



**EFFECTO DEL ESTRÉS PRODUCIDO POR LA VARIACIÓN DEL COLOR DE
LUZ Y LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE
GENES Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C.

ENERO 2019



**EFFECTO DEL ESTRÉS PRODUCIDO POR LA VARIACIÓN DEL COLOR DE
LUZ Y LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE
GENES Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis***

**Presentado por:
Kimberly Rossan Ávila Quintero
Erika Dayan Rico Norato
Carlos Andrés Rivero Torres**

**Trabajo de Investigación para obtener el Título de
Bacteriólogo y Laboratorista clínico**

**Asesora
Myriam Judith Huérfano Torres MSc
Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

BOGOTÁ D.C.

ENERO 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a mi mamá y mi familia quien estuvo siempre a mi lado apoyándome y teniendo fe en mí, que a pesar de las adversidades siempre estuvieron presentes; también lo dedico a mi abuelo quien desde el cielo siempre está cuidándome y que este es un sueño que los dos estamos cumpliendo, y por ultimo este trabajo también es dedicado a mis compañeros y equipo de tesis, que a pesar de los problemas que se presentaran siempre tuvimos persistencia y optimismo, para salir adelante con esta investigación que ahora es una realidad.

Este trabajo lo dedico a cada uno de los miembros de mi familia quienes siempre me acompañaron, brindándome consejos, sabiduría y apoyo durante todo el proceso de formación profesional, especialmente a mi padre quien con su esfuerzo y dedicación ha sido parte importante de este duro pero fructuoso camino, a mis amigos y compañeros que formaron parte de este sueño, y sobre todo a Dios por brindarme la paciencia y perseverancia necesaria para culminar de manera satisfactoria, no me quedan más sino palabras de agradecimiento para cada una de las personas que formaron parte de esta importante etapa de mi vida.

Dedico este trabajo primero a Dios por darme la paciencia, la sabiduría que me brindo en este proceso de alcanzar mi meta, a mi padre y a mi madre por sus grandes esfuerzos, por su apoyo, su total confianza y el gran deseo de superación durante este largo camino para cumplir mi sueño , a mi tío Fernando Saavedra por su apoyo, por nunca dejarme solo aun desde el cielo y por su bendición en cada día de mi vida, a mi hermana Karen y mis hermanos Robinson, Giovanny, Adolfo y Jairo por haberme apoyado y aconsejado todo en cada momento necesario y a cada una de las personas que hicieron parte de este proceso de crecimiento y formación como profesional y ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra asesora de proyecto Msc. Myriam Judith Huérfano Torres, por la confianza depositada en nosotros al permitirnos realizar este estudio, por el acompañamiento realizado para finalizar satisfactoriamente la investigación. A la doctora Judith Elena Camacho Kurmen docente que, con su conocimiento, nos dio siempre apoyo frente a todas las adversidades que se pudieran presentar al transcurrir la investigación. Al doctor Luis Eduardo Díaz docente de la facultad de ingeniería de la Universidad de la Sabana quien direccionó y acompañó este proyecto, con la fe puesta en cada uno de nosotros.

Agradecemos a Dios por darnos la sabiduría, la constancia y entendimiento para poder llevar a cabo día a día esta investigación, siendo él la guía de cada uno de nuestros triunfos, sacando constantemente lo mejor de nosotros.

Agradecemos y enaltecemos la labor realizada por el técnico de laboratorio de molecular de la Universidad de la Sabana Jorge Alberto Rodríguez Orjuela por su apoyo incondicional, por su profesionalismo, constancia, paciencia y calidad humana que lo caracteriza y por último por sus enseñanzas y acompañamiento permanente durante los altibajos que se presentaron. Quien nos ayudó a salir adelante con lo que al comienzo parecía un sueño.

Agradecemos a nuestros padres ya que gracias a ellos estamos viviendo esta gran experiencia que nos permitió crecer a nivel profesional y cumplir con parte de nuestro proyecto de vida, inculcando siempre en nosotros el respeto, amor,

colaboración al prójimo y compromiso, infinitas gracias por su apoyo incondicional y su dedicación continua para darnos lo necesario para seguir viviendo este sueño como bacteriólogos y laboralistas clínicos.

Agradecimientos de igual forma a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca nuestra alma mater, por la colaboración y la fe puesta en nosotros al abrirnos las puertas a un mundo tan interesante como lo es la investigación y por permitirnos terminar la carrera profesional con la mejor formación y a la Universidad de la Sabana por acogernos en sus instalaciones y ofrecernos las herramientas para poder llevar a cabo una buena investigación.

Por último, agradecemos a todas las personas que directa o indirectamente nos apoyaron en el proyecto también hacen parte del proceso vivido y que satisfactoriamente hoy culminamos.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1. ANTECEDENTES	4
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	11
2.1.1 Descripción	11
2.1.2 Morfología, estructura y fisiología	12
2.1.3 Composición química	13
2.1.4 Distribución	14
2.1.5 Aplicaciones	15
2.2 Medios de Cultivo	15
2.2.1 BBM - nitrógeno al 4.0%, factor de estrés lumínico (luz roja y azul)	16
2.2.2 RM - nitrógeno al 4.0%, factor de estrés lumínico (luz roja y azul)	16
2.3 Factores de estrés en <i>H. pluvialis</i>	17
2.3.1 Factores ambientales de estrés.....	17
2.3.2 La luz como forma de producción de Astaxantina.	18
2.3.3. Estrés de <i>H. pluvialis</i> con distintos tipos de luz.	18
2.4 Astaxantina	19
2.4.1. Química de la Astaxantina.....	19
2.4.2 Ruta metabólica de síntesis de la Astaxantina	20
2.4.3 Usos en la industria de la Astaxantina.....	21
2.5 Medición de Astaxantina.....	22
2.5.1. Genes que intervienen en la ruta metabólica para la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	22
2.6. Clorofila.....	23
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa	24
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	25
3.1. TIPO DE ESTUDIO	25
3.2 MUESTRA	25
3.3 VARIABLES.....	25
3.3.1 Variables dependientes.....	25

3.3.2 Variables independientes	26
3.4 POBLACIÓN	26
3.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	26
3.6 TRATAMIENTO No 1 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ.....	28
3.6.1 FASE UNO: Viabilidad y crecimiento celular	28
3.6.2 FASE DOS: Evaluación de estrés mediado por la variación de color de luz azul y roja.	28
3.7 TRATAMIENTO No 2 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ Y NITRÓGENO AL 4.0%.....	29
3.7.1 FASE UNO: Viabilidad y crecimiento celular en medios de cultivo con concentración de Nitrógeno al 4.0%.....	29
3.7.2 FASE DOS: Evaluación de estrés mediado por la variación de color de luz (azul y roja) y concentración de Nitrógeno al 4.0%	30
3.8 Medición de las concentraciones de Astaxantina y Clorofila por medio de espectrofotometría.	30
3.8.1 EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA Y CLOROFILA CON METANOL 90%	31
3.8.2 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA	31
3.9 DETERMINACIÓN DE GENES EXPRESADOS EN EL PROCESO DE BIOSÍNTESIS DE LA ASTAXANTINA	32
3.9.1 Determinación de las muestras para el análisis	32
3.9.2 OBTENCIÓN DE BIOMASA PARA PCR.....	34
3.9.3 EXTRACCIÓN DE RNA.....	34
3.9.4 CUANTIFICACIÓN DE RNA	35
3.9.5 CONVERSIÓN DE RNA A CDNA	35
3.9.6 PCR para Housekeeping	37
3.9.7 ELECTROFORESIS	38
3.9.8 PCR CON PRIMERS PARA EXPRESIÓN DE GENES	39
4. RESULTADOS	43
4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN	43
4.2 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ, COMO FACTOR DE ESTRÉS, APLICADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA	44
4.3 CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA POR VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ BLANCA, AZUL Y ROJA.....	45
4.3.1 Biorreactores sometidos a luz blanca (control).....	45
4.3.2 Biorreactores sometidos a luz azul (factor de estrés)	47
4.3.3 Biorreactores sometidos a luz roja (factor de estrés).....	50
4.4 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ Y CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO 4.0%, COMO FACTORES DE ESTRÉS.	53

4.5.1 Biorreactores sometidos a luz blanca (control)	53
4.5.2 LUZ AZUL Y NITRÓGENO AL 4.0 % COMO FACTORES DE ESTRÉS.....	56
4.5.3 LUZ ROJA Y NITRÓGENO AL 4.0% COMO FACTORES DE ESTRÉS.....	59
4.6 ANÁLISIS MOLECULAR	62
4.6.1 DETERMINACIÓN DE Housekeeping	63
4.6.2 EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE ASTAXANTINA.....	67
5.DISCUSIÓN	70
6. CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS.....	76
ANEXOS.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 ciclo de vida <i>H. pluvialis</i>	13
Figura 2 Estructura molecular de la Astaxantina.....	20
Figura 3 Ruta de síntesis de astaxantina en la microalga <i>H. pluvialis</i>	21
Figura 4 Diseño experimental tratamiento N°1 de estrés.....	29
Figura 5 Diseño experimental tratamiento N° 2 de estrés.....	30

INDICE DE GRAFICAS.

Grafica 1 Curva de calibración de clorofila	43
Grafica 2 Curva de calibración de astaxantina	44
Grafica 3 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con luz blanca (control negativo)	45
Grafica 4 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ medio RM y BBM con luz azul (factor de estrés)	48
Grafica 5 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ medio RM y BBM con luz Roja (factor de estrés)	50
Grafica 6 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con deficiencia de Nitrógeno al 4.0% y luz blanca (control).	54
Grafica 7. Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con Nitrógeno al 4.0% y luz azul como factores de estrés.....	57
Grafica 8 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$. con Nitrógeno al 4.0% y luz roja como factores de estrés.	59

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>H. pluvialis</i>	12
Tabla 4 Principales aplicaciones de la Astaxantina	21
Tabla 5 A) Composición del medio RM con concentración de Nitrógeno normal.	27
B) Composición del medio BBM con concentración de Nitrógeno normal	27
Tabla 5 A) Composición del medio RM con 4.0% de Nitrógeno B) Composición del medio BBM con 4.0% de Nitrógeno.....	27
Fuente: Niño Castillo CM, Castillo CMN, Rivera FCR, Díaz LE, Díaz AGL. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	27
TABLA 6 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz blanca	32
TABLA 7 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz Azul	32
TABLA 8 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz Roja.....	33
TABLA 9 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz blanca y nitrógeno 4.0%	33
TABLA 10 Muestras seleccionadas para análisis molecular Luz azul y nitrógeno 4.0%	33
TABLA 11 Muestras seleccionadas para análisis molecular Luz Roja y	33
nitrógeno 4.0%.....	33
Tabla 12 Multiplex para un volumen de 8 µl	36
Tabla 13 multiplex de MuLV.....	36
Tabla 14 Programación de Termociclador para cDNA.....	36
Tabla 15 Volúmenes para PCR multiplex con volumen de 12,5 µl	37
Tabla 16 Programación Termociclador para PCR con ITS	38
Tabla 17 Pesos moleculares de genes buscados en el estudio	40
Tabla 18 Preparación de multiplex PCR con 2 parejas de primers	40
Tabla 19 Preparación de multiplex PCR con 3 parejas de Primers	41
Tabla 20 Programación del Termociclador BIO-LAB.....	41
Tabla 21 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular, con luz blanca medio BBM objetivo 100x	46
Tabla 22 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular, con luz blanca medio RM objetivo 100x	47
Tabla 23 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio BBM objetivo 100x.....	49
Tabla 24 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio RM objetivo 100x.....	49
Tabla 25 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio BBM objetivo 100x.....	51
Tabla 26 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio RM objetivo 100x.....	51
Tabla 27 Registro fotográfico biorreactores tratamiento 1. Nitrógeno al 100% con variación del color de luz, medios RM y BBM. Vista macroscópica.....	52
Tabla 28 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x.....	55
Tabla 29 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x.....	56

Tabla 30 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz azul medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x	58
Tabla 31 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz azul medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x	58
Tabla 32 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz roja medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x	60
FTabla 33 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz roja medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x	61
Tabla 34 Registro fotográfico biorreactores tratamiento 2. Nitrógeno al 4% con variación del color de luz, medios RM y BBM. Vista macroscópica.	61

INDICE DE IMAGENES.

Imagen 1 Expresión de Housekeeping muestras 1,2,5, y 6.	64
Imagen 2 Expresión de Housekeeping muestras 3,4,7,8,9 y 10.	65
Imagen 3 Expresión de Housekeeping muestras 11 a la 18.....	66
Imagen 4 Expresión de los genes fitoeno sintetasa 402pb (PSY), β -caroteno Hidroxilasa 521pb (CHY) en las muestras 1 a la 18.	68
Imagen 5 Expresión de genes fitoeno desaturasa (PDS), licopeno β -ciclase (LCY), β -caroteno ketolasa (BKT), en muestras de la 1 a la 18 a excepción de la muestra 8 a la 10	69



EFFECTO DEL ESTRÉS PRODUCIDO POR LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LUZ Y LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis*

RESUMEN

La astaxantina es un caroteno secundario que sirve como base en la acuicultura, ornitología, en la industria farmacéutica, como antioxidante y foto protector; este pigmento es producido por diversas microalgas como el *Haematococcus pluvialis*, que es un alga verde de agua dulce. El objetivo del proyecto fue aumentar la producción del pigmento de forma natural. Se expuso la microalga al primer tratamiento con variación del color de luz y un segundo tratamiento con variación del color de luz y nitrógeno al 4.0%, cada fase se desarrolló en un periodo de 30 días, de los cuales 15 días fueron de crecimiento y 15 días de estrés (luz roja, luz azul) ; se llevó a cabo en los medios RM y BBM, los muestreos se realizaron cada tercer día para cuantificación de clorofila y astaxantina, observar morfología y posteriormente realizar análisis moleculares para evidenciar expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de astaxantina.

En la determinación de expresión de genes se obtuvo un 87,5 % el gen fitoeno sintasa (PSY) y en un 62,5% el gen β -caroteno Hidroxilasa (CHY) presente en

el total de las muestras analizadas, se concluyó que el tratamiento óptimo para la producción del pigmento fue nitrógeno al 4.0% con variación del color de luz roja en el medio BBM ya que alcanzó una producción de 7.24×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{cel.}$ de astaxantina.

PALABRAS CLAVES: *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, caroteno, microalga, clorofila, factor de estrés.

ESTUDIANTES: Kimberly Rossan Ávila Quintero, Erika Dayan Rico Norato, Carlos Andrés Rivero Torres.

DOCENTE: MSc. Myriam Judith Huérfano Torres

FECHA: Agosto de 2018

INTRODUCCIÓN

El *H. pluvialis* es una microalga verde de agua dulce, unicelular, de la familia de las Haematococcaceae, tiene una forma elipsoide, biflagelada y móvil en su estado vegetativo; Esta microalga posee 3 morfologías características, estas son Vegetativa (verde con presencia de flagelos), Palmella (verde, esférica sin flagelos) y Aplanóspora (roja, esférica sin flagelos), esta última cumple la función de estructura de resistencia a las condiciones de estrés que se presenten en el medio ¹. Algunos de los factores que favorecen la producción del pigmento son la deficiencia de nutrientes como nitrógeno, cambios de temperatura y exposición a variación de luz entre otros ²

En la actualidad, las microalgas han adquirido gran importancia, debido a los múltiples usos y aplicaciones en los diferentes campos de la investigación ³, esta especie de microalga es de interés biotecnológico, gracias a la capacidad de producir carotenoides, estos pueden actuar como pigmentos para la absorción de la luz y desempeñan un papel foto protector esencial al apagar las moléculas de clorofila en estado de triplete y eliminar el oxígeno tóxico ⁴, otro carotenoide producido es la astaxantina, esta constituye la parte principal de los carotenoides secundarios y se acumula principalmente en forma esterificada en las vesículas lipídicas extraplastídicas ⁵, como forma de protección del sistema fotosintético frente a condiciones ambientales y nutricionales desfavorables. Este caroteno secundario es usado en el ámbito industrial como colorante y aditivo en alimentos para pigmentación animal ⁶, a nivel farmacéutico presenta beneficios antioxidantes, antiinflamatorios, anti

cancerígeno y foto protector, en donde se han observado resultados frente a enfermedades renales, cardiovasculares y fortalecimiento de la respuesta inmune del organismo ⁷

El trabajo de investigación buscó aumentar la producción natural de astaxantina en un cultivo de *H. pluvialis* en los medios RM y Bold basal médium (BBM) los cuales se seleccionaron con base en el estudio realizado por el grupo de Biotecnología y bioprocesos “Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*” en el que se determinó la efectividad del crecimiento celular y la producción de astaxantina; además se usaron como factores de estrés, diferentes tipos de luz (azul y roja), se modificó la concentración de nitrógeno; se utilizó Nitrógeno al 4.0%, con base en el estudio “Efecto de estrés producido por la deficiencia de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de astaxantina y la expresión de genes relacionados con la misma en cultivo de *Haematococcus pluvialis*” en el que se demostró que al disminuir la concentración de nitrógeno hasta éste nivel se logra aumentar la producción de astaxantina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés combinado producido por la variación en el color de luz y Nitrógeno al 4.0% sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en *H. pluvialis*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la relación entre el efecto del estrés producido por la variación de color de luz y la concentración final de astaxantina en *H. pluvialis*.
- Establecer la relación entre el efecto del estrés producido por la variación de color de luz y concentración de Nitrógeno de 4.0%, en la concentración final de astaxantina en *H. pluvialis*.
- Establecer el efecto de estrés producido por el cambio del color de luz y la deficiencia de Nitrógeno sobre la expresión de los genes de la ruta metabólica de la astaxantina.

