

**Producción de astaxantina bajo 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**

Autoras

Laura Torres Cadavid
Jeimy Lizeth Ubaque Ramirez

Asesora

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

Grupo bioprocesos y control



Contenido

1. **Introducción**

2. **Objetivos**

3. **Antecedentes**

4. **Marco teórico**

5. **Diseño metodológico**

6. **Resultados**

7. **Conclusiones**

1. Introducción

Haematococcus pluvialis se considera como la mejor alternativa para producir astaxantina de forma natural; sin embargo, 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.



Aumento 40x. Fotografías tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.



Aumento 40x. Fotografías tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

Lo anterior motiva los estudios para encontrar las condiciones óptimas para obtener mayores cantidades de biomasa, como el uso de **biorreactores** controlados y el posterior uso de su biomasa para producir la astaxantina empleando factores de estrés como **estrés lumínico y salino**.

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la producción de astaxantina usando como factores de estrés, acetato de sodio y alta intensidad de luz, utilizando la biomasa obtenida de *Haematococcus pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 Litros

Objetivos específicos



Establecer el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, bajo las condiciones propuestas, en los medios de cultivo RM y BBM.



Determinar los cambios morfológicos de la microalga *H. pluvialis* al ser sometida a los factores de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz durante su cultivo



Cuantificar la producción de astaxantina y clorofila durante el tiempo de cultivo, bajo los factores de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz.

3. Antecedentes

2012

Tocquin, P., et al.

- Sistema de 2 etapas
- Cultivo mixotrófico
- Densidad . 2×10^6 cel/ml

2013

Ramírez, D.

- Biorreactor airlift
- Luz, NaCl
- Astaxantina: 59,2 ug/mL

2017

Niño C, et al.

- Medios BBM, RM, OHM
- Condiciones: pH, luz
- Rcto. celular: 7.55×10^5 células/ml. en RM
- 8,3 ug/ml Astaxantina.

2018

García, L.

- Biorreactor Tec-Fem 5L.
- Medio RM
- Acetato de Na y Luz.
- 2,530 ug/ml de Astaxantina

2018

Zhang, C., et al

- 10 mM de acetato de Na
- 4,8 mg/L de astaxantina.

2018

He B et al

- .Expresión de genes según factores de estrés
- Estrés lumínico y estrés salino aumenta la ruta de biosíntesis de astaxantina

2019

Rodríguez, L.

- .Medio RM
- Condiciones Luz, acetato de Na 1,6 g/L
- 7,3 ug/ml de Astaxantina

2019

Manrique y Marín

- Biorreactor BIostat A PLUS 5 L.
- Medios RM y BBM - utilizando luces LEDs
- 3,1 ug/ml de Astaxantina en RM.

2019

Liu Yu, et al.

- Sistema de 2 etapas, cultivo y estrés
- Agua residual y medio BBM
- Luz y acetato de Na
- $67,95 \pm 3,93$ mg/L de Astaxantina.

4. Marco teórico

Haematococcus pluvialis

- Alga verde de agua dulce.
- Productora de astaxantina; poderoso antioxidante, colorante y compuesto bioactivo, útil en diferentes industrias.
- En su **ciclo de vida** se distinguen cuatro tipos de morfologías celulares: macrozooide, palmella, aplanospora y microzooide.
- **Características metabólicas:** nutrición fotoautótrofa, mixotrófica y heterótrofa. (41)

Taxonomía	
Dominio:	Eukaryota
Reino:	Viridiplantae
Filo:	Chlorophyta
Clase:	Chlorophyceae
Orden:	Chlamydomonadales
Familia:	<i>Haematococcaceae</i>
Género:	<i>Haematococcus</i>
Especie:	<i>H. pluvialis</i>

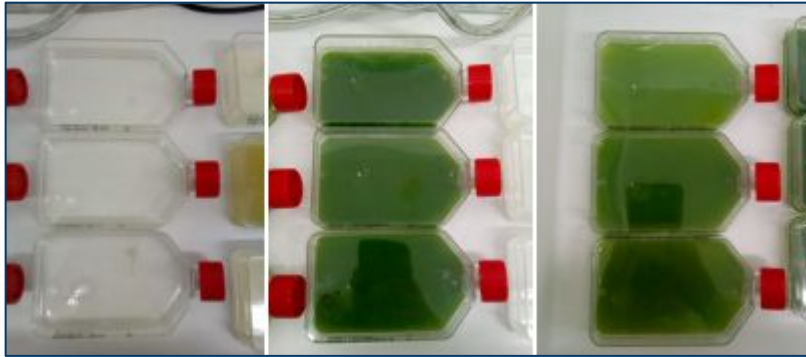
Flotow, J. Von. Beobachtungen über *Haematococcus pluvialis*. (1844)



