absorción están a 453nm y 642nm.

La microalga *H. pluvialis* pertenece al filo *Clorophyta*, las microalgas pertenecientes a este poseen plástidos primarios, es decir, plástidos con solo dos membranas de envoltura, en contraposición a los plástidos secundarios, que tienen tres o cuatro membranas de envoltura. Dado que hoy en día los plástidos primarios contienen solo unos pocos genes (generalmente mucho menos de 250), se supone que el núcleo original perdió la mayoría de sus genes, algunos para el núcleo del hospedador y otros en conjunto. Este grupo de protistas está predominantemente flagelado con dos flagelos desiguales. Las membranas externas de los plástidos encierran muchas membranas de tilacoides, que están estrechamente posicionadas entre sí sobre porciones significativas. el sistema de recolección de luz se basa en proteínas integrales de membrana. Muchas de estas proteínas están en la familia de proteínas de unión a la clorofila (CAB) que se unen a Clorofila a y Clorofila b. De esta familia de CAB pertenecen las Light Harvesting Antennae.

Complejos antena para la fotosíntesis

La captura de la energía de la luz para la fotosíntesis está reforzada por redes de pigmentos en los cloroplastos, dispuestos en grupos en los tilacoides. Estos grupos se denominan complejos antenas o ficobilisomas en algas.³³

La relación de estos complejos con la producción de astaxantina, es que este carotenoide reduce en gran medida la cantidad de luz disponible para la absorción por parte de los complejos antena para la fotosíntesis que captan la luz, lo que potencialmente limita la fotoinhibición y el fotodaño causados por la intensa irradiación. La esterificación de astaxantina con ácidos grasos representa un posible mecanismo por el cual este cromóforo se puede concentrar dentro de los glóbulos citoplásmicos para maximizar su eficiencia fotoprotectora.

2.4 Factores que promueven el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*

2.4.1 Cultivos

El crecimiento de *H. pluvialis* es lento, vulnerable a la contaminación lo que limita el cultivo a gran escala.⁵⁰ También es posible cultivarlo a en un fotobiorreactor e incubadora de luz que proporciona las condiciones necesarias para el crecimiento.⁶⁷

Hay diferentes tipos de modos de crecimiento disponibles para microalgas que incluyen crecimiento fotoautotrófico, heterótrofo, mixotrófico y fotoheterotrófico. La tasa de crecimiento y el contenido celular de las microalgas dependen en gran medida del

método de cultivo, ya que cada una de ellas proporciona una cantidad diferente de nutrientes y energía.⁴³

2.4.1.1 Cultivo Fotoautotrófico

La eficiencia de la incorporación de una fuente de carbono inorgánico y orgánico para los cambios de biomasa durante el crecimiento fotosintético, dependen de: especie del alga, intensidad de la luz, fuente de energía y carbono (orgánico o inorgánico) y fase de crecimiento (ver tabla 3).

Tabla 3 Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas⁴²

Metabolismo	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánico
Mixotrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y Orgánico

El *H. pluvialis* es una microalga que puede crecer bajo condiciones fotoautótroficas, heterótroficas y mixotróficas:

Tabla 4 Metabolismos en microalgas y ecuaciones estequiométricas⁴²

Metabolismo	Ecuación estequiométrica
Fotoautótrofo	$H_2O + HCO_3^- \longrightarrow C \text{ (biomasa)} + 1/2O_2 + OH^- \longrightarrow$ incremento de pH
Heterótrofo	$(1+a) CH_2O + O_2 \longrightarrow C \text{ (biomasa)} + aCO_2 + (1+a) H_2O \longrightarrow$ disminución de pH
Mixotrófico	$bHCO_3^- + cCH_2O \longrightarrow (b+(c-a))C \text{ (biomasa)} + 3OH^- + aCO_2 \longrightarrow$ Cambios de pH no son significativos

El cultivo fotoautotrófico utiliza la luz como única fuente de energía, la cual se convierte en energía química en las reacciones fotosintéticas. Los factores limitantes de crecimiento estudiados son luz y CO₂. (Ver tabla 4)

En un cultivo fotoautotrófico la luz puede ser considerada como un sustrato físico, la influencia de la intensidad de la luz sobre la rata de crecimiento es descrita con las

$$\mu = \mu_m \left[\frac{I_0}{K_{I_0} + I_0} \right]$$

ecuaciones de Monod (si no se observa fotoinhibición):

$$\mu = \mu_m \left[\frac{I_0}{K_{I_0} + I_0 + \frac{I_0^2}{K_i}} \right]$$

Ó Haldane (cuando ocurre fotoinhibición):

A bajos valores de I_0 (luz incidente) la ecuación de Monod, es una ecuación de primer orden donde la tasa específica de crecimiento esta relacionada linealmente a la limitación de la intensidad de luz incidente, después de que $\mu < \mu_m$, como se expresa en la siguiente ecuación (Chojnacka y Marquez, 2004):

$$\mu = \mu_m \left[\frac{I_0}{K_{I_0}} \right]$$

42

2.4.1.2 Cultivo mixotrofico

La mixotrofia es un proceso metabólico en el cual la fotosíntesis es la fuente más importante de energía. En el cultivo mixotrófico se produce una captación simultánea de compuestos orgánicos y CO₂ como fuentes de carbono para la síntesis celular y, luego, se espera que el CO₂ liberado a través de la respiración se atrape y reutilice rápidamente con suficiente intensidad de luz. Las células mixotróficas adquieren la energía al metabolizar compuestos orgánicos a través de la respiración y convirtiendo la energía de la luz en energía química. La adición de sustrato orgánico resultó en el aumento de la tasa de crecimiento, así como en la concentración final de biomasa. Es decir, la mixotrofia es capaz de utilizar diferentes modos de nutrición dependiendo de las condiciones de crecimiento, acarrea dos vías de metabolismo: autotrofia y heterotrofia. Los compuestos orgánicos y el dióxido de carbono puede ser utilizado simultáneamente como una fuente de carbono y compuestos orgánicos y la luz usados simultáneamente como una fuente de energía.⁴⁰

2.4.2 Luz

La luz ocasiona efectos en las propiedades ultraestructurales, biofísica y fisiológicas para incrementar la fotosíntesis y el crecimiento de la microalga. *H. pluvialis* atraviesa un proceso de foto adaptación.

La respuesta celular dependerá de la intensidad de la luz, si es disminuida esta intensidad la clorofila *a* y otros carotenoides primarios aumentaran. Por otro lado, la alta

intensidad de la luz aumentara los carotenoides secundarios generando una disminución de la fotosíntesis, entre estos carotenoides secundarios se encuentra la astaxantina, siendo utilizada como un agente protector ante este efecto. Estos carotenoides frecuentemente son acumulados en estructuras especiales como cuerpos lipídicos citoplásmicos, desempeñando así su papel para evitar que el exceso de energía lumínica llegue a la maquinaria fotosintética. La acumulación de los carotenoides pueden ser el resultado de la alternancia de flujos de carbono y nitrógeno dentro de las células bajo condiciones estresantes.

2.4.3 Temperatura

Este factor presenta gran importancia en la composición de la membrana lipídica. Según la literatura se ha reportado que la formación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* se triplica cuando la temperatura de crecimiento es de 20 a 30 grados centígrados, ya que la temperatura también ejerce un efecto sobre la composición de carotenoides; las temperaturas más altas pueden inducir la formación de radicales de oxígeno activo en las células de algas, lo que resulta en una carotenogénesis inducida por estrés oxidativo y/o mejora la reacción enzimática dependiente de la temperatura involucrada en la carotogénesis.

También la temperatura de crecimiento influye en los contenidos celulares de carbono y nitrógeno, así como en el volumen celular. Una temperatura óptima para el crecimiento puede dar como resultado células de algas que tienen un tamaño celular y contenido celular de carbono y nitrógeno adecuados, mientras que una temperatura por debajo o por encima del nivel óptimo puede conducir a aumentos en el volumen celular y contenido bioquímico. Es decir, se requiere más carbono y nutrientes para producir una célula a la misma tasa de crecimiento a una temperatura no óptima.

Las temperaturas bajas como las altas ejercen un efecto inhibitorio sobre las algas, lo que requiere un mantenimiento de la temperatura de cultivo en condiciones óptimas. En particular, los cultivos de *Haematococcus* se muestran bastante sensibles a los cambios de temperatura. De hecho, Las altas temperaturas (30-36 ° C) inhibieron la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*⁶¹ En el estudio de Giannelli *et. al.* (2015) se demuestra que la temperatura de 20 grados centígrados dio como resultado la concentración celular máxima $16.7 \cdot 10^5$, si el objetivo es la mayor producción de biomasa, esta sería la temperatura optima. Estos investigadores también analizaron el contenido de clorofila y concluyeron que cuanto mayor sea la temperatura de cultivo, mayor será el contenido final de clorofila, a 20°C, la clorofila se acumuló lentamente, mientras que a 30.5°C el pigmento se acumuló rápidamente. La clorofila la utiliza las algas para absorber la radiación de la luz y se convierten en energía reductora para el metabolismo celular. Estos investigadores concluyeron que la aclimatación de las células a temperaturas más altas ocurrió de hecho en condiciones de limitación de la luz. Mientras que todos los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo bajo

diferentes condiciones de temperatura, la luz se controló rigurosamente y se mantuvo constante con una irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esto sugiere que cuanto más alta es la temperatura en el cultivo, menos células perciben la luz. Respecto a la producción de astaxantina, en este estudio demostraron que el aumento de la temperatura tuvo un efecto positivo cuando se combinó con el estrés por inanición de nitrógeno y permitió un aumento de la producción final de astaxantina al realizar la comparación entre 20 y 27 grados centígrados, la temperatura de 27°C podría considerarse como una condición de crecimiento óptima ya que obtuvo un 30% más de astaxantina que la temperatura de 20°C .¹⁵

2.4.4 Nitrógeno

Nitrógeno, el cual generalmente representa alrededor del 7-10% del peso seco celular, es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de *H. pluvialis*. Cuando las microalgas crecen en condiciones de nitrógeno limitado, el efecto más llamativo es la degradación activa y específica de los ficobilisomas.

Hasta que el nitrógeno celular caiga por debajo de un valor umbral, la fotosíntesis aún continúa, aunque a un ritmo reducido. El flujo de carbono, fijado en la fotosíntesis, en estas circunstancias se desvía del camino de la síntesis de proteínas hacia la síntesis de lípidos.

Numerosos estudios muestran que la biosíntesis y la acumulación de lípidos se potencian en cultivos de microalgas limitados en nitrógeno. En contraste con los lípidos polares de las células con suficiente nitrógeno, los lípidos neutros en forma de triacilglicerol se convierten en los componentes predominantes de los lípidos de las células sin nitrógeno.⁵⁹

La acumulación de carotenoides secundarios es la característica principal de muchas algas cuando se extrae en condiciones de nitrógeno limitado, que a menudo va acompañada de una disminución en el contenido de clorofila de las células. Se ha demostrado que la baja concentración de nitrógeno es un factor importante en la estimulación de la síntesis y acumulación de la astaxantina y sus ésteres acíclicos en *Haematococcus pluvialis*.⁵⁷

Se ha informado que bajo condiciones de agotamiento de nitrógeno, *H. pluvialis* produjo para cada picogramo de astaxantina, cinco picogramos de ácidos grasos, particularmente triacilglicerol ricos en ácido oleico, sugiriendo que estos dos procesos están interrelacionados y que permiten que los glóbulos de aceite puedan mantener un alto contenido de ésteres de astaxantina.

En conclusión, las respuestas típicas a la limitación de nitrógeno son la decoloración de las células, es decir la disminución de las clorofilas y un aumento de los carotenoides y

la acumulación de compuestos de carbono orgánico como polisacáridos y ciertos aceites.

2.4.5 Fósforo

Es esencial para el crecimiento y muchos procesos celulares como la transferencia de energía y la biosíntesis de ácidos nucleicos. La forma preferida en la que se suministra a las microalgas es como ortofosfato (PO_2^{-4}) y su absorción depende de la energía. Aunque la biomasa de microalgas contiene menos del 1% de P, a menudo es uno de los factores limitantes del crecimiento más importantes en la biotecnología de *H. pluvialis*. Esto se debe a que se une fácilmente a otros iones (CO_3^{2-} y hierro) lo que da como resultado su precipitación y, en consecuencia, hace que este nutriente esencial no esté disponible para la absorción de algas. Además, el fosfato inorgánico también puede aparecer en las células en forma de polifosfatos, que se acumulan en distintos gránulos de polifosfato. Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en células normales bajo un crecimiento suficiente de fosfato, pero desaparecen una vez que el fosfato se vuelve deficiente.

El suministro de P también influye en la composición de la biomasa producida. Es especialmente el contenido lipídico y los carbohidratos los que se ven afectados por los suministros externos e internos de P. También es importante la proporción de N: P en los medios de crecimiento, ya que esto no solo determina la productividad potencial, sino que es importante para mantener el dominio de *H. pluvialis* en cultivo.⁵⁷

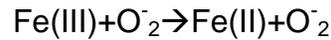
Algunos de los síntomas de depleción de fósforo son similares a los observados en cultivos deficientes en nitrógeno. El contenido de clorofila a tiende a disminuir mientras que el contenido de carbohidratos aumenta en células eucariotas y procariotas. En contraste con la depleción de nitrógeno, se produce poca degradación de ficobilisomas durante el agotamiento del fósforo. La disminución en el nivel de ficobilisomas celulares se debe a la división celular, mientras que la nueva síntesis de ficobilisomas cesa. Se informó que la depleción de fósforo daba como resultado la acumulación de astaxantina en las células de *Haematococcus pluvialis*, pero no notablemente cuando se compara con la deficiencia de nitrógeno.

2.4.6 Hierro

El hierro desempeña un papel importante en la composición bioquímica celular debido a sus propiedades redox e implicación en procesos fundamentales como la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógeno y la síntesis de ADN. Se encontró que la deficiencia de hierro inducía varios cambios bioquímicos. Por un lado, la clorofila a puede degradarse cuando el hierro se vuelve limitante.

El exceso de hierro en los cultivos de microalgas, por otro lado, puede provocar estrés oxidativo que conduce a una variedad de cambios fisiológicos. A nivel celular, el Fe^{2+}

puede reaccionar con H₂O₂ que es producido por las células de microalgas, para generar el radical hidroxilo (OH·) por la reacción de Fenton:



El acetato es un inductor de la formación de astaxantina en *H. pluvialis* fue notablemente mejorado por la adición de hierro. Fe²⁺ podría funcionar como un generador de OH· a través de la reacción de Fenton catalizada por hierro, y que OH· u otras especies de oxígeno (O₂, O₂⁻, H₂O₂) pueden jugar un papel esencial en la carotenogénesis mejorada en la microalga. Recientemente, se confirmó un papel antioxidante de astaxantina en células de *H. pluvialis* bajo estrés oxidativo midiendo la capacidad para la conversión in vivo de diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína al colorante fluorescente diclorofluoresceína en células vegetativas, así como células de quistes maduros e inmaduros.³⁴

2.5 Factores que promueven la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*

2.5.1 Luz

Las algas han desarrollado estrategias para adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales como lo es la intensidad de la luz. La estrategia principal es la fotorelocación de cloroplastos.

Bajo estrés como la luz intensa *H. pluvialis* aumentan la síntesis y acumulación de astaxantina, como se evidencio anteriormente, la astaxantina se sintetiza a partir de β-caroteno como un precursor en una reacción catalizada por β-caroteno cetolasa, este β-caroteno se exporta desde el cloroplasto al retículo endoplásmico donde se convierte en astaxantina, después en ésteres de astaxantina, y finalmente forma gotas de lípidos que contienen éster de astaxantina.⁷¹ Un estudio en el 2018 liderado por Shuheji, evidenció que ante un estrés por luz las gotas de lípido que contenían la astaxantina se movían desde el centro hasta la periferia a través de las vías en un cloroplasto. Estos investigadores también revelaron que la respuesta difería entre la astaxantina y la clorofila, ya que solo la astaxantina migraba libremente del centro a la periferia de la célula a través de un esférico y grande citoplasma que encapsula el cloroplasto como una gota de lípido. Y cuando las células regresaron a condiciones oscuras, las gotas de lípidos que contienen astaxantina vuelven a la periferia para exponer al cloroplasto y absorber luz eficientemente en condiciones normales, concluyendo así que este es el mecanismo de protección contra la luz de *H. pluvialis*.²³ La astaxantina es el principal agente fotoprotector⁸⁴ que actúa como un "filtro solar" para reducir el exceso de luz que penetra en el cloroplasto.⁴⁶ Ya que cuando las células se recuperaron del alto estrés lumínico, los glóbulos de astaxantina se concentraron alrededor del núcleo, lo que

indica que el pigmento también sirve como barrera fisicoquímica, protegiendo el ADN que se replica de la oxidación cuando las células se dividen.⁹⁵

En el estudio de Gwak *et. al.*, se logró evidenciar que respecto a los cambios morfológicos y bioquímicos durante el enquistamiento. En la etapa verde, la clorofila y la luteína eran los pigmentos más abundantes, al ser sometido a estrés con luz de alta intensidad en la etapa roja la astaxantina y el beta-caroteno eran los pigmentos que prevalecían. En esta investigación también se realizó un análisis lipídico donde dio como resultado una diferencia significativa de la etapa ver a la etapa roja en el contenido total de glicerolípidos, lo que nos lleva a pensar que la exposición a luz alta que la síntesis del almacenamiento de lípido triacilglicerol (TAG) se estimuló sustancialmente siendo proporcional al aumento de la astaxantina, ya que este carotenoide se almacena dentro de las gotas de lípidos. Un hallazgo mayor fue la comparación de los transcriptomas entre la etapa verde y la etapa roja ya que se los hematocistos están regulados por muchos más genes que las células verdes, hubo un aumento notable en la transcripción de muchos genes relacionados con la protección contra el estrés fotooxidativo cuando se sometió a estrés por exposición a la luz, por el contrario en la etapa verde los genes que codifican proteínas implicadas en la actividad de recolección de luz estaban aumentadas ante la disminución de alta irradiación.²⁶

No solamente es la luz un factor importante para la producción, también lo es el uso de luz intermitente. En la investigación de Kim³² y sus colaboradores determinaron que podría mejorarse drásticamente con una fuente de luz adecuada, como una luz intermitente. La producción de astaxantina de *H. pluvialis* debajo de la luz intermitente externa o internamente iluminada es un proceso mucho más eficiente y económico que bajo una luz continua con la misma intensidad de luz promedio, es decir la misma cantidad de fotones. También se puede resaltar que la luz intermitente tiene algunas otras ventajas sobre la fuente de luz continua como la reducción del consumo de energía debido a la existencia de desconexiones y aumento del flujo instantáneo de fotones fotosintéticos. En conclusión, la luz intermitente adecuada sin duda mejorará la productividad y la eficiencia de la producción de astaxantina y podría ser una técnica clave para el proceso comercial de producción de astaxantina en el futuro cercano. Según Kobayashi *et. al.* (1992) determinó que el contenido de carotenoides se correlacionó proporcionalmente con la cantidad de luz (intensidad de luz x tiempo de iluminación neto).⁷⁴

En el estudio de Park *et. al.* (2001) realizo una comparación de la producción de astaxantina sometida a diferentes intensidades de luz. Una densidad celular alta de 2,7 g/L fue obtenida por $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que una concentración celular mucho menor $<1.0 \text{ g/L}$ fue obtenida con una intensidad de luz más baja $15\text{-}30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Una alta intensidad de luz tuvo un efecto más dramático en la concentración final de astaxantina. Una concentración máxima de astaxantina de 6.5 mg/L fue obtenida a una

intensidad de luz de $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que solo 1.3 y 0,7 mg/L fue obtenida a 30 y $15 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente.⁸²

2.5.2 Sales: Acetato de sodio/Cloruro de sodio

La respuesta de las algas a los cambios en los ambientes osmóticos ha atraído considerable atención desde ellos son habitantes de muchos de los biotopos caracterizados por grandes variaciones en las salinidades y por lo tanto pueden servir como organismos modelo para el estudio de la respuesta de los organismos fotosintéticos al estrés osmótico.