1. ANTECEDENTES

H. pluvialis es una microalga unicelular que tiene una pared celular compuesta por celulosa, posee dos flagelos apicales que penetran la pared celular, esta es capaz de producir diferentes carotenoides como la astaxantina y clorofila a y b; *H. pluvialis* es la mejor fuente de astaxantina natural conocida como "el rey de los antioxidantes" ⁸. La astaxantina tiene como función la protección del microorganismo en diferentes condiciones de estrés ⁹ producido en la microalga se observa en el cambio morfológico de ésta, desde un estado vegetativo verde en el que se da el crecimiento, hasta un estado rojo de alta acumulación de astaxantina, que se genera por la falta de nutrientes esenciales, cambios de la irradiación, la salinidad del medio y las altas temperaturas, entre otros ⁷

Esta microalga es uno de las mejores productoras del carotenoide rojo, ya que cuenta con la capacidad de acumular más del 3.0% del pigmento; uno de los efectos más importantes de los carotenoides, es que cuentan con una alta afinidad secuestradora de radicales tóxicos de oxígeno, los cuales resultan principalmente de la peroxidación de lípidos y del gasto respiratorio de los fagocitos, esta propiedad hace que la astaxantina reciba el nombre de "súper vitamina" ^{10 11}. La astaxantina es un pigmento que se produce de forma natural en *H. pluvialis*, y se encuentra en la naturaleza en plantas y a nivel microbiano ¹², cabe resaltar sus múltiples aplicaciones e importancia para diversos sectores entre ellos, ornitología, acuicultura, industria nutracéutica, cosmética, alimentaria, desempeñando funciones en la fisiología y salud de diferentes

especies, además de ello brinda propiedades antioxidantes siendo 550 veces más potente que la vitamina E, y 11 veces más que el β - caroteno, cuenta con propiedades anti cancerígenas, anti inflamatorias, foto protector de los rayos UV retardando el eritema y la inflamación ^{13, 14} . Se han realizado estudios los cuales evidencian el uso de la astaxantina como antidiabético, disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, como protector renal previniendo la nefropatía diabética, fortalece el sistema inmune, reduce el peso del hígado, los triglicéridos en plasma y el colesterol total ¹⁵ , degeneración macular y manejo del cáncer ^{16 17 18} y como posible agente preventivo de la úlcera ¹⁹

En cuanto a la extracción y cuantificación de la astaxantina producida por *H. pluvialis* se han investigado diferentes procesos entre los que se encuentran: Extracción con solvente, es una técnica en la que se utiliza el éter de petróleo y una pequeña porción de muestra que posteriormente se centrifuga, el sobrenadante se lleva a recuperación para obtener el extracto ¹ . La extracción con enzimas líticas; el procedimiento se realiza con acetona por 24 horas para extraer la clorofila, posteriormente se usa una serie de enzimas líticas comerciales, se centrifuga y se lava con agua, de esta manera se obtiene astaxantina que luego se cuantifica por medio de espectrofotometría ¹ La extracción por Soxhlet, es una técnica que utiliza la acetona como solvente durante 6 horas para lograr una condensación del pigmento; en la actualidad se busca el uso de tecnologías modernas que permitan una mayor obtención de astaxantina, así como factores de estrés que permitan mayor producción de la misma, por parte de *H. pluvialis*.

En años anteriores **R. Sarada. (2002)** analizaron la influencia del estrés sobre *H. pluvialis* bajo diferentes concentraciones de NaCl, además de la observación de la cantidad del carotenoide acumulado donde analizaron que los cultivos más frescos eran capaces de almacenar mayor cantidad de astaxantina; así mismo, los cultivos fueron colocados en nitrato de calcio como fuente de nitrógeno donde mostraron un contenido de astaxantina mayor comparado con otras fuentes de nitrógeno ¹³ Daniel R. 2002 analizó en 5 medios de cultivo de *H. pluvialis* los cuales fueron sometidos a cantidades de NaCl superior al 0,0025% donde logró concluir que aumentaba la producción de astaxantina a medida que las concentraciones de NaCl (0.5, 0,25, 1.0, 2.0%), aumentaban en los diferentes medios de cultivo ¹³

Katsuda et al. (2004) estudiaron el efecto de diferentes longitudes de onda, (625, 525, 470, 410, 380 nm) a diferentes intensidades de luz sobre el crecimiento celular y la acumulación de astaxantina en cultivo de *H. pluvialis*, utilizaron lámparas de LEDs, los resultados obtenidos demostraron que utilizar luz roja (625 nm) en el cultivo permitió aumentar la densidad celular, mientras que la luz azul (380-470 nm) indujo un cambio morfológico en la célula y mejoró la acumulación de astaxantina ²⁰

Domínguez A. (2004) realizó la determinación de factores de estrés que permitieran generar una mayor de producción de carotenoides, tuvo en cuenta factores de estrés como la cantidad de nitrógeno, fósforo, concentración de

NaCl y algunos factores ambientales como cambios de temperatura, irradianza y aireación; se obtuvo como resultados una mayor cantidad de astaxantina con los factores de estrés de nitrógeno, NaCl e irradianza y un total de 3.5×10^5 células / mL en medio BBM ²¹

Lavabo Pour et al. (2005) en su estudio evaluó el efecto del método de alimentación (fed - batch) e iluminación con luz azul (LEDs) en la producción de astaxantina en cultivo de *H. pluvialis*, con ello se pudo analizar, que la adición de nutrientes por el método fed-batch mantuvo la actividad fisiológica de las células, y el cambio de luz de roja a azul aceleró la acumulación de astaxantina; por otra parte, los pH superiores a 9.5 suprimen la síntesis de carotenoides; así mismo, compararon el resultado con un estudio realizado previamente donde se utilizó el método de reemplazo de medio y el rendimiento obtenido es superior al reportado, por lo que se concluyó que el método de alimentación fed-batch, luz azul y no ajuste de pH son parámetros efectivos para la producción de astaxantina en foto biorreactores ²²

Morales H. (2013) en su estudio usaron foto biorreactores de doble región, con el objetivo de simplificar el proceso de producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* en dos etapas de acuerdo con el diseño experimental, las condiciones de estrés fueron intensidad alta de luz y deficiencia de nitrógeno, se observó que la máxima acumulación de astaxantina fue de 357 mg/mL en la región exterior del foto biorreactor, y la concentración celular en la región interior fue

de 4.0×10^5 cel./mL, los resultados demostraron que el diseño del foto biorreactor de doble región estimulo la producción total de astaxantina en un porcentaje de 5.79% con base al peso seco de la microalga. El estudio indico que el foto biorreactor de doble región, junto con los factores de estrés como altas intensidades de luz y deficiencia de nitrógeno, poseen buen potencial para la producción comercial de astaxantina por *H. pluvialis*, alcanzando una alta densidad celular y concentración de astaxantina²³

Vidhyavathi R. (2008) realizó su investigación sobre el efecto del estrés con alta intensidad de luz, como resultado se obtuvo un aumento en la producción en general de carotenoides, también buscó la relación con la expresión de genes carotenogicos licopeno β -ciclase (LCY) β -caroteno Hidroxilase (CHY), fitoeno desaturase (PDS), β -caroteno ketolase (BKT) y fitoeno sintetase (PSY) en *H. pluvialis* relacionando el cambio de la irradianza con el aumento de la producción de astaxantina y clorofila, las transcripciones de los genes PSY, PDS, LCY, BKT y CHY se detectaron en todas las etapas de inducción de estrés, la alta intensidad de luz indujo la expresión de genes biosintéticos de astaxantina, BKT y CHY en mayor cantidad²⁴

Imamoglu E, (2009) en su investigación estudiaron el efecto de diferentes factores de estrés por déficit nutricionales en medio de cultivo RM durante 14 días; usó medio RM (libre de N), medio RM (libre de P), medio RM (libre de N y P) y agua destilada con la adición continua de CO₂, el estrés con luz se dio mediante iluminación proporcionada por lámparas fluorescentes de 18W,

colocadas de dos a tres lámparas, desde cada lado de los matraces para alcanzar intensidades de luz más altas ($445 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $546 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en el estudio se concluyó que el agua destilada con la adición de CO_2 generó una rápida acumulación de astaxantina, y la intensidad de luz ($546 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron las condiciones óptimas para la mayor producción del pigmento por parte de *H. pluvialis*²⁵

En el estudio de **Camacho J et al. (2013)** se realizó una revisión sobre los factores de estrés nutritivos, de intensidad lumínica, estrés oxidativo y de alta salinidad, demostró que la actividad de producción de carotenoides, está regulada por factores como pH, intensidad lumínica, concentraciones de nutrientes y presencia de inhibidores de procesos metabólicos, que afectan la ruta e síntesis de los diferentes carotenos que el microorganismo es capaz de producir en condiciones ambientalmente favorables¹²

Espinaco B (2016) realizó un estudio en el cual usó una intensidad inicial de luz ($70 \mu\text{mol fotón.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), tres tipos de concentración de Nitrógeno en los medios de cultivo: una concentración normal del medio, una al doble y la otra al triple, se tomó como referencia el medio de concentración normal (25mg) y una vez consumida la fuente de nitrógeno de dicho medio, se procedió a iniciar el estrés en todos los cultivos trasladándose a una cámara de crecimiento con alta intensidad de luz ($110 \mu\text{mol fotón.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); en éste estudio se llegó a la conclusión, que la mayor acumulación de astaxantina se daba en

cultivos sometidos a estrés por luz, cuando la microalga se consumió el nitrógeno del medio, debido a que las microalgas al carecer de Nitrógeno aumentan la sensibilidad de las células al exceso de luz y comienza a sintetizar el pigmento en forma más rápida y se acumula en mayor porcentaje, por la limitación de éste nutriente favorece el cambio de las membranas fotosintéticas alterando el funcionamiento de los sistemas que participan en la fotosíntesis; ya que la molécula de astaxantina actúa protegiendo a las células frente al daño oxidativo generado ante condiciones adversas como altas intensidades de luz

26

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Haematococcus pluvialis

2.1.1 Descripción

Las algas verdes presentan características especiales, que las diferencian de otras algas, como la composición de los polisacáridos que producen los cuales se encuentran en forma de gránulos ubicados alrededor del pirenoide, o dispersos en el estroma del cloroplasto, muchas de éstas viven sumergidas y pueden encontrar de forma aislada o agrupados en colonias, producen pigmentos como clorofila, xantofila, luteína y zeaxantina, los cuales son producidos en los cloroplastos; *H. pluvialis* es una microalga también conocida como *H. iacustris* o *Sphaerella iacustris*, de color verde, unicelular y su hábitat se encuentra en aguas dulces; taxonómicamente pertenece al Phylum Chlorophyta, que incluye a todas las algas que contienen pigmentos fotosintéticos clorofila a y b y en su ciclo biológico poseen estadios flagelados de esporas o gametos; del orden Volvocales, familia *Haematococcaceae*, género *Haematococcus* y de especie *pluvialis*^{27, 28}. (**Tabla1**).

Tabla 1. Clasificación taxonómica *H. pluvialis*

REINO	<i>Viridiplantae</i>
PHYLLIUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GÉNERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>Pluvialis</i>

Fuente: Martínez. A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPYTA: VOLVOCABLES) cultivada en diferentes medios. (Tesis). México: Instituto politécnico nacional; 2010 ²⁷

2.1.2 Morfología, estructura y fisiología

La microalga tiene una forma elipsoide, biflagelada y móvil en su estado vegetativo. Posee 3 morfologías características como respuesta a los estímulos del medio, estas son vegetativa (verde con presencia de flagelos), palmella (verde, esférica sin flagelos) y aplanóspora (roja, esférica sin flagelos), esta tiene como función ser una estructura de resistencia a las condiciones de estrés que se presenten en el medio; en este estadio es donde se produce la astaxantina como respuesta a factores de estrés ¹ La microalga es capaz de revertir el proceso retornando a la configuración vegetativa convirtiéndose estas características en cíclicas **Figura 1** . *H. pluvialis*, forma quistes que acumulan grandes cantidades de astaxantina en su citoplasma, los cuales generan una coloración rojiza de la célula, por lo tanto, las células comienzan a acumular masivamente astaxantina, notándose inicialmente la deposición del

pigmento alrededor del núcleo, y continuando radialmente hasta que todo el protoplasto en de color rojo⁶

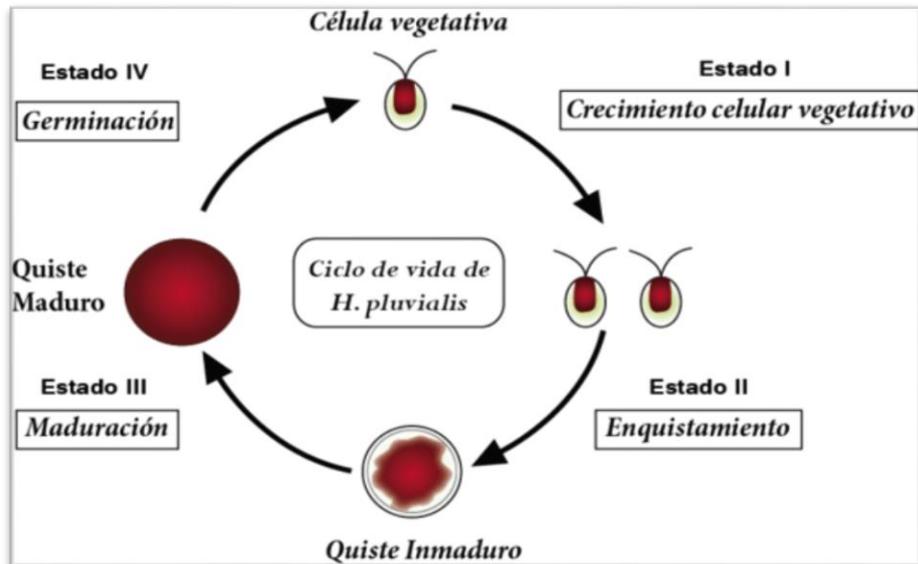


Figura 1 ciclo de vida *H. pluvialis* Fuente <http://www.astaxanthin.pe/produccion/>

2.1.3 Composición química

La composición general de esta microalga (**Tabla 2**) consiste sustancias de alto valor biológico, tales como ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, antioxidantes, vitaminas y minerales. Por otro lado, recientes estudios indican que las microalgas podrían ser usadas para producir biodiesel e hidrógeno, Por un lado, contienen pigmentos útiles tales como clorofilas y carotenoides.²⁹

Tabla 2 Compuestos comunes de *H. pluvialis*.

COMPUESTOS	MINIMO	MAXIMO
PROTEINAS (%)	17.30	27.16
CARBOHIDRATOS (%)	36.9	40.0

GRASAS (%)	7.14	21.22
HIERRO (%)	0.14	1.0
HUMEDAD (%)	3.0	9.0
MAGNESIO (%)	0.85	1.4
CALCIO (%)	0.93	3.3
BIOTINA (mg/lb)	0.108	0.665
ACIDO FOLICO (mg/100 g)	0.936	1.48
NIACINA (mg/lb)	20.2	35.2
ACIDO PANTOTENICO	2.80	10.57
VITAMINA B1 (mg/lb)	<0.050	4.81
VITAMINA B2 (mg/lb)	5.17	9.36
VITAMINA B6 (mg/lb)	0.659	4.5
VITAMINA B12 (mg/lb)	0.381	0.912
VITAMINA BC (mg/lb)	6.42	82.7
VITAMINA BE (IU/lb)	58.4	333
CENIZAS (%)	11.07	24.47

Fuente: Dominguez, Guerrero, I. Martinez, F. Tomasini, A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 2004: 92. 209–214 ²¹

2.1.4 Distribución

H. pluvialis ha sido encontrada inicialmente en Europa, África y Norteamérica, donde ha podido ser aislada a partir de cortezas secas de piedras, acantilados, en los musgos de los estanques y en cuerpos de agua temporales y no temporales; la presencia de esta microalga en estos ambientes se debe a que en ellos pueden presentarse condiciones extremas de luz, concentraciones de

sal y temperatura, en los cuales esta puede sobrevivir debido a su capacidad de enquistarse de forma rápida, ya que mediante su morfología de quistes secos esta microalga pudo distribuirse por medio del viento a muchos ambientes ²

2.1.5 Aplicaciones

La microalga *H. pluvialis*, es un microorganismo que tiene una gran cantidad de astaxantina, es el porcentaje más alto en comparación a bacterias, hongos u otras microalgas; los beneficios antioxidantes de este compuesto, han sido de gran interés para su producción y su comercialización, para el consumo humano en forma de ingrediente en suplementos dietéticos, a nivel de la acuicultura se ha demostrado un gran interés, debido a su uso como colorante rojizo en la carne de salmón cultivado ⁴.

2.2 Medios de Cultivo

La microalga *H. pluvialis* presenta un grave problema de cultivo debido a la disminución del índice de crecimiento en éstos, por esta razón se ha buscado un medio óptimo entre producción de biomasa y producción de pigmentos, como clorofila y astaxantina principalmente.

En la última década se ha logrado avanzar en la utilización de medios para el cultivo de microalga y la producción de los pigmentos; entre los que están: BBM, RM, M1, F1, HONG KONG, OHM, BRISTOL suplementado entre otros ²⁷.

Los medios de cultivo utilizados para este estudio fueron el BBM y RM, que fueron elegidos con base en el estudio del grupo de Biotecnología y

bioprocesos “Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*” en el que se determinó como óptimos éstos medios de cultivo ya que en éstos la microalga presentó mayor efectividad del crecimiento celular y producción de astaxantina.³⁵

2.2.1 BBM - nitrógeno al 4.0%, factor de estrés lumínico (luz roja y azul)

El BBM es un medio para el cultivo de microalgas como *H. pluvialis*, se han obtenido buenos resultados en la tasa de crecimiento de este microorganismo, debido a la composición de macronutrientes y micronutrientes como fósforo, nitrógeno, magnesio, cobalto, cloro, hierro entre otras sales; además con vitaminas como la tiamina y la biotina³⁰. Para generar estrés a la microalga, se adecuó el medio BBM con una concentración de nitrógeno del 4.0% y variación de color con la utilización de luz, azul y roja como factor adicional de estrés y luz blanca como control negativo.