Aumento 40x. Fotografías tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

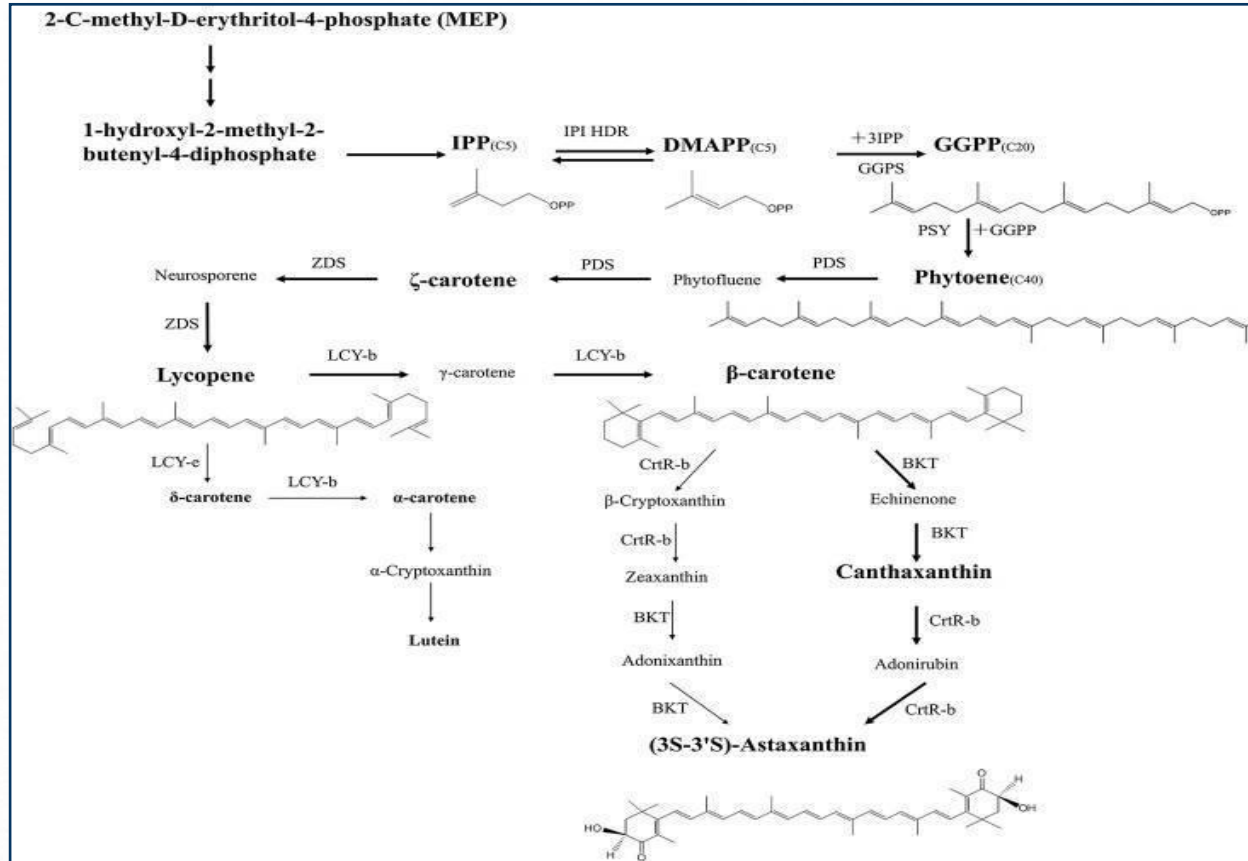
Clorofila

La clorofila cumple como papel fundamental absorber la luz violeta, azul y roja, siendo aceptora final de fotones gracias al complejo antena, necesario para la fotosíntesis y por ende el metabolismo de la alga. (34)



Fotografías tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020.

Astaxantina



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

Condiciones de estrés

Lumínico

El exceso de radiación puede causar daño en los cromatóforos aumentando la producción de carotenoides. (38)

Acetato de sodio

En algunas ocasiones restringen el crecimiento celular, debido al cambio osmótico del medio y de la microalga, produciendo estrés, manifestándose como la producción de astaxantina

Nitrógeno

Su disminución en el cultivo es un factor que inhibe la biosíntesis de clorofila A y promueve la degradación de la clorofila B. (39)