La fotosíntesis de las algas se inhibe por el estrés osmótico. Tal disminución en la fotosíntesis puede estar asociada con la inhibición de la actividad de PS II.

Li *et. al.* (2009) estudiaron la regulación de los genes que codifican la fitoeno desaturasa (*PDS*), la hidroxilasa carotenoides (*CHYb*) y la ketolasa carotenoides (*BKT*) en el alga verde *Chlorella zofingiensis*, siendo esta microalga perteneciente al mismo grupo que *H. pluvialis*. Esta microalga se sometió bajo estrés por luz y cloruro de sodio con una iluminación alta de $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) regulada por incremento las transcripciones de *PDS*, *CHYb* y *BKT* mejoró enormemente la biosíntesis de zeaxantina, cantaxantina y astaxantina. En contraste, el estrés por cloruro de sodio solo regulaba al alza la transcripción de *BKT* y mejoraba la biosíntesis de la cantaxantina y la astaxantina. Se reveló que el estrés causado por alta luz y NaCl resultaron en un aumento en el nivel de especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS), son formas parcialmente reducidas de oxígeno atmosférico (O_2). Suelen ser el resultado de la excitación del O_2 para formar oxígeno singlete (O_2) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones a O_2 para formar, respectivamente, un radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (HO^\cdot).⁷⁹ Son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. En relación con el estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares llamado estrés oxidativo. Al aplicar ROS generados químicamente a las células de algas, determinaron que O_2 específicamente regulaba el gen *CHYb*, mientras que OH^\cdot regulaba los genes *PDS* y el *BKT*. Los autores concluyeron que el estrés causado por alta luz y NaCl pueden estimular la generación de diferentes ROS, que a su vez desencadenan la regulación positiva de genes carotenogénicos específicos y la biosíntesis mejorada de carotenoides. Estas consecuencias al estrés son compartidas con la microalga *H. pluvialis*.⁷⁷ Congruente con los resultados de Pelah *et. al.* (2004) quienes sugieren que para la acumulación de cantaxantina bajo estrés salino, la luz no es un factor limitante, pero para la acumulación de astaxantina es obligatoria una alta irradiancia de luz.^{83,94}

Según la investigación de He y sus colaboradores donde evaluaron el transcriptoma de células expuestas a acetato 25 Mm y luz alta. Se analizaron los DEGG (genes expresados diferencialmente) en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), los investigadores encontraron que el acetato de sodio a comparación de los demás tratamientos tenía un efecto sobre la ruta de fotosíntesis y sus proteínas de antena. Las proteínas de antena se encuentran en los complejos proteicos de la clorofila, representan un ayuda en la recolección de luz y funcionan como un sistema de antenas periféricas. Los resultados evidenciaron que todos los genes relacionados con las proteínas de antena de fotosíntesis estaban regulados negativamente (LHCA light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein). Además, se encontró que *BKT* (beta-caroteno hidroxilasa) que actúa en la última etapa de síntesis de la astaxantina aumentó significativamente en comparación con el tratamiento de solo luz alta e inhibió la expresión de *LcyE*, que hace parte de la vía de síntesis de la luteína, siendo este otro carotenoide que produce *Haematococcus pluvialis*. Lo que nos confirma que la cantidad de clorofila disminuirá proporcionalmente a la astaxantina. ¹

Según Kobayashi *et. al.* (1993) el estrés oxidativo está involucrado en la activación postraduccional de la biosíntesis de carotenoides en células de quistes inducidas por acetato.⁷⁵

2.6 Métodos de medición de biomasa

2.6.1 Cámara de Neubauer

La determinación de la concentración del número de células (conteo de células) requiere que las células se suspendan individualmente. Para mejorar la reproducibilidad de este método, Es de importancia la selección el tamaño de la muestra de *H. pluvialis*, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara. Para realizar el recuento celular se han diseñado diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra entre una lámina y una laminilla colocada sobre plataformas laterales a una altura establecida. La que se usa con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer. La cámara de recuento que se utiliza es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm²), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 µL. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm² (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños.

Si se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros de 1 mm², la concentración celular se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil}$$

En donde:

C = cél/mL

N = promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

dil = factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra).³⁷

2.6.2 Peso seco

La masa seca se mide con el peso seco total de la biomasa o el peso seco sin cenizas. La determinación del peso en seco requiere separación de células, pasos de lavado y secado a peso constante. Se toman alícuotas representativas de cultivos de algas y las células se separan por filtración en membrana o centrifugación. La membrana del filtro o los tubos de la centrífuga deben pesarse previamente. Las células se lavan normalmente con medio diluido o tampón varias veces, seguido de enjuague con agua destilada. Después de que el tubo de centrífuga o la membrana del filtro se haya enfriado en un desecador a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-30 minutos, la muestra seca se debe pesar inmediatamente después de sacarla del desecador para evitar la absorción de humedad del aire.

El peso húmedo se mide usando los mismos procedimientos descritos anteriormente, pero sin secar. Aunque es más rápido, este método de determinación es mucho menos preciso ya que rara vez se obtiene un contenido de agua definido.³⁴

2.6.3 Densidad óptica

La densidad óptica corresponde a una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada. Para este método se utiliza un espectrofotómetro, un equipo que mide cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la muestra, basándose en la Ley de Beer-Lambert.

Este método permite una evaluación rápida de la concentración microalgal, en especial si se cuenta con una curva de calibración entre la concentración celular de *H. pluvialis*, evaluada directamente, y las lecturas de densidad óptica de uno o más cultivos de esa especie. Uno de sus inconvenientes es que la contaminación bacteriana y/o de otro tipo (basura, residuos), dará lecturas erróneas. En este proyecto se utiliza dos longitudes de onda específicas para la astaxantina y la clorofila, 477 y 667 nm respectivamente.³⁷

2.6.4 Epifluorescencia

Este método se basa en principios ópticos de microscopía común y un fluorocromo que corresponde a un tinte fluorescente. Respecto al uso en microalgas, el término correcto es un método de filtrado de epifluorescencia que consiste en que *H. pluvialis* se filtra sobre una membrana apropiada, posteriormente se agrega un agente fluorescente para teñir las células de la microalga como diamidino-2-phenylindole. Después se lleva a cabo la

detección que puede hacerse con un microscopio de fluorescencia o con otros dispositivos capaces de medirla.

2.7 Métodos de medición de astaxantina y clorofila

2.7.1 Espectrofotómetro

Las células son colectadas por centrifugación o filtración de membrana. Los pigmentos pueden ser extraídos con diversos solventes, como lo son 100% acetona, 90% metanol y 100% dietil eter. Después de la extracción la célula, los desechos celulares son removidos por centrifugación. La absorbancia del extracto de disolvente se mide a las longitudes de onda dadas frente a un blanco de disolvente en el caso de *H. pluvialis* se usa 667nm para la medición de clorofila y 477 nm para la medición de astaxantina.³⁴

2.7.2 HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución, consiste en que un disolvente líquido que contiene la mezcla de las moléculas de *H. pluvialis* a identificar se hace pasar a través de una columna densamente empaquetada con pequeñas esferas de resina insoluble. En la cromatografía en columna, cuanto más pequeñas sean las partículas de resina y más densamente se encuentren empaquetadas, mejor será la resolución de esta técnica separativa. En la HPLC, la resina esta tan densamente empaquetada que el líquido debe ser bombeado a través de la columna a elevada presión. Por este motivo en HPLC se emplean bombas de alta presión de precisión, y las columnas son de metal y no de cristal o plástico como en la cromatografía a presión atmosférica. Las partículas de resina pueden recubrirse con grupos químicos cargados para separar los compuestos por intercambio iónico, o con grupos hidrofóbicos para retrasar las moléculas apolares hidrofóbicas.

Las separaciones por HPLC ofrecen una resolución y reproducibilidad extremadamente elevadas.⁴⁹

Jin y sus colaboradores en 2017 determinaron simultáneamente 13 carotenoides por este método de cromatografía líquida de alta presión a base de columna C18 para el perfil de carotenoides en *Haematococcus pluvialis* que acumula astaxantina. El método es capaz de separar eficazmente dos isómeros de astaxantina, dos isómeros de ζ -caroteno y tres isómeros de fitoeno en dos columnas simples de C18 en 9 y 12 minutos solo mediante el uso de metanol y acetonitrilo, respectivamente. Hasta donde sabemos, este es el método más rápido para estos isómeros de carotenoides, actualmente. Usando este método, se llevó a cabo con éxito el perfil de carotenoides en *H. pluvialis* acumulador de astaxantina bajo estrés ambiental. Los resultados indicaron que la biosíntesis de carotenoides fue perturbada de manera diferente por las tensiones ambientales, lo que indica que este método simple y rápido es adecuado no solo para

muestras bacterianas sino también para algas, con aplicaciones potenciales para una amplia gama de muestras de plantas a animales.³⁵

2.8 Métodos de medición de proteínas

2.8.1 Electroforesis

La electroforesis de proteínas generalmente se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida con un tamaño de un poro característico, de manera que la separación de las moléculas se basa en la filtración por el gel correspondiente al tamaño y forma, así como en la movilidad electroforética correspondiente a la carga eléctrica. La electroforesis se diferencia de la filtración en geles en que la movilidad electroforética de las moléculas más pequeñas es mayor que la movilidad de las más grandes cuando la densidad de la carga es la misma. El Ph del gel es suficientemente alto por lo general alrededor de 9 como para que casi todas las proteínas tengan cargas netas negativas y se muevan hacia el ánodo en el que se aplica la corriente. Las moléculas de tamaño y carga similares se mueven en forma de banda a través del gel.

Luego de la electroforesis, las bandas separadas pueden visualizarse en el gel mediante una técnica adecuada, por ejemplo, si se sumerge el gel en una solución de un colorante que se une fuertemente a las proteínas como el azul brillante Coomassie.

2.8.2 Western Blot

Esta técnica es un análisis de proteínas de tercera dimensión, ya que mediante anticuerpos específicos y altamente sensibles se pueden analizar componentes concretos de una mezcla compleja de proteínas de *H. pluvialis*. La separación de las proteínas se realiza mediante SDS-PAGE. Sin embargo, mientras las proteínas están aún en la matriz del gel no pueden ser alcanzadas por las grandes moléculas de los anticuerpos. Por ello se extraen del gel, y se colocan en una fina membrana de nitrocelulosa o polivinildifluoruro (PVDF). Para ello se coloca el gel de SDS sobre la membrana y se aplica verticalmente con respecto al nivel del gel una corriente eléctrica. Las micelas SDS-proteínas se transfieren electroforéticamente hacia el ánodo desde el gel hacia la matriz, y se produce una impresión de la muestra de la proteína en la membrana. Esta une las proteínas transferidas con fuerza. Los puntos de unión restantes de la matriz se saturan con proteínas como las de la leche antes de añadir el anticuerpo primario; dado que este es una proteína, se debe evitar que se produzca un enlace no específico a la membrana. En ese momento, la unión del anticuerpo no es visible, pero aportando un anticuerpo secundario generado contra el anticuerpo primario se muestra la banda de proteína, esto es porque el anticuerpo secundario tiene enlazado una enzima que cataliza una reacción de coloración. Puesto que una única molécula de enzima genera con cada paso catalítico nuevas moléculas de colorante, se origina una señal amplificada.⁴⁸

Steinbrenner *et. al.* (2006) realizaron un protocolo de transformación genética para la ingeniería metabólica de *H. pluvialis*. Primero, se aisló el gen que codifica la enzima encargada de la biosíntesis de carotenoides como lo es la fitoeno desaturasa, la modificaron mediante mutagénesis cambiando el codón de leucina en la posición 504 por un codón de arginina. En un ensayo *in vitro*, la fitoeno desaturasa modificada todavía estaba activa en la conversión de fitoeno en zetacaroteno y exhibía una resistencia 43 veces mayor al herbicida blanqueador norflurazon. Tras la transformación biolística utilizando el gen de fitoeno desaturasa modificado como informador y la selección con norflurazon, la integración en el genoma nuclear de *H. el gen de pluvialis* y fitoeno desaturasa y la expresión de proteína se demostraron mediante transferencia de Western blot, respectivamente, en 11 transformantes. Algunos de los transformantes tenían un mayor contenido de carotenoides en el estado verde, lo que se correlacionaba con un mayor enfriamiento no fotoquímico. Esta medición de fluorescencia de clorofila se puede usar como un procedimiento de selección para transformantes estables. La inducción de estrés de la biosíntesis de astaxantina por luz alta mostró que hubo una acumulación acelerada de astaxantina en uno de los transformantes en comparación con la acumulación en el tipo silvestre.³⁶

2.8.3 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica rápida y conveniente para amplificar un ADN específico. La muestra de ADN se separa en cadenas simples y se incuban con ADN polimerasa, dNTP y dos cebadores de oligonucleótidos cuyas secuencias flanquean el segmento de ADN de interés. Los cebadores dirigen la ADN polimerasa para que sintetice cadenas complementarias del ADN diana. Varios ciclos de este proceso, cada uno de los cuales duplica la cantidad de ADN diana, amplifican geométricamente el ADN diana a partir de una muestra tan pequeña como una sola copia del gen. En cada ciclo, las dos cadenas del ADN dúplex se separan por calor, los cebadores se aparean con sus segmentos de ADN complementarios y la ADN polimerasa dirige la síntesis de las cadenas complementarias. El uso de una ADN polimerasa estable frente al calor, como la polimerasa Taq aislada del *Thermus aquaticus*, una bacteria que prolifera a 75 grados centígrados, elimina la necesidad de agregar enzima fresca luego de cada ciclo de calentamiento, ya que el calor inactiva la mayoría de las enzimas. Así, en presencia de cantidades suficientes de cebadores y dntp, la PCR se lleva a cabo simplemente al variar la temperatura de manera cíclica. Con veinte ciclos de PCR se incrementa la cantidad de la secuencia diana en aproximadamente en un millón de veces con especificidad elevada. Sin dudas, la PCR puede amplificar el ADN diana presente solo una vez en una muestra de 10^5 células, por lo que el método puede usarse sin una purificación previa del ADN. El ADN amplificado puede luego puede secuenciarse o clonarse.⁵⁶

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1 Universo, Población y muestra

Universo: Microalgas

Población: Microalga *H. pluvialis*

Muestra: *H. pluvialis* UTEX, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA).

3.2. Hipótesis, variables, indicadores

Tipo de estudio: experimental

Hipótesis: El *H. pluvialis* sometido a factores de estrés combinados de acetato de sodio, cloruro de sodio y alta intensidad de luz logran mayor producción de astaxantina.

Tabla 5 Variables e indicadores del experimento

VARIABLES		INDICADORES
VARIABLES DEPENDIENTES	Cambio morfológico	Formas: Macrozoide, microzoide, palmella y aplanospora
	Clorofila	mg/μL
	Astaxantina	mg/μL
	Crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i>	Conteo celular con Cámara de Neubauer células/ml
VARIABLES INDEPENDIENTES	Sales utilizadas	Concentraciones de acetato de sodio de 0.18 g/L, 1.6 g/L y 0.320 g/L y Concentraciones de cloruro de sodio de 6.4 g/L, 0.72 g/L y 1.28 g/L.
	Tiempos de adición de sales	Inicio del cultivo y después de finalizada fase exponencial de la microalga
	Temperatura	20°C ± 2°C
	pH	6,8
	Luz blanca	Lámparas fluorescentes
	Fotoperiodo	20:4 (luz:oscuridad)
	Irradianza	70 μE m ⁻² s ⁻¹
	Aire filtrado	Cual es?

Elaborada por la autora, 2018

3.3 Técnicas y procedimientos

3.3.1 Fase 1 Crecimiento de *Haematococcus pluvialis*

Microorganismo

H. pluvialis UTEX, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA).

Mantenimiento de la cepa: medio sólido o líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), 50 lux, temperatura 20°C + 2°C, se replica mensualmente o cada seis meses.

Activación de la cepa: en medio líquido Volvox-MES, irradianza 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pH 6,8 temperatura 20°C + 2°C, fotoperiodo 16h:8h LO, luz blanca con lámparas fluorescentes (T1t 20w/54RS marca Philips) y aire filtrado hasta alcanzar una población celular de 1×10^4 Células/ml.

Condiciones de cultivo:

Medio RM (ver Tabla 2-2), pH 6.8, ciclo luz/oscuridad 16h:8h, temperatura 20±2°C, agitación manual una vez al día durante 10 segundos, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (T1t 20w/54RS marca Philips), irradianza 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aire filtrado.

Condiciones de estrés: los tratamientos realizados se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 6 Tratamientos

RM1: Control
Medio celular RM normal
RM2
Acetato de sodio 0,18 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionó el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM3
Acetato de sodio 1,6 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionó el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM4
Acetato de sodio 0,18 g/L y Cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM5
Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

RM6

Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Condiciones de cultivo

Medio RM (ver Tabla 2), pH 6.8, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura $20\pm 2^\circ\text{C}$, agitación manual una vez al día durante 10 segundos, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aire filtrado.

- Cada medio estéril con el pH ajustado en erlenmeyers de 500 ml hasta un volumen de 400 ml. Sellar para garantizar esterilidad.
- Adicionar el inóculo de la microalga (1×10^5 células./ml).
- Tomar muestra por triplicado días establecidos en forma aséptica.
- Conservar las muestras para su posterior estudio a 4 grados Celsius.
- Llevar control de ciclo luz/oscuridad y pH
- Tiempo del estudio 56 días

Realizar conteo celular en Cámara de Neubauer utilizando 1 mililitro por triplicado (Ver Anexo 1).

