

**Producción de astaxantina usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz utilizando la biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L**

Trabajo de grado para obtener el título de Bacteriología y Laboratorio Clínico

**INFORME FINAL**

**Presentado por**

Laura Torres Cadavid  
Jeimy Lizeth Ubaque Ramírez

**Asesor**

Judith Elena Camacho Kurmen  
Q. F. U.N. Esp. MSc. Dr. en Biociencias



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
2021  
Bogotá D.C.**

**TABLA DE CONTENIDO**

1. Resumen	10
2. Introducción	12
3. Antecedentes	13
4. Marco Teórico	22
4.1 Astaxantina	23
4.2 Clorofila	25
4.3 Condiciones de cultivo	26
4.4 Medios de cultivo	28
4.5 Nitratos	30
4.6 Fósforo	31
4.7 Luz	31
4.8 Salinidad	31
4.9 Cloruro de sodio	31
4.10 Acetato de sodio	32
4.12 Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros	32
4.13 Métodos de medición de biomasa	34
4.14 Métodos de medición de pigmentos	35
4.15 Modelos de crecimiento	35
5. Diseño metodológico	38
5.1 Hipótesis	38
5.2 Variables dependientes	38
5.3 Variables independientes	38
5.4 Fase 1. Crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i>	39
5.5 Fase 2. Cambio morfológico	41
5.6 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.	41
5.7 Fase 4. Análisis estadístico	44
6. Resultados	45
6.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga <i>H.pluvialis</i>	45
6.2 Fase 2. Cambio morfológico	50
6.3 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina	57
6.3.1 Determinación de astaxantina por HPLC	<b>63</b>
7. Discusión	69

8. Conclusiones	79
9. Recomendaciones	80
10. Presentación en eventos	81
11. Referencias	84
12. Anexos	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo vital de <i>H. pluvialis</i> .....	22
Figura 2. Estructura del carotenoide astaxantina. ....	23
Figura 3. Isómeros de la astaxantina .....	23
Figura 4. Vía biosintética de carotenoides de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> .....	24
Figura 5. Estructura de la clorofila.....	25
Figura 6. Complejo antena .....	26
Figura 7. Biorreactor biostat A plus de 5 L, medio RM y BBM .....	33
Figura 8. Modelos estadísticos.....	37
Figura 9. Curva de crecimiento medios RM control y BBM control. ....	45
Figura 10. Curva de crecimiento medios RM BIOSTAT y BBM BIOSTAT con adición de acetato de sodio a 0,375 mg/L .....	47
Figura 11. Curva de crecimiento medios RM Biostat y BBM biostat con adición de acetato de sodio a 0,750 mg/L. ....	48
Figura 12. Vista general de curvas de crecimiento medios RM y BBM. ....	49
Figura 13. Cambio morfológico de <i>H. pluvialis</i> .....	51
Figura 14. Cambio macroscópico de <i>H. pluvialis</i> .....	55
Figura 15. Células vegetativas microalga <i>H. pluvialis</i> . ....	56
Figura 16. Célula de <i>H. pluvialis</i> en su fase quística.....	56
Figura 17. Células de <i>H. pluvialis</i> . Fotografía representativa de los medios de cultivo RM ACETATO y BBM ACETATO. ....	57
Figura 18. Concentración de astaxantina y clorofila para medios RM control y BBM control. ....	58
Figura 19. Concentración de astaxantina y clorofila para medio BBM BIOSTAT .....	59
Figura 20. Concentración de astaxantina y clorofila para medio RM BIOSTAT .....	60
Figura 21. Concentración de astaxantina y clorofila para medios RM ACETATO y BBM ACETATO .....	61
Figura 22. Concentración de astaxantina y clorofila por tratamientos.....	62
Figura 23. Cromatograma de estándar de astaxantina .....	63
Figura 24. Curva de calibración Astaxantina .....	64
Figura 25. Cromatograma de HPLC del extracto de microalga <i>H. pluvialis</i> productora de astaxantina identificada como 1 .....	66
Figura 26. Cromatograma de muestra con acetato de sodio 0,750 mg/L combinada con irradiancia de 360 luxes día 35 de cultivo. (51) .....	67



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas.....	27
Tabla 2. Estequiometría de los metabolismos encontrados en microalgas.....	27
Tabla 3. Composición medios RM y BBM. ....	30
Tabla 4. Requerimientos para el crecimiento de microalgas.....	34
Tabla 5. Tratamientos empleados por medio de cultivo.....	40
Tabla 6. Condiciones cromatográficas .....	42
Tabla 7. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.....	50
Tabla 8. Datos curva de calibración de estándar de Astaxantina.....	64
Tabla 9. Evaluación de precisión del sistema. ....	65
Tabla 10. Resumen de tratamientos realizados con sus respectivos resultados .....	68



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Conteo celular de medios de cultivo por triplicado. ....	91
Anexo 2. Promedio de conteo celular de medios de cultivo .....	91
Anexo 3. Análisis de varianza del conteo celular. ....	91
Anexo 4. Resultados prueba Tukey, para crecimiento celular/ml vs tiempo.. ....	92
Anexo 5. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo logístico.....	92
Anexo 6. Absorbancias de astaxantina y clorofila según medio y tratamiento. ....	93
Anexo 7. Promedio de absorbancias de astaxantina y clorofila. ....	93
Anexo 8. Curvas de calibración de Astaxantina y clorofila.. ....	94
Anexo 9. Concentración de astaxantina y clorofila vs tiempo. ....	94
Anexo 10. Análisis de varianza concentración de astaxantina.....	94
Anexo 11. Análisis de varianza concentración de clorofila.....	95

## 1. Resumen

La astaxantina es un carotenoide al que se le considera útil en diversas industrias, además se le reconoce por su potente capacidad antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante. La microalga *Haematococcus pluvialis* es considerada como la mejor productora natural de astaxantina. En la actualidad, la mayor cantidad de astaxantina se produce de forma sintética, y se comercializa a costos elevados, por esto se ha incrementado el interés por producir este compuesto de forma natural.

En este estudio se propone la determinación de la producción de astaxantina usando la biomasa de *H. pluvialis* obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, sometiendo a los factores de estrés acetato de sodio (0,375 mg/L y 0,750 mg/L) y una irradiancia de 360 lux con luz blanca, en medios BBM y RM, pH 6,8, temperatura 20°C, agitación diaria, aire filtrado, cajas de cultivo celular. Se determinó el cambio morfológico, la concentración de clorofila y astaxantina. Estableciendo que el tratamiento que uso medio RM con 0.375 mg/L de acetato de sodio produjo 6.088 ug/mL de astaxantina. El Anova (95%) realizado no estableció diferencias significativas entre tratamientos para la producción del carotenoide ( $P > 0,05$ ), pero sí para el crecimiento celular ( $P < 0,05$ ), y según el test Tukey HSD este tratamiento tiene significativamente mayor crecimiento celular ( $3.01 \times 10^8$  cel./mL).

Esta investigación permite concluir que el uso de la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, para someterla a factores de estrés como el acetato de sodio, combinado con alta irradiancia, permite obtener concentraciones óptimas de astaxantina, aplicables en la producción industrial.

**Palabras clave:** *microalga, biomasa, biorreactor, carotenoide, estrés salino, alta irradiancia.*

## Abstract

Astaxanthin is a carotenoid that is considered useful in various industries, and it is also recognized for its powerful anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant capacity. The microalgae *H. pluvialis* is considered the best natural producer of astaxanthin. Currently, the largest amount of astaxanthin is produced synthetically, and is marketed at high costs, for this reason the interest in producing this compound naturally has increased.

Proposing in this research to determine the production of astaxanthin using the biomass of *H. pluvialis* obtained in the 5-liter BIOSTAT A PLUS Bioreactor, subjecting

it to the stress factors sodium acetate (0.375 mg / L and 0.750 mg / L) and an irradiance of 360 lux with white light, in BBM and RM media, pH 6.8, temperature 20 ° C, daily shaking, filtered air, cell culture boxes. The morphological change, the concentration of chlorophyll and astaxanthin were determined. Establishing that the treatment using RM medium with 0.375 mg / L of sodium acetate produced 6.088 ug / mL of astaxanthin. The Anova (95%) performed did not establish significant differences between treatments for carotenoid production ( $P > 0.05$ ), but for cell growth ( $P < 0.05$ ), and according to the Tukey HSD test, this treatment has significantly higher growth cells ( $3.01 \times 10^8$  cel./mL).

Concluding using the biomass obtained from *H. pluvialis* in the BIOSTAT A PLUS 5-liter Bioreactor, to subject it to stress factors such as sodium acetate combined with high irradiance and obtain astaxanthin.

**Keywords:** *microalgae, biomass, bioreactor, carotenoid, salt stress, high irradiance.*

## 2. Introducción

Las microalgas en la actualidad tienen alto interés biotecnológico, se emplean para la obtención de diversos compuestos bioactivos útiles en la industria alimentaria, farmacéutica, nutracéutica, agrícola, piscícola, y reemplazando sustancias químicas de origen sintético como los colorantes, los cuales son considerados algunas veces como cancerígenos. Algunos colorantes de origen natural que pueden emplearse para reemplazar estos productos sintéticos, son los carotenoides, siendo uno de estos la astaxantina, la cual en forma sintética tiene un alto valor de 2500 USD/kg, razón por la cual se hace cada vez más necesario obtenerla de manera natural.

Entre las alternativas de obtención natural de astaxantina se destaca la microalga *Haematococcus pluvialis*, pues produce la mejor calidad de este carotenoide. De esta manera se han intentado optimizar las condiciones de cultivo y producción, probando diferentes medios de cultivo como el RM y BBM (Bold's Basal Medio), además de tener en cuenta como factores de estrés, el efecto de la deficiencia de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, también el efecto de la temperatura, luz, sales como acetato de sodio y cloruro de sodio sobre las células de *H. pluvialis*, con el fin de conseguir cantidades altas de astaxantina y presentar un aporte a las investigaciones relacionadas, que buscan contribuir al aprovechamiento industrial y comercial de este producto.

A pesar de que la microalga *H. pluvialis* se considera como la mejor alternativa para producir astaxantina de forma natural, es importante tener en cuenta que presenta una baja productividad debido a factores como un crecimiento lento, baja concentración celular y alta susceptibilidad a daños hidrodinámicos, y sobre todo, su complejo ciclo de vida. Sin mencionar que siempre existe el riesgo de contaminación externa de los medios de cultivo, si no se tienen las medidas adecuadas. Dichos factores, son los que minimizan la posibilidad de su producción a gran escala y provocan que se opte por elaborar este carotenoide de manera sintética.

Lo anterior motiva a realizar nuevos estudios para la estandarización de métodos de cultivo que permitan encontrar condiciones óptimas para obtener mayores cantidades de biomasa, tales como: el uso de biorreactores controlados y el posterior uso de la biomasa obtenida de *H. pluvialis* para producir la astaxantina empleando factores de estrés, bien sea solos o combinados, como el uso de salinidad aportada por el acetato de sodio y una alta irradiancia de luz blanca. Lo cual se realizó en este trabajo de investigación, ya que para producir la astaxantina, la microalga debe ser sometida a factores de estrés, debido a que la aplanospora funciona como una estructura de resistencia a las condiciones del medio, si está detecta que el medio ya no es hostil, puede regresar a su estado vegetativo, que ya no nos será de utilidad para producir la astaxantina de interés.

### 3. Antecedentes

En esta investigación se ha tenido en cuenta la siguiente revisión para llevar a cabo el trabajo experimental y su análisis:

Ramírez, D (2013), menciona cómo se da la evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *H. pluvialis* en fotobiorreactor tipo airlift (1). Con la finalidad de estandarizar las condiciones de cultivo de la microalga *H. pluvialis*, que favorecieron la acumulación de astaxantina en la célula, por medio de la construcción de un fotobiorreactor tipo airlift. El estudio se llevó a cabo empleando como metodología, estrés celular con irradiación y estrés por alta salinidad en el medio de cultivo. Inicialmente, la microalga fue cultivada por triplicado en cinco diferentes medios de cultivo: BBM, OHM, BG11, F1 y BBM:BG11, demostrando que no existe una diferencia significativa entre los medios evaluados. (1)

El estrés por intensidad lumínica, se llevó a cabo con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad, empleando tres diferentes intensidades (18500, 37000, 55500  $\pm$  50 Lux) por triplicado. En cuanto a la evaluación de salinidad, se sometieron células en fase estacionaria a tres diferentes concentraciones de NaCl (0.025, 0.100, 0.250 %), por triplicado. Finalmente, como resultado de interés, el método de estrés por alta irradiancia, demostró un aumento considerable, en la productividad de astaxantina, con una concentración de 59,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otro lado, se demostró que una concentración de NaCl superior al 0,025 % es letal para la microalga y no genera acumulación de astaxantina. (1)

Para lograr un correcto crecimiento y desarrollo de la microalga *H. pluvialis*, así como una producción satisfactoria de astaxantina, es necesario conocer el efecto celular completo, que generan una gran variedad de metodologías, así como mantener el control de las condiciones adecuadas de cultivo, estado nutricional, pH, entre otras. En el centro de Acuicultura de la Universidad estatal Paulista, Brasil, LH Sipaúba *et al* 2013 (2), desarrollaron un proyecto en el cual se comparan, los requerimientos de crecimiento y medios, entre dos volúmenes exclusivos (13 L y 250 L). En este proyecto, se inocularon los medios de cultivo (WC) en fase exponencial, a los volúmenes de 13 L y 250 L.

El crecimiento fue controlado durante un periodo de trece días. Adicionalmente, se determinó, clorofila, pH (siendo entre alrededor de 6.5 y 8.03  $\pm$  0.08), conductividad y oxígeno disuelto. La astaxantina se determinó el día trece, obteniendo una concentración en ambos volúmenes de 11,63  $\pm$  0,17  $\mu\text{g}/100$  g para el volumen de 13 L, y una concentración de 11,83  $\pm$  0,52  $\mu\text{g}/100$  g para el volumen de 250 L. Los resultados obtenidos de la metodología empleada, demuestran que, en ambos volúmenes la microalga crece exponencialmente,

para luego disminuir de forma abrupta; debido a la formación de quistes. La diferencia significativa es la tasa de crecimiento (k), siendo más alta a un volumen de 250 L con un resultado de 0,36 (pero menor densidad celular) y la densidad celular, siendo mayor en un volumen de 13 L ( $1,1 \pm 0,17 \times 10^5$  cel/mL), ya que se genera un mayor crecimiento en estado vegetativo. Finalmente, encontraron que, la densidad celular aumentó en un 55%, con la adición de vitamina B o tiamina (se agregó al medio a una tasa de 0.01 g/L) y H o biotina (0,1 mg). (2)

A la hora de trabajar con esta microalga, es importante comprender qué ocurre a nivel celular, cuando esta es sometida a diferentes factores de estrés. En el año 2014, se publicó un artículo investigativo, desarrollado por Wang B *et al* (3), cuyo objetivo era determinar los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren a lo largo del desarrollo celular de la microalga, con la intención de reconocer los mecanismos por los cuales la célula hace frente a las altas intensidades lumínicas. Para esto, durante el cultivo, las células móviles y palmelas, fueron separadas y sometidas a iluminación continua de luz alta (HL) (fotones de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 24 h en medio BBM a 22°C.

Los carotenoides y la clorofila fueron analizados mediante HPLC, el contenido de carotenoides fue aproximadamente de 2,30 mg y la clorofila ocupaba el 17.8% de la célula, también se analizaron y cuantificaron lípidos, carbohidratos y proteínas de membrana totales. Se demostró que, a nivel morfológico, las células de la palmela eran esféricas con paredes celulares rígidas y algo rojizas en el centro, lo que indica la presencia de astaxantina ( $0.66 \pm 0.06$  mg / g de peso muerto). (3)

La capacidad de las células vivas para sobrevivir en condiciones ambientales extremas puede depender de su capacidad para modificar su composición de membrana y ajustar su nivel de desaturación de lípidos y otros sistemas. Incluso el medio de cultivo en sí mismo, puede afectar la distribución de los lípidos, como lo sustentan: Tokarz D, *et al* (4), publicado en el año 2014.

Es importante tener en cuenta, que la cantidad de astaxantina obtenida, también puede variar según el tipo de cepa de *H. pluvialis*. Por ejemplo, en el año 2014, se aisló una cepa de *H. pluvialis* denominada "*H. pluvialis* BM1", de un hábitat de la costa ártica caracterizada con niveles de salinidad moderados y muy variables. Con base a esto, y con el fin de conocer su viabilidad, se desarrolló un estudio en la facultad de Biología de la Universidad Estatal de Moscú, Rusia, por Chekanov K, *et al* (5).

Esta cepa demostró, que empleando concentraciones de irradiancia más



elevadas ( $480 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) que las “óptimas”, *H.pluvialis* BM1, no solo las toleraba, sino que la mayoría de las células mostraron una inducción rápida en la biosíntesis de astaxantina, que alcanzó el 5.0% - 5.5% mg/L al sexto día de estrés (correspondiente a relación Caroteno / Clorofila de  $13,0 \pm 0,1$ ); también se demostró mayor tolerancia al estrés por salinidad, donde se empleó NaCl, cultivando la microalga con una salinidad similar a la del agua del baño de rocas (25 g/L). (5)

Luego de haber obtenido concentraciones significativas de astaxantina, el paso a seguir es su extracción. Dong S *et al* 2014 (6), En su artículo publicado en la revista “The Scientific World Journal”. Se estudiaron cuatro métodos diferentes de extracción de astaxantina, obteniéndose mejores resultados con el método de extracción MET-ACE en relación disolvente/materia prima de 400 mL/g con un tiempo de extracción de 20 min, entre los cuales: pretratamiento con ácido clorhídrico seguido de extracción con acetona (HCl-ACE), extracción con solventes mezcla de hexano / isopropanol (HEX-IPA), extracción con metanol seguido de extracción con acetona (MET -ACE) y extracción de aceite de soja. Se obtuvo que el método HCl-ACE presentaba el mayor rendimiento de extracción de contenido total de astaxantina. (6)

Otros métodos de extracción populares que se realizan, pueden ser: con enzimas líticas cuyo procedimiento inicia con células tratadas, con el fin de extraer la clorofila con un tratamiento de acetona por 24 horas. Una vez las células están libres de clorofila se liofilizan y se tratan con enzimas líticas comerciales; la extracción de astaxantina se estimó como astaxantina libre (pretratada) y total. Algunas de las enzimas evaluadas fueron catalasa y celulasa que presentaron una mayor extractabilidad de astaxantina. Por otra parte, el método de extracción con fluidos supercríticos siendo su fundamento el utilizar un fluido en condiciones supercríticas (presión-temperatura) en las que sus propiedades fisicoquímicas se encuentran entre las de un líquido y un gas, como se expone en el artículo de investigación desarrollado por Córdoba N *et al* en el año 2015 (7).

Estandarizar metodologías eficientes para la producción de astaxantina natural, es conveniente no solo a nivel industrial, sino también a nivel de la salud humana. Una alternativa que no se había mencionado para promover su producción, es el enriquecimiento en medios de cultivo (tales como el medio NITROFOSKA foliar, ALGAENZIM y FUERZA VERDE, cada uno de estos medios se trabajó con el fertilizante orgánico a concentraciones de 0.10%, 0.25% y 0.50%), a base de fertilizantes orgánicos (como el Nitrofoska), con sales de hierro, en conjunto con irradiancia y agitación diarias; esto último, permite una distribución homogénea de los nutrientes. Este método fue desarrollado por Granda G, en el año 2015 (8).

Además, se ha demostrado que la astaxantina de origen natural, posee una capacidad antioxidante mayor, en comparación a la astaxantina sintética, tal como se demostró en el artículo de investigación desarrollado por Régnier P, *et al* (9) en el año 2015. Dicha comparación se realizó mediante caracterización fisicoquímica, por ensayo TEAC (método espectrofotométrico). El extracto de astaxantina natural logró neutralizar los radicales libres en forma de cationes con más potencia que el extracto sintético. Por lo tanto, podemos decir, que la astaxantina natural, aportaría mayores beneficios antioxidantes, que favorecen la salud humana.

Siguiendo con la idea anterior la producción de antioxidante de mayor calidad, es la natural como lo es la astaxantina de *H. pluvialis*, donde lo menciona Ramaraj S, *et al* 2017 (10) donde menciona que el estudio de las microalgas en general es muy amplio y diverso, puesto que pueden sintetizar a partir de diferentes rutas metabólicas fuentes prometedoras de ácidos grasos, esteroides, carotenoides, polisacáridos, lectinas, aminoácidos, toxinas, agar agar, entre otros, dando oportunidad a una nueva puerta para la economía industrial, alimenticia, farmacéutica y entre otras, por esta razón se busca la estandarización y cultivo junto con la ruta más efectiva para la producción de dichos metabolitos.

En la búsqueda por seleccionar los medios de cultivo más apropiados, que logren concentraciones celulares más elevadas, se desarrolló un proyecto de investigación, que sería la base para otros tantos, desarrollado por Niño C, *et al* (11). En el que se compararon tres medios de cultivo (OHM, RM, BBM), bajo condiciones de pH 6,7, fotoperiodo de 18h luz – 6 oscuridad, 70 microestein de irradiancia con lámparas de luz fluorescentes blanca, T° 25°C y agitación manual diaria, con el fin de determinar el qué de más producción de biomasa celular, y por lo tanto de astaxantina, permitiera lograr. Se obtuvo que el medio de cultivo RM fue el de mayor rendimiento, con un recuento celular de  $7.55 \times 10^5$  células/ml, seguido del medio de cultivo BBM con un recuento de  $3.88 \times 10^5$  células/ml, y por último, el medio de cultivo OHM con un recuento de  $3.43 \times 10^5$  células/ml. En donde la mayor producción de astaxantina se obtuvo en el medio RM con una concentración de 8.3 ug/ml.

Además de los medios de cultivo, entre los métodos de crecimiento celular más novedosos se encuentran el crecimiento al aire libre en fotobiorreactores tubular como lo desarrolló Zhang L *et al* 2017 (12) donde inicia con una transformación celular de las células móviles en células no móviles, aquí se evidencia una absorción de luz y el transporte de electrones fotosintéticos más eficientes en la primera fase (transformación celular), después en la fase de acumulación de astaxantina, la absorción de luz aumentó, pero la eficiencia del transporte de electrones y el rendimiento disminuyó, lo que indica disminución fotosintética generando un desequilibrio entre la absorción de luz fotosintética y la utilización

de energía, en pocas palabras con este método se evidencia como la luz y el medio de desarrollo pueden modificar la ruta metabólica de la microalga, como datos adicionales ellos evidenciaron que la astaxantina comenzó a acumularse después de tres días de incubación, después de cinco días de incubación el contenido de astaxantina aumentó de 0,47 mg/ml a 12,89 mg/ml durante un período de incubación de nueve días, además el contenido de clorofila aumentó gradualmente con el tiempo durante los siete días iniciales de incubación, pero disminuyó ligeramente después de siete días de incubación en *H. pluvialis*.

El incremento de la producción de astaxantina como lo mencionan algunos autores es el estrés; García en el 2018 (13), realizó el estudio para la producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluvialis* en el biorreactor Tec-ferm de 5 L, usando dos diferentes concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L Y 1,6 mg/L), las cuales fueron evaluadas en el medio RM con pH de 6.7, fotoperiodos 20h luz y 4h oscuridad , luz blanca, temperatura  $25 \pm 2^\circ$  C, aire filtrado y agitación a 100 rpm en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros. Obteniéndose que con 0,299 mg/L de acetato de sodio determinaron un crecimiento celular máximo de  $2,0 \times 10^4$  Cel/ mL y una concentración máxima de astaxantina de 2,530  $\mu$ g/mL durante 34 días, mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular máximo de  $3,5 \times 10^4$  Cel/mL y una concentración máxima de astaxantina de 1,9  $\mu$ g/ml, lo cual permite concluir que con las dos concentraciones de acetato de sodio y las demás condiciones del proceso realizado en el biorreactor permitió una mayor producción del colorante en cuestión.

En este mismo año se busco la innovación de algunos factores de estrés en el medio de crecimiento de la microalga uno de ellos fue el publicado Reis DF, *et al* 2018 (14) donde comenta el uso de CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono en el medio de cultivo BBM y el uso de acetato de Sodio (1.986 g/L), fundamentándose en la limitación del nitrógeno en presencia de fuentes de carbono en exceso y cómo estas influyen en la producción de carotenoides, como resultado final el total de carotenoide recuperado fue de  $2949,91 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  mostrando una tasa de producción aceptable. Por otro lado Zhang C *et al* 2018 (15) menciona los efectos del acetato de sodio exógeno sobre la acumulación de astaxantina y la fotoprotección en *H. pluvialis* en la etapa no móvil, donde se evidencia como con 10 mM de acetato de sodio aumenta la cantidad de astaxantina, con una concentración máxima de 4,8 mg/L aproximadamente, en las células al ser comparadas con las microalga sin ser tratada, mostrando una aceleración en la acumulación de astaxantina en la etapa no móvil, además menciona que la clorofila y la actividad fotosintética se es suprimida con la adición del acetato.

Las condiciones ambientales demuestran cómo se adapta un ser vivo a su entorno, en este caso Enrico D *et al* 2018 (16) investigó la influencia del estrés

en condiciones ambientales tróficas en la producción de astaxantina, otras xantofilas y lípidos de una cepa argentina de *H. pluvialis*. Los cultivos de microalgas se realizaron en condiciones autotróficas o mixotróficas (con adición de 1 g/L de acetato de sodio en el medio de cultivo BBM) y se sometieron a dos intensidades de luz diferentes (90 MLS/Moderate Light Stress y 350 SLS/Severe Light Stress). Entre los datos de mayor importancia dados por el análisis de HPLC mostraron que las células acumularon mayor parte de la astaxantina aproximadamente 90% en forma esterificada y el máximo nivel de astaxantina se dio en condiciones autotróficas sometidas a estrés lumínico moderado de fotones de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que el mismo régimen de luz en condiciones mixotróficas condujo a un aumento menor solo 25.8 veces.

He B *et al* 2018 (17) estudió los efectos sinérgicos del estrés lumínico con acetato de sodio junto al hierro, evidenciándose cuatro grupos de transcriptomas según el estrés en cuestión: irradiación lumínica alta (HL), adición de acetato de sodio 25 mM bajo luz alta (HA), adición de  $\text{Fe}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$  bajo luz alta (HF) y células verdes normales en crecimiento (HG). Entre el total de genes expresados analizados, más de 10 mil genes se expresaron a causa de alta irradiancia y 1800-1900 genes por acetato de sodio o  $\text{Fe}^{2+}$ . Los resultados del análisis en general mostraron que la adición de acetato bajo luz intensa promovió la expresión de genes clave relacionados con las vías para la biosíntesis de carotenoides y el alargamiento de ácidos grasos. Además, el acetato podría inhibir la expresión de genes relacionados con la vía de las proteínas de la antena de fotosíntesis. Por la adición de  $\text{Fe}^{2+}$ , los genes relacionados con las proteínas de la antena de fotosíntesis se promovieron significativamente y no hubo un cambio obvio en las expresiones genéticas relacionadas con la síntesis de carotenoides y ácidos grasos, mostrando cómo la adición de ambos factores de estrés interrumpe la capacidad fotosintética y genera un cambio conformacional de la célula.