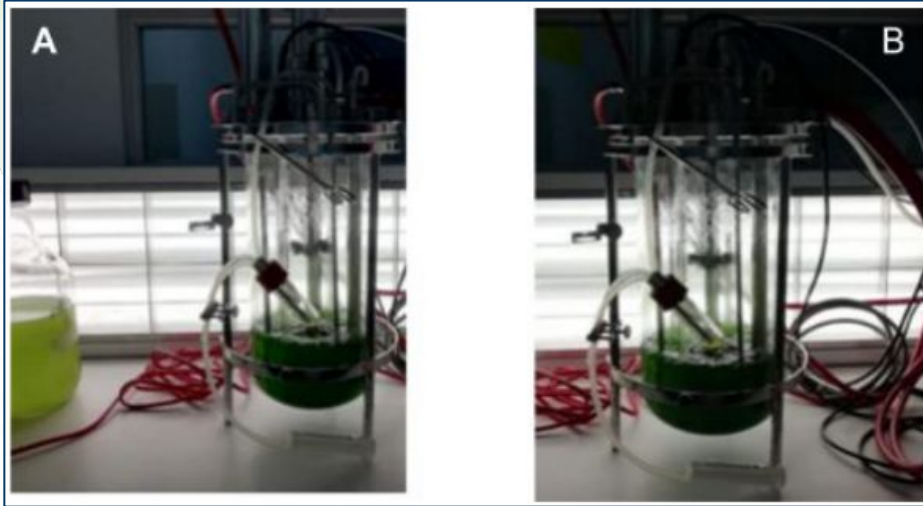
Fósforo

La falta en el medio puede generar cambios en la composición de la célula, aumentando la producción de lípidos o carbohidratos. (37)

CO₂

Para un correcto desarrollo del cultivo de *H. pluvialis*, es necesario tener en cuenta la disponibilidad de CO₂. La ausencia de este, generaría un ambiente hostil. (36)


Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros



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

(24)

- Sistema de aireación sencillo y automático para aire, O₂, CO₂ y N₂
- Vidrio borosilicato.
- Antiespumante.
- Forma tubular.
- Sistema de agitación integrado.
- Sensores de T°, pH y OD, en la parte superior.
- Conectado a un computador.
- Sistema cerrado.



5. Diseño metodológico

FASE 1

Crecimiento de la microalga *H. pluvialis*

Obtención de la biomasa

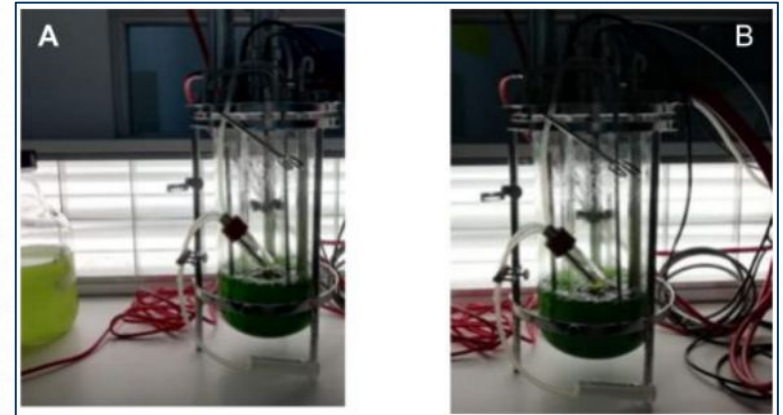
- **BIOSTAT A PLUS de 5 L** en los medios de cultivo **BBM y RM**,

Condiciones manejadas:

- pH 6.8
- Fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad
- Temperatura de a $20 \pm 1^\circ \text{C}$,
- Iluminación con lámparas fluorescentes blancas y LEDs color blanca, azul y roja
- Intensidad lumínica de 270 luxes
- Aire filtrado y agitación 100 rpm.

Inocularon (1×10^4 células/mL) en cajas de cultivo celular denominadas

- RM (control)
- RM biostat acetato (0,750 mg/L de acetato de Na)
- RM biostat (0,375 mg/L de acetato de Na)
- BBM (control)
- BBM biostat acetato (0,750 mg/L de acetato de Na)
- BBM biostat (0,375 mg/L de acetato de Na)



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

Condiciones del cultivo

- pH a 6.8
- Fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad
- Temperatura de a $20 \pm 1^\circ \text{C}$
- Iluminación con lámparas fluorescentes blancas
- Intensidad lumínica de 65 luxes
- Agitación manual de 10 segundos al día

Condiciones de estrés

- Fotoperiodo de 20 horas luz y 4 de oscuridad
- Iluminación con LEDs color blanco
- Intensidad lumínica de 360 luxes
- Adición de acetato de sodio
 - 0,375 mg/L para los medios BBM biostat y RM biostat
 - 0,750 mg/L para los medios BBM biostat acetato y RM biostat acetato
- Agitación manual de 10 segundos al día



- Toma de muestras por triplicado
- Curva de crecimiento (cel/ml vs Tiempo)
- Modelo logístico
- ANOVA (95%)
- Tukey (95%)

Fotografía tomada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2019.