Realizar curva de crecimiento a partir de los resultados.

3.3.2 Fase 2 Cambios morfológicos celulares

Para el monitoreo de la microalga utilizar un microscopio de luz para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células, realizar registro fotográfico a 10x y 40x (Ver Figs 12-19).

3.3.3 Fase 3 Cuantificación de astaxantina y clorofila

Método de extracción metanol al 90%

Para la cuantificación de la astaxantina y clorofila tomar 1 ml de la muestra, utilizar la centrifuga eppendorf 5702 a 12.000 rpm durante 5 min. Posteriormente retirar el sobrenadante, al paquete celular adicionar 1 ml de metanol al 90%, calentar durante 10 min a 60 grados Celsius en baño serológico. Leer la absorbancia a 667 nm para clorofila y a 477 nm para astaxantina (APHA, 1992) en espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis. y hallar las concentraciones utilizando la curva de calibración para astaxantina y clorofila (Ver Anexos 3,5,8,9,10,11).

Análisis estadístico de los datos

Realizar un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% para ver diferencias significativas entre tratamientos, para este análisis utilizar Excel 2016. (Ver Anexos 2,4,6).

4. RESULTADOS

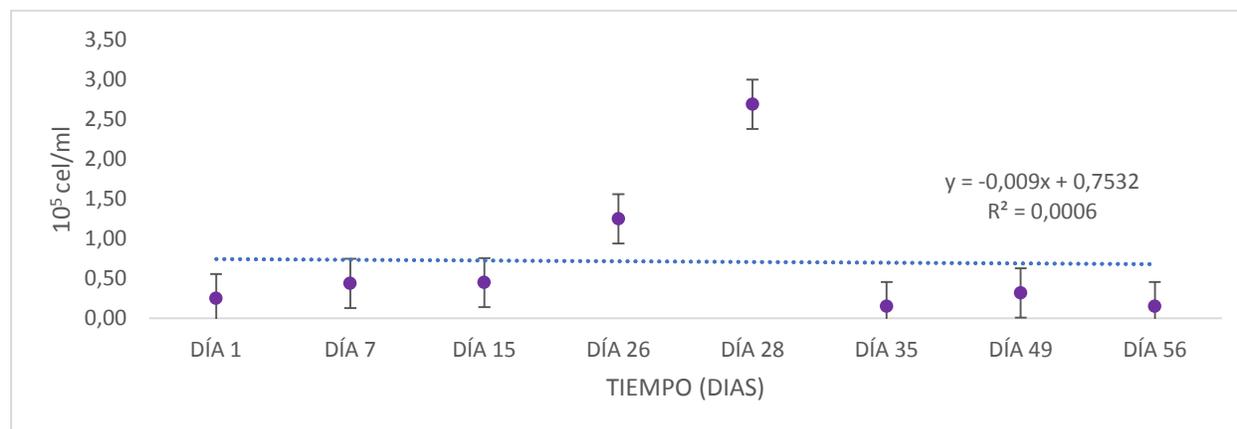
A continuación, se presentan los resultados obtenidos para este trabajo de acuerdo con las fases de investigación

4.1 Fase 1 Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*

Los tratamientos realizados se observan en la Tabla 6

En la fig. 6 se presenta el crecimiento del tratamiento RM1 siendo este el control del estudio, como se puede observar en la gráfica el máximo crecimiento se presentó el día 28 con un valor de $2,69 \times 10^5$ cel/ml, ya que este tratamiento solamente tuvo el estrés celular de iluminación de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y ninguna concentración de sales logrando así que la microalga atravesara todas las fases de crecimiento latencia, exponencial, estacionaria y finalmente muerte donde los nutrientes del medio ya se habían acabado sin mayor dificultad.

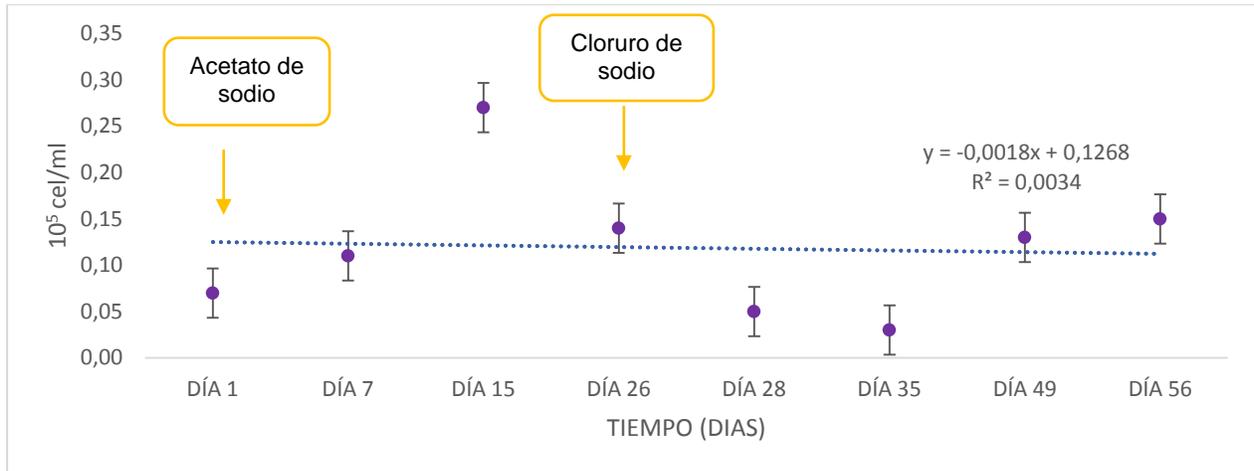
Fig. 6 Curva de crecimiento RM1 Control



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 7 se presenta el crecimiento del tratamiento RM2, en el cual podemos ver que el máximo crecimiento se produjo el día 15 con un valor de $0,27 \times 10^5$ cel/ml ya que en este tratamiento se adicionó una concentración de acetato de sodio de $0,18 \text{ g/L}$ desde el inicio, lo cual favoreció la producción de la biomasa ya que el acetato de sodio es una fuente de carbono adicional que puede utilizar la microalga *H. pluvialis* y el cloruro de sodio con una concentración de $0,72 \text{ g/l}$ que fue adicionado el día 15 afectó el crecimiento celular ya que el día 28 y 35 se presentó un descenso de la biomasa, que posteriormente se reguló posiblemente porque la microalga llegó a adaptarse a las condiciones ambientales a las que se le sometió.

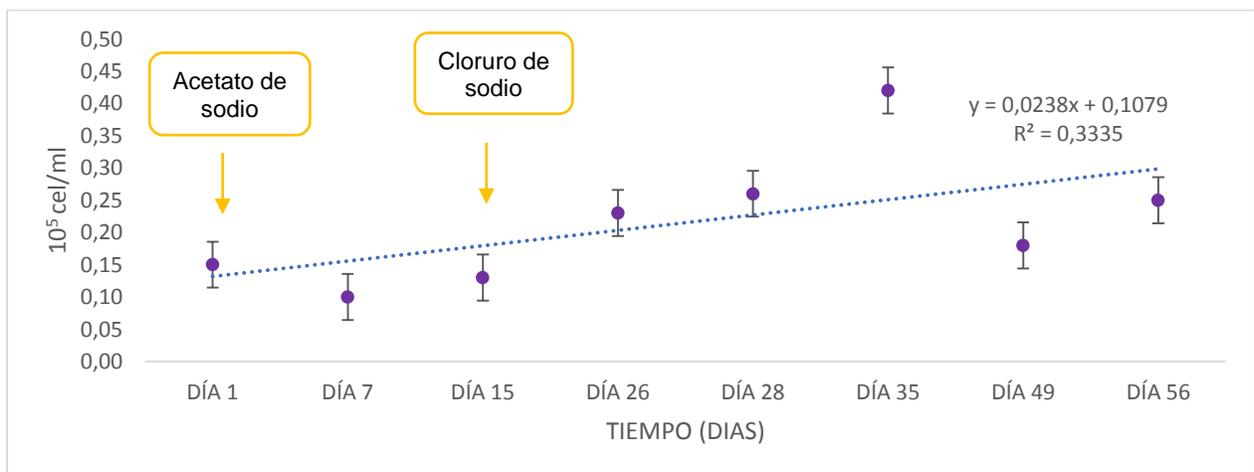
Fig. 7 Curva de crecimiento RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 8 se presenta el crecimiento del tratamiento RM3, como se puede observar en la gráfica el máximo crecimiento se produjo el día 35 con un valor de $0,42 \times 10^5$ cel/ml, en este tratamiento se adiciono una concentración de acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio del estudio y cloruro de sodio de 6,4 g/L se agregó el día 15 del estudio, se logra observar el efecto sinérgico de las dos sales que permite una mayor estimulación de la producción de biomasa.

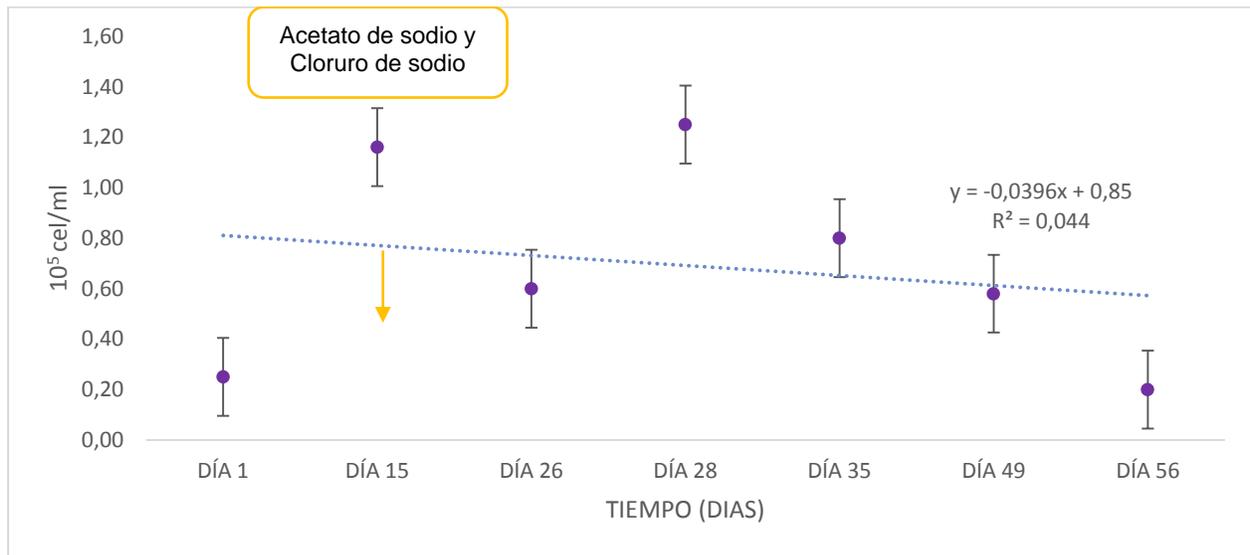
Fig. 8 Curva de crecimiento RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 9 se presenta el crecimiento del tratamiento RM4, en el cual podemos ver que el máximo crecimiento se produjo el día 28 con un valor de $1,25 \times 10^5$ cel./ml, en este tratamiento la microalga estuvo creciendo 15 días sin ningún tipo de estrés salino en el medio RM y posteriormente se adicionó acetato de sodio 0,18 g/L y Cloruro de sodio 0,72 g/L en el día 15 del estudio. Se logra observar que desde la adición de las sales, la microalga tiene un tiempo de adaptación evidenciado en el día 26 y posteriormente el día 28 logra su crecimiento celular máximo.

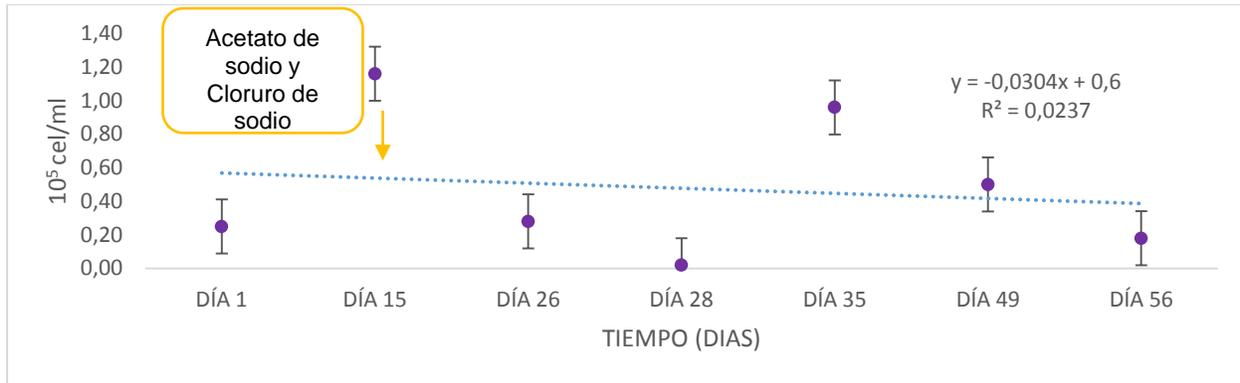
Fig. 9 Curva de crecimiento RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 10 se presenta el crecimiento del tratamiento RM5, como se puede observar en la gráfica el máximo crecimiento se produjo el día 15 con un valor de $1,6 \times 10^5$ cel./ml, en este tratamiento la microalga estuvo creciendo 15 días sin ningún tipo de estrés salino en el medio RM hasta que finalizó la fase exponencial de crecimiento de la microalga y posteriormente se adicionó acetato de sodio 1,6 g/L y cloruro de sodio 6,4 g/L en el día 15 del estudio. Se logra observar que la mayor concentración celular se obtuvo antes de que la microalga fuera estresada por las sales, en las posteriores mediciones se observa que descendió la biomasa y posiblemente cuando la microalga *H. pluvialis* logro adaptarse a las condiciones de estrés volvió a aumentar su celularidad y a utilizar estas sales como fuentes de carbono y a nutrirse de estas, posteriormente disminuyo ya que los nutrientes empiezan a acabarse y la microalga entra en fase de muerte.

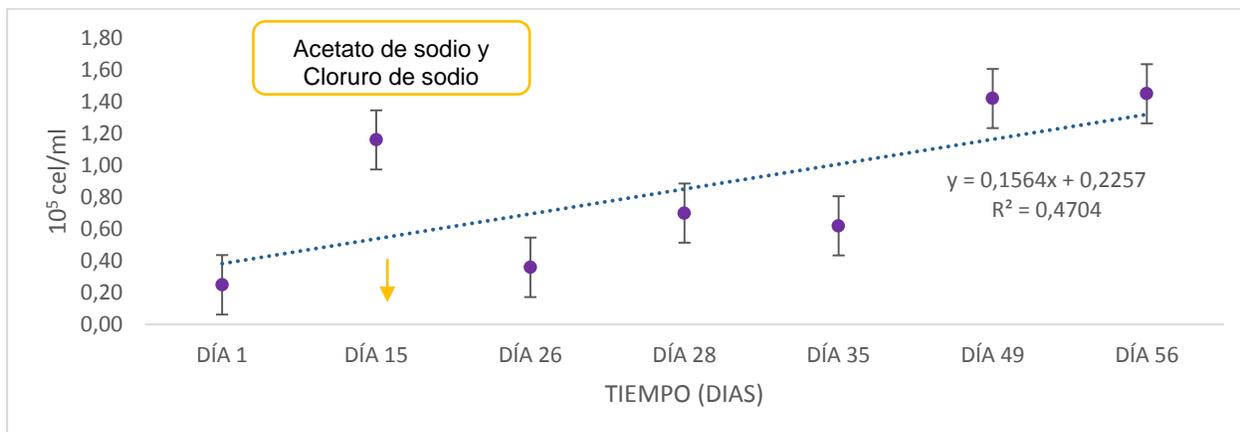
Fig. 10 Curva de crecimiento RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 11 se presenta el crecimiento del tratamiento RM6, como se puede observar en la gráfica el máximo crecimiento se produjo el día 56 con un valor de $1,4 \times 10^5$ cel./ml, en este tratamiento la microalga estuvo creciendo 15 días sin ningún tipo de estrés salino en el medio RM hasta que finalizó la fase exponencial de crecimiento de la microalga y posteriormente se adicionó acetato de sodio 0,320 g/L y cloruro de sodio 1,28 g/L en el día 15 del estudio. Se logra observar que este tratamiento permitió el máximo crecimiento celular en comparación con los demás, por lo tanto, las concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio utilizadas en este tratamiento regulan mejor el crecimiento, ya que a mayor concentración de estas es mayor la muerte celular.

Fig. 11 Curva de crecimiento RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L



Curva realizada por la autora (2018)

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante transformación de los valores de Y a los cuales se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. La idea de realizar el ajuste fue para determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tratamientos probados. El tratamiento con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM6, el cual contiene acetato de sodio 0,320 g/L y cloruro de sodio 1,28 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio con iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad y $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradianza con una velocidad de crecimiento de 1,0179 Cel/día, seguido por el tratamiento RM3, el cual contiene acetato de sodio 1,6 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionó el día 15 del estudio con iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad y $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradianza con una velocidad de crecimiento de 0,696 células/días (Ver tabla 7) (Ver Anexo 7 curvas ajustadas).