Sin embargo, para óptimos resultados, adicional a lo antes mencionado se puede recurrir a una mejora del rendimiento de astaxantina a través de recursos moleculares. En el artículo publicado por Luo Q *et al*, en el año 2019 (18), se realizó la secuenciación del genoma completo de la microalga y se revelaron genes potencialmente novedosos involucrados en la síntesis de astaxantina, como por ejemplo los genes *bkt*. Estos aportes significan un recurso valioso para dilucidar los mecanismos moleculares, relacionados al rendimiento y la acumulación de astaxantina, lo que a su vez facilitará la reproducción de nuevas cepas con un contenido de astaxantina significativamente mayor. Dicho recurso puede combinarse con otras técnicas de estrés celular, como lo es la variación de nitrógeno, permitiendo analizar patrones de expresión a lo largo de todo el ciclo de cultivo y de los mecanismos reguladores adaptativos. Demostrando que la célula, en los peores escenarios, tiene la capacidad genética de modificar su

metabolismo, en función de sus necesidades. Análisis desarrollado en el artículo publicado en el año 2019 desarrollado por Huang L *et al* (19).

La capacidad que tiene la célula para modificarse a nivel metabólico y responder de forma inmediata a nivel genético, en relación al factor de estrés implementado, no es la única técnica que puede aprovecharse. En el artículo expuesto por Li F, *et al* (20), en el año 2019, se propone el uso de células no móviles de *H. pluvialis*, con la hipótesis de que estas podrían ser más efectivas a la hora de producir astaxantina. Los resultados indicaron que el aumento en el contenido de biomasa y astaxantina en las células del quiste se asociaba estrechamente con el aumento del tamaño celular; Donde las concentraciones de biomasa aumentaron en un 28% y 44% en cultivos celulares móviles y no móviles (con concentraciones máximas de biomasa de 2,00 g/L<sup>-3</sup> para células inmóviles y de 1,00 g/L<sup>-3</sup> para las móviles), respectivamente, mostrando una correlación donde el tamaño de los quistes formados por células no móviles fue mayor que el formado por las células móviles, confirmando la hipótesis inicial. Las concentraciones máximas de astaxantina obtenidas fueron de 80 mg/L<sup>-1</sup> para células inmóviles y de 20 mg/L<sup>-1</sup> para células móviles.

Otra de las modificaciones celulares que pueden ocurrir, dadas por el factor de estrés de preferencia, es la alteración de la membrana celular, tal como lo expone el artículo, desarrollado en el año 2019 por Miranda A, *et al* (21). En el cual se logró establecer que la rigidez de la membrana celular de la microalga, es afectada negativamente por la acumulación de la astaxantina, acumulación que se asegura, se logra más eficientemente por medio de la inanición celular de nitrógeno. El estrés proporcionado a la microalga, por la limitación de este nutriente, provoca disminución de la rigidez celular, debido a la acumulación de astaxantina en la membrana; una menor rigidez permitiría una extracción del carotenoide mucho más sencilla. Sin embargo, otra variable a tener en cuenta, son los niveles de obtención de astaxantina, estando estos ligados con los métodos de extracción, donde los más usados provocan altos niveles de pérdida del pigmento (solventes orgánicos), como lo argumentan Galarza, *et al* (22); donde comparan las formas de extracción de astaxantina con solventes orgánicos (saponificados) y con colesterol esterasa (enzimas líticas) en muestras iguales. Al discutir los resultados de la cuantificación, se puede concluir cómo el método influye en la concentración de la lectura en HPLC, mostrando mejores resultados con la enzimálisis, y por ende menos pérdida de astaxantina en el tratamiento de extracción de la misma. La astaxantina extraída a través del método con colesterol esterasa alcanzó una concentración máxima de 975,65 ug mg<sup>-1</sup>, mientras que la que se extrajo a través de NaOH alcanzó concentraciones más bajas de 356,39 ug mg<sup>-1</sup>.

Otros estudios de interés donde mencionan los factores de estrés para la producción del carotenoide es Rodríguez (2019) (23) donde busca obtener una mayor producción de astaxantina en *H. pluvialis*, usando medio RM bajo condiciones lumínicas con fotoperiodos en lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, de  $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos. El resultado con mayor rendimiento fue con la adición de 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio, presentó la mayor producción astaxantina en un 20% superando los demás tratamientos con 7,3  $\mu\text{g/ml}$ . Aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Manrique y Marín en el 2019 (24) estudiaron el uso del biorreactor BIOSTAT A PLUS a escala de laboratorio de 5 litros en medios como el BBM y RM usando condiciones como pH 6,8, temperatura  $20^\circ\text{C} + 2^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 18 h luz: 6 h oscuridad, panel de luces led multicolor (blanco, azul y roja), como resultado el cultivo realizado en el medio de cultivo BBM presentando al final de 36 días una biomasa de  $2,88 \times 10^7$  cel/mL, Una concentración de clorofila de 28,3  $\mu\text{g/mL}$  y una concentración de astaxantina de 3,1  $\mu\text{g/mL}$ . El medio RM presentó  $2,43 \times 10^7$  cel/mL, una concentración de clorofila de 21,8  $\mu\text{g/mL}$  y una concentración de astaxantina de 2,9  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando mayor rendimiento el medio BBM, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Para aumentar el rendimiento en la producción del antioxidante una de las opciones actualmente estudiadas es el entendimiento genético como lo explica Li F *et al* en su artículo publicado en el 2019 (25) mencionando en su diseño experimental como la concentración más alta de astaxantina ( $48.42 \pm 3.13 \text{ mg L}^{-1}$ ) se origina en los cultivos celulares no móviles con la productividad más alta que en los cultivos de células móviles. El examen microscópico de la morfología celular mostró una gran cantidad de células dañadas por fotooxidación en los cultivos de células móviles, lo que resultó en una tasa de mortalidad celular más alta que los cultivos de células no móviles. En cuanto a las condiciones de cultivo, las células móviles se cultivaron fotoautótrofas en BBM con 0,75 g/L de  $\text{NaNO}_3$  bajo luz baja continua de  $25 \mu \text{ mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante 5 días. Como dato anexo y de alta importancia que se concluye es el diámetro celular, indicando que las células no móviles llegaban a la formación de quistes grandes ricos en astaxantina de forma más rápida que las células móviles.

Como se mencionó anteriormente la salinidad es un factor de estrés que incita a un cambio metabólico en la microalga y no solamente es usada para la producción de colorantes, otro producto de su metabolismo lo expone en el 2019

Ding Wei et al (26), donde usó la microalga *H. pluvialis* para la producción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico, por medio de estrés salino usando una concentración de 0,4 g/L de NaCl en un cultivo mixotrófico en presencia de ácido fúlvico (FA) generando una biomasa de 1,84 g/L con un contenido de ácido  $\gamma$ -aminobutírico de 25,45 mg/g. De igual forma en el mismo año Liu Yu et al (27) diseñó un sistema de dos etapas para los procesos de cultivo e inducción de *H. pluvialis*. La primera se cultivó en aguas residuales de minkery y se comparó con el medio basal de Bold convencional, y creció mejor en aguas residuales de minkery diluidas (1,5%), lo que arrojó una producción de biomasa de  $906,3 \pm 34,0$  mg/L.

En la siguiente etapa que denomino inducción, las células vegetativas se expusieron a una alta intensidad de luz para la producción de astaxantina, y la producción resultante fue de  $39,72 \pm 1,69$  mg L<sup>-1</sup>. Empleando el agua residual diluida, también se probó una estrategia de inducción mixotrófica usando una serie de concentraciones de acetato de sodio. Los hallazgos indicaron que la combinación óptima para la producción de astaxantina era acetato de sodio al 38,14 mM y NaCl al 0,58% (p / v). Y la concentración óptima de astaxantina fue de  $67,95 \pm 3,93$  mg L<sup>-1</sup> después de un período de inducción de 12 días. Dando como resultado la apertura al campo de tratamiento de aguas residuales de minerales para la producción de astaxantina.

Basándose en los estudios anteriormente descritos se puede concluir que la microalga nativa de *H. pluvialis* no presenta diferencia significativa en el crecimiento cuando es sometida a diferentes medios de cultivo. Adicionalmente, para optimizar la producción de biomasa celular, uno de los parámetros fundamentales a tener en cuenta es la agitación constante de los medios de cultivo con la consecuente homogeneización de los mismos, lo que permite que los nutrientes se dispersen y se asimilen correctamente, en conjunto con la distribución de luz (8). En cuanto a la producción de astaxantina, también se ha podido demostrar que la luz alta es el factor directo de los cambios en la expresión génica durante el período de inducción en *H. Pluvialis* (20), de hecho, se demostró que la intensidad de luz óptima para el crecimiento de *H. pluvialis* es de aproximadamente  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2). El acetato de sodio podría mejorar aún más la expresión de los genes implicados en la síntesis de carotenoides y ácidos grasos. Se ha podido demostrar que cuando la microalga *H. pluvialis* es sometida a factor de estrés por salinidad a una concentración de 2,5 g/L, se genera muerte celular sin una acumulación previa de astaxantina significativa (1). Todos estos estudios preliminares favorecen grandemente los avances en este campo de interés, proporcionan bases sobre las cuales los próximos proyectos podrán trabajar en busca de las condiciones óptimas de cultivo de la microalga *H. pluvialis* y su consecuente producción de astaxantina en concentraciones que se espera, sean cada vez mayores.

#### 4. Marco Teórico

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con un alto valor industrial, debido a su versatilidad de aplicaciones, estas son útiles en la producción de biodiesel, tratamiento de aguas residuales y la producción de proteína para la alimentación animal y humana (1), además han sido propuestas como agentes beneficiosos para la salud humana, ya que son efectivos en la prevención de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunoreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena (28).

*Haematococcus pluvialis* es un alga verde de agua dulce, unicelular, distribuida en muchos hábitats en todo el mundo, posee una forma elipsoide hasta redondeada en los extremos, biflagelada y móvil en su estado vegetativo. Cuando la célula es sometida a largos periodos de estrés, pierde sus flagelos y forma una gruesa pared, seguido de una acumulación de astaxantina que genera el color rojo apreciable visualmente. Los quistes maduros de *H. pluvialis*, pueden contener cerca de un 3% de su peso seco como astaxantina esterificada.

En el ciclo de *H. pluvialis* pueden distinguirse cuatro tipos de morfologías celulares: formas macrozoide (mide 8 a 20  $\mu\text{m}$ , esférica, elipsoidal, con dos flagelos, resultado de la fisión del hematocisto, hacen mitosis), palmella (inmóvil, células en reposo vegetativo), aplanospora (resistente a ambientes extremos, en su forma madura acumula carotenoides secundarios) y formas microzooides (flageladas esbeltas) (29) (Figura 1). Los macrozooides (zoosporas), los microzooides y las etapas de palmella se conocen como "fase vegetativa verde", mientras que los hematocistos (aplanosporas) se denominan "fase enquistada no móvil roja" (30)

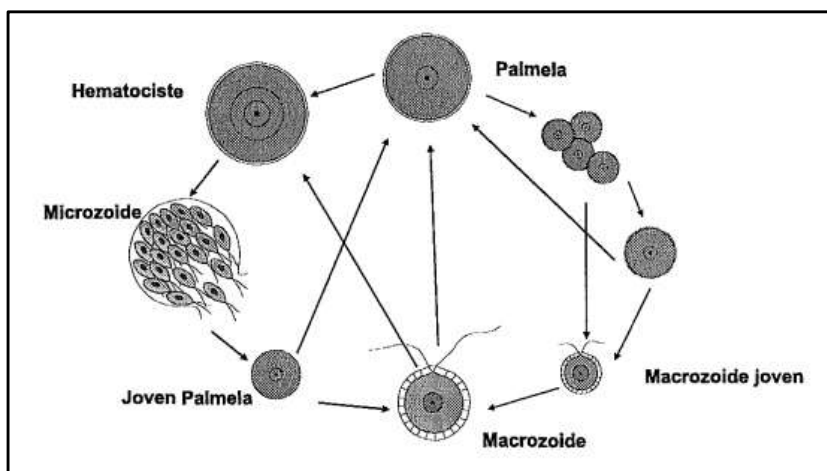


Figura 1. Ciclo vital de *H. pluvialis* (27)



## 4.1 Astaxantina

Dentro de los agentes antioxidantes se encuentran los carotenoides. Un antioxidante es una molécula capaz de prevenir la oxidación de otras moléculas, dicho proceso puede producir radicales libres, que generan reacciones en cadena que eventualmente causan daño celular (31). La astaxantina es una xantofila roja de tipo carotenoide, su nombre se deriva del cangrejo *Astacus astacus* y se conoce químicamente como 3,3 dihidroxi caroteno-4,4 diona (Figura 2). La molécula de astaxantina posee dos carbonos localizados en las posiciones 3 y 3' sobre dos anillos bencénicos al final de la molécula (31). La astaxantina tiene tres estereoisómeros que son 3R,3'R; 3R,3'S y 3S,3'S (Figura 3); el mayor isómero de astaxantina producido por *H. pluvialis* es el 3S,3'S; donde 1 gramo aporta 10 mg del carotenoide (32).

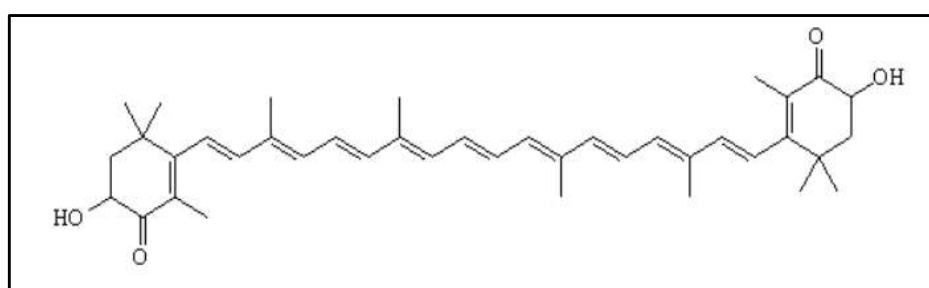


Figura 2. Estructura del carotenoide astaxantina. (31)

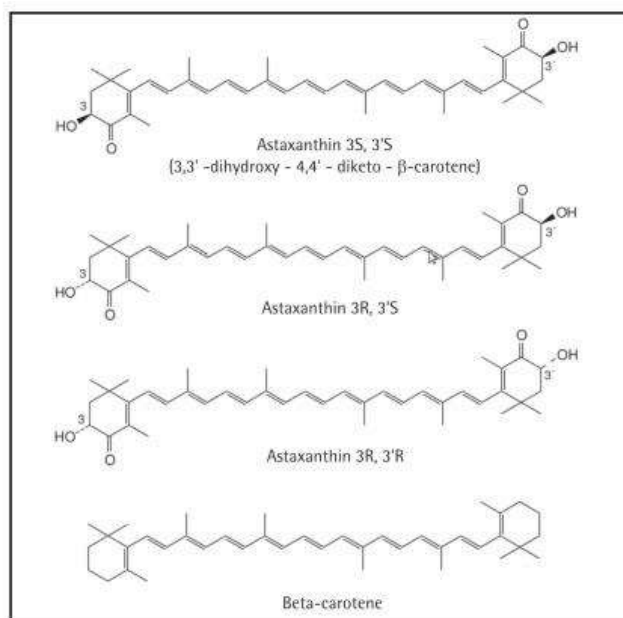


Figura 3. Isómeros de la astaxantina (32)

La ruta de biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*, inicia con la condensación de geranyl-geranyl difosfato (GGPP) a fitoeno, dado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), posteriormente, fuera de la membrana celular, intervienen otras enzimas de biosíntesis, tales como: fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS),

licopeno ciclasa (LCYB),  $\beta$ -caroteno cetolasa y caroteno hidroxilasa (CH) (33) (Figura 4).

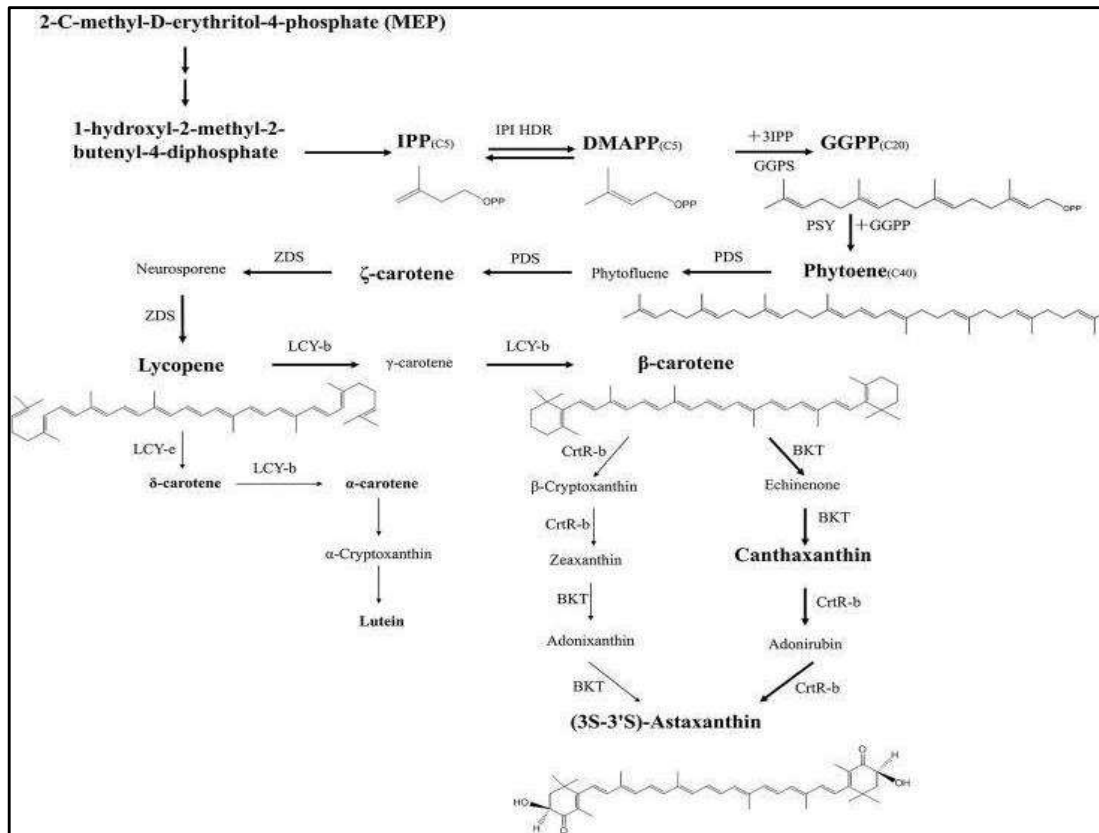


Figura 4. Vía biosintética de carotenoides de astaxantina en *H. pluvialis* (33)

El interés por la producción y comercialización de este pigmento ha llevado a que se destaque el cultivo de *H. pluvialis* como una fuente natural de gran interés debido a la calidad del pigmento que se obtiene de ella.

#### Usos de la astaxantina:

Entre los usos de la astaxantina encontramos que esta es responsable de la coloración de la piel de algunos animales marinos como mariscos, langostas y camarones, los cuales no tienen la capacidad de sintetizar, por lo tanto, este compuesto es suministrado en el alimento de los mismos; en la industria de este tipo de alimentos, el uso de pigmentos carotenoides cumple como función principal actuar como antioxidante y promotor de la producción de vitamina A. Este pigmento tiene aplicación en otro tipo de industrias también, como la farmacéutica y cosmética, donde cumple funciones como protector solar, al prevenir el daño de la piel causado por los rayos UV, contribuye como un factor antienvjecimiento y protector de la piel, aumenta la actividad inmunológica y la salud cardiovascular, disminuye los

triglicéridos, aumenta el rendimiento y la recuperación física. En la industria farmacéutica es un ingrediente de suplementos dietarios. (1)

## 4.2 Clorofila

Otro pigmento que se encuentra en el estudio de *H. pluvialis* es la clorofila, esta sustancia se encuentra en todos los organismos autotrofos y existen de dos tipos clorofila a y clorofila b, su estructura presenta un anillo de porfirina que contiene magnesio (encargado de absorber la luz) y una cadena hidrófoba de fitol (mantiene la clorofila integrada en la membrana fotosintética) (Figura 5), la clorofila cumple como papel fundamental absorber la luz violeta, azul y roja (reflejando verde), siendo aceptora final de fotones gracias al complejo antena (unión de carotenoides y clorofila) (Figura 6) y el centro de reacción, necesario para la fotosíntesis y por ende el metabolismo de la alga (34).

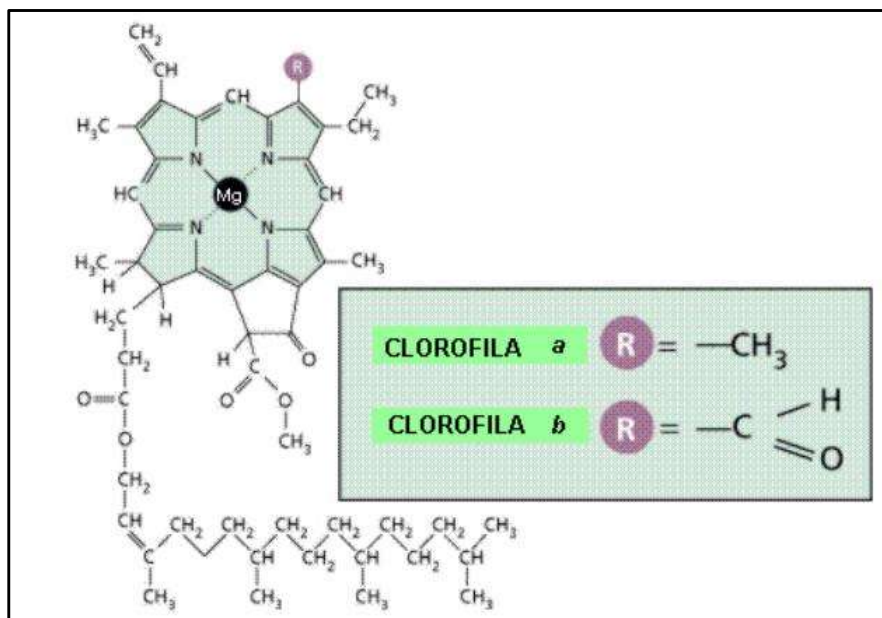


Figura 5. Estructura de la clorofila (34)

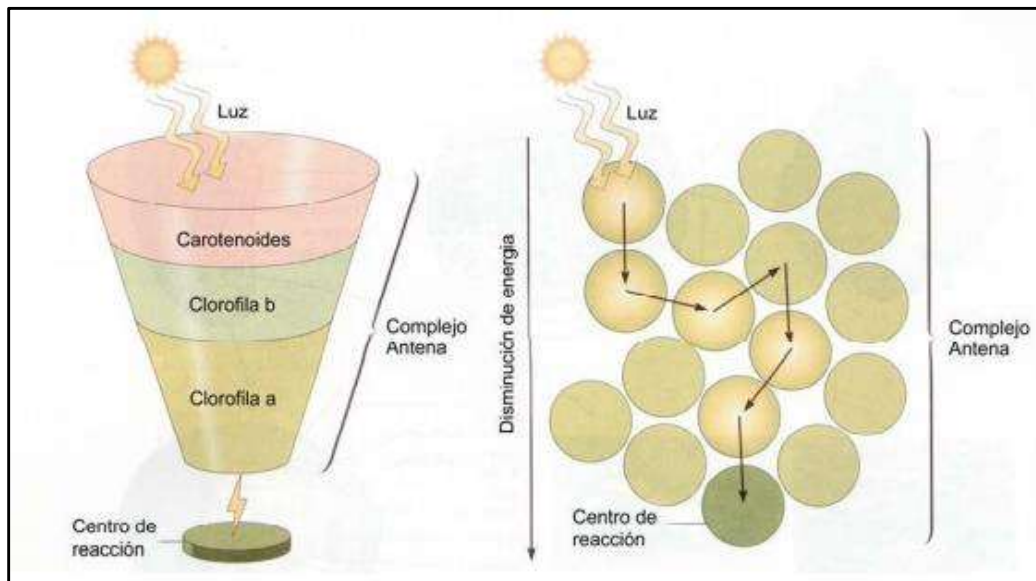


Figura 6. Complejo antena (34)

La concentración de clorofila se determina tomando una alícuota de la muestra del cultivo de la microalga (1 ml), posteriormente se debe extraer el contenido celular mediante centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante que se obtiene se elimina, al contenido restante se adiciona metanol al 90% (1 ml) y luego se incuba en baño serológico a 60°C por 10 minutos. Para la cuantificación se emplean patrones de referencia y la concentración se conoce a una determinada longitud de onda en un espectrofotómetro. (34)

### 4.3 Condiciones de cultivo

#### Cultivos:

Hay diferentes tipos de modos de crecimiento disponibles para microalgas que incluyen crecimiento fotoautotrófico, heterótrofo, mixotrófico y fotoheterotrófico. La tasa de crecimiento y el contenido celular de las microalgas dependen en gran medida del método de cultivo, ya que cada una de ellas proporciona una cantidad diferente de nutrientes y energía.

#### Cultivo Fotoautotrófico:

La eficiencia de la incorporación de una fuente de carbono inorgánico y orgánico para los cambios de biomasa durante el crecimiento fotosintético, dependen de: especie del alga, intensidad de la luz, fuente de energía y carbono (orgánico o inorgánico) y fase de crecimiento (ver tabla 1-2).

Metabolismos	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánico
Mixótrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y Orgánico

Tabla 1. Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas

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

Metabolismo	Ecuación estequiométrica
Fotoautótrofo	$\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{h\nu} \text{C}(\text{biomasa}) + 1/2\text{O}_2 + 3\text{OH}^- \Leftrightarrow \text{Incremento pH}$
Heterótrofo	$(1+a) \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{C}(\text{biomasa}) + a\text{CO}_2 + (1+a) \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{disminución pH}$
Mixotrófico	$b\text{HCO}_3^- + c\text{CH}_2\text{O} \xrightarrow{h\nu} (b + (c-a))\text{C}(\text{biomasa}) + 3\text{OH}^- + a\text{CO}_2 \Leftrightarrow \text{Cambio de pH no significativo}$

Tabla 2. Estequiometría de los metabolismos encontrados en microalgas (34)

El cultivo fotoautótrofico utiliza la luz como única fuente de energía, la cual se convierte en energía química en las reacciones fotosintéticas. Los factores limitantes de crecimiento estudiados son luz y CO<sub>2</sub>. En un cultivo fotoautótrofico la luz puede ser considerada como un sustrato físico, la influencia de la intensidad de la luz sobre la tasa de crecimiento es descrita con las ecuaciones de Monod (si no se observa fotoinhibición):

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

Ó Haldane (cuando ocurre fotoinhibición):

$$\mu = \mu_m \left[ \frac{I_0}{K_{l_0} + I_0 + \frac{I_0^2}{K_i}} \right]$$

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

$$\mu = \mu_m \left[ \frac{I_0}{K_{l_0}} \right]$$

#### Cultivo mixotrófico:

La mixotrofia es un proceso metabólico en el cual la fotosíntesis es la fuente más importante de energía. En el cultivo mixotrófico se produce una captación simultánea de compuestos orgánicos y  $CO_2$  como fuentes de carbono para la síntesis celular y, luego, se espera que el  $CO_2$  liberado a través de la respiración se atrape y reutilice rápidamente con suficiente intensidad de luz. Las células mixotróficas adquieren la energía al metabolizar compuestos orgánicos a través de la respiración y convirtiendo la energía de la luz en energía química. La adición de sustrato orgánico resultó en el aumento de la tasa de crecimiento, así como en la concentración final de biomasa. Es decir, la mixotrofia es capaz de utilizar diferentes modos de nutrición dependiendo de las condiciones de crecimiento, acarrea dos vías de metabolismo: autótrofo y heterótrofo. Los compuestos orgánicos y el dióxido de carbono pueden ser utilizados simultáneamente como una fuente de carbono y compuestos orgánicos y la luz usados simultáneamente como una fuente de energía. (35)

#### **4.4 Medios de cultivo**

Para determinar las condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, se emplean diferentes medios de cultivo, entre los más usados se encuentran los medios BBM y RM. Se han evaluado medios de cultivo en condición autotrófica, heterotrófica y mixotrófica con el fin de determinar el medio y la condición de crecimiento óptimas y que generen la máxima producción de astaxantina. El medio de cultivo Bold Basal (BBM) fue uno de los que se emplearon en condiciones

autotróficas, está conformado por sales (sulfatos, nitratos, fosfatos), elementos trazas y ácido bórico, es un medio de algas de agua dulce que se ha utilizado para cultivar una variedad de cultivos de algas verdes (por ejemplo, *Trichosarcina*, *H.pluvialis*, *Chlorococcum* y *Chlorella*) sin la necesidad de extracto de suelo o vitaminas. La naturaleza predominantemente inorgánica de este medio se facilita como medio de mantenimiento del cultivo axénico. Los componentes de este medio, así como del medio de cultivo RM pueden verse en la tabla 3. Por otro lado, el medio RM contiene especialmente nitrato de sodio, este componente permite confirmar que la presencia de este nutriente es importante para el crecimiento de esta microalga, puesto que en estudios posteriores ni su deficiencia evitó observar el crecimiento de esta microalga.