FASE 2

Cambio Morfológico

-Evaluación de cambio morfológico: Se determinó color, tamaño, viabilidad y morfología celular. Se tomaron muestras por triplicado.



FASE 3

Determinación de Astaxantina y Clorofila

- Procedimiento **APHA 1992 (50)**.
- Para la cuantificación se realizó curva de calibración con patrones de referencia.
- Lectura espectrofotométrica 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina.
- Determinación de astaxantina por **HPLC**



Condiciones HPLC

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

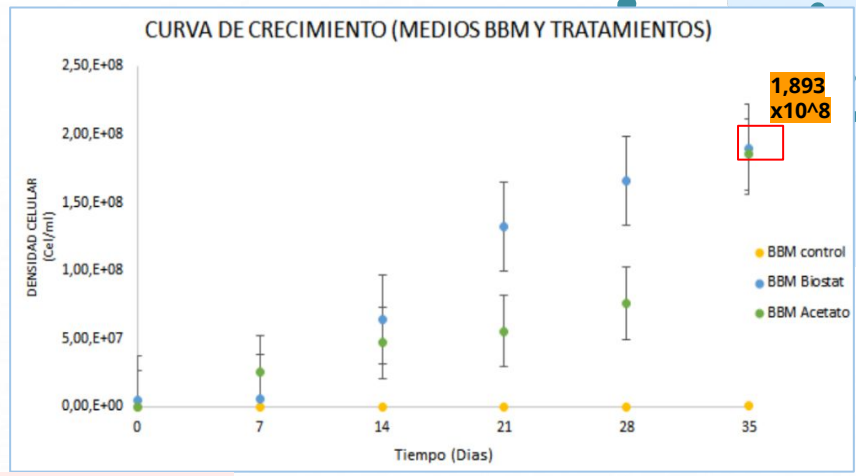
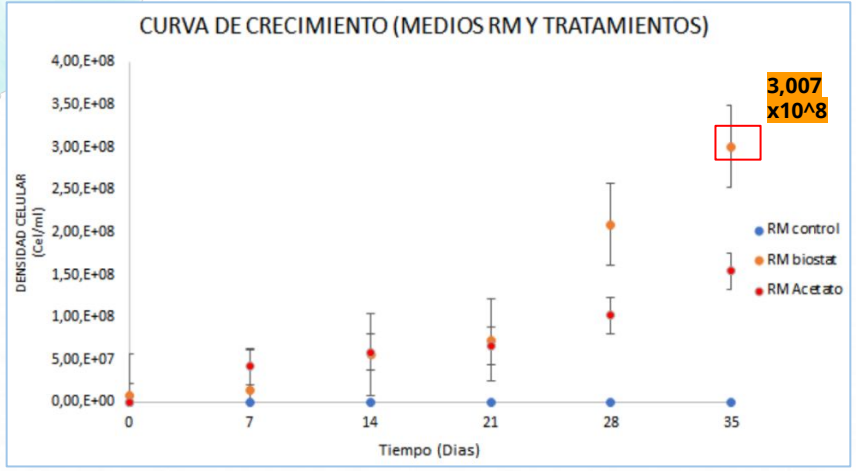
Condiciones cromatográficas (51).



Cromatógrafo Agilent® Technologies
1260 Infinity. Tomada de:

<https://grupobiomaster.com/1260-2/>

6. Resultados



ANOVA (95%) (F=3,55; P= 0,015;gl=5)

-CONTROL
-BIOSTAT:
 0,375 mg/L de acetato de Na.
-ACETATO:
 0,750 mg/L de acetato de Na.

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%

Modelo Logístico

Irradiancia 360 luxes día
 15.

Niño C., et al (2017)

Tocquin, P., et al. (2012)

Gráficos y tabla elaborados por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

Test de tukey (95%)

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

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

FASE 2: Cambio morfológico



Días	RM	RM BIOSTAT ACETATO	RM + ACETATO	BBM	BBM BIOSTAT ACETATO	BBM + ACETATO
7						
14						
21						
28						
35						

Cambio morfológico visto en aumento 40x. Fotografías tomadas por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2019.

