



**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LA MICROALGA
Haematococcus pluvialis UTILIZANDO LOS MEDIOS DE CULTIVO
OHM Y KOBAYASHI EN EL BIORREACTOR TECFERM DE 5 LITROS**

**Trabajo de grado presentado para optar por el título de Bacterióloga y
laboratorista clínico**

Estudiante:

Ángela María Hernández Cortes

Asesora:

**Judith Elena Camacho Kurmen
Química Farmacéutica MSc, PhD**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C**

2019

BOGOTA D.C. 2019



**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LA MICROALGA
Haematococcus pluvialis UTILIZANDO LOS MEDIOS DE CULTIVO
OHM Y KOBAYASHI EN EL BIORREACTOR TECFERM DE 5 LITROS**

ANGELA MARÍA HERNÁNDEZ CORTES

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN QF, MSc, PhD.

ASESORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

INFORME FINAL

BOGOTA D.C 2019

DEDICATORIA

A Dios por que ha guiado mis pasos desde el inicio de mi carrera y con su amor me brindo la fortaleza para superar cada obstáculo que se presentó en mi camino y que hasta el día de hoy no me abandonado en ningún momento.

A mi madre, Gloria; quien sin saberlo me brindo la mejor de las herramientas para llegar lejos, la palabra. A mi hermano por su infinita bondad y a mi papá por su amor.

A mis amigos Carolina, Brian, Roberth, Sebastián y Camilo por enseñarme desde el colegio lo importante que es una buena amistad y demostrarme que con el paso de los años hacemos más fuerte nuestra unión.

A Jenny que desde pequeña me adopto como su hermana y hoy en día cumplimos con el sueño de ser amigas, hermanas y colegas.

A mis compañeros de la universidad que llenaron con sus risas y consejos cada día durante este proceso, gracias a aquellos que no me abandonaron y creyeron en mi ante las adversidades.

Y claro, a la vida por permitirme soñar tanto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecida con Dios por poner en mi camino esta profesión tan linda y llena de retos, por brindarme excelentes personas durante mi proceso y hacerme ver que en esta vida todo tiene una razón de ser.

Un agradecimiento a la profesora Judith Elena Camacho Kurmen por su compañía durante este proceso y la paciencia puesta en cada tropiezo, quedo infinitamente agradecida por ayudarme a cumplir con esta gran meta.

Al grupo de investigación Bioprocesos y control por dar los recursos para realizar el proyecto.

A la universidad Colegio mayor de Cundinamarca por hacer que cada día quiera dejar en alto el nombre de la institución y por todo el apoyo en mi investigación.

A todos los que me brindaron su compañía y apoyo durante toda mi carrera, siempre tendrán un espacio en mi corazón.

Tabla de contenido

CONTENIDO	6
FIGURAS	7
TABLAS.....	8
GRAFICAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	12
1 ANTECEDENTES	13
2 MARCO REFERENCIAL	24
2.1 Microalgas.....	24
2.2 <i>Haematococcus pluvialis</i>	24
2.2.1 Ciclo celular de <i>H. pluvialis</i>	25
2.2.2 Morfología y fisiología.....	26
2.2.3 Composición Bioquímica de la microalga <i>H. pluvialis</i>	27
2.2.4 Aplicaciones de la microalga <i>H. pluvialis</i>	31
2.2.5 Condiciones para el cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i>	32
2.2.6 Medios de cultivo	33
2.2.7 Sistemas de Cultivo	36
2.2.8 Fotobiorreactores.....	37
2.2.9 Biorreactor Tecferm 5L.....	38
2.2.10 Modelos de crecimiento	39
3 DISEÑO METODOLÓGICO	44
3.1 TIPO DE ESTUDIO	44
3.2 HIPÓTESIS, VARIABLES E INDICADORES.....	44
3.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	44
4 RESULTADOS	45
5 DISCUSIÓN	62
6 CONCLUSIONES	67
7 RECOMENDACIONES	69
8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Ciclo celular de <i>H. pluvialis</i>	25
FIGURA 2 Ciclo celular de <i>H. pluvialis</i> . Elaboración propia	26
FIGURA 3 Estructura bioquímica de la Astaxantina	29
FIGURA 4 Estructura molecular de la Clorofila a y b	31
FIGURA 5 Distribución de la luz, tomado de Tecnología de cultivo en microalgas en fotobiorreactores, AQM 2009	32
FIGURA 6 Instalación comercial de Cyanotech corporation	36
FIGURA 7 Bioreactor del Manual de operación del contenedor de cultivo y equipamientos	36
FIGURA 8 Tipos básicos de fotobiorreactores	37
FIGURA 9 Fermentador Tecferm 5 L. Elaboración propia	38
FIGURA 10 Curva del modelo logístico	40
FIGURA 11 Curva del modelo de Gompertz	41
FIGURA 12 Ecuación del modelo de Monod	41
FIGURA 13 Curva del modelo de Monod	42
FIGURA 14 Curva del modelo Baranyi	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Características de las diferentes condiciones de cultivo	24
TABLA 2 Clasificación taxonómica de <i>H. pluvialis</i>	25
TABLA 3 Composición bioquímica de <i>H. pluvialis</i>	28
TABLA 4 Composición medio Kobayashi	34
TABLA 5 Composición medio OHM	35
TABLA 6 Composición del medio MES Volvox	45
TABLA 7 Morfología en medio OHM y Kobayashi de la microalga <i>H. pluvialis</i> Objetivo utilizado 40X. Elaboración del autor	51
TABLA 8 Tendencias de crecimiento	52
TABLA 9 Análisis de costos para producir 1 litro de medio OHM y Kobayashi ..	60
TABLA 10. Tabla resumen de los medios empleados	61

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 Curva de crecimiento celular de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor	52
GRÁFICA 2 pH de los cultivos de la microalga <i>H. pluvialis</i> en los medios OHM y Kobayashi Elaborada por el autor	53
GRÁFICA 3 Concentración de clorofila obtenida durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor	54
GRÁFICA 4 Concentración de Astaxantina obtenida durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i>	55
GRÁFICA 5 Clorofila vs Astaxantina	56
GRAFICA 6 Clorofila vs Astaxantina	56
GRÁFICA 7 Concentración de Nitratos obtenida durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i>	57
GRAFICA 8 Concentración de fosfatos durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en el medio OHM, elaboración propia	58

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LA MICROALGA
Haematococcus pluvialis UTILIZANDO LOS MEDIOS DE CULTIVO
OHM Y KOBAYASHI EN EL BIORREACTOR TECFERM DE 5 LITROS**

RESUMEN

H. pluvialis es una microalga ampliamente reconocida por ser una fuente natural de astaxantina con amplio uso en la industria, sin embargo cuenta con un ciclo complejo de crecimiento. Es por esto que se propone determinar cuáles son las condiciones óptimas de cultivo para obtener una producción adecuada en cantidad y calidad de biomasa de la microalga utilizando el biorreactor a escala de laboratorio Tecferm de 5 litros.

El cultivo fue llevado a cabo en los medios OHM y Kobayashi (KM) bajo las condiciones de fotoperiodo 18:6 Luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827), 65 Lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado y temperatura 22°C ± 2 durante 21 días. Se realizó la determinación de biomasa, morfología, contenido de clorofila, astaxantina, fosfatos y nitratos. Se realizó un análisis de costos y se efectuó un análisis estadístico Kruskal-Wallis (P < 0.05)

El mayor crecimiento de la microalga se presentó en el medio OHM con 1.23x10⁶ cel/ml y el contenido de clorofila fue 11.87mg/ml observándose diferencias significativas en los parámetros analizados como pH y nitratos.

El consumo de nitratos en el medio OHM fue 75%. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (P= 0.0436 KW=14.46).

El consumo de fosfatos en el medio OHM fue 80%, el medio KM no contenía este nutriente, por lo cual es el más económico para la producción de la microalga.

El cultivo en el biorreactor Tecferm 5L utilizando el medio OHM y KM bajo las condiciones trabajadas permitió obtener una biomasa adecuada de *H. Pluvialis* en calidad y cantidad.

PALABRAS CLAVE: Biorreactor, microalga, concentración celular, nutrientes, medios de cultivo

Estudiante: Ángela María Hernández Cortes

Asesor: Judith Camacho Kurmen QF, PhD, MSc.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de *H. pluvialis* representa un gran reto en la comunidad industrial debido a sus diversas condiciones de cultivo y necesidades mínimas para un desarrollo óptimo, el interés en esta microalga nace de las cualidades que tiene para producir diversos metabolitos de gran impacto en campos como la industria farmacéutica, cosméticos, alimentación animal y uso nutraceutico en humanos en los cuales se ven beneficiados por su característica antioxidante, inmunoreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena. La microalga posee un complejo ciclo celular por lo que es importante entender las condiciones que permiten que ella sea capaz de desarrollarse libremente y así producir varios metabolitos, principalmente la astaxantina; la cual es el ketocarotenoide más importante desde el punto de vista biotecnológico, ya que puede ser utilizada en diversos campos.

Es por esto el interés de establecer el medio de cultivo y las condiciones adecuadas que brinden la capacidad a la microalga de una mayor producción en cantidad de biomasa. Por estas razones en este trabajo de investigación se evaluaron los medios de cultivo OHM y Kobayashi que contenían diferentes micro y macro nutrientes y así mismo se establecieron las condiciones de temperatura, intensidad lumínica, color de luz, concentración de micro y macro nutrientes, pH, CO₂, agitación, aire filtrado, fotoperiodo 18 horas luz / 6 oscuridad y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel, se utilizó el biorreactor a escala de laboratorio Tecferm 5 L, el cual apporto la forma tubular, la esterilidad y las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas para esta microalga.

Teniendo en claro la importancia que tiene el garantizar dichas condiciones durante el cultivo de *H. pluvialis* se estableció que es importante entender mejor el ciclo de crecimiento de la microalga y así obtener una biomasa óptima en calidad y cantidad para ser utilizada a favor de la síntesis de productos de interés a nivel industrial.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones adecuadas para el crecimiento de *H. pluvialis*, utilizando los medios de cultivos OHM y Kobayashi en un biorreactor Tecferm de 5 litros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi bajo las condiciones establecidas intensidad de luz, fotoperiodo, color de luz, pH, temperatura, agitación y aire filtrado y cambio morfológico durante el cultivo.
- Determinar la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.
- Determinar los costos para la implementación de la producción para cada medio de cultivo.

1. ANTECEDENTES

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que por lo general son muy eficientes en el proceso de fijación de CO₂ y aprovechamiento de la energía solar para la producción de biomasa. Se encuentran presentes en variedad de locaciones en las cuales aprovechan las condiciones propias del lugar, así como los compuestos allí presentes, entre ellos se destaca CO₂, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros metales que se encuentren disponibles. Su importancia ha ido ascendiendo con el paso de los años debido al impacto que tienen al producir metabolitos como carotenos, ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga y clorofila que son requeridos en industrias como la farmacéutica, cosmética, pigmentación en acuicultura y producción de biodiesel.

Como indica Spolaore *et al* 2006¹ el primer uso de las microalgas por los humanos se remonta 2000 años en la población china los cuales utilizaban *Nostoc* para sobrevivir a la hambruna que en ese momento estaban atravesando. La implementación de recursos biotecnológicos para trabajar con dichas algas solo tuvo acogida el siglo pasado donde se buscó brindar un método estándar para su cultivo y aprovechamiento, los diversos campos en los que se utilizaron microalgas fueron en el humano y animal como producto enriquecedor de los valores nutricionales de los productos comercializados en los que se adicionaba alguno de sus metabolitos; aquí se tiene en cuenta que no todas las microalgas eran usadas y que los géneros más reconocidos son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*.

Las microalgas no solo tienen acogida en la parte nutricional sino en el sentido farmacológico como indican Pérez y Labbé 2014² en su artículo de revisión, describen el valor medicinal que posee *Chlorella* quien protege contra la insuficiencia renal, ayuda a la promoción del crecimiento de lactobacilos intestinales, disminuye las concentraciones de colesterol en el torrente sanguíneo e incrementa la liberación de antioxidantes en personas fumadoras. Este es solo un ejemplo de las características multi-benéficas que posee algunos de los géneros de las microalgas.

Las observaciones en *H. pluvialis* comenzaron en el año 1797 a cargo de Girod-Chantrons pero con el transcurso del tiempo quedaron a manos de los europeos, se tiene como referencia que hacia el año 1884 Flowtow

hace la primera descripción de la microalga pero solo hasta el año 1899 Henrick publica unos breves comentarios sobre la historia de vida y alternancia del ciclo de vida en células en reposo y móviles³

Fabregas en el año 2001⁴ realiza estudios empleando el medio de cultivo OHM y establece dos sistemas de cultivo; uno para la fase verde vegetativa junto con el estado estacionario de la célula y el segundo encaminado a la inducción de factores de estrés que aumentan la concentración de astaxantina en la microalga, las condiciones registradas para el cultivo fueron pH 7.2 a 7.8 con una intensidad lumínica de 40 fotones mol m⁻² s⁻¹ proporcionada gracias al uso de lámparas fluorescentes blancas regida por un una fase de 12 horas luz/12 horas oscuridad acompañado de una temperatura de 25° C, la aireación utilizada fue intermitente durante 10 segundos a una velocidad de 250 ml/min. Para la primera etapa la principal característica de los cultivos era ser semi-continuos a fin de garantizar tasas de renovación que variarían entre 10% y 40% para que brindaran una mayor biomasa en el medio y para la segunda etapa se varían las condiciones de luz a 240 fotones mol m⁻² s⁻¹ por 15 días para inducir la microalga a su etapa de aplanospora y así lograr obtener la astaxantina.

Los resultados revelan que para la primera etapa al cabo de 2-5 días se obtiene una densidad celular de 5,72x10⁵ células/ml y una renovación diaria del 10% para el siguiente análisis se determina que los cultivos con tasa de renovación del 10% pasados tres días de ensayo y ser sometidos a las nuevas condiciones lumínicas obtienen valores de hasta 49 µg ml⁻¹ en el día 15 de estudio y que los cultivos con tasa de renovación del 40% al noveno día de ensayo con las mismas condiciones lumínicas el crecimiento celular cesa, el nitrógeno disponible en el medio se agota y se generan períodos de aumento de la astaxantina, finalmente se establece que la producción máxima de astaxantina se generó a los 15 días de estudio con 9,6 mg l⁻¹ día⁻¹ con una tasa de renovación del 40%³

Para el 2003 A.S Cifuentes *et al*⁵ realizaron un trabajo en el cual investigaron la obtención de biomasa, carotenoides y astaxantina en condiciones de laboratorio. El inóculo creció en medio Bristol bajo condiciones como temperatura 23° ± 2, intensidad de luz de 35 mmol m²s⁻¹, fotoperiodo 16:8 (luz/oscuridad), sin aireación y con agitación 2 veces al día. El crecimiento fue llevado a cabo en condiciones autotróficas y mixotróficas, la primera con NaNO₃, NH₄Cl y urea a una concentración de 2.9 mM y la segunda con acetato sódico 4, 8, 12 mM. Para esta parte del estudio las condiciones del cultivo fueron modificadas y se utilizaron dos intensidades de luz (35 y 85 mmol m⁻²s⁻¹), temperatura de 23 ± 2 °C, agitación dos veces al día y un pH de 6,0. De las diferentes condiciones

que se llevaron a cabo, el cloruro de amonio resultó ser la mejor fuente de nitrógeno ya que alcanzó una densidad celular de 2.0×10^5 y 2.5×10^5 cel/ml habiendo partido de un inóculo de 2×10^3 cel/ml, lo cual indica que las condiciones brindadas al cultivo son reproducibles⁵.

En el año 2006 López *et al*⁶ realiza un estudio en el cual hacen la comparación del cultivo de *H. pluvialis* en fotobiorreactores tubulares y en columna de burbujas. Los dos biorreactores operaban con el mismo nivel de medio (55 litros) y se operaban de la misma manera permitiendo analizar si su diseño influenciaba el ensayo. Para la caracterización del cultivo a escala macroscópica por medio de un método colorimétrico se determinó la densidad celular, contenido de clorofila y astaxantina en la biomasa; para la escala microscópica se tuvo la ayuda de un análisis por computadora que establece imágenes digitales dando como resultado la población celular, tamaño celular promedio y homogeneidad de la población.

Los datos de los biorreactores mostraron la ventaja que posee el modelo tubular ya que tiene mayor disponibilidad de la luz solar reflejándose en la cantidad de biomasa obtenida la cual fue de 7.0 g/L (d.wt.) luego de 16 días de estudio y con una productividad global de biomasa de 0,41 g/l por día a comparación del fotobiorreactor de columna de burbuja donde la concentración máxima alcanzada fue de 1.4 g/L y con una productividad global de 0.06 g/L por día. El estudio destaca la posibilidad de aumentar el contenido de carotenoides al usar el primer diseño ya que su distribución permite a la microalga aprovechar al máximo las condiciones que le brinda su medio.

Para el mismo año García *et al*⁷ realizaba un estudio donde el principal objetivo era determinar condiciones estables de crecimiento y modelar la respuesta del sistema de irradiación y la tasa de dilución para permitir la producción al aire libre de células verdes de *H. pluvialis*, donde el proceso fue verificado en biorreactores tubulares de 1.8 L y 0.22 m^3 operados en sentido continuo y discontinuo. En este experimento se contó con un fotobiorreactor tubular de $0,22 \text{ m}^3$ horizontal en cuyos extremos se utilizó una cubierta blanca para aumentar la irradiación de la luz sobre las células en un periodo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad. La caracterización de las células se hizo por medio de imágenes digitales que brindaban un microscopio invertido (Leica DMIL) con el programa Image-pro plus 4.5.1 de Media cybernetics, donde brindaba información como población celular, diámetro de las células y homogeneidad de las células, confirmando que al asegurar condiciones como temperatura, luz cantidad de nitratos podemos obtener población celular palmeloide flagelada de alta calidad

además enseñan que la forma de la célula va en función de la tasa de crecimiento que se esté presentando en el cultivo⁷.

Las observaciones en *H. pluvialis* más recientes datan desde el año 2008 llevado a cabo en Alemania por la universidad de ciencias aplicadas Anhalt, donde por primera vez se informan los cambios en la síntesis de carotenoides que sufre la microalga debido a la dependencia que presenta con respecto al medio en el que se cultive además la formación secundaria de carotenoides que inicia una vez se expone a un agotamiento de nutrientes y concentraciones de luz. El estudio fue evaluado en 15 días y tres medios de cultivo autótrofos diferentes donde se analizaba el cambio presentado entre mono y diesteres de carotenoide, allí se alcanzó un peso máximo de 16.1 mg/g de peso seco. Los resultados muestran la estrecha relación entre el medio de cultivo y las condiciones brindadas las cuales se evidencian al hacer un análisis cuantitativo de los carotenoides secundarios obtenidos durante el proceso⁸

Siguiendo con estudios de esa época Ranjbar *et al*⁹ en su estudio utiliza un biorreactor de columna de burbujas, hecho en vidrio y equipado con un rociador de gas de placa perforada al fondo del equipo para mayor distribución del gas e iluminado con 4 lámparas fluorescentes circulares, el cual fue puesto en oscuridad total para evitar recibir luz de otras fuentes diferentes a las que el investigador le proporcione. El cultivo primario se realizó en medio Kobayashi a pH 6.8 donde luego de la fase pre-cultivo se tomó un volumen de 100ml para inocular la columna, la cual contenía 1000ml de medio inorgánico estándar adicionado con nitratos, potasio, EDTA, vitamina B1 y B12, esta columna fue mantenida a 20°C, pH alrededor de 8 para luego ser ajustado a pH 7.5. La intención del estudio era generar mayor cantidad de biomasa para su posterior obtención de astaxantina por lo cual se decidió adicionar una concentración 10 veces al medio y luego se dejó consumir los nutrientes por las siguientes 100 horas y finalmente se diluyó el medio a la mitad y se generaron condiciones de estrés para la microalga como cambios en luz y concentración de nitratos. Concluyendo con el artículo Ranjbar habla sobre el continuo suplemento de CO₂ y un suministro de nutrientes para mantener la concentración de nitratos en la columna a unos 8 mM en el fotobiorreactor y así mantener el número de células arriba de 3,5x10⁶ cel/ml después de 200 horas de cultivo sin cambio morfológicos a células enquistadas.

La variedad de procesos que se comenzaron a llevar a cabo con la microalga les brindó en el 2009 a Bao yu Zhang *et al*¹⁰ la idea de crear un diseño propio donde se imita las condiciones naturales de crecimiento de *Haematococcus* este cuenta con estanque abierto en el entorno natural donde se van dando los diferentes estadios de crecimiento de células

vegetativas y transformación de quistes y su posterior acumulación de pigmentos generados gracias a este sistema de fotobiorreactor abierto. El estudio se realizó en 12 días utilizando cuatro cepas diferentes de la microalga, los aspectos como densidad, pH y condiciones del medio fueron controlados de cerca, al final se seleccionó dos de las cepas para ser medidas con respecto a contenido de astaxantina, rendimiento y ser utilizadas para cultivo en masa brindando como resultado un rendimiento de astaxantina de 51.06 y 40.25 mg L⁻¹ que son equivalentes a 2.79% y 2.50% de su biomasa seca. Luego de esto se decidió poner 100 m² de estanque para continuar con la metodología de un solo paso donde se demostró que el contenido de astaxantina cambio de 1.61 a 2.48 g 100 g⁻¹ peso seco con contenido promedio de astaxantina de 2.10 g 100 g⁻¹ peso seco. El trabajo presentado en este artículo muestra como usando un sistema de crecimiento de dos etapas de un solo paso resulta ser mucho más efectivo para la acumulación del pigmento en quistes rojos¹⁰

H. pluvialis es una gran fuente de carotenoides y pigmentos de gran valor para el mercado, es por esto que Tocquin Pierre *et al*¹¹ en 2011 realiza un ensayo utilizando un medio de bajo costo en el cual se varía la cantidad de nitrógeno y fósforo en su composición buscando variar la proporción del crecimiento vegetativo por tal razón se utiliza un fertilizante hidropónico de tres componentes con el cual se emplean diferentes combinaciones generando 18 posibles opciones de medio. Este fue nombrado como método ciego donde a los 18 medios les fue inoculada una concentración de 2x10⁴ cel/mL, las microalgas fueron cultivadas en luz continua a 30 μmol m⁻² s⁻¹ durante 9 días. Entre los 18 medios estudiados, se registró una densidad celular máxima de 1x10⁶ células mL⁻¹, en medio M1B5 en el día 9. M1B5 fue el único medio que permitió mantener las células en la etapa verde y móvil después del día 9 ya que contaba con altas cantidades de fosfatos, la cual no había sido empleada anteriormente.