<b>Composición de medios RM y BBM</b>		
	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad adicionada</b>
<b>RM</b>	NaNO <sub>3</sub>	0,15 gr
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 gr
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01 gr
	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,005 gr
	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,027 gr
	EDTA	0,0035 gr
	NaCl	0,01 gr
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00015 gr
	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	0,00075 gr
	ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.00005 gr
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0,00015 gr
	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,00004 gr
	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0,00013 gr

	FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0,0085 gr
	H <sub>2</sub> O destilada	--
<b>BBM</b>	NaNO <sub>3</sub>	5 ml
	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	5 ml
	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 ml
	NaCl	5 ml
	EDTA	0,5 ml
	KOH	0,5 ml
	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,5 ml
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 ml
	Sln de metales	0,5 ml

Tabla 3. Composición medios RM y BBM.

El medio se completó hasta 500 ml de agua destilada. La solución de metales utilizada en el medio BBM se compone de: ZnSO<sub>4</sub>• 7H<sub>2</sub>O , MnCl<sub>2</sub>• 4H<sub>2</sub>O, MoO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O , Co (NO<sub>3</sub> )<sub>2</sub>• 6H<sub>2</sub>O (11)

#### 4.5 Nitratos

Como se ha mencionado, el crecimiento y la carotenogénesis de *H. pluvialis* está regulada por factores ambientales. La privación de algunos nutrientes como el sulfato, fosfato o el nitrato, alta irradiancia y alta temperatura promueven la acumulación masiva de este pigmento acompañada de cambios morfológicos desde un estado vegetativo verde hasta un estado rojo de alta acumulación de astaxantina. La disponibilidad real de nitrógeno para la célula está determinada principalmente por la concentración de nitratos en el medio y la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* está fuertemente influenciada por la disponibilidad de nitratos. En un cultivo continuo,



dicha disponibilidad depende del nitrato presente en el medio, de la velocidad a la que se suministra y de la biomasa del cultivo (36). Los nitratos en medio de cultivo pueden determinarse mediante método colorimétrico, incubando una muestra del medio con ácido salicílico al 2,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%. Luego se determina la absorbancia con un espectrofotómetro, empleando curvas de calibración para determinar la concentración (36).

#### **4.6 Fósforo**

Dentro de los requerimientos nutricionales para la producción de biomasa de *H. pluvialis* y astaxantina se encuentran los micronutrientes esenciales (Na, K, NH<sub>3</sub>, Ca, Mg, Fe, Cl, S) y los macronutrientes (C, H, O<sub>2</sub>, P). La falta de fósforo (en conjunto con otros macronutrientes) en el medio de cultivo puede generar cambios en la composición de la célula, disminuyendo la síntesis de ARN y ADN, mientras aumenta la producción de lípidos o carbohidratos. Por lo tanto, al haber obtenido la biomasa necesaria, la posterior limitación de este componente en el medio, generaría un estrés a la célula que favorece la producción de pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina. (37)

#### **4.7 Luz**

Debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en las moléculas de los carotenoides, estos se descomponen fácilmente por efecto de la luz, además de que provoca reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide. Es importante tener en cuenta este factor a la hora de la extracción del carotenoide. (38)

#### **4.8 Salinidad**

Cuando la microalga *H. pluvialis* es sometida a cultivo en medios salinos, el crecimiento celular se ve restringido y la síntesis de astaxantina se estimula. (1) Para evaluar el efecto de la salinidad sobre la acumulación de astaxantina, se deben someter a las células a diferentes concentraciones de la misma, suministradas al medio de cultivo. Para concentraciones superiores de sal, no se presenta crecimiento de la microalga y se observa muerte por rompimiento de la membrana celular. (1)

#### **4.9 Cloruro de sodio**

Se ha demostrado que concentraciones por encima del 1% p/v de NaCl son letales para el crecimiento de la microalga, mientras que una concentración de 0,5% favorece la acumulación de astaxantina; este método es frecuentemente utilizado como un factor inductor de estrés celular. (1)

#### **4.10 Acetato de sodio**

El acetato de sodio se emplea como fuente de carbono para el medio y la microalga. Se ha demostrado que la concentración óptima para el crecimiento de la microalga es de 0,299 mg/L de acetato de sodio, e inhibe el crecimiento a altas concentraciones (1,6 mg/L). (13)

#### **4.11 Condiciones de estrés**

Para un correcto desarrollo del cultivo de *H. pluvialis*, es necesario tener en cuenta la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, el nitrato como fuente de nitrógeno (0.5 – 1 g/L de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), fosfato como fuente de fósforo (aprox. 0.1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), potasio, magnesio y otros metales traza que actúan como cofactores enzimáticos en su metabolismo (36). El nitrógeno por su parte, representa del 1 al 10% de la materia seca total de la microalga, siendo el nutriente de mayor importancia para su crecimiento; sus niveles deben ser controlados a lo largo del crecimiento en cultivo para mantener el contenido de nutrientes, evitar el daño de la membrana celular y la pérdida de biomasa, además de que la disminución de nitrógeno en cultivo es un factor que inhibe la biosíntesis de clorofila A y promueve la degradación de la clorofila B, retrasando el proceso de fotosíntesis de la microalga. (39)

Existen ciertas condiciones inducidas que pueden generar situaciones de estrés celular, y que consecuentemente provocan el inicio de la caroteno génesis en *H. pluvialis*, además de las altas intensidades de luz, están las altas temperaturas que fomentan la deshidratación celular y las alteraciones morfológicas, lo que se traduce en una acumulación de caroteno en vesículas alrededor del núcleo, seguido de un desequilibrio metabólico a nivel celular; dichas alteraciones son las que obligan a la célula a pasar a su fase quística o de resistencia. Gracias a la acumulación de astaxantina en las vesículas, se ha incursionado en la búsqueda de la obtención de altas concentraciones del pigmento, por medio de factores de estrés (32), además de la optimización de métodos de extracción que no generen un gasto económico mayúsculo.

La producción de la biomasa de *H. pluvialis* en estado vegetativo, es un paso fundamental para la obtención posterior de astaxantina, para ello se emplean biorreactores o fotobiorreactores, que permiten el crecimiento exponencial con alta actividad fotosintética. (1)

#### **4.12 Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros**

El biorreactor es un sistema que busca mantener un ambiente biológicamente activo, esto es posible con el control, modificación y monitoreo de parámetros ambientales, por ejemplo: presión parcial de oxígeno, presión parcial de dióxido de carbono, pH, agitación, densidad, temperatura y en otros casos, intensidad luminosa

(fotobiorreactor) (1). Biostat A plus es un biorreactor usado en investigación y academia con un diseño de vivienda único con medición y control integrados, donde es posible controlar bombas, temperatura, gasificación y sistema motor; es muy útil y ampliamente usado para el cultivo microbiano y celular, para la visualización de tendencia de crecimiento, enriquecimiento de oxígeno si es necesario, entre otros. Los volúmenes que se manejan usualmente son de 1 L, 2 L o 5 L (40). Cabe resaltar que los parámetros y acondicionamientos del biorreactor, dependen del microorganismo de interés, por esta razón es importante comprender su metabolismo y modos de nutrición. *H. pluvialis* tiene como características metabólicas, una nutrición fotoautótrofa, mixotrófica y heterótrofa (41)

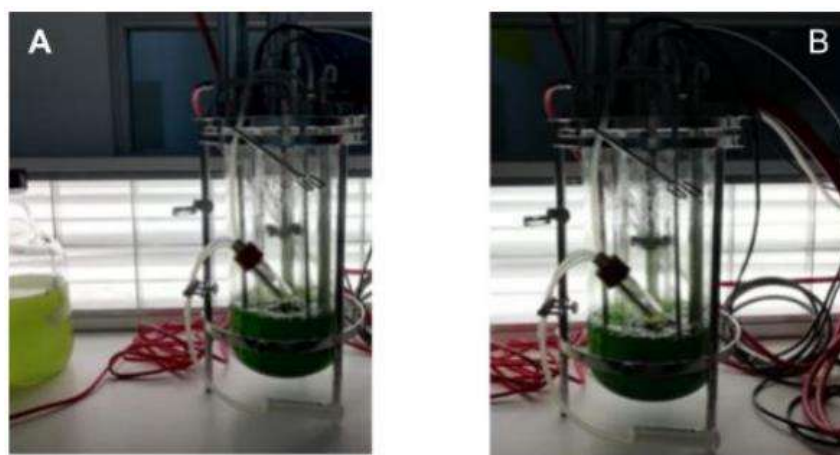


Figura 7. Biorreactor biostat A plus de 5 L, medio RM (A) y BBM (B). (24)

Adicionalmente, para lograr una cantidad considerable de biomasa celular, es necesario el uso de medios de cultivo artificiales que cuenten con los macros y micro nutrientes necesarios, para un correcto rendimiento y crecimiento celular (Tabla 4) (39). Entre los medios que más frecuentemente se utilizan para el cultivo de *H. pluvialis*, encontramos: Medio Bold Basal (BBM) y Medio RM (Tabla 3).

	REQUERIMIENTOS	COMPUESTOS QUÍMICOS	VALORES
<b>FÍSICOS</b>	Luz		2,000-4,000 lux
	Temperatura		15-22°C
	Salinidad		0.37%
	pH		7-9
	Redox		

<b>NUTRITIVOS</b>	C	CO <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	g/100 ml
	O, H	O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	g/100 ml
	N	N <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> +NO <sub>3</sub>	g/100 ml
	P	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	g/100 ml
	S	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	g/100 ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al, et	Sales	µg/100 ml
	Vitaminas	B <sub>12</sub> , Tiamina, Biotina	µg/100 ml

Tabla 4. Requerimientos para el crecimiento de microalgas (42)

#### 4.13 Métodos de medición de biomasa

##### Cámara de Neubauer:

Para evaluar el crecimiento y morfología celular, se realiza conteo celular en cámara de Neubauer. A partir de estos datos, se realiza una curva de crecimiento de cel/ml cuantificados (cinética de crecimiento). De esta forma, se puede determinar el medio de cultivo que mayor tasa de crecimiento presente de la microalga *H. pluvialis*.

La cantidad de células por mililitro puede calcularse con la fórmula  $C = N * 10^4 * Dil$ , donde **C** corresponde a la densidad celular, **N** promedio de células en 8 cuadrantes, **Dil** factor de dilución y **10<sup>4</sup>** factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL. (11)

##### Peso seco:

El crecimiento puede monitorearse tanto por conteo celular, como por peso seco. El peso seco se puede determinar tomando una alícuota de muestra que luego es centrifugada (3000 rpm x 20 min), es importante resuspender el precipitado con Vortex para luego centrifugar nuevamente las muestras. El precipitado se seca hasta obtener un peso constante. (1)

##### Densidad óptica:

El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo ( $I_0$ ) y la transmitida ( $I$ ) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia ( $A$ ) o densidad óptica ( $D.O.$ ). La evaluación del crecimiento en cultivo, puede determinarse mediante la lectura de la densidad óptica, en un espectrofotómetro. Sin embargo, la densidad óptica no es una medida directa del número de células, es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de Absorbancia. (11)

#### Epifluorescencia

Se basa en la captación de luz reflejada por una muestra al ser excitada por un ente externo (ejemplo común un láser azul), donde la muestra absorbe la energía la transforma (ejemplo color verde) y se observa por un equipo lo más común en uso convencional es por microscopía (43).

#### **4.14 Métodos de medición de pigmentos**

##### Espectrofotométrico:

Para la cuantificación debe realizarse una curva de calibración (absorbancia y en función de la concentración expresada en  $\mu\text{g/ml}$ ) con patrones de referencia, y se hace la lectura en espectrofotómetro. Se hallan las concentraciones extrapolando los datos de las absorbancias a la curva realizada; para elaborar las gráficas se emplea la fórmula: (44)

$$\frac{\text{concentración } \mu\text{g/ml} \times \text{volumen muestreado (ml)}}{\# \text{ de células en conteo en cámara (cel/ml)} \times \text{vol muestreado (ml)}}$$

##### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Es un método físico de separación que se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. En esta se busca aumentar la eficiencia de las separaciones, por medio de una disminución de las partículas de fase fija hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir, es una técnica altamente usada en análisis químicos (45).

#### **4.15 Modelos de crecimiento**

Para la correlación en cuanto al desarrollo celular se usan modelos de crecimiento, estos pueden ser: logístico, donde el crecimiento estará íntimamente relacionado con la capacidad nutricional del medio y es el refinamiento del modelo exponencial; como se observa en la figura 8 (1), donde  $N$  indica el número de microorganismos a tiempo

$t$  y  $N^{\circ}$  es el valor de  $N$  en el momento de inoculación.  $A$ , es la concentración máxima y  $\lambda$  son los parámetros del modelo (48). El modelo Gompertz, donde se menciona y analiza un crecimiento lento al inicio y al final de un momento dado, pero manteniendo la relación logística del anterior método (figura 8 (2)) aquí se define  $N(t)$  como el tamaño de la población al tiempo  $t$ ,  $A$  es el valor del máximo de crecimiento y además determina un punto de inflexión en  $A/e$  y  $K$  establece la tasa intrínseca de crecimiento. Por otro lado el método Monod, también conocido como curva de crecimiento microbiano, representa el comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo, siendo posible la determinación de la producción de biomasa o de metabolitos de interés, en este se menciona que,  $X(t)$  es la cantidad de células o biomasa al tiempo  $t$ , su unidad de medida es  $gr/l$ , los  $\mu(S)$  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  $S(0)$  son condiciones iniciales de biomasa y sustrato respectivamente (figura 8(3)) (46).

El método Haldane, es usado para relacionar las velocidades de crecimiento con las concentraciones de sustrato, demostrando así el efecto negativo que tiene sobre las células a altas concentraciones, este fenómeno es conocido como inhibición por sustrato su ecuación se puede evidenciar en la figura 8(4) (43). Finalmente, el modelo Baranyi, describe el crecimiento como una cinética que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población (44) Figura 8 (5).

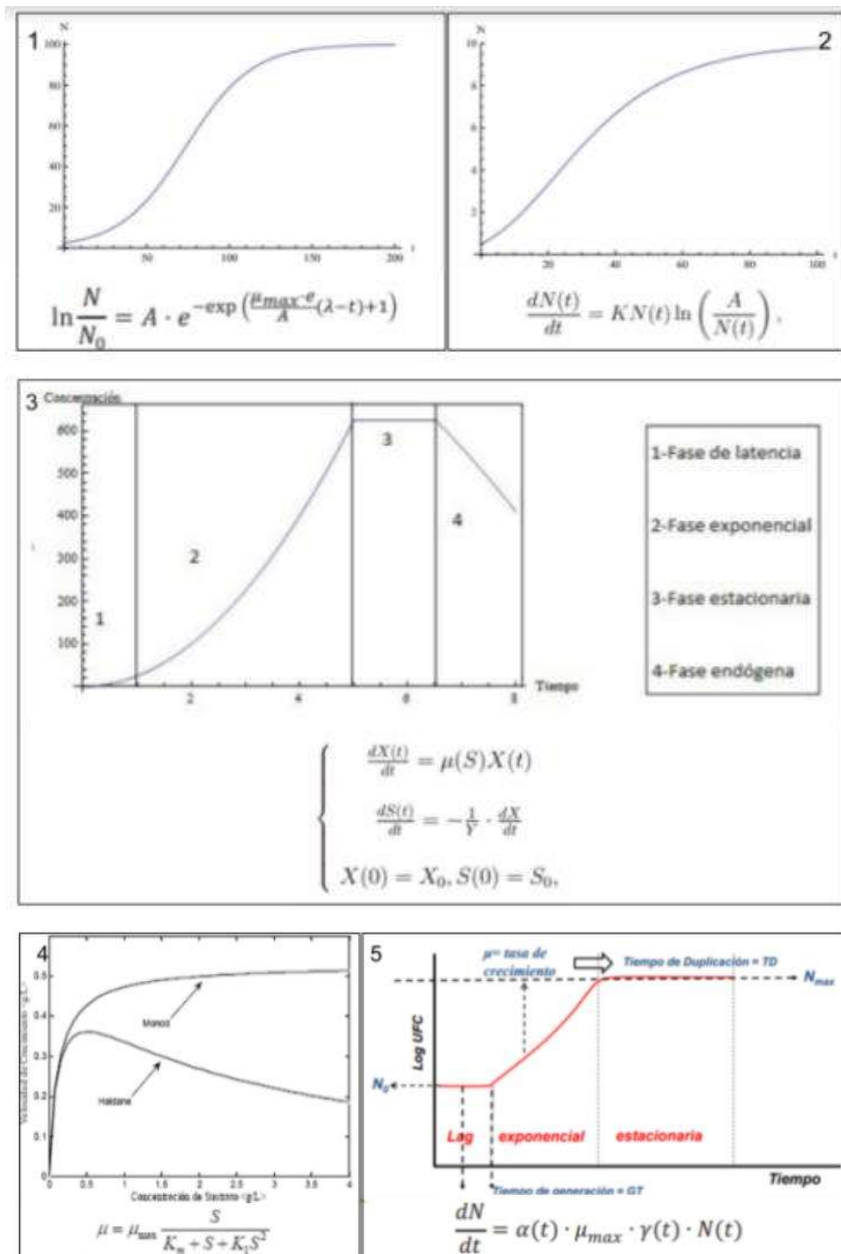


Figura 8. Modelos estadísticos. 1. Logístico. 2. Gompertz. 3. Monod (46). 4. Haldane (47). 5. Baranyi (48)

## 5. Diseño metodológico

Tipo de Investigación mixta (cualitativa y cuantitativa) (49) de alcance experimental que buscó fundamentalmente establecer las condiciones para la producción de astaxantina empleando la biomasa de la microalga *H. pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L en los medios de cultivo BBM y RM.

- Universo: Microalgas
- Población: Microalgas productoras de carotenoides.
- Muestra: Biomasa de *H. pluvialis* UTEX 2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA), donada por la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana.

### 5.1 Hipótesis

El uso de la biomasa de la microalga *H. pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L sometida a condiciones combinadas de acetato de sodio y alta intensidad de luz blanca incrementa la producción de astaxantina.

### 5.2 Variables dependientes

Producción de astaxantina y clorofila, cambio morfológico

Indicadores:

ug/mL astaxantina, ug/ mL Clorofila

Morfología: vegetativa, palmella, aplanospora

### 5.3 Variables independientes

Condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz utilizando la biomasa de la microalga *H. pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L.

Indicadores:

Concentraciones de acetato de sodio: 0,750 mg/L y 0,375 mg/L

Luz: iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), intensidad lumínica de 65 luxes por 15 días. Período de estrés Leds de color blanca con intensidad lumínica de 360 luxes.

Biomasa en cultivo usando cajas de cultivo celular de 250 mL en medio RM y BBM:  
Células/mL

Condiciones del cultivo: pH a 6,8, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad 15 días (Condición de estrés: fotoperiodo 20 horas luz: 4 horas oscuridad), temperatura de a  $20 \pm 1^\circ$  C, aire filtrado y agitación diaria 10 segundos. Las cajas de



cultivo celular se colocaron horizontalmente para aumentar la superficie de intercambio de gases y optimizar la exposición a la luz. No se suministró una fuente adicional de CO<sub>2</sub>. (57)

Biomasa de *H. pluvialis* bajo las siguientes condiciones: biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L, pH a 6.8, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de a 20 ±1° C, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y LEDS color blanca, azul y roja, intensidad lumínica de 270 luxes, aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/minutos y agitación 100 rpm. El cultivo realizado en el medio de cultivo BBM presenta a los 36 días de cultivo una biomasa de 2,88 x10<sup>7</sup> cel./mL. El medio RM presentó una biomasa de 2,43 x10<sup>7</sup> cel./mL. (24)

#### 5.4 Fase 1. Crecimiento de la microalga *H. pluvialis*

##### Microorganismo

*H. pluvialis* UTEX2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA), de la Universidad de la Sabana. Mantenimiento de la cepa: medio sólido o líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), 50 lux, temperatura 20°C + 2°C, se replica cada seis meses.

Activación de la cepa: en medio líquido Volvox-MES, irradiancia 50 lux, pH 6,8 temperatura 20°C + 2°C, fotoperiodo 16h:8h LO, luz blanca con lámparas fluorescentes (Tlt 20w/54RS marca Philips) y aire filtrado hasta alcanzar una población celular de 1 x 10<sup>4</sup> Células/ml

##### Condiciones de cultivo

La biomasa obtenida bajo las Condiciones biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L, pH a 6.8, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de a 20 ±1° C, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y LEDS color blanca, azul y roja, intensidad lumínica de 270 luxes, aire filtrado y agitación 100 rpm (24), se distribuirá por triplicado en celdas de cultivo celular de 250 mL, adicionando 100 mL de cada biomasa obtenida en los medios RM y BBM. Se utilizará el control de los medios RM y BBM. (Tabla 4)

Tratamientos	Condiciones
<b>RM (Control)</b>	Se trabajó por triplicado. Medio original sin cambios. Se adicionará 1 x 10 <sup>4</sup> células/mL del inóculo.
<b>RM Biostat Acetato</b>	Se trabajó por triplicado. A los 15 días de cultivo se adicionó 0,750 mg/L de

	acetato de sodio.
<b>RM Biostat</b>	Se trabajó por triplicado. A los 15 días de cultivo se adicionó 0,375 mg/L de acetato de sodio.
<b>BBM (Control)</b>	Se trabajó por triplicado. Medio original sin cambios. Se adicionó $1 \times 10^4$ células/mL del inóculo.
<b>BBM Biostat Acetato</b>	Se trabajó por triplicado. A los 15 días de cultivo se adicionó 0,750 mg/L de acetato de sodio.
<b>BBM Biostat</b>	Se trabajó por triplicado. A los 15 días de cultivo se adicionó 0,375 mg/L de acetato de sodio.

Tabla 5. Tratamientos empleados por medio de cultivo.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Los tratamientos se llevaron a cabo en un periodo de 35 días bajo las condiciones de pH de 6.8, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ , iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), intensidad lumínica de 65 luxes, aire filtrado y agitación manual de 10 segundos al día por 15 días. Las cajas de cultivo celular se colocaron horizontalmente para aumentar la superficie de intercambio de gases y optimizar la exposición a la luz

Se evaluó el crecimiento celular por medio de microscopía en cámara de Neubauer, donde se buscaron los siguientes parámetros: color, morfología y viabilidad celular. Después de 15 días los cultivos se indujeron a estrés con un fotoperiodo de 20 horas luz 4 oscuridad usando LEDs de color blanca con intensidad lumínica de 360 luxes y se adicionaron concentraciones de 0,750 mg/L y 0,375 mg/L de acetato de sodio, exceptuando el control de cada medio. Se tomó una alícuota de 1 ml de cada cultivo cada siete días, para conteo celular y evaluación de cambios morfológicos usando cámara de Neubauer. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores de Y a los cuales se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular.

## 5.5 Fase 2. Cambio morfológico

Se evaluaron los cambios morfológicos usando cámara de Neubauer. Para el monitoreo de la microalga se utilizó un microscopio de luz marca OLYMPUS CX31 para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células, realizando registro fotográfico a 40x (1).

## 5.6 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.

Se realizó el procedimiento APHA, 1992 (50). Inicialmente se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo, los cuales se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante (medio de cultivo); al paquete celular se le adiciono 1 mL de metanol al 90% y se calentó durante 10 min. a 60°C en baño serológico y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó una curva de calibración (absorbancia en función de la concentración expresada en ug/mL) con patrones de referencia, la lectura espectrofotométrica se hizo en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina, con el fin de encontrar las concentraciones en ug/ml. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Adicional se realizó la determinación de astaxantina por el método HPLC

Equipo: Se empleó un Cromatógrafo Agilent® Technologies 1260 Infinity, equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD). La columna cromatográfica empleada fue una, ZORBAX Eclipse plus C18 4,6 x 100mm, 3,5 µm de tamaño de partícula.

Reactivos: Astaxantina vestándar (99%) Sigma Aldrich, metanol 98% reactivo analítico, metanol grado HPLC (Scharlau), hexano grado HPCL y acetonitrilo grado HPLC (ABCLaboratorios).

### Desarrollo del método analítico

Preparación de las muestras:

Para evaluar las características de desempeño en la validación del sistema se preparó una solución madre de astaxantina (por duplicado) de la siguiente manera: 1 mg de Astaxantina / 50 mL de acetona (100%) = 20 µg/mL. A partir de estas soluciones se hicieron diluciones para trabajar de 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,8 µg/mL y 1 µg/mL. (51)

La concentración de astaxantina se determinó según Yuan y Chen (52) modificado, en donde se cambió el metanol por acetona al 100%, el procedimiento se desarrolló de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 5 ml de la suspensión de células de microalga y se centrifugó a 9000 r.p.m durante 10 min para concentrar la biomasa. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1ml de acetona y se mezcló con 0,40 g de partículas esféricas (tamaño de partícula = 0,2-1 mm), se mezcló vigorosamente en vórtex durante 15 minutos y nuevamente se centrifugó a 9000 r.p.m durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante se mezcló con 0,1 ml de una solución de NaOH en metanol (5 mM) y se mantuvo durante la noche en oscuridad a 70 °C en estufa de secado con aire recirculante para saponificar los enlaces de astaxantina.

Condiciones cromatográficas:

Las condiciones cromatográficas como longitud de onda de máxima absorción para la lectura, temperatura de columna y la composición de la fase móvil, se ajustaron con pruebas de modificación a partir de estudios similares (53)(52)(54)(55)(7).

Se establecieron las siguientes condiciones: columna cromatográfica C18, de 4.6 x 100 mm y 5 µm de tamaño de partícula, se evaluó una temperatura isocrática entre 25 y 30°C, utilizando como fase móvil metanol:agua:hexano (95%/4%/1%), flujo entre 0,5 y 1 mL/min, volumen de inyección entre 10 y 20 µL y longitud de onda entre 480 y 488 nm.

<b>Columna ZORBAX 5 µm C18 (4.6 x 100mm)</b>	
Fase móvil	metanol:agua:hexano (95:4:1 v/v)
Flujo	1mL/min
Temperatura	30°C
Volumen de Inyección	10 µL
Espectro de absorción	488 nm
Tiempo de corrida	39 min

Tabla 6. Condiciones cromatográficas (51)

Linealidad:

La linealidad del sistema y del método se verificó mediante la realización de la curva de calibración con seis concentraciones diferentes de analito, las cuales fueron preparadas por duplicado, en un rango de 0,1 a 1,0 µg/mL. La evaluación de la linealidad se hizo a través del análisis de varianza (ANOVA) para la regresión. El

estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto, asumiendo una confianza del 95% (56).

#### Precisión:

La precisión fue determinada a través de la evaluación de la repetibilidad (intradía) y de la precisión intermedia (inter días). La repetibilidad se estimó mediante análisis por triplicado de tres niveles de concentración (0,2, 0,4 y 1,0 µg/mL) en el mismo día, con el mismo analista y con el mismo equipo. La precisión intermedia se determinó en tres o cinco días, utilizando las mismas concentraciones del analito.