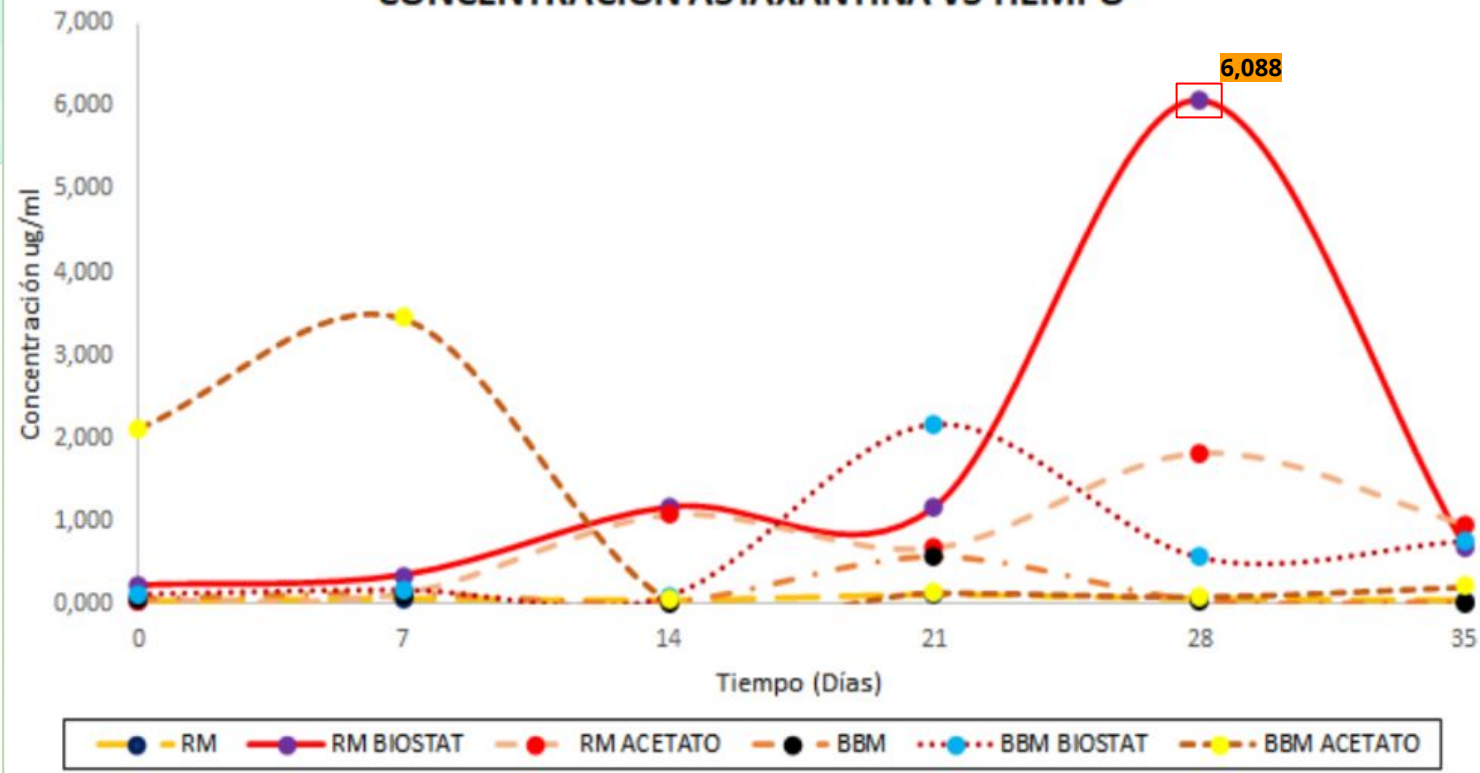
Zhang, C. et
al (2018)

Liu Yu, et al.
(2019)

Zhang, L
(2017)

García L
(2018)

CONCENTRACIÓN ASTAXANTINA VS TIEMPO

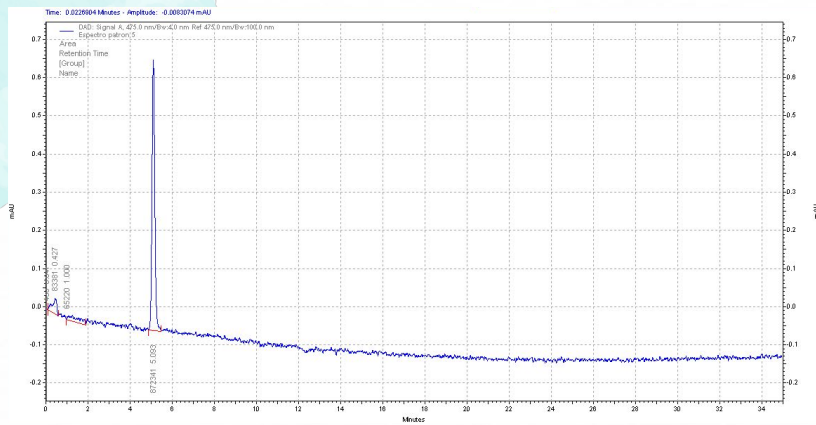


-CONTROL
 -BIOSTAT: 0,375 mg/L de acetato de Na.
 -ACETATO: 0,750 mg/L de acetato de Na.