2.2.2 RM - nitrógeno al 4.0%, factor de estrés lumínico (luz roja y azul)

El RM es un medio de cultivo óptimo para el cultivo de la microalga ya que se ha observado una mayor tasa de crecimiento en menor tiempo (en aproximadamente 10 días) en comparación con otros medios de cultivo como el BBM, OHM, M1, F1, HONG KONG etc³⁰; éste medio de cultivo no posee ningún suplemento, y es muy utilizado en la producción de *H. pluvialis* debido a su bajo costo, como factor de estrés adicional se modificó la concentración de nitrógeno ajustándola a 4.0% y variación del color de la luz con la utilización de luz roja y azul como factor de estrés adicional y luz blanca como control .

2.3 Factores de estrés en *H. pluvialis*.

2.3.1 Factores ambientales de estrés

El *H. pluvialis* durante la fase de crecimiento presenta una morfología vegetativa verde en la cual se incrementa el número de células, durante la fase de estrés se generan células con quistes rojos que se forman por la que acumulación de astaxantina, que se sintetiza en condiciones ambientales que provocan estrés, como la temperatura alta, deficiencia de nutrientes (nitrato, magnesio, sulfato y fosfato), alta intensidad de luz, alta salinidad y estrés oxidativo ^{12,31}.

Estudios realizados con la microalga sugieren, que el principal factor inductor de la síntesis de astaxantina podría ser el estrés oxidativo en comparación con la luz, ya que se ha demostrado que la adición de sustancias generadoras de radicales libres y especies de oxígeno activas a los medios de cultivo potencian la formación de astaxantina ⁶.

En la actualidad, se han utilizado potenciadores de la acumulación de astaxantina mediante factores de estrés como la limitación de nitrógeno y altas intensidades luminosas, como principales factores de estrés con los cuales se han visto resultados favorables lo que conlleva a deducir, que el fitoplancton parece ser más sensible al exceso de luz visible bajo condiciones de limitación de nutrientes, ya que bajas reservas celulares de nitrógeno reducen la tasa de renovación de la proteína Qb (quinona aceptora de electrones del PS II) lo que incrementa la susceptibilidad de la foto inhibición celular ^{6,32}.

2.3.2 La luz como forma de producción de Astaxantina.

La luz es uno de los factores de estrés más eficaces, ya que por estudios realizados se ha demostrado que a una intensidad de luz de ($85 \text{ mmol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el contenido de astaxantina en células y el crecimiento logarítmico permanece casi constante, mientras que en cultivos expuestos a intensidades de luz ($170 \text{ mmol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) la astaxantina se acumula masivamente en la micro alga, con lo que se concluye que la intensidad de luz y la iluminación continua, es más efectiva en la biosíntesis de carotenoides.² Cifuentes (2003) argumentó que la luz es el mejor factor inductivo caroteno génico³³

Los sistemas de cultivos de microalgas pueden ser iluminados por luz artificial, luz solar o ambas. Entre los sistemas de cultivo de algas con iluminación natural con grandes áreas de iluminación se encuentran los estanques abiertos, los llamados platos planos o flat plates, los airlift tubulares o de tipo serpentin y los de tipo inclinado, entre otros³⁴

2.3.3. Estrés de *H. pluvialis* con distintos tipos de luz.

En estudios realizados con *H. pluvialis* en el aumento de la producción de astaxantina con factores de estrés, se ha sometido a la microalga a distintas intensidades de la luz en diferentes longitudes de onda, (625, 525, 470, 410, 380 nm) durante la fase de crecimiento celular y acumulación de astaxantina, el ensayo se realizó mediante irradiación con luz proveniente de lámparas de LEDs (diodos emisores de luz) de color azul y rojo, los cuales tienen como característica una emisión espectral estrecha²¹ En los resultados obtenidos en

el estudio de Katsuda et al 2004, demostraron que utilizar luz roja (625 nm) en el cultivo, permitió aumentar la densidad celular, mientras que usar luz azul (380-470 nm) indujo un cambio morfológico en la célula y mejoró la acumulación de astaxantina, mostrando así una foto taxis preferencial hacia la luz azul ⁶ El método de cuantificación del pigmento fue realizado por cromatografía líquida de alta eficiencia.

2.4 Astaxantina

La astaxantina es considerada el antioxidante del siglo XXI, es un carotenoide secundario de color rojo producido por diferentes tipos de microalgas como el *H. pluvialis* que es la base de la alimentación de animales marinos como el salmón, los crustáceos, las langostas y los camarones, que almacenan el pigmento en la piel y tejido graso lo que les da la tonalidad rojo-rosado de la carne, este pigmento es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria por sus propiedades antioxidantes, la capacidad anti inflamatoria, y como prevención de enfermedades cardiovasculares y estimulación del sistema inmune ¹⁴.

2.4.1. Química de la Astaxantina

La molécula de astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β , β -caroteno), está compuesta por dos carbonos asimétricos estos se encuentran localizados en las posiciones 3 y 3' sobre los dos anillos bencénicos al final de la molécula, se identifica por estar formada de una cadena de once enlaces conjugados, responsables del intenso color rojo brillante del cromóforo y presenta un anillo cíclico en cada extremo de la molécula (**Figura2**), la presencia de radicales

conversión de β -caroteno en astaxantina en *H. pluvialis* se lleva a cabo mediante dos enzimas, β -caroteno cetolasa y carotenoide hidroxilasa ³⁶

(Figura 3).

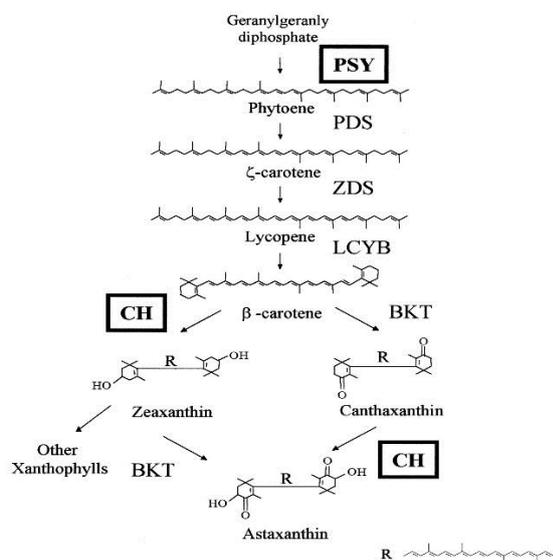


Figura 3 Ruta de síntesis de astaxantina en la microalga *H. pluvialis*

Fuente: Ramírez. M. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. (Tesis de grado Magister). Bogotá. Universidad Nacional de Colombia .2013.⁷

2.4.3 Usos en la industria de la Astaxantina.

El pigmento carotenoide astaxantina tiene importantes aplicaciones en las industrias nutracéutica ³⁷, como ingrediente de formulaciones cosméticas, médicas y dietéticas ^{38 39}, algunos de los usos de la misma se encuentran en la siguiente **tabla 4**.

Tabla 4 Principales aplicaciones de la Astaxantina.

SECTOR	APLICACION	FUNCION	FUENTE
	Salmon y Trucha	Pigmentación	(Domínguez

Acuicultura		Etapas de crecimiento	et.al.,2005; Lawlor & O'Brien, 1995; Lorenz & Cysewski, 2000)
	Peces Marinos -Besugo	Pigmentación	
	Peces Ornamentales	Pigmentación	
	Cultivos de Camarón	Pigmentación	
Ornitología	Gallinas	Color de yema de los huevos	(Inboorr, 1998)
	Pollos	Pigmentación	
Farmacéutica	Radicales libres	Antioxidante	(Barros et.al.,2001; Guerin et al., 2008; Mortensen et al., 1997; Naguib, 2000; Pashkow et al; 2008)
	Peroxidación	Antioxidante	
	Salud Humana	Anti-cancerígeno	
	Piel, ADN y Retinas	Foto-protector	

Fuente: Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. (Ing. Químico), Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013: 73-82⁷

2.5 Medición de Astaxantina

2.5.1. Genes que intervienen en la ruta metabólica para la producción de astaxantina en *H. pluvialis*

Gen PSY: Se encarga de la codificación de la enzima fitoeno sintasa que realiza la condensación de cabeza a cabeza del geranil-geranil difosfato para formar fitoeno⁴⁰.

Gen PDS y ZDS: Codifica para la producción de las enzimas fitoeno desaturasa y ζ-caroteno desaturasa. Su función es alargar las cadenas conjugadas para formar carbonos dobles y producir fitoflueno, posteriormente formar el cromógeno que le da el color característico de los β-carotenoides formando licopeno.⁵

Gen LCYB: Realiza la expresión del β -licopeno ciclasa que tiene la función de formar una reacción de ciclación con el licopeno, realizando una canalización bicíclica y formando un β -caroteno con dos anillos que puede dar origen a distintos compuestos³⁵

Gen BKT y CHY: Codifican específicamente para la β -caroteno cetolasa y carotenoide hidroxilasa, estas se encargan de realizar la fase final para la producción de la molécula de astaxantina oxidando el β -caroteno a echinenone, posteriormente la enzima β -caroteno cetolasa nuevamente transforma el echinenone en cantaxantina y por último la enzima carotenoide hidroxilasa añade grupos hidroxilo a la molécula de cantaxantina en cada lado formando la astaxantina^{24, 40}.

2.6. Clorofila

La clorofila es el pigmento verde que permite a las plantas transformar la luz solar en energía química y compuestos orgánicos durante la fotosíntesis⁴¹, se pueden encontrar 4 tipos de clorofila, a, b, c y d; en la microalga se encuentra presente la clorofila a compuesto de mayor presencia en los organismos fotosintéticos⁴², en plantas la clorofila b, en diatomeas y algas pardas clorofila c, y finalmente en las algas rojas la clorofila d, en *H. pluvialis* la clorofila se encuentra presente cuando esta cuenta con condiciones favorables para su formación, entre ellas se encuentra la concentración de nutrientes, salinidad, iluminación y temperatura adecuadas entre otras; al presentarse un cambio en las condiciones, la microalga se enquistada como mecanismo de defensa y producirá un carotenoide secundario denominado astaxantina^{27, 35}

2.7 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR permite generar una gran cantidad de copias de fragmentos de DNA, para que la reacción se lleve a cabo es necesario disponer de una enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde; una DNA polimerasa, las enzimas DNA polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' cadena de DNA. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 pares de bases) de DNA de cadena sencilla (cebadores o primers de la reacción). Nucleótidos libres; las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).⁴³

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO DE ESTUDIO

En el trabajo de grado se realizó una investigación descriptiva correlacional, que tuvo como variables el cambio de color de luz, (roja y azul como factores de estrés), blanca como (control negativo), y concentración de Nitrógeno al 4.0 %, que fueron aplicados a cada uno de los biorreactores de 0,35 L de capacidad con el fin de evidenciar cuáles factores de estrés contribuyen al aumento de la producción de astaxantina.

3.2 MUESTRA

Para la investigación se tomó un inóculo tomado de la cepa de referencia de *H. pluvialis*, proporcionada por la Facultad de ingeniería de la Universidad de la Sabana, el cual se cultivó en medios BBM y RM, en los que se colocaron los nutrientes necesarios para el crecimiento, y posteriormente se sometieron a factores de estrés: variación de color de luz (blanca, roja y azul) y la concentración del nitrógeno al 4.0%; con el fin de obtener mayor producción de astaxantina e identificar por medio de técnicas moleculares de PCR, los genes que intervienen en la producción.

3.3 VARIABLES

3.3.1 Variables dependientes

- Concentración de astaxantina y clorofila (ug/células).
- Expresión de genes funcionales para la producción de astaxantina.
- Conteo celular.

3.3.2 Variables independientes

Factores de estrés: Concentración de Nitrógeno 4.0%, luz roja y azul.

Medios de cultivo

- Bold's Basal Medium
- Medio RM.

3.4 POBLACIÓN

Se utilizó una cepa de referencia de la microalga *H. pluvialis*, suministrada por la Facultad de ingeniería de la Universidad de la Sabana.

3.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo se realizó a partir de la cepa de referencia, la cual fue transferida a dos Erlenmeyer cada uno con 3,5 L de medio de cultivo: RM y BBM, que tenían un pH de 6.7, los cuales fueron expuestos a fotoperiodos de 18 horas de luz (blanca) y 6 horas de oscuridad, 25 °C de temperatura y suministro de 5% de CO₂ y 95% de aire, con agitación diaria por 21 días.

Tabla 5 A) Composición del medio RM con concentración de Nitrógeno normal.

B) Composición del medio BBM con concentración de Nitrógeno normal

A)

MEDIO RM	CANTIDADES CON NITROGENO NORMAL mg/L para 2Lts
NaNO ₃	600 mg
K ₂ HPO ₄	160 mg
KH ₂ PO ₄	40 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	117 mg
E. D. T. A.	15 mg
NaCl	20 mg
H ₃ BO ₃	0,6 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	3,0 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg
(NH ₄) ₆ MoO ₄ .2H ₂ O	2 mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 mg
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,52 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	34 mg

B)

MEDIO BBM	CANTIDADES CON NITROGENO NORMAL mg/L para 2Lts
NaNO ₃	25 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.500 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	750 mg
K ₂ HPO ₄	750 mg
KH ₂ PO ₄	175 mg
E. D. T. A.	90 mg
KOH	310 mg
NaCl	2,50 mg
H ₃ BO ₃	11,4 mg
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,49 mg
H ₂ SO ₄	0,1 mL
TRACE METAL	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.820 mg
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.440 mg
MoO ₃	710 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.570 mg
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	490 mg

Tabla 2 A) Composición del medio RM con 4.0% de Nitrógeno B) Composición del medio BBM con 4.0% de Nitrógeno

A)

MEDIO RM	CANTIDADES CON 4 % DE NITROGENO mg/L para 3,5 Lts
NaNO ₃	42 mg
K ₂ HPO ₄	280 mg
KH ₂ PO ₄	70 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	35 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	205 mg
E. D. T. A.	26,2
NaCl	70 mg
H ₃ BO ₃	1,05 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	5,25 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,1 mg
(NH ₄) ₆ MoO ₄ .2H ₂ O	1,05 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	5,5 mg
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,7 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	60 mg

B)

MEDIO BBM	CANTIDADES CON 4% NITROGENO mg/L para 3,5 Lts
NaNO ₃	35 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	81,5 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	26,2 mg
K ₂ HPO ₄	26,2 mg
KH ₂ PO ₄	61,2 mg
E. D. T. A.	175 mg
KOH	108,3 mg
NaCl	87,5 mg
H ₃ BO ₃	40 mg
FeSO ₄ *7H ₂ O	11,5 mg
H ₂ SO ₄	3,5 mL
TRACE METAL	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	31 mg
MnCl ₂ *4H ₂ O	5 mg
MoO ₃	2,5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	5,5 mg
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,7 mg

Fuente: Niño Castillo CM, Castillo CMN, Rivera FCR, Díaz LE, Díaz AGL. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*.

3.6 TRATAMIENTO No 1 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ

3.6.1 FASE UNO: Viabilidad y crecimiento celular

Se realizó durante 15 días, teniendo en cuenta las condiciones descritas en la **Figura 4**, durante ésta fase se tomaron muestras cada tercer día, en las que se evaluó el crecimiento de la microalga por microscopía en cámara de Neubauer, y se observaron los siguientes parámetros: color (pigmento), morfología, viabilidad celular y conteo celular.

3.6.2 FASE DOS: Evaluación de estrés mediado por la variación de color de luz azul y roja.

Esta fase se realizó durante 15 días, con las condiciones descritas en la Imagen, posteriormente se evaluó la producción de astaxantina y clorofila mediada por el estrés producido por la variación del color de la luz (roja y azul) y se tomaron muestras cada tercer día, en las que en las que se evaluó el crecimiento de la microalga por microscopía en cámara de Neubauer, y se observaron los siguientes parámetros: color (pigmento), morfología, viabilidad celular , conteo celular y análisis moleculares.

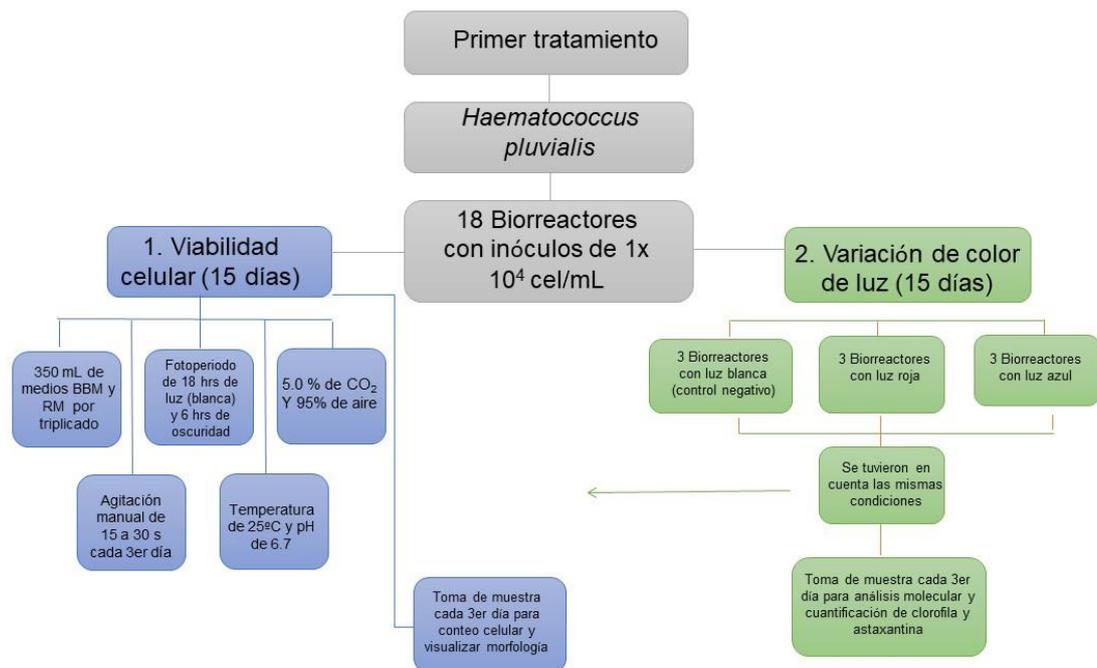


Figura 4 Diseño experimental tratamiento N°1 de estrés.