La repetibilidad se evaluó a través del coeficiente de variación, el valor de aceptación para el método en cada nivel debe tener  $C.V \leq 15\%$  (ICH 2005). La precisión intermedia se evaluó mediante un ANOVA empleando una confianza del 95%.

#### Exactitud:

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal. Como criterio de aceptación para este parámetro se fijó un porcentaje de recuperación (%R) entre 95% a 105%, considerando la complejidad de la matriz de la muestra (56).

#### Límite de detección y cuantificación:

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas en el estudio de linealidad, empleando cuatro niveles de concentración (0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 µg/mL), con cinco réplicas a cada nivel.

El límite de detección (Ecuación 1) y límite de cuantificación (Ecuación 2) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de una curva de calibración a bajas concentraciones.

$$\text{Ecuación 1. } LOD = (|a| + 3Sa) / (b * \sqrt{n})$$

$$\text{Ecuación 2. } LOQ = (|a| + 10Sa) / (b * \sqrt{n})$$

Donde Sa = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones y b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones. (51)

#### **5.7 Fase 4. Análisis estadístico**

Se realizará un análisis de varianza (ANOVA) para todos los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, para establecer si existían diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) utilizando el programa Excel 2016 y test de tukey (95%)

## 6. Resultados

### 6.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga *H.pluvialis*

Los tratamientos control de RM y BBM, presentaron un crecimiento promedio a los 7 días de cultivo de  $2,603 \times 10^4$  cel/mL y de  $4,790 \times 10^4$  cel/mL , respectivamente. El día 14 el medio BBM tuvo mayor crecimiento con un total de  $8,330 \times 10^4$  cel/mL, con respecto al medio RM con un total de  $5,757 \times 10^4$  cel/mL; el día 35 de cultivo se presentó un crecimiento promedio de  $2,580 \times 10^5$  cel/mL para los tratamientos RM CONTROL y de  $8,31 \times 10^5$  cel/mL para BBM CONTROL (Anexo 1 y 2); Se observa en las figura 9a y 9b el crecimiento celular para ambos medios, siendo el día 35 el que se presenta la mayor cantidad de biomasa, en especial para el medio BBM con un incremento en un 69 % frente al RM.

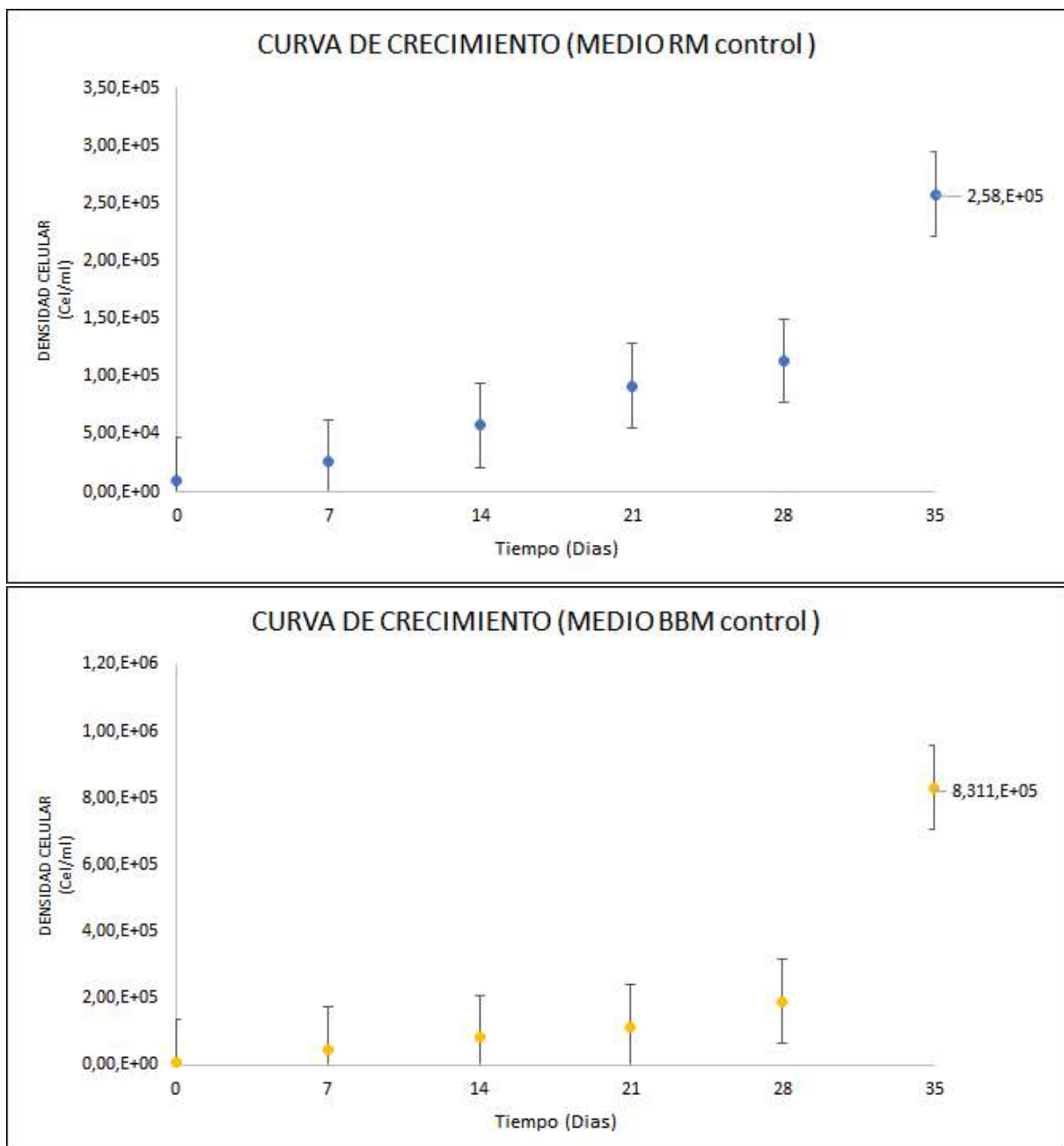
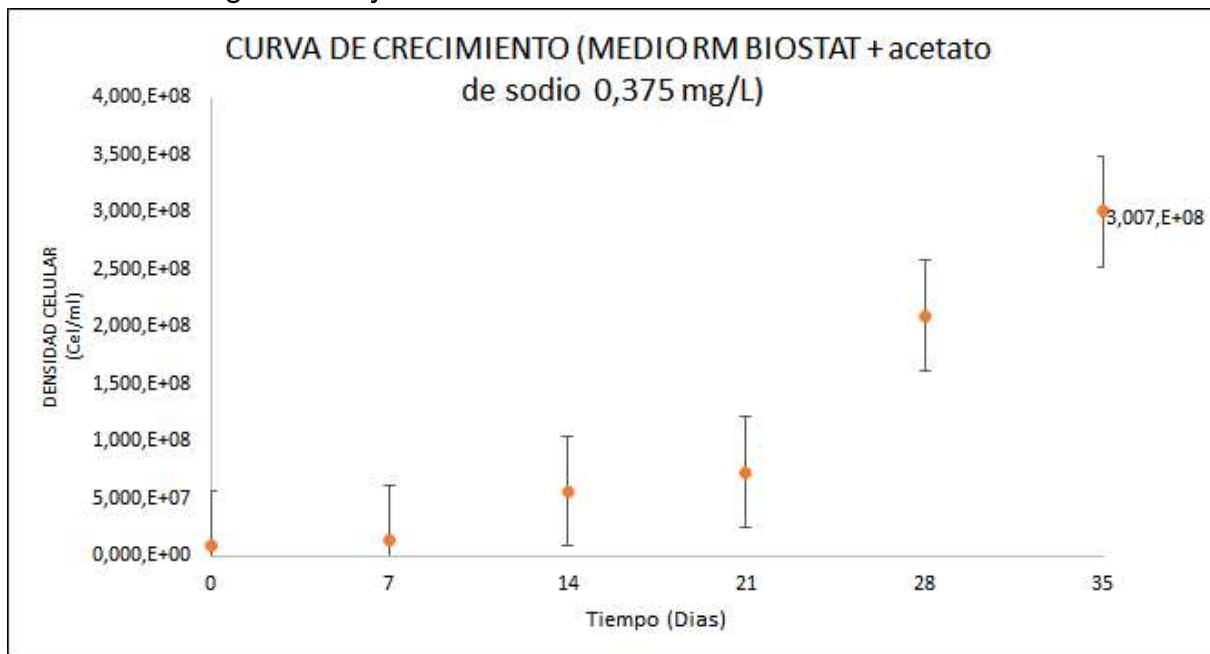


Figura 9. Curva de crecimiento medios (a) RM control y (b) BBM control.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Los tratamientos RM BIOSTAT y BBM BIOSTAT con adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio y aumento de irradiancia a 360 luxes con led blanca luego de los 15 días iniciales del cultivo, presentaron un crecimiento celular promedio a los 7 días de cultivo de  $1,333 \times 10^7$  cel/mL para el tratamiento RM BIOSTAT y de  $6,143 \times 10^6$  cel/mL para el tratamiento BBM BIOSTAT. Al día 35 de cultivo se obtuvo un crecimiento para RM BIOSTAT y BBM BIOSTAT en promedio de  $3,01 \times 10^8$  cel/mL y de  $1,89 \times 10^8$  cel/mL, respectivamente (Anexo 1 y 2); incrementándose el crecimiento en 37.2% del tratamiento RM BIOSTAT en comparación del tratamiento BBM BIOSTAT, siendo para ambos tratamientos el día en que se presenta el mayor crecimiento como se observa en la figura 10 a y 10b.





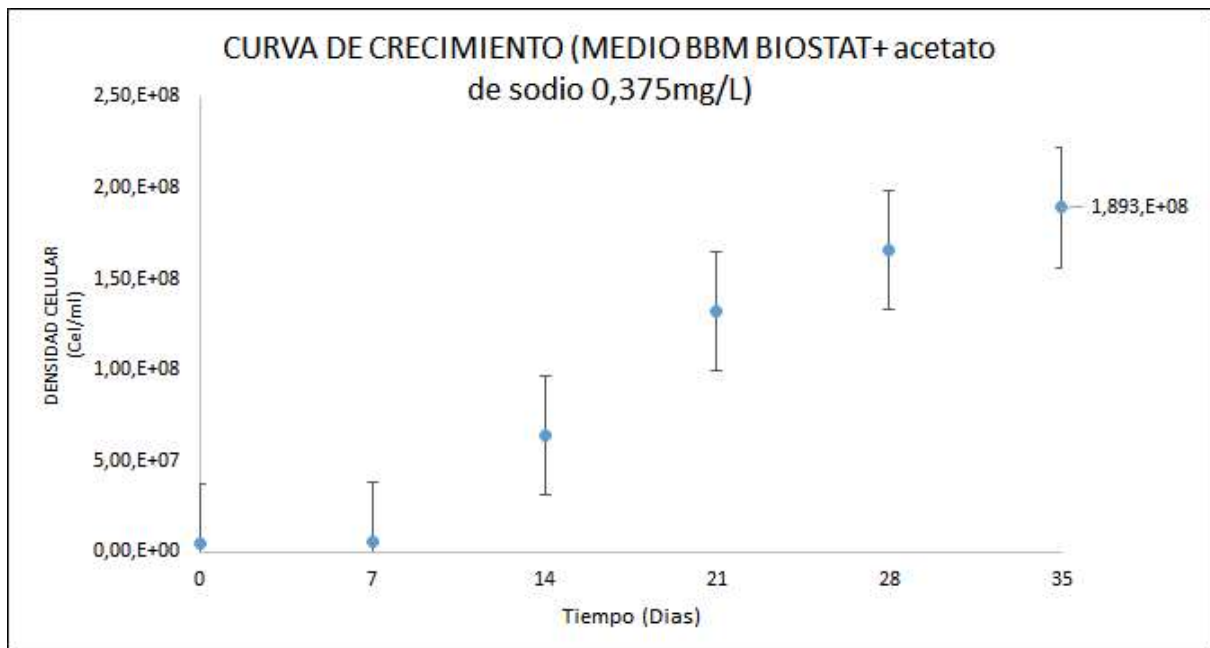


Figura 10. Curva de crecimiento medios (a) RM BIOSTAT y (b) BBM BIOSTAT con adición de acetato de sodio a 0,375 mg/L combinados con irradiancia de 360 luxes desde 15 día del cultivo.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Los tratamientos RM BIOSTAT ACETATO y BBM BIOSTAT ACETATO, en los cuales se le adiciona 0,750 mg/L de acetato de sodio y se aumentó la irradiancia a 360 luxes con led blanca, presentaron al día 7 de cultivo un promedio de crecimiento de  $4,229 \times 10^7$  cel/mL para los medios RM BIOSTAT ACETATO y de  $2,583 \times 10^7$  cel/mL para los medios BBM BIOSTAT ACETATO, para el día 35 de cultivo se presentaron crecimiento en promedio de  $1,54 \times 10^8$  cel/mL y de  $1,86 \times 10^8$  cel/mL, respectivamente, siendo el incremento de un 17% en el crecimiento celular del tratamiento BBM BIOSTAT ACETATO, con respecto al tratamiento RM BIOSTAT ACETATO, figura 11 a y figura 11b (Anexo 1 y 2).

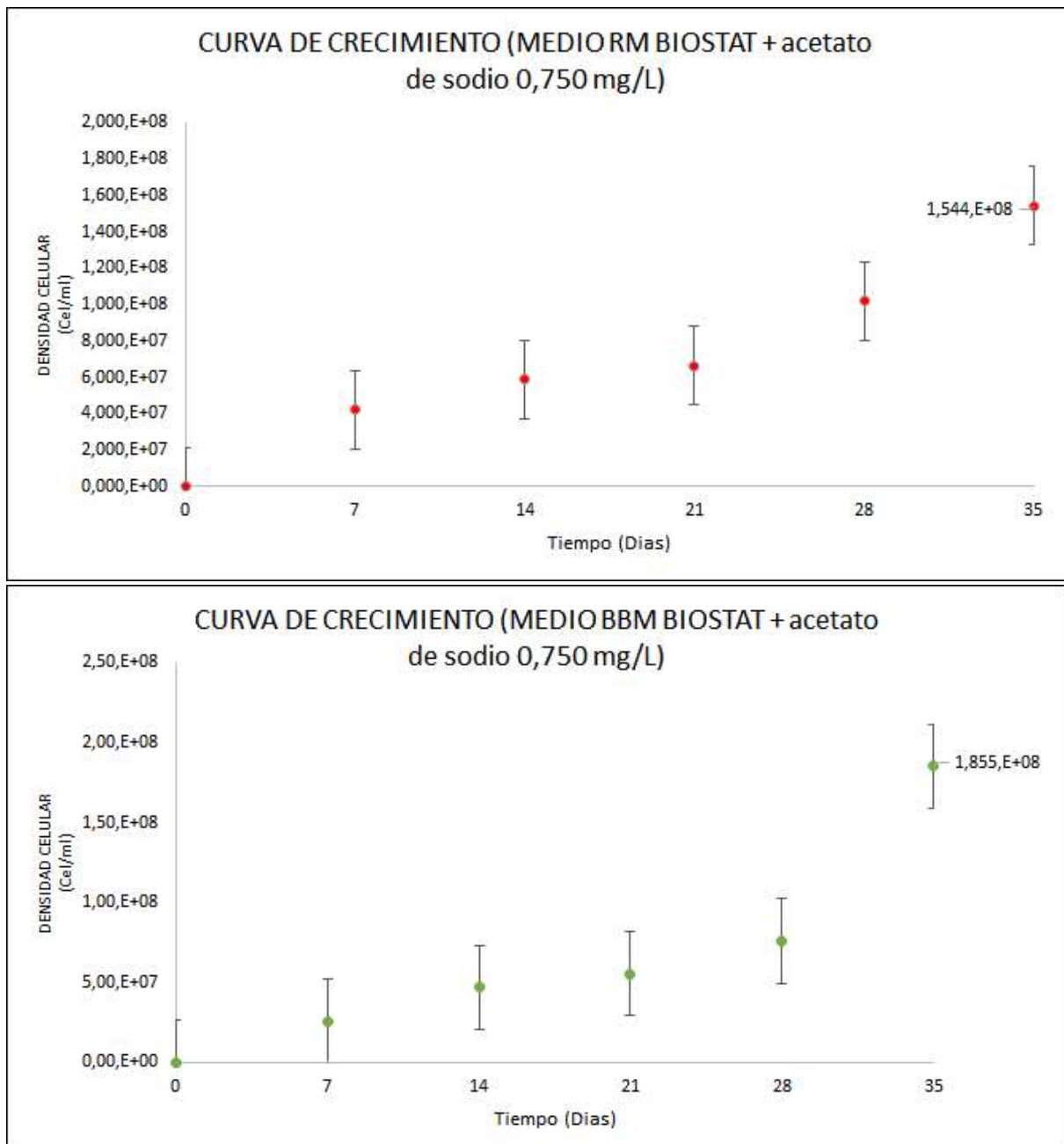


Figura 11. Curva de crecimiento medios (a) RM Biostat y (b) BBM biostat con adición de acetato de sodio a 0,750 mg/L.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

En las figuras 12a y 12b se presenta el crecimiento celular para los diferentes tratamientos, observándose que el tratamiento que presentó el mayor crecimiento fue el RM BIOSTAT, el cual contiene de acetato de sodio 0.375 mg/L combinado con una irradiancia de 360 luxes de led blanca (Figura 10).

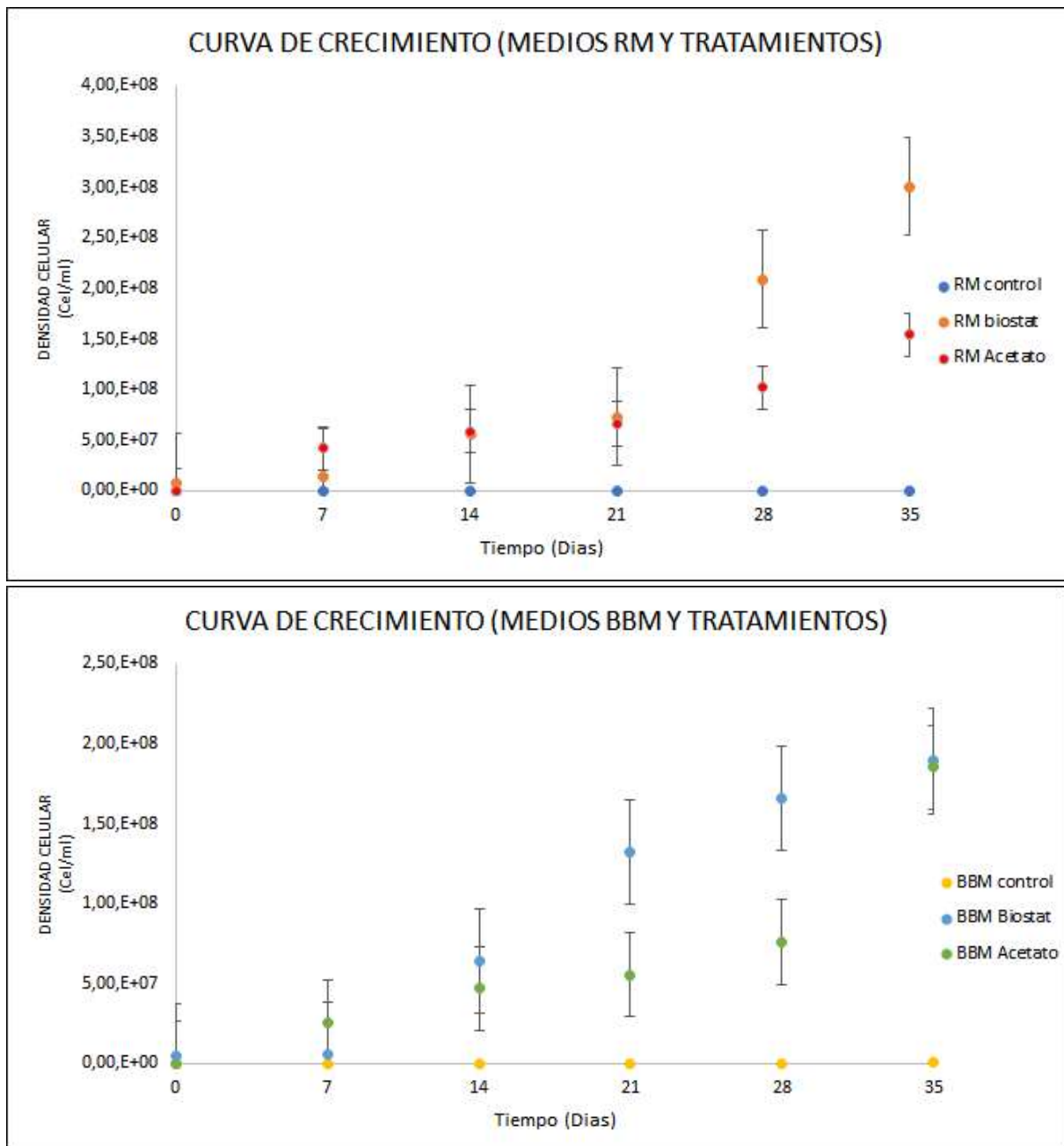


Figura 12. Vista general de curvas de crecimiento medios (a) RM y (b) BBM.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

El ANOVA (95%) realizado estableció que con respecto al crecimiento celular se presentan diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 3,54$  ; $P=0,015$ ;  $gl= 5$ ) (ver anexo 3). Al realizar el test de Tukey (95%) (anexo 4) se pudo establecer que el mejor tratamiento para el crecimiento celular de la microalga es el denominado PB que corresponde al RM BIOSTAT, donde se usa una concentración de 0.375 mg/L de acetato de sodio combinado con una irradiancia de 360 luxes de led blanca (Figura 10a), con un recuento celular de  $3.01 \times 10^8$  cel./mL en el día 35, seguido del medio de cultivo BBM BIOSTAT con una concentración de 0.375 mg/L de acetato de sodio, con un recuento celular de  $1.89 \times 10^8$  cel./mL. en el mismo tiempo (Figura 10b).

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores de Y a los cuales se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. La idea de realizar el ajuste fue para determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los medios probados. El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM BIOSTAT ACETATO con una velocidad específica de crecimiento de 0,028 Cel./hora (Ver tabla 7) (Ver Anexo 5 curvas ajustadas).

MEDIO DE CULTIVO	N° DATOS	DATO MINIMO	DATO MAXIMO	VEL. DE CRECIMIENTO	COEFICIENTE DE DETERMINACION
RM	6	4	5	0,028	96,40%
RM BIOSTAT ACETATO	6	7	8	0,028	96,79%
RM ACETATO	6	4	8	0,016	54,89%
BBM	6	4	6	0,027	93,51%
BBM BIOSTAT ACETATO	6	7	8	0,024	85,43%
BBM ACETATO	6	4	8	0,017	59,99%





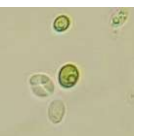
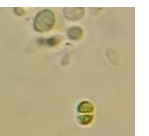
Tabla 7. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.

Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Se pudo establecer que el tratamiento RM BIOSTAT ACETATO fue el que mejor se ajustó al modelo logístico con un 96,79% y el que menos se ajustó fue el RM ACETATO con un 54,89%, los tratamientos en general tuvieron velocidades de crecimiento entre 0,016 y 0,028 células/ hora.

## 6.2 Fase 2. Cambio morfológico

Se presentan a continuación la morfología microscópica y macroscópica observada para los diferentes tratamientos realizados.