Gráfica elaborada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

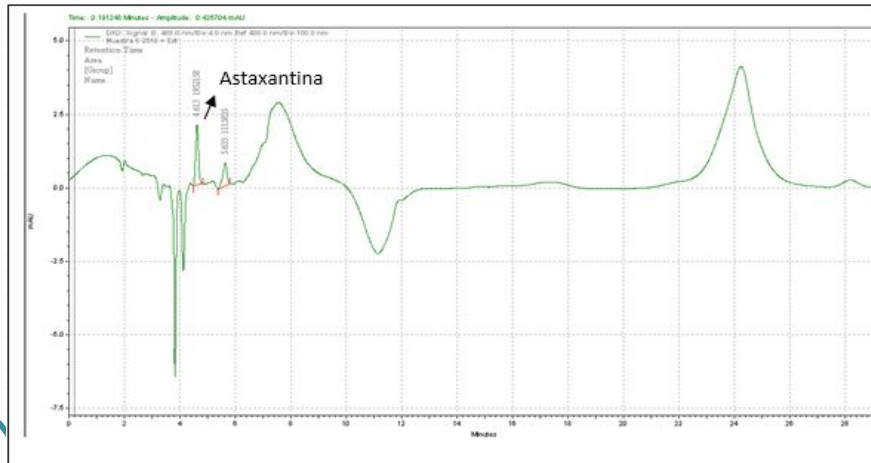
Rodríguez, L (2013) Zhang, C. et al (2018)
 García L (2018) Liu Yu, et al. (2019)
 Niño C., et al (2017) Zhang, L (2017)

ANOVA (95%) (F= 1,38 ; P=0,29; gl=5)



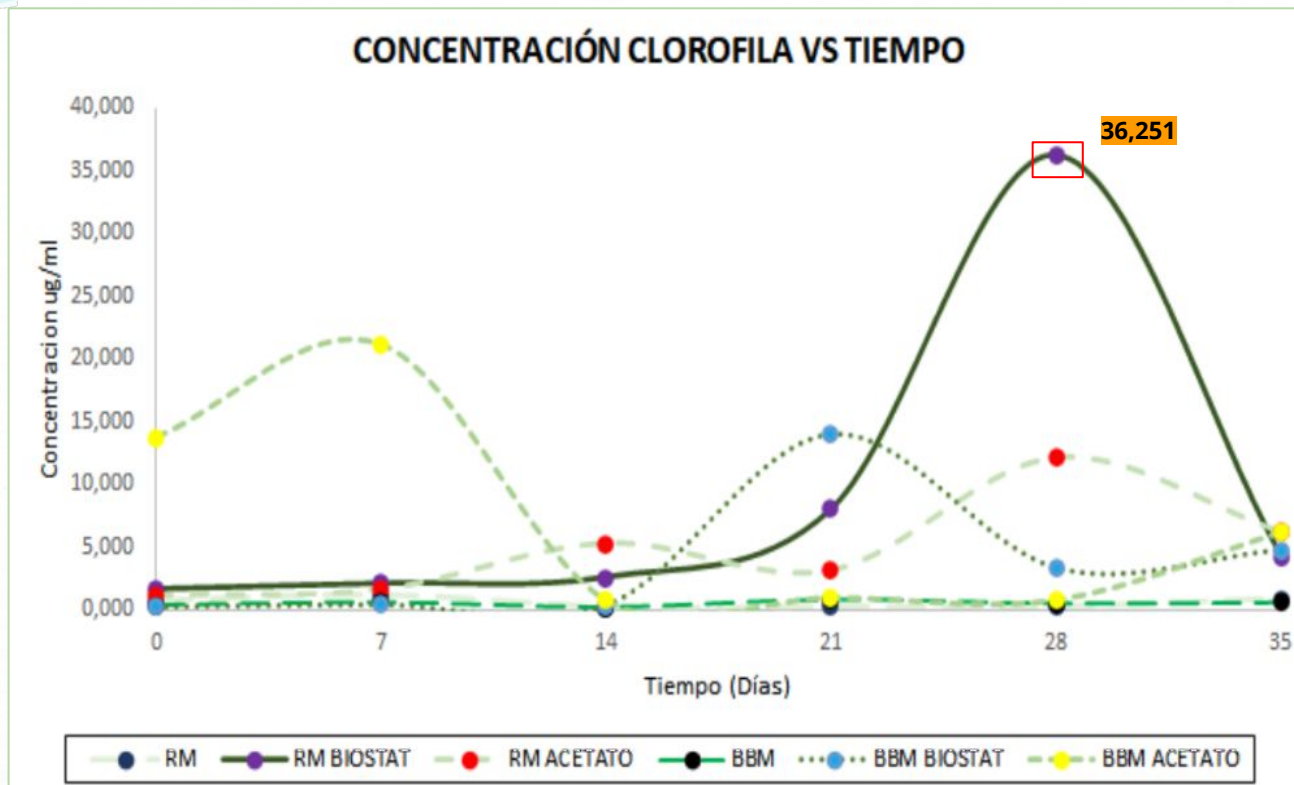
Cromatograma de estándar de astaxantina (51)