Fuente: autores del proyecto

3.7 TRATAMIENTO No 2 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ Y NITRÓGENO AL 4.0%

3.7.1 FASE UNO: Viabilidad y crecimiento celular en medios de cultivo con concentración de Nitrógeno al 4.0%

Ésta fase se realizó durante 15 días, teniendo en cuenta el diseño experimental de la **Figura 5**, durante ésta fase se tomaron muestras cada tercer día, en las que se evaluó el crecimiento de la microalga por microscopía en cámara de Neubauer, y se observaron los siguientes parámetros: color (pigmento), morfología, viabilidad celular y conteo celular.

3.7.2 FASE DOS: Evaluación de estrés mediado por la variación de color de luz (azul y roja) y concentración de Nitrógeno al 4.0%

Ésta fase se tomaron muestras cada tercer día, en las que se evaluó el crecimiento de la microalga por microscopía en cámara de Neubauer, y se observaron los siguientes parámetros: color (pigmento), morfología, viabilidad celular, conteo celular y análisis molecular como se indica en la Imagen 2

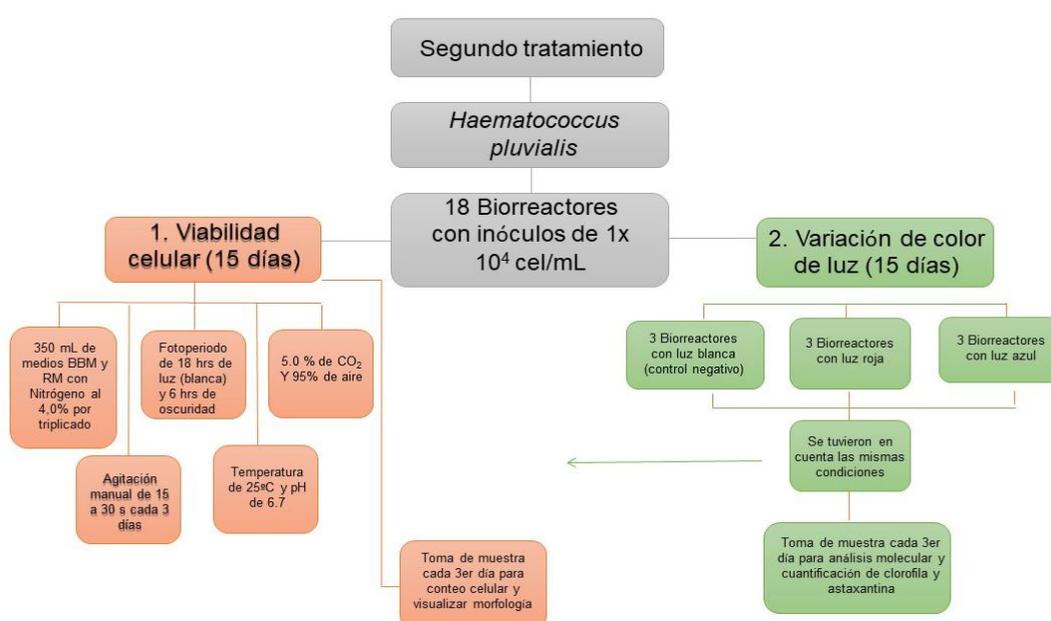


Figura 5 Diseño experimental tratamiento N° 2 de estrés

Fuente: autores del proyecto

3.8 Medición de las concentraciones de Astaxantina y Clorofila por medio de espectrofotometría.

Para el desarrollo de esta fase se realizaron los siguientes procedimientos:

3.8.1 EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA Y CLOROFILA CON METANOL 90%

Para la medición de las concentraciones de Astaxantina y clorofila se realizó la extracción con solvente de los pigmentos por medio de metanol al 90% , con el que se garantiza la obtención de una mayor de concentración de astaxantina; se tomaron 10 mL de cada una de las muestras, y fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante; al paquete celular se le adicionó 1.0 mL de metanol al 90% y se llevaron a 60°C en baño serológico durante 10 min, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min ⁴¹ A continuación, se leyeron las muestras en el espectrofotómetro Jenway a una longitud de onda de 667nm para determinación de clorofila y 477nm para determinación de astaxantina.

3.8.2 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA

Para la cuantificación de astaxantina y clorofila se realizó la curva de calibración (absorbancia y en función de la concentración expresada en µg/mL) con patrones de referencia para clorofila de 0,184 a 0.566 µg/mL, y para astaxantina de 0,311 a 1,266 µg/mL con base en los patrones de 10,20,30,40 ug/mL se hallaron concentraciones.

Concentración µg/mL x volumen muestreado (mL)

Número de células en conteo en cámara (cel/mL) x volumen muestreado (mL)

Formula 1: Formula para hallar µg/cel. de astaxantina

Los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{cel}$ y con base en éstos cálculos se realizaron gráficas para cada tratamiento de luz (roja y azul como factores de estrés y blanca como control negativo) y nitrógeno normal y nitrógeno al 4.0% aplicado a los biorreactores.

3.9 DETERMINACIÓN DE GENES EXPRESADOS EN EL PROCESO DE BIOSÍNTESIS DE LA ASTAXANTINA

3.9.1 Determinación de las muestras para el análisis

Se analizaron 18 muestras las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta las mejores concentraciones expresadas en las gráficas de $\mu\text{g}/\text{cel}$, estas muestras sólo pertenecen a las tomadas cada 3 días en las fases de estrés que se usaron para este estudio.

Las muestras seleccionadas para análisis de expresión de genes fueron:

Tratamiento 1: variación de color de luz

TABLA 6 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz blanca

Medio	día de muestreo	fecha de muestreo
RM	18	06-10-17
	21	09-10-17
BBM	15	03-10-17
	18	06-10-17
	21	09-10-17

TABLA 7 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz Azul

RM	18	06-10-17
BBM	21	09-10-17

TABLA 8 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz Roja

RM	18	06-10-17
BBM	21	09-10-17

Tratamiento 2: Nitrógeno al 4.0% y variación de color de luz

TABLA 9 Muestras seleccionadas para análisis molecular de Luz blanca y nitrógeno 4.0%

- Luz Blanca (control)

Medio	día de muestreo	fecha de muestreo
RM	18	14-11-17
	21	16-11-17
BBM	15	10-11-17
	24	19-11-17

TABLA 10 Muestras seleccionadas para análisis molecular Luz azul y nitrógeno 4.0%

RM	21	16-11-17
BBM	24	19-11-17
	27	22-11-17

TABLA 11 Muestras seleccionadas para análisis molecular Luz Roja y nitrógeno 4.0%

RM	21	16-11-17
BBM	24	19-11-17

3.9.2 OBTENCIÓN DE BIOMASA PARA PCR

Los 10 ml que fueron tomados para el análisis molecular fueron centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm, el sobrenadante fue descartado, y el botón celular fue transferido a tubos de 1,5 mL y llevado a -20°C.

3.9.3 EXTRACCIÓN DE RNA

El β -carotenoide astaxantina principal producto de *H. pluvialis* tiene una vía de síntesis secundaria que se encuentra regulada por genes como Fitoeno sintasa (PSY), β -caroteno Hidroxilasa (CHY), β -caroteno ketolasa (BKT), fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno ciclasa (LCY); estos se encuentran asociados a la degradación, acumulación y producción de β -carotenoides llevando a cabo así la producción de astaxantina. Para ello se realizó el método de extracción con trizol (Invitrogen^(e)), en el cual las muestras se recolectaron en tubos de 1,5 mL y llevadas a una temperatura de -20 °C.

Fueron seleccionadas 18 muestras en total, para la extracción de RNA las cuales recibieron un tratamiento adicional con nitrógeno líquido a -150°C durante un día para una mayor lisis celular y liberación del material intracelular de la microalga, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C , luego se descartó el sobrenadante dejando únicamente el paquete celular al cual se le

adicionó 1.0 mL de trizol con agitación en Vortex hasta el desprendimiento del botón y se llevó a incubación a 20°C durante 5 minutos.

Luego del tiempo de incubación se le adicionaron 200 µL de cloroformo y se homogeneizó en Vortex y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, después de la centrifugación se observaron dos fases: la fase acuosa de la cual se tomó 1.0 mL a un nuevo eppendorf, en la que se adicionaron 500 µL de isopropanol frío y se mezcló suavemente por inversión.

Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante; se adicionaron 1.0 mL de etanol al 75% para lavar el RNA, se mezclaron en el Vortex durante 1-2 segundos; nuevamente se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire, para finalizar el proceso con la adición de 50 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas.

3.9.4 CUANTIFICACIÓN DE RNA

Para determinar la presencia y comprobar la correcta extracción de RNA se realizó cuantificación del mismo usando el kit de Invitrogen Qubit, se tomó en un tubo de 1.5 mL 199 µL de buffer y 1 µL de fluoróforo, luego en un nuevo tubo se tomó 190 µL de esta mezcla y 10µL de la muestra a cuantificar, se llevó al equipo Qubit y se dio lectura, se realizó el mismo procedimiento para las 18 muestras seleccionadas.

3.9.5 CONVERSIÓN DE RNA A CDNA

Se realizó la conversión de las 18 muestras siguiendo el protocolo de la casa comercial Biolab (**Tabla 12, 13 y 14**) que comprende los siguientes pasos:

1. Descongelar muestras y reactivos
2. Mezclar

Tabla 12 Multiplex para un volumen de 8 μ l

Reactivo	Volumen
H ₂ O free	5.0 μ L
dT 23	2.0 μ L
RNA	1.0 μ L

Fuente: autores del proyecto

3. Llevar al Termociclador a 65° C por 5 min
4. Retirar y dejar en hielo por 1 min.
5. Agregar

Tabla 13 multiplex de MuLV

Reactivo	Volumen
M MuLV Reaction Mix	10 μ L
M MuLV Enzyme Mix	2.0 μ L

Fuente: Inserto casa comercial Biolabs

6. Programación en el Termociclador

Tabla 14 Programación de Termociclador para cDNA.

Temperatura	Tiempo
42 ° C	1 hora
80 ° C	5 min

7. Sacar y dejar a -20 ° C.

3.9.6 PCR para Housekeeping

Para comprobar la **correcta síntesis** de cDNA en las muestras analizadas se realiza PCR usando como Primers ITS, con el fin de comprobar y verificar la correcta conversión de RNA a cDNA, Los ITS 1 (inner transcribed spacer) se encuentran entre los genes de rRNA 18S y 5.8S y el ITS 4 son secuencias altamente específicas de tipo universal de ADN encontradas en genes que codifican para el ARN ribosomal.⁴⁴

1. Descongelación de muestras y reactivos
2. preparación de la PCR multiplex con los siguientes volúmenes (**Tabla 15**).

Tabla 15 Volúmenes para PCR multiplex con volumen de 12,5 µl

Reactivo	Volumen
one taq	6,3 µL
ITS 1	1.0 µL
ITS 4	1.0 µL
H2O	1,2 µL
cDNA	3.0 µL

Fuente: autores del Proyecto

Tabla 16 Programación Termociclador para PCR con ITS

1 Paso	94°C	5.0min
2 paso	94°C	30 seg x 30 ciclos
3 paso	59°C	30 seg x 30 ciclos
4 paso	72°C	1 min x 30 ciclos
5 paso	72°C	7 min
6 paso	94°C	∞

3.9.7 ELECTROFORESIS

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras ⁴⁵.

Esta técnica permite separar bastante bien biomoléculas, cuando la cromatografía líquida se muestra menos efectiva, y compuestos de pequeña masa molecular difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos de electro migración en soporte ⁴⁶.

Se preparó el gel de agarosa al 1,5 % (0.4 g), disueltos en 30 mL de TAE (tris, acetato y EDTA) al 1.0 X, se calentó en el microondas de 20 a 40 s hasta homogenizar y se agregó 1.0 μ L de SYBER Green (Invitrogen®), la mezcla fue servida en un soporte y se usaron los peines (8 pozos o 15 pozos) según cantidad de muestras a correr, se dejó de 10 a 15 min aproximadamente hasta su solidificación protegido de la luz para evitar la degradación del fluoróforo (SYBER Green esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente), transcurrido el tiempo se retiraron los peines y se introduce el gel en el tanque de buffer el cual fue sumergido en su totalidad por TAE al 1.0 X, se sirvieron las muestras junto el buffer de carga (Gel loading Dye purple 6X) del laboratorio BioLabs , en una proporción de 6:2 μ L y se sirvió el marcador de peso molecular HyperLadder II (BIOLINE), luego se inició la corrida, conectando el tanque de buffer a la fuente de poder (marca BIORAD) a 100 voltios durante 1 hora, cumplido este tiempo se extrajo el gel para su lectura, la cual se realizó usando el equipo BIORAD con un sistema de documentación de geles Gel Doc XR por luz UV, mediante el programa Quantity One, por medio de este se tomó registro fotográfico para la visualización de las bandas.

3.9.8 PCR CON PRIMERS PARA EXPRESIÓN DE GENES

Se realizó PCR usando los primers para determinar la presencia de los genes importantes en la ruta biosintética de la astaxantina, (fitoeno sintetasa (PSY), β -caroteno Hidroxilasa (CHY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno β -ciclase (LCY), β -caroteno ketolasa (BKT). Se dividieron los Primers en un múltiplex de

dos parejas (PSY y CHY) y un múltiplex de 3 parejas (PDS, BKT y LCY) teniendo en cuenta los pesos moleculares.

Tabla 17 Pesos moleculares de genes buscados en el estudio

Gen	Peso molecular
PSY	402 pb
BKT	423 pb
PDS	462 pb
CHY	521 pb
LCY	565 pb

Para la realización de la PCR se llevaron a cabo los siguientes pasos (**Tabla 18, 19 y 20**):

1. Descongelación de muestras y reactivos
2. Preparación de multiplex con 2 parejas de Primers

Tabla 18 Preparación de multiplex PCR con 2 parejas de primers

Reactivo	Volumen
One Taq	6,3 μ L
PSY forward	1.0 μ L
PSY reverse	1.0 μ L
CHY forward	1.0 μ L
CHY reverse	1.0 μ L
cDNA	3.0 μ L

Fuente: Autores del proyecto

3. Homogeneización de las muestras por 10-15 segundos en la mini centrífuga

TDL 4 marca XINGKE

4. Preparación de multiplex con 3 parejas de Primers

Tabla 19 Preparación de multiplex PCR con 3 parejas de Primers

Reactivo	Volumen
One Taq	7,5 μ L
PDS forward	1.0 μ L
PDS reverse	1.0 μ L
BKT forward	1.0 μ L
BKT reverse	1.0 μ L
LCY forward	1.0 μ L
LCY reverse	1.0 μ L
cDNA	3.0 μ L

Fuente: Autores del proyecto

5. Homogeneización de las muestras por 10-15 segundos en la mini centrífuga

TDL 4 marca XINGKE

6. Programación del Termociclador BIO-LAB

Tabla 20 Programación del Termociclador BIO-LAB.

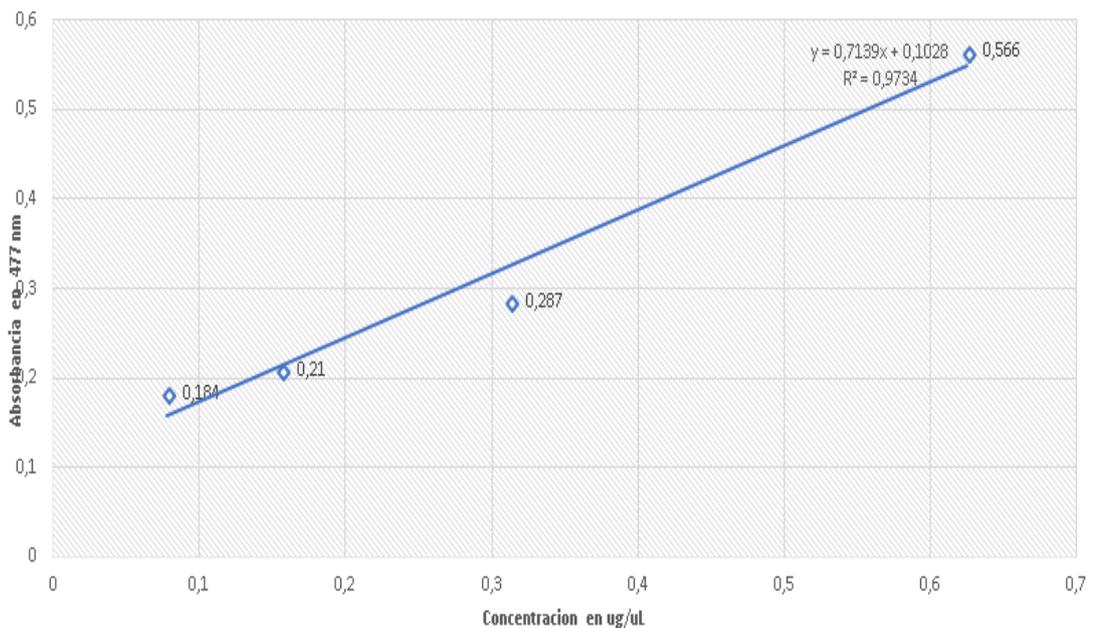
1 Paso	94°C	4.0min
2 Paso	94° C	1.0min x 30 ciclos

3 Paso	58°C	1.0min x 30 ciclos
4 Paso	72°C	1.0min x 30 ciclos
5 Paso	72°C	10 min
6 Paso	94°C	∞

4. RESULTADOS

4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

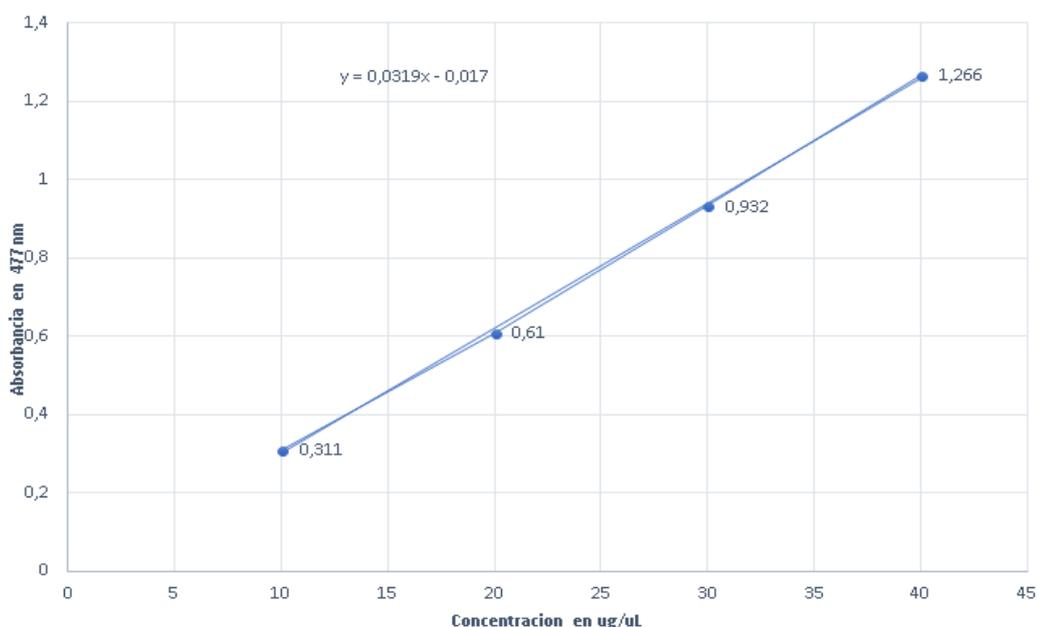
Se realizaron curvas de calibración de clorofila (**Grafica 1**) y astaxantina (**Grafica 2**) como base para determinar las concentraciones de las muestras para clorofila se utilizó un patrón inicial de 125 ug/uL con el que se prepararon patrones con las siguientes concentraciones: 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 ug/uL y se leyeron a 667nm de longitud de onda.