Días	RM	RM BIOSTAT ACETATO	RM + ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT ACETATO	BBM + ACETATO
7						

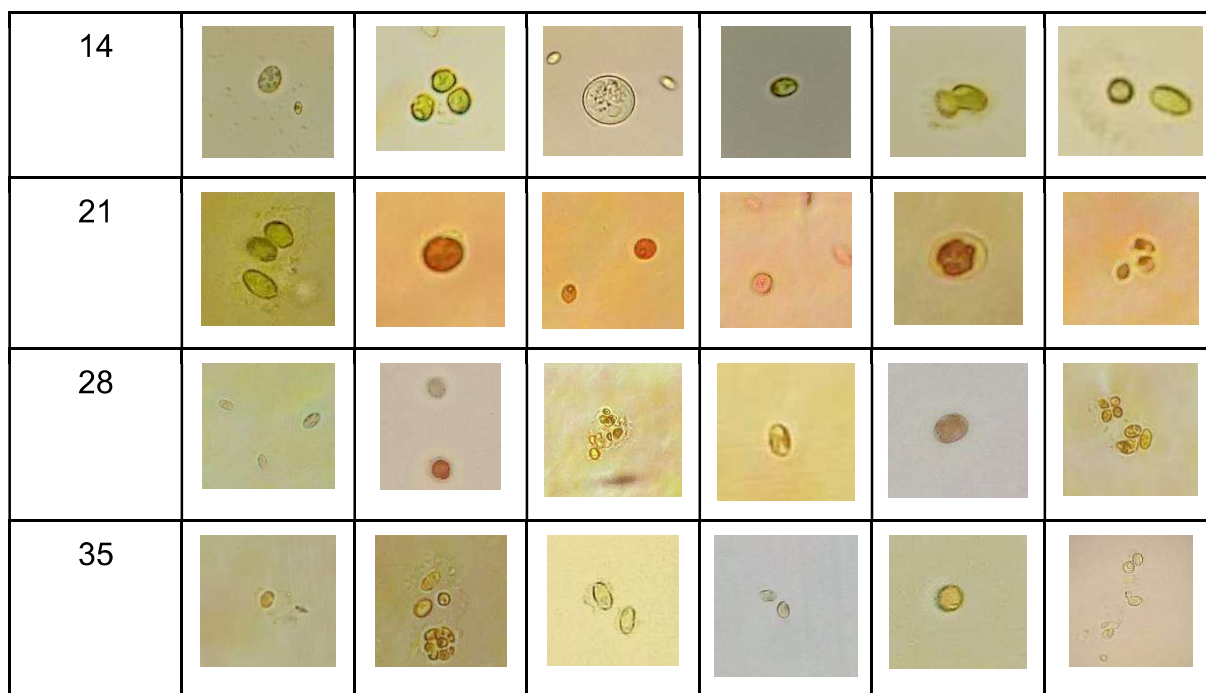





Figura 13. Cambio morfológico de *H. pluvialis* para los tratamientos RM (control), RM BIostat ACETATO: 0,375 mg/L acetato de sodio, RM ACETATO: 0,750 mg/L acetato de sodio, BBM (control), BBM BIostat ACETATO: 0,375 mg/L acetato de sodio, BBM ACETATO:0,750 mg/L acetato de sodio. Combinados con irradiancia de 360 luxes desde 15 días de cultivo. Tamaño 40x. Tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

Cambio morfológico (macroscópico)	
Días	Medios
0	 
7	



14



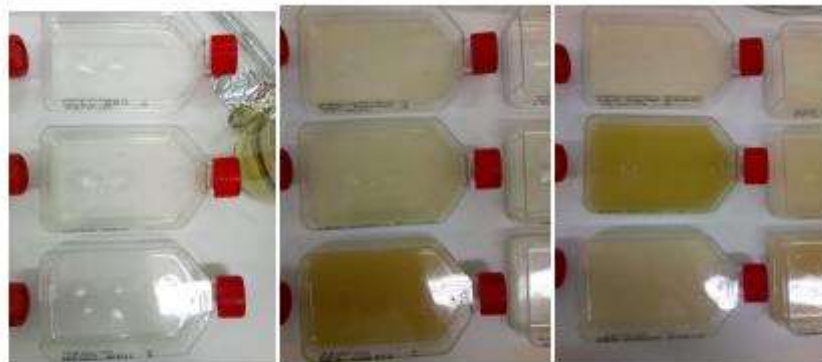
(BBM biostat, BBM acetato, RM biostat, RM acetato)

21

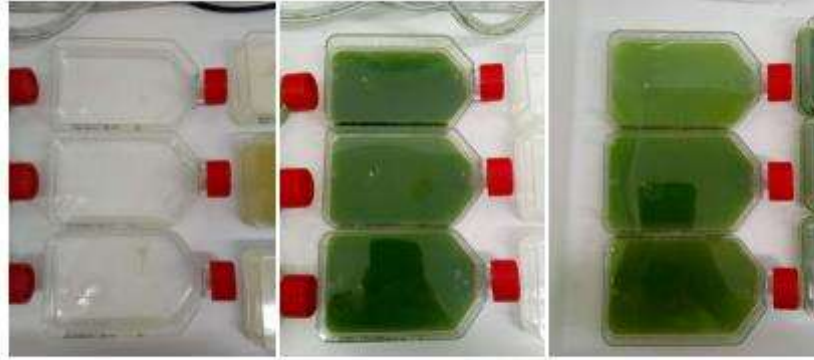


ORDEN: RM, RM biostat, RM acetato, BBM, BBM biostat y BBM acetato

28



BBM, BBM biostat y BBM acetato



RM, RM biostat y RM acetato

35





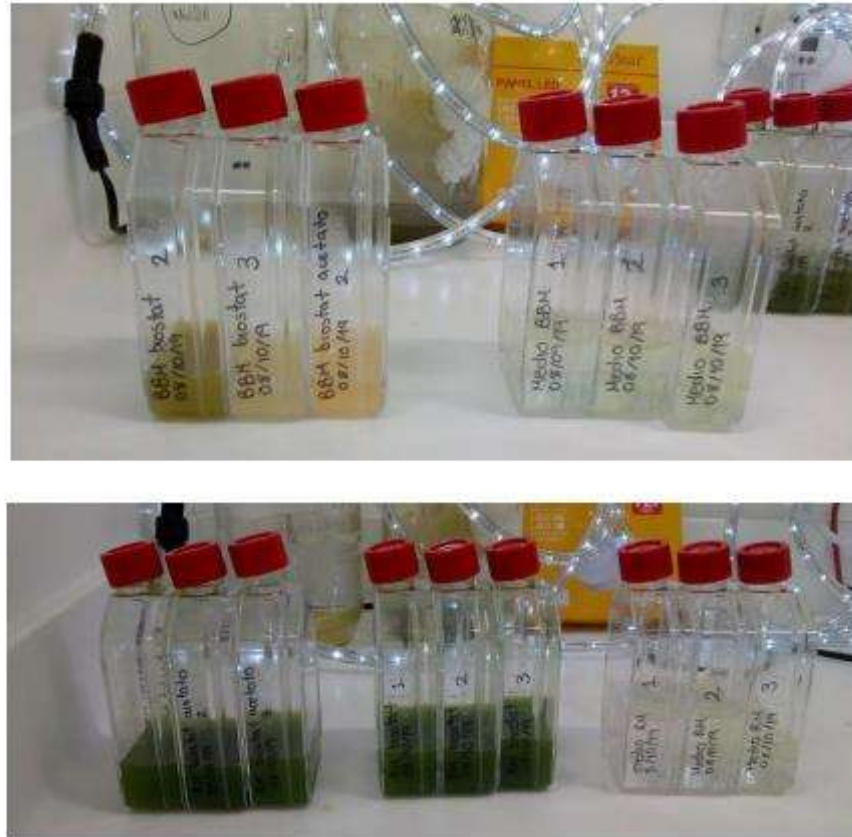


Figura 14. Cambio macroscópico de *H. pluvialis* para los tratamientos RM (control), RM BIostat ACETATO: 0,375 mg/L acetato de sodio, RM ACETATO: 0,750 mg/L acetato de sodio, BBM (control), BBM BIostat ACETATO: 0,375 mg/L acetato de sodio, BBM ACETATO: 0,750 mg/L acetato de sodio. Combinados con irradiancia de 360 luxes desde el 15 día de cultivo. Tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

La microalga *H. pluvialis*, presentó formas vegetativas de color verde para los días 7 y 14 de cultivo, hasta su fase enquistada no móvil roja en el día 21 para los tratamientos RM BIostat ACETATO y BBM BIostat ACETATO, en especial. Tratamientos que contenían de 0,375 mg/L de acetato de sodio y aumento de irradiancia a 360 luxes con luz led blanca desde el 15 día del cultivo, indicando producción de astaxantina por el cambio de color de verde a color rojo enquistada (Figura 13), lo cual se correlaciona con la caracterización macroscópica realizada (Figura 14), por efecto de los factores de estrés utilizados en forma combinada.

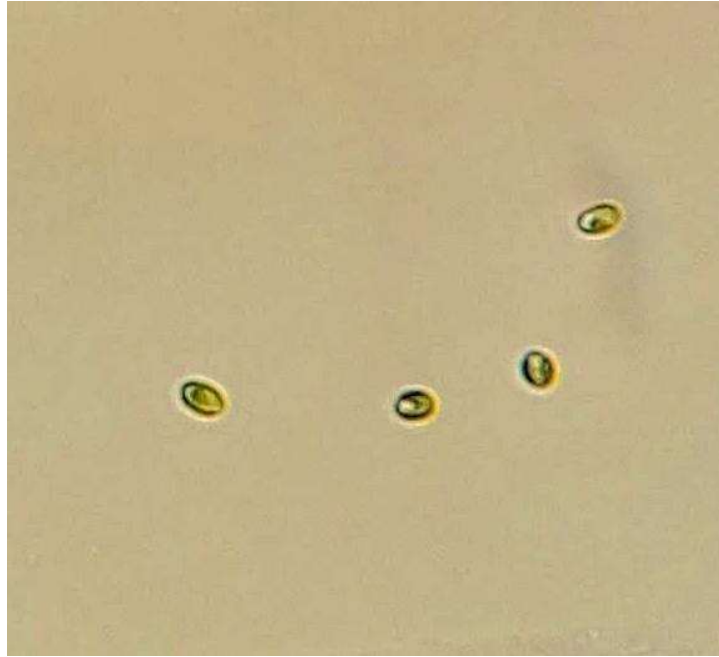


Figura 15. Células vegetativas microalga *H.pluvialis*. Fotografía representativa de todos los medios de cultivo durante el día 7 de crecimiento en objetivo 40X. Fotografía tomada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.



Figura 16. Célula de *H. pluvialis* en su fase quística. Fotografía representativa de los medios de cultivo RM BIOSTAT ACETATO Y BBM BIOSTAT ACETATO tratados con concentraciones de 0,375 mg/L de acetato de sodio, durante el día 21 de su cultivo en objetivo 40X. Fotografía tomada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.



Figura 17. Células de *H. pluvialis*. Fotografía representativa de los medios de cultivo RM ACETATO y BBM ACETATO tratados con concentraciones de 0,750 mg/L de acetato de sodio, durante el día 35 de su cultivo en objetivo 40X. Fotografía tomada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

Se observa en la figura 12 y 17, que para el día 35 de cultivo las células de la microalga empiezan a volverse de color verde, encontrándose también células sin color, efecto que han reportado otros autores cuando se utiliza estrés salino con acetato de sodio

### 6.3 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina

Las concentraciones de astaxantina y clorofilas determinadas se pueden observar en los anexos 10 y 11, se puede comprobar que en los tratamientos control de los medios RM y BBM una concentración de astaxantina de 0,116 ug/mL y 0,584 ug/mL, respectivamente.

En cuanto a la concentración de clorofila se obtuvo para los medios RM control y BBM Control resultados de 1,174 ug/mL y de 0,810 ug/mL, respectivamente; en ambos casos las concentraciones corresponden al día 7 de cultivo. Al día 35 se obtuvieron como concentraciones de astaxantina de 0,046 ug/mL, para el medio RM control y de 0,025 ug/mL para el medio BBM control, con respecto a las concentraciones de clorofila en el mismo periodo de tiempo, el medio RM control y BBM control tuvieron valores de 0,887 ug/mL y 0,561 ug/mL respectivamente, correlacionado con el crecimiento celular presentado (Figura 9a y 9b); En el día 21 de cultivo se presentó la mayor concentración de astaxantina, con valores de 0,116 ug/mL, para el medio RM y el día 21 para el medio BBM con un valor de 0,584 ug/mL. Con respecto a la

clorofila el día de mayor concentración para el medio RM control fue el 7 día con 1,174  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para el medio BBM control el día 21 con un valor de 0,810  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (ver figura 18)

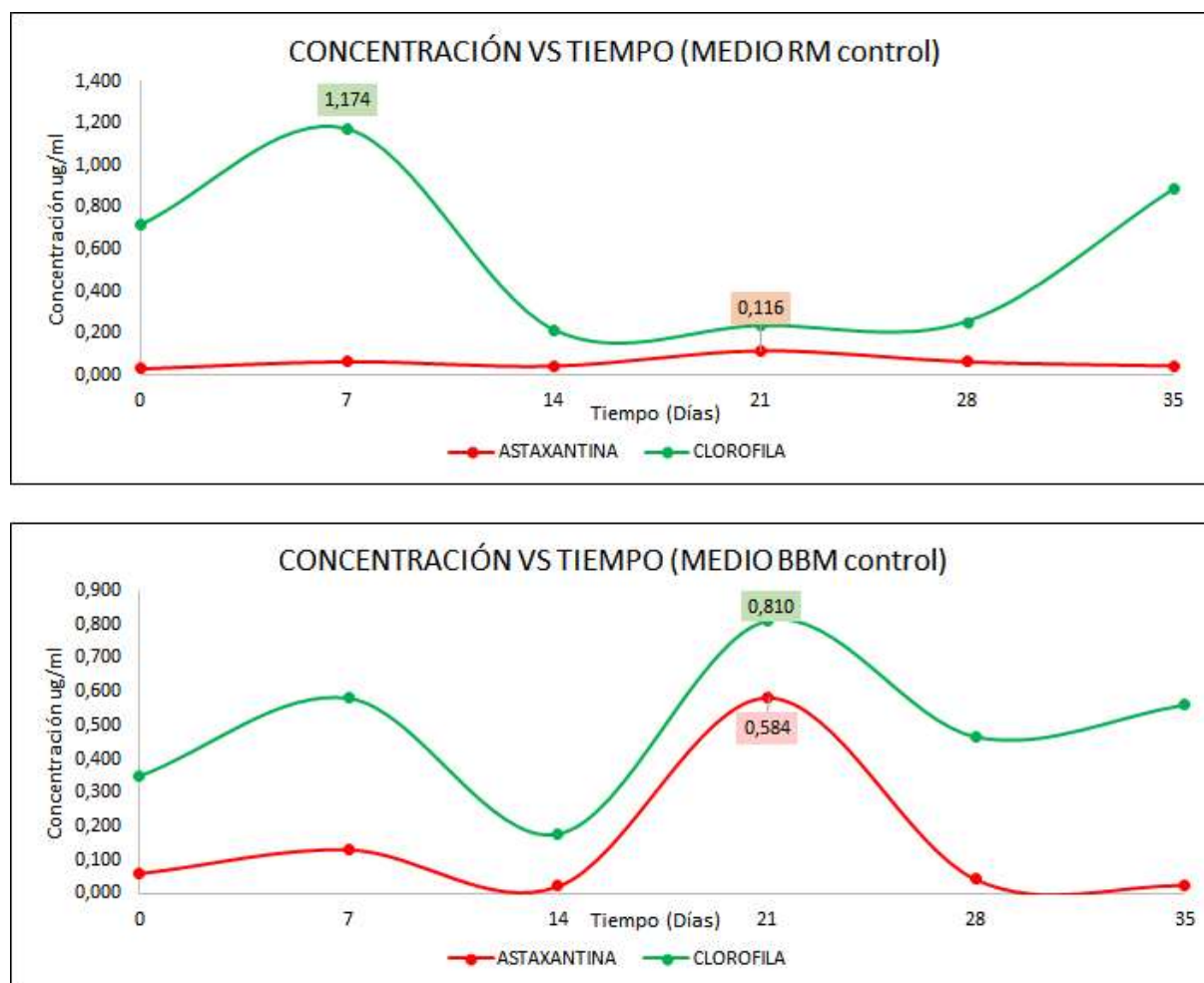


Figura 18. Concentración de astaxantina y clorofila para medios (a) RM control y (b) BBM control. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

En general se observa en las Figuras 17a y 17b, que por tratarse de tratamientos control, se empieza a presentar acumulación del carotenoide por la deficiencia en nutrientes combinada con la alta irradiancia, hasta los días 21 y 35, con bajos valores entre 0,116  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,584  $\mu\text{g}/\text{mL}$  correlacionándose con la caracterización microscópica que se presenta en la figura 13.

El tratamiento BBM BIOSSTAT, que contenían 0,375  $\text{mg}/\text{L}$  de acetato de sodio y se sometía a una irradiancia de 360 luxes con luces led blanca, en el día 7 de cultivo presentó una concentración de astaxantina de 0,181  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El día 21 fue el que presentó mayor concentración de astaxantina con un valor de 2,176  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La concentración de clorofila en el mismo tratamiento fue de 0,427  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el día 7 y de 13,971  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el día 21 (ver figura 19); en este caso se puede destacar el

aumento de la concentración de clorofila en el tiempo, esto puede deberse a que la concentración de acetato de sodio empleada en un principio, jugó un rol fundamental en el crecimiento y así mismo en el aumento de clorofila, lo cual se correlaciona con el crecimiento de la microalga, ya que el acetato de sodio es considerado como se mencionó previamente una fuente de carbono adicional, para la microalga.

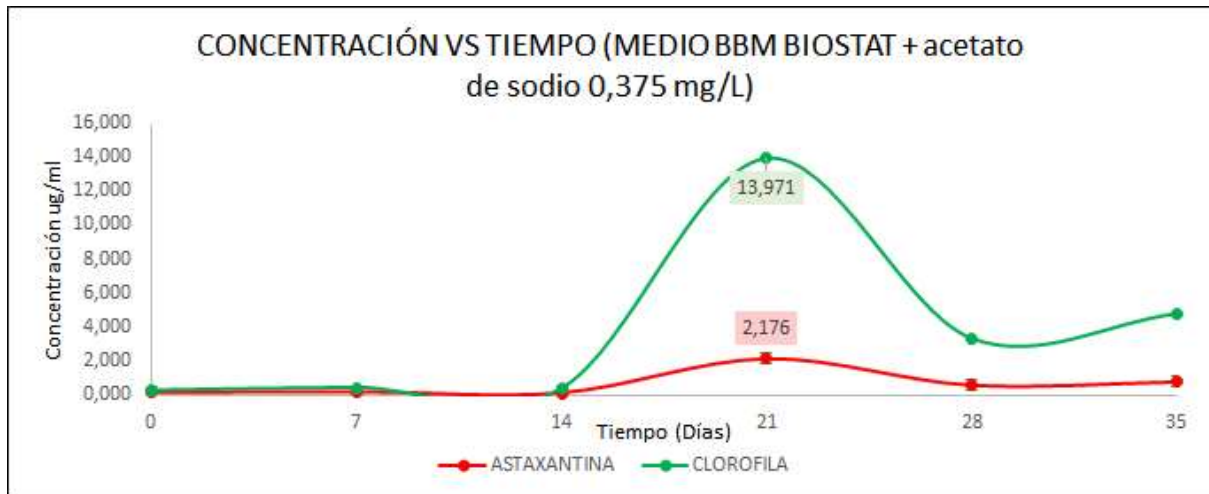


Figura 19. Concentración de astaxantina y clorofila para medio BBM BIOSTAT: 0,375 mg/L de acetato de sodio, combinada con una irradiancia de 360 luxes desde 15 día de cultivo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Para los tratamientos RM BIOSTAT se obtuvieron concentraciones de astaxantina en el día 7 de 0,347 ug/mL. El día con mayor producción de astaxantina en este tratamiento fue el día 28, con una concentración de 6,088 ug/mL. La concentración de clorofila obtenida para el día 7 de cultivo fue de 2,094 ug/mL y de 36,251 ug/mL para el día 28 del cultivo (ver figura 20). Se observa que en este tratamiento se encontró un incremento del 64% de la concentración de astaxantina, respecto al tratamiento de BBM BIOSTAT, estos resultados destacan no solo la viabilidad del medio de cultivo RM, sino también el efecto de las condiciones de estrés utilizadas, como la concentración de acetato de sodio de 0,375 mg/L combinada con alta irradiancia de 360 luxes de LED blanca.



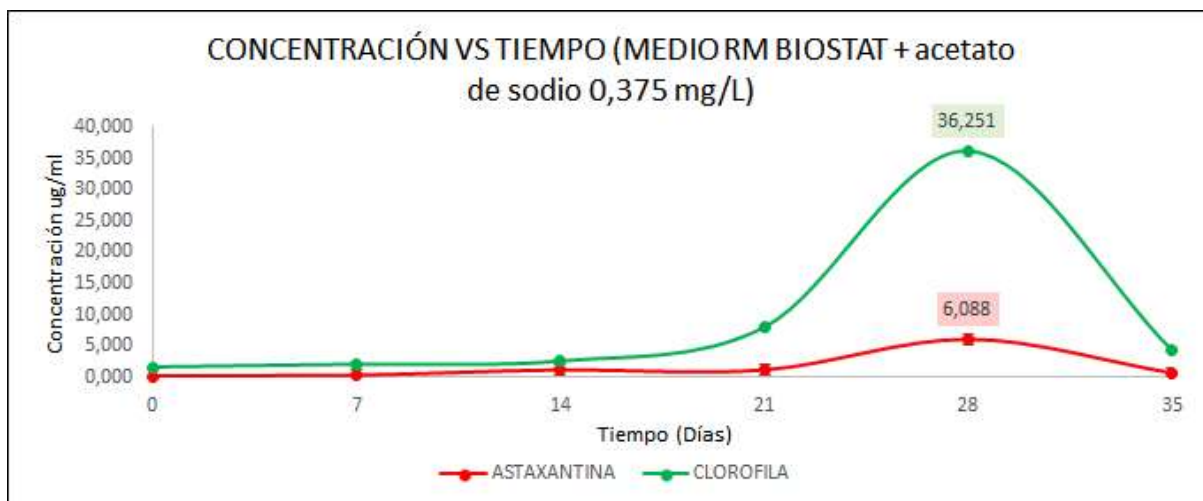


Figura 20. Concentración de astaxantina y clorofila para medio RM BIOSTAT: 0,375 mg/L de acetato de sodio combinada con una irradiancia de 360 luxes desde 15 día del cultivo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Los tratamientos donde utilizaron concentraciones de 0,750 mg/L de acetato de sodio y alta irradiancia de 360 luxes con luces LED blanca, BBM ACETATO y RM ACETATO, se obtuvieron concentraciones de astaxantina de 0,141 ug/mL, para el día 7, para el tratamiento RM ACETATO. La mayor concentración de astaxantina obtenida fue de 1,815 ug/mL correspondiente a los 28 días del cultivo. En cuanto a la clorofila, los resultados para los días 7 y 28 fueron de 1,615 ug/mL y de 12,094 ug/mL, respectivamente, lo cual se correlaciona con el crecimiento celular observado.

Los resultados de astaxantina para los medios BBM ACETATO fueron de 3,450 ug/mL (día 7) y 0,219 ug/mL (día 35), observándose que la adición de acetato de sodio en una concentración de 750 mg/L afecta el crecimiento de la microalga y por lo tanto la acumulación de astaxantina, siendo el día 7 el que presenta mayor producción de astaxantina. Las concentraciones de clorofila para este tratamiento fueron de 21,136 ug/mL (día 7) y de 6,155 ug/mL (día 35), con una disminución de 14,981 ug/mL de la producción de clorofila en el tiempo del cultivo realizado (ver figura 21b), debido a que la concentración de acetato de sodio de 0,750 mg/L, posiblemente produce daño sobre la célula microalga, produciendo destrucción de células por el estrés salino producido, permitiendo concluir que la mejor concentración de acetato de sodio como factor de estrés para producir astaxantina es 0,375 mg/L, porque no produce daño en el crecimiento de la microalga, sino que es utilizada por la microalga en esta concentración como fuente adicional de carbono favoreciendo el crecimiento de la microalga y posteriormente como factor de estrés produce acumulación de astaxantina.

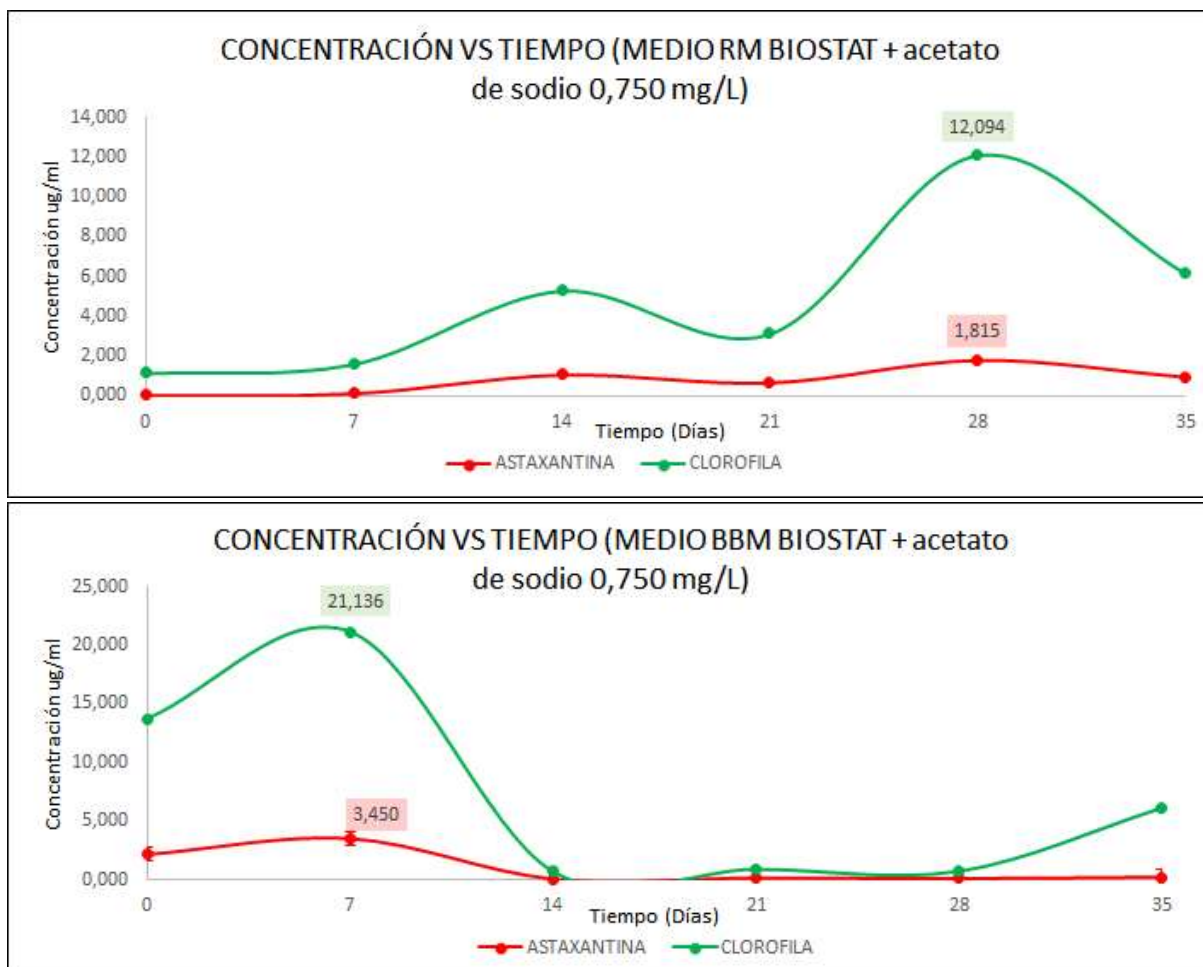


Figura 21. Concentración de astaxantina y clorofila para medios (a) RM ACETATO y (b) BBM ACETATO : 0,750 mg/L de acetato de sodio combinada con una irradiancia de 360 luxes desde 15 día del cultivo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Según el ANOVA (95%) realizado no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la obtención de astaxantina ( $F=1,38; P=0,259; gl=5$ ), ni para la producción de clorofila ( $F=1,39; P=0,253; gl=5$ ) (ver anexo 10 y 11). Sin embargo, al igual que en el crecimiento celular el tratamiento con mayor producción de astaxantina y clorofila fue el RM BIOSTAT (Figura 20), donde se utiliza como factores de estrés acetato de sodio al 0,375 mg/L combinada con alta irradiancia de LED blanca (360 luxes), llegando a una concentración máxima de astaxantina de 6,088 ug/mL y de clorofila una concentración máxima de 36,251 ug/mL a los 28 días de cultivo, el segundo tratamiento con mayor producción de astaxantina y clorofila fue el medio BBM BIOSTAT (figura 19), donde se utiliza como factores de estrés acetato de sodio al 0,375 mg/L combinada con alta irradiancia de LED blanca (360 luxes), con una concentración máxima de astaxantina de 2,176 mg/mL y una concentración máxima de clorofila de 13,971 mg/mL, a los 21 días de cultivo (ver figura 22a y 22b).