Este resultado se comparó junto a otros dos medio que fueron OHM y BBM3N quienes contenían 2.5 y 25 veces menos fosfatos que M1B5 y donde el promedio de NO₃ y PO₄ eran de 4.6 y 23.9 respectivamente, aquí se observó que en BBM3N y OHM las células cambiaron rápidamente a estado palmeloide en un intervalo de tiempo de 4-6 días mientras que en M1B5 las células estuvieron en su estado verde móvil durante todo el experimento dejando en evidencia su utilidad para mantener a la microalga en esta forma durante un periodo de tiempo más largo¹¹.

En el año 2011 Jian Li *et al*¹² elaboraron un estudio empleando un medio de cultivo con componentes similares al medio OHM y con la generación de un nuevo diseño de fotobiorreactores tubulares al aire libre, uno contaba con capacidad de 1000L y el otro de 8000 L, cada uno cumplía con las características para controlar la temperatura, pH, inyección de CO₂ y agitación del medio. El biorreactor de menos capacidad sirvió para proporcionar el inóculo celular al biorreactor grande donde se comenzó con una concentración celular de $5-8 \times 10^4$ cel/ml y aumentaba su concentración celular a más de 5×10^5 cel/ml en 4-5 días. La concentración celular máxima alcanzada fue de 1×10^6 cel/ml, El pH del medio fue mantenido en 7.5 y el consumo de CO₂ fue de 4.5 kg por día.

En este mismo año se evidenció la necesidad de buscar alternativas que brindarían solución a los inconvenientes que se presentaban con el cultivo respecto al diseño del biorreactor; es por esto que Jae Jun Yoo *et al*¹³ decidieron experimentar con uno en el cual su diseño estuviera en forma de “v” y así poder brindar una mejor relación altura/diámetro, tasa de flujo volumétrico y aprovechamiento del cambio de la densidad óptica. El experimento se realizó comparando el cultivo con un biorreactor con diseño totalmente en vertical, la cepa utilizada primero fue cultivada en medio NIES-C en un Erlenmeyer de 250ml que contaba con 130 ml de inóculo, estuvo a 150 rpm y 23°C mientras era aireado al 5% con CO₂ enriquecido con una tasa de 65 ml/min, la luz la brinda una fuente de $40 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas.

Finalmente se realizaron mediciones celulares durante 3 días y se determinó la densidad óptica del cultivo a 686 nm, donde el biorreactor con el nuevo diseño nos brinda un resultado de 0.052 OD la cual es 6 veces mayor que en el otro biorreactor, los autores destacan la ventaja que tiene el nuevo diseño del dispositivo ya que brinda una mejor mezcla del cultivo, baja zona de adherencia del cultivo en la parte inferior del biorreactor y con la ayuda de aspas hexagonales incluidas en el nuevo diseño se incrementa la posibilidad de realizar cultivos a largo plazo con biomasa de alta calidad y cantidad¹³

Para el 2012 Se estudió el efecto de diversos factores de estrés y regulación en la producción de la biomasa de *H. pluvialis*, en este artículo que se llevó a cabo por Sushanta Kumar *et al*¹⁴ se tuvieron en cuenta variables que han sido destacadas como primordiales a la hora del cultivo de la microalga como lo son intensidad de la luz, medio de cultivo, limitaciones de nitrógeno y fósforo que garantizan una producción viable de biomasa. La metodología utilizada para esta investigación se basó en utilizar medio MBB enriquecido con NaNO₃ para la fase verde y luego

proceder a una inoculación de 500 μl de células en crecimiento, el procedimiento se realizó con iluminación LED blanco a $80 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con una agitación de 150 rpm, temperatura de 20° y ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h además utilizando una concentración de CO_2 del 5% y finalmente utilizando un biorreactor de 20 L para la obtención de biomasa.

Durante la experimentación se establecieron nueve condiciones totales las cuales eran aplicadas dependiendo la fase en la que se encontrara la microalga (fase verde/ fase roja), El procedimiento para la fase verde se llevó a cabo en 10 días y la fase roja se realizó por 2 semanas esto les brindó la posibilidad de establecer una gráfica en la cual se describe qué condiciones aportan realmente al crecimiento, desarrollo y obtención de los diferentes productos secundarios de la microalga, para la fase verde la condición número uno brindó la capacidad de mejorar la capacidad fotosintética por lo tanto crear un mejor ambiente de crecimiento, luego en la fase roja aumentó su capacidad de concentración de carotenoides y clorofila, la cual disminuía si se alargaba el periodo de cultivo en esta fase. Los resultados obtenidos en estudio sugieren que utilizando este tipo de luz LED $80 \text{ (Imol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ inducen un efecto de crecimiento, pero si se aumenta la capacidad de luz disminuye considerablemente su concentración de clorofila disponible¹⁴

En el año 2013 Galbao R *et al*¹⁵ estudian el crecimiento de la microalga considerando condiciones de luz desde 2000 a 10000 lux, temperatura de 22°C y pH en un rango de 6.5 - 12.5. Este ensayo se realizó en un biorreactor de 4 litros en medio Rudic y el conteo celular se realizó por medio de cámara de Neubauer. Al exponerse la microalga al cultivo se demuestra que las condiciones de intensidad de la luz y pH influyen la tasa de crecimiento de *H. pluvialis*, por lo cual los autores proponen un modelo no lineal autorregresivo basado en una red neural artificial para describir el comportamiento del pH durante el cultivo a diferentes intensidades de luz, brindando como resultado que a mayor intensidad lumínica existe una menor concentración de biomasa, como ejemplo de esto en el estudio se empleó una intensidad de 10000 lux donde la biomasa obtenida fue de 60.476 cel/mL mientras que la biomasa obtenida a 2000 lux fue de 136.265 cel/mL¹⁵

En el año 2014 se publica un trabajo bajo el nombre “La fotoinducción efectiva de *H. pluvialis* para acumular astaxantina con cultivo adjunto” En este estudio se tenía como objetivo investigar y comparar la eficiencia de un sistema adjunto para producir astaxantina a partir de *H. pluvialis* a la del sistema suspendido (biorreactor de columna de burbujas) en diversas

condiciones. La cepa utilizada fue NIES- 144 y fue cultivada en medio NIES-C con 10 mM de acetato de sodio como fuente orgánica de carbono, aquí se brindaron condiciones como iluminación continua de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura 25°C y luego se expuso bajo iluminación continua de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 25°C , otras condiciones para el cultivo primario fueron temperatura del color 6199 k, el pico, dominante, centroide y longitudes de onda centrales de iluminación de la fluorescencia fría de la lámpara era 445, 504, 437 y 437 nm, respectivamente.

Se utilizó un biorreactor simple de un litro en el cual se investigaba la viabilidad de la inducción de células de algas unidas a una clase de gasa que estaba apoyada a una malla, allí se brindaba microfiltración por medio de una membrana de diámetro establecido donde se lograba retener la mayor cantidad de microalga posible. El contenido de clorofila fue de 11.87mg/ml $33 \pm 0.5 \text{ cm}^2$ y finalmente se revisaba la formación de una película de algas sobre esa malla acompañada de alambre, el cual contaría con un imán que a través de fuerza magnética generaría la aireación y mezcla, éstas se realizaron por burbujeo de aire con la tasa de 0.5 vvm.

La inducción o el cultivo adjunto se realizó ubicándolo en la parte superior de la malla así se aseguraba que esta estuviera húmeda siempre y aprovechara dichas condiciones así se creaba dos tipos de cultivo, uno suspendido en el medio Nies-N que contaba con deficiencia de nitrógeno y el otro adherido a la membrana en el biorreactor. Los resultados mostraron que este sistema adjunto es más adecuado para la fotoinducción de *H. pluvialis* que el suspendido biorreactor. Bajo las condiciones óptimas, la productividad de astaxantina del sistema adjunto era $65.8 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y 2.4 veces eso en el sistema suspendido, la producción de biomasa fue de $3.7 \pm 0.3 \text{ (g m}^{-2} \text{ d}^{-1})$ en el sistema adjunto.

Este enfoque adjunto también ofrece otras ventajas sobre sistemas suspendidos, tales como, producir astaxantina bajo un amplio rango de intensidades de luz y temperaturas, ahorro de agua, facilidad para cosechar celdas, resistencia a la contaminación. Por lo tanto, el enfoque adjunto se puede considerar una tecnología económica, respetuosa con el medio ambiente y altamente eficiente para producir astaxantina a partir de *H. pluvialis*¹⁶

Para el año 2015 Sipaubá-Tavares *et al*¹⁷ comparan el efecto que tiene sobre la tasa de crecimiento y los parámetros fisiológicos del cultivo, dos medios alternativos NPK y M+NPK comparados con un medio comercial. Los medios alternativos muestran características como alta cantidad de vitamina B12 la cual es útil para el crecimiento de *H. pluvialis* pero solo en el medio M+NPK se registra el contenido de N, P, C, Mg, Mn y K en

comparación con el medio comercial; es por esta razón que la concentración de células durante este período de ensayo alcanzó el valor máximo de $1,5 \times 10^5$ cel/mL-1 en medio de cultivo M+NPK en los días 11 y 13 de cultivo después de los cuales fue disminuyendo ligeramente, revisando las concentraciones celulares en los medios WC y NPK estas fueron más bajas, ya que iban de $0,4 \times 10^5$ cel/mL-1 y $1,08 \times 10^5$ cel/mL-1 y entre $0,55 \times 10^5$ cel/mL-1 y $1,5 \times 10^5$ cel/mL-1, el 5º día y el 13º día, respectivamente. Se destaca la importancia que tiene la tabla de componentes de cada medio de cultivo ya que así se puede elegir con más objetividad el medio que se acomode a las necesidades del investigador y de la microalga¹⁷

Para el 2016 Hexin L *et al*¹⁸ analizan el perfil metabólico del proceso de acumulación de astaxantina inducida por la luz alta en *H. pluvialis*, Aquí realizan el cultivo en medio BBM se establecen condiciones tales como intensidad de luz de $24 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ para 16 h/8h luz / oscuridad ciclo a 24° C sin aireación. En sus resultados muestran que la fase logarítmica de las células presentaron unas condiciones como intensidad de luz de $24 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ durante 7 días (OD 669 = 0.7) (verde), cada fase (verde, amarilla y roja) tuvo una intensidad de luz y tiempo diferente, intensidad de luz de $80 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ durante 14 días (amarilla) e intensidad de luz de $80 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ por 28 días(roja) como parte del proceso se analizó la cantidad de clorofila total obtenida, su resultado fue Clorofila a (mg/L) = 12.19 y Clorofila b (mg/L) = 21.99 estos datos fueron obtenidos gracias al uso de una balanza electrónica analítica la cual contaba con una precisión de $\pm 0.0001 \text{ g}$.

A cada uno de estos resultados de las fases de pigmentación se les realizó un análisis por HPLC donde los resultados brindaban un perfil metabólico un total de 81 metabolitos fueron identificados y cuantificados por cromatografía de gases-espectrometría de masas, incluyendo 23 aminoácidos, 19 azúcares, 15 orgánicos ácidos, 8 alcoholes, 7 aminas, 4 ácidos nucleicos y 5 otros. Posteriormente se subdividieron en cuatro grupos según a sus cambios durante cada una de las fases, los metabolitos identificados y los posibles biomarcadores potenciales se concluyeron mediante tres técnicas, análisis de componentes principales, análisis de mínimos cuadrados parciales y análisis de agrupación jerárquica quienes brindan información acerca de las rutas metabólicas de las células. Las rutas que más se evidenciaron fue el ciclo de Calvin y el ciclo de TCA que se mostraba con más fuerza durante la fase amarilla y brindaba mayor número de precursores para la síntesis de metabolitos citoprotectores, esta fase fue expuesta a luz alta lo cual brinda la hipótesis

de que dichos procesos benéficos son llevados a cabo al exponer esta fase a una luz alta en *H. pluvialis*¹⁸

Entre publicaciones recientes para el 2017 se encuentra el artículo de Christwardana M *et al*¹⁹ donde publican un escrito bajo el nombre “Los efectos del sonido audible para mejorar la tasa de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* en etapa vegetativa” Aquí se expresa la idea de que el sonido audible actúa como un físico-estimulante del crecimiento de las microalgas en fase logarítmica. Para la investigación se empleó la cepa (UTEX #2505) junto con el medio OHM la cual después de tres días de cultivo se obtiene una concentración celular de 0.4×10^4 células/ml de cultivo la cual se transfiere a un fotobiorreactor con 60 L de agua destilada y medio de cultivo.

Se evidencia la importancia de factores que brindan capacidad de crecimiento a la microalga como ciclos de luz/oscuridad, empleo de lámparas LED blancas, ajuste de pH, temperatura y adición de medio de cultivo OHM cada dos días durante los 22 que duró el cultivo. En el 2015 Cai *et al*²⁰, informó que 2000 Hz es el principal componente de frecuencia en la mayoría de sonido audible en la naturaleza, razón por la cual se establece un rango de potencia de audio de 60 dB medido con el programa Q4 Audacy software, las canciones utilizadas fueron “Blues for Elle” y “Far and Wide” quienes estimulan la fotosíntesis, el consumo de nutrientes y resistencia a la temperatura para microbios o microalgas según Larsen y Gilbert²¹

La música fue puesta a 20 cm de cada fotobiorreactor y reproducido 8 horas por día (10 AM a 6 PM). La tasa de crecimiento de las microalgas fue determinada por densidad óptica (OD) y el empleo de una celda de conteo manual llamada hemocitómetro. El resultado mostró que la microalga *H. pluvialis* tratada con la música presenta la mayor tasa de crecimiento (0.03 por día) 58 % más alto que la microalga que no tenía sonido audible además que se generaba un incremento en la producción de biomasa hasta un 50.94% o 3.467 cel/ml/día con la canción “Blues for Elle” en conclusión los autores describen que este sonido audible es muy útil para estimular la tasa de crecimiento de *H. pluvialis*¹⁹

En ese mismo año Niño Castillo *et al*²² realizan en la universidad de la Sabana de Bogotá-Colombia una investigación en la cual emplean los medios de cultivo BBM, OHM y RM, buscando el medio de cultivo y las condiciones óptimas para la producción de astaxantina por medio de *H. pluvialis*, para este estudio se utilizó la influencia de factores como pH 6.7 - 7, CO₂ al 5%, fotoperiodo 16 horas luz/8 oscuridad, irradiancia 70 μ E/m²

s durante un tiempo de cuatro meses y medio. El proceso de cultivo fue llevado a cabo en biorreactores de 500 ml con 350 ml de medio y 1×10^4 cel/ml de inóculo en su fase exponencial. El resultado demostró que el medio de cultivo con una tasa de crecimiento más elevada fue el medio de cultivo RM con 7.55×10^5 cel/ml en su recuento celular seguido del medio de cultivo BBM con un resultado de 3.88×10^5 células/ml y finalmente con un recuento de 3.43×10^5 células/ml el medio de cultivo OHM. Cabe destacar que la investigación demostró que el medio RM cumple con los parámetros necesarios tanto para la obtención de una buena tasa de crecimiento celular como para la inducción de estrés a la microalga y así obtener una alta producción de astaxantina²².

En el año 2018 Leiton presenta un trabajo de investigación en el cual busca establecer el mejor medio para la obtención de biomasa de *H. pluvialis* utilizando los medios de cultivo BBM y RM, las condiciones del cultivo fueron, temperatura 20 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad, utilizando luz blanca por medio de lámparas de luz fluorescentes blancas (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH DE 7.1. El proceso se llevó a cabo en 21 días utilizando el biorreactor Tecferm de 5L brindando como resultado que la densidad celular máxima de 1.25×10^5 cel/ml y 1.0×10^5 cel/ml en medio RM y BBM durante el tiempo de estudio habiendo partido de un inóculo inicial de 1×10^4 cel/ml quedando en evidencia que el medio RM al obtener un crecimiento celular de 25% más que el medio BBM es propicio para el desarrollo de la microalga²³

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Microalgas

Las microalgas representan un gran grupo de organismos unicelulares y organismos multicelulares acuáticos que presentan una variedad en su código genético. Son reconocidas ampliamente por su capacidad fotosintética además por generar biomasa gracias al uso del CO₂ disponible y la luz, estas utilizan el agua como principal donador de electrones quienes ayudan a oxidarla en O₂. Las microalgas pueden actuar con un metabolismo autótrofo donde requieren CO₂, sales y nutrientes como fuente de energía o metabolismo heterótrofo donde aprovecha una fuente externa de compuestos orgánicos para su beneficio y metabolismo mixótrofo en el cual la microalga es capaz de realizar fotosíntesis y adquirir nutrientes orgánicos exógenos²⁴ (Ver tabla 1)

Condición del cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fototrofia	Luz	Carbono inorgánico
Heterotrofia	Carbono orgánico	Carbono orgánico
Fotoheterotrofia	Luz	Carbono orgánico
Mixotrofia	Luz y carbono orgánico	Carbono inorgánico y orgánico

Tabla 1. Características de las diferentes condiciones de cultivo²⁵.

2.2. *Haematococcus pluvialis*

H. pluvialis es una microalga verde unicelular biflagelada en condiciones óptimas que pertenece al orden de los *volvocales* y a la familia *Haematococcaceae* (tabla 2) presente en la naturaleza en todo el mundo, donde las condiciones ambientales para su crecimiento son favorables⁴

PHYLUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GÉNERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>pluvialis</i>

Tabla 2: Clasificación taxonómica *H. pluvialis*⁴

2.2.1. Ciclo celular de *H. pluvialis*

La microalga *H. pluvialis* presenta un ciclo de celular en el cual se registran cambios morfológicos y fisiológicos, sus células pueden dividirse en dos tipos, células vegetativas verdes biflageladas involucradas en la acumulación de biomasa y las células sin flagelo relacionadas con la síntesis de astaxantina. Las células en reposo pueden ser clasificadas como células verdes en reposo, célula naranja en reposo llamadas palmella y quites rojos conocidos como aplanospora, dependiendo de la tonalidad que está presente cambian sus características morfológicas y bioquímicas. Las células naranjas/rojas están relacionadas con el proceso de acumulación rápida de astaxantina además de estar encargadas de soportar el proceso de deficiencia de nutrientes²⁶(Ver figura 1y2)

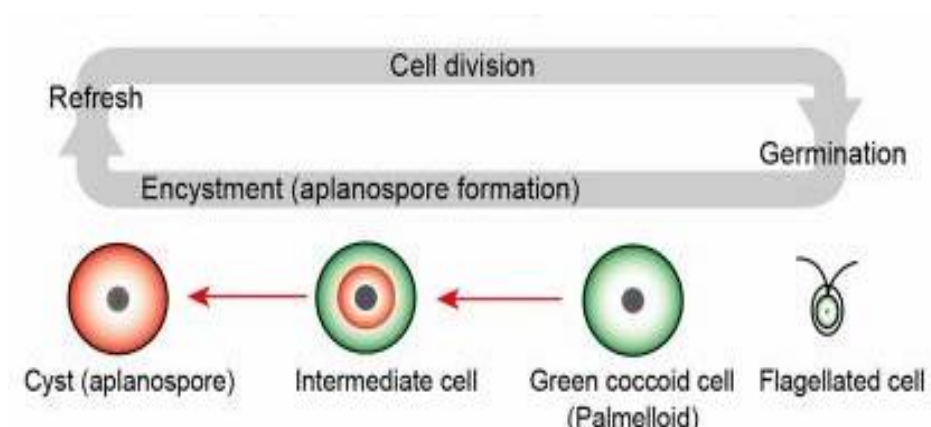


Figura 1. Ciclo celular *H. pluvialis*²⁷
 Representación esquemática del ciclo de vida y cambio morfológico que posee *H. pluvialis* a lo largo de su proceso de desarrollo.

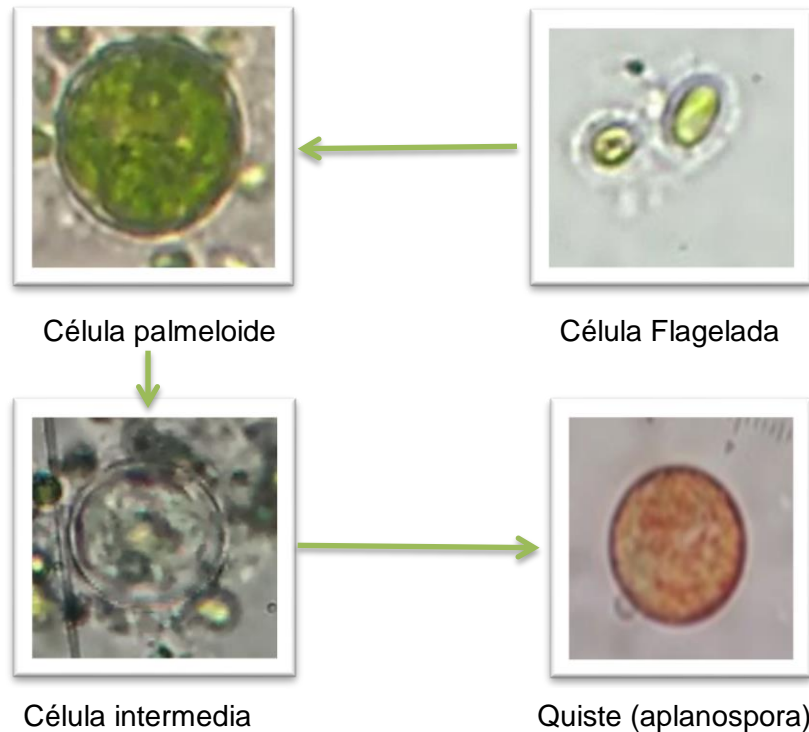


Figura 2. Ciclo celular *H. pluvialis*. Elaboración propia, 2018.
 Representación esquemática del ciclo de vida y cambio morfológico de *H. pluvialis* durante el cultivo en medio OHM y Kobayashi.