Grafica 1 Curva de calibración de clorofila

Fuente: autores del proyecto

Para la curva de astaxantina se utilizó un patrón de concentración inicial de 4 mg con el que se prepararon patrones de concentración: 10, 20, 30 y 40 ug/uL.



Gráfica 2 Curva de calibración de astaxantina **Fuente:** autores del proyecto

Es importante anotar que en la producción de carotenos por parte del *H. pluvialis* se espera que las concentraciones obtenidas en las muestras analizadas estén relacionadas de manera inversamente proporcional así: mientras la concentración de astaxantina aumenta la concentración de la clorofila disminuye; debido a una respuesta fisiológica y de adaptación de la microalga por un efecto de foto protección del aparato fotosintético.³¹

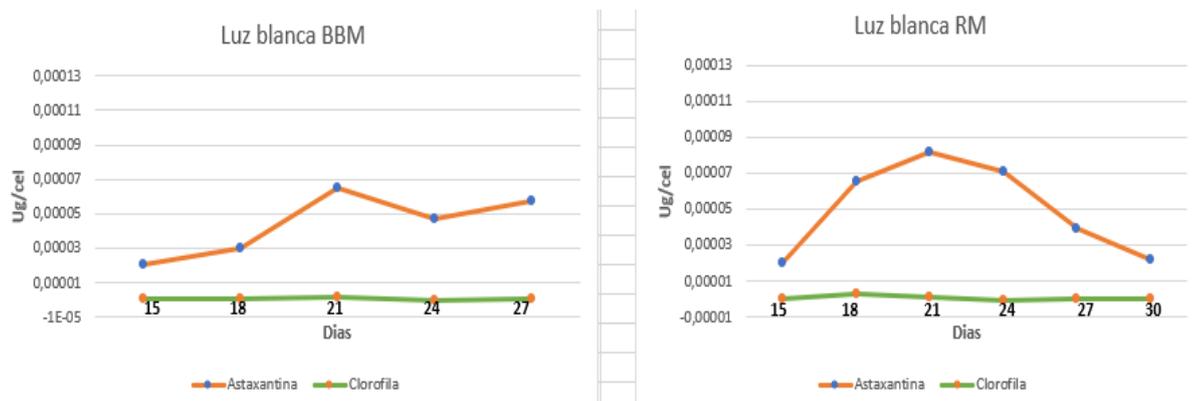
4.2 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ, COMO FACTOR DE ESTRÉS, APLICADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA

En esta fase del ensayo se evaluó la producción de astaxantina por parte de *H. pluvialis*, en medio BBM y RM, con la variación de color: azul y rojo (factor de estrés) y luz blanca como control, este factor de estrés fue suministrado a los 18 birreactores durante 15 días, después de un periodo de crecimiento de 15 días para un total de 30 días desde el inicio hasta la finalización del ensayo.

4.3 CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA POR VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ BLANCA, AZUL Y ROJA.

4.3.1 Biorreactores sometidos a luz blanca (control)

En la Grafica 3 se muestra la producción de clorofila y astaxantina en los medios RM y BBM, representados en $\mu\text{g}/\text{cel}$. vs. día de muestreo.



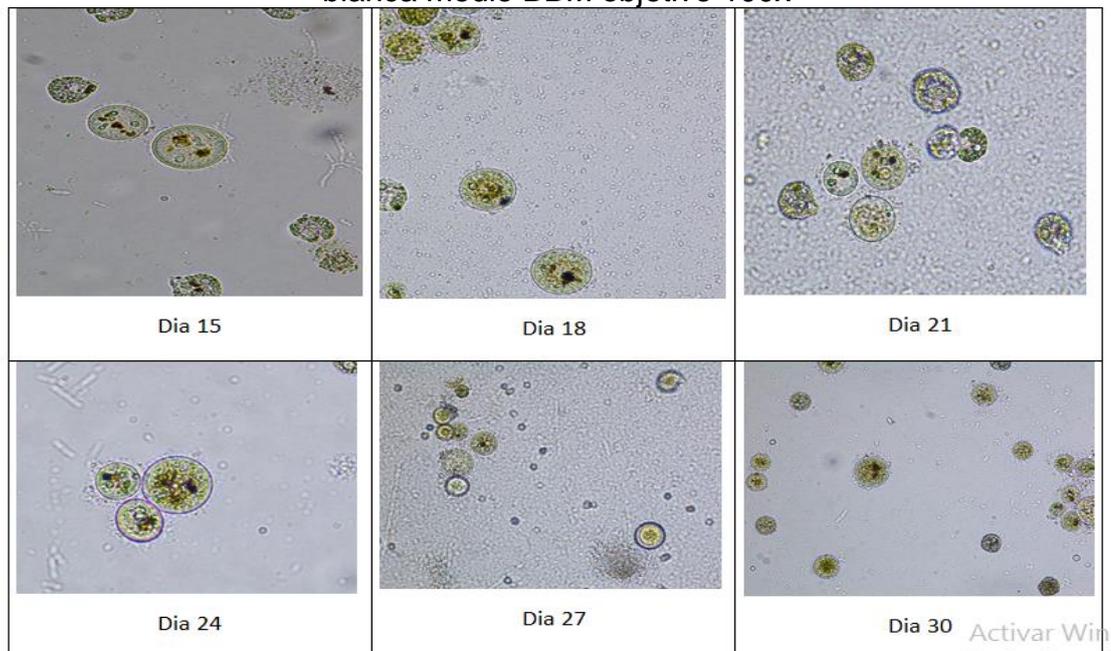
Grafica 3 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con luz blanca (control negativo)-**Fuente:** Autores del proyecto

En esta gráfica se puede observar la producción de los carotenos por parte de la microalga en el medio BBM, durante el crecimiento celular la producción de clorofila se mantuvo constante en las fases de crecimiento y estrés, mientras que la concentración de astaxantina empieza a aumentar en el día 15, teniendo en cuenta que la luz blanca fue el control, se pudo observar que los biorreactores expuestos tuvieron buena producción de astaxantina, debido que a partir del día 18 (muestreo 2- día 18) existe un aumento a una concentración de $3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ frente al primer día de muestreo (muestreo 1- día 15), y se duplica la concentración en el día 21 (muestreo 3- día 21) de $6,7 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, durante los siguientes muestreos día 24 y 27, la producción de astaxantina se disminuye $5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, y se mantiene hasta el muestreo final donde la

cantidad de caroteno solo se aumenta $1 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$. En la **Tabla 21** de evidencia por medio de registro fotográfico.

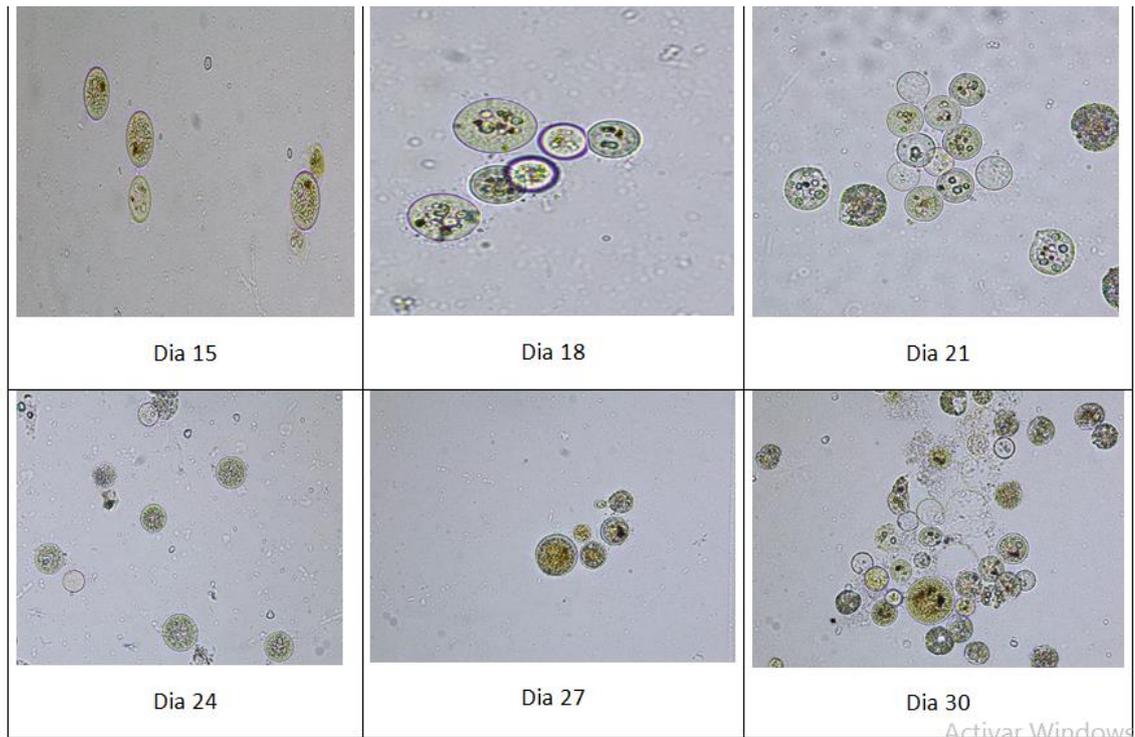
En el medio RM , se observó un pico máximo en la producción de astaxantina en el día 18 (muestreo 3- día 21) de $8,1 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, la cual al pasar los días fue descendiendo hasta una concentración de $2,2 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ (muestreo 5 - día 30) , al final de la fase de estrés la concentración se observa una disminución de la producción del carotenoide con respecto a su concentración inicial ; en cuanto a la producción de clorofila en el medio RM se observó que la concentración se mantuvo baja durante toda la fase de estrés, viéndose afectada por el aumento de la producción de astaxantina. En la Tabla 22 se observa por medio de registro fotográfico.

Tabla 21 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular, con luz blanca medio BBM objetivo 100x



Fuente: Autores del proyecto

Tabla 22 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular, con luz blanca medio RM objetivo 100x



Fuente: Autores del proyecto

4.3.2 Biorreactores sometidos a luz azul (factor de estrés)

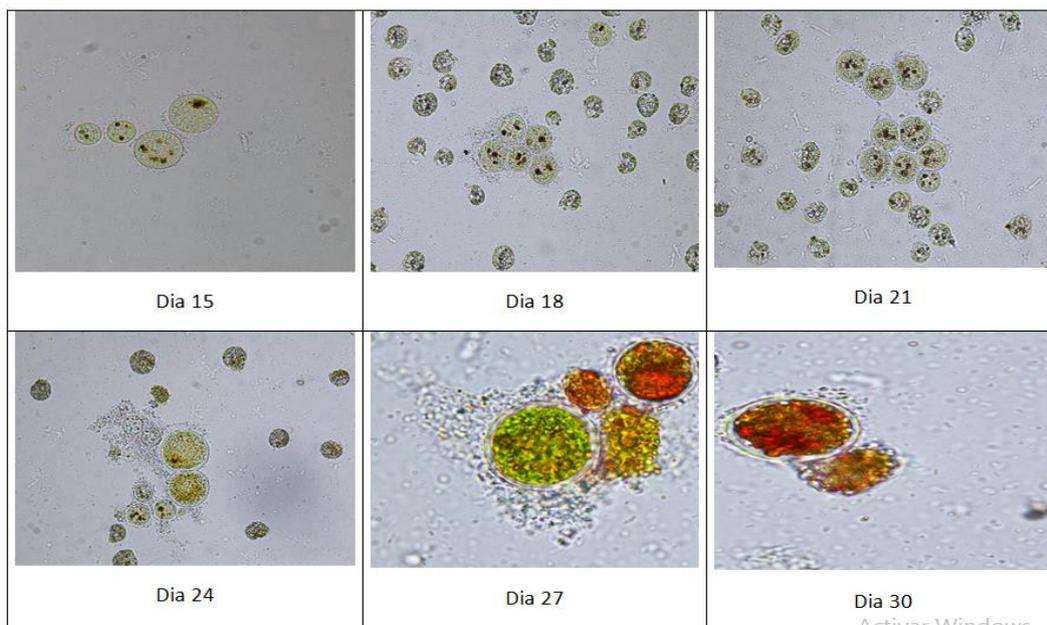
En la Grafica 4 se muestra la producción de clorofila y astaxantina en los medios RM y BBM, usando como factor de estrés luz azul representados en $\mu\text{g}/\text{cel.}$ vs. día de muestreo.



Grafica 4 Producción de clorofila y astaxantina µg/cel medio RM y BBM con luz azul (factor de estrés) - **Fuente:** Autores del proyecto

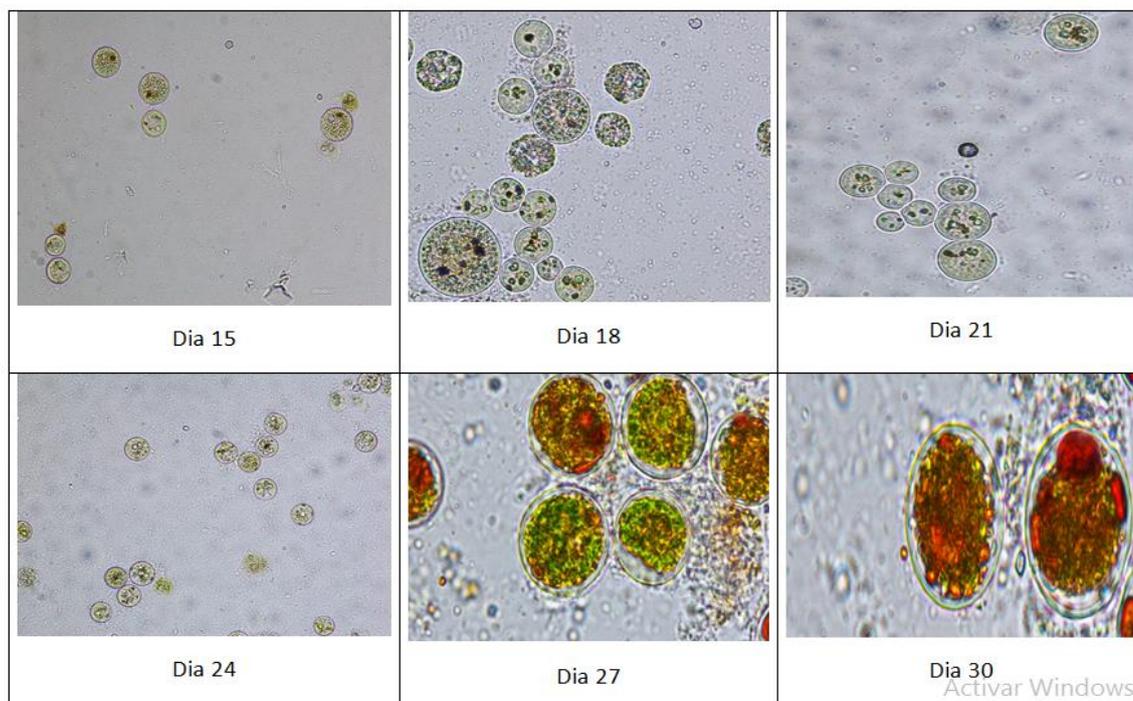
En la gráfica se puede evidenciar que éste tratamiento tuvo menor eficiencia en la producción de carotenoides con respecto al tratamiento de luz roja ya que en el medio RM se observa a partir del día 18 (muestreo 2- día 18) un aumento con una concentración de $5,13 \times 10^{-5}$ µg/cel en el medio BBM se encontró una concentración de $4,39 \times 10^{-5}$ µg/cel mientras que la concentración de clorofila fue disminuyendo progresivamente lo que evidencia la relación inversamente proporcional entre las concentraciones de clorofila y astaxantina, ya que en el medio RM (muestreo 1- día 15) se encontró una concentración de clorofila de $4,27 \times 10^{-7}$ µg/cel y finalizó (muestreo 6 - día 30) con una concentración de $7,79 \times 10^{-8}$ µg/cel mientras que en el medio BBM inició (muestreo 1- día 15) con una concentración de clorofila de $7,64 \times 10^{-7}$ µg/cel y finalizó (muestro 6 - día 30) con $3,33 \times 10^{-8}$ µg/cel. En las Tablas 23 y 24 se encuentran los registros fotográficos microscópicos.