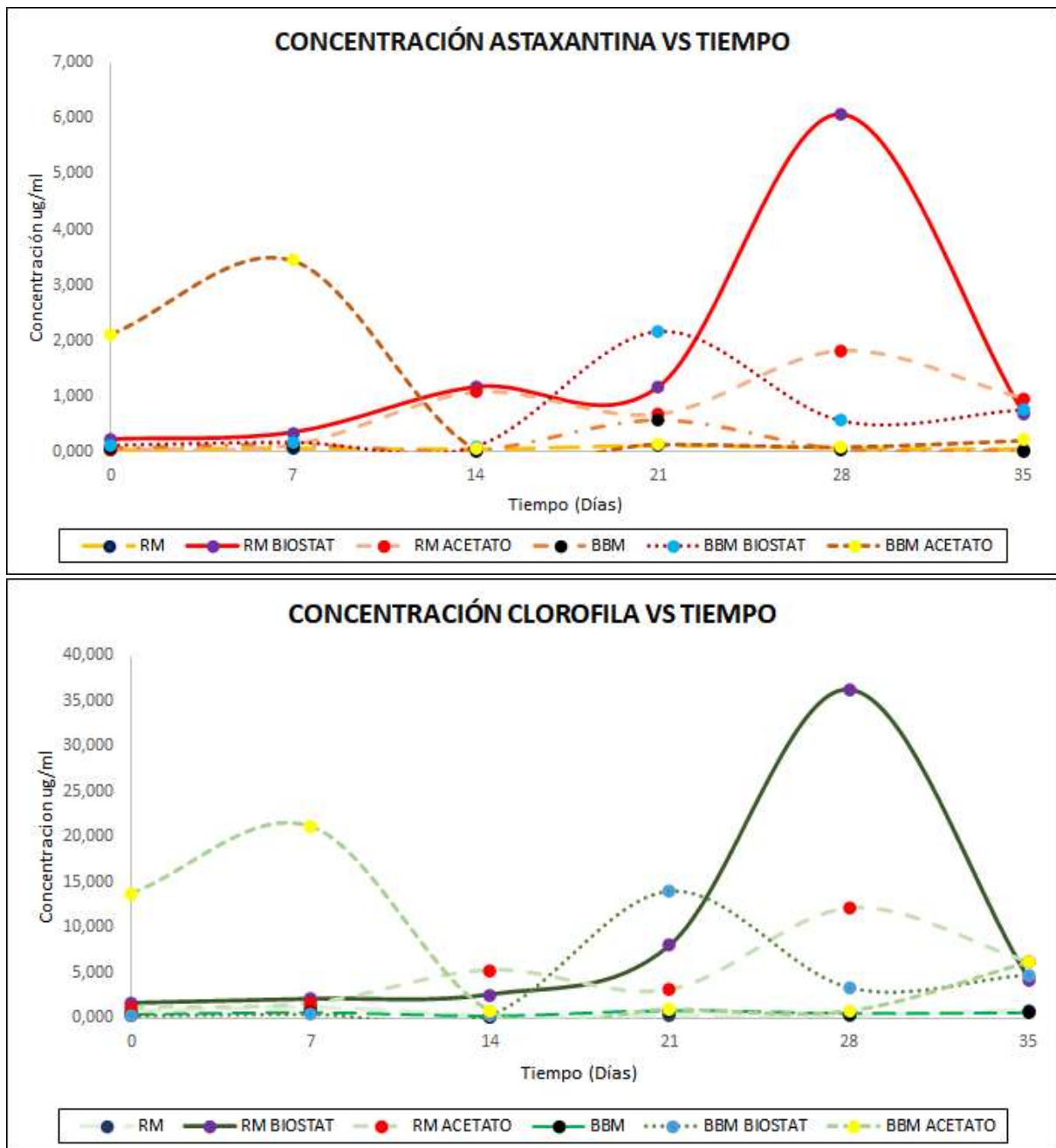


Figura 22. (a) Concentración de astaxantina y (b) clorofila. Tratamientos: RM: control; BBM: control; RM BIOSTAT: 0,375 mg/L de acetato de sodio, BBM BIOSTAT: 0,375 mg/L de acetato de sodio, RM BIOSTAT ACETATO: 0,750 mg/L de acetato de sodio y BBM BIOSTAT ACETATO: 0,750 mg/L de acetato de sodio. Combinados con irradiancia de 360 luxes desde el 15 día de cultivo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

La producción de astaxantina usando la biomasa de *H. pluvialis* obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, sometiénndose a los factores de estrés acetato de sodio (0,375 mg/L y 0,750 mg/L) y una irradiancia de 360 lux con luz blanca, en medios BBM y RM, pH 6,8, temperatura 20°C, agitación diaria, aire filtrado, cajas de cultivo celular colocadas horizontalmente para aumentar la superficie de intercambio de gas y optimizar la exposición a la luz, permitió establecer que el



tratamiento que uso medio RM con 0.375 mg/L de acetato de sodio produjo 6.088 ug/mL de astaxantina. El Anova (95%) realizado no estableció diferencias significativas entre tratamientos para la producción del carotenoide ( $P > 0,05$ ), pero sí para el crecimiento celular ( $P < 0,05$ ), y según el test Tukey HSD este tratamiento tiene significativamente mayor crecimiento celular ( $3,01 \times 10^8$  cel./mL), concluyendo la factibilidad de usar la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, para someterla a factores de estrés como el acetato de sodio combinada con alta irradiancia y obtener astaxantina, aprovechando que el proceso de producción de astaxantina por esta microalga se logra en un sistema de dos etapas: durante la primera etapa, se producen células vegetativas "verdes" y luego se convierten, en la segunda etapa, en quistes que acumulan astaxantina. (57)

### 6.3.1 Determinación de astaxantina por HPLC

En la figura 23 se observa el pico de estándar de astaxantina a 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , demostrando que con la metodología cromatográfica empleada se logró la elución rápida del analito.

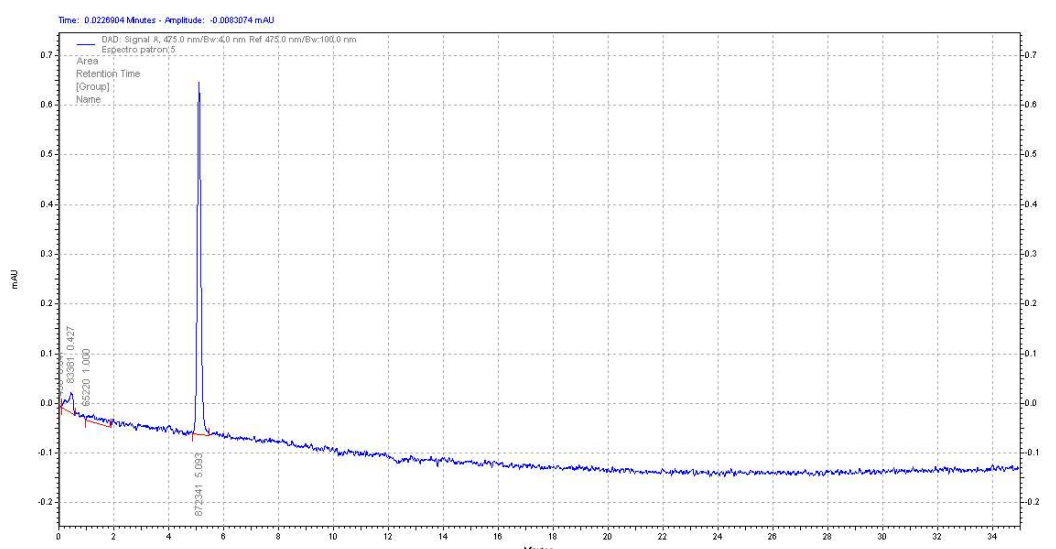


Figura 23. Cromatograma de estándar de astaxantina (51)

### Selectividad/Especificidad

Para evaluar la selectividad del método, se compararon los resultados cromatográficos de las réplicas de los diferentes solventes de la fase móvil, determinando que no presentan interferencias en el tiempo de retención del analito. Luego se compararon los cromatogramas obtenidos de las muestras de microalgas y de muestras enriquecidas con estándar de astaxantina, mostrándose en el segundo caso un aumento en el área del pico.

## Linealidad

La linealidad se estudió para seis niveles de concentración (entre 0.1 y 1,0 µg/mL), realizando cinco réplicas de cada una. En la Figura 24, se presenta la curva de calibración (relación de áreas vs concentración), en la cual se puede observar un coeficiente de correlación de 0.987 indicando un alto grado de relación entre la variable X (concentración), y la variable Y (respuesta).

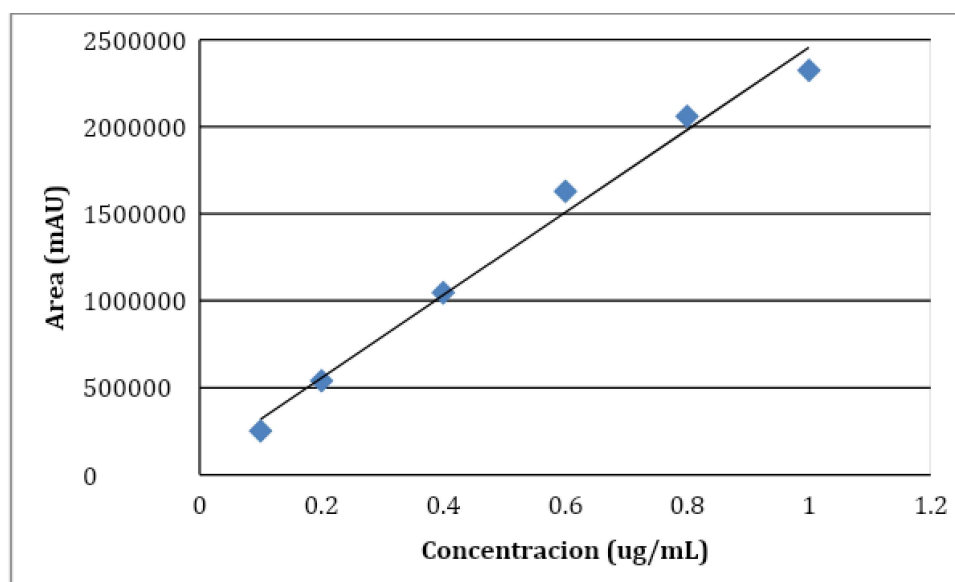


Figura 24. Curva de calibración Astaxantina (51)

La tabla No. 8 muestra los datos a partir de los cuales se determinó la curva de calibración, se muestra las respectivas áreas (mAU) por réplica de inyección, según concentración de estándar de astaxantina. Además, se muestra la desviación estándar de las réplicas, el promedio y el coeficiente de variación, destacando que, en ninguno de los casos, este último sobrepasa el 10%.

Concentración	0,1µg/mL	0,2µg/mL	0,4µg/mL	0,6µg/mL	0,8µg/mL	1,0µg/mL
Replica 1	248665	542218	1038900	1716963	2077800	2319981
Replica 2	271109	572321	1019778	1468292	2065463	2297048
Replica 3	237481	539871	1076739	1690014	2039556	2378420
Replica 4	259725	519450	1058428	1671972	2099874	2334444
Replica 5	228505	527791	1039993	1596271	2019812	2283975
DesvEst <sup>*1</sup>	252453,333	540330,2	1046767,6	1628702,4	2060501	2323471,75
Promedio	17289,189	20127,0976	21624,5381	100255,419	31497,6099	42418,189
CV(%) <sup>*2</sup>	6,84	3,72	2,06	6,15	1,52	1,82

Tabla 8. Datos curva de calibración de estándar de Astaxantina. Donde <sup>\*1</sup> Desviación estándar y <sup>\*2</sup> Coeficiente de variación (51)

## Precisión

### Repetibilidad

Para evaluar la precisión intradía se tomaron muestras preparadas por triplicado a tres niveles de concentración: bajo de 0,1 µg/mL, medio de 0,4 µg/mL y alto de 1,0µg/mL. Los RSDP fueron considerablemente inferiores al valor máximo permitido, que es del 15%, lo que brinda un nivel de precisión confiable sobre las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla No. 9.

<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,0</b>
<b>Promedio</b>	244290	1042514,67	2333657,33
<b>Desviación Estandar</b>	11836,2229	24018,6691	47956,5246
<b>C.V (%)</b>	4,84515245	2,30391666	2,05499428
<b>RSDp</b>	<b>3,06</b>		

Tabla 9. Evaluación de precisión del sistema. (51)

\*RSDp: coeficiente de variación promedio ponderado

La precisión intermedia no se logró evaluar, ya que no se contaba con otro analista para realizar el proceso de determinación de las muestras.

### Exactitud

Por medio de la comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, se evaluó todo el rango lineal, obteniendo un 97.7% de porcentaje de recuperación; por lo cual se estableció que la exactitud del método es correcta.

### Límite de Detección y Cuantificación

Estos parámetros se calcularon utilizando las curvas de calibración para sistema y método y unas segundas curvas de concentraciones bajas 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 µg/mL. Para determinar estos parámetros se procedió a comprobar la linealidad, precisión y exactitud a bajas concentraciones, obteniendo la ecuación=  $3 \times 10^6 + 1748$  con un  $R^2= 0,984$  y  $n=20$ . Estos resultados fueron utilizados para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación, sus valores fueron **0,884** y **1,919 ng/mL** respectivamente.

### Muestras de microalgas

La corrida cromatográfica para la determinación de astaxantina en alícuotas de muestras microalgas tiene un total de 39 minutos, debido a la complejidad de la muestra, pues presenta entre 8 y 17 componentes. La figura No. 25 muestra un acercamiento del cromatograma, incluyendo los 10 primeros minutos de corrida.

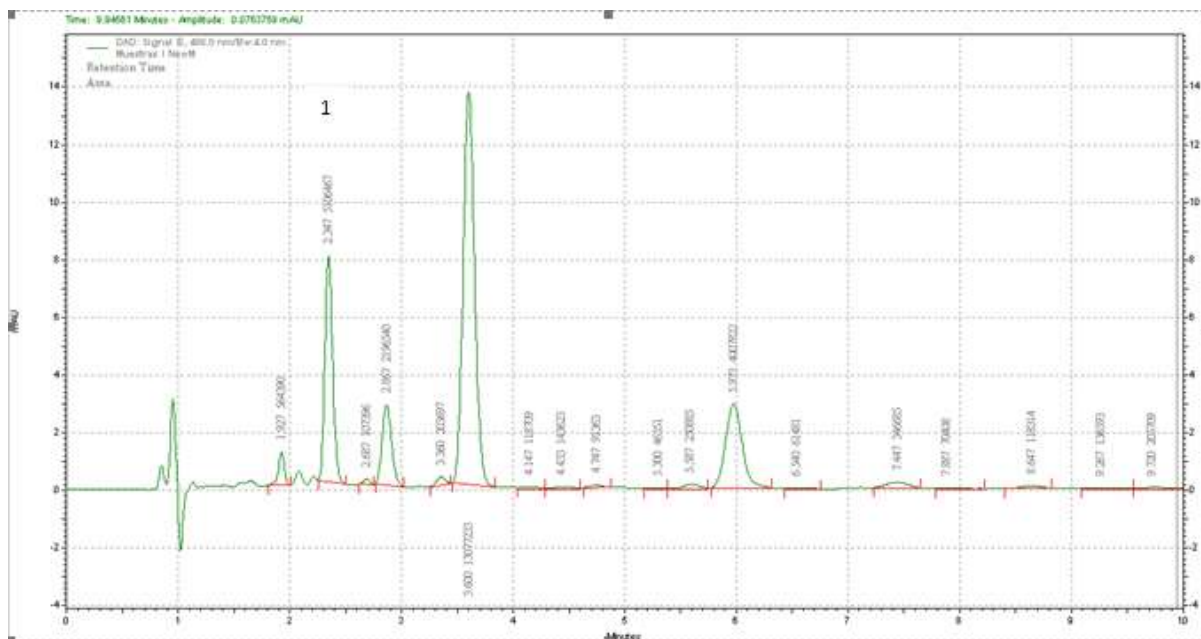


Figura 25. Cromatograma de HPLC del extracto de microalga *H. pluvialis* productora de astaxantina identificada como 1. (51)

A partir de la metodología desarrollada el tiempo de retención que presenta la Astaxantina es en promedio de 2,22min, este corto tiempo de salida, luego del frente de solvente se da debido posiblemente al largo de la columna empleada, ya que es más corta 100mm, que las utilizadas en estudios similares de 150mm.

Comparando los resultados con los obtenidos en los estudios de Yuan J, Chen F en 1999 (54), se podría indicar que luego del proceso de saponificación, en el cromatograma el pico numero 1 corresponde a trans-astaxantina y luego en orden de retención estarían luteína, 3,9- cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, cantaxantina, clorofila y finalmente esteres de astaxantina, los cuales podrían ser confirmados con los patrones respectivos.

En la figura 26 se presenta el corrido de la muestra correspondiente al medio BBM biostat con adición de acetato de sodio al 0,750 mg/L combinada con una irradiancia de 360 luxes, tomada en el día 35 del cultivo. Se presenta la presencia de astaxantina con una concentración de 0,21 ug/mL, la cual se correlaciona con los resultados obtenidos con el método espectrofotométrico APHA 1992 (50), de 0,214 ug/mL, indicando similitud y confianza con los resultados obtenidos. En el cromatograma se observan picos de interferencia del acetato de sodio.

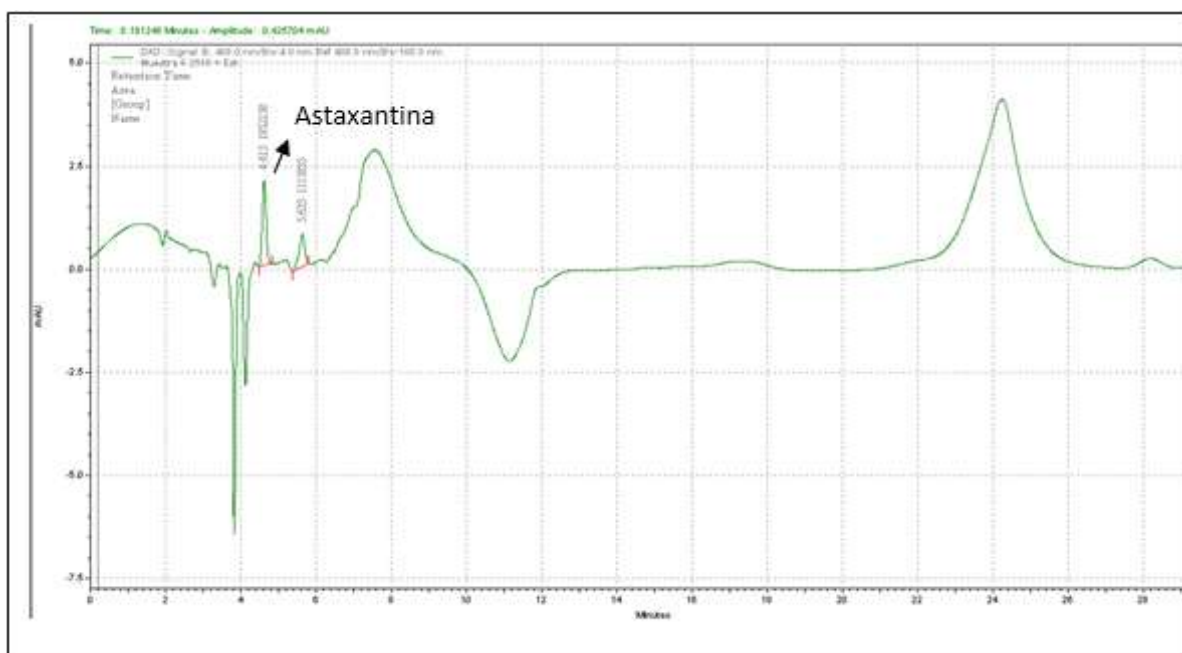


Figura 26. Cromatograma de muestra con acetato de sodio 0,750 mg/L combinada con irradiancia de 360 luxes día 35 de cultivo. (51)

A continuación, se presenta un resumen general de los resultados obtenidos para los tratamientos realizados, para los parámetros crecimiento celular, velocidad de crecimiento, concentración de astaxantina y de clorofila (Tabla 10).

Tratamiento	Resultados						
	crecimiento celular / (Cel./ml/ día)	velocidad de crecimiento	análisis estadístico	[ ] de astaxantina (µg/ día)	Análisis estadístico	[ ] de clorofila (µg / día)	Análisis estadístico
<b>RM</b>	2,58 x 10 <sup>5</sup> 35 días	0,028	ANOVA (95%) (F=3,55; P= 0,015; gl=5)	0,116 µg/mL 21 días	ANOVA (95%) (F= 1,38; P=0,26; gl=5)	1,174 µg/mL 7 días	ANOVA (95%) (F =1,39; P=0,25; gl=5)
<b>RM + 0,375 mg/L</b>	3,01 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,028		6,088 µg/mL 28 días		36,251 µg/mL 28 días	
<b>RM + 0,750 mg/L</b>	1,54 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,016		1,815 µg/mL 28 días		12,094 µg/mL 28 días	
<b>BBM</b>	8,31 x 10 <sup>5</sup> 35 días	0,027		0,584 µg/mL 21 días		0,944 µg/mL 35 días	
<b>BBM + 0,375 mg/L</b>	1,89 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,024		2,176 µg/mL 21 días		13,971 µg/mL 21 días	
<b>BBM + 0,750</b>	1,86 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,017		3,450 µg/mL 7 días		21,136 µg/mL 7 días	

mg/L							
------	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 10. Resumen de tratamientos realizados con sus respectivos resultados.  
Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Según los resultados obtenidos, el mejor tratamiento para pensar en un escalamiento del cultivo para producir astaxantina es en el que se utiliza medio RM con acetato de sodio en una concentración de 0,375 mg/L combinada con una irradiancia alta de 360 luxes con LED de color blanco utilizando cajas de cultivo celular colocadas horizontalmente aumentando la superficie de intercambio de gases y optimizando la exposición a la luz obteniendo un crecimiento de la microalga de  $3,01 \times 10^8$  células/día en 35 días de cultivo, una producción de clorofila de 36,251  $\mu\text{g/mL}$  en 28 días de cultivo y acumulación de astaxantina de 6,088  $\mu\text{g/mL}$ , en el mismo tiempo, con un incremento en su producción de un 70%, con respecto a los demás tratamientos utilizados, siendo estos los medios RM con 0,750 mg/ml y los medios BBM con adición de acetato de sodio a concentraciones de 0,375 mg/ml y 0,750 mg/ml.

## 7. Discusión

La microalga *Haematococcus pluvialis* se destaca por su capacidad para acumular pigmentos carotenoides de importancia comercial, entre ellos la astaxantina. Derivado de su gran demanda en el mercado se han llevado a cabo diferentes estudios, cuyos objetivos van encaminados a optimizar la producción de astaxantina a través de la microalga mencionada, de forma masiva. De esta manera, se han evaluado condiciones de cultivo, que van desde averiguar qué medio ofrece los mejores nutrientes, que se ajusten a los requerimientos de crecimiento de la microalga, así como aspectos relacionados a factores de estrés que favorezcan el desarrollo celular a su fase enquistada no móvil roja y posteriormente se dé una acumulación intracelular de astaxantina.

Cabe resaltar que las microalgas (no solo es el caso de *H. pluvialis*), se consideran muy apetecibles a nivel industrial, ya que se ha demostrado una gran cantidad de aplicaciones de mucho valor, por ejemplo, Vacca V, et al. (2017) (67), evaluaron en su estudio, la capacidad de la microalga *Chlorella sp.* para remover el color de efluentes del agua de una empresa textil. Un dato interesante, es que la microalga se cultivó en un biorreactor de 2,5 L, con fotoperiodos de luz/oscuridad de 12 horas, para posteriormente someter el agua a un tratamiento usando diferentes concentraciones de la microalga. Se dieron cuenta de que a pesar de que la presencia de colorantes en el agua inhibía el crecimiento normal de la microalga, esta pudo remover el mayor porcentaje de colorante del agua residual hasta un 97,2%. De manera similar, Vieira, H et al (2018) (68), demostraron que la microalga *Scenedesmus obliquus*, posee una buena capacidad para la biorremediación de aguas residuales de ganado, esto significa que los ganaderos tienen la oportunidad de llevar una producción sostenible del ganado, siendo cada vez más ecológica.

Cuando se trabaja con esta microalga, es importante conocer qué ocurre a nivel intracelular, cuando esta es sometida a diferentes factores de estrés, y así tomar decisiones acertadas a la hora de su cultivo y el posterior sometimiento a estrés, sin causar daño celular. En el año 2014, se publicó un artículo investigativo, desarrollado por Wang B et al (3), en donde se determinó que, cuando las células de *H. pluvialis* se cultivan en condiciones favorables, las células móviles pasaban a convertirse en palmelas, siendo estas capaces de hacer frente al estrés ambiental en diferentes grados. Las células son capaces de sobrevivir al fotodaño dependiendo de su capacidad para modificar su membrana y ajustar su nivel de desaturación de lípidos. Por lo tanto, la productividad de la biomasa y los bioproductos se ve comprometida debido a la susceptibilidad de las células móviles al estrés (3). En el estudio realizado fue imprescindible tener en cuenta hasta qué punto se priorizaría el crecimiento celular, y a partir de qué momento se intensificarían los factores de estrés, con la finalidad de contar con una gran cantidad de biomasa, que pudiese ser sintetizadora viable de astaxantina.

Los proyectos que se llevan a cabo con relación al tema, buscan principalmente contribuir a minimizar los costos de producción de astaxantina. Para esto se han ensayado una gran variedad de metodologías, que se basan inicialmente en lograr una cantidad óptima de biomasa celular, como es el caso de Gómez L, et al (2009) (70), en cuya investigación se empleó el uso de un campo magnético de 0.03T, para evaluar su efecto sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de las células de *H. pluvialis* en medio de cultivo Bristol, bajo un régimen de luz continua con lámparas fluorescentes. Obtuvieron que el efecto permanente del campo magnético favoreció el crecimiento celular, y permitió alcanzar niveles máximos de densidades celulares a los 17 días de cultivo; esto podría significar un adelanto de al menos un día o dos en la cosecha de la microalga a nivel industrial, lo que contribuiría a minimizar costos.

El presente proyecto es uno de los pocos que han desarrollado el cultivo de la microalga *H. pluvialis* a partir de la producción de la mencionada biomasa en un biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 Litros; sin embargo, existen otras investigaciones que ya han incursionado en el uso de otros tipos de biorreactores para el mismo fin, como el desarrollado por Ramírez, D (2013) (1), quien a partir de un fotobiorreactor tipo airlift de 1,8 Litros, al que fue modificando tiempos de mezclado, coeficientes de oxígeno, de dióxido de carbono, entre otras condiciones, encontró una velocidad de crecimiento celular óptima. El estudio se llevó a cabo empleando como metodología, estrés celular con irradiación y estrés por alta salinidad en el medio de cultivo. De esta manera, encontramos bases que demostraban, que la producción de biomasa de *H. pluvialis* puede llevarse a cabo de forma ideal en un biorreactor, ya que es más sencillo controlar ciertas condiciones y evitar contaminación cruzada de la materia prima, para posteriormente realizar la inoculación en cajas de cultivos, las cuales ofrecen un microambiente que favorece la acumulación de gas y que es útil a la hora de generar un factor de estrés adicional para la célula, sin mencionar que permite una mejor distribución de luz; (57) condición que se ve mejor favorecida por la forma tubular y el material transparente con el que se fabricó el BIOSTAT A PLUS de 5 Litros, utilizado en esta investigación

Choi Y, et al 2011 (69), comprobaron en su estudio que la luz es el factor más importante que afecta la biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*, cultivando esta microalga en un biorreactor. Se dieron cuenta que pequeñas células verdes predominan bajo menor intensidad de luz, mientras que las células grandes rojizas se extendieron bajo la alta intensidad de luz. En este sentido, los datos sugirieron que debería ser necesario considerar el ciclo de *H. pluvialis* cuidadosamente para futuras aplicaciones, además del hecho de que efectivamente, el uso de biorreactores para el cultivo de la microalga, no es el más adecuado en cuanto al suministro de luz, pues incluso el empleo de iluminaciones internas no es suficiente para la entrega de energía de la luz, porque la penetración de esta disminuye significativamente con el crecimiento celular.



Manrique y Marín en el 2019 (24), emplearon en su proyecto de investigación el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L, empleando condiciones como pH 6,8, temperatura 20°C + 2°C, fotoperiodo 18 h luz: 6 h oscuridad, y uso de un panel de luces LED multicolor (blanca, azul y roja) a 270 luxes, en medios RM y BBM. Como resultado, obtuvieron para el medio de cultivo BBM concentraciones de clorofila de 28,3 µg/mL y una concentración de astaxantina de 3,1 µg/mL. En el medio RM, se obtuvieron concentraciones de clorofila de 21,8 µg/mL y una concentración de astaxantina de 2,9 µg/mL. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

La biomasa producida en los dos medios RM y BBM, se utilizó para producir astaxantina en esta investigación, utilizando cajas de cultivo celular y factores estrés combinado como acetato de sodio y alta irradiancia de 360 luxes con luces LED blanca. Incrementando la irradiancia de 270 luxes (24), a 360 luxes, usando luces led blancas, con fotoperiodo de 20h luz 4h oscuridad, obteniendo resultados para el tratamiento RM con 0,375 mg/L de acetato de sodio de una concentración máxima de clorofila de 36,251 ug/ml y de astaxantina de 6,088 ug/ml, incrementándose en un 70% la acumulación de astaxantina frente a los demás tratamientos realizados, como el tratamiento en el que se usó el medio BBM con 0,375 mg/L de acetato de sodio, una concentración máxima de clorofila de 13,971 ug/ml y de astaxantina de 2,176 ug/ml. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), con respecto a la producción de astaxantina y clorofila.