Tabla 7 Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los tratamientos realizados

TRATAMIENTO	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM1 Control	8	0,15	2,69	0,00036	0,02
RM2	8	0,03	0,27	0,00032	0,18
RM3	8	0,10	0,42	0,69643	39
RM4	8	0,20	1,25	0,00535	0,3
RM5	8	0,02	1,16	0,00016	0,009
RM6	8	0,25	1,45	1,0179	57

Tabla realizada por la autora (2019)

4.2 Fase 2 Evaluación cambios morfológicos macroscópicos y microscópicos de la microalga *H. pluvialis*

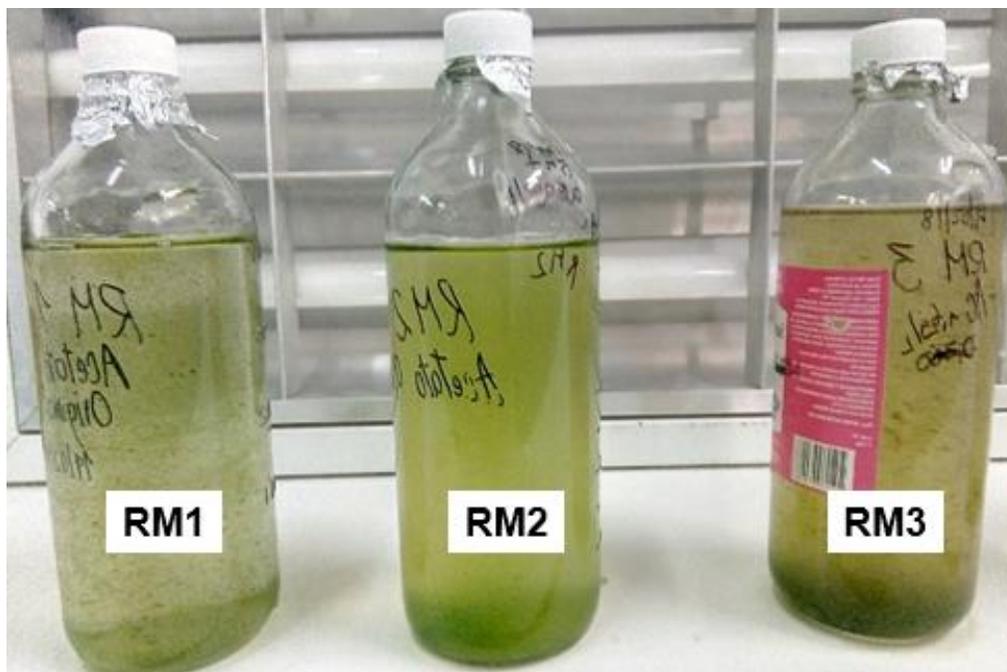
Los tratamientos se identifican en la tabla 6

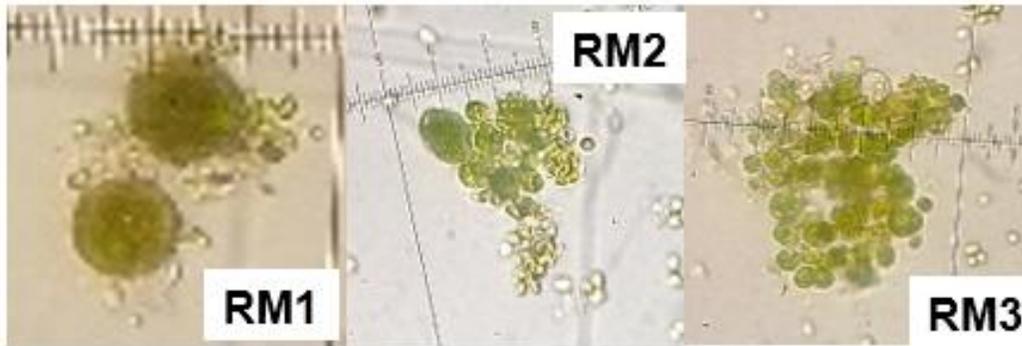
En las siguientes fotografías se observan las dos fases por las que atraviesa la microalga *H. pluvialis*: fase vegetativa y fase roja debido a la combinación de factores de estrés como acetato de sodio, cloruro de sodio y luz a los que se sometió la microalga. En la Fig. 12 Día 1 se logra observar los macrozoides, ya que aún no están siendo afectados por el estrés salino. Posteriormente se observa células albinas que pueden ser debidas al impacto que tuvo las concentraciones de acetato de sodio en las células como se observa en la Fig. 13 Día 7, es probable que el tratamiento RM1 no haya pasado por células albinas porque no sufrió un estrés salino.

En la Fig. 14 Día 15 predomina la forma Palmella en forma vegetativa, la cual es un indicativo de que la microalga se está adaptando a las condiciones del medio donde se logra observar algunos cloroplastos. Después la microalga pasa a la fase roja donde se observa célula enquistada donde se observa la transición de fases vegetativa a roja como en la Fig. 16 Día 28 en el medio RM3 y finalmente aplanosporas siendo la forma en la que se acumulan grandes cantidades de astaxantina siendo el medio RM3 donde predomina esta forma como se ve desde la Fig. 16 Día 28 hasta la Fig. 19 Día 56 tanto microscópicamente como macroscópicamente.

A continuación, se presentan la morfología de los tratamientos realizados:

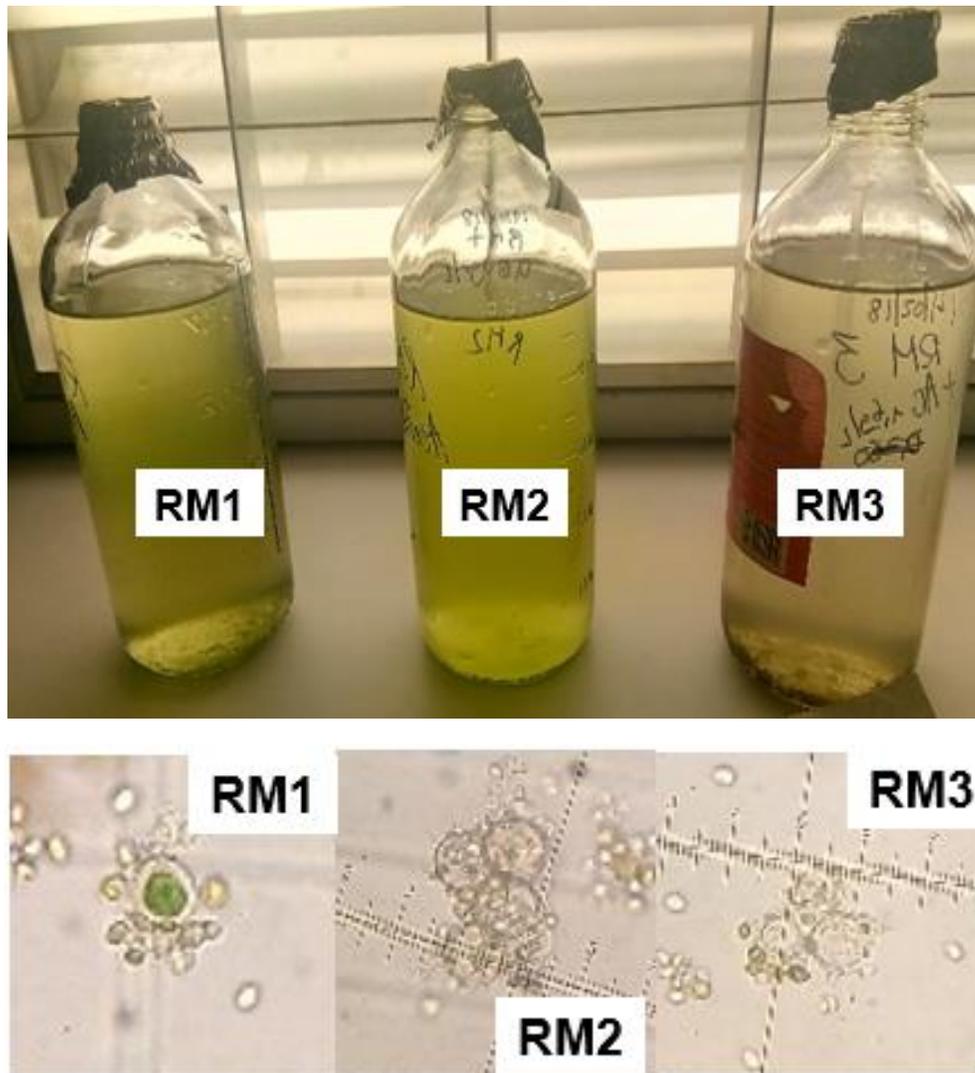
Fig. 12 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Día 1





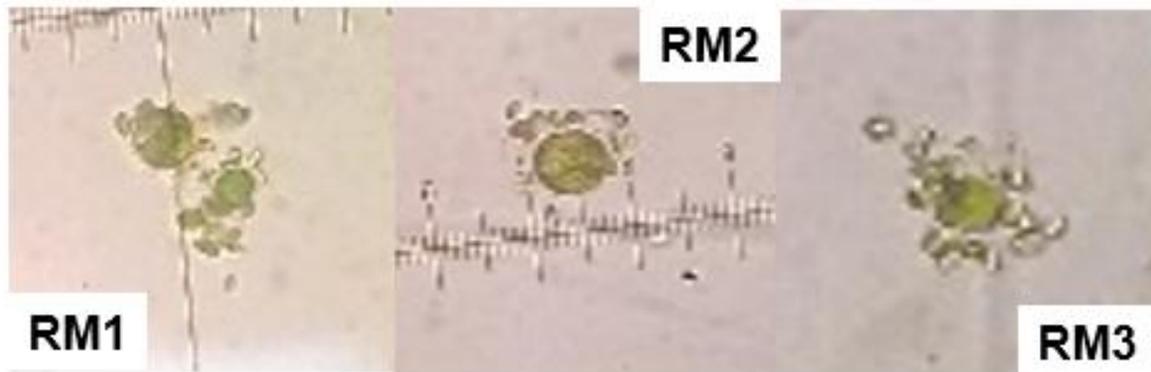
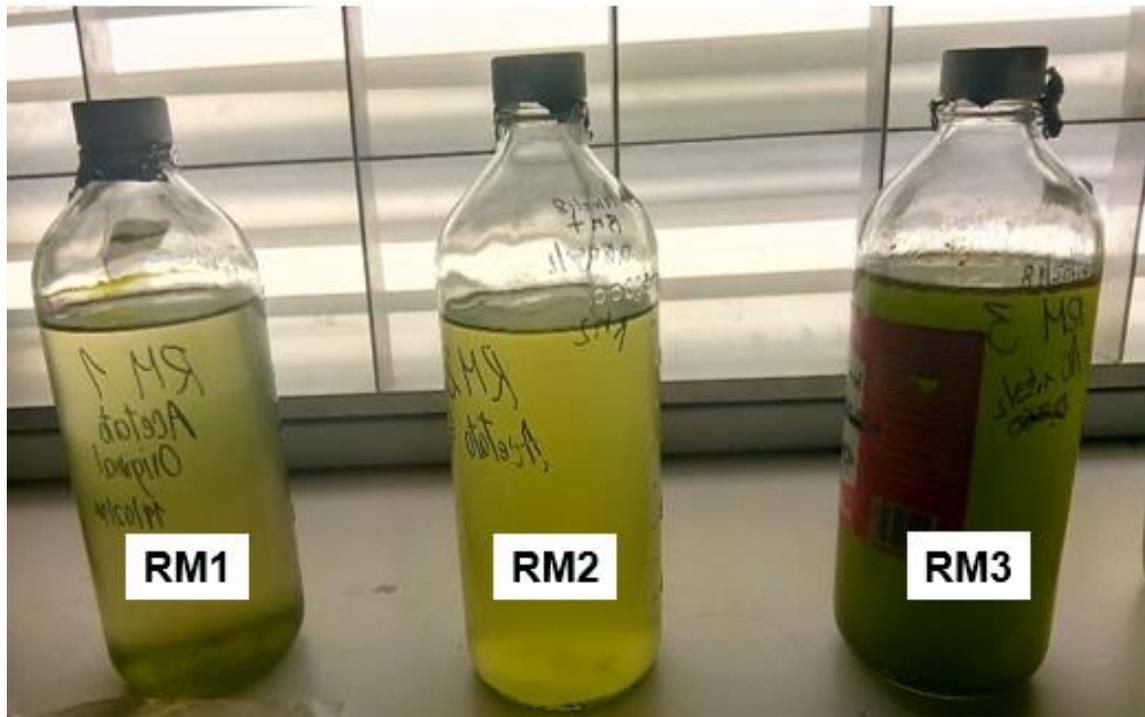
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 13 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Dia 7



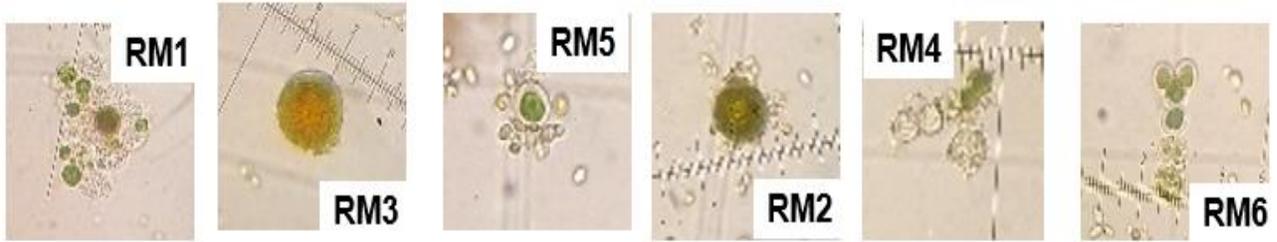
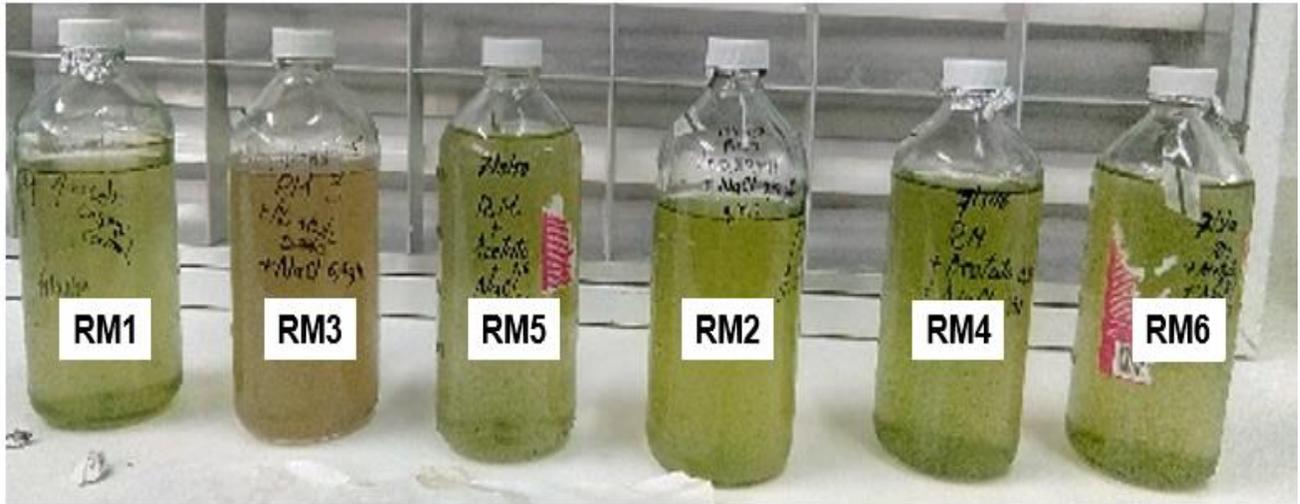
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 14 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2 Y RM3 Dia 15



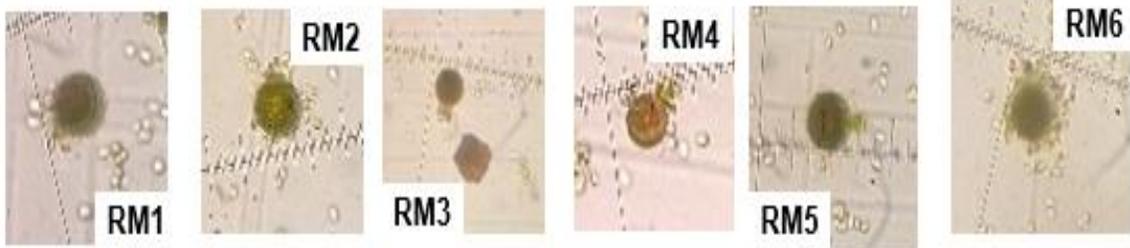
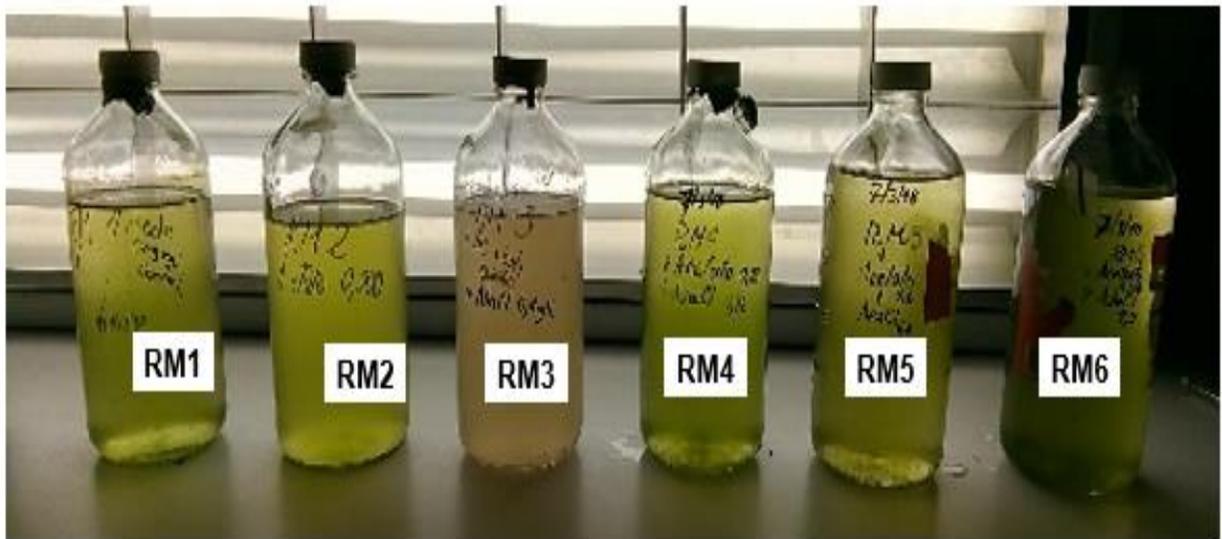
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 15 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 26



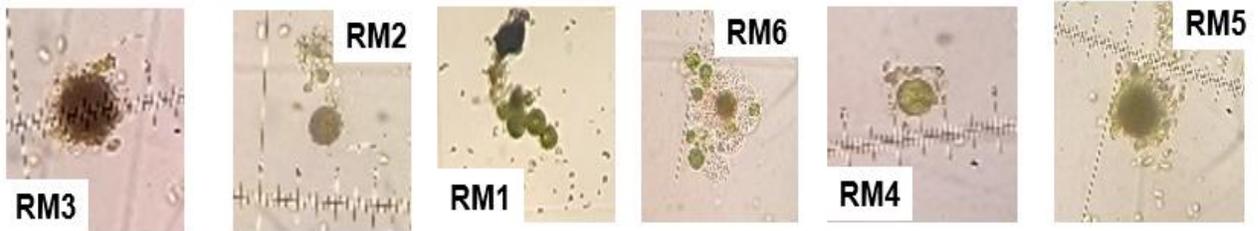
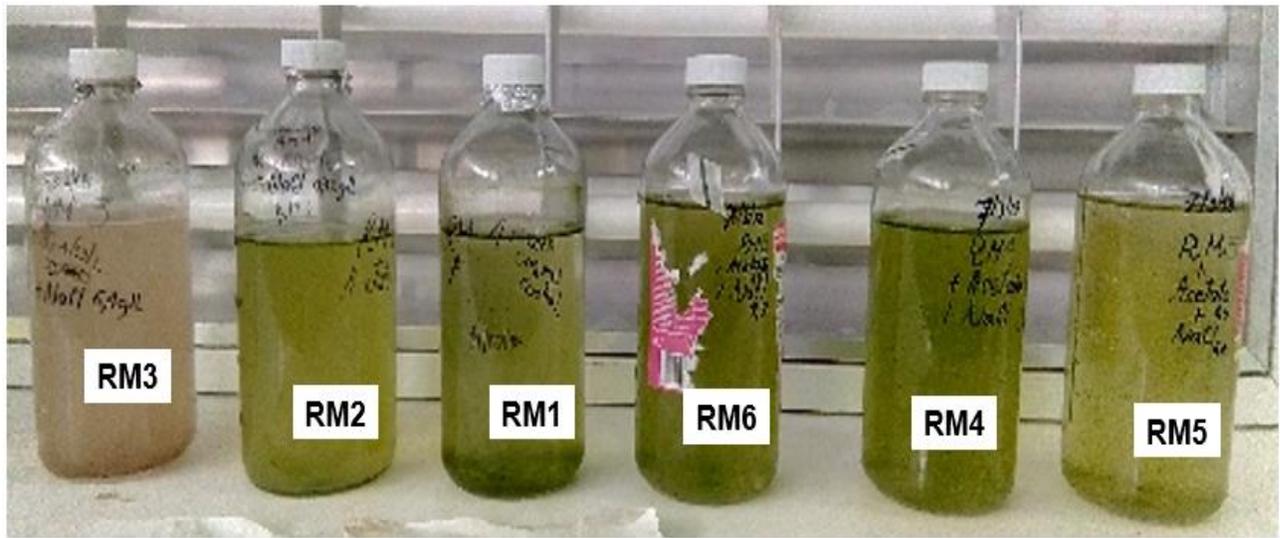
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 16 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 28