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.



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

FASE 3: determinación de clorofila y astaxantina



-CONTROL
-BIOSTAT:
0,375 mg/L de acetato de Na.
-ACETATO:
0,750 mg/L de acetato de Na.

Gráfica elaborada por las autoras Jeimy Ubaque y Laura Torres, 2020

García L (2018)
Manrique y Marín (2019)

ANOVA (95%) (F = 1,39 ; P=0,25 ; gl=5)

Irradiancia
360 luxes



Tratamiento	Resultados						
	crecimiento celular / (Cel./ml/ día)	velocidad de crecimiento	análisis estadístico	[] de astaxantina (µg/ día)	Análisis estadístico	[] de clorofila (µg / día)	Análisis estadístico
RM	$2,58 \times 10^5$ 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)
RM + 0,375 mg/L	$3,01 \times 10^6$ 35 días	0,028		6,088 µg/mL 28 días		36,251 µg/mL 28 días	
RM + 0,750 mg/L	$1,54 \times 10^6$ 35 días	0,016		1,815 µg/mL 28 días		12,094 µg/mL 28 días	
BBM	$8,31 \times 10^5$ 35 días	0,027		0,584 µg/mL 21 días		0,944 µg/mL 35 días	
BBM + 0,375 mg/L	$1,89 \times 10^6$ 35 días	0,024		2,176 µg/mL 21		13,971 µg/mL	
mg/L				días		21 días	
BBM + 0,750 mg/L	$1,86 \times 10^6$ 35 días	0,017		3,450 µg/mL 7 días		21,136 µg/mL 7 días	

Tabla resumen

7. Conclusiones

El tratamiento RM BIOSTAT con adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio combinado con una irradiancia de 360 luxes, fue el que presentó:

- Mayor crecimiento celular de *H. pluvialis* con un recuento celular de 3.01×10^8 cel./mL correspondiente al día de cultivo 35, ajustándose a un modelo logístico (96,79%), logrando una velocidad de crecimiento de 0,028 células/hora.
- En cuanto a morfología celular, fue el tratamiento con mayores formas enquistadas o aplanospora correspondiente al día número 21 de cultivo.
- Presentó mayor concentración de astaxantina y clorofila, logrando una concentración máxima de 6,088 ug/mL y de 36,251 ug/mL respectivamente, correspondientes a los 28 días de cultivo

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 con cajas de cultivo celular, como acetato de sodio y alta intensidad de luz. obteniendo concentraciones de hasta 6.088 ug/mL.

8. Recomendaciones

Para futuras investigación donde se incluyan:

1. Aplicar diferentes intensidades de luz, con la intención de comparar y establecer la irradiancia más óptima para producir astaxantina.
2. 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.
3. Seguir utilizando en una primera etapa la biomasa de la microalga *H. pluvialis* producida en el biorreactor BIostat A PLUS de 5 litros para en una segunda etapa, someterla a factores de estrés para producir astaxantina, en cajas de cultivo celular.

9. Presentación en eventos

Ponencia meritoria, Mejor proyecto terminado Biológicas y del Mar

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

XXIII Encuentro nacional de semilleros de investigación-fundación REDCOLSI

(24 al 27 de noviembre del 2020, modalidad virtual).



Agradecimientos

Queremos empezar agradeciendo enormemente a la Dra. Judith Elena Camacho Kurmen por habernos dado la oportunidad de desarrollar este proyecto tan importante y por habernos ofrecido su guía constante durante todo el proceso. Sin ella, culminar este proyecto de grado no habría sido posible.

Nos gustaría agradecer especialmente a nuestras familias, por el apoyo que nos han brindado a lo largo de estos años de formación, el título que esperamos recibir es tanto nuestro, como de ellos. Gracias a Dina, Yelene, Yadira y Orlando.

Gracias a nuestros amigos más cercanos que estuvieron en los momentos más difíciles para prestarnos su apoyo incondicional. Gracias a Sergio y a Alexey.