Tabla 23 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio BBM objetivo 100x



Fuente: Autores del proyecto

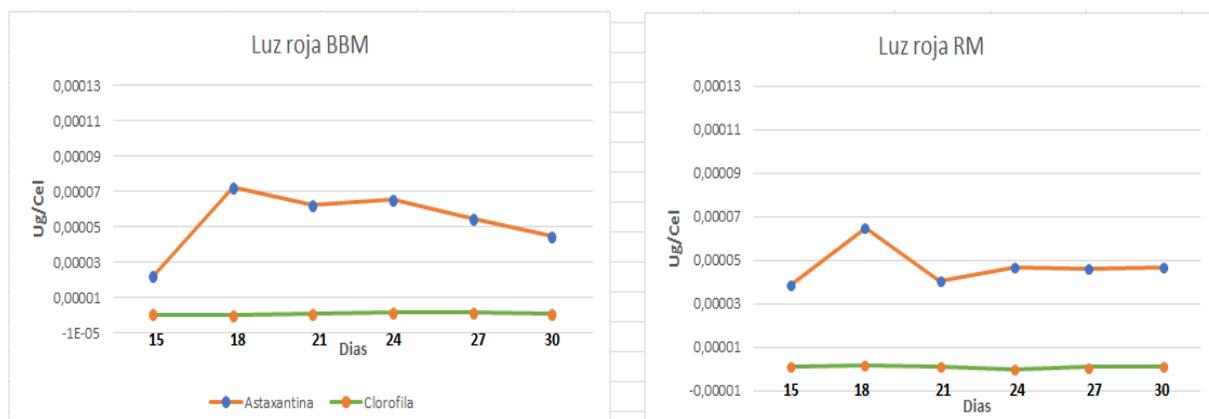
Tabla 24 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio RM objetivo 100x.



Fuente: Autores del proyecto

4.3.3 Biorreactores sometidos a luz roja (factor de estrés)

En la Grafica 5 se muestra la producción de clorofila y astaxantina en los medios RM y BBM, con luz roja como factor de estrés, representados en $\mu\text{g}/\text{cel}$ vs. día de muestreo.

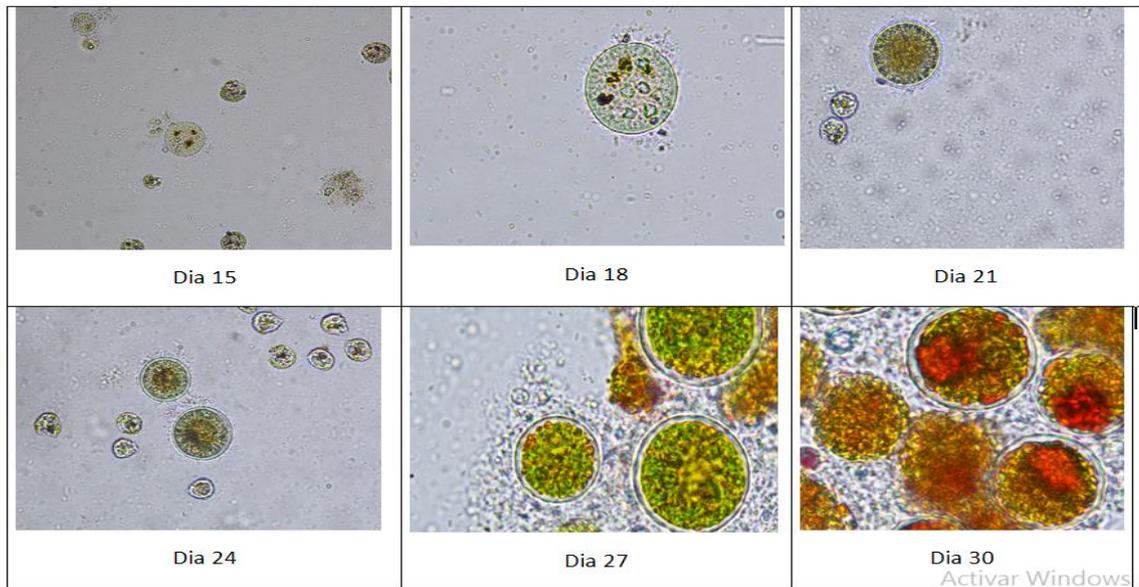


Grafica 5 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ medio RM y BBM con luz Roja (factor de estrés) **Fuente:** Autores del proyecto

En la gráfica de tratamiento con luz roja se evidencia el punto máximo de concentración de astaxantina en el muestreo 2 (día 18) en el medio RM con $6,49 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ y en el medio BBM con una concentración de $7,24 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, lo que muestra un comportamiento constante en los dos medios hasta finalizar el ensayo; en cuanto a la clorofila se observa la disminución progresiva de la producción de este pigmento ya que en el medio RM inició (muestreo 1- día 15) con una concentración de $1,17 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{cel}$ y finalizó (muestreo 6- día 30) con $1,10 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{cel}$; en el medio BBM una concentración inicial de $7,54 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{cel}$, y finalizó con $3,90 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{cel}$. En la **Tabla 25** y **26** se encuentra el registro fotográfico. Al comparar la producción de astaxantina

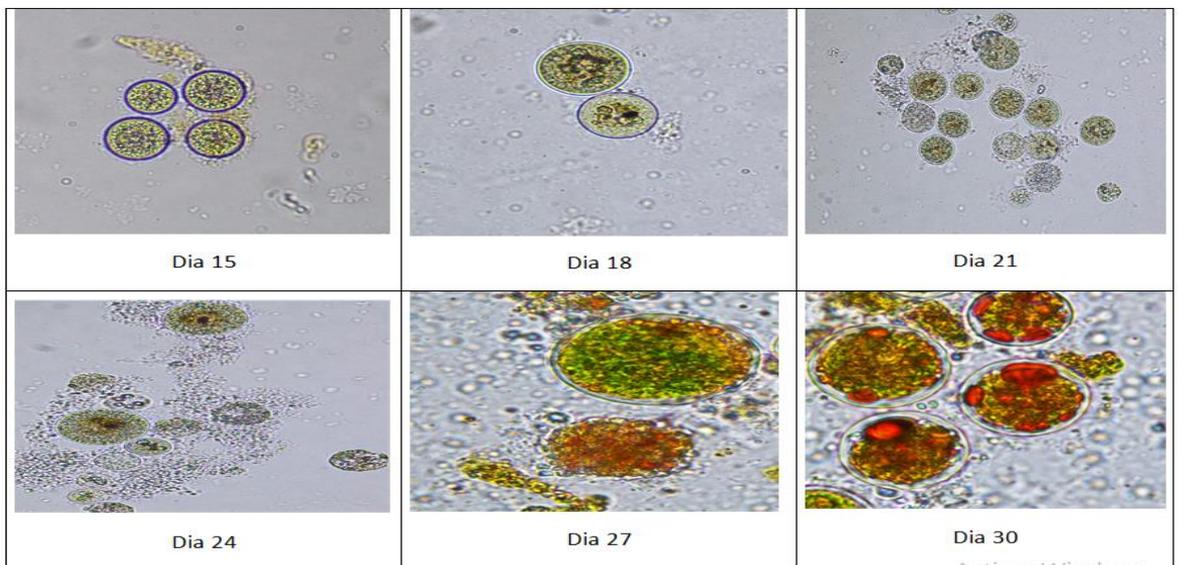
en los dos tratamientos (luz roja y luz azul), se observó que la producción fue mayor en el ensayo con luz roja.

Tabla 25 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio BBM objetivo 100x.



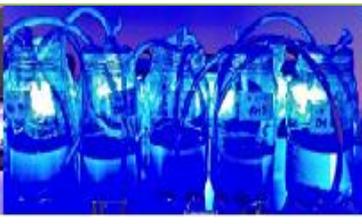
Fuente: Autores del proyecto

Tabla 26 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio RM objetivo 100x.



Fuente: Autores del proyecto

Tabla 27 Registro fotográfico biorreactores tratamiento 1. Nitrógeno al 100% con variación del color de luz, medios RM y BBM. Vista macroscópica.

D í a	Biorreactores		
1 5			
1 8			
2 1	  		
2 4	  		
2	  		



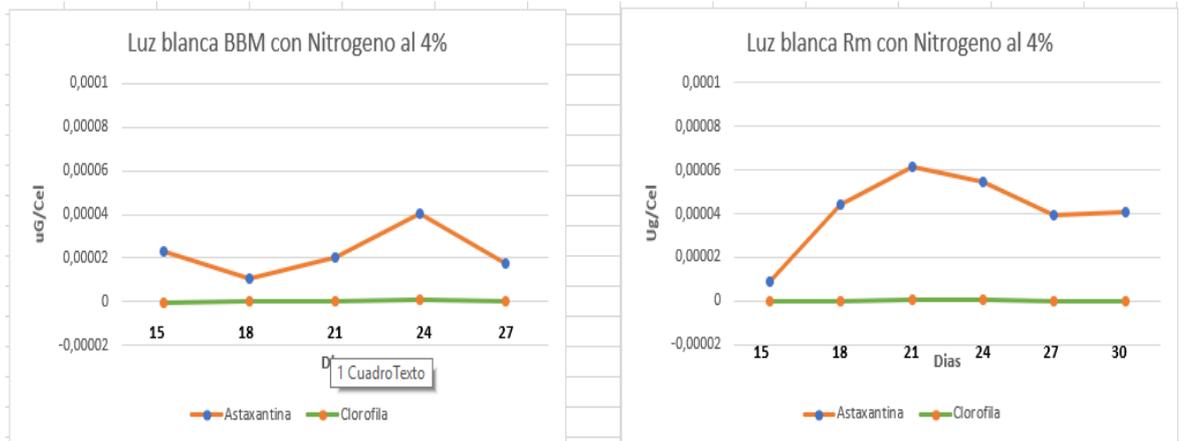
Fuente: Autores del proyecto

4.4 VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ Y CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO 4.0%, COMO FACTORES DE ESTRÉS.

Durante el segundo tratamiento del ensayo se evaluó la producción de astaxantina por parte de *H. pluvialis*, en 18 biorreactores con los medios BBM y RM, con dos factores de estrés como variables: concentración de Nitrógeno al 4.0 % (primer factor de estrés 15 días), con la variación de color de luz blanca (control), posteriormente se expusieron los biorreactores por 15 días a variación en el color de luz: azul y rojo (segundo factor de estrés), para un total de 30 días desde el inicio hasta la finalización del ensayo. 4.5 CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA POR VARIACIÓN DE COLOR DE LUZ BLANCA, AZUL Y ROJA Y CONCENTRACIÓN DE NITROGENO AL 4.0%.

4.5.1 Biorreactores sometidos a luz blanca (control)

En la **Gráfica 6**, se muestra la producción de clorofila y astaxantina en los medios RM y BBM con concentración de Nitrógeno al 4.0 %, representado en $\mu\text{g}/\text{cel}$ vs. Día de muestreo.



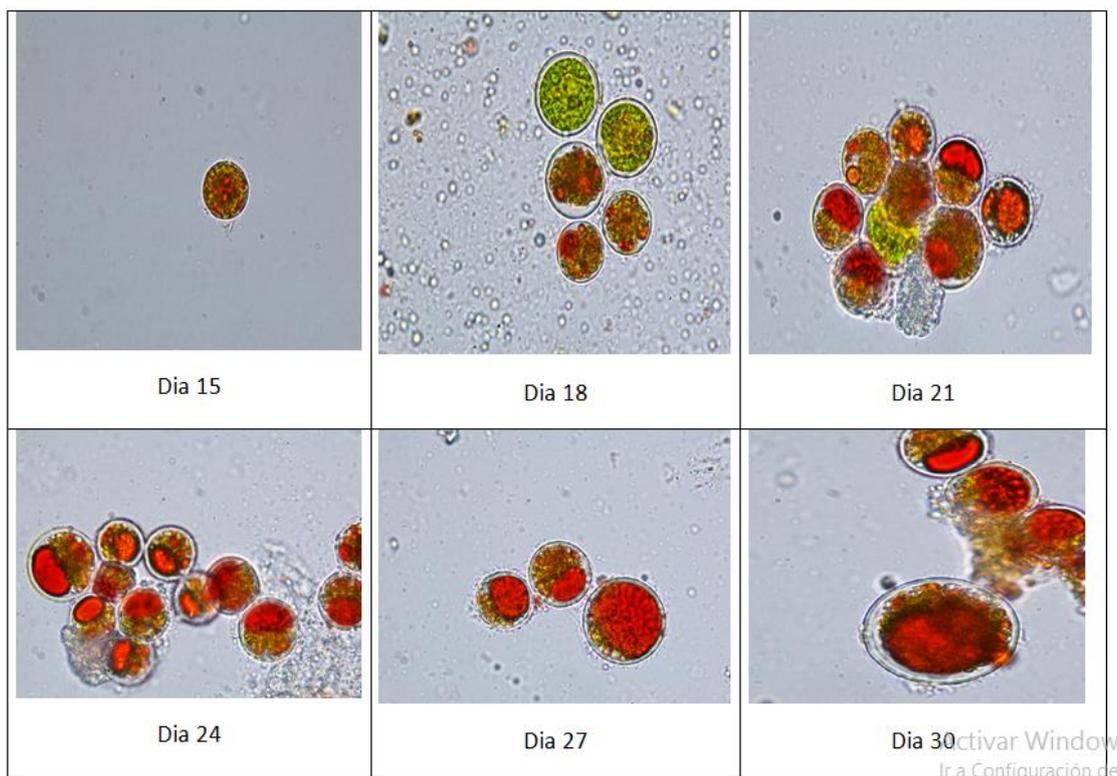
Grafica 6 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con deficiencia de Nitrógeno al 4.0% y luz blanca (control). **Fuente:** Autores del proyecto

En el medio BBM, se obtuvieron menores resultados en la producción de astaxantina la cual inició en el día 15 (muestreo 1) con una concentración de $2,31 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, que aumentó en el tiempo y se evidenció en el día 24 (muestreo 4) donde tiene un pico máximo con una concentración de $4,06 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, finalizando en el día 27 (muestreo 5) a $1,77 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$. En relación con la producción de clorofila en el medio RM, se observó que la concentración se mantuvo constante durante toda la fase de estrés, y no se vió afectada por el descenso en el crecimiento del inóculo. Registro fotográfico microscópico en la **Tabla 28**.

Se observó el medio RM en la fase de estrés (nitrógeno 4.0%) con la luz de color blanca (control), se analiza que durante el crecimiento celular, la producción de clorofila se mantuvo constante durante todas las fases del experimento; sin embargo, la astaxantina en el día 15 comenzó la producción, durante el inicio del estrés con variación del color de luz, se observó que la producción de astaxantina fue mínima a partir del día 15, (muestreo 1) evidenciada con una concentración de $2,3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, a partir del día 18 (

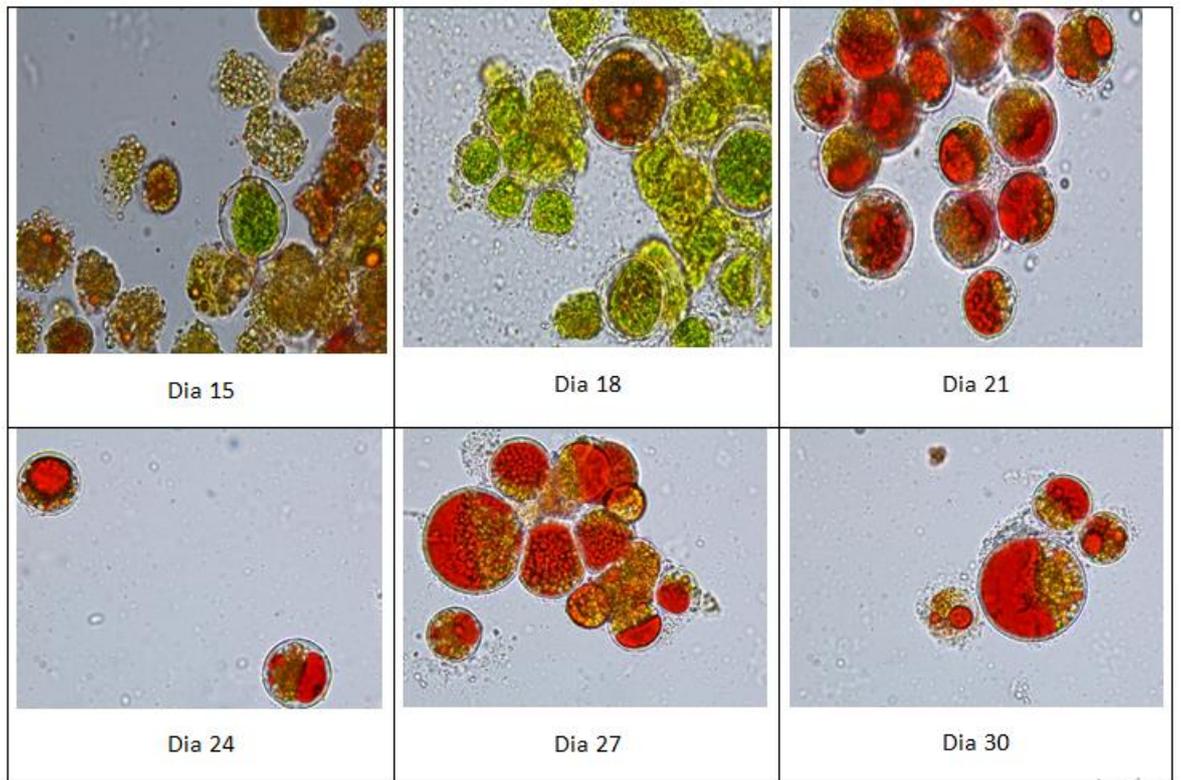
muestreo 2) se presentó un aumento considerable a $4,42 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$, probablemente debido a la unión de los dos factores de estrés. La concentración del caroteno en el día 24, (muestreo 4) tiene una disminución poco significativa con una concentración de $5,42 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$ para finalizar con una concentración de $3,94 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$ (muestreo 5), manteniéndose en concentraciones similares hasta el final del experimento. Registro fotográfico microscópico en la **Tabla 29**.