2.2.2. Morfología y fisiología

H. pluvialis en su etapa de crecimiento tiene fases móviles y no móviles. Las estructuras en forma de pera están constituidas por un tamaño entre 8 y 50 μm de diámetro; la estructura celular con la que cuenta se conforma de un cloroplasto en forma de copa con un indefinido número de pirenoides distribuidos de manera aleatoria, vacuolas contráctiles las cuales usualmente son numerosas y tienden a estar ubicadas cerca de la superficie del protoplasto; cuenta con un núcleo y dos flagelos de igual longitud los cuales emergen de la papila anterior que perfora la pared de celulosa. Su estructura está protegida por una pared celular que es espesa, gelatinosa y usualmente conectada a su protoplasto por hebras simples o ramificadas²⁸. Las células flageladas tienen la capacidad de

detener la división celular después de haber realizado este proceso cinco veces, posterior a esto las células denominadas zoosporas, detienen su fusión celular y el material genético (ADN) se duplica posteriormente las células adoptan una forma esférica no móvil debido a la pérdida de sus flagelos²⁹.

En su forma no móvil denominada palmella, el protoplasto esférico está envuelto dentro de una membrana de palmella estrechamente adherida y con excepción de los flagelos la estructura celular guarda la misma relación con la fase móvil. Cuando las condiciones de crecimiento comienzan a tornarse agresivas, las células aumentan su volumen de manera logarítmica e ingresan en una etapa de reposo en la que la célula es rodeada por una pared de celulosa resistente y pesada conformada por sustancias similares a la esporopolenina quien actúa como agente impermeable y brinda la capacidad de resistir la presencia de agentes químicos, este proceso comúnmente es conocido como “enquistamiento” donde el protoplasto adquiere una tonalidad roja bastante marcada.²⁸ En condiciones favorables las células poseen clorofila a y b además de carotenoides primarios tales como luteína, violaxantina, zeaxantina y neoxantina²⁹

2.2.3. Composición Bioquímica de *H. pluvialis*

La composición bioquímica de la microalga está compuesta por una cantidad amplia de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, carotenoides y minerales.(Ver tabla 3)

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN
PROTEÍNAS	27.16 (%)
CARBOHIDRATOS	40 (%)
GRASAS	21.22 (%)
HIERRO	1.0 (%)
MAGNESIO	1.4 (%)
CALCIO	3.3 (%)
BIOTINA	0.665 (mg/lb)

L-CARTINA	12 (µg/g)
ÁCIDO FÓLICO	1.48 (mg/lb)
NIACINA	35.2 (mg/lb)
ACIDO PANTOTEOICO	10.57 (mg/lb)
VITAMINA B1	4.81 (mg/lb)
VITAMINA B2	9.36 (mg/lb)
VITAMINA B6	4.5 (mg/lb)
VITAMINA B16	0.912 (mg/lb)
VITAMINA BC	82.7 (mg/lb)
VITAMINA BE	333 (mg/lb)

Tabla 3: Composición Bioquímica *H. pluvialis*³⁰

2.2.3.1. Proteínas

La composición de aminoácidos es crucial para la calidad nutricional de las proteínas es aquí cuando en condiciones favorables para el crecimiento de la microalga esta muestra un panel de aminoácidos en la biomasa donde los aminoácidos esenciales logran ocupar casi el 40% del contenido total. Entre los componentes principales destacamos el ácido glutámico (3.4%) seguido del aminoácido esencial leucina (2.6%) y finalmente ácido aspártico con un (2.4%)³¹

2.2.3.2. Carbohidratos

En su etapa verde el contenido de carbohidratos puede alcanzar el 15-17 %, en condiciones de estrés la microalga acumula altos contenidos de carbohidratos alcanzando 36-40% del contenido celular. Bajo prolongadas condiciones de estrés el almidón es consumido en la célula³²

2.2.3.3. Lípidos

El contenido total de lípidos en condiciones favorables de crecimiento varía de 20-25% con aproximadamente 10% de lípidos compuestos por ácidos grasos cortos poli-insaturados depositados en los cloroplastos. Los lípidos neutros son la clase de lípidos que predominan en ambos estadios (verde y rojo). En la etapa roja, bajo condiciones de estrés prolongado la microalga produce un flujo mayor para proteger la síntesis de lípidos-triacilgliceroles (TAG)³²

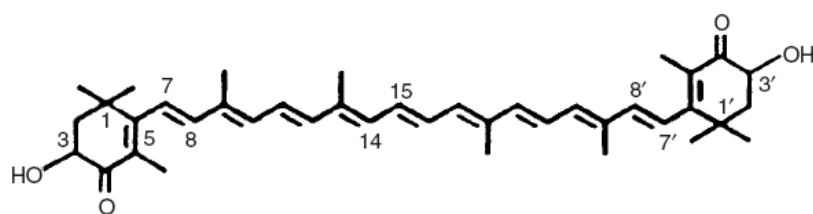
2.2.3.4. Carotenoides

Ante condiciones de estrés apropiadas la microalga enquistada y genera una alta concentración de carotenoides lo cual le brinda protección ante la luz y el oxígeno. La fracción de carotenoides de *H. pluvialis* contiene aproximadamente 70% de monoésteres de astaxantina, 10% de diéster de astaxantina, 5% de astaxantina libre, y el 15% restante consiste en una mezcla de b-caroteno, cantaxantina, luteína y otros carotenoides⁴

2.2.3.5. Astaxantina

La astaxantina es ubicua en la naturaleza, especialmente en ambientes marinos donde es ampliamente conocida por brindar el tono rojo-rosado a la carne de los salmónidos, así como camarones, langostas y cangrejos. El carotenoide astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β,β -caroteno) se distingue por poseer una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados, quienes hacen que esta, presente su intensa coloración rojiza además cuenta con un anillo cíclico en cada extremo de la molécula, un grupo funcional hidroxilo en cada uno de los carbonos 4,4' y lo que le brinda su característica de oxicarotenoide o xantofila es la existencia de dichos radicales libres oxigenados en los en sus extremos (Ver figura 3). Posee un importante interés comercial ya que es utilizado como colorante en comidas y primariamente usado para alimentar peces y en una pequeña cantidad para alimentar aves de corral. El color que caracteriza a los salmones y las truchas se debe a la adición de este pigmento a la comida con la cual se les alimenta ya que ellos por sí solos no pueden sintetizarlo, la astaxantina también es comúnmente utilizada como un precursor de Vitamina A en peces ya que algunas especies son incapaces de absorber el b-caroteno. En el ambiente marino esta es biosintetizada en la cadena alimenticia dentro de microalgas o fitoplancton como nivel de producción primaria.

La astaxantina ha sido considerada una gran fuente de Vitamina A, C y E además de actuar como una hormona de crecimiento para peces y crustáceos. Entre sus múltiples beneficios aparece la capacidad de actuar sobre el sistema inmune aunque no lo suficiente como para incluirlo como agente inmunoestimulante en sus comidas. Hasta el momento ningún estudio ha reportado la existencia de riesgo por el uso de la



astaxantina^{33,34}

Figura 3. Estructura bioquímica de la astaxantina³³

2.2.3.6. Clorofila

La clorofila es el pigmento fotosintético primario en todas las algas y es la única clorofila que hay en las cianobacterias y las rhodophyta. La cantidad total de clorofila en las algas oscila entre 0.5-1.5% de peso seco³³. Es uno de los compuestos bioactivos más valiosos que se puede extraer de una microalga ya que posee características antioxidantes y antimutagénicas además puede ser utilizado como colorante alimentario natural³⁵.

En las plantas la clorofila se encuentra confinada en los cloroplastos donde no solo está relacionada con fosfolípidos, polipéptidos y tocoferoles sino que a su vez se encuentra protegida por una membrana hidrofóbica; en los casos donde la clorofila pierde su ambiente natural el ion magnesio que posee se convierte en inestable y puede llegar a ser reemplazado por un ácido débil brindando así múltiples variaciones en estructura molecular de la clorofila inicial, a fin de evitar esto en muchas ocasiones se sustituye este ion magnesio por un ion cobre a fin de formar un complejo azul/verde altamente estable³⁵.

2.2.3.7. Estructura molecular de la clorofila

Existen dos tipos principales de clorofila, clorofila *a* y clorofila *b* pero al tener una constante exposición a ácidos débiles, oxígeno y luz, aceleró su oxidación y brindó como resultado la formación de numerosos productos de degradación.

El esqueleto que compone la molécula de clorofila es el macrociclo de la porfirina, quien está compuesta por cuatro anillos de pirrol. “La unión de un único anillo isocíclico a uno de los anillos de pirrol brinda lugar a la estructura de la fornilina. Cada anillo de pirrol contiene cuatro átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Todos los átomos de nitrógeno miran hacia adentro creando un agujero central donde un ion metálico Mg^{2+} se une fácilmente. En la clorofila, el grupo metilo en el anillo II de la clorofila es reemplazado por un grupo formilo³⁵. (Ver figura 4)

El presentar esta diferencia estructural da como resultado que la clorofila sea un pigmento azul/verde con una absorbancia máxima de 660 a 665 nm y que la clorofila sea verde/amarilla con una absorbancia máxima de 642 a 652 nm.

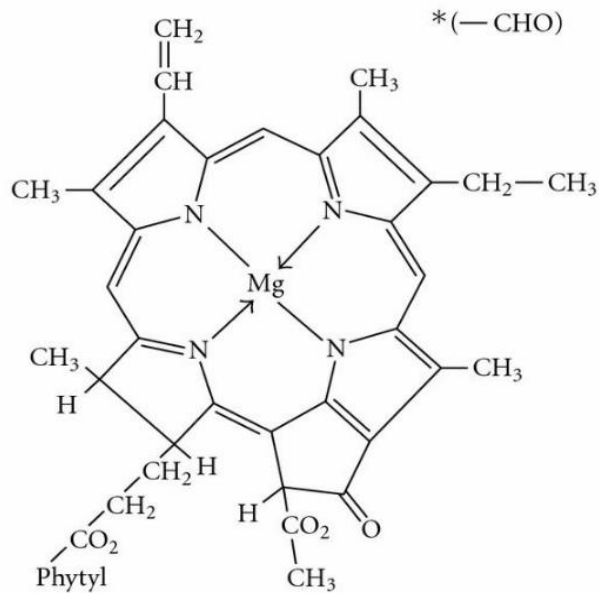


Figura 4. Estructura molecular de la clorofila a, clorofila b es una variante con el grupo metilo en la posición 3 siendo reemplazado por un grupo formilo³⁵.

2.2.4. Aplicaciones

Tradicionalmente las microalgas han sido utilizadas por la humanidad para cubrir diferentes necesidades; tres de las principales razones por las que sucede esto es que primero; utilizan un sistema de cultivo biológico eficiente en el cual se aprovecha al máximo la luz solar para producir materia orgánica, segundo, la composición química de la microalga puede variar dependiendo de las condiciones ambientales o composición del medio de cultivo al que sean expuestas y tercero, bajo condiciones de estrés algunos tipos de microalgas pueden acumular compuestos de interés comercial en altas concentraciones tales como proteínas, almidón, glicerol, pigmentos naturales y biopolímeros³⁶

Se han desarrollado una variedad de procesos en los cuales las microalgas están involucradas entre ellos podemos mencionar los más importantes que son:

- **Acuicultura:** Utilizadas como fuente de alimento para una variedad de moluscos, fases larvianas de crustáceos, salmones además utilizado como complemento en la dieta de peces³⁶
- **Biomedicina y farmacología:** Utilizadas en dietas para perder peso, tratamiento de heridas y sobre todo en medicamentos donde actúan ejerciendo actividad antibacteriana, antiinflamatoria, anti fúngica, inmunoreguladora y antitumoral³⁶.

- **Alimentación humana:** Principalmente utilizadas como complemento en dietas, pigmentos, vitaminas.
- **Industrias:** Se han descrito casos en los cuales se utiliza como combustible líquido al acumular una gran cantidad de biomasa y ser sometida a diferentes tecnologías de transformación³⁶

Haematococcus pluvialis presenta una gran característica y es que representa una fuente natural de astaxantina, donde es capaz de superar el 4% del peso seco, es una tasa de producción superior a cualquier microalga en la actualidad se busca el cultivo a gran escala porque representa un activo aprovechable en las industrias²⁹

2.2.5. Condiciones de cultivo *H. pluvialis*

El desarrollo de las microalgas está relacionado entre el estrecho vínculo que existe entre los factores bioquímicos a los que sea expuesta, podemos destacar temperatura, pH del medio de cultivo, disponibilidad de nutrientes, CO₂, nitrógeno, fósforo, agitación y aire filtrado.

- **Luz:** La intensidad de la luz es una condición primordial en el cultivo de la microalga ya que gracias a esta se ve influenciada la síntesis de lípidos. Es necesario brindar periodo de luz/oscuridad establecido según los requerimientos de *H. pluvialis* además establecer su exposición, cantidad y calidad ya que determinan la producción de biomasa (Ver figura 5). Las condiciones de luz pueden llegar a afectar el crecimiento y su proceso de síntesis, se han reportado casos en los que una luz muy fuerte genera fotoinhibición representando problemas que limitan el crecimiento de la microalga²⁹,

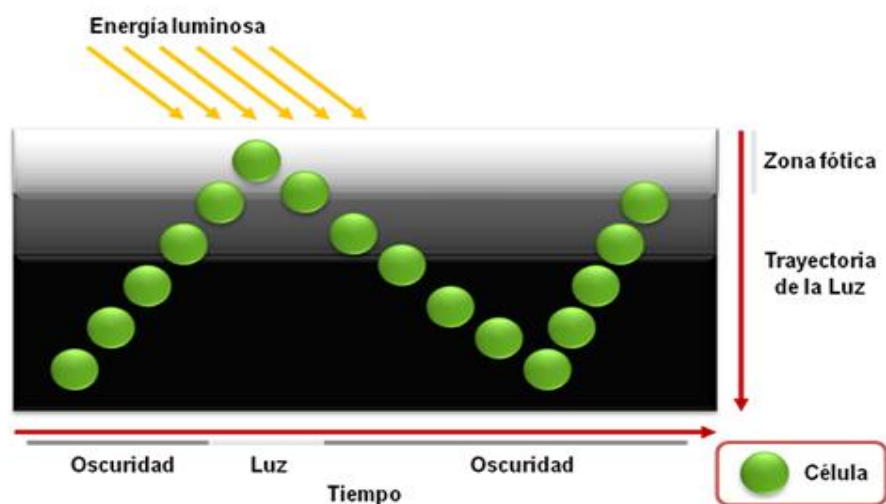


Figura 5. Distribución de la luz, tomado de Tecnología de cultivo en microalgas en fotobiorreactores, AQM 2009²⁵.

En esta figura se observa como la energía luminosa tiene la capacidad de llegar hasta la célula y estimular la síntesis de lípidos. Además, muestra el esquema por el cual la célula debe atravesar para promover la actividad fotosintética de la microalga por medio de periodos de oscuridad/luz.

- **Temperatura:** En cuanto a la temperatura algunas especies crecen entre los 10-35° C, para *H. pluvialis* la temperatura óptima es 20°C. Los cultivos de microalgas que crecen con una temperatura inferior a la óptima tienden a ser más sensibles a la fotoinhibición, esta condición también afecta la composición química de las células³⁷
- **pH:** El pH en los medios de cultivo se ve influenciado por la presencia de CO₂ y la composición iónica del medio de cultivo, el pH más adecuado para el crecimiento de las microalgas generalmente es de 8.0, con un rango de 7.0-9.0 a un pH mayor se podría generar la muerte microalga. El pH puede ser controlado por la inyección de CO₂³⁸
- **Nutrientes:** El nitrógeno es el nutriente más importante seguido del carbono, el cual se integra como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺). El nitrógeno disponible en el medio es un factor crítico en el cultivo ya que regula el contenido de lípidos de la microalga además de comportarse como un factor limitante de crecimiento. El fósforo es otro nutriente importante relacionado con la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía, cuando existe una deficiencia de este en el cultivo se limita el crecimiento microalgar².
- **Fósforo:** El fósforo es un macronutriente importante requerido para el crecimiento normal de la microalga, este desempeña su rol en procesos metabólicos celulares mediante la formación de componentes estructurales y funcionales. Cuando en el medio el fósforo comienza a agotarse comienza a disminuir la cantidad de clorofila disponible, pero inicia un aumento en la acumulación de astaxantina en la célula del *Haematococcus*, pero no tan notablemente como ocurre en los casos donde se disminuye el nitrógeno³³.
- **Agitación:** La agitación en el medio permite la distribución correcta de nutrientes haciendo de este un proceso más homogéneo, además permite que se capte la luz de manera adecuada.²⁹

2.2.6. Medios de cultivo

Existe una variedad amplia de medios de cultivo para crecimiento microalgar, cada uno tiene una característica específica de acuerdo a las necesidades que tenga la microalga, un medio de cultivo eficiente es aquel que combina la calidad, alta producción de biomasa y bajo costo.

- **Medio Kobayashi:** Medio de cultivo para algas empleado para crecimiento vegetativo (Ver tabla 4)

COMPOSICIÓN MEDIO KOBAYASHI	
REACTIVOS	PARA 1 LITRO
COMPOSICIÓN MEDIO BASAL DE PARTIDA	
Acetato de sodio	14.6 mM
L- asparagina	2.7mM
Extracto de levadura	2.0 g/l
MgC12.6H2O	0.985 mM
FeSO4.7H2O	0.036 mM
CaC1E.2H2O	0.135 mM
pH 6.8	
COMPOSICIÓN MEDIO MODIFICADO KOBAYASHI	
Acetato de sodio	14.6 mM
L-asparagina	2.7 mM
Extracto de levadura	0.5 g/l
Tris-(hydroxymethyl)-aminometano	6.2 mM
MgC12.6H2O	0.640 mM
FeSO ⁴ .7H2O	0.216 mM
MnC12-4H2O	0.808 mM

Tabla 4: Composición medio Kobayashi³⁹

- **Medio Optimal *Haematococcus* Medium (OHM):** Medio de cultivo optimizado para obtener una mayor producción de células en estado vegetativo adicionado con biotina para mejorar la biosíntesis de ácidos grasos y fijación de CO₂ y adicionado con vitamina B12. (Ver tabla 5)

COMPOSICIÓN MEDIO OHM	
REACTIVOS	PARA 1 LITRO
KNO ₃	0.41 g/L
Na ₂ HPO ₄	0.03 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.246 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.11 g/L
Fe(III) Citrato H ₂ O	2.62 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.011 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.012 g/L
Cr ₂ O ₃	0.075 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.98 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.12 g/L
SeO ₂	0.005 g/L
TIAMINA	15 µg/L
BIOTINA	17.5 µg/L
VITAMINA B12	0.026 µg/L

Tabla 5: Composición medio OHM¹⁹

2.2.7. Sistemas de cultivo

El cultivo de microorganismos fotoautotróficos como las microalgas, se ha llevado a cabo en fotobiorreactores (FBR) los cuales varían en diseño y marcas. Actualmente se manejan dos sistemas; abiertos y cerrados, cada uno de los sistemas presenta ventajas e inconvenientes.

2.2.7.1. Sistema abierto:

Es un sistema que no requiere mucha inversión y mantenimiento, pero presentan un sistema de control mucho más dificultoso. Este tipo de sistema están compuestos por estanques o lagunas, implementados con capas de plástico inerte que recubre todo el espacio, paletas giratorias que ejercen acción de agitación en el cultivo⁴⁰. (Ver figura 6)



Figura 6: Instalación comercial de Cyanotech Corporation⁴
Biorreactor abierto, cuenta con lagunas con capas de plástico que cubren el espacio y aspas giratorias para ejercer agitación en el cultivo.

2.2.7.2. Sistema cerrado:

Es un sistema que cuenta con unos reactores tubulares cerrados, presenta un tamaño considerable en cuanto a su robustez y que minimiza el riesgo de contaminación. Tiene una mayor tasa de productividad que el sistema abierto⁴⁰. (Ver figura 7)

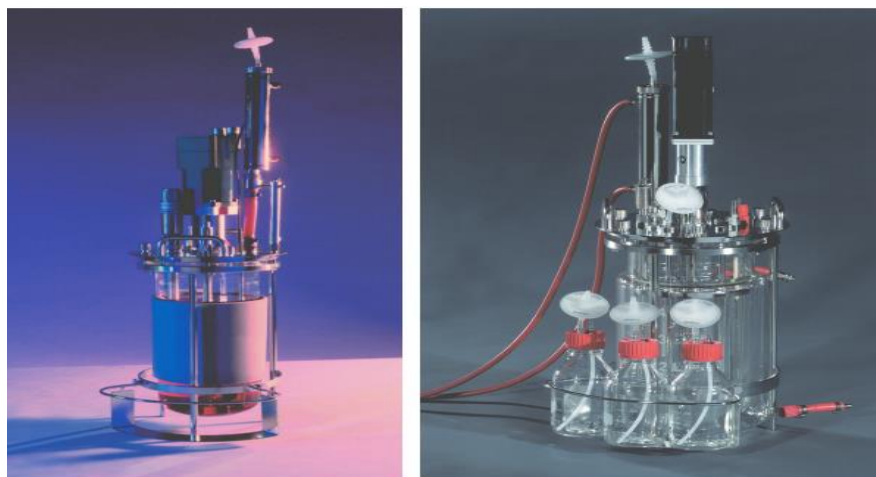


Figura 7: Equipo de cultivo cerrado UniVessel⁴¹

2.2.8. Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores son sistemas destinados para el cultivo de microalgas dotados de subsistemas que brindan las condiciones para permitir un correcto desarrollo del cultivo entre ellas fuente de luz, sistemas de manejo de aire, filtración, agitación y sistemas eléctricos. Se cuenta con fotobiorreactores con sistema abierto y sistema cerrado, los cuales tienen cualidades de acuerdo al tipo de cultivo que se quiera realizar (Ver figura 8).