A la hora de realizar el cultivo celular de *H. pluvialis* en biorreactores, es importante tener en cuenta que las células se adhieren con mucha facilidad a las paredes del biorreactor, y se ha comprobado que estas se enrojecen mucho más rápido en comparación a las que se encuentran en suspensión, tal como se señala en el trabajo de investigación de Wan M et al 2014 (64), en donde además se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento celular y la astaxantina, empleando temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C, obteniendo la concentración de astaxantina más alta a 15°C, este dato puede compararse con el empleado para este proyecto, que fue de 20 ±1° C, obteniendo resultados satisfactorios y comprobando de esta manera que la temperatura óptima para la acumulación de astaxantina por *H. pluvialis* se encuentra en el rango de 20°C a 28°C. (64)

Otros estudios realizados en biorreactores son los relacionados con la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, en fotobiorreactores tubulares, como lo desarrolló Zhang L et al 2017 (12). En dicho estudio, se prioriza la importancia del comportamiento fotosintético de *H. pluvialis*, durante la transformación celular y la posterior acumulación de astaxantina, esto a través del uso de fotobiorreactores tubulares en donde se cultivaría la microalga al aire libre. En este caso, el desequilibrio entre la absorción y la utilización de la luz por la microalga, serían el punto clave en la producción de astaxantina. Se obtuvo que, la astaxantina comenzó a acumularse a

partir de los 3 días de incubación, y se consideró significativa a los 5 días con una cantidad de 0,47 mg/ml, seguido de 12,89 mg/ml a los 9 días. (12) Si comparamos dichos resultados con los de este estudio, la astaxantina comenzó a acumularse a partir del día 7 de cultivo, en cantidad de 0,347 ug/ml, y alcanzó un nivel significativo hasta el día 21 de cultivo con una acumulación de 6,088 ug/ml. Todo esto sugiere que hay muchos factores a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un cultivo de *H. pluvialis* con la finalidad de producir astaxantina, no solo se trata de escoger el medio de cultivo y los factores de estrés ideales, sino también conocer y tener en cuenta el comportamiento de la microalga a nivel intracelular y su respuesta al ambiente externo.

Entre los resultados obtenidos en el estudio realizado, puede destacarse que el medio de cultivo con mejor tasa de crecimiento celular de *H. pluvialis* fue el medio RM. De manera similar al estudio realizado por Niño, et al (2017) (11), quienes cultivaron la microalga en 3 diferentes medios de cultivo (RM, BBM, OHM), bajo condiciones de pH 6,7, fotoperiodo de 18h luz – 6 oscuridad, 70 uE de irradiancia con lámparas de luz fluorescentes blanca, T° 25°C y agitación manual diaria, con el fin de determinar el qué de más producción de biomasa celular, y por lo tanto de astaxantina, permitiera lograr. Obtuvieron un recuento celular de  $7.55 \times 10^5$  células/mL, en comparación al logrado en este proyecto (para el mismo medio sin ninguna adición de acetato de sodio) de  $9,16 \times 10^4$  cel/mL, como resultado máximo alcanzado. Sin embargo, lograr un crecimiento celular favorable de la microalga, es solo el paso inicial, seguido, deben estudiarse los factores de estrés más viables para la producción de astaxantina (58).

La producción de astaxantina usando la biomasa de *H. pluvialis* obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, sometiénola a los factores de estrés acetato de sodio (0,375 mg/L y 0, 750 mg/L) y una irradiancia de 360 lux con luz blanca, en medios BBM y RM, pH 6,8, temperatura 20°C, agitación diaria, aire filtrado, cajas de cultivo celular. Estableciendo que el tratamiento que uso medio RM con 0.375 mg/L de acetato de sodio, según el Anova (95%) realizado estableció diferencias significativas entre tratamientos para el crecimiento celular ( $P < 0.05$ ), y según el test Tukey HSD este tratamiento tuvo significativamente mayor crecimiento celular ( $3.01 \times 10^8$  cel./mL).

Este proceso en dos etapas se realizó aprovechando que el proceso de producción de astaxantina por esta microalga se logra mediante un sistema de dos etapas: durante la primera etapa, se producen células vegetativas "verdes" utilizando el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros y luego se convierten, en la segunda etapa, en quistes que acumulan astaxantina, usando los factores de estrés acetato de sodio combinado con alta irradiancia de luz LED blanca. Similar proceso hizo Liu Yu et al (27) quienes diseñaron un sistema de dos etapas, en la primera etapa se cultivó en aguas residuales y se comparó con el medio basal de Bold (BBM) convencional, y creció mejor en aguas residuales diluidas (1,5%), lo que arrojó una producción de biomasa de  $906,3 \pm 34,0$  mg L<sup>-1</sup>. En la siguiente etapa que denominaron inducción,

las células vegetativas se expusieron a una alta intensidad de luz para la producción de astaxantina, y la producción resultante fue de  $39,72 \pm 1,69 \text{ mg L}^{-1}$ . Empleando el agua residual diluida, también se probó una estrategia de inducción mixotrófica usando una serie de concentraciones de acetato de sodio. Los hallazgos indicaron que la combinación óptima para la producción de astaxantina era acetato de sodio al 38,14 mM y NaCl al 0,58% (p / v), obteniendo una concentración de astaxantina de  $67,95 \pm 3,93 \text{ mg L}^{-1}$  después de un período de inducción de 12 días.

En esta investigación se trabajaron los cultivos con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, iluminación con lámparas fluorescentes blancas e intensidad lumínica de 65 luxes, durante 15 días para luego modificar esas condiciones a un fotoperiodo de 20 horas luz 4 oscuridad, con intensidad lumínica de 360 luxes, todo esto durante 35 días que duró el cultivo. Como resultado de lo anterior, se logró una mejoría notable en la producción de astaxantina intracelular, al momento de modificar las condiciones de irradiancia utilizando un fotoperiodo de 20 horas luz 4 oscuridad con la intensidad de 360 luxes y la ubicación horizontal de las cajas de cultivo celular para aumentar la superficie de intercambio de gases y optimizar la exposición a la luz (57) obteniendo una concentración de astaxantina de  $6,088 \text{ ug/mL}$

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en el trabajo desarrollado por Granda, G (2015) (8), en donde se emplearon igualmente lámparas de luz blanca fluorescentes, pero con un fotoperiodo de 12 horas luz 12 oscuridad, utilizando dos iluminancias (5000 lux y 8000 lux) durante 6 días únicamente, obteniendo de esta manera, un valor máximo en la concentración de astaxantina de  $0,237 \text{ mg.g}^{-1}$  con la intensidad de 8000 lux.

Adicionalmente, es importante resaltar que, la iluminación continua en los medios de cultivo, es un parámetro imprescindible a la hora de favorecer la acumulación de astaxantina, como lo señalan Gómez L et al 2020 (62) en su trabajo de investigación, donde trabajaron un ciclo de luz/oscuridad de 20h/4h (mismas condiciones con las que se llevó a cabo este proyecto a partir del día 15 de cultivo de la microalga *H.pluvialis*) a una irradiancia de 3,360 luxes (dato de discrepancia si se compara con los 360 luxes utilizados en el proyecto propio), obteniendo una síntesis favorable de astaxantina de  $3,52 \times 10^{-6} \text{ ug/cel. x mL}$ . Dicho resultado, puede compararse con el obtenido en el presente proyecto, si se tiene en cuenta que en ambos se empleó como factor de estrés la irradiancia y se trabajó con medio de cultivo RM.

En el proyecto de Gómez L et al 2020 (62), se emplearon como factores de estrés la alta irradiancia y la deficiencia de nitrógeno, mientras que en el presente proyecto se utilizó en forma combinada los factores de estrés de alta irradiancia y acetato de sodio, condiciones con las que se obtuvo una concentración de astaxantina de  $6,088 \text{ ug/mL}$ .

El otro factor de estrés estudiado en esta investigación son las concentraciones de acetato de sodio, que son consideradas como fuente de carbono en las

concentraciones indicadas; lo que favorece el crecimiento celular de la microalga, ya que este nutriente a altas concentraciones puede llegar a inhibir el crecimiento celular (1). En este estudio se obtuvieron resultados favorables empleando concentraciones de 0,375 mg/L de acetato de sodio, combinada con la alta irradiancia, lográndose un sinergismo que produjo una concentración de astaxantina de 6,088 ug/mL. El acetato de sodio, tiene la capacidad de inducir la producción de ARNm, como resultado del estrés al que se somete a la microalga, y por ende puede generar un flujo metabólico precursor de la biosíntesis de los carotenoides (59). En este estudio se pudo establecer que es más eficiente agregar el acetato de sodio de una forma mixotrófica alternativa (AM), que quiere decir adición de acetato de sodio al final de la fase logarítmica o exponencial en modo fotótrofo, obteniendo el máximo recuento posible de la microalga, minimizando el riesgo de contaminación y la posible muerte celular debido a la menor exposición a las fuentes de carbono orgánico (23).

El uso de acetato de sodio como factor de estrés para la producción de astaxantina, se ha estudiado por Rodríguez L (23), donde se empleó el medio de cultivo RM, se establecieron concentraciones de acetato de sodio de 0,18 g/L, 1,6 g/L y 0,320 g/L, en conjunto con el uso de cloruro de sodio, además de alta intensidad lumínica. Obteniendo una producción máxima de astaxantina 7,325 ug/mL en el medio con adición de 1,6 g/L de acetato de sodio desde el inicio del cultivo y 6,4 g/L de cloruro de sodio adicionado el 15 día del cultivo con una intensidad lumínica de 75 luxes y un fotoperiodo de 20h luz/4h oscuridad. Estos métodos seleccionados, son similares a los empleados en el presente proyecto, sin embargo, en este caso, se seleccionó una concentración de acetato de sodio mucho más baja de 0,375 mg/L, obteniendo, como ya se ha mencionado, un resultado de astaxantina máximo de 6,088 ug/mL.

Vidhyavati *et. al.* (2008) (65) realizaron un ensayo en el que utilizaron tres tratamientos diferentes: 0,99 g/l de NaCl, 0,36 g/l de acetato de sodio y una combinación de 0,99 g/l de NaCl con 0,36 g/l de acetato de sodio, todos estos tratamientos sometidos a irradiancia alta con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad donde se obtuvo la mayor producción de astaxantina en el tratamiento en el que se combinaron las dos sales con 25 mg/día en comparación con los demás tratamientos, se observó también que la adición de acetato de sodio y cloruro de sodio producen una transcripción temprana y expresión de los genes como BKT ( $\beta$ -caroteno cetolasa) que regula la transformación de zeaxantina a adonixantina y de adonixantina a astaxantina, desde tres días de estrés hasta tres meses después (67).

Otros estudios donde se combinó el uso de acetato de sodio y alta irradiancia fue el realizado por He B *et al* 2018 (17) quienes estudiaron los efectos sinérgicos del estrés lumínico con acetato de sodio junto al hierro, evidenciándose cuatro grupos de transcriptomas según el estrés en cuestión: irradiación lumínica alta (HL), adición de acetato de sodio 25 mM bajo luz alta (HA), adición de  $Fe^{2+}$  20  $\mu$ M bajo luz alta (HF) y células verdes normales en crecimiento (HG). Entre el total de genes expresados analizados, más de 10 mil genes se expresaron a causa de alta irradiancia y 1800-

1900 genes por acetato de sodio o Fe 2+. Los resultados del análisis en general mostraron que la adición de acetato de sodio bajo luz intensa promovió la expresión de genes clave relacionados con las vías para la biosíntesis de carotenoides y el alargamiento de ácidos grasos. Además, el acetato de sodio podría inhibir la expresión de genes relacionados con la vía de las proteínas de la antena de fotosíntesis, mostrando cómo la adición de ambos factores de estrés interrumpe la capacidad fotosintética y genera un cambio conformacional de la célula.

Además del acetato de sodio como factor de estrés, se ha estudiado también el uso de acetato de potasio, acetato de magnesio y bicarbonato de sodio, Pan-utai, W (2017) (66), empleo todos estos factores de estrés para definir cuál de estos tratamientos ofrecía mejores resultados en cuanto a la cantidad de astaxantina obtenida. Se utilizaron concentraciones de 100 mM de acetato de potasio y 10 mM de acetato de magnesio y bicarbonato de sodio. Como resultado, se obtuvo que, con el uso de acetato de sodio, se logró una concentración de astaxantina en el rango de 20 a 22 mg/g – 1, con acetato de potasio de 25 a 43 mg/g – 1, para el acetato de magnesio de 19 a 33 mg/g – 1, y finalmente para el bicarbonato de sodio un resultado en el rango de 25 a 35 mg/g – 1. Concluyeron así, que el tratamiento que ofreció una mayor cantidad de astaxantina, fue con el factor de estrés de acetato de potasio a 100 mM, seguido del bicarbonato de sodio, acetato de magnesio y finalmente, acetato de sodio.

García en el 2018 (13), realizó el estudio para la producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluvialis* en el biorreactor Tec-ferm de 5 L, usando dos diferentes concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L y 1,6 mg/L), las cuales fueron evaluadas en el medio RM con pH de 6.7, fotoperiodos 20h luz y 4h oscuridad, luz blanca, temperatura  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , aire filtrado y agitación a 100 rpm en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros. Obteniéndose con 0,299 mg/L de acetato de sodio un crecimiento celular máximo de  $2,0 \times 10^4 \text{ Cel./ mL}$  y una concentración máxima de astaxantina de 2,530  $\mu\text{g/mL}$  durante 34 días, mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular máximo de  $3,5 \times 10^4 \text{ Cel./mL}$  y una concentración de astaxantina de 1,9  $\mu\text{g/ml}$ , estableciéndose que el uso elevado de concentraciones de acetato de sodio produce daño celular por el estrés osmótico generado, lo cual afecta el crecimiento celular de la microalga y por lo tanto la acumulación de astaxantina, resultados que también se establecieron en el estudio realizado en esta investigación donde utilizando 350 mg/L de acetato de sodio producen un crecimiento celular significativo y acumulación de astaxantina con un

incremento en el 70% frente a los tratamientos similares donde se utiliza medio BBM.

Otros estudios donde también se usó acetato de sodio como factor de estrés para producir astaxantina fueron los realizados por Reis DF, et al 2018 (14) donde se utiliza CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono en el medio de cultivo BBM y el uso de acetato de sodio en concentración de 1.986 g/L, fundamentándose en la limitación del nitrógeno en presencia de fuentes de carbono en exceso y cómo estas influyen en la producción de carotenoides, como resultado final el total de carotenoide recuperado fue de 2949,91±1 µg.g<sup>-1</sup>. Por otro lado Zhang C et al 2018 (15) menciona los efectos del acetato de sodio exógeno sobre la acumulación de astaxantina y la foto protección en *H. pluvialis* en la etapa no móvil, donde se evidencia como con 10 mM de acetato de sodio aumenta la cantidad de astaxantina, con una concentración máxima de 4,8 mg/L aproximadamente, en las células al ser comparadas con las microalga sin ser tratada, mostrando una aceleración en la acumulación de astaxantina en la etapa no móvil, además menciona que la clorofila y la actividad fotosintética se es suprimida con la adición del acetato de sodio, efectos que posiblemente se presentaron en este estudio realizado y que explican la acumulación de astaxantina en cantidades entre 1,815 µg/mL y 6,088 µg/mL.

Enrico D et al 2018 (16) investigaron la influencia del estrés en condiciones ambientales tróficas en la producción de astaxantina, otras xantofilas y lípidos de una cepa argentina de *H. pluvialis*. Los cultivos se realizaron en condiciones autotróficas o mixotróficas (con adición de 1 g/L de acetato de sodio en el medio de cultivo BBM) y se sometieron a dos intensidades de luz diferentes (90 MLS/Moderado estrés con luz y 350 SLS/ Alto estrés con luz).

Rodríguez (2019) (23) buscaba obtener una mayor producción de astaxantina en *H. pluvialis*, usando medio RM bajo condiciones lumínicas con fotoperiodos en lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, de 70 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos. El resultado con mayor rendimiento fue con la adición de 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio, presentó la mayor producción astaxantina en un 20% superando los demás tratamientos con 7,3 µg/ml. Aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

La capacidad de las células vivas para sobrevivir en condiciones ambientales extremas puede depender de su capacidad para modificar su composición de membrana y ajustar su nivel de desaturación de lípidos y otros sistemas. Incluso el medio de cultivo en sí mismo, puede afectar la distribución de los lípidos, como lo sustentan: Tokarz D, *et al* (4), publicado en el año 2014.

Liu Yu *et al* (27) diseñó un sistema de dos etapas para los procesos de cultivo e inducción de *H. pluvialis*. La primera se cultivó en aguas residuales de minkery y se comparó con el medio basal de Bold convencional, y creció mejor en aguas residuales de minkery diluidas (1,5%), lo que arrojó una producción de biomasa de  $906,3 \pm 34,0$  mg L<sup>-1</sup>.

En la siguiente etapa que denominó inducción, las células vegetativas se expusieron a una alta intensidad de luz para la producción de astaxantina, y la producción resultante fue de  $39,72 \pm 1,69$  mg L<sup>-1</sup>. Empleando el agua residual diluida, también se probó una estrategia de inducción mixotrófica usando una serie de concentraciones de acetato de sodio. Los hallazgos indicaron que la combinación óptima para la producción de astaxantina era acetato de sodio al 38,14 mM y NaCl al 0,58% (p / v), obteniendo una concentración óptima de astaxantina fue de  $67,95 \pm 3,93$  mg L<sup>-1</sup> después de un período de inducción de 12 días.

Para optimizar la producción de biomasa celular, uno de los parámetros fundamentales a tener en cuenta es la agitación constante de los medios de cultivo con la consecuente homogeneización de los mismos, lo que permite que los nutrientes se dispersen y se asimilen correctamente, en conjunto con la distribución de luz (8). En cuanto a la producción de astaxantina, también se ha podido demostrar que la luz alta es el factor directo de los cambios en la expresión génica durante el período de inducción en *H. Pluvialis* (20), de hecho, se demostró que la intensidad de luz óptima para el crecimiento de *H. pluvialis* es de aproximadamente  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2). El acetato de sodio podría mejorar aún más la expresión de los genes implicados en la síntesis de carotenoides y ácidos grasos. Se ha podido demostrar que cuando la microalga *H. pluvialis* es sometida a factor de estrés por salinidad a una concentración de 2,5 g/L, se genera muerte celular sin una acumulación previa de astaxantina significativa (1).

En esta investigación se logró establecer que al usar la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, y someterla a factores de estrés como el acetato de sodio combinada con alta irradiancia, se obtuvo astaxantina entre 21 y 28 días del cultivo.

Los carotenoides y la clorofila fueron analizados mediante HPLC, el contenido de carotenoides fue aproximadamente de 2,30 mg y la clorofila ocupaba el 17.8% de la célula, también se analizaron y cuantificaron lípidos, carbohidratos y proteínas de

membrana totales. Se demostró que, a nivel morfológico, las células de la palmela eran esféricas con paredes celulares rígidas y algo rojizas en el centro, lo que indica la presencia de astaxantina ( $0.66 \pm 0.06$  mg / g de peso muerto). (3)

En esta investigación se observaron desde las células vegetativas verdes en los días iniciales del cultivo 7 y 14 días en todos los tratamientos realizados, observándose en los días 21, 28 la presencia de células enquistadas palmela de color rojo (Figura 12), correlacionadas con la cantidad de astaxantina presente en los tratamientos que contienen 0,375 mg/L de acetato de sodio combinado con alta irradiancia de luz de 360 luxes con led blancas. Al aumentar el contenido de acetato de sodio de 0,750 mg/L de acetato de sodio y más tiempo de exposición se observa que las células empiezan a volverse claras o albinas y puede haber un cambio conformacional de la célula.

Con respecto a la extracción de la astaxantina y clorofila, cuyo proceso se basó en el protocolo APHA 1952 (50), se puede concluir que, al compararlo con el método HPLC, se obtuvieron valores similares, observándose en el cromatograma las interferencias del acetato de sodio y luego del proceso de saponificación, en el cromatograma el pico numero 1 corresponde a trans-astaxantina y luego en orden de retención estarían luteína, 3,9- cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, cantaxantina, clorofila y finalmente esterres de astaxantina, los cuales podrían ser confirmados con los patrones respectivos.

El proceso realizado en este trabajo respecto a la saponificación y la técnica aplicada permitió cuantificar la astaxantina en diferentes muestras, así como se validó la técnica para utilizar el equipo de HPLC que se encuentra en la Universidad.

Actualmente, se evidencian nuevos procesos de extracción del carotenoide astaxantina, que pueden llegar a lograr este fin de una forma más sencilla y viable para su aprovechamiento a gran escala, como lo son enzimas líticas, superfluidos (7), ultrasonido (60), y el método más reciente desarrollado por investigadores de una empresa holandesa, que es la dispersión en fase sólida matricial (61), cuya propuesta es la implementación de técnicas sustentables y disolventes no tóxicos para obtener un extracto más completo y rico en compuestos bioactivos.

Seguido de la extracción de la astaxantina, se procede a su cuantificación, que en este caso, se llevó a cabo por el método HPLC en el sistema Agilent® Technologies 1260 Infinity, tal como lo desarrollan Galarza J et al 2019 (22), en donde se puede destacar la longitud de onda seleccionada de 440 nm, mientras que para el presente proyecto se empleó una longitud de onda entre 480 y 488 nm. De cualquier forma, se resalta el alto rendimiento de este sistema HPLC analítico.



## 8. Conclusiones

- El tratamiento que presentó mayor crecimiento celular de *Haematococcus pluvialis* fue el denominado RM BIOSTAT, donde se utilizó 0,375 mg/L de acetato de sodio, presentando un crecimiento celular de  $3.01 \times 10^8$  cel./mL correspondiente al día de cultivo 35. El ANOVA (95%) realizado estableció que con respecto al crecimiento celular si se presentan diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 3,54$  ; $P=0,015$ ;  $gl= 5$ ), y al realizar el test de Tukey HSD (95%) (anexo 6) se pudo establecer que, efectivamente, el tratamiento RM BIOSTAT fue el mejor para crecimiento celular. La velocidad de crecimiento fue de 0,028 células/hora, con un coeficiente de determinación del 96,79%.
- La caracterización macroscópica del cultivo de los diferentes tratamientos, permitió observar el cambio de color inicial de verde a un color naranja rojizo en los días finales del cultivo, observándose microscópicamente formas vegetativas de color verde en los días iniciales del cultivo y finalmente formas enquistadas y aplanospora de color rojo. Se puede concluir que el tratamiento en el que se obtuvieron más formas enquistadas y aplanospora fue en el medio RM BIOSTAT con adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio y una irradiancia de 360 luxes de luces LED blancas.
- El tratamiento con mayor producción de astaxantina y clorofila fue el RM BIOSTAT, el cual contenía acetato de sodio al 0,375 mg/L combinada con irradiancia de 360 luxes de luces LED blancas, pH 6,8, T 20°C, agitación diaria 10 segundos, aire filtrado, cajas de cultivo celular, llegando a una concentración máxima de astaxantina de 6,088 ug/mL a los 28 días del cultivo. La concentración de clorofila en el mismo tiempo fue de 36,251 ug/mL, el segundo tratamiento con mayor producción de astaxantina (2,176 mg/mL) y clorofila (13,971 mg/mL) fue el medio BBM BIOSTAT, el cual contenía acetato de sodio al 0,375 mg/L, utilizando también las demás condiciones previamente mencionadas, a los 21 días del cultivo. El ANOVA (95%) realizado estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la obtención de astaxantina ( $F=1,38$ ; $P=0,259$ ; $gl=5$ ), ni para la producción de clorofila ( $F=1,40$ ; $P=0,254$ ;  $gl=5$ ).
- La biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, utilizando los medios RM y BBM, puede ser utilizada para producir astaxantina al ser sometida a factores de estrés como acetato de sodio y alta intensidad de luz. obteniendo concentraciones de hasta 6.088 ug/mL.
- La técnica de HPLC se estandarizó y validó utilizando el equipo de la Universidad para determinar la presencia de astaxantina en *H. pluvialis* bajo los factores de estrés ensayados en esta investigación.

## 9. Recomendaciones

Futuras investigación donde se incluyan:

- Otros factores de estrés como la deficiencia de nitrógeno en conjunto con los utilizados en este proyecto, para incrementar la producción de astaxantina.
- Aplicar diferentes intensidades de luz, con la intención de comparar y establecer la irradiancia más óptima para producir astaxantina.
- Realizar determinación de la expresión de genes durante el cultivo, para ver cómo influyen los factores de estrés utilizados en su expresión y en la producción de astaxantina.
- Seguir utilizando en un primer paso la biomasa de la microalga *H. pluvialis* producida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros para en un segundo paso someterla a factores de estrés para producir astaxantina.
- Buscar otras alternativas de disolventes para la extracción de astaxantina, que no sean tan tóxicos como el metanol, empleado en este estudio.

## 10. Presentación en eventos

**10.1. Ponencia meritoria, Mejor proyecto terminado Biológicas y del Mar :** Producción de astaxantina utilizando la biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 L usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz . Estudiantes: Laura Torres y Jeimy Lizeth Ubaque Ramírez. XVIII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación realizado en la Universidad Nacional Abierta y a Distancia del 24 al 28 de agosto de 2020

Nota: 100



**10.2. XXIII Encuentro nacional de semilleros de investigación- fundación REDCOLSI (24 al 27 de noviembre del 2020, modalidad virtual).**

### 10.2.1 Productos:

Video de presentación

[https://www.youtube.com/watch?v=fxJNdDTH-vk&feature=youtu.be&ab\\_channel=LauraTorresCadavid](https://www.youtube.com/watch?v=fxJNdDTH-vk&feature=youtu.be&ab_channel=LauraTorresCadavid)



## Programación

FACULTAD	PROGRAMA	PROYECTO	SEMILLERO	PONENTE 1	PONENTE 2	FECHA	JORNADA
CIENCIAS DE LA SALUD	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Producción de astaxantina utilizando la biomasa de la microalga Haematococcus pluvialis obtenida en el biorreactor biostat a plus de 5 L usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz	BIOPROCESOS Y CONTROL	Jeimy Lizeth Ubaque Ramírez	Laura Torres Cadavid	25 de noviembre de 2020	TARDE
CIENCIAS DE LA SALUD	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de Haematococcus pluvialis y la producción del pigmento astaxantina.	BIOPROCESOS Y CONTROL	Erica Johana Quintero Gómez		25 de noviembre de 2020	TARDE
CIENCIAS DE LA SALUD	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Producción de astaxantina empleando Haematococcus pluvialis bajo los factores de estrés deficiencia de nitratos y fosfatos utilizando el biorreactor BIOSTAT A plus de 5 litros.	BIOPROCESOS Y CONTROL	Barreto Forero Paula Andrea	Ortiz Basante Tatiana	25 de noviembre de 2020	TARDE
CIENCIAS DE LA SALUD	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Análisis molecular de los genes que codifican para la enzima cisteína sintasa en cepas de Pseudomonas aeruginosa con diferente perfil de sensibilidad a antibióticos mediante PCR y secuenciamiento de ADN	BIOTECNOLOGÍA Y GENÉTICA	Miry Geraldine Cardoso Cardeñas	Angie Paola Boada Ballesteros	25 de noviembre de 2020	MAÑANA
CIENCIAS DE LA SALUD	Bacteriología y Laboratorio Clínico	Uso del fago p22 como alternativa terapéutica en veterinaria para salmonella en Colombia	BIOTECNOLOGÍA Y GENÉTICA	Nathaly Riveros Lopez	Andrea Priscila Alvarado Zuñiga	27 de noviembre de 2020	TARDE

## Póster

[https://www.canva.com/design/DAEEVmtTlfg/FnBDuKJsr05uzqZUUES\\_aw/view?utm\\_content=DAEEVmtTlfg&utm\\_campaign=designshare&utm\\_medium=link&utm\\_source=publishsharelink](https://www.canva.com/design/DAEEVmtTlfg/FnBDuKJsr05uzqZUUES_aw/view?utm_content=DAEEVmtTlfg&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=publishsharelink)



## 11. Referencias

- (1) Ramírez Landínez DM. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. 2013 Jan 1.
- (2) Sipaúba-Tavares LH, Millan RN, Berchielli-Morais FA. Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. Brazilian journal of biology 2013 Aug;73(3):585-591.
- (3) Wang B, Zhang Z, Hu Q, Sommerfeld M, Lu Y, Han D. Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing Lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. PLoS one 2014;9(9):e106679.
- (4) Tokarz D, Cisek R, El-Ansari O, Espie GS, Fekl U, Barzda V. Organization of astaxanthin within oil bodies of *Haematococcus pluvialis* studied with polarization-dependent harmonic generation microscopy. PLoS ONE 2014 September;9(9).
- (5) 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 Aug 15;12(8):4504-4520.
- (6) Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. TheScientificWorld 2014 Jan 19;2014:694305.
- (7) Córdoba-Castro, NM., Acero-Reyes, N.L., Duque-Buitrago, L.F., Jiménez-Aguilar, L.J., Serna-Jiménez, J.A. (2015) Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus Pluvialis*. UGCiencia 21, 73-82.
- (8) Granda Jara Gabriela Patricia. PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*; 2015.
- (9) Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, Caballero-Casero N, Caballo C, Sicilia D, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. Marine Drugs 2015 May;13(5):2857-2874
- (10) Sathasivam R, Radhakrishnan R, Hashem A, Abd Allah EF. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine [Internet]. Vol. 26, Saudi Journal of Biological Sciences. Elsevier B.V.; 2019 [cited 2020 May 5]. p. 709–22.
- (11). Niño Castillo CM, Rodríguez Rivera FC, Díaz LE, Lancheros Díaz AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Nova [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 11];15(28):19.
- (12) Zhang L, Su F, Zhang C, Gong F, Liu J. Changes of Photosynthetic Behaviors and Photoprotection during Cell Transformation and Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* Grown Outdoors in Tubular Photobioreactors. International

journal of molecular sciences 2016 Dec 26,;18(1):33.