Tabla 28 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



Fuente: autores del proyecto

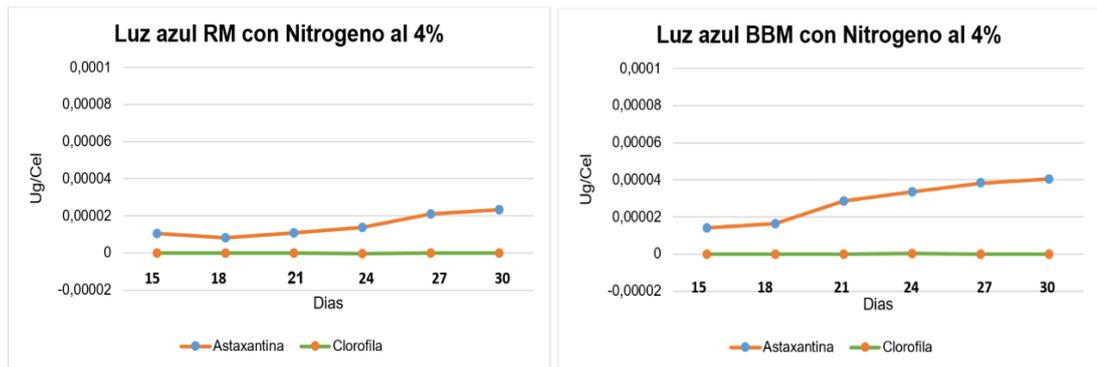
Tabla 29 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



Fuente: autores del proyecto

4.5.2 LUZ AZUL Y NITRÓGENO AL 4.0 % COMO FACTORES DE ESTRÉS.

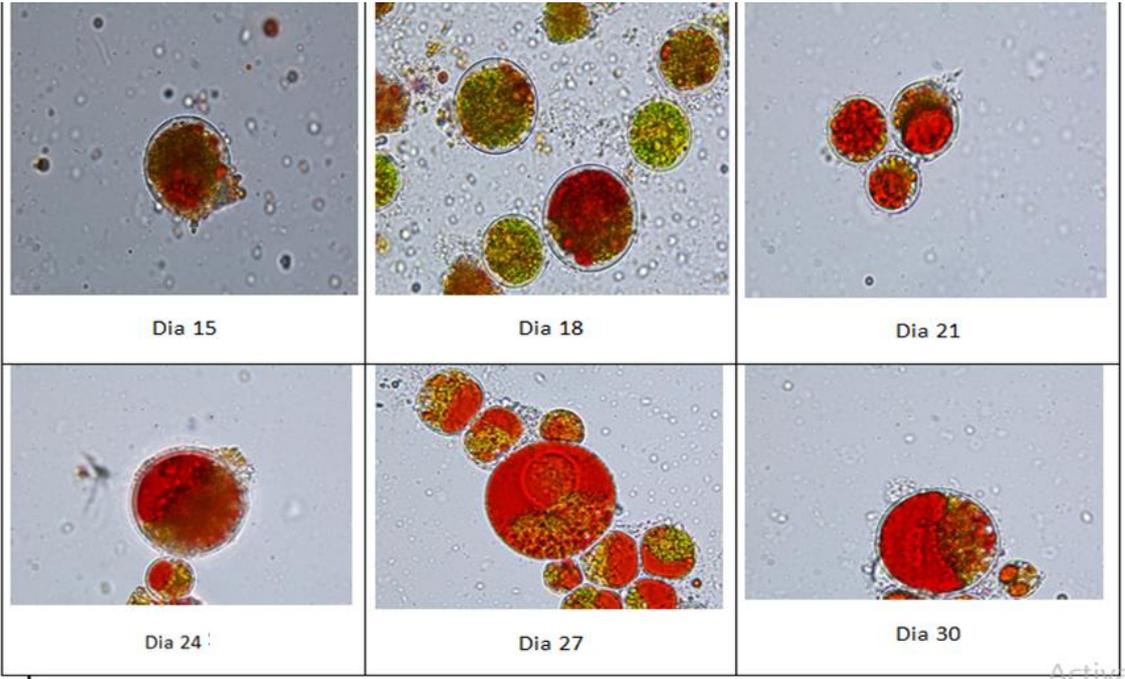
A continuación (**Grafica 7**), se observa el comportamiento de la producción de astaxantina y de clorofila en los medios RM y BBM, representados en $\mu\text{g}/\text{cel.}$ vs. Día de muestreo con la utilización de luz azul y nitrógeno al 4.0% como factores de estrés.



Grafica 7. Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con Nitrógeno al 4.0% y luz azul como factores de estrés. Fuente: Autores del proyecto

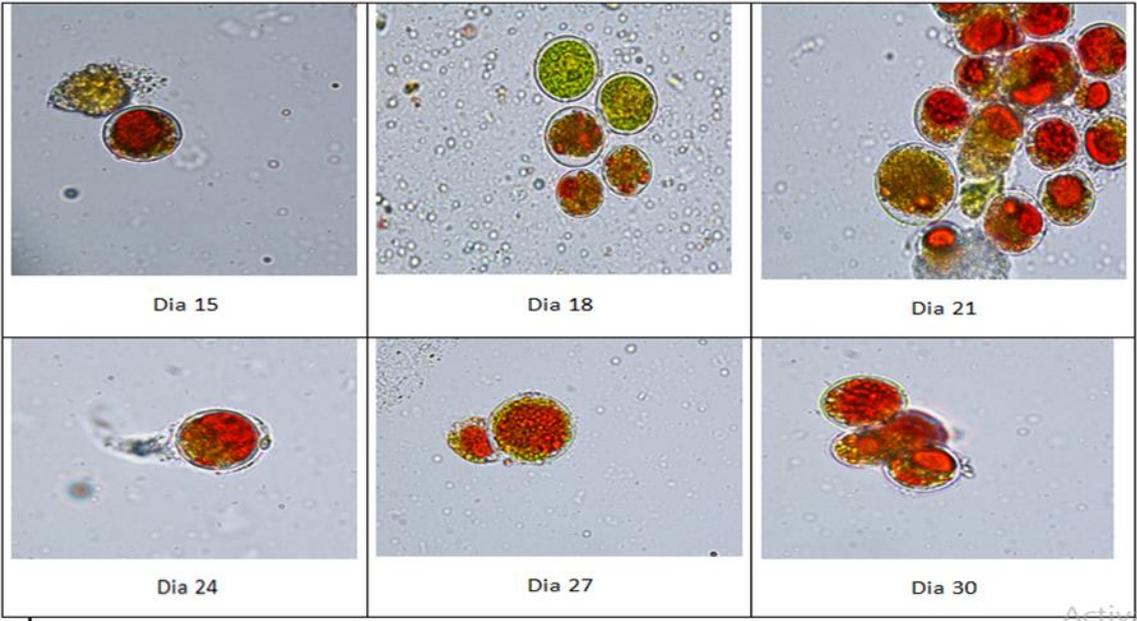
La gráfica permite observar y comparar el comportamiento de la microalga en los medios RM y BBM con el uso de factores de estrés: luz azul y nitrógeno al 4.0%, se mostró que en el medio BBM aumentó la producción de astaxantina, ya que el día 15 (muestreo 1) inició con una concentración de astaxantina de $1,41 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ y finalizó en el día 30 (muestreo 6) con $3,91 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$; en el medio RM el día 15 (muestreo 1) presentó una concentración de $1,03 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ y finalizó el día 30 (muestreo 6) con $1,49 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$, lo que evidencia un comportamiento constante en la producción de astaxantina en los dos medios usados en el ensayo en los cuales se evidencia la producción y acumulación de astaxantina. Observar Tabla 30 día 15, día 30 y Tabla 30 día 15, día 30, en cuanto a la clorofila en el medio RM en el día 15 (muestreo 1) se evidencia una concentración de $6,72 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cel}$ y finalizó con $3,31 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cel}$ demostrando la relación inversa entre astaxantina y clorofila. En la **Tabla 31 día 18** se observa como disminuye la producción de clorofila.

Tabla 30 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz azul medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



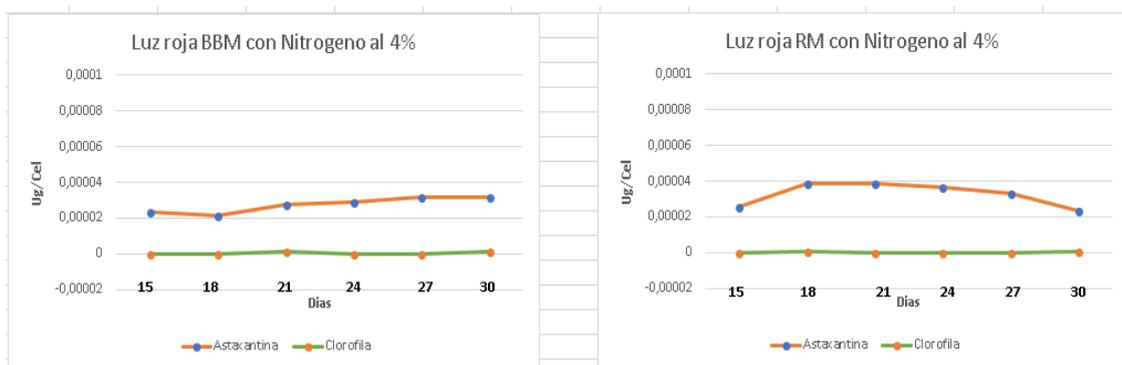
fuelle: autores del proyecto

Tabla 31 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz azul medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



Fuente: autores del proyecto

4.5.3 LUZ ROJA Y NITRÓGENO AL 4.0% COMO FACTORES DE ESTRÉS.

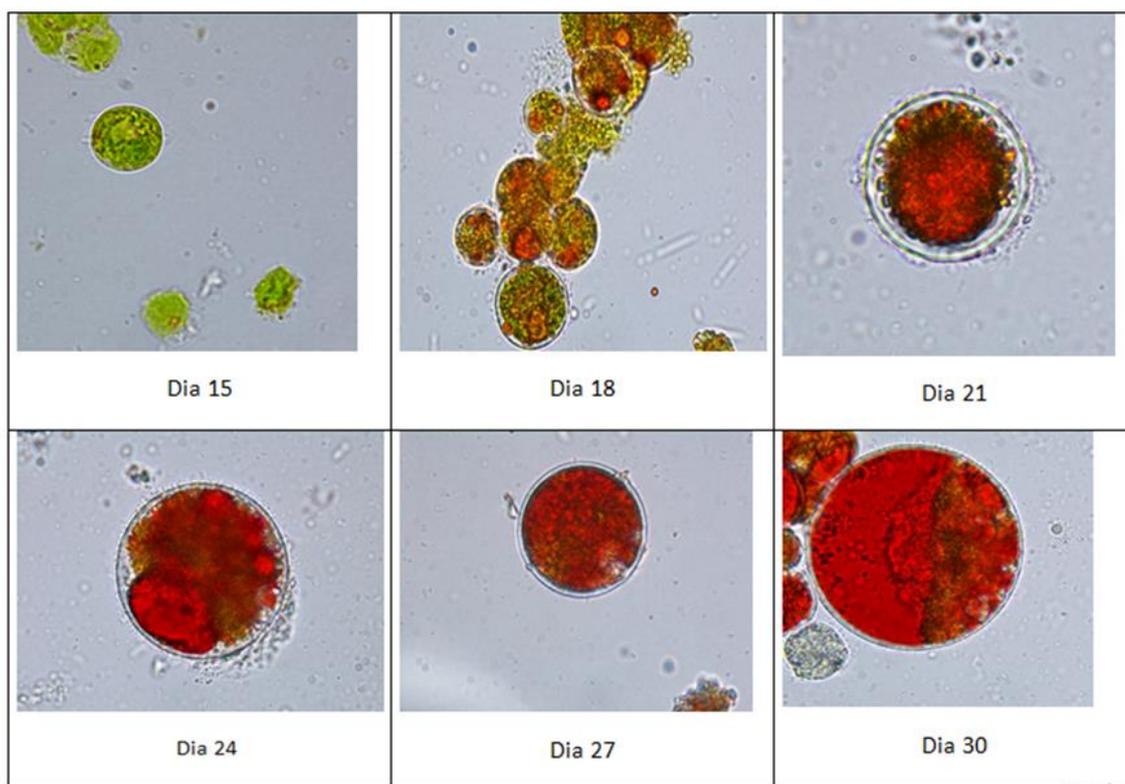


Grafica 8 Producción de clorofila y astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$. con Nitrogeno al 4.0% y luz roja como factores de estrés. **Fuente:** Autores del proyecto

En la **Gráfica 8** de producción de clorofila y astaxantina bajo las condiciones de estrés de nitrógeno al 4.0% y luz roja, se observó que en el medio BBM, la microalga presentó producción de clorofila en el día 15 (muestreo 1) con una concentración de $9,47 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{cel}$ y finalizó en el día 30 (muestreo 6) con una concentración de $8,63 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cel}$ como se evidencia en la **Tabla 32** en el día 15 y el día 18; en el medio RM la concentración de clorofila se encontró en el día 15 (muestreo 1) una concentración de $6,72 \times 10^{-8}$ y finalizó en el día 30 (muestreo 6) con una concentración de $3,31 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{cel}$, se evidencia en la **Tabla 32** en el día 24 y día 27; por otra parte, la producción de astaxantina en medio BBM se encontró en el día 15 (muestreo 1) una concentración de $2,33 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ y en el día 30 (muestreo 6) una concentración de $3,13 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ que se pudo considerar como pico máximo de producción, En la **Tabla 32** se observó la producción y acumulación de astaxantina en el día 18 y día 27, en el

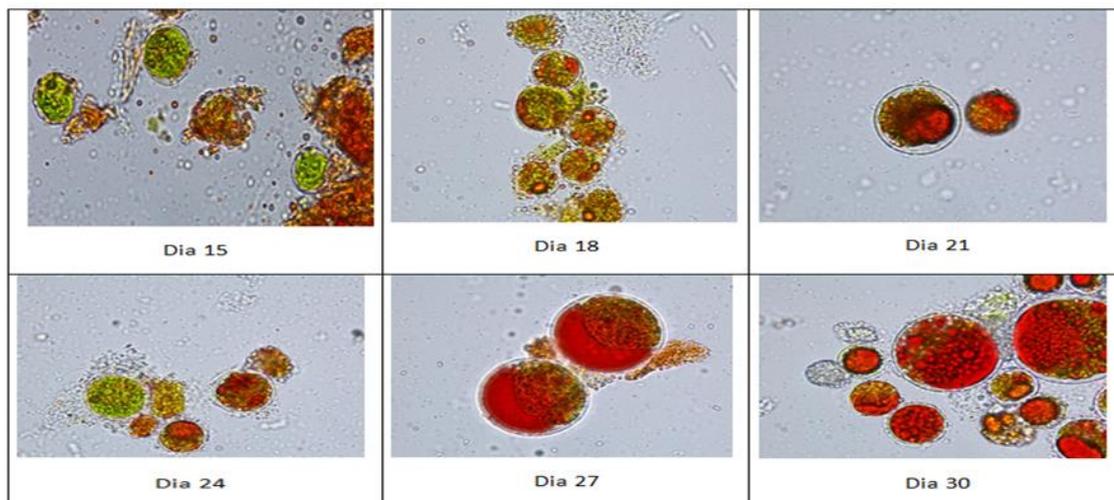
medio RM se evidenció un aumento en la producción de astaxantina a partir del día 15 (muestreo 1) concentración de $2,56 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$ y entre el día 18 y 21 (muestreo 2 y 3) se encontró una concentración de $3,87 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$. En los días 27 y día 30 de la Tabla 33 se observa la acumulación de astaxantina en la mayoría de las células.