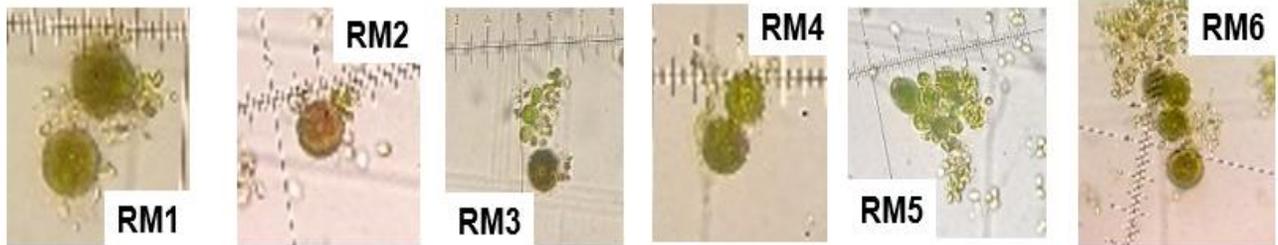
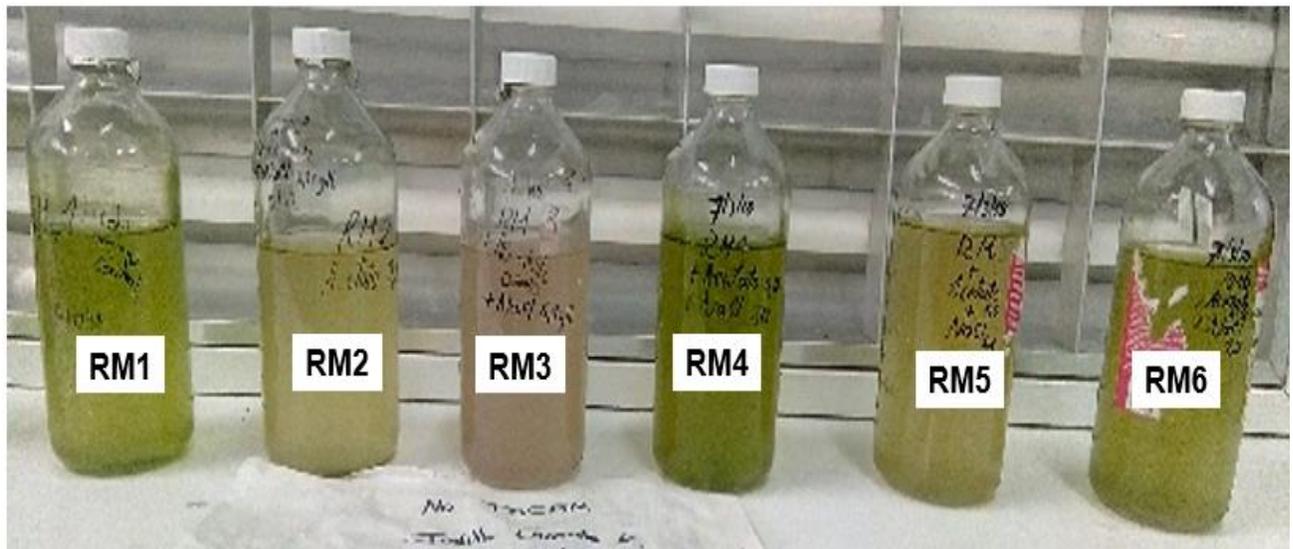
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 17 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 35



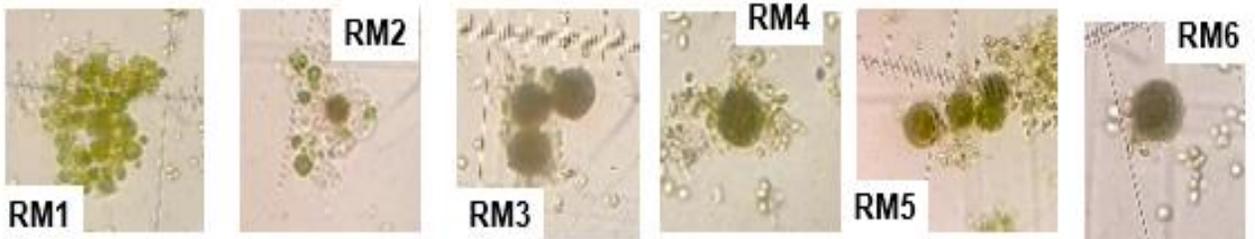
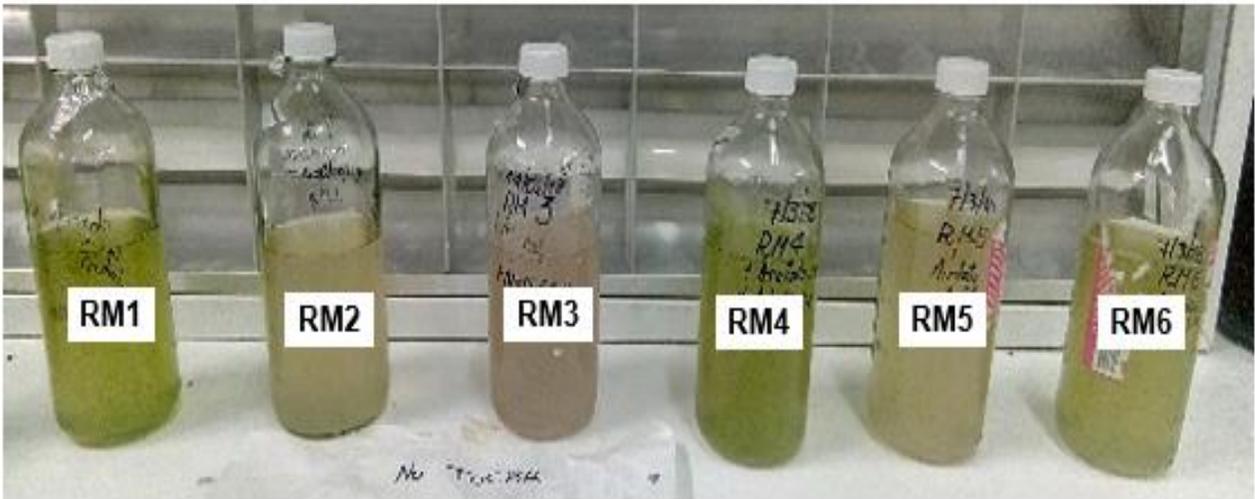
Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 18 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 49



Fotografía tomada por la autora (2018)

Fig. 19 Cultivo *H. pluvialis* Tratamientos RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 Y RM6 Dia 56

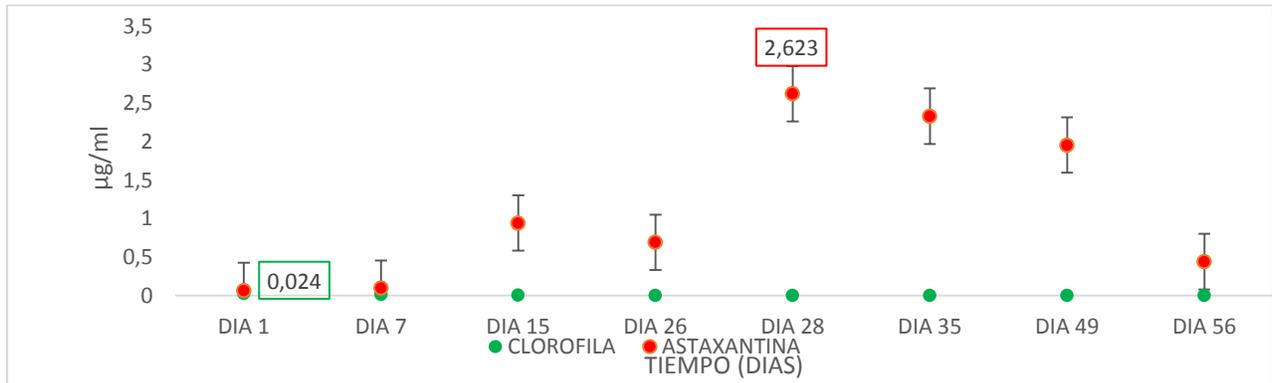


Fotografía tomada por la autora (2018)

4.3 Fase 3 Cuantificación de astaxantina y clorofila producidas durante el periodo de estudio

Los tratamientos se identifican en la tabla 4.1

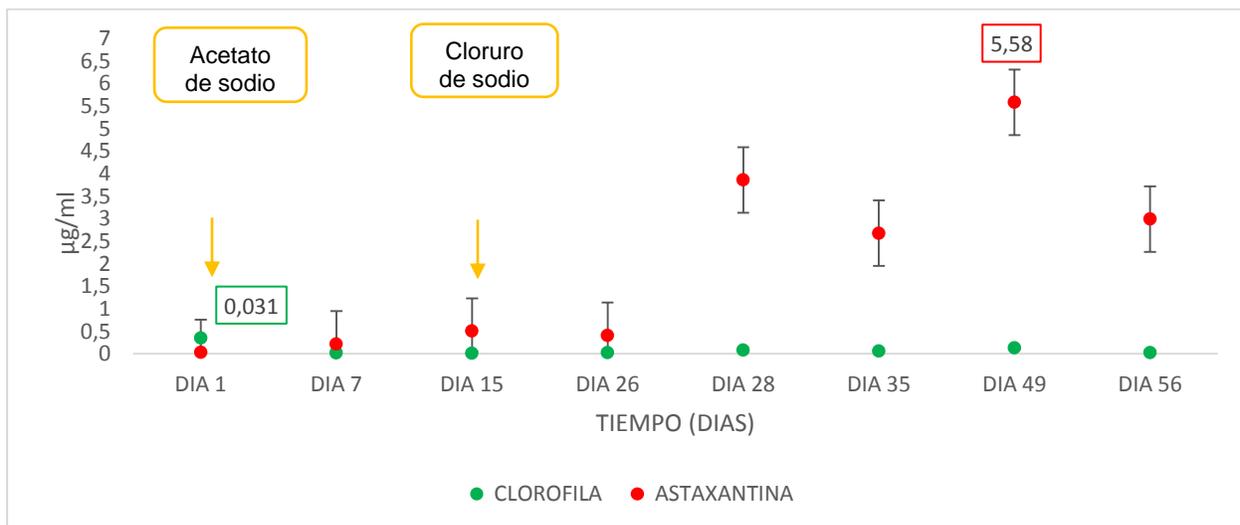
Fig. 20 RM1 Control astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la Fig. 20 se presenta las concentraciones de astaxantina y clorofila del medio RM1 siendo este el control en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 2,623 µg/ml y ocurrió el día 28 sin haberse sometido a estrés salino, solamente estrés por iluminación con lámparas fluorescentes, esto se correlaciona con la caracterización morfológica donde en la Fig. 4.2-5 se observa las células enquistada.

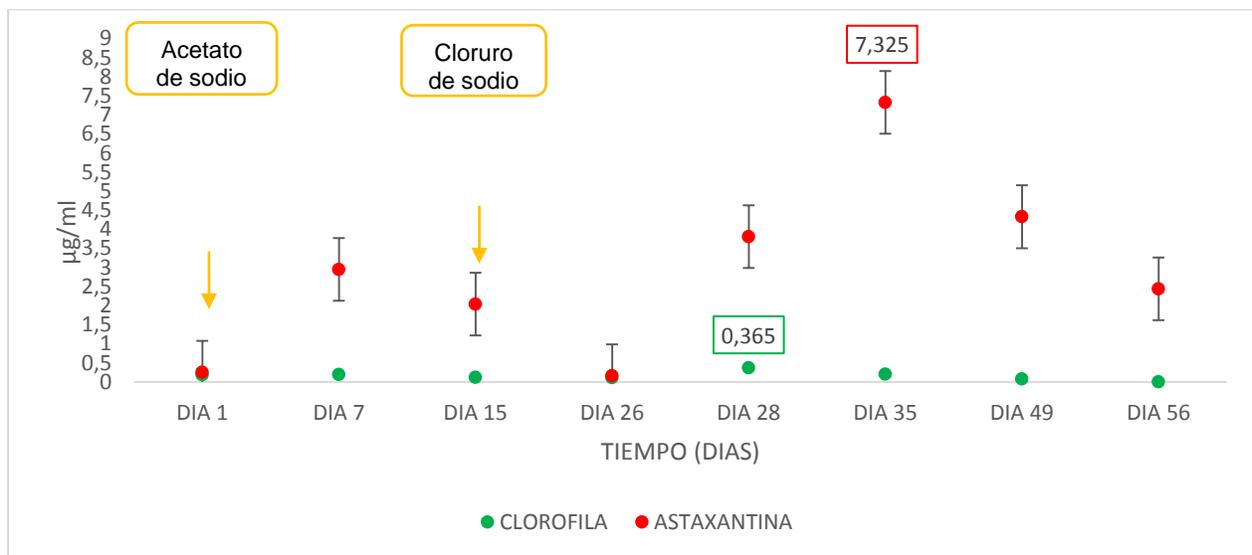
Fig. 21 RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 21 se muestran las concentraciones de astaxantina y clorofila del medio RM2 que fue estresado con acetato de sodio 0,18 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionó el día 15 del estudio con irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 20h luz/4h oscuridad, en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 5,58 $\mu\text{g/ml}$ y ocurrió el día 49, asumiendo que gracias al efecto sinérgico de las sales se logró esta concentración del carotenoide, además de que macroscópicamente se logra ver el cambio de color y microscópicamente se observa la aplanospora en la Fig. 4.2-7.

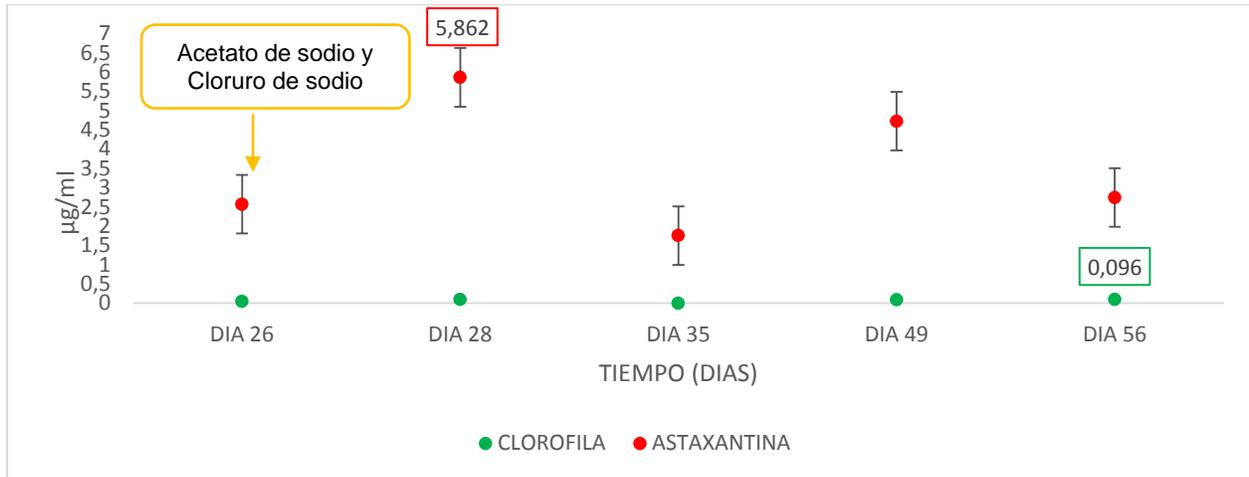
Fig. 22 RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 22 se presenta las concentraciones de astaxantina y clorofila del tratamiento RM3 que fue estresado con acetato de sodio 1,6 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionó el día 15 del estudio con irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 20h luz/4h oscuridad, en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 7,325 $\mu\text{g/ml}$ y ocurrió el día 35 como se observa en la Fig. 4.2-6, gracias a la combinación de la luz y las dos sales utilizadas. Este fue el tratamiento que logra la mayor concentración del carotenoide, que es coherente con las figuras mostradas anteriormente ya que fue el primer medio en el que macroscópicamente se observó un cambio de color y también el medio en el que se observaron mayor cantidad de aplanosporas a lo largo de los 56 días de estudio.