Fotobiorreactores de columna: Cuentan con un sistema cerrado en el cual tienen una columna de burbujeo de material transparente la cual permite distribuir la luz de manera uniforme, tiene un subsistema para la retirada de O_2 y el aporte de CO_2 . Cuenta con un problema principal y es el escaldado además que su forma en columna no permite aprovechar la luz solar⁴²

Fotobiorreactores planos: Son similares a los fotobiorreactores de columna, pero intentan resolver los problemas que este presenta, pueden ser delgados para mejor paso óptico, verticales inclinados para orientarlos hacia el sol y maximizar la captación de luz y dependen del burbujeo⁴².

Fotobiorreactores tubulares: Es parte de los fotobiorreactores más sofisticados y especializados por lo tanto tiene un precio elevado. Su diseño se caracteriza por dos partes: Lazo y Desgasificador⁴².

-Lazo: Es quien lleva a cabo la captación de energía solar y permite optimizar la productividad maximizando la eficiencia fotosintética.

-Desgasificador: Es quien lleva a cabo el intercambio de materia especialmente la adsorción de O_2 y los intercambios térmicos⁴².

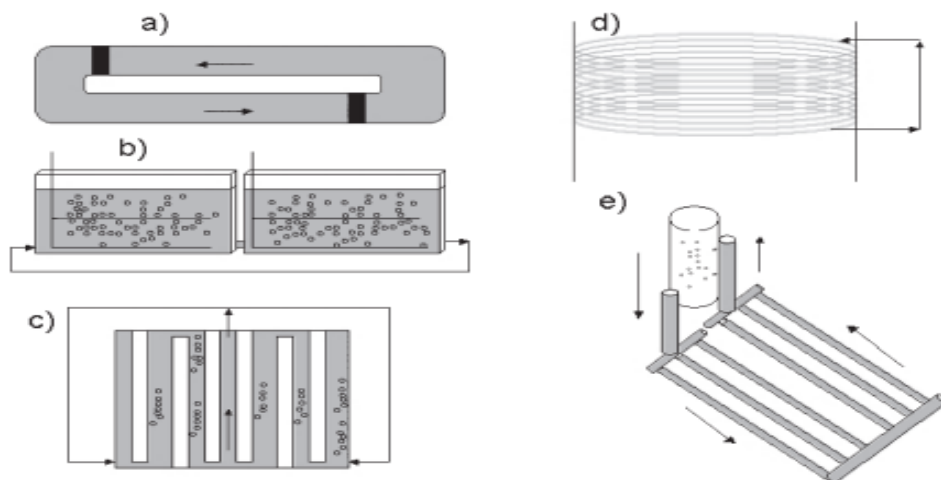


Figura 1. Tipos básicos de fotobiorreactores. a: Tipo carrusel, vista superior, los bloques negros indican propelas. b: Tipo plano, vista horizontal. c: Con iluminación interna, los bloques blancos indican espacios de iluminación. d: Tipo serpentin. e: Tipo tubular horizontal con sistema *airlift*.

Figura 8. Tipos básicos de fotobiorreactores⁴³

2.2.9. Biorreactor Tecferm 5 litros

Los recipientes de este tipo son diseñados para llevar a cabo procesos en los cuales el material de estudio requiera condiciones de desarrollo y producción adecuadas, el tamaño de este sistema puede variar entre 5L, 10L, 20L, 100L, y 200L de volumen, tiene aplicaciones microbianas o de cultivo celular, el volumen mínimo de trabajo es de 2 litros para lo cual se deben ajustar la altura de las aspás y el electrodo de pH. Cuenta con condiciones que se pueden controlar tales como la agitación dada en rpm que van desde 0 a 800 esto ayuda a mantener homogéneo el medio y destruir formas no requeridas dentro del cultivo, la escala de temperatura puede regularse automáticamente de acuerdo a un termómetro incluido dentro del equipo, el pH puede ser controlado en un rango entre 0 y 14, algunos sistemas cuentan con la capacidad de trabajar de forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno incluso con suministro de aire filtrado⁴¹. (Ver figura 9)



Figura 9: Fermentador Tecferm 5 litros. Foto: Angela Hernandez, 2018.

El biorreactor en el que se realiza el cultivo consta de un vaso de acero inoxidable (A) con mirilla lateral(B), empaque y aro de cierre(C), así mismo consta de una tapa (tipo head plate) y mangueras adaptadas a válvulas de muestreo(D)⁴¹.

El Biorreactor

Consta de un vaso en acero inoxidable con mirilla lateral, empaque y aro de cierre y cuenta con una tapa (tipo Head plate) con los siguientes servicios:

- Puerto de inoculación
- puertos de adición (medio, ácido, base)
- puertos auxiliares
- puerto de toma de muestras
- puerto de cosecha
- puerto para el filtro de salida (venteo)
- puerto de electrodo de pH
- puerto de electrodo de oxígeno
- tobera de inyección de aire/ gases con filtro de ingreso
termo pozo
- intercambiador de calor (con ingreso y salida)
- 4 deflectores, baffles o contracorrientes
- sistema de agitación con eje y 2 aspas tipo Rushton de 6 paletas

2.2.10. MODELOS DE CRECIMIENTO

Los datos generados durante el crecimiento las microalgas requieren del uso de modelos estadísticos adecuados que permitan representarlos con pocos parámetros y que además muestren las características del crecimiento. Según la bibliografía se estudia los modelos de crecimiento de Gompertz, Monod, Logístico y Baranyi por que tienen un sentido biológico ya que obtiene consideraciones sobre la forma de crecimiento.

Modelo de crecimiento logístico: En el modelo de crecimiento logístico explica que a mayor población P , menor tasa de crecimiento, donde inicialmente, la población crece rápido, por lo que esta se convierte en una fuente de presión constante, y pierde su capacidad de crecer al volverse muy numerosa, debido a interacciones con el medio o miembros de la población lo que da como resultado un estado de equilibrio ⁴⁴

La solución explícita de la ecuación diferencial está dada por la siguiente expresión conocida como modelo logístico⁴⁵.

Donde:

- **B** es cualquier número real positivo que depende de la condición inicial $N(0)$
- **A** es el valor del crecimiento máximo de la población

- **K** es la tasa de crecimiento intrínseco

La gráfica que representa el modelo logístico está representada por la figura 10:

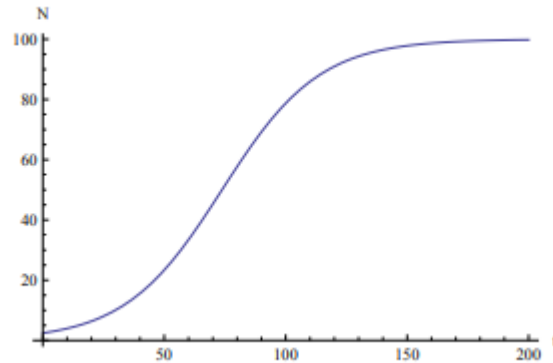


Figura 10: Curva del modelo logístico con $A= 100$, $B=40$, $K=0,05$
Tomado de Trinidad A. Modelos de crecimiento biológico⁴⁵.

Modelo de crecimiento de Gompertz: En el modelo de Gompertz se asume que la tasa de crecimiento se incrementa monótonicamente hasta cuando alcanza un máximo y después decrece en forma monótona asintóticamente. En esta se incluyen algunos parámetros biológicos del modelo logístico^{45,46}

Donde:

- **N** (t) es el tamaño de la población al tiempo t
- **A** es el valor del máximo crecimiento y además determina un punto de inflexión en
- **B** número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha
- **K** establece la tasa intrínseca de crecimiento.

La curva que representa el modelo de Gompertz está representada por la figura 11:

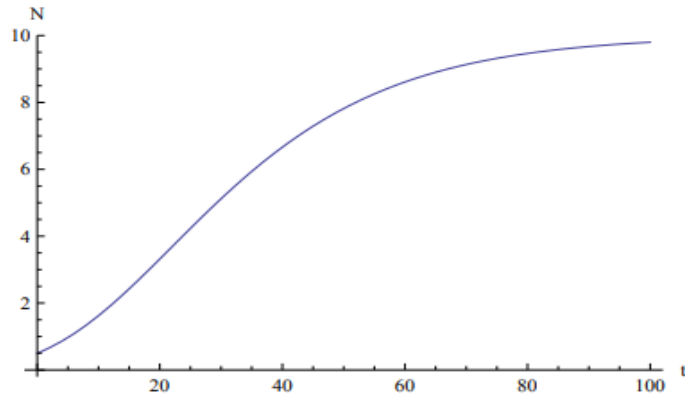


Figura 11: La curva de Gompertz con $A=10$, $B=3$, $K= 0.05$
Tomado de Trinidad A. Modelos de crecimiento biológico⁴⁵.

Modelo de crecimiento de Monod: En este modelo se tiene en cuenta la curva de crecimiento de un microorganismo y planteó para representar el comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo. Con base en ella, se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos (primarios o secundarios)⁴⁵.

La ecuación de Monod está representada por la siguiente fórmula, figura 12 y la gráfica en la figura 13:

$$\begin{cases} \frac{dX(t)}{dt} = \mu(S)X(t) \\ \frac{dS(t)}{dt} = -\frac{1}{Y} \cdot \frac{dX}{dt} \\ X(0) = X_0, S(0) = S_0, \end{cases}$$

Figura 12: Ecuación de Monod
Tomado de Trinidad A. Modelos de crecimiento biológico⁴⁵.

Donde:

- **X (t)** es la cantidad de células o biomasa al tiempo t, su unidad de medida es gr / L
- **μ(S)** es la velocidad específica de crecimiento en S, su unidad de medida es gr / L
- **t** es tiempo
- **Y** es la constante de rendimiento del sustrato limitante, se define como, Cantidad de biomasa producida /Cantidad de sustrato consumido.

- $X(0)$ y $S(0)$ condiciones iniciales de biomasa y sustrato respectivamente.

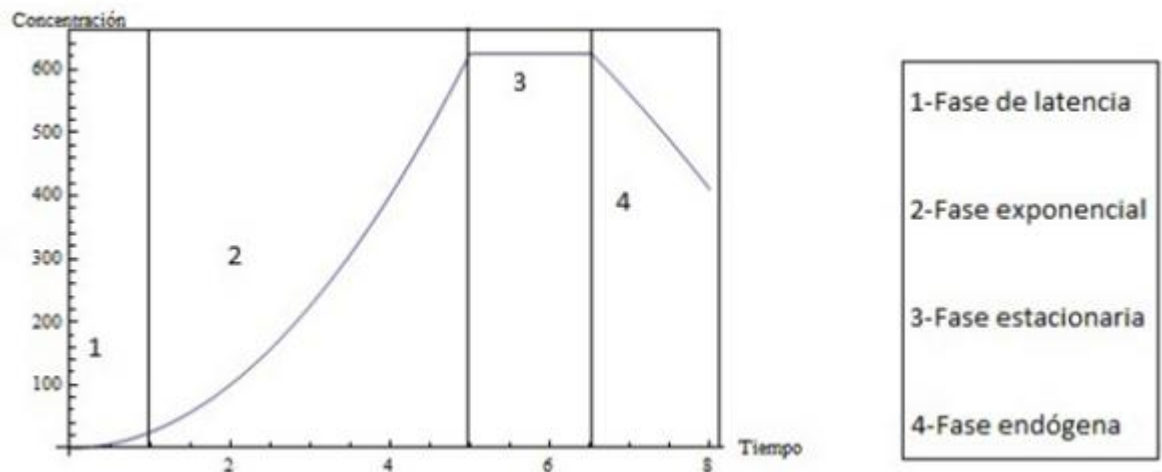


Figura 13: Curva que describe el crecimiento de un microorganismo
Tomado de Trinidad A. Modelos de crecimiento biológico⁴⁵.

Fase de latencia: Esta fase coincide con el periodo de adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales⁴⁵.

Fase exponencial: En esta fase las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (para levaduras o bacterias) o por el aumento en la biomasa por unidad de tiempo⁴⁵.

Fase estacionaria: En esta fase la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo es igual a la velocidad de descenso y esto implica un equilibrio celular⁴⁵.

Fase endógena: Se inicia cuando los nutrientes que están en el medio de cultivo no son suficientes para que el microorganismo pueda reproducirse⁴⁵.

Modelo de crecimiento de Baranyi:

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts en 1994 es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio $\mu(t)$ que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este coeficiente es igual a μ_{max} mientras que durante las fases de adaptación y

estacionaria se reduce por medio de los coeficientes $\alpha(t)$ y $\lambda(t)$ ambos comprendidos entre cero y uno⁴⁷.

La ecuación de Baranyi está representada en la siguiente fórmula

$$y(t) = y_{\max} + \ln \left[\frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \lambda) + \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot t) + \exp(\mu_{\max} \lambda + y_{\max} - y_0)} \right]$$

Figura 14: Ecuación de Baranyi

Tomado de Cayre M. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas.

Donde:

- $y(t) = \ln N(t)$, siendo $N(t)$ la densidad bacteriana (ufc.g^{-1}) al tiempo t ⁴⁸.
- $y_0 = \ln N_0$, siendo N_0 el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad bacteriana inicial (ufc.g^{-1})⁴⁸.
- $y_{\max} = \ln N_{\max}$, siendo N_{\max} el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad bacteriana (ufc.g^{-1})⁴⁸.
- $\mu_{\max} =$ máxima velocidad específica de crecimiento (tiempo^{-1})⁴⁸.
- $l =$ tiempo de latencia (tiempo)⁴⁸.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de estudio

Experimental, tipo de estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes dentro de una situación de control para el investigador, en este se realiza la producción de biomasa de *H. pluvialis* en un biorreactor Tecferm de 5 L en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

3.2. Hipótesis

En el biorreactor Tecferm de 5L se produce una biomasa adecuada en cantidad y calidad de *H. pluvialis* utilizando los medios de cultivo OHM y Kobayashi y las condiciones definidas.

Variables

Variable independiente: Condiciones de cultivo en el biorreactor Tecferm 5L y nutrientes disponibles en el medio.

Indicadores:

- Fotoperiodo: 18:6 Luz/Oscuridad
- Luz blanca por medio de lámparas fluorescentes blancas (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) Irradianza 65 lux
- pH: 6.8
- Agitación: 100 rpm
- Velocidad de aireación de 0,1 vvm
- temperatura 22°C ± 2

Variable dependiente: Microalga *Haematococcus pluvialis*

Indicadores:

Crecimiento celular expresado en cel/ml

Morfología celular: fase vegetativa, palmella y aplanospora.

Condiciones de cultivo:

- Crecimiento celular expresado en cel/ ml
- Inóculo de 1×10^4 cel/ml
- pH

- Clorofila mg/L
- Nitratos mg/L
- Fosfatos mg/L
- Astaxantina µg/ ml
- Conteo celular (cel/ml)
- Morfología celular

3.3. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Fase 1: Fase 1: Realización del cultivo de *H. pluvialis* en biorreactor Tecferm de 5 L.

Inóculo: La preparación del inóculo se realizó transfiriendo la cepa *H. pluvialis* UTEX en medio MES volvox estéril. (Ver tabla 6), con 10% de inóculo en un biorreactor que contiene 500 mL de medio

COMPOSICIÓN MEDIO MES VOLVOX	
Reactivos	Para 1 L
MES buffer	1.95 g
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	117.8 mg
Na ₂ -glicerofosfato * 5H ₂ O	60 mg
MgSO ₄ * 7H ₂ O	40 mg
KCl	50 mg
NH ₄ Cl	26.7 mg
Biotina (vitamina H)	0.0025 mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	0.0015 mg
Solución Stock de microelementos	6 mL
Solución Stock de microelementos	
Na ₂ EDTA	750 mg
FeCl ₃ * 6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ * 4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	4 mg
pH = 6.7	

Tabla 6: Composición de medio MES volvox.³³

El inóculo se sometió a las siguientes condiciones: fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad, utilizando un cronometro y luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Philips Master TL5 HO de 54W/827)³², aire filtrado, pH 6.7, agitación manual por 10 segundos al día y temperatura de 20°C por un periodo de 5 días. Se monitoreo la morfología y viabilidad celular del inóculo por microscopia cada 3 días, el recuento celular se realizó en cámara de Neubauer ⁶.

Ensayo en el Biorreactor Tecferm 5L

El inóculo se transfirió a los medios que serán objeto de estudio en este trabajo, OHM y Kobayashi, el volumen a inocular se estableció utilizando la fórmula:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

A partir de este cálculo se conoció el volumen a tomar del inóculo, se transfirió 10% del inóculo a los medios OHM y Kobayashi (ver tabla 3 y 4) teniendo una concentración celular de 1×10^4 cel/mL, siguiendo con el cultivo en el biorreactor Tecferm de 5L, las condiciones de crecimiento fueron, temperatura 20°C, agitación a 100 rpm, fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad, utilizando luz blanca por medio de lámparas fluorescentes blancas Phillips Master TL5 HO de 54W/827 irradianza 60 lux y pH de 6.8¹⁴

Estas condiciones se establecieron por medio de la consulta de la literatura previa y bibliografía de trabajos realizados previamente (Ver Anexo 11).

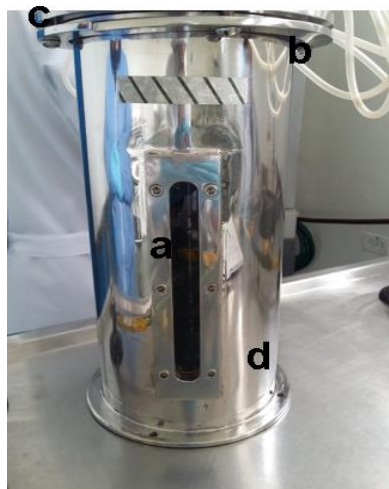


Imagen 1. Biorreactor Tecferm de 5 L donde se observa **a.** mirilla lateral, **b.** Aro de cierre, **c.** tapa tipo head plate y **d.** vaso inoxidable. Imagen tomada en el laboratorio Fuente: Leiton Y, 2018

Fase 2: Determinación de crecimiento celular y evaluación de la morfología durante el proceso.

El recuento celular se realizó mediante conteo en cámara de Neubauer cada 7 días además se llevó a cabo un registro fotográfico de la morfología de la microalga, las muestras se tomaron por triplicado²². Se realizaron curvas de crecimiento para determinar la tasa de crecimiento celular en los medios Kobayashi y OHM, cada lectura se realizó cada 7 días hasta completar 21 días de estudio.

Ajuste de curvas de crecimiento

A cada medio de cultivo se le realizó un ajuste de crecimiento celular según el modelo de crecimiento logístico empleado, utilizando el software DMFit basado en el modelo de Baranyi⁶⁰.

Fase 3: Determinación de parámetros para la selección del medio de cultivo

Determinación de Clorofila:

Se determinó la concentración de clorofila tomando 1 mL de muestra, posteriormente las células fueron extraídas por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos en centrífuga Eppendorf centrifuge 5702. El sobrenadante (medio de cultivo) fue retirado y se adicionó 1 mL de metanol al 90% y se incubó a 60°C por 10 minutos en baño serológico Memert. Para la cuantificación de clorofila se utilizaron patrones de referencia de clorofila con los cuales se realizó curvas de calibración. La concentración de clorofila se determina a una longitud de onda de 667 nm en un espectrofotómetro Jenway.³³ Se realizó una curva de calibración con los patrones de referencia xxx para determinar la linealidad estadística, las concentraciones utilizadas fueron 2, 4, 8, 12, 16, 20 µg/ml.

Determinación de Nitratos:

El nitrato fue analizado en los medios de cultivo por medio de la reacción colorimétrica con ácido salicílico donde se tomaron 20 µl de medio se incubaron con ácido salicílico al 2.5% H₂SO₄ al 98% durante 20 minutos, se procedió a realizar una neutralización con 500 µl de NaOH 3.8 M. La concentración de NO₃⁻ se realizó midiendo la absorbancia a 405 nm con la ayuda de un espectrofotómetro.⁵⁰ Se realizó una curva de calibración con los patrones de referencia de nitratos para determinar la linealidad estadística, las concentraciones utilizadas fueron 1, 2, 3, 4, 5 µg/ 20 ml.

Determinación de Fosfatos:

La concentración de fosfatos fue analizada en el sobrenadante de los medios de cultivo por medio de la reacción con ácido ascórbico mezclado con 50 µl de medio diluido con 50 µl de solución, esta contiene ácido ascórbico al 2% (peso/volumen), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5% (p/v) y H_2SO_4 0,6 M. Concentración en PO_4 . La concentración de PO_4 se ensayó midiendo la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro⁵⁰. Se realizó una curva de calibración con los patrones de referencia de fosfatos para determinar la linealidad estadística, las concentraciones utilizadas fueron 0, 1, 2, 3, 4, 5 µMol/20 ml.

Determinación de pH:

El pH se determinó utilizando un potenciómetro marca Hanna Instruments tomando 11 mL de muestra en tubo falcón. El potenciómetro fue calibrado antes de la medición insertando el electrodo en solución amortiguadora de pH 7.0 y posterior a lavado en solución de pH 4.0, al finalizar la calibración del potenciómetro, el electrodo se lavó con agua destilada y se procedió a la lectura de la muestra⁵¹.