- (13) García Martín Laura. Producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluvialis*". 2018. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 86p
- (14) Reis DF, Machado Junior, Francisco Roberto da Silva, Ores JDC, Lemes AC, Burkert CAV, Burkert, Janaina Fernandes de Medeiros. Influência do CO<sub>2</sub> no Crescimento de *Haematococcus Pluvialis* e na Produção de Carotenoides. Uniciências 2019 Jan 24,;22(3Esp):25.
- (15). Zhang C, Zhang L, Liu J. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage. J Appl Phycol [Internet]. 2019 Apr 15 [cited 2020 May 5];31(2):1001–8.
- (16). Doria, E. Inuence of Light Stress on the Accumulation of Xantho-phylls and Lipids in *Haematococcus Plu-vialis* CCALA 1081 Grown under Auto-trophic or Mixotrophic Conditions. (2018) J Marine Biol Aquacult 4(1): 30- 35.
- (17) He B, Hou L, Dong M, Shi J, Huang X, Ding Y, et al. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe 2. International journal of molecular sciences 2018 Jan 7,;19(1):175.
- (18) Luo Q, Bian C, Tao M, Huang Y, Zheng Y, Lv Y, et al. Genome and Transcriptome Sequencing of the Astaxanthin-Producing Green Microalga, *Haematococcus pluvialis*. Genome biology and evolution 2019;11(1):166-173.
- (19) Huang L, Gao B, Wu M, Wang F, Zhang C. Comparative transcriptome analysis of a long-time span two-step culture process reveals a potential mechanism for astaxanthin and biomass hyper-accumulation in *Haematococcus pluvialis* JNU35. Biotechnology for biofuels 2019;12(1):18.
- (20) Li F, Cai M, Lin M, Huang X, Wang J, Ke H, et al. Differences between Motile and Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis* in the Production of Astaxanthin at Different Light Intensities. Marine Drugs 2019 January;17(1):39.
- (21) Miranda AM, Ossa EA, Vargas GJ, Sáez AA. Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. Información tecnológica 2019 Feb;30(1):23-32.
- (22) Galarza JI, Arredondo Vega BO, Villón J, Henríquez V. Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress. Biotechnol Reports [Internet]. 2019 Sep;23.
- (23) RODRIGUEZ ROMERO LAURA JOHANNA. PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* BAJO EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO DE SODIO. 2019. Trabajo de grado. Uicolmayor. 103 p.



- (24) MANRIQUE PINZÓN Mónica Alejandra y MARÍN CORREDOR DAVID LEONARDO . PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* BAJO EL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO Y ALTA IRRADIANCIA EN EL BIORREACTOR BIOSTAT ® A PLUS. 2019. Trabajo de grado. Uicolmayor 89 p.
- (25) Li F, Cai M, Lin M, Huang X, Wang J, Zheng X, et al. Accumulation of Astaxanthin Was Improved by the Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis*. *BioMed research international* 2019;2019:1-7
- (26) Ding W, Cui J, Zhao Y, Han B, Li T, Zhao P, et al. Enhancing *Haematococcus pluvialis* biomass and  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation. *Bioresource technology* [Internet]. 2019 August [cited 2020 Apr 11];285.
- (27) Liu Yu, Yildiz I. Biorremediación de aguas residuales de minería y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Global Warming* [Internet]. 2019 August [cited 2020 Apr 15]; 19.
- (28) Camacho J, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova* [Internet]. 2013 Jun [cited 2020 Apr 11];15;11(19):93.
- (29) Abalde J, Orosa M, Torres E, Cid A. LA MICROALGA *Haematococcus* COMO FUENTE DE ASTAXANTINA [Internet]. 1999 [cited 2020 Apr 14].
- (30) Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers* [Internet]. 2016 Apr [cited 2020 Apr 14].
- (31) Solari S, Vílchez J, Vivar J, Hermosilla N. Astaxantina : antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética Astaxanthin : natural antioxidants with various applications in cosmetics. *Biofarbo* [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 14];19(2):6–12.
- (32) Roldán P, Mach N. Effect of consumption of astaxanthin in health. *Rev Esp Nutr Comunitaria* [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 15];18(3):164–77.
- (33).Reinoso H, Tordable M, Grosso M. DESDE LA CÉLULA A LA FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS SUPERIORES [Internet]. [cited 2020 Apr 15].
- (34). Rojas Loria Cesar. *Microbiología General* [Internet]. [cited 2021 Feb 13].
- (35) Chojnacka K, Marquez F. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy



and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnol* [Internet]. 2004 [cited 2019 March 22];3(1):21-34.

(36) Hoys C. Análisis de metabolitos de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo durante la acumulación de astaxantina [Internet]. 2019 [cited 2020 May 7].

(37) Gómez B. Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo [Internet]. 2018 [cited 2020 May 8].

(38) Meléndez A, Vicario I, Heredia F. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos [Internet]. 2004 June [cited 2020 May 10]; 54.

(39) Barbosa C. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE LÍPIDOS Y CAROTENOIDES TOTALES EN UN EXTRACTO HEXÁNICO DE *Haematococcus pluvialis* EN DISTINTOS PERIODOS DE ESTRÉS [Internet]. 2019 Dec. [cited 2020 Apr 15].

(40) Pc IN, Biostat T, Pc N, Pc P. BIOSTAT ® Aplus. [cited 2020 Apr 15]; Available from: [http://www.sartogsm.ru/pdf/Data\\_BIOSTATAplus\\_SBI2014-e.pdf](http://www.sartogsm.ru/pdf/Data_BIOSTATAplus_SBI2014-e.pdf)

(41) Pérez R. Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria, en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico [Internet]. 2009 April [cited 2020 Apr 15]. Tesis.

(42) Blanco L, Tacon A. LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO Y SU IMPORTANCIA EN ACUACULTURA [Internet].

(43) Microscopio Epi-Fluorescencia. [Internet]. [cited 2020 May 8].

(44) Gómez L, et al. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *MUTIS* [Internet]. 2019 October [cited 2020 Sep18]; 9.

(45) Técnicas Cromatográficas [Internet]. 2007 December [cited 2020 May 8].

(46) Trinidad A. MODELOS DE CRECIMIENTO EN BIOLOGÍA, SU SIGNIFICADO BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DEL MODELO POR SU AJUSTE [Internet]. 2014 June [cited 2020 Apr 15].Tesis.

(47) Trejos V, Alzate J, Garcia M. Descripción matemática y análisis de estabilidad de

procesos fermentativos. DYNA [Internet]. 2009 [cited 2020 Apr 15];76(158):111–21.

(48) Pérez A, Larrosa J, Fernández Escámez P. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. Anu Jóvenes Investig [Internet]. 2016 July [cited 2020 Apr 15];9(9):160–3.

(49) Sampieri R. Metodología de la investigación [Internet]. sexta. 2014 [cited 2020 May 8].

(50). Chiruchi J, Zoboli J, Usher S, Serrentino C. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA AGUAS Y EFLUENTES [Internet]. 1996. [cited 2020 Sep 18].

(51) Malagón K. Estandarización de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 5].

(52) Yuan J, Chen F. Hydrolysis Kinetics of Astaxanthin Esters and Stability of Astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during Saponification. J. Agric. Food Chem [Internet]. 1998 December [cited 2020 sep 18]; 47, 31-35.

(53) Yuan J, Chen F. .Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. J. Agric. Food Chem [Internet]. 1998 July [cited 2020 sep 18]; 46, 3371-3375. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf980039b>

(54) Yuan J, Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Food Chemistry [Internet]. 2000 March [cited 2020 sep 18]; 68., 443 – 448.

(55) Lu M., Zhang Y., Zhao C. Zhou P, Yu L. Analysis and Identification of Astaxanthin and its Carotenoid Precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by High-Performance Liquid Chromatography. Z. Naturforsch [Internet]. 2010 January. [cited 2020 August 20];65 c, 489 – 494.

(56) The International Conference on Harmonisation of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology [Internet]. 2005 November [cited 2020 September 18].

(57) 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 [Internet]. 2012 Jun 29 [cited 2020 Nov 23];24(3):365–73.

- (58) Imamoglu E. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. Int J Nat Eng Sci [Internet]. 2007 [cited 2020 Nov 24];1(3):5–9.
- (59) Jin E, Lee CG, Polle JEW. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology [Internet]. Vol. 16, Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006 [cited 2020 Nov 24]. p. 821–31.
- (60) Extracción ultrasónica de astaxantina para mayores rendimientos - Hielscher Ultrasound Technology [Internet]. [cited 2020 Nov 24].
- (61) Castillo A, Pereira S, Otero A, Fiol S, Garcia-Jares C, Lores M. Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from: *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF. RSC Adv [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2020 Nov 24];10(47):27995–8006.
- (62) Luisa G, et al. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia [Internet]. 2021 Feb 13 [cited 2021 Feb 13].
- (63) Rodríguez L. PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis* BAJO EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO DE SODIO. [cited 2021 Feb 23].
- (64) WAN, Minxi, et al. The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresource technology*, 2014;163: 26-32.
- (65) Vidhyavathi, Raman, et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2008; 59(6): 1409-1418.
- (66) Pan-utai W, et al. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. [Internet]. 2017. [cited 2021 Mar 10]
- (67) Vacca, V, et al. Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. [Internet]. 2017. [cited 2021 Mar 10]
- (68) Vieira, H, et al. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison between batch and continuous operation. [Internet]. 2018. [cited 2021 Mar

10]

(69) Choi Y, Sang Y, Jong P. 2011. Multistage operation of airlift photobioreactor for increased production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2011. [cited 2021 Mar 10]

(70) Gómez L, Menéndez J, Álvarez I, Flores I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. [Internet]. 2009. [cited 2021 Mar 10]

## 12. Anexos

CRECIMIENTO CELULAR/ML VS TIEMPO									
TIEMPO (Días)	RM1	RM2	RM3	RM BIOSTAT 1	RM BIOSTAT 2	RM BIOSTAT 3	RM ACETATO1	RM ACETATO2	RM ACETATO3
0	1,E+04	1,E+04	1,E+04	-	-	-	1,E+04	1,E+04	1,E+04
7	3,75,E+04	2,19,E+04	1,87,E+04	1,34,E+07	1,28,E+07	1,38,E+07	5,00,E+07	2,53,E+07	5,16,E+07
14	4,69,E+04	8,21,E+04	4,37,E+04	8,13,E+07	4,15,E+07	4,69,E+07	5,81,E+07	6,22,E+07	5,69,E+07
21	6,87,E+04	8,44,E+04	1,22,E+05	8,69,E+07	4,87,E+07	8,38,E+07	7,25,E+07	6,25,E+07	6,44,E+07
28	1,03,E+05	9,37,E+04	1,44,E+05	1,91,E+08	2,89,E+08	1,48,E+08	1,16,E+08	7,25,E+07	1,18,E+08
35	1,96,E+05	2,90,E+05	2,87,E+05	2,32,E+08	4,68,E+08	2,03,E+08	1,18,E+08	1,68,E+08	1,78,E+08

CRECIMIENTO CELULAR/ML VS TIEMPO									
TIEMPO (Días)	BBM 1	BBM 2	BBM 3	BBM BIOSTAT 1	BBM BIOSTAT 2	BBM BIOSTAT 3	BBM ACETATO1	BBM ACETATO2	BBM ACETATO3
0	1,E+04	1,E+04	1,E+04	-	-	-	1,E+04	1,E+04	1,E+04
7	5,62,E+04	5,94,E+04	2,81,E+04	7,50,E+06	7,18,E+06	3,75,E+06	2,63,E+07	4,03,E+07	1,09,E+07
14	8,12,E+04	1,06,E+05	6,25,E+04	8,66,E+07	4,28,E+07	6,38,E+07	2,81,E+07	6,63,E+07	4,66,E+07
21	1,40,E+05	1,28,E+05	7,10,E+04	8,72,E+07	2,45,E+08	6,40,E+07	3,31,E+07	7,59,E+07	5,78,E+07
28	1,78,E+05	1,81,E+05	2,16,E+05	1,06,E+08	3,03,E+08	8,78,E+07	4,53,E+07	7,66,E+07	1,06,E+08
35	1,13,E+06	6,47,E+05	7,16,E+05	2,70,E+08	1,26,E+08	1,72,E+08	1,82,E+08	1,73,E+08	2,03,E+08

Anexo 1. Conteo celular de medios de cultivo por triplicado. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

CRECIMIENTO CELULAR/ML VS TIEMPO (PROMEDIO)						
TIEMPO (Días)	RM	RM BIOSTAT	RM ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT	BBM ACETATO
0	1,E+04	-	1,E+04	1,E+04	-	1,E+04
7	2,603,E+04	1,333,E+07	4,229,E+07	4,790,E+04	6,143,E+06	2,583,E+07
14	5,76,E+04	5,65,E+07	5,91,E+07	8,33,E+04	6,44,E+07	4,70,E+07
21	9,163,E+04	7,311,E+07	6,646,E+07	1,130,E+05	1,322,E+08	5,562,E+07
28	1,135,E+05	2,093,E+08	1,02,E+08	1,916,E+05	1,66,E+08	7,59,E+07
35	2,58,E+05	3,01,E+08	1,54,E+08	8,31,E+05	1,89,E+08	1,86,E+08

Anexo 2. Promedio de conteo celular de medios de cultivo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,69626E+16	5	1,53925E+16	3,549	0,015	2,620654148
Dentro de los grupos	1,04078E+17	24	4,33659E+15			
Total	1,81041E+17	29				

Anexo 3. Análisis de varianza del conteo celular. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

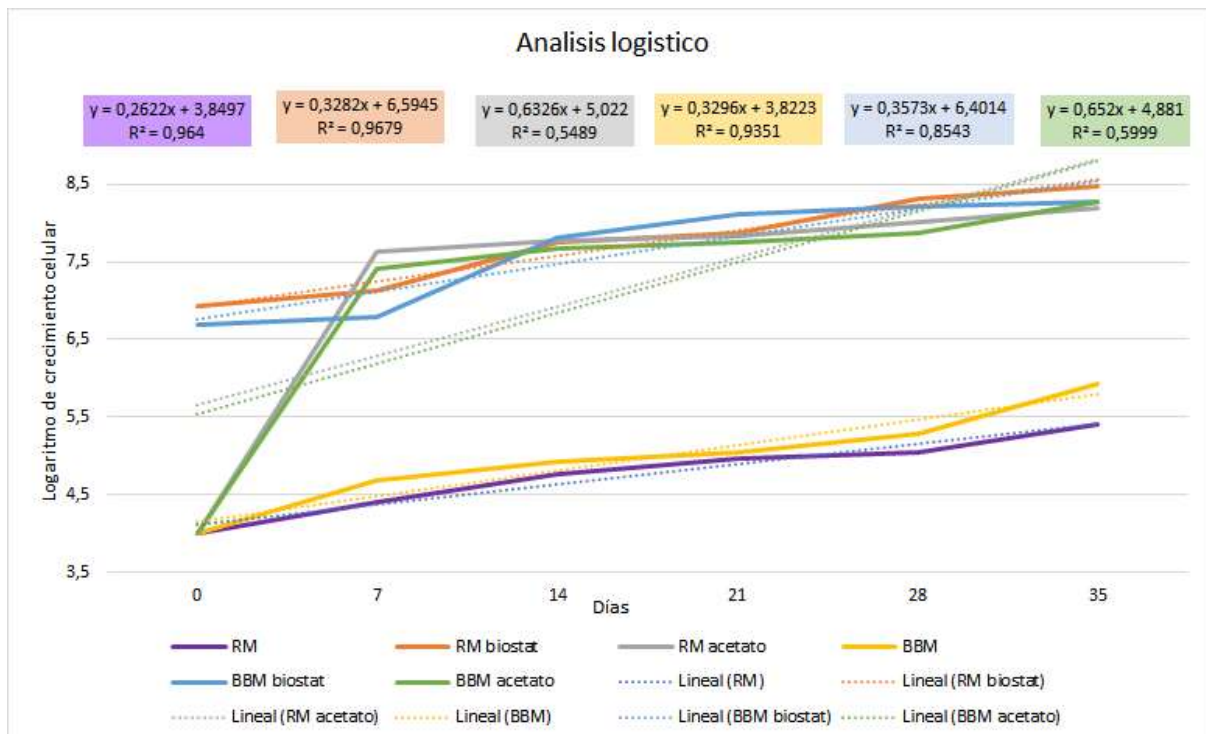
HSD =	128697595,9
Multiplicador =	4,37
MSe =	4,33659E+15
n=	5

CRECIMIENTO CELULAR/ML VS TIEMPO (PROMEDIO)						
TIEMPO (Días)	RM	RM BIOSTAT	RM ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT	BBM ACETATO
7	3,E+04	1,E+07	4,E+07	5,E+04	6,E+06	3,E+07
14	6,E+04	6,E+07	6,E+07	8,E+04	6,E+07	5,E+07
21	9,E+04	7,E+07	7,E+07	1,E+05	1,E+08	6,E+07
28	1,E+05	2,E+08	1,E+08	2,E+05	2,E+08	8,E+07
35	3,E+05	3,E+08	2,E+08	8,E+05	2,E+08	2,E+08
Promedio	1,E+05	1,E+08	8,E+07	3,E+05	1,E+08	8,E+07

diferencia	P	PB	PA	C	CB	CA
P		-130489387	-84739386,67	-144113,333	-111400720	-77860720
PB			45750000	130345273	19088666,67	52628666,67
PA				84595273,3	-26661333,33	6878666,667
C					-111256606,7	-77716606,67
CB						33540000
CA						

COMBINACIONES	
RM	P
BIOSTAT	B
ACETATO	A
BBM	C

Anexo 4. Resultados prueba Tukey, para crecimiento celular/ml vs tiempo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.



Anexo 5. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo logístico. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.



ABSORBANCIAS DE MUESTRAS VS TIEMPO										
TIEMPO (DIAS)	MEDIOS	RM1	RM2	RM3	RM BIOSTAT 1	RM BIOSTAT 2	RM BIOSTAT 3	RM ACETATO 1	RM ACETATO 2	RM ACETATO 3
0	ASTAXANTINA	0,001	0,022	0,022	0,080	0,042	0,038	0,057	0,025	0,001
	CLOROFILA	0,004	0,015	0,018	0,045	0,018	0,023	0,023	0,013	0,024
7	ASTAXANTINA	0,010	0,038	0,041	0,102	0,050	0,064	0,078	0,038	0,007
	CLOROFILA	0,007	0,026	0,028	0,058	0,018	0,033	0,034	0,016	0,034
14	ASTAXANTINA	0,031	0,003	0,005	0,400	0,031	0,156	0,121	0,276	0,149
	CLOROFILA	0,010	0,000	0,001	0,346	0,010	0,063	0,043	0,166	0,067
21	ASTAXANTINA	0,003	0,000	0,004	0,132	0,000	0,114	0,088	0,155	0,125
	CLOROFILA	0,008	0,000	0,004	0,072	0,000	0,063	0,046	0,072	0,045
28	ASTAXANTINA	0,027	0,003	0,000	0,990	0,130	1,688	0,474	0,220	0,185
	CLOROFILA	0,013	0,000	0,000	0,910	0,074	0,908	0,356	0,143	0,132
35	ASTAXANTINA	0,012	0,005	0,063	0,151	0,085	0,131	0,147	0,136	0,213
	CLOROFILA	0,007	0,005	0,034	0,091	0,044	0,085	0,088	0,078	0,155

ABSORBANCIAS DE MUESTRAS VS TIEMPO										
BBM1	BBM2	BBM3	BBM BIOSTAT 1	BBM BIOSTAT 2	BBM BIOSTAT 3	BBM ACETATO1	BBM ACETATO2	BBM ACETATO3	TIEMPO (DIAS)	MEDIOS
0,041	0,009	0,037	0,052	0,036	0,028	0,105	0,365	0,548	0	ASTAXANTINA
0,011	0,005	0,002	0,003	0,001	0,009	0,053	0,120	0,543		CLOROFILA
0,057	0,013	0,049	0,049	0,042	0,050	0,184	0,570	0,863	7	ASTAXANTINA
0,017	0,010	0,003	0,008	0,003	0,011	0,087	0,393	0,623		CLOROFILA
0,040	0,001	0,008	0,038	0,049	0,020	0,002	0,044	0,042	14	ASTAXANTINA
0,004	0,003	0,002	0,005	0,012	0,001	0,016	0,012	0,010		CLOROFILA
0,139	0,097	0,087	0,977	0,026	0,039	0,029	0,050	0,048	21	ASTAXANTINA
0,002	0,021	0,019	0,720	0,000	0,009	0,009	0,020	0,019		CLOROFILA
0,023	0,008	0,009	0,064	0,033	0,219	0,038	0,029	0,039	28	ASTAXANTINA
0,016	0,005	0,003	0,024	0,001	0,149	0,011	0,008	0,020		CLOROFILA
0,015	0,033	0,000	0,051	0,031	0,324	0,043	0,041	0,074	35	ASTAXANTINA
0,009	0,020	0,000	0,019	0,009	0,221	0,027	0,257	0,037		CLOROFILA

Anexo 6. Absorbancias de astaxantina y clorofila según medio y tratamiento. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

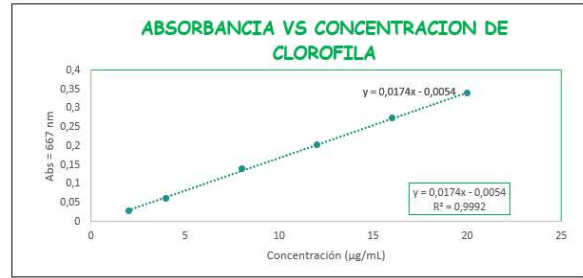
PROMEDIOS ABSORBANCIAS							
TIEMPO (DIAS)	MEDIOS	RM	RM BIOSTAT	RM ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT	BBM ACETATO
0	ASTAXANTINA	0,015	0,053	0,028	0,029	0,039	0,339
	CLOROFILA	0,012	0,029	0,020	0,006	0,004	0,239
7	ASTAXANTINA	0,030	0,072	0,041	0,040	0,047	0,539
	CLOROFILA	0,020	0,036	0,028	0,010	0,007	0,368
14	ASTAXANTINA	0,013	0,196	0,182	0,016	0,036	0,029
	CLOROFILA	0,004	0,140	0,092	0,003	0,006	0,013
21	ASTAXANTINA	0,002	0,082	0,123	0,108	0,347	0,042
	CLOROFILA	0,004	0,045	0,054	0,014	0,243	0,016
28	ASTAXANTINA	0,010	0,936	0,293	0,013	0,105	0,035
	CLOROFILA	0,004	0,631	0,210	0,008	0,058	0,013
35	ASTAXANTINA	0,027	0,122	0,165	0,016	0,135	0,053
	CLOROFILA	0,015	0,073	0,107	0,010	0,083	0,107

Anexo 7. Promedio de absorbancias de astaxantina y clorofila. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

DATOS CURVA CALIBRACION	
Concentración (µg/mL)	A = 667 nm
2	0,028
4	0,061
8	0,14
12	0,203
16	0,275
20	0,34

$$X = (Y/0,0174)+0,0054$$

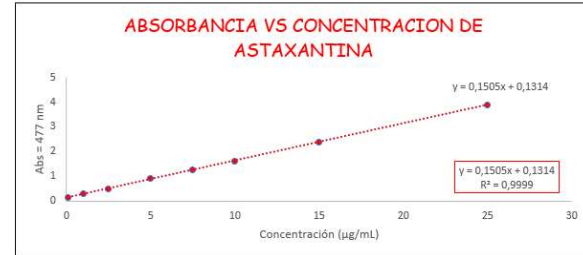
$$[ ] = (Abs/0,0174)+0,0054$$



DATOS CURVA	
Concentración (µg/mL)	A = 477 nm
0,1	0,153
1	0,293
2,5	0,5
5	0,898
7,5	1,245
10	1,612
15	2,395
25	3,9

$$X = (Y/0,1505)-0,1314$$

$$[ ] = (Abs/0,1505)-0,1314$$



Anexo 8. Curvas de calibración de Astaxantina y clorofila. (Elaborado por Gómez et al, 2019) (62).

CONCENTRACION ASTAXANTINA VS TIEMPO							
TIEMPO (DIAS)	MEDIOS	RM	RM BIOSTAT	RM ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT	BBM ACETATO
0	ASTAXANTINA	0,032	0,223	0,052	0,061	0,126	2,123
7	ASTAXANTINA	0,066	0,347	0,141	0,132	0,181	3,450
14	ASTAXANTINA	0,045	1,169	1,078	0,023	0,106	0,064
21	ASTAXANTINA	0,116	1,169	0,684	0,584	2,176	0,150
28	ASTAXANTINA	0,065	6,088	1,815	0,043	0,568	0,103
35	ASTAXANTINA	0,046	0,681	0,967	0,025	0,768	0,219

CONCENTRACION CLOROFILA VS TIEMPO							
TIEMPO (DIAS)	MEDIOS	RM	RM BIOSTAT	RM ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT	BBM ACETATO
0	CLOROFILA	0,714	1,653	1,155	0,350	0,254	13,722
7	CLOROFILA	1,174	2,094	1,615	0,580	0,427	21,136
14	CLOROFILA	0,216	2,592	5,293	0,178	0,350	0,733
21	CLOROFILA	0,235	8,032	3,128	0,810	13,971	0,925
28	CLOROFILA	0,254	36,251	12,094	0,465	3,339	0,753
35	CLOROFILA	0,887	4,220	6,155	0,561	4,776	6,155

Anexo 9. Concentración de astaxantina y clorofila vs tiempo. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,030013436	5	1,806002687	1,38035772	0,259588941	2,533554548
Dentro de los grupos	39,25075361	30	1,308358454			
Total	48,28076705	35				

Anexo 10. Análisis de varianza concentración de astaxantina. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020



ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	332,6023628	5	66,52047256	1,39666845	0,253735231	2,533554548
Dentro de los grupos	1428,83888	30	47,62796266			
Total	1761,441243	35				

Anexo 11. Análisis de varianza concentración de clorofila. Elaborado por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020