Finalmente, ofrecemos nuestro agradecimiento a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a nuestros docentes, por formarnos y hacer parte de nuestro proceso ético y profesional a lo largo de nuestra carrera. Gracias a la Universidad de la Sabana por aportar la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis*, sin la que habría sido imposible desarrollar nuestro proyecto de grado.

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 CO2 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* CCLA 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 Fe²⁺. 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 γ -aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation. *Bioresource technology* [Internet]. 2019 August [cited 2020 Apr 11];285.

(27) Liu Y, 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

- (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].

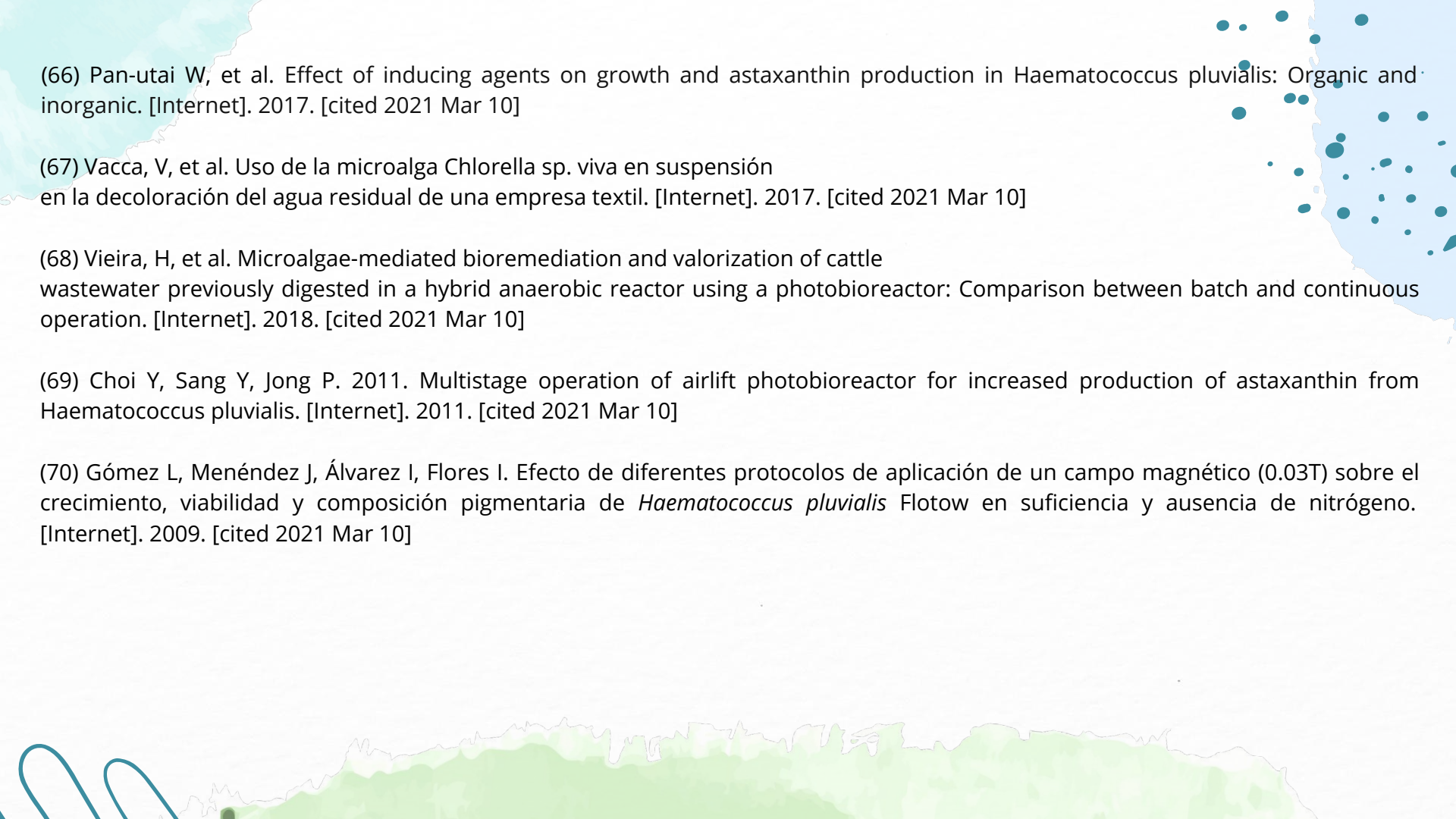
(61) Castillo A, Pereira S, Otero A, Fiol S, Garcia-Jares C, Lores M. Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from: *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF. RSC Adv [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2020 Nov 24];10(47):27995–8006.

(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]