Determinación de astaxantina:

Se determinó la concentración de astaxantina tomando 1 mL de muestra posteriormente las células fueron extraídas por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos en centrífuga eppendorf 5702. El sobrenadante (medio de cultivo) fue retirado y se adiciono 1 ml de metanol al 90% y se incubó a 60°C por 10 minutos en baño serológico Memert. Para la cuantificación de astaxantina se utilizaron patrones de referencia con los cuales se realizó las curvas de calibración. La concentración de astaxantina se determinó a una longitud de onda de 475 nm en un espectrofotómetro Jenway⁵². Se realizó una curva de calibración con los patrones de referencia de astaxantina para determinar la linealidad estadística, las concentraciones utilizadas fueron 50, 40, 30, 20, 10 µg/µl.

Análisis estadístico:

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Se empleó el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) para establecer diferencias significativas entre los diferentes tratamientos utilizados. Se utilizó el programa GraphPad Prism, para establecer cuál es el mejor tratamiento en el cultivo de *H. pluvialis*.

4. RESULTADOS

Fase 1. Realización del cultivo de *H. pluvialis* en biorreactor Tecferm de 5 L.

Las condiciones de trabajo establecidas en este estudio se dieron según la revisión teórica realizada que apoyan la selección de condiciones adecuadas para hacer un cultivo de la microalga *H. pluvialis* en el biorreactor, a escala de laboratorio de 5L Tecferm, entre ellas están pH, temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica, color de luz, concentración de micro y macro nutrientes, agitación y velocidad de suministro de aire u CO₂. La consulta incluyó trabajos donde se han usado biorreactores y fotobiorreactores (ver anexo 11).

En los estudios se encontró el uso de fotobiorreactores con volúmenes de 22 litros, 60 litros y biorreactores con un volumen mínimo de 200 ml, a partir de los cuales las condiciones seleccionadas fueron fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) con irradianza de 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura 22° C ± 2 por un periodo de 21 días de cultivo.



Imagen 2 Inoculo de *H. pluvialis* UTEX en medio MES volvox estéril. Foto tomada en el laboratorio, elaboración propia, 2018.

El inoculo inicial es parte fundamental del estudio es por esto que se evalúa su morfología y su densidad celular inicial como se muestra en la parte de metodología fase 1 para poder dar inicio al proceso en el biorreactor Tecferm 5L.



Imagen 3 Biorreactor Tecferm 5L. Foto tomada en el laboratorio, elaborada por el autor, 2018.

El biorreactor Tecferm debe cumplir con estándares de inocuidad antes de iniciar su proceso de cultivo, es por esto que se envió a la central de esterilización para poder proceder a instalar el equipo.

Fase 2: Determinación de crecimiento celular y evaluación de la morfología durante el proceso.

Los datos obtenidos de la densidad celular en los medios OHM y Kobayashi se encuentran en la tabla 7 y la gráfica 1. La densidad celular máxima fue de $1,23 \times 10^6$ Cel/ml y $1,0 \times 10^5$ Cel/ml en medio OHM y Kobayashi, respectivamente durante el tiempo empleado para el estudio. Se obtuvo un crecimiento celular mayor en el medio de cultivo OHM brindando una diferencia de crecimiento de $1,13 \times 10^6$ cel/ml como queda evidenciado en la gráfica 1 la cual indica el comportamiento que se logró durante toda la fase experimental en los medios utilizados.

Con respecto a la morfología obtenida en el proceso del cultivo de la microalga presentó diversas formas entre las cuales podemos destacar células flageladas y células palmeloides. En el cultivo realizado en el

medio Kobayashi se encontro una baja población de células enquistadas (Ver tabla 7). La fase exponencial de crecimiento de la microalga se ve reflejada entre los días 7 a 14 que es donde logra aprovechar al máximo los nutrientes disponibles en el medio luego de esto experimenta una desaceleración del crecimiento al cabo del día 15 de cultivo para el medio OHM en cambio para el medio Kobayashi este descenso en el crecimiento no es tan drástico y mantiene relación con la lectura del día 14 y 21, esto podemos correlacionarlo con la Gráfica 1 que nos muestra el comportamiento de *H. pluvialis* a lo largo del estudio.

Las condiciones del cultivo celular fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) con irradianza de 60 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura 22° C ± 2 demuestran ser las adecuadas de acuerdo a los resultados obtenidos durante el crecimiento de *H. pluvialis*. Como se había mencionado previamente en el medio OHM se incrementó el crecimiento en un 0.30% log con respecto al medio Kobayashi, lo que hace que el medio OHM sea adecuado en torno al crecimiento de la microalga. El analisis estadistico de Kruskal wallis $p < 0.005$ no muestra diferencias significativas para los tratamientos realizados.


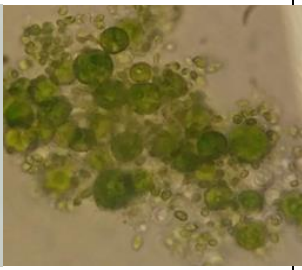
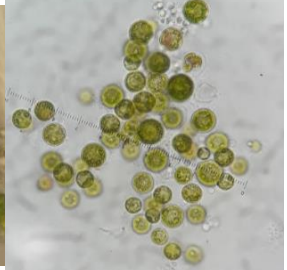
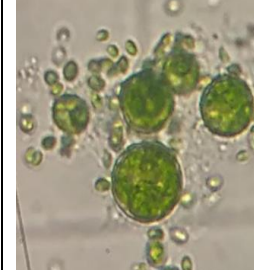

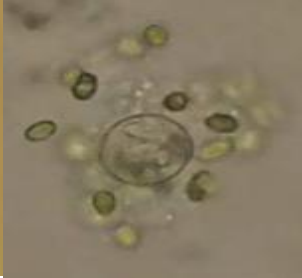
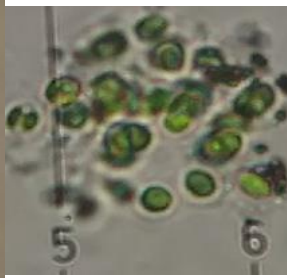

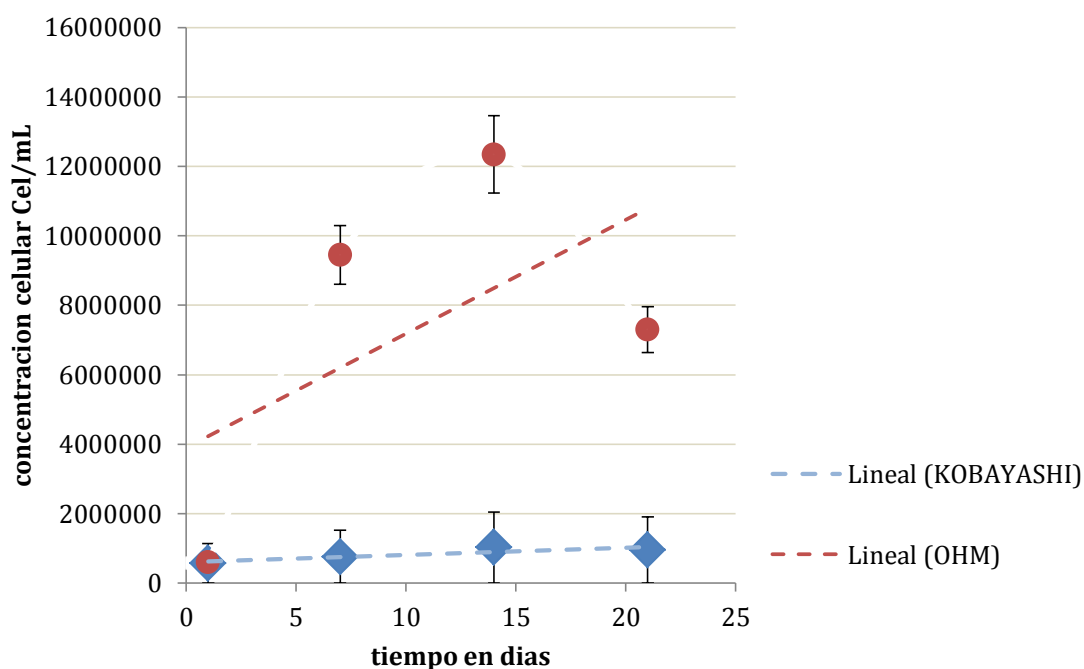
FOTOGRAFIAS DE LA DENSIDAD CELULAR				
DÍAS	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21
Crecimiento	5.9 x10 ⁴ Cel/ml	9.4 x10 ⁵ Cel/ml	1.23 x10 ⁶ Cel/ml	7.3x10 ⁵ Cel/ml
MEDIO OHM				
	5.6 x10 ⁴ Cel/ml	7.5 x10 ⁴ Cel/ml	1.0 x10 ⁵ Cel/ml	9.5 x10 ⁴ Cel/ml
MEDIO KOBAYASHI				

TABLA 7. Morfología en medio OHM y Kobayashi de la microalga *H.pluvialis*. Objetivo utilizado 40X. Elaboración del autor, 2018.



Gráfica 1. Curva de crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis* en medios OHM y Kobayashi. Elaborado por el autor, 2018.

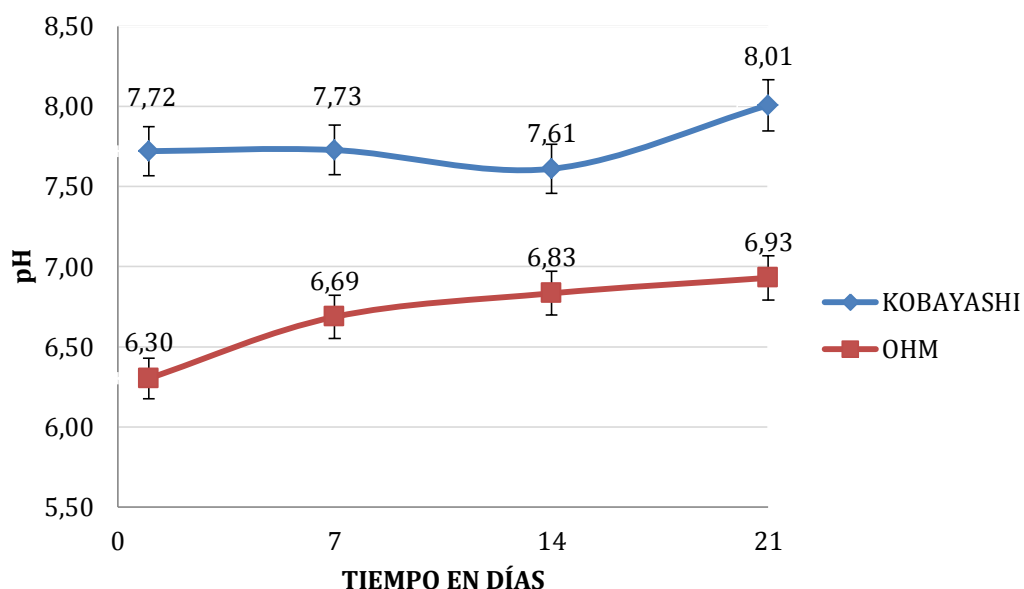
Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores en el eje y, de los cuales se calculó en logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. (Ver anexo 1) El medio de cultivo con mayor velocidad específica de crecimiento fue el OHM con una velocidad específica de crecimiento de 0.037 cel/día (Ver tabla 7) (ver anexo 1 curvas ajustadas)

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
OHM	4	5.774	6.863	0.037 cel/ml	47%
Kobayashi	4	5.752	5.977	0.022 cel/ml	78%

Tabla 8. Matriz de coeficientes del modelo de crecimiento logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo. Elaborado por el autor, 2018.

Fase 3: Determinación de parámetros para la selección del medio de cultivo

DETERMINACIÓN DE pH



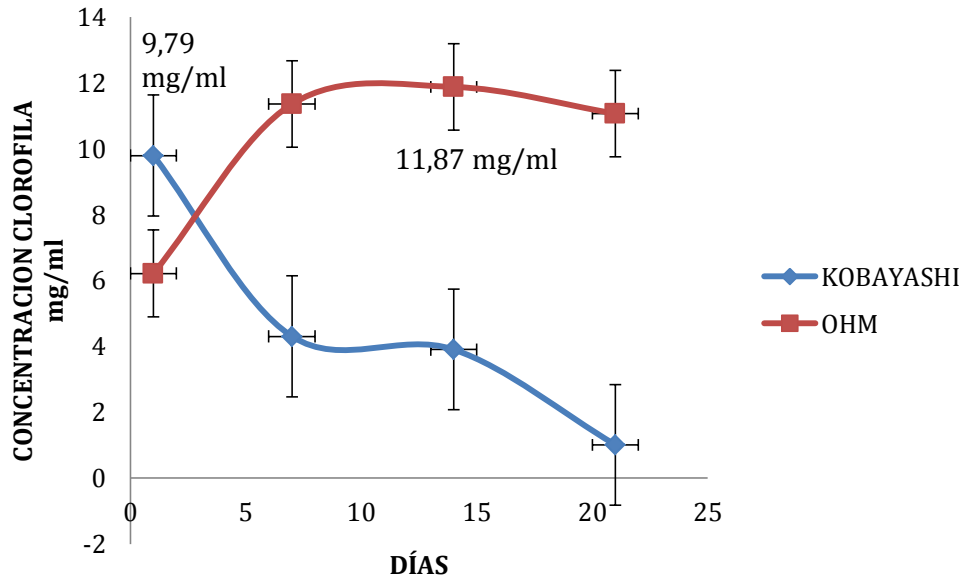
Grafica 2. pH de los cultivos de la microalga *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi Elaborada por el autor, 2018.

El cultivo OHM de *H. pluvialis* realizado en el medio presento un intervalo de pH de 6.3 a 6.9 y para el medio de cultivo Kobayashi un intervalo de 7.7 a 8.0, al realizar una correlación de los pH con el crecimiento celular de cada medio se establece que para este estudio se obtiene un mejor crecimiento y desarrollo celular al mantener un pH cercano a 7 donde brinda un rango de neutralidad al medio; como se puede observar en la Grafica 2 donde se obtuvo el mayor crecimiento celular en un 11% en el medio OHM y siendo el promedio de pH 6.8 durante el cultivo de la microalga en los 21 días que duró el estudio. (Ver Gráfica 1 y 2)

El pH general del estudio nos indica que durante el tiempo del ensayo fue posible controlar condiciones esenciales para la microalga como lo es este parámetro, las condiciones de trabajo en el biorreactor Tecferm 5L fueron las adecuadas y no se presentó contaminación; esto se confirmó por medio del conteo celular en cámara de Neubauer la cual permitía la visualización del estado microbiológico del cultivo. Según la literatura a pH superior de 7.0 ocurre sedimentación y lisis celular lo que sugiere que al manejar un rango superior a ese puede ser letal para la microalga y limita su desarrollo en el medio. En el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P <$

0.05) se establece que hay diferencias significativas entre los tratamientos con $P= 0.0044$ (ver anexo 10)

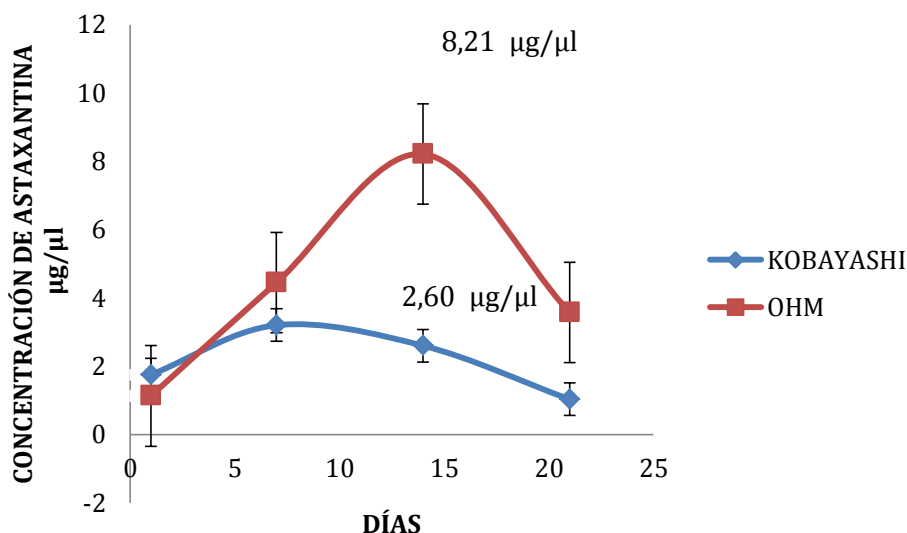
DETERMINACIÓN DE CLOROFILA (mg/ml)



Grafica 3. Concentración de clorofila obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2018.

En el cultivo de *H. pluvialis* en medio OHM la clorofila final obtenida el día 21 fue de 11.87 mg/ml y en el medio de cultivo Kobayashi fue de 9.79 mg/ml (ver grafica 3). Según los datos que se obtuvieron se observó una mayor concentración de clorofila en un 21% frente a la concentración obtenida en el medio Kobayashi. Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.2404$. Correlacionando con las gráfica 3 que muestra la concentración de la clorofila durante los 21 días de cultivo, mostrando que para el medio Kobayashi el contenido de clorofila fue menor en un 17 % (Ver anexo 7) lo cual se correlaciona con el porcentaje relacionado con el crecimiento celular; donde en este medio se obtuvo un valor menor de 1.0×10^5 Cel/ml (ver grafica 1)

DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA

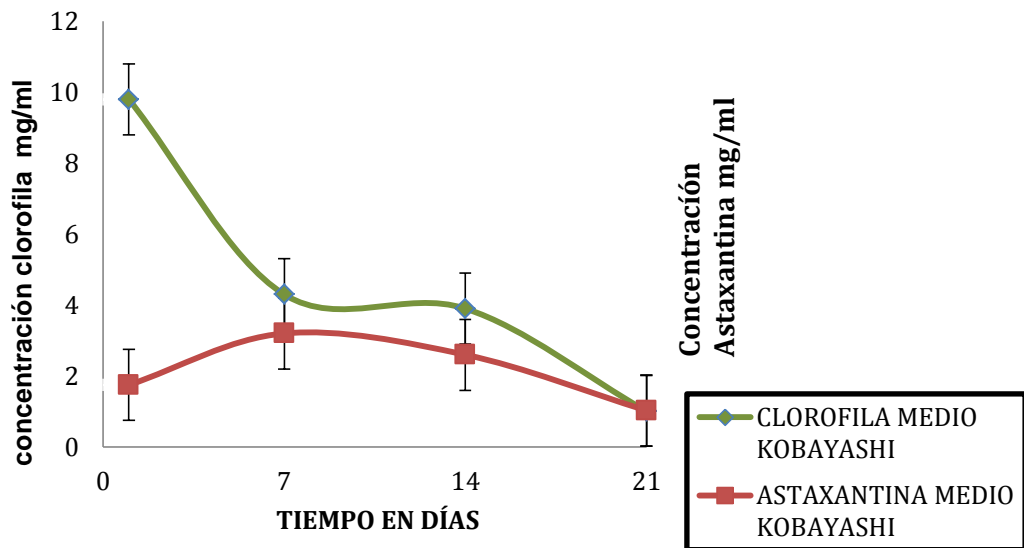


Grafica 4. Concentración de astaxantina obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2018.

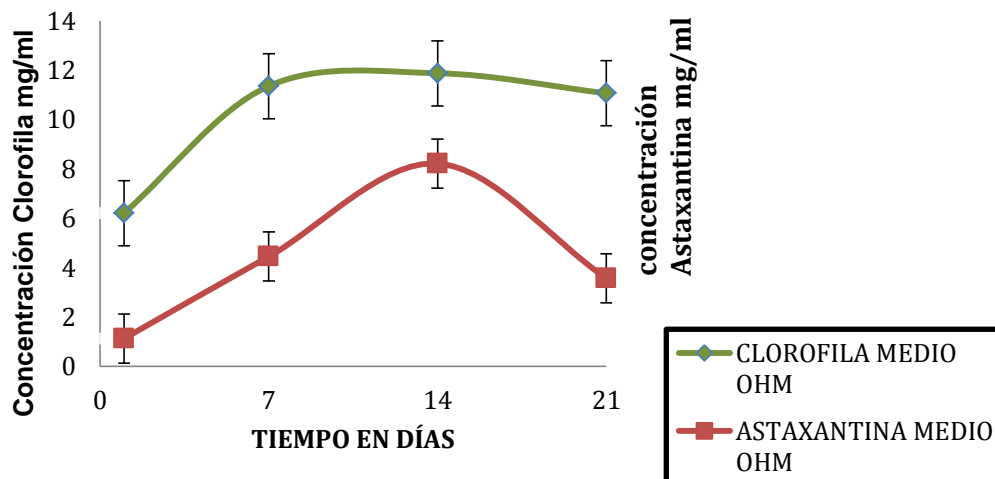
Los resultados obtenidos en el estudio se encuentran evidenciados en la gráfica 4 la cual nos indica la producción de astaxantina en cada uno de los medios utilizados, para el medio de cultivo OHM se registró la mayor producción del pigmento de 8.21 µg/µl y para el medio Kobayashi de 3.20 µg/µl. Según los datos obtenidos luego de la fase de cultivo se observó una mayor concentración de astaxantina de 61% en el medio OHM en comparación con el otro tratamiento.

Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos para la producción de astaxantina $P = 0.3929$; (Ver anexo 9) en los medios de cultivo empleados en este estudio, lo que se correlaciona con la gráfica 4 que muestra el comportamiento de la astaxantina durante los 21 días de cultivo, mostrando que para el medio OHM al cabo del día 15 se alcanzó un pico en la producción de astaxantina llegando a 8.21 µg/µl en comparación con el medio Kobayashi donde para ese día alcanzó una producción de 2.60 µg/µl (Ver grafica 4). Cabe resaltar que para el medio Kobayashi durante la fase final del cultivo se presentaron condiciones del medio que indujeron a estrés a la microalga iniciando así su proceso en enquistamiento (aplanospora roja) que la protege del estrés oxidativo⁵³

producido en el medio, como se logra ver en la tabla 6 para el día 21, mostrando la tonalidad roja característica de este estado.