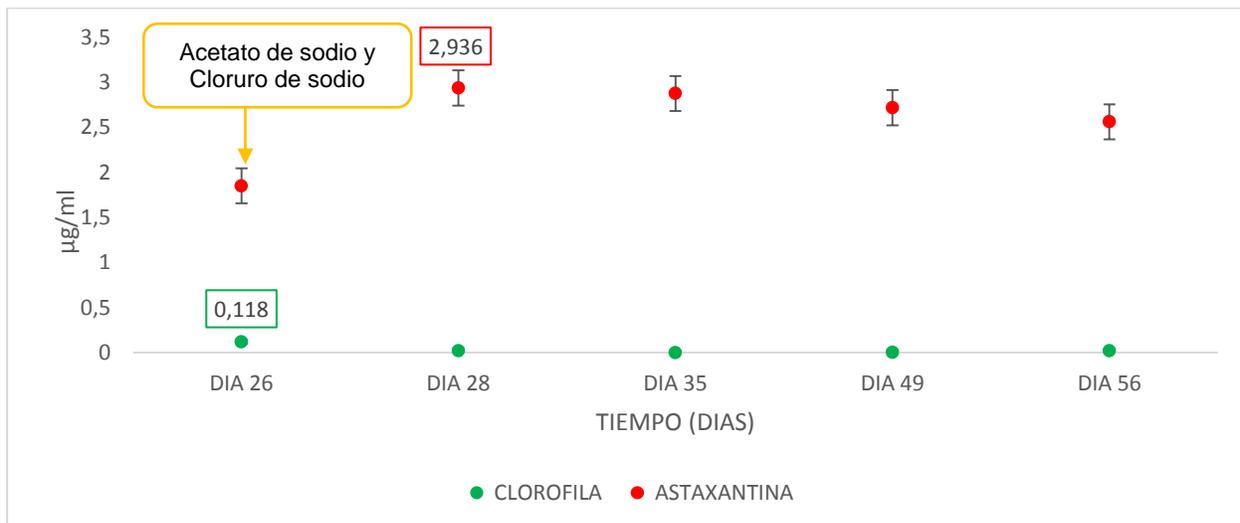
Fig. 23 RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 23 se muestran las concentraciones de astaxantina y clorofila del tratamiento RM4 que durante 15 días estuvo creciendo con irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16h luz/8h oscuridad y fue estresado con acetato de sodio 0,18 g/L y cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionaron el día 15 del estudio con irradianza 20h luz/4h oscuridad, en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 5,862 $\mu\text{g/ml}$ y ocurrió el día 28 como se observa en la Fig. 4.2-5.

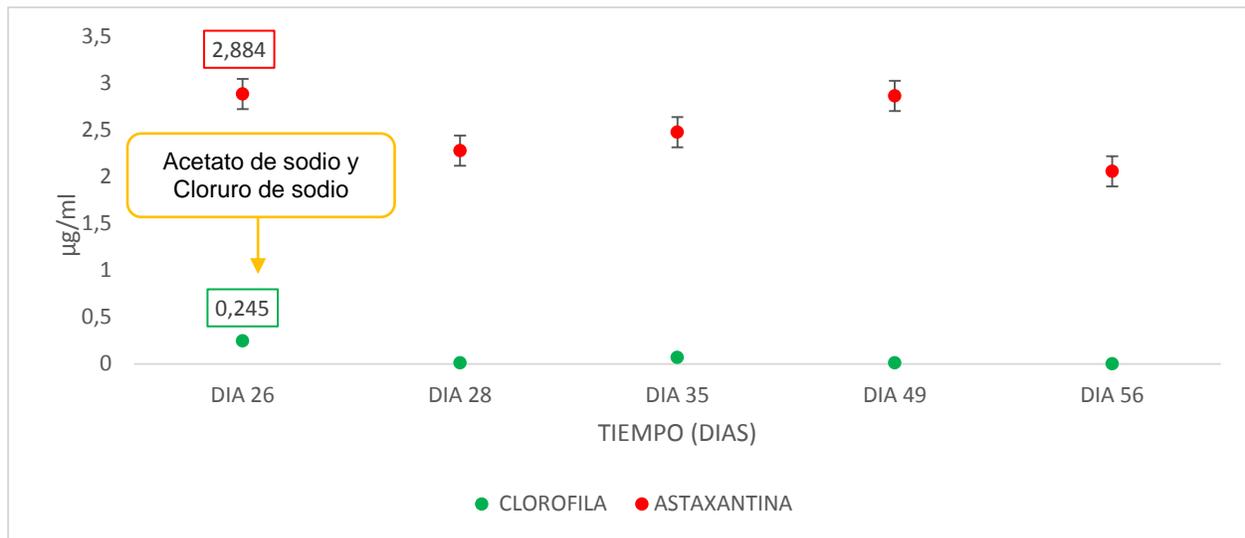
Fig. 24 RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 24 se presentan las concentraciones de astaxantina y clorofila del tratamiento RM5 que durante 15 días estuvo creciendo con irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16h luz/8h oscuridad y fue estresado con acetato de sodio 1,6 g/L y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionaron el día 15 del estudio con irradianza 20h luz/4h oscuridad, en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 2,936 $\mu\text{g/ml}$ y ocurrió el día 26 como se observa en la Fig. 4.2-4.

Fig. 25 RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L astaxantina y clorofila



Curva realizada por la autora (2018)

En la fig. 25 se observan las concentraciones de astaxantina y clorofila del tratamiento RM6 que durante 15 días estuvo creciendo con irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16h luz/8h oscuridad y fue estresado con acetato de sodio 0,320 g/L y cloruro de sodio 1,28 g/L que se adicionaron el día 15 del estudio con irradianza 20h luz/4h oscuridad, en el que se observa que la mayor producción de astaxantina fue 2,884 $\mu\text{g/ml}$ y ocurrió el día 26 como se observa en la Fig. 4.2-4.

Tabla 8 Tabla resumen de los tratamientos realizados

	Crecimiento celular máximo ($\times 10^5$ cel/ml)	Día de máximo crecimiento celular	P < 0,005	Concentración máxima de astaxantina ($\mu\text{g/ml}$)	Día de máxima concentración de astaxantina	P<0,005	Concentración máxima de clorofila ($\mu\text{g/ml}$)	P<0,005
RM1 Control	2,69	28	0,025	2,623	28	0,165	0,024	0,003
RM2	0,27	15		5,580	49		0,131	
RM3	0,42	35		7,325	35		0,365	
RM4	1,25	28		5,862	28		0,098	
RM5	1,16	15		2,936	28		0,118	
RM6	1,45	56		2,884	26		0,245	

ANOVA (95%) Diferencias significativas entre tratamientos $p < 0,005$

Tabla realizada por la autora (2019)

Se realizó un análisis de varianza ANOVA (95%) del crecimiento celular para los seis tratamientos (RM1, RM2, RM3, RM4, RM5, RM6) del promedio de las réplicas, encontrando que para una confianza del 95% no hubo diferencias significativas estadísticamente [$F=22,47$; $p=0,025$; $gl=5$] entre los diferentes tratamientos evaluados, donde los tratamientos RM6 seguido por el RM4 fueron los que presentaron mayor crecimiento de $1,45 \times 10^5$ cel./ml y $1,25 \times 10^5$ cel./ml en comparación al RM1 el cual fue el control del ensayo que tuvo un crecimiento de $2,69 \times 10^5$ cel./ml.

Hubo diferencias significativas también entre tratamientos respecto al factor de la clorofila [$F=4,307$; $p=0,003$; $gl=5$], donde RM6 fue uno de los medios que presento mayor concentración de clorofila, lo cual se correlaciona con el crecimiento de la microalga porque al aumentar la biomasa incrementa el contenido de clorofila.

Al analizar los tratamientos realizados respecto a la astaxantina no hubo diferencias significativas [$F=1,687$; $p=0,165$; $gl=5$], sin embargo al observar el tratamiento RM3 se observó que se obtuvo la mayor concentración de astaxantina de 7,325 microgramos/ml donde se usó una concentración de acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio del estudio y cloruro de sodio de 6,4 g/L que se agregó el día 15 del estudio, indicando que este es el tratamiento ideal para obtener una buena producción de astaxantina.

5. DISCUSIÓN

En las curvas de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* se puede observar que la fase exponencial en los seis medios de cultivo se presentó en diferentes días del estudio, dependiendo de la adición de las sales. El medio RM3 fue el primer medio en alcanzar la fase exponencial en el día 5 en comparación con RM1 siendo este el control en los 56 días de estudio.

El primer factor de estrés que se tuvo en cuenta en este estudio fue la exposición a luz alta con irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, siendo este el método más común para estresar la microalga y generar la producción de astaxantina como se había mencionado anteriormente este carotenoide se sintetiza a partir de β -caroteno como un precursor en una reacción catalizada por β -caroteno cetolasa, este β -caroteno se exporta desde el cloroplasto al retículo endoplásmico donde se convierte en astaxantina, después en ésteres de astaxantina, y finalmente forma gotas de lípidos que contienen éster de astaxantina. Shuhei *et. al.* (2018) demostró que cuando *H. pluvialis* fue estresado por luz alta, las gotas de lípido que contenían la astaxantina se movían desde el centro hasta la periferia a través de las vías en un cloroplasto. Estos investigadores también revelaron que la respuesta difería entre la astaxantina y la clorofila, ya que solo la astaxantina migraba libremente del centro a la periferia de la célula a través de un esférico y grande citoplasma que encapsula el cloroplasto como una gota de lípido. Y cuando las células regresaron a condiciones oscuras, las gotas de lípidos que contienen astaxantina vuelven a la periferia para exponer al cloroplasto y absorber luz eficientemente en condiciones normales, concluyendo así que este es el mecanismo de protección contra la luz de *H. pluvialis*.

La temperatura utilizada en esta investigación fue de 20 grados centígrados que es congruente con los resultados de Giannelli *et. al.* (2015) en el que la temperatura de 20 grados centígrados dio como resultado la concentración celular máxima 16.7×10^5 , si el objetivo es la mayor producción de biomasa, esta sería la temperatura óptima. Y similar a los resultados obtenidos por Fan *et. al.* (1994) quien determino que la temperatura óptima para el crecimiento del alga es entre 20°C y 28°C , a la cual la tasa de crecimiento específica fue de 0.054 h^{-1} y que a temperaturas más altas no se observa división celular.

El uso del medio de cultivo RM se realizó con base a los resultados obtenidos por Niño (2017) donde obtuvieron una concentración celular máxima de $7,55 \times 10^5$ células/ml en medio RM en comparación con otros medios como OHM y BBM cuando fue estresada la microalga con irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y de Imamoglu (2007) con una concentración celular máxima de $9,50 \times 10^5$ células/ml en medio RM con irradianza de $40 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; este medio favorece la productividad celular, la composición celular y el

rendimiento de productos específicos. Utilizando este medio en este estudio encontramos una concentración celular máxima de $2,69 \times 10^5$ células/ml en medio RM1, siendo este el control que solo contenía este medio y respecto a los tratamientos realizados la mayor fue en el medio RM6 de $1,45 \times 10^5$ células/ml y la menor en el medio RM2 de $0,27 \times 10^5$ células/ml en los 56 días del estudio. Estos resultados sugieren que el medio que provee los nutrientes adecuados para el crecimiento de *H. pluvialis* es el medio RM como lo han reportado los autores previamente mencionados.

En el presente estudio se observó que el mayor conteo celular aparte del control, fue de $1,45 \times 10^5$ células/ml, este conteo se obtuvo en el medio RM6 al cual se le adicionó 0,320 g/L de acetato de sodio y 1,28 g/L de cloruro de sodio en el día 56 del estudio con una irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, concluyendo que estas concentraciones de sales no logran el suficiente estrés para inhibir por completo el crecimiento celular, siendo congruente con los resultados de Orosa *et. al.* (2005) donde concluyeron que las tasas de crecimiento se incrementaban a concentraciones más bajas de 2,5 g/l con respecto a los cultivos de control sin acetato de sodio donde se obtuvo 11×10^5 cels/ml a los 15 días de estudio con irradianza de $68,25 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con la investigación de Cifuentes *et. al.* (2003) que obtuvo a una concentración de 8 g/l de cloruro de sodio un crecimiento celular de $0,78 \times 10^5$ cels/ml a los 11 días del estudio con una irradianza de $85 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y de Harker *et. al.* (1995) quien al someter la microalga a una concentración de cloruro de sodio de 2,31 mg/l, 4,05 mg/l y 5,79 mg/l obtuvo un recuento celular de $1,3 \times 10^5$ cels/ml, $1,2 \times 10^5$ cels/ml y $0,5 \times 10^5$ cels/ml respectivamente a los 30 días del estudio, concluyendo que, al aumentar la salinidad, también aumenta la mortalidad celular.

Siendo congruente con los resultados obtenidos por Sarada *et. al.* (2002) quienes concluyeron que la edad del cultivo era un factor crucial para desencadenar la producción de astaxantina en cultivos inducidos por estrés salino, es decir que los cultivos jóvenes de cuatro a ocho días presentaban una sensibilidad mayor que aquellos que eran antiguos de 12 a 16 días fueron más resistentes a la adición del cloruro de sodio junto con acetato de sodio y acumularon más astaxantina después de un tiempo de incubación de 20 días. Como fue el caso del medio RM6 que tuvo un tiempo de 15 días para crecer sin ningún estrés salino y produjo un crecimiento celular máximo en comparación con los otros tratamientos, ya que en RM6 la microalga estuvo creciendo 15 días sin ningún tipo de estrés salino en el medio RM solamente iluminación con lámparas blancas hasta que finalizó la fase exponencial de crecimiento de *H. pluvialis* y posteriormente se adicionó acetato de sodio 0,320 g/L y cloruro de sodio 1,28 g/L en el día 15 del estudio.

Resultados similares obtuvo Goksan *et. al.* (2010) cuando estreso la microalga con irradianza de $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y acetato de sodio (1 g/l), en esta investigación querían comparar si se debía añadir esta sal combinado con los nutrientes orgánicos al

comienzo del cultivo como en la mixotrofia tradicional (TM), o al final de la fase logarítmica o exponencial en modo fotótrofo como en la mixotrofia alternativa (AM). El equipo concluyo que el peso seco (DW), los pigmentos y especialmente el número de células en la mixotrofia alternativa (AM) fueron más altos que la mixotrofia (TM) tradicional. El número de células en AM casi se duplicó de 21.7 desde el momento en el que se agregó el acetato de sodio que fue finalizando la fase logarítmica hasta $4,29 \times 10^5$ células mL^{-1} durante 5 días de exposición a acetato de sodio, mientras que el número de células en TM fue de $2,45 \times 10^4$ células mL^{-1} teniendo en cuenta que el acetato de sodio había sido agregado desde el inicio del estudio. Respecto a el ensayo realizado los medios RM1, RM2 Y RM3 correspondería a la mixotrofia tradicional y los medios RM4, RM5 Y RM6 corresponderían a la mixotrofia alternativa, se obtuvo resultados similares ya que el medio RM6 fue el que mayor número de células presento con un crecimiento máximo de $1,45 \times 10^5$ células/ml. Eso quiere decir que es más eficiente agregar el acetato de sodio de una forma mixotrofica alternativa si el objetivo es obtener el máximo recuento posible de la microalga, ya que así se puede minimizar el riesgo de contaminación y posible muerte debido a la menor exposición de las células a las fuentes de carbono orgánico.

El tratamiento estadístico estableció que en el crecimiento de la microalga se presentaron diferencias significativas entre tratamientos respecto a las concentraciones de sales [$F=22,47$; $p=0,025$; $gl=5$]

Al observar macroscópicamente los diferentes tratamientos se observa un cambio de color rojizo en el medio RM3 desde el día 1 y medios RM2, RM5 y RM6 en el día 24 del estudio que son congruentes con la observación microscópica realizada para analizar la evolución de la morfología de la microalga mediante su proceso de fabricación de carotenoide observándose la formación de formas enquistadas aplanosporas correlacionado con la producción de astaxantina por efecto de la combinación del estrés salino y el ciclo de 20h luz/4h oscuridad y la irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los resultados obtenidos son congruentes con los conseguidos por Hoang *et. al.* (2011) que en su estudio del ciclo de vida de 50 días concluyo que la microalga pasa por cuatro etapas celulares: células vegetativas de 0 a 10 días, células enquistadas de 10-40 días, células maduras de 40-50 días y células en germinación de 2 días. Cada etapa de célula algal podría distinguirse entre sí por el perfil de pigmentos y el contenido de clorofila. Durante el ciclo de vida de las algas, las células vegetativas contenían altos niveles de clorofila y proteína, pero tenían un contenido de carotenoides muy bajo, mientras que la maduración de las células del quiste fue acompañada por una biosíntesis de astaxantina y una degradación de clorofila acelerada. Los contenidos de clorofila y astaxantina tienden a aumentar lentamente en los primeros 20 días de cultivo y luego aumentan rápidamente. Después de 40 días de cultivo, el contenido de clorofila disminuyó, mientras que el contenido de astaxantina sigue aumentando y alcanzó su

máximo después de 50 días de cultivo. En la presente investigación los tratamientos se estudiaron por 56 días, en el caso del tratamiento RM3 se observa las células vegetativas de 0 a 26 días y las células enquistadas de 26 a 49 días (Ver Figs. 12 -19), clorofila y astaxantina aumentaron hasta los 15 días, a los 28 días empezó a disminuir la clorofila y la astaxantina incremento alcanzando la mayor concentración a los 35 días. (Ver Figs. 20-25)

Siendo estos resultados congruentes con el estudio de Su *et. al.* (2014) donde al estresar la microalga con una alta intensidad de luz de $150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y acetato de sodio lograron evidenciar que a los dos días las células se volvían ligeramente rojizas indicando la transición a aplanospora y también con las conclusiones de Jeon *et. al.* (2006) en las que estableció que al observar directamente la morfología celular indico que la célula tendía a cambiar de la etapa vegetativa a la quística con mayor rapidez bajo un alto nivel de acetato, la microalga no puede someterse a más de 4,125 g/l porque las células se verían descoloridas y morían finalmente; cuando se sometieron a 2,475 g/l de acetato, las células mantuvieron su etapa vegetativa bajo una baja intensidad de luz. Por lo que en el actual estudio se utilizó una concentración de acetato de sodio menor a la mencionada anteriormente, ya que se sometió a una alta intensidad de luz con irradianza de $80\text{-}120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el objetivo era promover el crecimiento celular y la producción de astaxantina. Estos resultados también son congruentes con el estudio de Harker *et. al.* (1996) donde a una concentración de 2,3 g/l de cloruro de sodio se loro evidenciar que en el momento en el que se le adiciona esta sal el número de células disminuyo, pero se formaron aplanosporas con un aumento de tamaño y contenido de astaxantina, eso quiere decir que la adición de cloruro de sodio sirve para acelerar la transición natural a la etapa roja del ciclo de la microalga y la posterior síntesis de astaxantina.

El contenido de astaxantina se logra evidenciar un aumento simultaneo con una disminución de la concentración de clorofila congruente con los resultados obtenidos de Vidyhavati *et. al.* (2008) donde en su experimento después de 9 días de estrés, el contenido total de clorofila en todos los tratamientos fue un 90% menor que el de las células móviles verdes al inicio.