Graficas 5 Concentración Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio Kobayashi. Elaboración del autor, 2018.



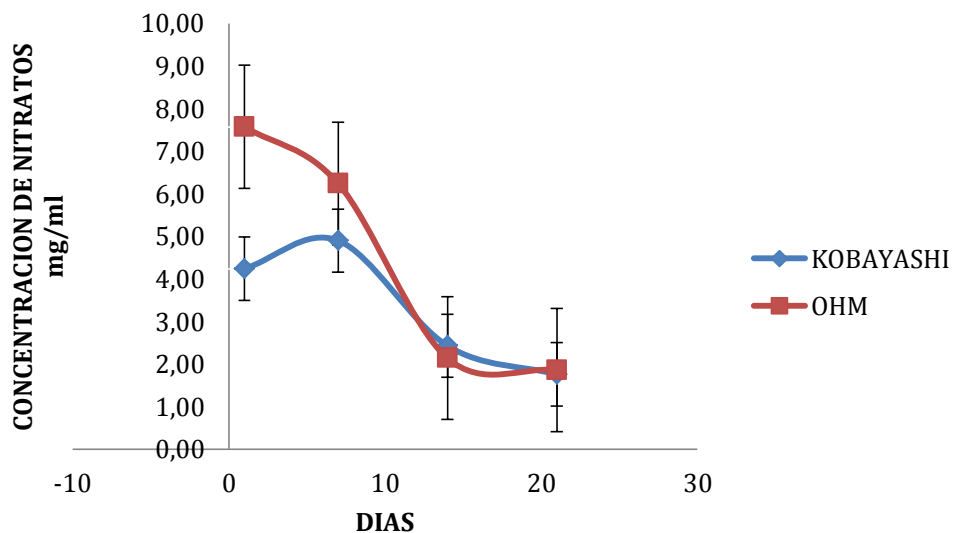
Graficas 6 Concentración Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio OHM. Elaboración del autor, 2018.

Al analizar la relación clorofila - astaxantina en los medios utilizados podemos observar que la producción del pigmento y la cantidad de clorofila son inversamente proporcionales como se puede evidenciar en la gráfica 5 observándose que a medida que aumenta la concentración de astaxantina disminuye la concentración de clorofila, esto quiere decir que

se da una relación inversa como se observa en el cultivo realizado en el medio Kobayashi. Esta relación se da gracias a la respuesta fisiológica de la microalga como adaptación al estrés aplicado por el medio de cultivo generando así fotoprotección por medio del enquistamiento mudando a la fase roja de la célula.

En el caso de la gráfica 6 donde se observa un comportamiento diferente en la clorofila debido a que tiene una relación proporcional con la astaxantina se puede decir que pudo deberse a que la tasa de crecimiento en el medio OHM fue más alta ($1,23 \times 10^6$ cel/ml) y que no ha terminado su fase exponencial de crecimiento y a medida que la microalga aumentaba su número de células vegetativas se incrementaba la concentración de clorofila, con respecto a la astaxantina pudo verse influenciado su aumento debido a la constante renovación de las células y su posterior estrés con algunas de las condiciones brindadas por el medio, como pudo ser la concentración de nitratos, la cual a medida que va siendo consumida por la microalga en el medio; aumenta la cantidad de astaxantina en *H. pluvialis*.

DETERMINACIÓN DE NITRATOS

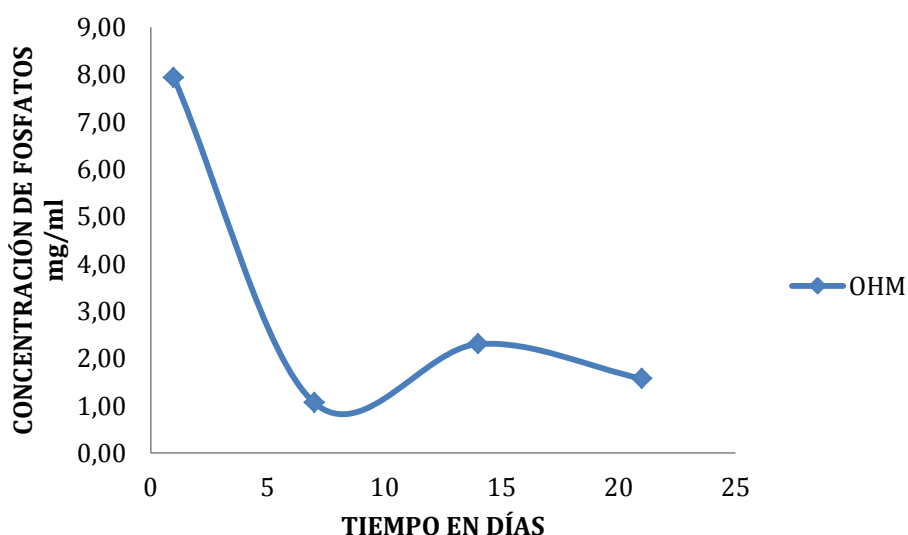


Gráfica 7. Concentración de nitratos durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2018.

El medio OHM presenta una concentración inicial de NaNO_3 de 7.57 mg/ml la cual al finalizar el tiempo de estudio terminó con un valor de 1.86 mg/ml en su concentración, si analizamos el consumo que se produjo tuvo un porcentaje de 75%, el medio Kobayashi tuvo una concentración inicial de 4.24 mg/ml y su concentración final de 1.76 mg/ml, la diferencia en su consumo tiene un porcentaje de 58%. El consumo de nitrato de sodio en el medio OHM se correlaciona con la tasa de crecimiento que presentó la microalga como lo evidencia la gráfica 1 dado que a mayor consumo de nitratos mayor es la tasa de división celular presentada en el medio teniendo en cuenta su velocidad de crecimiento que tuvo un valor de 0.03 cel/día (ver tabla 8)

Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) se presentaron diferencias significativas en los tratamientos $P = 0.0436$; (Ver anexo 8) Indicando que en ambos cultivos la microalga utiliza el NaNO_3 como nutriente para el crecimiento, siendo en el medio OHM en el cual la microalga tiene mayor capacidad de usar el nutriente hasta un 75% en los 21 días de estudio. En la gráfica 7 se encuentran consignados los datos obtenidos durante el cultivo de la microalga en cada tratamiento utilizado.

DETERMINACIÓN DE FOSFATOS



Grafica 8. Concentración de fosfatos durante el cultivo de *H. pluvialis* en el medio OHM, elaboración propia, 2018.

En la gráfica 8 se observa el consumo de fosfato de potasio (KH_2PO_4) para el medio OHM ya que era el único medio que presentaba este componente, la concentración inicial fue de 7.92 mg/ml y su concentración final fue de 1.57 mg/ml presentando una disminución del sustrato del 80%. No se lleva a cabo el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) ya que no se realizó este ensayo para el otro medio debido a que en su composición no hay fosfatos.

Si realizamos un análisis entre el consumo de fosfatos y nitratos por parte de la microalga en su etapa de cultivo para el medio OHM podemos evidenciar que el porcentaje de consumo se encuentra estrechamente relacionados debido a que contaban con cantidades similares iniciales y finales lo que nos puede indicar que, en este medio es importante contar con las cantidades adecuadas de cada componente para asegurar que el desarrollo de la microalga va a ser el adecuado, lo cual se evidenció ya que estos dos nutrientes incrementan el crecimiento de esta microalga en un 30 % log frente al cultivo donde se usa medio Kobayashi que solo posee nitrato de sodio en una menor cantidad.

Análisis de costos

El análisis se realiza con base en la comparación de la producción de un litro de medio de cultivo teniendo en cuenta cada componente y su concentración. El Medio OHM tiene un valor de producción de 11.357 pesos por litro de medio de cultivo y el medio Kobayashi 1.596 pesos. Siendo el medio más económico en su preparación el Kobayashi ya que contiene solo 6 reactivos y no incluye en su composición vitaminas. Las cuales sí están presentes en el medio OHM generando un incremento en su costo debido a la presencia de 11 reactivos diferentes. (Ver tabla 9)

MEDIO OHM			MEDIO KOBAYASHI		
REACTIVOS	mg/L	Precio (pesos)	REACTIVOS	g/L	Precio(pesos)
KNO ₃	0.41 g/L	0.41	Acetato de sodio	1.2	29.2
Na ₂ HPO ₄	0.03 g/L	0.03	L-asparagina	0.4	47.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.246 g/L	42.32	Extracto de levadura	2.0	558
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.11 g/L	21.0	MgCl ₂ 6H ₂ O	0.2	961
Fe(III)citrato H ₂ O	2.62	644.0	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01	0.76
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.011	0.97	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	0.055
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.012	1.27	-	-	-
Cr ₂ O ₃	0.075	2.325	-	-	-
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.98	702.66	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.12	648.0	-	--	--
SeO ₂	0.005	0.045	-	-	-
TIAMINA	15 µg/L	750.0	-	-	-
BIOTINA	17.5 µg/L	1.750	-	-	-
VITAMINA B12	0.026 g/L	4.472	-	-	-
TOTAL	11.357 PESOS		TOTAL	1.596 PESOS	

TABLA 9. Análisis de costos para producir 1L de medio OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2018.

A continuación se presenta una tabla resumen de los parámetros determinados por los cultivos realizados en los medios OHM y Kobayashi para el *H.pluvialis* incluyendo los costos de preparación para un litro de medio.

Medios	Kobayashi	OHM	Kruskal-Wallis (P < 0.05)
Densidad celular (cel/ml)	1.0×10^5 cel/ml	1.23×10^6 cel/ml	
pH	7.7 a 8.0 pH	6.3 a 6.9 pH	P= 0.0044 KW=20.59
Consumo de fosfatos %	No incluye el medio	80%	-
Consumo de nitratos %	58%	75%	P= 0.0436 KW=14.46
Clorofila (mg/ml)	9.79	11.87	P= 0.2404 KW=9.173
Astaxantina mayor producción de pigmento (ug/ul)	3.20 ug/ul	8.21 ug/ul	P= 0.3929 KW=6.277
Crecimiento máximo (cel/ml)	5.977	6.863	-
Velocidad de crecimiento Cel/día	0.022	0,037	-
Análisis de costos	1.596 pesos	11.357 pesos	-

Análisis estadístico Kruskal-Wallis. Diferencias significativas entre tratamientos $P < 0.05$

Tabla 10. Cuadro resumen de los parámetros trabajados durante el cultivo, elaboración propia, 2018.

Al comparar los resultados se puede observar que el medio para continuar el proceso de cultivo de la microalga y la obtención de productos como la astaxantina y clorofila utilizando el biorreactor Tecferm 5L es el medio OHM; por tener el mejor crecimiento celular, la mayor obtención de pigmentos, astaxantina y carotenoides como la clorofila; así como costos de producción no tan altos a pesar de utilizar vitaminas.

5. Discusión

El H. pluvialis cuenta con variedad de capacidades las cuales poco a poco han sido descubiertas para su uso en el ámbito industrial, alimentario y farmacéutico, es por ello que su consumo ha aumentado con el paso del tiempo y se hace necesario establecer condiciones óptimas que le brinden al cultivo cualidades adecuadas para lograr acoplarse al complejo ciclo de vida que realiza la microalga a lo largo de su desarrollo. El crecimiento de la microalga se caracteriza por ser bastante lento mientras produce cambios en aspectos bioquímicos y morfológicos en respuesta a su adaptación al medio en el cual se encuentre liberada, es por ello que la realización de trabajos como este servirá para futuras investigaciones en cultivos de esta microalga y producir una biomasa que sea tanto en cantidad como en calidad adecuadas para los procesos que se requieran.

Según los resultados del presente estudio, encontramos un gran número de variables con respecto a la microalga, como la morfología; quien nos brinda información acerca del estado actual de crecimiento y además datos clave de su composición bioquímica, para que la microalga atravesase por sus diferentes estadios se le proporcionaron condiciones establecidas según la revisión teórica realizada (Ver anexo 11) las cuales fueron fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) con irradianza de 60 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0.01 vvm⁵⁴ y temperatura 22° C ± 2, usando el biorreactor Tecferm 5L a escala de laboratorio, ya que como se describe en su protocolo es un biorreactor utilizado para el cultivo de microorganismos, hecho de acero inoxidable, sellado que brinda esterilidad al cultivo realizado, así como da la inclusión en su manejo de sensores de temperatura, pH y continua agitación, apagado/encendido y dos puntos de toma de muestra que aseguran que no haya contaminación.

El biorreactor posee la forma tubular ya que le ayuda a una mejor distribución de la luz en el cultivo, otros autores^{19,59,57} han utilizado fotobiorreactores y biorreactores con capacidades que varían desde los 22 litros, 60 litros hasta 200 ml, ya que poseen una ventana por la cual pasa la luz al cultivo. Gracias a estas cualidades la microalga realizó un cambio de formas vegetativas en ambos medios y avanzando a fase de enquistamiento en uno de ellos (Kobayashi) debido a un cambio en su ambiente acuoso generando estrés oxidativo y haciendo que la microalga

optara por enquistarse para protegerse así misma. Las formas que más tuvieron lugar en el cultivo fue la célula vegetativa flagelada, célula vegetativa palmeloide y la presencia de células con aspecto albino quienes nos guían presuntivamente a corroborar que las condiciones del medio eran adecuadas para el crecimiento de la microalga y que a lo largo de los 21 días fue posible tener un desarrollo exitoso de *H. pluvialis* según la literatura^{33,53}.

Los hallazgos respecto a morfología comparados con Leiton²³ quien en el año 2018 empleo el biorreactor Tecferm 5L con medio BBM y RM en condiciones de cultivo similares a este estudio donde el método de caracterización microscópico brindó un estimado de biomasa obtenida y cualidades de las células descritas, en este estudio se presentó una frecuencia de células vegetativas flageladas verdes que tuvieron predominio durante su observación en el cultivo sin llegar a estadios de enquistamiento a diferencia del presente cultivo que logró alcanzar esta fase debido a condiciones del medio que generaron estrés en la microalga, la experimentación se llevó a cabo en el biorreactor Tecferm de 5L lo que hace comparable estos dos estudios debido a que comparten grandes características durante su proceso.

Otro estudio con el que se llevó a cabo una comparación respecto al tipo de estructuras morfológicas presentadas durante el cultivo fue el que realizó Garcia *et al*⁷ donde muestra que llevó a cabo el crecimiento de la microalga en un biorreactor tubular de 0,22m³ implementado con extremos blancos para aumentar la irradianza de la luz sobre las células y luego proporcionarle condiciones de crecimiento tales como temperatura, pH, luz blanca y la adición de nitrato como fuente de nutrientes, aquí se logró realizar la caracterización de las células obtenidas por medio de imágenes digitales que brindaba un microscopio invertido el cual contaba con la articulación con el programa Image-pro plus 4.5.1 de Media Cybernetics, donde proporcionaba información sobre la población celular, diámetro celular y homogeneidad de las células, confirmando que la población más recurrente en el estudio era las células en estado vegetativo palmeloide y las células flageladas; la baja variabilidad entre el estudio de Garcia y el presente trabajo indican que las condiciones trabajadas y mencionadas anteriormente en el biorreactor Tecferm 5L son las adecuadas y permiten la obtención de biomasa de alta cantidad y calidad.

Jian Li⁹ reporta en su estudio haber obtenido una concentración celular máxima de 1×10^6 cel / ml en un medio que contenía acetato de sodio, nitrato de potasio, elementos principales, oligoelementos y vitaminas cultivado en un bioreactor tubular tipo airlift, esta concentración concuerda

con la obtenida en este estudio para el medio OHM que fue de $1,23 \times 10^6$ cel/ml quien se acerca al valor del estudio en comparación, los dos medios comparten similitudes en sus componentes además las condiciones de cultivo tienen puntos de convergencia que pueden dar razón a la poca variabilidad de los resultados en la densidad celular obtenida.

Con respecto al medio Kobayashi encontramos el artículo de Ranjbar *et al*⁹ donde se emplea un biorreactor de columna de burbujas en vidrio donde en condiciones similares a las del presente estudio tales como fase luz/oscuridad, diversidad de nutrientes; entre ellos nitratos y fosfatos y ajuste de pH 7-8 se llevó a cabo el cultivo de la microalga, el medio utilizado como fase inicial del crecimiento fue Kobayashi y para la fase de mantenimiento y desarrollo a largo plazo se utilizó el medio inorgánico estándar quien comparte atributos principales del medio Kobayashi además de contar con vitaminas B1 y B12. En este estudio la concentración celular obtenida fue superior a $3,5 \times 10^6$ cel/ml sin generar cambio morfológico hacia la fase de enquistamiento, este valor puede ser comparado con el obtenido en el medio Kobayashi del presente estudio donde la concentración máxima fue de 1.0×10^5 cel/ml dado a que la cantidad de medio utilizada en el primer estudio es mucho más grande y el tiempo de estudio sobrepasa el de esta investigación se hace una comparación a escala, brindando así similitudes en los dos hallazgos y logrando correlacionar el funcionamiento correcto de las condiciones de cultivo sobre la microalga.

La microalga requiere condiciones que aseguren su crecimiento, es por esto que es importante elegir el medio con las características adecuadas, tipo de biorreactor a utilizar y cualidades óptimas para el desarrollo del ciclo de vida de las células, entre ellas cabe resaltar el pH, temperatura, aire filtrado, fotoperiodo luz/oscuridad y color de luz que se le brinde al cultivo. En el estudio de Jian li *et al*¹² muestra que para obtener un crecimiento óptimo el pH fue mantenido en 7.5, lo cual se corrobora con el crecimiento obtenido en el estudio realizado ya que se mantuvo en un intervalo de 6.9 a 7.7 en los dos medios lo que permitió el desarrollo y crecimiento de la microalga, por otro lado para futuros cultivos es importante conocer que la disminución del pH está directamente relacionada con la liberación de protones en el medio debido al proceso de fotosíntesis incrementando porcentualmente la acidez del medio y afectando el desarrollo normal de la microalga, es por esto que se convierte en una parte fundamental asegurar esta condición cercana a la neutralidad⁷.

En este estudio se contó con dos medios de cultivo, OHM quien posee la adición de concentraciones de nitrato de sodio (NaNO_3) y fosfato de

potasio (KH_2PO_4) por otro lado el medio Kobayashi quien solo dispone de concentraciones de nitrato de sodio (NaNO_3), la implementación de estos nutrientes en el medio según la literatura⁷ confiere la capacidad a la microalga de alcanzar una mayor división celular, así como mayor tasa de acumulación de pigmentos en la población microalgal. Según Salazar *et al*⁵⁵ en el año 2012 medios que contengan una cantidad de 1.25 g/L de NaNO_3 tienen mayor capacidad de mejorar la densidad celular a obtener; tal como lo podemos relacionar con el tratamiento realizado con OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm donde haciendo una comparación entre las magnitudes de medio manejadas en el artículo de Salazar y el presente estudio se pueden establecer valores de confianza al manejar estas cantidades de nutriente a escala de laboratorio, por otro lado según Ramírez *et al*³⁴ en 2018 dice que una cantidad de 3,4 mM de KH_2PO_4 muestran un efecto positivo en el crecimiento de *H. pluvialis* valor con el cual se puede hacer una comparación entre la escala utilizada para el estudio de Ramírez *et al* y el estudio actual dando como resultado que al comparar la cantidad de medio utilizado, si se manejaron concentraciones relevantes para cumplir con la finalidad del nutriente ya que este aumenta la capacidad replicativa de la célula y promueve su desarrollo óptimo.

La diferencia en el diseño del biorreactor, la cantidad de luz y cantidad total de carotenoides y pigmentos presentes influyen directamente en el contenido de clorofila y astaxantina que la microalga pueda alcanzar. En este estudio el diseño del biorreactor y la adición de nutrientes explican el por qué el contenido de biomasa de calidad y buena cantidad varía tanto, el equipo Tecferm de 5L cuenta con una mirilla delgada por donde la microalga aprovecha la irradiancia de luz brindada al medio de cultivo, al contar con una longitud corta puede impedir el aprovechamiento de la luz y ser insuficiente para la totalidad del cultivo pero es allí donde el biorreactor brinda la posibilidad de contar con agitación controlada en rpm haciendo que el medio se mantenga en agitación constante y la totalidad del medio pueda aprovechar las cualidades que le confiere la luz sobre sus células haciendo este diseño comparable con el diseño del estudio de Yoo JJ *et al*¹³ donde se implementó un biorreactor en forma de letra V para poder lograr una agitación continua y más profunda del medio logrando una favorable distribución de la luz en todo el medio.

Como se mencionó anteriormente en el biorreactor Tecferm se cuenta con la presencia de una mirilla delgada que permite el paso de la luz para que la microalga pueda aprovechar la irradiancia de esta y así poder entrar en etapa fotosintética; para este estudio se empleó fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) con irradiancia de 65 lux, la variación entre la fase oscura y la fase fotica del cultivo cumple con la función de fotosíntesis y la fase de respiración respectivamente; con respecto a el

color de la luz este influye directamente sobre la absorción de los fotones debido a que las moléculas de los pigmentos de las plantas tienen la capacidad de aprovechar diferentes longitudes de onda que van desde 700nm a 400nm donde se genera el radio de activación fotosintética⁵⁶. La microalga tiene presencia de clorofila *a* y *b* quienes se ven estimuladas en su concentración al utilizar luz de color azules y rojas como en el estudio de T. Xi *et al*⁵⁷ en 2016 donde fueron empleados estos colores para generar un aumento en la biosíntesis de clorofila y astaxantina de la microalga; en el biorreactor Tecferm se utilizó luz blanca a fin de establecer si esta longitud de onda ejercía el mismo efecto sobre la microalga dando un resultado positivo para el OHM donde se registró un alto contenido de clorofila en *H. pluvialis* de 11,87 mg/ml comparado con el estudio de T. Xi donde se registró un aumento del 50% en la concentración de astaxantina y clorofila en fotobiorreactores de 250 ml diseñados en frascos de Erlenmeyer.