En el estudio de Wayama *et. al.* en el 2013, se realizó una evaluación volumétrica, el resultado de estas imágenes 3D logro evidenciar que existían cambios drásticos en la transición entre la etapa verde y la etapa roja cuando se estreso con irradianza de $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En la etapa verde, los cloroplastos representaron el 41.7% del volumen total de células, mientras que el volumen total de astaxantina fue de 0.2% donde se observaron los cloroplastos altamente desarrollados en la periferia y pocos gránulos de astaxantina rodeando el núcleo. En la etapa roja, las gotas de aceite que contenían astaxantina predominaron con un 52% y el volumen total de cloroplastos disminuyo a 9.7% donde se observaron gotas de aceite grandes en toda la célula, los cloroplastos

estaban altamente degenerados y localizados en el espacio intermedio entre las gotas de aceite, que les daba una apariencia de red. Es importante aclarar que los cloroplastos no desaparecieron completamente, esto puede deberse a serán utilizados en una recuperación rápida cuando las condiciones ambientales se reestablezcan y la descomposición de clorofila ha sido inducida por la deficiencia de nutrientes. Según la investigación de He *et. al.* (2018) evaluaron el transcriptoma de células expuestas a acetato 2 mg/l y luz alta con irradianza $195 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, concluyendo que el acetato a comparación de los demás tratamientos afectaba la fotosíntesis y sus proteínas de antena. Las proteínas de antena se encuentran en los complejos proteicos de la clorofila, representan un ayuda en la recolección de luz y funcionan como un sistema de antenas periféricas. Los resultados evidenciaron que todos los genes relacionados con las proteínas de antena de fotosíntesis estaban regulados negativamente (LHCA light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein). Lo que nos confirma que la cantidad de clorofila disminuirá proporcionalmente a la astaxantina.

Existen diferencias significativas entre tratamientos realizados respecto al factor de la clorofila [$F=4,307$; $p=0,003$; $gl=5$], ya que el tratamiento donde se presentó una mayor concentración de clorofila de 0,245 microgramos/L fue en el medio RM6 y la menor en el medio RM2 de 0,024 microgramos/L en los 56 días de estudio, lo cual se correlaciona con el crecimiento de la microalga porque al aumentar la biomasa incrementa el contenido de clorofila.

Según los resultados de este proyecto de investigación se observa que el medio RM3 al cual se le adicionó 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio combinada con luz de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ presentó la mayor producción de astaxantina con una concentración de 7,3 microgramos/L, congruente con los resultados de Sarada *et. al.* (2002) quien utilizó una concentración de 5 mg/l cloruro de sodio y 0,18 g/l de acetato de sodio y obtuvo 11 microgramos/L de astaxantina. También los resultados de Cifuentes *et. al.* (2003) donde concluyo que las concentraciones de cloruro de sodio de 8 g/L en combinación con alta irradianza de $85 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aumentaron el contenido de astaxantina a 0,492 microgramos/ml en el día 11 del estudio y junto con las conclusiones de Pan-Utai *et. al.* (2017) cuando sometió la microalga a 0,825 g/l de acetato y obtuvo una concentración de 8,4 microgramos/ml de astaxantina en el día 24 tras someterla a un estrés salino y con irradianza de $104 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un ciclo de luz/oscuridad 16/8 h.

Vidyhavati *et. al.* (2008) desarrollo un ensayo en el que utilizó tres tratamientos diferentes: 0,99 g/l de NaCl, 0,36 g/l de acetato de sodio y una combinación de 0,99 g/l de NaCl con 0,36 g/l de acetato de sodio, todos estos tratamientos sometidos a irradianza alta en ciclo de 16/8 horas donde se obtuvo la mayor producción de astaxantina en el tratamiento en el que se combinó las dos sales con $25 \text{ mg}^{-1} \text{ DW}$ en comparación con los demás tratamientos, evidenciando así el efecto sinérgico entre el

acetato de sodio y el cloruro de sodio. Según el análisis de expresión de genes relacionados con la producción de carotenoides durante la inducción de estrés realizado por el autor anteriormente citado, nos dice que la adición de acetato de sodio y cloruro de sodio producen una transcripción temprana y regulación máxima positiva de genes como BKT (β -caroteno cetolasa) que se encarga de la transformación de zeaxantina a adonixantina y adonixantina a astaxantina, desde tres días de estrés hasta tres meses después. Siendo esta conclusión similar a la obtenida por Bangxiang *et. al.* (2018) quienes evaluaron el transcriptoma de células expuestas a 2 mg/l de acetato de sodio y luz alta y encontraron que *BKT* (beta-caroteno hidroxilasa) que actúa en la última etapa de síntesis de la astaxantina aumentó significativamente en comparación con el tratamiento de solo luz alta. Esto explicaría los resultados obtenidos en el estudio donde se observa una producción de astaxantina al someter la microalga a estrés salino. Y congruente con los resultados de Huang *et. al.* (2006) la identificación y expresión de los genes de *bkt*, al separar el producto de la PCR en gel de agarosa se logró concluir que aquellas células sometidas a acetato de sodio de 3,7 g/l se aumentaron las transcripciones acompañadas con una acumulación de astaxantina mayor de los tratamientos estudiados, el segundo tratamiento que obtuvo mayor número de transcripciones fue el sometido al cloruro de sodio de 5,8 g/l.

Resultados congruentes con Steinbrenner *et. al.* (2001) quien investigó la expresión de la fitoeno sintasa y la carotenoide hidroxilasa, dos enzimas clave en la biosíntesis de astaxantina, a nivel transcripcional. La aplicación de estrés ambiental resultó en un aumento de los niveles de ARNm en estado estable de ambos genes. La intensidad de luz alta condujo a un aumento transitorio en el ARNm de la carotenoide hidroxilasa seguido de una acumulación moderada de astaxantina. En contraste, el estrés salino en combinación con luz alta dio como resultado un aumento sostenido en ambas transcripciones, efecto que probablemente se present en los tratamientos realizados en esta investigación ya que se utilizaron estos dos factores de estrés.

Al analizar los tratamientos realizados respecto a la astaxantina no hubo diferencias significativas [$F=1,687$; $p=0,165$; $gl=5$] lo cual indica que con estos tratamientos se puede obtener astaxantina siendo el mejor tratamiento el RM3 donde se combinan los tres factores de estrés.

Según los resultados obtenidos se recomienda adicionar desde el inicio del cultivo el acetato de sodio para generar un estrés a la microalga y cuando este terminando su fase exponencial adicionar el cloruro de sodio para maximizar el estrés generado y la producción de astaxantina.

6. CONCLUSIONES

1. El recuento celular en los tratamientos realizados fue para el RM6 de $1,45 \times 10^5$ células/ml, RM4 de $1,25 \times 10^5$ células/ml, RM5 de $9,6 \times 10^4$ células/ml, RM3 de $4,2 \times 10^4$ células/ml y RM2 de $2,7 \times 10^4$ células/ml. El control RM1 presentó un crecimiento de $2,69 \times 10^5$ células/ml. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos [$F=22,47$; $p=0,025$; $gl=5$] siendo el mejor tratamiento el RM6, donde se utilizó acetato de sodio en una concentración de 0,320 g/L y cloruro de sodio en una concentración de 1,28 g/L que se adicionaron desde el día 15 del cultivo de la microalga (fin de su fase exponencial de crecimiento) combinado con iluminación con lámparas blancas con una irradianza de $78 \text{ E}^2 \text{ m}^2/\text{s}$ (65 lux) y un fotoperiodo de 20h luz/4h oscuridad.
2. El cambio morfológico observado presentó formas vegetativas de color verde que se iba convirtiendo en formas enquistadas y aplanosporas en los diferentes tratamientos donde se utilizó la combinación de los factores de estrés como cloruro de sodio, acetato de sodio y luz alta se concluyó que el tratamiento donde se observan más rápido y en mayor cantidad de estas formas es el medio RM3 desde el día 26 y en el que se observó menos fue en el medio RM1 correspondiente al control del estudio.
3. El tratamiento RM6 en el día 26 obtuvo la mayor concentración de clorofila de 0,245 microgramos/L, resultados obtenidos debido a la mezcla de diferentes factores de estrés acetato de sodio, cloruro de sodio y luz alta. Estadísticamente se observaron diferencias significativas entre los tratamientos [$F=4,307$; $p=0,003$; $gl=5$], lo cual se correlaciona con el crecimiento de la microalga, ya que en el tratamiento RM6 fue donde se presentó un mayor crecimiento.
4. En este estudio se comprobó que el uso de sales como acetato de sodio y cloruro de sodio combinados con luz alta $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en un ciclo 20h luz/4 h oscuridad estresaron la microalga y produjeron astaxantina durante el tiempo de

estudio. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre tratamientos [$F=1,687$; $p=0,165$; $gl=5$], obteniéndose de este carotenoide hasta 7,3 microgramos/L de astaxantina en el tratamiento donde se utilizaron las concentraciones de 1,6 g/L de acetato de sodio que se adiciono al principio del estudio combinado con luz alta $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 6,4 g/L de cloruro de sodio que se adiciono en el día 15 del estudio (RM3).

5. La combinación de acetato de sodio, cloruro de sodio, luz blanca y alta irradianza generaron estrés en el *H. pluvialis* lo cual se evidenció en el cambio morfológico y con la producción de astaxantina *obtenida en el estudio realizado posiblemente porque el uso de las sales como acetato de sodio y cloruro de sodio producen una transcripción temprana y regulación máxima positiva de genes como BKT (β -caroteno ketolasa) que se encarga de la transformación de zeaxantina a adonixantina y adonixantina a astaxantina y su combinación con la exposición a luz blanca y una alta irradianza impulsa la producción del carotenoide ya que las gotas de lípidos que contienen la astaxantina son el mecanismo de protección que tiene *H. pluvialis* contra la luz.*

RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar las condiciones establecidas en este estudio para obtener una mayor producción de astaxantina combinándolas con diferentes irradianzas de luz para determinar cuál es la más adecuada para obtener una mayor producción del carotenoide.
- Se recomienda hacer escalamiento del cultivo utilizando los factores de estrés que produjeron mayor cantidad del colorante astaxantina en este estudio.
- Se recomienda evaluar los genes que se expresan positivamente cuando la microalga es sometida a estrés salino.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ¹ He B, Hou L, Dong M, Shi J, Huang X, Ding Y, Cong X, Zhang F, Zhang X, Zang X. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. *Int J Mol Sci.* [internet] 2018;7(19) [consultado 2018 04 26]
- ² Pan-Utai W, Parakulksuksatid P, Phomkaivon N. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* [internet] 2017;12:152-158 [consultado 2018 04 26]
- ³ Suyono E, Aminina , Pradania L, Mu'avatuna U , Habibaa R , Ramdaniyaha , Fatihatur E. Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of Microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences.* [internet] 2015; 28:399 – 405 [consultado 2018 04 26]
- ⁴ Su Y, Wang J, Shi M, Niu X, Yu X, Gao L, Zhang X, Chen L, Zhang W. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Bioresour Technol.* [internet] 2014;170:522-529 [consultado 2018 04 26]
- ⁵ Goksan T, Ak I, Gokpinar S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *J Microbiol Biotechnol.* [internet] 2010;20(9):1276-82. [consultado 2018 04 26]
- ⁶ Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot.* [internet] 2008;59(6):1409-18 [consultado 2018 04 26]
- ⁷ Huang JC, Chen F, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol.* [internet] 2006;122(2):176-85 [consultado 2018 04 26]

- ⁸ Jeon Y, Cho C, Yun Y. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* [internet] 2006;39(3):490-495 [consultado 2018 04 26]
- ⁹ Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* [internet] 2005;96(3):373-8. [consultado 2018 04 26]
- ¹⁰ Wong Y, Ho Y, Ho K, Lai Y, Tsang P, Chow K, Yau Y, Choi M, Ho R. Effects of light intensity, illumination cycles on microalgae *Haematococcus pluvialis* for production of astaxanthin. *Journal of marine biology and aquaculture.* [internet] 2016;2(2):1-6. [consultado 2019 03 29]
- ¹¹ Wei D, Jing C, Zhao Y, Han B, Li T. Enhancing *Haematococcus pluvialis* biomass and aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation. *Bioresour Technol.* [internet] 2019; 285:121. [consultado 2019 06 09]
- ¹² Domínguez-Bocanegra AR, Guerrero Legarreta I, Martínez Jerónimo F, Tomasini Campocoso A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* [internet] 2004;92(2):209-14. [consultado 2018 04 26]
- ¹³ Feng L, Cai M, Li M, Huang X, Wang J. Accumulation of astaxanthin was improved by the nonmotile cells of *Haematococcus pluvialis*. *Biomed Res Int* [internet] 2019; 810:176. [consultado 2019 06 09]
- ¹⁴ Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res.* [internet] 2003;36(3-4):343-57. [consultado 2018 04 26]
- ¹⁵ Giannelli L, Yamada H, Katsuda T, Yamaji H. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and bioengineering* [internet] 2015;119(3):345-350 [consultado 2018 04 26]
- ¹⁶ Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar G. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [internet] 2002; 18:517–521 [consultado 2018 04 26]
- ¹⁷ Guedes C, Amaro H, Malcata F. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs* [internet] 2011;625-644. [consultado 2018 03 10]

- ¹⁸ Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci* [internet] 2016;7(531) [consultado 2018 02 01]
- ¹⁹ Cui H, Yu X, Wang Y, Cui Y, Li X. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics* [internet] 2013;8(457) [consultado 2019 06 08]
- ²⁰ Galasso C, Corinaldesi C, Sansone C. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants* [internet] 2017;6(4):96. [consultado 2018 02 01]
- ²¹ Gong M, Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechadv* [internet] 2016;34(8):1396-1412 [consultado 2018 02 01]
- ²² Davinelli S, Nielsen M, Scapagnini G. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients* [internet] 2018;10(4):522 [consultado 2018 07 31]
- ²³ Shuehi O, Morita A, Ohnuki S, Hirata A, Sekida S, Okuda K, Ohya Y, Kawano S. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci Rep* [internet] 2018;8:5617 [consultado 2018 07 31]
- ²⁴ Wayama M, Ota Shuhei, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One* [internet] 2013;8(1):e53618 [consultado 2018 07 31]
- ²⁵ Hoang D, Tam L, Thuy N, Hong D. A study on the changes of the cell morphology, contents of pigments and intracellular protein in the life cycle of the green microalgal *Haematococcus pluvialis* under laboratory condition. *Academia Journal of Biology*. [internet] 2011;33(1) [consultado 2018 07 31]
- ²⁶ Gwak Y, Hwang Y, Wang B, Kim M, Jeong J, Lee C, Hu Q, Han D, Jin E. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. *J. Exp. Bot.* [internet] 2014;65(15):4317-4334 [consultado 2018 07 31]
- ²⁷ Imamoglu E, Sukan FV. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *International journal of natural and engineering sciences* [internet] 2007; 1(3):5–9 [consultado 2018 08 04]

- ²⁸ Niño CM, Rodríguez FC, Díaz LE, Lancheros AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. NOVA. [internet] 2017;15(28) [consultado 2018 08 04]
- ²⁹ Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Plant Physiol.* [internet] 2008;165(17):1783-97 [consultado 2018 08 20]
- ³⁰ Christian D, Zhang J, Sawdown A, Pen C. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresour Technol* [internet] 2018; 256:548-551 [consultado 2018 08 20]
- ³¹ Sheng B, Fan F, Huang J, Bai W, Wang J, Li S, Li W, Wan M, Li Y. Investigation on models for light distribution of *Haematococcus pluvialis* during astaxanthin accumulation stage with an application case. *Algal research* [internet] 2018; 33:182-189 [consultado 2018 08 20]
- ³² Kim Z, Kim S, Lee H, Lee C. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* [internet] 2006; 39:414-419 [consultado 2018 08 20]
- ³³ Borowitzka M., Beardall J., Raven J. *The physiology of microalgae*. 1 ed. [internet]. Suiza: Springer-Verlag GmbH; 2016 [consultado 2018 08 23].
- ³⁴ Richmond A. *Handbook of microalgal Mass culture*. Segunda edición. Inglaterra: Wiley Balckwell; 2013.
- ³⁵ Jin H, Lao YM, Zhou J, Zhang HJ, Cai ZH. Simultaneous determination of 13 carotenoids by a simple C18 column-based ultra-high-pressure liquid chromatography method for carotenoid profiling in the astaxanthin-accumulating *Haematococcus pluvialis*. *J Chromatogr A.* [internet] 2017; 10:93-103 [consultado 2018 09 16]
- ³⁶ Steinbrenner J, Sandmann G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* [internet] 2006;72(12):7477-84 [consultado 2018 09 16]
- ³⁷ Arredondo B, Voltolina D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal.* [internet] 2014 [consultado 2018 09 16]

- ³⁸ Harker M, Tsavalos A, Young A. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J Ferment Bioeng.* [internet] 1996;82: 101-106 [consultado 2019 02 07]
- ³⁸ Harker M, Tsavalos A, Young A. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology.* [internet] 1995;55:207-241 [consultado 2019 02 07]
- ³⁹ Sarada R, Tripathi U, Ravishankar G. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry.* [internet] 2002;37:623–627 [consultado 2019 02 07]
- ⁴⁰ Gao F, Yang H, Li C, Pen Y, Lu M. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour technol.* [internet] 2019;282:118-224 [consultado 2019 06 09]
- ⁴¹ Wan M, Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y, Huang J, Wang J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol.* [internet] 2014;167:276-283 [consultado 2018 08 11]
- ⁴² Chojnacka K, Marquez F. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnol.* [internet] 2004;3(1):21-34 [consultado 2019 03 22]
- ⁴³ Wayne K, Reen S, Loke P, Jiun Y, Chuan T, Chang J. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* [internet] 2018;91:332–344 [consultado 2019 03 22]
- ⁴⁴ Li Q, Zhang L, Liu J. Comparative transcriptome analysis at seven time points during *Haematococcus pluvialis* motile cell growth and astaxanthin accumulation. *Aquaculture.* [internet] 2019;503:304-311 [consultado 2019 03 22]
- ⁴⁵ Zhang C, Liu J, Zhang L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology.* [internet] 2017;35(5):1205-1211 [consultado 2019 03 22]
- ⁴⁶ Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol.* [internet] 2010;22(3):253-263 [consultado 2019 03 22]

- ⁴⁷ Morais M, Silva B, Greque E, Vieira J. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Research International*. [internet] 2015;15 [consultado 2019 06 08]
- ⁴⁸ Gwozdz T, Dorey K. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Reino Unido: Academic Press;2017.
- ⁴⁹ Weston A, Brown P. *HPLC and CE Principles and Practice*. Estados Unidos: Academic Press;1997.
- ⁵⁰ Cai M, Li F. Recent advances in *Haematococcus pluvialis* scale culture technology. *Natural Science*. [internet] 2016;55(5):733-741 [consultado 2019 06 09]
- ⁵¹ Guerin M, Huntley M, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. [internet] 2003;21(5):210-216 [consultado 2019 03 28]
- ⁵² Gu W, Xie X, Gao S, Zhou W, Pan G, Wang G. Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLoS One*. [internet] 2013;8(7): e67028. [consultado 2019 03 28]
- ⁵³ Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. [internet] 2003;20(4):459-466 [consultado 2019 03 28]
- ⁵⁴ Higuera I, Valenzuela F, Goycoolea F. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. [internet] 2006;46(2):185-96. [consultado 2019 03 28]
- ⁵⁵ Chekanov K, Lukyanov A, Boussiba S, Aflalo C, Solovchenko A. Modulation of photosynthetic activity and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* cells during their conversion into haematocysts and back. *Photosynthesis Research*. [internet] 2016;128(3):313-323. [consultado 2019 03 28]
- ⁵⁶ Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays J. *Principals and technical aspects of PCR amplification*. Holanda: Springer;2008
- ⁵⁷ Shi J, Zang X, Cong X, Hou L, He B, Ding Y, Dong M, Sun D, Guo Y, Zhang F, Wang Z, Wei X, Zhang X, . Cloning of nitrite reductase gene from *Haematococcus pluvialis* and transcription and enzymatic activity analysis at different nitrate and phosphorus concentration. *Gene*. [internet] 2019;697:123-130. [consultado 2019 03 28]

- ⁵⁸ Tang Z, Zhu S, Fei L, Wei L, Xue S. Effects of Astaxanthin on Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis in Mice. *Biomed Res Int* [internet] 2017;25:932. [consultado 2019 06 09]
- ⁵⁹ Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. [internet] 1992;74(6):403-405. [consultado 2019 03 29]
- ⁶⁰ Hong M.-E., Hwang S. K., Chang W. S., Kim B. W., Lee J., Sim S. J. Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven Haber–Weiss reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [internet] 2015;99(12):5203–5215 [consultado 2019 06 09]
- ⁶¹ Wan M, Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y, Huang J, Wang J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol* [internet] 2014;167:276–283 [consultado 2019 06 09]
- ⁶² Nguyen K. Astaxanthin: a comparative case of synthetic VS Natural production. *Chemical and Biomolecular Engineering*. [internet] 2013. [consultado 2019 04 01]
- ⁶³ Capelli B, Bagchi D, Cysewski G . Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*. [internet] 2013;12(4):145-152. [consultado 2019 04 01]
- ⁶⁴ Bai J, Beena B, Shashirekha V. Nomenclature, Taxonomy, Reproduction and Life Cycle of the genus *Haematococcus*, *Haematococcaceae*, *Chlorophyceae*. *Phykos*. [internet] 2016;46(1):64-70. [consultado 2019 04 02]
- ⁶⁵ Peled E, Pick U, Zarka A, Shimoni E, Leu S, Boussiba S. Light-induced oil globule migration in *haematococcus pluvialis* (*chlorophyceae*). *J Phycol*. [internet] 2012;48(5):1209-1219. [consultado 2019 04 02]
- ⁶⁶ Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res*. [internet] 2010 Nov;106(1-2):155-77. [consultado 2019 04 02]
- ⁶⁷ Shen Y., Cai M. G., Huang S. Y., et al. *Haematococcus pluvialis* culture in photobioreactor. *Marine Sciences*. [internet] 2010;34(10):83–89 . [consultado 2019 06 09]

- ⁶⁸ Sun H., Liu B., Lu X., Cheng K.-W., Chen F. Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. [internet] 2017;233:326–331. [consultado 2019 06 09]
- ⁶⁹ Brinda BR, Sarada R, Kamath BS, Ravishankar GA. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects. *Curr Sci*. [internet] 2004;87:1290–1295 [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁰ Wang J., Han D., Sommerfeld M. R., Lu C., Hu Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. [internet] 2013;25(1):253–260 [consultado 2019 06 09]
- ⁷¹ Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) *Journal of Applied Phycology*. [internet] 2010;22(3):253–263 [consultado 2019 06 09]
- ⁷² Luo Q, Bian C, Tao M, Huang Y, Lv Y. Genome and Transcriptome Sequencing of the Astaxanthin-Producing Green Microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Genome Biol Evol.* [internet] 2019;11(1):166-173 [consultado 2019 06 09]
- ⁷³ Tufan M, Sayin S. The effects of iron and light intensity on biomass and pigment synthesis of *Haematococcus pluvialis* under laboratory conditions. *ICAMS*. [internet] 2014 [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁴ Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, Nagai S. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. [internet] 1992;74(1):61-63 [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁵ Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl Environ Microbiol*. [internet] 1993;59(3):867-73. [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁶ Kobayashi M, Kurimura Y, Kakizono T, Nishio N, Tsuji Y. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. [internet] 1997;84(1):94-97 [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁷ Li Y, Huang J, Sandmann G, Chen F. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. [internet] 2009;45(3) [consultado 2019 04 03]

- ⁷⁸ Meng CX, Teng CY, Jiang P, Qin S, Tseng C. Cloning and characterization of β -carotene ketolase gene promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Biochim Biophys Sinica* [internet] 2005; 37:270–275 [consultado 2019 04 03]
- ⁷⁹ Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. [internet] 2002;7(9):405-410 [consultado 2019 04 03]
- ⁸⁰ Olaizola M, Huntley ME. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Recent advances in marine biotechnology*. [internet] 2003;9:143–164
- ⁸¹ Orosa M, Valero J, Herrero C, Abalde J. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*. [internet] 2001;23(13):1079–1085 [consultado 2019 04 03]
- ⁸² Park EK, Lee CG. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *J Microbiol Biotechnol*. [internet] 2001; 11:1024–1030 [consultado 2019 04 03]
- ⁸³ Pelah D, Sintov A, Cohen E. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World J Microbiol Biotechnol*. [internet] 2004; 20:483–486 [consultado 2019 04 03]
- ⁸⁴ Qiu B, Li Y. Photosynthetic acclimation and photoprotective mechanism in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) during the accumulation of secondary carotenoids at elevated irradiation. *Phycologia*. [internet] 2006; 45:117–126 [consultado 2019 04 03]
- ⁸⁵ Khan Academy [internet] Estados Unidos; c2006. [consultado 2019 04 03]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-dependent-reactions>
- ⁸⁶ Saini RK, Keum Y. Progress in microbial carotenoids production. *Indian J Microbiol* [internet] 2017;57:129–130 [consultado 2019 06 09]
- ⁸⁷ Mascia F, Girolomoni L, Alcocer M, Bargigia I, Perozeni F, Cazzaniga S, Cerullo G. Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *Haematococcus pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. *Sci Rep*. [internet] 2017; 7: 16319. [consultado 2019 04 03]

- ⁸⁸ Bhosale P, Bernstein P. Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol.* . [internet] 2015;68:445–455 [consultado 2019 06 09]
- ⁸⁹ Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthetic genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol.* [internet] 2001; 125:810–817. [consultado 2019 04 03]
- ⁹⁰ Steinbrenner J, Linden H (2003) Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol Biol.* [internet] 2003; 52:343–356. [consultado 2019 04 03]
- ⁹¹ Tan S, Cunningham FX, Youmans M, Grabowski B, Sun Z, Gantt E. Cytochrome f loss in astaxanthin-accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes, and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells. *J Phycol.* [internet] 1995; 31:897–905. [consultado 2019 04 03]
- ⁹² Tran N-P, Park J-K, Lee C-G. Proteomic analysis of proteins in green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) expressed under combined stress of nitrogen starvation and high irradiance. *Enzyme Microb Technol.* [internet] 2009; 45:241–246 [consultado 2019 04 03]
- ⁹³ Vidhyavathi R, Sarada R, Rhavishankar GA. Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. *Enzyme Microb Technol.* [internet] 2009; 45:88–93 [consultado 2019 04 03]
- ⁹⁴ Wang Y, Peng J. Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World J Microbiol Biotechnol.* [internet] 2008; 24:1915–1922 [consultado 2019 04 03]
- ⁹⁵ Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process during high irradiance. *J Phycol.* [internet] 2008; 39:1116–1124 [consultado 2019 04 03]

ANEXOS

Anexo 1 Resultados curva de crecimiento

	RM1 control	RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L
DÍA 1	0,25	0,07	0,15	0,25	0,25	0,25
DÍA 7	0,44	0,11	0,10			
DÍA 15	0,45	0,27	0,13	1,16	1,16	1,16
DÍA 26	1,25	0,14	0,23	0,60	0,28	0,36
DÍA 28	2,69	0,05	0,26	1,25	0,02	0,70
DÍA 35	0,15	0,03	0,42	0,80	0,96	0,62
DÍA 49	0,32	0,13	0,18	0,58	0,50	1,42
DÍA 56	0,15	0,15	0,25	0,20	0,18	1,45

Anexo 2 Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferencias de concentraciones de sales en el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prueba bilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
	319,39767			2,926	0,025	2,477168
Entre grupos	9	5	63,8795357	78565	6436	67
Dentro de los grupos	785,73	36	21,8258333			
	1105,1276					
Total	8	41				

Anexo 3 Resultados cuantificación de clorofila

CLOROFILA						
	RM1 Control	RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L
DÍA 1	0,024	0,035	0,182			
DÍA 7	0,013	0,016	0,194			
DÍA 15	0,004	0,009	0,119			
DÍA 26	0,000	0,025	0,107	0,045	0,118	0,245
DÍA 28	0,000	0,083	0,365	0,098	0,021	0,010
DÍA 35	0,000	0,064	0,197	0,000	0,000	0,069
DÍA 49	0,000	0,131	0,075	0,092	0,003	0,009
DÍA 56	0,000	0,028	0,000	0,096	0,020	0,001

Anexo 4 Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferentes concentraciones de sales de la microalga *H. pluvialis* respecto a la concentración de clorofila

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prueba bilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,1006824	7	0,02013649	4,307	0,003	2,502635
Dentro de los grupos	0,1542754	3	0,00467501	25968	98612	01
Total	0,2549579	38				

Anexo 5 Resultados cuantificación de astaxantina

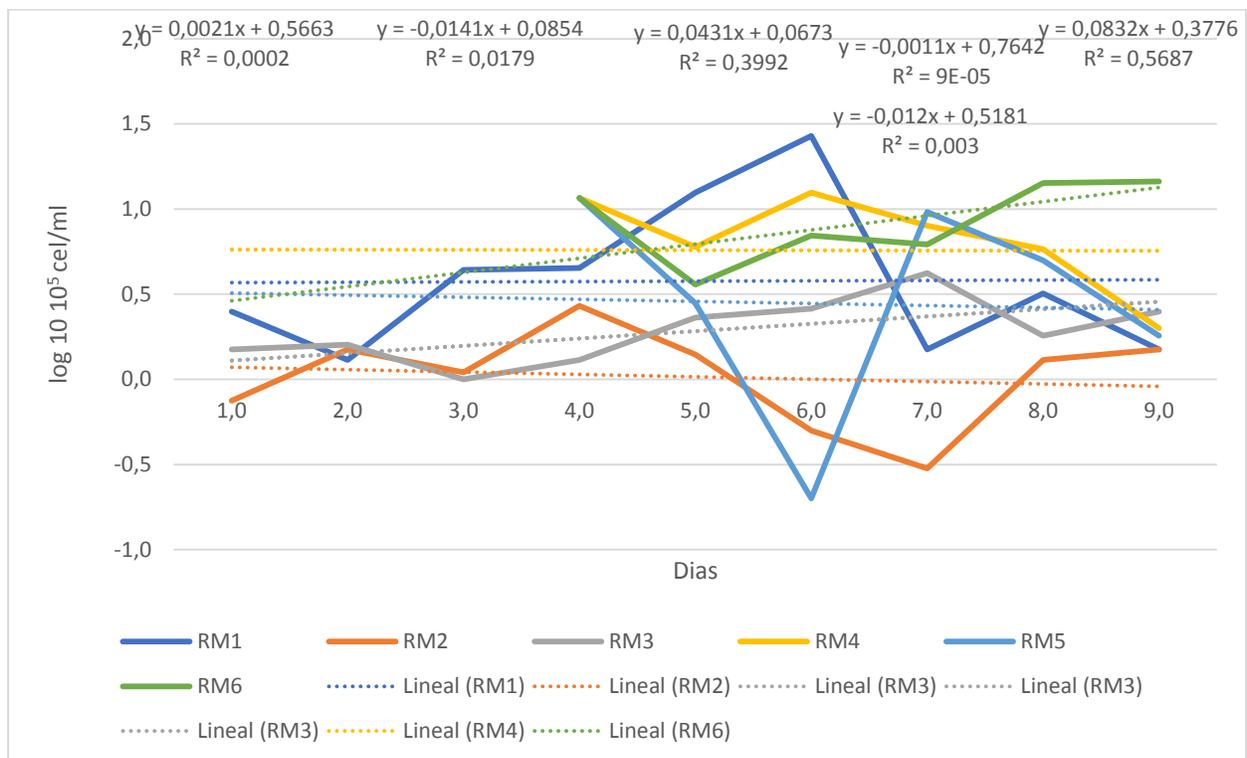
ASTAXANTINA						
	RM1 Control	RM2 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM4 Acetato de sodio 0,18 g/L + Cloruro de sodio 0,72 g/L	RM5 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L	RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L
DÍA 1	0,063	0,031	0,251			
DÍA 7	0,094	0,219	2,947			
DÍA 15	0,940	0,502	2,038			
DÍA 26	0,690	0,408	0,157	2,571	1,850	2,884
DÍA 28	2,623	3,856	3,804	5,862	2,936	2,278
DÍA 35	2,330	2,675	7,325	1,755	2,874	2,476
DÍA 49	1,954	5,580	4,326	4,723	2,717	2,863
DÍA 56	0,439	2,989	2,435	2,743	2,560	2,059

Anexo 6 Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de las diferentes concentraciones de sales de la microalga *H. pluvialis* respecto a la concentración de astaxantina

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Proba bilidad	Valor crítico para F
	22,383625			1,6873	0,165	2,502635
Entre grupos	9	5	4,47672519	6459	15503	01
Dentro de los grupos	87,551873	33	2,65308708			
Total	109,9355	38				

Anexo 7 Curvas ajustadas Log X vs Tiempo

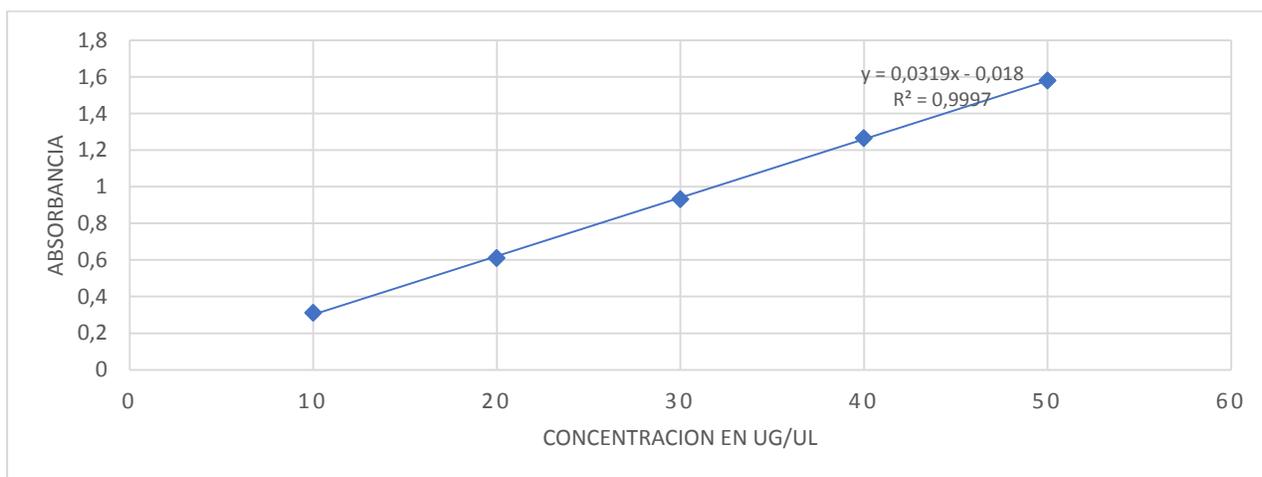


Anexo 8 Concentración y absorbancia calibración astaxantina

Concentración	Absorbancia
---------------	-------------

50	1,579
40	1,266
30	0,932
20	0,61
10	0,311

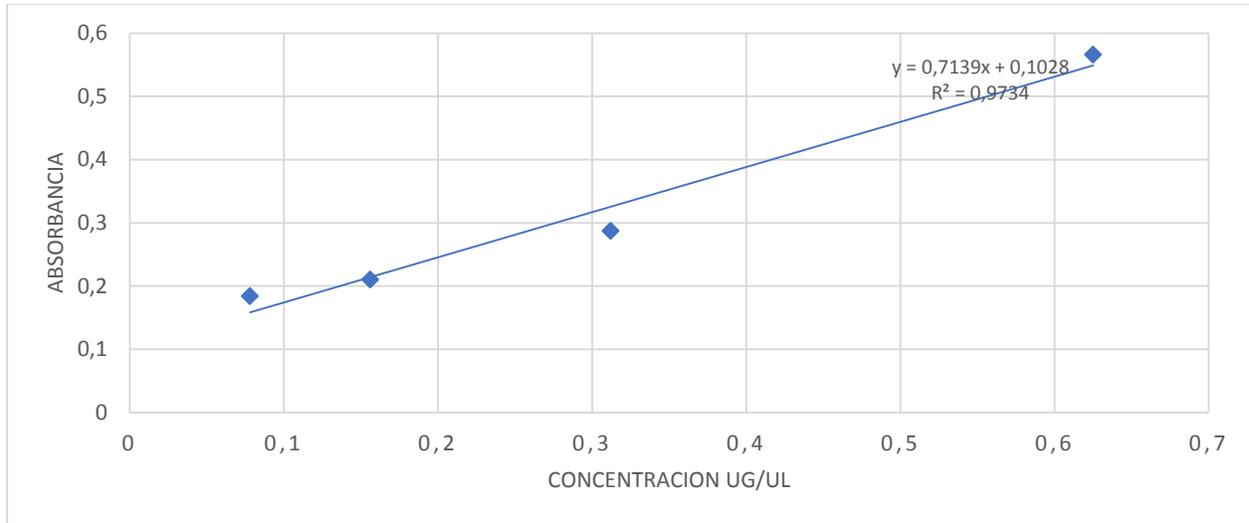
Anexo 9 Curva de calibración astaxantina



Anexo 10 Concentración y absorbancia calibración clorofila

Dilución	Concentración	Absorbancia
1;2	0,625	0,566
1;4	0,312	0,287
1;8	0,156	0,21
1;16	0,078	0,184
1;32	0,039	0,016

Anexo 11 Curva de calibración clorofila



AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

A la Dra Judith Elena Camacho Kurmen quien asesoro este trabajo de grado.

Al grupo Bioprocesos y control por los recursos para realizar la parte experimental.

A los jurados por tomarse el tiempo de leer mi trabajo de grado

Este trabajo se presentó en el IIV CONGRESO INTERNACIONAL Y VIII INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN – DESARROLLO RURAL Y SOSTENIBILIDAD DESDE LA INNOVACIÓN Y EL EMPRENDIMIENTO – UNIVERSIDAD AGRARIA. 26 de abril de 2019.

Y se presentó un poster y una presentación oral en idioma inglés en el SIMPOSIO INTERNACIONAL “APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE VANGUARDIA EN LA SALUD Y LA CIENCIA” – UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA. 24 de mayo de 2019, UCMC