El diseño del biorreactor es una característica importante del estudio ya que contamos con una variedad bastante extensa de ejemplares, entre los más utilizados están los de sistema abierto donde utilizan directamente la luz solar pero que debido a su prolongada exposición al ambiente logran contaminarse con facilidad y tienen pérdida de medio por evaporación; encontramos también los de sistema cerrado como los de columna airlift donde maneja bajo consumo de energía y baja cantidad de estrés, manejo de la temperatura, mezclado óptimo del medio y amplio radio de iluminación, fotobiorreactor en bolsa plástica donde debido a su diseño tiene costos de producción bastante bajos, airlift de panel plano donde su diseño brinda características como bajo poder de consumo de energía, amplio rango de aprovechamiento de luz, control de temperatura y bajo capital de operación; todos ellos comparten cualidades muy atractivas a la hora de realizar un estudio pero al realizar un análisis de sus desventajas tienen un alto costo de adquisición del fotobiorreactor, limitaciones en la obtención de la luz como en el caso de la bolsa plástica y en la mayor parte de los casos tienen un alto costo de limpieza del equipo. Es por esto que el biorreactor Tecferm al tener un diseño tubular cuenta con cualidades óptimas para la realización de trabajos a escala de laboratorio, brindando ventajas como diseño simple, gran área de iluminación, mezclado por medio de aspas y sistema cerrado para evitar contaminación del medio con fuentes externas que puedan dañar el desarrollo óptimo de la microalga, esta comparación se logra gracias al estudio de Huang *et al*⁵⁸ en 2017 donde describe las diferencias entre cada biorreactor y la influencia que cada uno tiene sobre los parámetros analizados en este estudio como pH, aireación, periodo luz/oscuridad, rpm y tipo de luz que recibe el medio a través del fotobiorreactor brindando como resultado que emplear este modelo de biorreactor brinda un valor

agregado al cultivo e implementa formas diversas y a bajo costo para la producción de biomasa de *H.pluvialis*.

6. CONCLUSIONES

-Las condiciones de cultivo en el biorreactor Tecferm 5L, fotoperiodo 18:6 Luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) irradianza 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado y temperatura $22^{\circ} \text{C} \pm 2$ por un periodo de 21 días brindan a la microalga *H. pluvialis* la capacidad de sobrevivir y replicarse en un ambiente óptimo como lo es un medio de cultivo, se cuenta con la variabilidad de diseños para llevar a cabo el cultivo de la microalga y en este caso el biorreactor Tecferm de 5L actuó de la manera esperada brindando el lugar para la obtención de biomasa de calidad.

-El cultivo de *H. pluvialis* llegó a obtener en los medios OHM y Kobayashi un crecimiento celular de 1.23×10^6 cel/ml y 1.0×10^5 cel / ml respectivamente, bajo las condiciones mencionadas previamente además se encontraron diferencias significativas para los parámetros pH y nitratos. Por otra parte, podemos encontrar que se logra llevar a cabo la acumulación de pigmentos como la clorofila con una concentración máxima de 11.87 mg/ml para OHM y 9.79 mg/ml Kobayashi sin obtener diferencias significativas $P=0.2404$ entre los dos tratamientos, razón por la cual los dos medios tienen el potencial para generar gran cantidad de clorofila.

-El cultivo de *H.pluvialis* presentó una concentración máxima de 8,21 ug/ul de astaxantina en el medio OHM y 3,20 ug/ul en medio Kobayashi. El análisis estadístico realizado no demostró diferencias significativas entre tratamientos $P=0.3929$.

-La morfología celular observada como células flageladas, palmeloides y enquistadas de la microalga en condiciones de cultivo como las realizadas en el biorreactor Tecferm 5L se ven beneficiadas en un mayor grado por condiciones como la intensidad de luz y pH ya que gracias a ellos se van desencadenando aspectos bioquímicos positivos en *H. pluvialis*

-El consumo de nitratos fue de 75% para el cultivo realizado en el medio OHM y de 58% para el realizado en el medio Kobayashi. El analisis estadistico Kruskal Wallis ($P < 0.05$) estableció que sí existen diferencias significativas entre tratamientos $P = 0.0436$ El consumo de fosfatos solo se pudo observar en el medio OHM siendo de 80% ya que en el medio Kobayashi no hay presencia de este nutriente.

-El análisis de costos permite establecer que la producción de 1 litro de medio OHM tiene un valor de \$11.357, siendo más costoso que el valor obtenido para obtener 1 litro de medio Kobayashi, el cual es \$1.596 pesos.

-El cultivo en el biorreactor Tecferm permitió obtener en los dos medios OHM y Kobayashi una biomasa de la microalga *H. pluvialis* en buena calidad y cantidad, sugiriendo el medio OHM por sus resultados para continuar procesos de escalamiento en este biorreactor.

7. RECOMENDACIONES

-Tener en cuenta la trayectoria de la luz en el biorreactor Tecferm para que la incidencia de la luz sobre la microalga pueda ejercer efecto sobre la fotosíntesis *H. pluvialis*, esta no debe ser mayor de 2-5 cm.

-Continuar utilizando el biorreactor Tecferm 5L en estudios posteriores ya que al contar con un diseño de tipo tubular es más sustentable para el cultivo de *H. pluvialis* ya que cuentan con un área amplia de iluminación con una buena tasa de producción de biomasa.

8. Referencias

1. P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101(1):87–96.
2. A. Hernández-Pérez, J. I. Labbé. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2014; 49:157–173
3. Lorenz T. A technical review of Haematococcus Algae. Cyanotech Corporation. 1999.
4. Fábregas J, Otero A, Maseda A, Domínguez A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *J Biotechnol*. 2001; 89(1):65–71.
5. Cifuentes A, Gonzales M, Vargas S, Hoeneisen M. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res* 2011; 36: pp. 343-357.
6. Lopez Garcia M C, Del Rio E, Casas J, Fernández F, Fernández J, Rivas J, *et al*. Comparative analysis of the outdoor culture of Haematococcus pluvialis in tubular and bubble column photobioreactors 2006; 123(3):329-342.
7. García-Malea, M. C., Acién, F. G., Fernández, J. M., Cerón, M. C., & Molina, E. *Continuous production of green cells of Haematococcus pluvialis: Modeling of the irradiance effect*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006 38(7), 981–989.
8. Grewe C, Griehl C. Time-and media-dependent secondary carotenoid accumulation in Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Journal* [Internet] 2008;3 :1232-44.
9. Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2006; 39:575-580.
10. Bao Yu Z, Ya Hong G, Zhong K, Hong Jun H, Ye Guang Li. Production of astaxanthin from Haematococcus in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*. 2009; 295: 275–281

11. Tocquin P, Fratamico A, Franck F Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol.* 2012; 24:365–373.
12. Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis* . *Biotechnology Advances.* 2011; 29(6), 568–574.
13. Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, Sim SJ. Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35(1-2):309-15.
14. Saha S, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Tecnology.* 2013; 128:118-124.
15. Galvao R, Santana T, Fontes C, Sales E. Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Research.* 2013, 4:50-56
16. Wan M, Hou D, Li Y, Fan J, Huang J, Liang S et al. The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Tecnology.* 2014; 163:26-32.
17. Sipaùba L, Berchielli F, Scardoeli B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology.* 2015; 75(4): pp 796-803
18. Hexin Lv, Feng X, Miao L, Xianggan C, Fazli W, Shiru Jia. Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research.* 2016; 20:35–43.
19. Christwardana M, Hadiyanto H. The Effects of Audible Sound for Enhancing the Growth Rate of Microalgae *Haematococcus pluvialis* in Vegetative Stage. *HAYATI Journal of Biosciences.* 2017; 24(3):149-155.
20. Cai. W, Dunford N.T, Wang. S, Zhu. H. Audible sound treatment of the microalgae *Picochlorum oklahomensis* for enhancing biomass productivity. *Bioresour Technol,* 202 (2016), pp 226-230
21. Larsen P, Gilbert J. Microbial Bebop: Creating Music from Complex Dynamics in Microbial Ecology. *PLoS ONE.*2013; 8(3):e58119.
22. Niño Castillo C, Rodríguez Rivera F, Díaz L, Lancheros Díaz A. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *NOVA-SciELO.org.co.* 2017; 15 (28): 19-31
23. Leiton Y.A. Producción de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor tecferm de 5 l en medios de cultivo RM y BBM. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca. 2018
24. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010; 14(2):557-577.
25. Benavente J. R.1, Montañez J. C., Aguilar C. N, Méndez A, Valdivia B. Tecnología de cultivo en microalgas en fotobiorreactores, AQM 2009 revista de divulgación científica. Publicación de la coordinación de

- estudios de postgrado e investigación y la facultad de ciencias químicas. Universidad Autonoma de Coahuila. 04-2011-101709565500-102v
26. 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. 2013;8(7):e67028.
 27. Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. Frontiers in Plant Science. 2016; 7(531).
 28. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*. 2000;108(2):111-117.
 29. Jaramillo R. Producción de Astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus Pluvialis*. Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. UDLA. 2015. 66 p.
 30. Instituto tecnológico de Sodora, Mc Gahey L, Uzziel A. Produccion de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* 2017.
 31. Ba F, Ursu A, Laroche C, Djelveh G. *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. *Bioresource Technology*. 2016; 200:147-152.
 32. Andex Biothechnology, Franklin Street 567, Manhattan, New York, USA.
 33. Richmond A, Hu Q. Handbook of Microalgal Culture. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 2013.
 34. Ramirez D.. Evaluacion del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Universidad Nacional de Colombia [Tesis Master] 2013.
 35. Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah M. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2010;11.
 36. Gómez Luna L. MICROALGAS: ASPECTOS ECOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS. *Revista Cubana de Química [Internet]*. 2018; XIX, (2): 3-20.
 37. Gonzalez C. Alicia.¿Qué Son Las Microalgas? Interés Y Uso [Internet]. *Grupocooperativocajamar.es*. 2018
 38. Granada P, Granada R. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. 2015.
 39. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991;71(5):335-339.
 40. Cultivo de microalgas: sistemas abiertos vs sistemas cerrados | CO2ALGAEFIX. *Co2algaefix.es*. 2012.
 41. Sartorius Stedim Systems GmbH. <http://www.sartorius-stedim.com>. 2018.
 42. Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Universidad de Almería.

43. Contreras C, Peña Castro J, Flores Cotera L, Cañizares Villanueva R, Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas *Interciencia*, 2003;28(8): 450-456
44. [Internet]. Legislación vigente en los organismos genéticamente modificados. *Catarina.udlap.mx*. 2012.
45. Trinidad bello a. modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste. *mat.izt.uam.mx*. 2014.
46. Casas GA, Rodríguez D, Afanador G. Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2010; 23:349-358.
47. Garre Pérez A, Egea Larrosa, J, Fernández Escámez P. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*. 2016;9.
48. Cayré M, Vignolo G, Garro O. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *Información tecnológica*. 2007;18(3).
49. M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. *Asian Journal of Plant Biology* 2014; 2 (1): pp. 01-06
50. Tocquin P, Fratamico A, Franck F. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *Journal of Applied Phycology*. 2011; 24(3):365-373.
51. Universidad Autónoma de Tamaulipas, tutorial de análisis de agua. México. *Bacteriología y potabilidad del agua*. 2012 - Educational innovations
52. Hernandez K, Perez M, Jauregui Carmen, Alcantara L, Hurtado Lilia. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Rev. mex. Cienc. Farm.* [revista de internet] 2015 46(1):7-16
53. García-Malea, M. C., Acién, F. G., Fernández, J. M., Cerón, M. C., & Molina, E. *Continuous production of green cells of Haematococcus pluvialis: Modeling of the irradiance effect. Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 981–989.
54. Fernandez M, Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana*, Universidad EAFIT Departamento de Ingeniería de Procesos Medellín Colombia 11-2013.
55. Salazar M, Monroy O, Beristain R, Cuevas F, Mendoza C. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México; 2012.
56. OpenStax, The Light-Dependent Reactions of Photosynthesis. OpenStax CNX. 9 de octubre de 2013.
57. Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J.-S., & Choi, Y.-E. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED

- wavelength shift strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016; 100(14), 6231–6238.
58. Huang Q, Jiang F, Wang L, Yang C. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms green chemical engineering-review. 2017;3(3):318-329.
 59. 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*, 119(3), 345–350. (2015).
 60. 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*. 2013 25(1), 253-260.
 61. Wan M, Hou D, Li Y, Fan J, Huang J, Liang S, Wang W, Pan R, Wang J Li S. The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Technol*. 2014;163:26-32.
 62. Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). *The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of Haematococcus pluvialis during a light-dark cyclic cultivation. Bioresource Technology, 167, 276–283.*
 63. Damiani MC, Popovich CA, Constenla D, Leonardi PI. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour Technol*. 2010 Jun;101(11):3801-7.
 64. Cordoba N, Acero N, Duque L, Jimenez L, Serna J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis* UGCiencia. 2015; 21: 73-82.
 65. Wang J, Han D, Sommerfeld M, 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*. 2013; 25(1) 253-260
 66. Bedoya J, Hoyos R, efecto de la reacción agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de azadiractina en cultivos celulares de *azadirachta indica* a. juss, *Rev.Fac.Nac.Agron. Medellín*. 2010; 1(63): 5293-5305, ISSN, electrónico 2248-7026 ISSN impreso 0304-2847,
 67. Rendon castrillon L, Ramirez Carmona M, Velez Salazar Y. *Microalgas para la industria alimenticia*. 1st ed. Medellín: Editorial Universidad Pontificia Bolivariana; 2015.
 68. Mendiola J.A. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos *J. of Supercritical Fluids* 43 (2008) 484–489
 69. Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs*. 2014; 12, 128–152.
 70. Shah, Md. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J. & Daroch, M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7.

71. Collins, A. M. Carotenoid distribution in living cells of haematococcus pluvialis (chlorophyceae). *PLoS ONE*. 2011; 6
72. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis. *Bioresource Technology*. 2005; 96(3), 373–378.
73. Domínguez A. R., Guerrer I., Martinez, F.Tomasini A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Bioresource Technology*.2004;92:(2), 209–214.
74. Imamoglu, E., Sukan, F. V., & Dalay, M. C.Effect of different culture media and light intensities on growth of Haematococcus pluvialis. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 2007 1(3), 5–9.
75. Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H., & Sim, S. J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68(2): 237–241
76. Han, D., Li, Y., & Hu, Q. Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013
77. Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., & Sim, S. J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga Haematococcus pluvialis in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*2006; 31(3): 234–238.
78. Del Río, E., Acién, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E., & Guerrero, M. G. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga Haematococcus pluvialis in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*.2005;91(7): 808–815.
79. Kathiresan, S., & Sarada, R. Towards genetic improvement of commercially important microalga Haematococcus pluvialis for biotech applications. *Journal of Applied Phycology*.2009; 21(5): 553–558.
80. Han, D., Li, Y., & Hu, Q. Biology and Commercial Aspects of Haematococcus pluvialis. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2013:388–405
81. Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., & Pavasant, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of Haematococcus pluvialis in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*.2007; 98(2): 288–295.
82. Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., & Tanaka, H. Production of astaxanthin by Haematococcus pluvialis in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*. 2001; 13(5): 395–402.
83. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. Intensified green production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Food and Bioproducts Processing*. 2016; 99:1–11.
84. Sun, H., Guan, B., Kong, Q., Geng, Z., & Wang, N. Repeated cultivation: Non-cell disruption extraction of astaxanthin for Haematococcus pluvialis. *Scientific Reports*. 2016; 6.

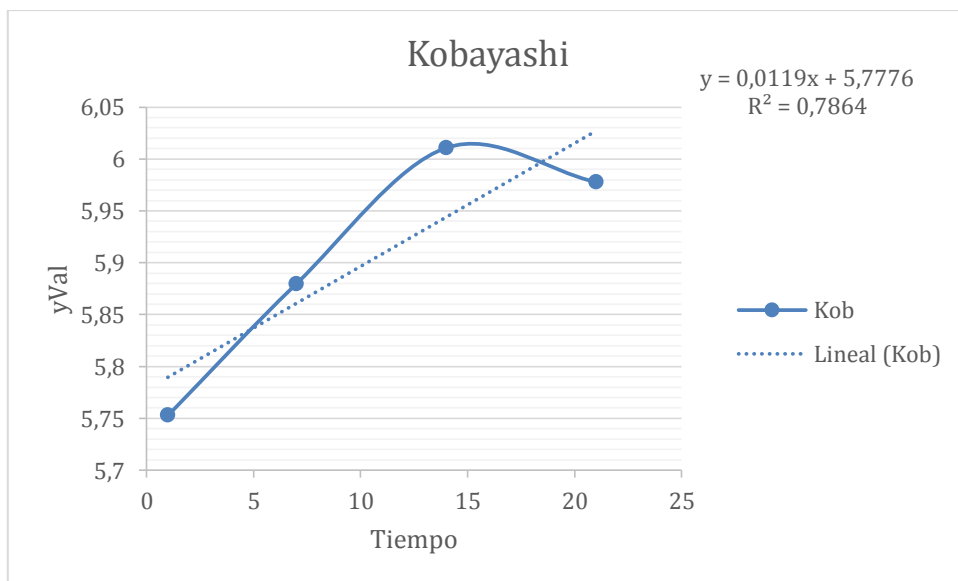
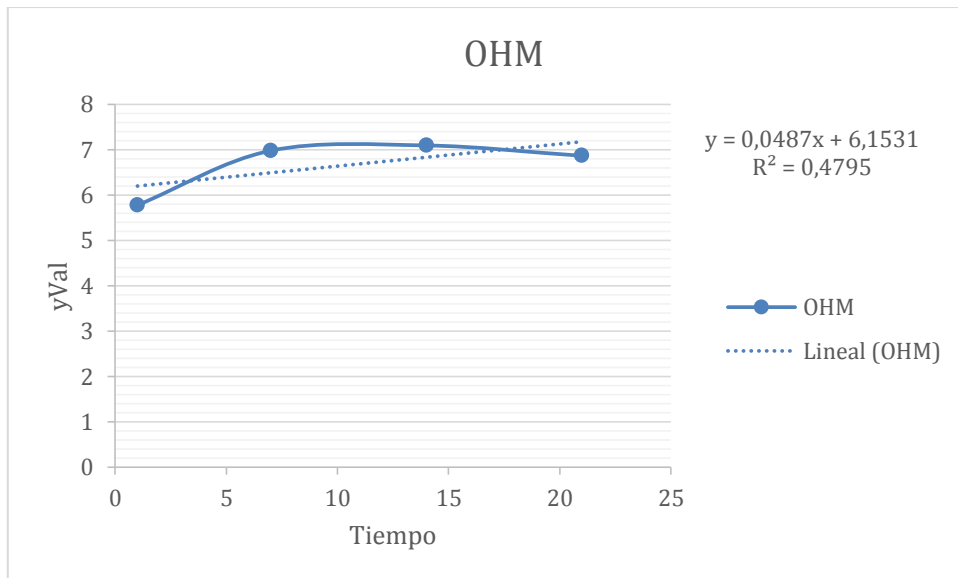
85. Kim, Z. H., Kim, S. H., Lee, H. S., & Lee, C. G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006;39(3): 414–419.
86. Göksan, T., Ak, İ., & Kihç, C. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2011;11: 377–383.
87. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs*.2014; 12(8): 4504–4520.
88. Issarapayup, K., Powtongsook, S., & Pavasant, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*.2009; 142(3–4), 227–232.
89. Hanan, N. A., Al-Shorgani, N. K., Shukor, H., Abd. Rahman, N., & Kalil, M. S. Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluvialis* Growth. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*.2016; 3(2): 168.
90. Yilmaz, C., & Gökmen, V. Chlorophyll. In *Encyclopedia of Food and Health* 2015; 37–41.
91. Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*.2001; 92(2), 113–131.
92. Quinn, J., de Winter, L., & Bradley, T. Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource Technology*. 2011;102(8): 5083–5092
93. Sierra, E., Ación, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C., & Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*.2008; 138(1–3), 136–147.
94. Tang, H., Chen, M., Simon Ng, K. Y., & Salley, S. O. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012; 109(10): 2468–2474
95. Liao, Q., Li, L., Chen, R., & Zhu, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. *Bioresource Technology*. 2014; 161, 186–191.
96. Zijffers, J. W. F., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. Design process of an area-efficient photobioreactor. *Marine Biotechnology*, 2008;10(4), 404–415.
97. Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Morosinotto, T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*.2012 7(6).
98. Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*.2001; 92(2), 113–131

99. Suh, I. S., & Lee, C. G. Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. 2003
100. De Mooij, T., de Vries, G., Latsos, C., Wijffels, R. H., & Janssen, M. Impact of light color on photobioreactor productivity. *Algal Research*. 2016; 15, 32–42.

9. ANEXOS

ANEXO 1

AJUSTE DE DATOS PARA CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS MEDIOS OHM Y KOBAYASHI

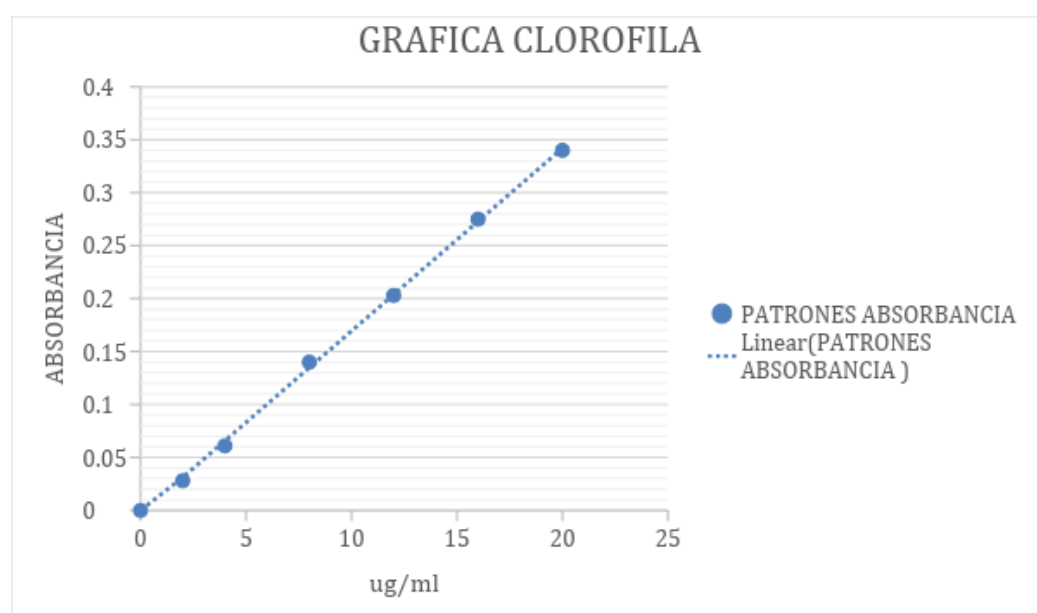


Valores de crecimiento en Logaritmo base 10				
Medio OHM			Medio Kobayashi	
Tiempo/DIA	Concentraciòn		Tiempo/DIA	Concentraciòn
1	5,77451697		1	5,75281643
7	6,97543181		7	5,87966921
14	7,09135035		14	6,01072387
21	6,86332286		21	5,97772361
Velocidad de crecimiento	0,037 cel/dia		Velocidad de crecimiento	0,022 cel/día
Coeficiente de determinacion	48%		Coeficiente de determinacion	79%

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

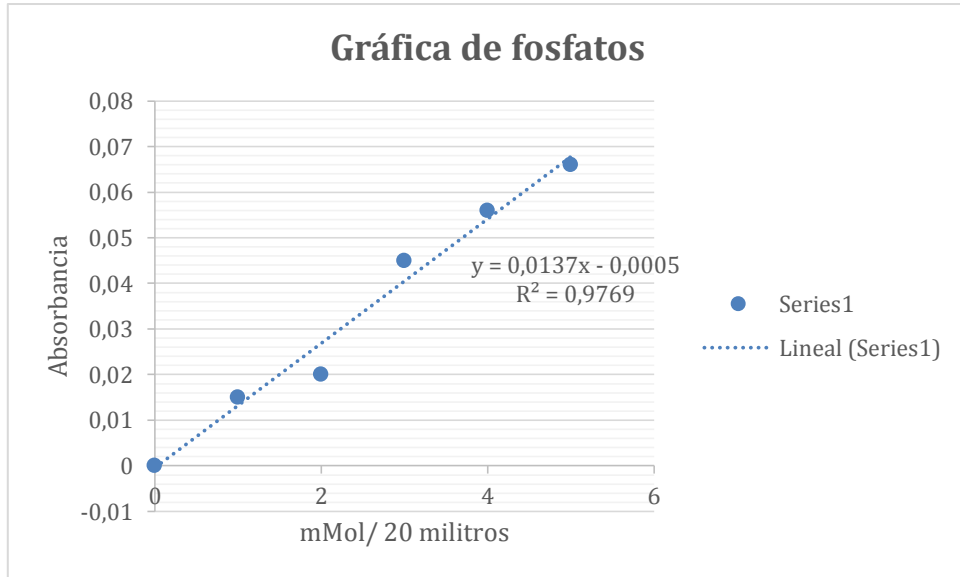
DATOS CURVA DE CALIBRACION	
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	A= 667nm
2	0.028
4	0.061
8	0.0140
12	0.203
16	0.275
20	0.340



ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE FOSFATOS

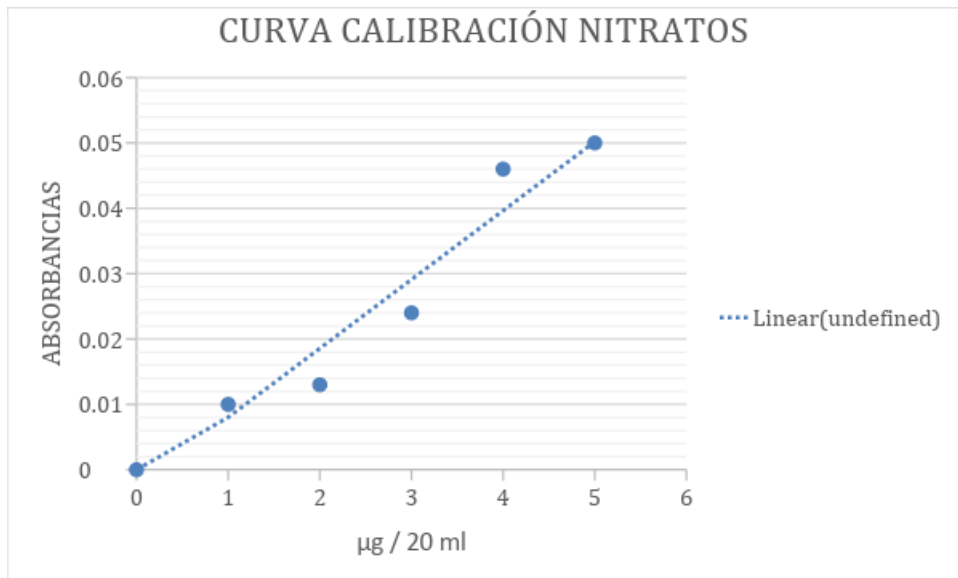
CONCENTRACION ($\mu\text{Mol}/20\text{ ml}$)	ABSORBANCIA
0	0
1	0,015
2	0,02
3	0,045
4	0,056
5	0,066



ANEXO 4

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS

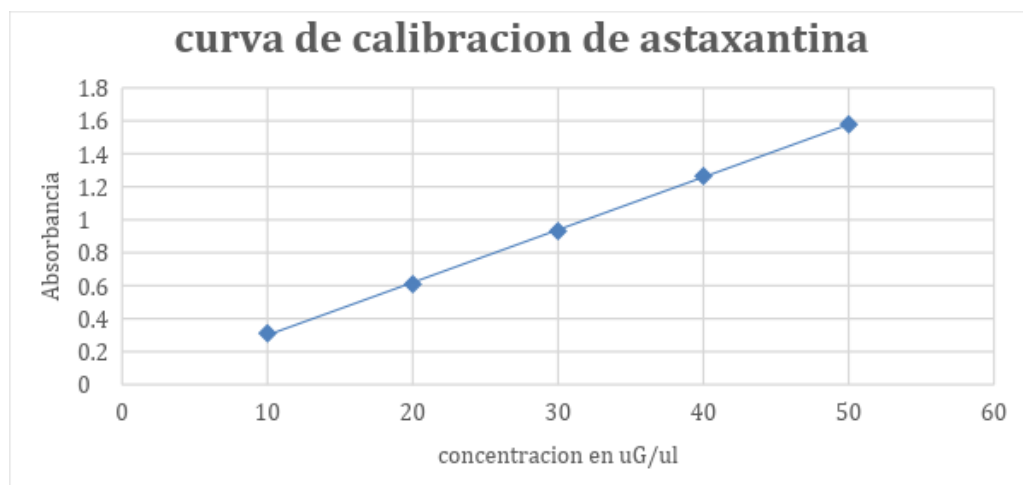
$\mu\text{g} / 20 \text{ ml}$	ABSORBANCIA
1	0,04
2	0,052
3	0,096
4	0,184
5	0,2



ANEXO 5

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA

CONCENTRACION $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	ABSORBANCIA
50	1,579
40	1,266
30	0,932
20	0,61
10	0,311



**ANEXO 6 TEST ESTADISTICO KRUSKAL WALLIS – CRECIMIENTO
CELULAR EN MEDIOS OHM Y KOBAYASHI**

Table Analyzed	OHM
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0757
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	6,883

	Día 1 OHM	Día 7 OHM	Día 14 OHM	Día 21 OHM
Number of values	3	3	3	3
Minimum	25	33	40	25
Median	31	56	71	36
Maximum	32	66	149	45
Mean	29,33	51,67	86,67	35,33
Std. Deviation	3,786	16,92	56,16	10,02
Std. Error	2,186	9,77	32,43	5,783
KS normality test				
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
D'Agostino & Pearson omnibus normality test				
K2	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Shapiro-Wilk normality test				
W	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				

Sum	88	155	260	106

Table Analyzed	KOBAYASHI
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0811
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	6,729

	Dia 1 KOB	Dia 7 KOB	Dia 14 KOB	Dia 21 KOB
Number of values	3	3	3	3
Minimum	15	23	36	29
Median	25	30	42	40
Maximum	28	38	45	45
Mean	22,67	30,33	41	38
Std. Deviation	6,807	7,506	4,583	8,185
Std. Error	3,93	4,333	2,646	4,726
KS normality test				
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
D'Agostino & Pearson omnibus normality test				
K2	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				
Shapiro-Wilk normality test				
W	N too small	N too small	N too small	N too small
P value				
Passed normality test (alpha=0.05)?				
P value summary				

Sum	68	91	123	114

ANEXO 7

TEST ESTADISTICO KRUSKAL WALLIS - CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

Table Analyzed	CLOROFILA
Kruskal-Wallis test	
P value	0,2404
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	9,173

	DIA 1 KOB	DIA 7 KOB	DIA 14 KOB	DIA 21 KOB	DIA 1 OHM	DIA 7 OHM	DIA 14 OHM	DIA 21 OHM
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,023	0,053	0,054	0,011	0,049	0,029	0,058	0,028
Median	0,033	0,073	0,059	0,012	0,121	0,241	0,162	0,187
Maximum	0,442	0,089	0,08	0,021	0,143	0,309	0,388	0,403
Mean	0,166	0,07167	0,06433	0,01467	0,1043	0,193	0,2027	0,206
Std. Deviation	0,2391	0,01804	0,0138	0,005508	0,04917	0,146	0,1687	0,1882
Std. Error	0,138	0,01041	0,007965	0,00318	0,02839	0,08432	0,09741	0,1087
KS normality test								
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
D'Agostino & Pearson omnibus normality test								
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								

Shapiro-Wilk normality test								
W	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
Sum	0,498	0,215	0,193	0,044	0,313	0,579	0,608	0,618

ANEXO 8

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CONCENTRACIÓN DE NITRATOS

Table Analyzed	NITRATOS
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0436
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	14,46

	DIA 1 KOB	DIA 7 KOB	DIA 14 KOB	DIA 21 KOB	DIA 1 OHM	DIA 7 OHM	DIA 14 OHM	DIA 21 OHM
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,027	0,021	0,013	0,012	0,066	0,023	0,014	0,015
Median	0,036	0,028	0,017	0,017	0,07	0,062	0,018	0,016
Maximum	0,065	0,098	0,039	0,021	0,095	0,105	0,028	0,021
Mean	0,04267	0,049	0,023	0,01667	0,077	0,06333	0,02	0,01733
Std. Deviation	0,01986	0,04258	0,014	0,004509	0,01572	0,04102	0,007211	0,003215
Std. Error	0,01146	0,02458	0,008083	0,002603	0,009074	0,02368	0,004163	0,001856
KS normality test								
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
D'Agostino & Pearson omnibus normality test								

K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
Shapiro-Wilk normality test								
W	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
Sum	0,128	0,147	0,069	0,05	0,231	0,19	0,06	0,052

ANEXO 9

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA

Table Analyzed	ASTAXANTINA
Kruskal-Wallis test	
P value	0,3929
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	7
Kruskal-Wallis statistic	6,277

	DIA 1 KOB	DIA 7 KOB	DIA 14 KOB	DIA 1 OHM	DIA 7 OHM	DIA 14 OHM	DIA 21 OHM
Number of values	3	3	3	3	3	3	3
Minimum	0,023	0,06	0,023	0,092	0,042	0,077	0,028
Median	0,538	0,086	0,065	0,206	0,156	0,244	0,086
Maximum	0,576	0,108	0,082	0,241	0,175	0,412	0,174
Mean	0,379	0,08467	0,05667	0,1797	0,1243	0,2443	0,096
Std. Deviation	0,3089	0,02403	0,03037	0,07791	0,07193	0,1675	0,07351
Std. Error	0,1783	0,01387	0,01753	0,04498	0,04153	0,09671	0,04244
KS normality test							
KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small

P value							
Passed normality test (alpha=0.05)?							
P value summary							
D'Agostino & Pearson omnibus normality test							
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value							
Passed normality test (alpha=0.05)?							
P value summary							
Shapiro-Wilk normality test							
W	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value							
Passed normality test (alpha=0.05)?							
P value summary							
Sum	1,137	0,254	0,17	0,539	0,373	0,733	0,288

ANEXO 10

Table Analyzed	PH
Kruskal-Wallis test	
P value	0,0044
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	20,59

	PH 1 KOB	DIA 7 KOB	DIA 14 KOB	DIA 21 KOB	DIA 1 OHM	DIA 7 OHM	DIA 14 OHM	DIA 21 OHM
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3
Minimum	7,52	7,15	7,53	7,86	6,17	6,67	6,73	6,88
Median	7,65	7,99	7,63	7,91	6,33	6,69	6,82	6,95
Maximum	7,99	8,04	7,67	8,25	6,41	6,7	6,95	6,96
Mean	7,72	7,727	7,61	8,007	6,303	6,687	6,833	6,93
Std. Deviation	0,2427	0,5	0,07211	0,2122	0,1222	0,01528	0,1106	0,04359
Std. Error	0,1401	0,2887	0,04163	0,1225	0,07055	0,008819	0,06386	0,02517
KS normality test								

KS distance	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
D'Agostino & Pearson omnibus normality test								
K2	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
Shapiro-Wilk normality test								
W	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small	N too small
P value								
Passed normality test (alpha=0.05)?								
P value summary								
Sum	23,16	23,18	22,83	24,02	18,91	20,06	20,5	20,79

ANEXO 11

CUADRO COMPARATIVO DE CONDICIONES DE CULTIVO EN DIFERENTES BIORREACTORES

FERMENTADOR	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES	EVALUACION DE MEDIO DE CULTIVO	BIOMASA OBTENIDA	REF
Fotobiorreactor de Columna de burbujas 1litro	Nies-C con acetato de sodio 10 mM como fuente de carbono orgánico	Iluminación continua $25\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 25 °C, luz continua, pH 7.5	Para el biorreactor de columna, las células de algas se recolectaron mediante centrifugación del fluido de inducción a 4000 g durante 10 min, se lavaron con agua destilada y se secaron a 80°C durante 24 h. Mientras que la célula del disco de algas se lavó y se volvió a	20 g m ⁻²	16

			suspender con un volumen de agua destilada, y luego se midió el peso seco del disco de algas.		
FBR de columna cilíndrica de 200 ml diámetro interior 3,6 cm	C- Medium para el precultivo y para el cultivo final Medio modificado estandar.	Luz continua, 20° a 30.5 °C pH 7.5 Rociada con 100 ml min 1 de aire enriquecido con CO2 al 5% v / v.	La biomasa se determinó por peso seco (DW) se almacenaron en un horno a 80° C toda la noche y se pesaba al día siguiente. El número de total de células se midió usando un contador Coulter.	-1.7x10 ⁶ cel/ml -6.0x10 ⁵ cel/ml	59
Frascos de Erlenmeyer utilizados como FBR de 250 ml	OHM	50 μmol m ⁻² s ⁻¹ de luz roja con longitud de onda (630-665 nm) y luz azul (λmax 430-465 nm) LED. 25±0,5 °C Ciclo de iluminación oscura de 20H/ Luz nocturna. Inyección aire filtrado 100 ml min pH 7.5	El Crecimiento se midió filtrando la suspensión de algas a través de una membrana de nitrato de celulosa previamente seca y prepesada de 0.45 μm en papel de filtro y secado en un horno a 80°C durante 24 horas	LED roja: 3,5x10 ⁴ cel/ml LED Azul: 2,3x10 ⁴ cel/ml	57
FBR acrílico de 60 litros	Medio OHM	Inyección aire filtrado 100 ml min Sin adición de CO ² Ciclo 12 horas luz/ 12 horas oscuridad	Para la medición de la biomasa se utilizó un espectrofotómetro a 680 nm. Se utilizó un hemocitómetro para medición de biomasa	0.4x10 ⁴ células / ml Productividad diaria 3.467 × 10 ² cells/ mL/día.	19
Biorreactor Tecferm 5L	Medio BBM y RM	temperatura 20 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado,	La evaluación de la biomasa se realizó por medio de conteo en cámara de Neubauer y	densidad celular máxima de 1.25x10 ⁵	23

		fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, utilizando luz blanca por medio de lámparas de luz fluorescentes blancas (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH DE 7.1.	el analisis morfologico por medio de microscopia.	cel/ml 1.0×10^5 y cel/ml en medio RM y BBM	
Columnas de vidrio	Medio BG11	20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4,3 W m ²)T° 20-25 ° C Luz Continua, 1.5% CO ₂ , v / v, pH 8.	La evaluación de la biomasa se realizó por método gravimétrico, los nitratos fueron determinados por un kit Quikchem 8500. Se extrajo muestra de pigmento redissuelto en la solución de solvente para determinar la astaxantina concentración por HPLC	mayor productivida d 17,1 mg L1 día-1	60
Columna de vidrio con membrana de filtro.1 L	Medio NIES-C con acetato de sodio 10 mM como fuente de carbono orgánico.	25 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (5,4 W m ⁻²), 25 °C, Luz Continua, CO ₂ 4%, pH 7.5,	La densidad de la microalga fue determinada por peso seco, la astaxantina fue determinada por método de Boussiba	mayor productivida d 65.8 mg m-2 día-1	61
matraces Erlenmeyer de 500 ml	medio líquido Bold basal (BBM)	24 $\mu\text{mol / m}^2 \text{s}$ (5,2 W m-2), 24 ° C, para 16 h / 8 h luz / oscuridad ciclo, CO ₂ 5%, pH 7.5	1. cuantificado por cromatografía de gasesespectrometría de masas 2. Biomasa: El peso de las células secas de algas se midió por medio peso constante por secado a 90 ° C en un horno de aire caliente. 3. Microscopía Las células de H. pluvialis se observaron bajo un microscopio óptico (OM)(Olympus BX53, Tokio, Japón) con una	El contenido de clorofila a en la fase verde, La fase amarilla y la fase roja fueron 17.3 mg / g, 6.2 mg / gy 10 mg / g, respectivamente.	18

			cámara digital en color Olympus DP72		
Tubo cilíndrico de vidrio de 1 Litro	Medio NIES C	250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ /s. (54,3 W m^2), 20° C 12 h clarooscuro ciclo, CO ₂ 5%, pH 7.6 – 8, 40 rpm	Biomasa Las células de algas se recolectaron diariamente centrifugando el medio para inducción celular a 4.000 rrp durante 10 min, lavado con agua destilada y secado a 80 ° C durante 24 h. *Productividad neta de biomasa en el biorreactor (g/ L/ d): $(m_t - m_0)/ t$; donde, m_t (g / L) era peso seco después de la inducción, m_0 (g / L) fue la inicial peso en seco, t (d) fue el tiempo de inducción	La productividad neta de biomasa 0,12 g / L /d a la temperatura de 28° C	62
dos pistas abiertas de 100 m ² estanque por el proceso de un solo paso de crecimiento de dos etapas	Medio BG 11	Luz Blanca 100 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (21,7 W m^2), 20°C, ciclos de luz oscuridad de 14:10 h, CO ₂ 5%, pH 6-7,	La densidad celular se controló diariamente. Se corrigieron muestras duplicadas con la solución Logul y cada muestra fija se contó cuatro veces con un contador de células sanguíneas Thomas bajo el microscopio	Luego de la inoculación se reportó un valor de $2-3 \times 10^4$ cells ml ⁻¹ .	10
Biorreactor cerrado	medio BBM	Luz Blanca 90 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ (19,5 W m^{-2}), 24 ° C, 12/12 h luz / oscuridad, burbujeo continuo de aire r (500–700 cm^3 / min) containing 0.30 cm^3 / min , pH 7,0,	La densidad celular se realizó por conteo en muestra por triplicado en cámara de Neubauer.	1.1×10^6 cel/ ml ¹	63

--	--	--	--	--	--

Fuente: Elaborada por el autor,2018

ANEXO 12

PROMEDIO, DESVIACION ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTUDIADOS DURANTE EL CULTIVO

CRECIMIENTO CELULAR		
	OHM	KOBAYASHI
PROMEDIO	7421500	824.750
DS	4997738,055	205908.3534
CV	2,49774E+13	423982250000

CLOROFILA		
	KOBAYASHI	OHM
PROMEDIO	0,07875	10,1242775
DESVIACION ESTANDAR	0,063463244	2,63211743
COEFICIENTE DE VARIACION	0,004027583	6,92834152

FOSFATOS		
	KOBAYASHI	OHM
PROMEDIO		0,047
DESVIACION ESTANDAR		0,04232415
COEFICIENTE DE VARIACION		0,00179133

NITRATOS		
	KOBAYASHI	OHM
PROMEDIO	0,0325	0,04425
DESVIACION ESTANDAR	0,015545632	0,03030264
COEFICIENTE DE VARIACION	0,0002	0,00091825

ASTAXANTINA		
	KOBAYASHI	OHM
PROMEDIO	0,050475	0,120475
DESVIACION ESTANDAR	0,030284801	0,09379323
COEFICIENTE DE VARIACION	0,000917169	0,00879717

pH		
	KOBAYASHI	OHM
PROMEDIO	7,77	6,69
DESVIACION ESTANDAR	0,0169233	0,2754727
COEFICIENTE DE VARIACION	0,0286398	0,0758852