Tabla 32 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz roja medio BBM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



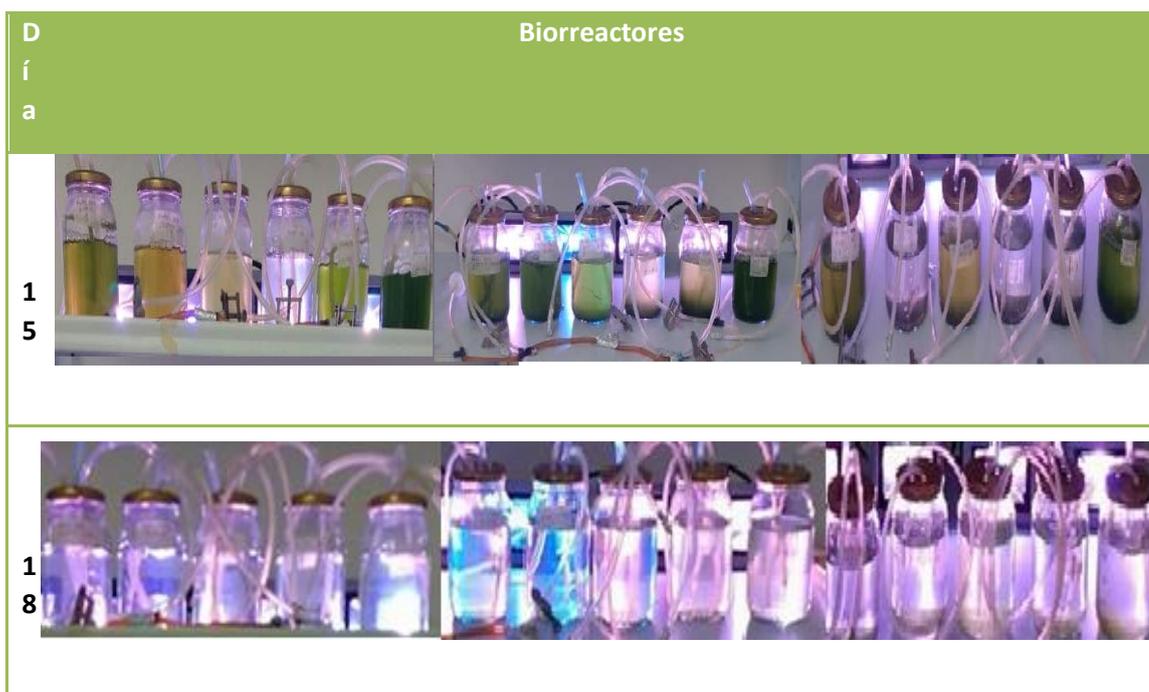
Fuente: autores del proyecto

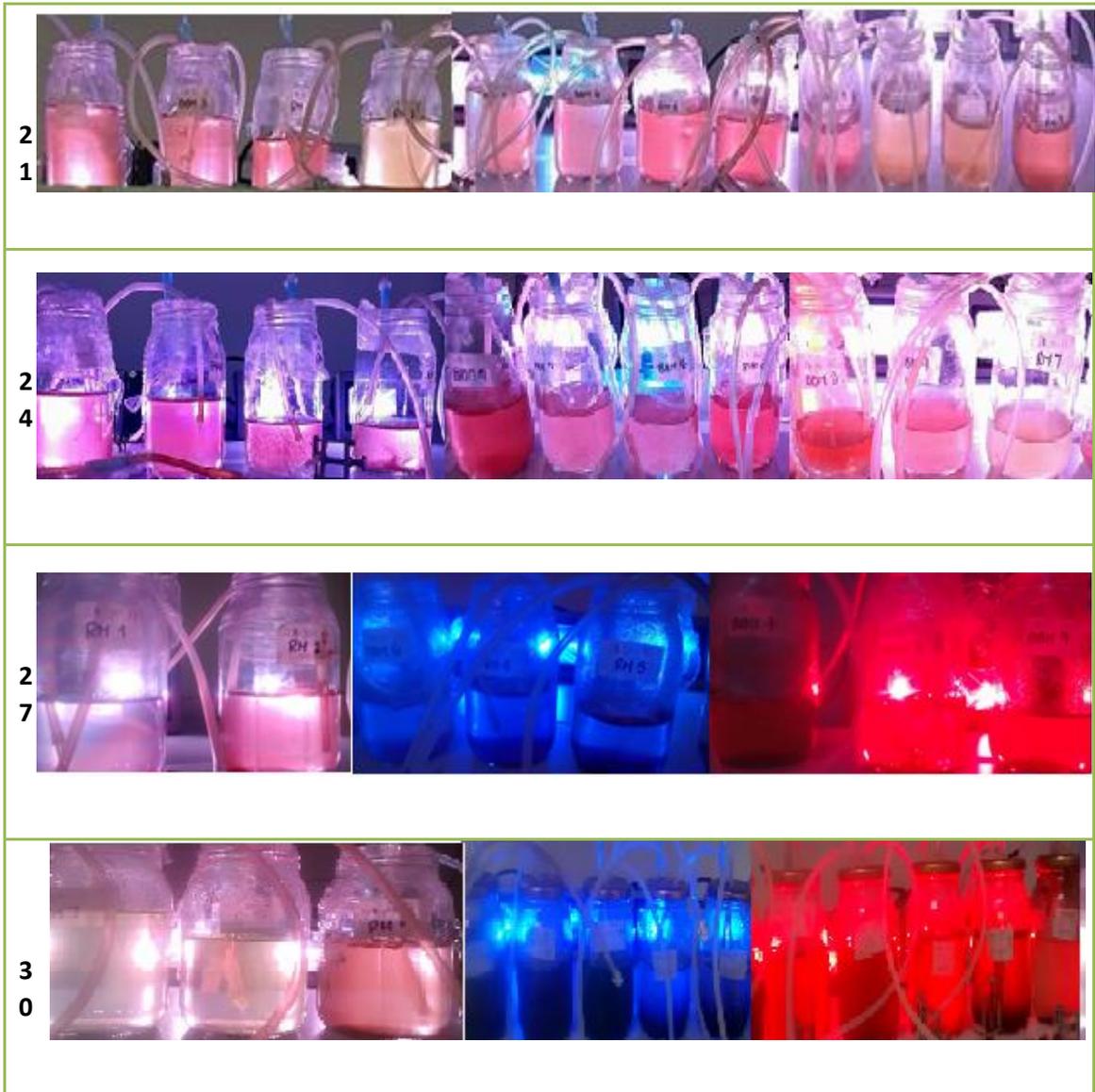
Tabla 33 Registro fotográfico microscópico de la morfología celular tratamiento luz roja medio RM con nitrógeno al 4.0% objetivo 100x



Fuente: autores del proyecto

Tabla 34 Registro fotográfico biorreactores tratamiento 2. Nitrógeno al 4% con variación del color de luz, medios RM y BBM. Vista macroscópica.





Fuente autores del proyecto

4.6 ANÁLISIS MOLECULAR

Se realizó con el fin de comprobar si los tratamientos de estrés (variación de color de luz y nitrógeno al 4.0%) usados durante el estudio, favorecen la

expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de la astaxantina se analizaron la expresión de los siguientes genes: fitoeno sintetasa (PSY), β -caroteno Hidroxilasa (CHY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno β -ciclase (LCY), β -caroteno ketolasa (BKT) dichos genes son de gran importancia en el proceso biosintético del pigmento. Ver tamaño de amplicones en Tabla 16. De cada una de las muestras a analizar se adicionaron 8 μ L para el corrido electroforético.

4.6.1 DETERMINACIÓN DE Housekeeping

Se realizó la determinación del Housekeeping para comprobar la síntesis de la conversión de RNA a cDNA se llevó a cabo correctamente, se hizo por medio de PCR para ITS (Espaciador transcrito interno). las cuales son secuencias altamente específicas de ADN encontradas en genes que codifican el ARN ribosomal ⁴⁴.

M M1 M2 M5 M6



Imagen 1 Expresión de Housekeeping muestras 1,2,5, y 6.

Fuente: Autores del proyecto

M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE); M1 control medio RM muestreo 2 (dia 18), M2 control medio RM muestreo 3 (dia 21), M5 control medio BBM muestreo 2 (dia 18), M6 luz azul medio RM muestreo 2 (dia 18). (Todas las muestras pertenecen al primer tratamiento).

En la imagen 1 se observa la presencia de los cDNA evidenciado por las bandas características que muestran un peso molecular de 800 pb, por esta razón estas muestras fueron seleccionadas para realizar PCR con Primers de genes involucrados en la biosíntesis de astaxantina, en el carril dos (M2) se visualiza, una banda tenue pero teniendo en cuenta la concentración de astaxantina $8,12 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel}$ correspondiente al muestreo 3 (día 21), se decide conservar dicha muestra para realizar más análisis moleculares.

M3 M4 M7 M8 M9 M10 M



Imagen 2 Expresión de Housekeeping muestras 3,4,7,8,9 y 10.

Fuente: Autores del proyecto

M3 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M4 control medio BBM muestreo 2 (día 18), M7 luz azul medio BBM muestreo 3 (día 21), M8 luz roja medio RM muestreo 2 (día 18), M9 luz roja medio BBM muestreo 3 (día 21), M10 control medio RM muestreo 2 (día 18), M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE). (Todas las muestras a excepción de la M10 pertenecen a l tratamiento 1, M10 pertenece a tratamiento 2).

En la **imagen 2** se logra visualizar en las muestras 3, 7, 8, 9 y 10 la formación de dos bandas, por lo tanto estas muestras fueron seleccionadas para posteriores análisis moleculares de expresión de genes, en el primer pozo M3 la primera banda corresponde a 600 pb, la segunda ubicada en 900pb ,M4 se encuentra en el segundo pozo se observa una ligera banda, por lo tanto teniendo en cuenta la baja concentración de astaxantina $3,00 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel}$ en esta muestra (día18), se toma la decisión de excluirla de posteriores análisis, en el pozo 3 muestra 7 (M7) se observa la primera banda de 600 pb, la segunda con 900pb, M8 mostro una primera banda de 600 pb y una segunda banda de 900pb, M9 corresponde al quinto pozo con una banda inicial de 580 pb peso y una segunda banda de 900pb, finalmente M10 con mostro una primera banda de 550 pb y Una segunda banda de 900 pb.

M11 M12 M13 M14 M15 M16 M17 M M18

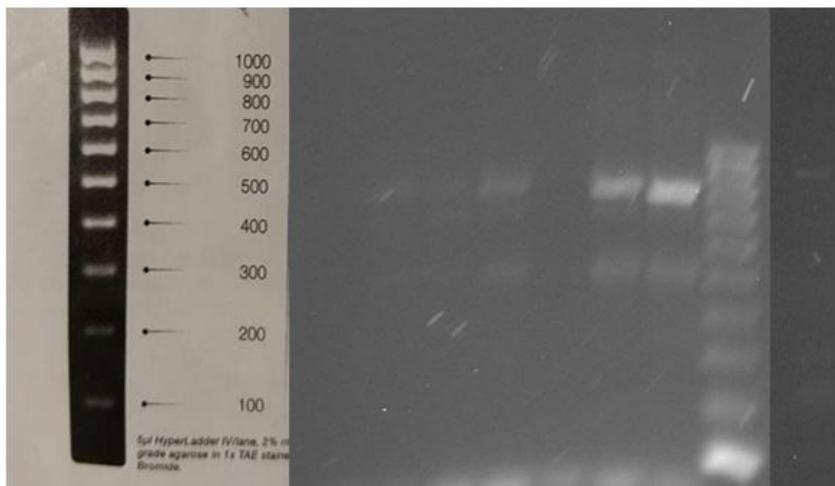


Imagen 3 Expresión de Housekeeping muestras 11 a la 18.

Fuente: Autores del proyecto

M11 control medio RM muestreo 3 (día 21), M12 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M13 control medio BBM muestreo 4 (día 24), M14 luz azul medio RM muestreo 3 (día 21), M15 luz azul medio BBM muestreo 4 (día 24), M16 luz azul medio BBM muestreo 5 (día 27), M17 luz roja medio RM muestreo 3 (día 21), M: peso molecular Hyper Ladder II (BIOLINE), M18 luz roja medio BBM muestreo 4 (día 24). (Todas las muestras corresponden al tratamiento 2)

En la **imagen 3** se verifica la presencia de material genético (cDNA) luego del proceso de conversión de RNA a cDNA por medio de la presencia de bandas; en las muestras 12,13,14,16,17,18, se evidenció la formación de dos bandas, la primera con 500 pb, la segunda con 900 pb, confirmando la presencia de ITS 1 Y 4 (regiones específicas presentes en células eucariotas) en un 75% (6 de 8 muestras analizadas en la imagen); en las muestras 11 y 15 no se observa amplificación de estas regiones, sin embargo la muestra 11 mostró una concentración de astaxantina de $7,90 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel}$, por lo tanto se decide conservar y realizar posteriores análisis, por otro lado la muestra 15 con una

baja concentración de astaxantina de $3,36 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel}$ se excluye de posteriores análisis de expresión de genes; debido a que a mayor concentración de astaxantina la posibilidad de la expresión de la ruta biosintética es mayor.

4.6.2 EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE ASTAXANTINA

Para la determinación de los genes importantes en la biosíntesis de la astaxantina se encuentran involucrados el fitoeno sintetasa (PSY), β -caroteno Hidroxilasa (CHY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno β -ciclaza (LCY), β -caroteno ketolasa (BKT), fue necesario realizar dos PCR por muestra ya que en una se analizaron los genes PSY y CHY, y en la otra los genes PDS, LCY y BKT, debido a que el peso molecular de los genes era muy cercano de esta forma se separaron los genes uno con peso alto y otro con peso bajo, esto con el fin de visualizar mejor las bandas como resultados de la electroforesis. Ver pesos moleculares **Tabla 16**

M1 M2 M3 M5 M6 M M7 M8 M9 M10 M M11 M12 M13 M14 M16 M17 M18M

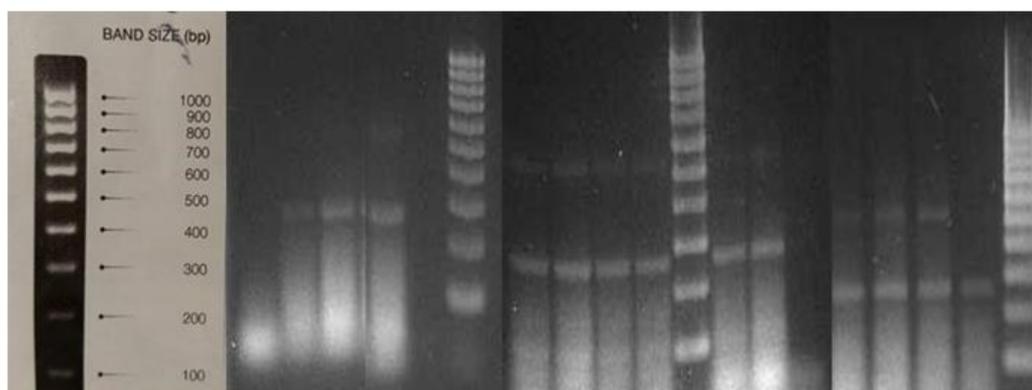


Imagen 4 Expresión de los genes fitoeno sintetasa 402pb (PSY), β -caroteno Hidroxilasa 521pb (CHY) en las muestras 1 a la 18. **Fuente:** Autores del proyecto

M1 control medio RM muestreo 2 (día 18), M2 control medio RM muestreo 3 (día 21), M3 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M5 control medio BBM muestreo 2 (día 18), M6 luz azul medio RM muestreo 2 (día 18), M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE). M7 luz azul medio BBM muestreo 3 (día 21), M8 luz roja medio RM muestreo 2 (día 18), M9 luz roja medio BBM muestreo 3 (día 21), M10 control medio RM muestreo 2 (día 18), M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE). M11 control medio RM muestreo 3 (día 21), M12 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M13 control medio BBM muestreo 4 (día 24), M14 luz azul medio RM muestreo 3 (día 21), M16 luz azul medio BBM muestreo 5 (día 27), M17 luz roja medio RM muestreo 3 (día 21), M18 luz roja medio BBM muestreo 4 (día 24), M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE).

En **la imagen 4** se observa la presencia del gen PSY(fitoeno sintasa) el cual se encontró presente en un 87,5 % (14 de las 16 muestras analizadas) con un peso molecular de 400 pb ,en la muestra 1 (M1) no se observa la presencia del gen ya que esta mostró una concentración de astaxantina de $1,13 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel}$, por esta razón se cree que el gen no alcanzó a expresarse, este es el primero en mostrar actividad en la ruta biosintética de la astaxantina de allí también su alto porcentaje, para el gen CHY se evidenció una presencia de aproximadamente un 62,5% (10 de las 16 muestras analizadas) con un peso

molecular de 500 pb , es importante aclarar que el Sybr Green causó interferencias en el momento de la visualización de las bandas..

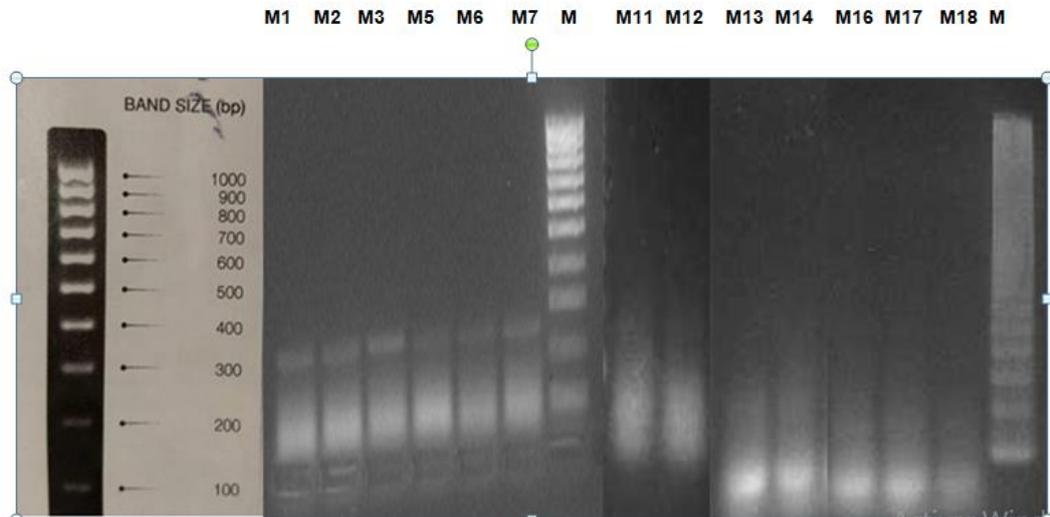


Imagen 5 Expresión de genes fitoeno desaturasa 462 pb (PDS), licopeno β -ciclasa 565 pb (LCY), β -caroteno ketolasa 423 pb (BKT), en muestras de la 1 a la 18 a excepción de la muestra 8 a la 10 **Fuente:** Autores del proyecto

M1 control medio RM muestreo 2 (día 18), M2 control medio RM muestreo 3 (día 21), M3 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M5 control medio BBM muestreo 2 (día 18), M6 luz azul medio RM muestreo 2 (día 18), M7 luz azul medio BBM muestreo 3 (día 21) M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE) , M11 control medio RM muestreo 3 (día 21), M12 control medio BBM muestreo 1 (día 15), M13 control medio BBM muestreo 4 (día 24), M14 luz azul medio RM muestreo 3 (día 21), , M16 luz azul medio BBM muestre 5 (día 27), M17 luz roja medio RM muestreo 3 (día 21), , M18 luz roja medio BBM muestreo 4 (día 24), M: peso molecular Hypper Ladder II (BIOLINE).

En la **imagen 5** en se observa ver en las muestras 1,3,5,6,7, la presencia de bandas del gen BKT (423pb). No se observa expresión de los genes buscados PDS (462) y LCY (565pb).

5.DISCUSIÓN

La exposición a diferentes colores de luz influye en el crecimiento óptimo de la microalga, forma parte importante en la división y mantenimiento celular, es por esto que Lababpour et al. (2005) buscó aumentar la producción de astaxantina usando luz LED's con cambios de color rojo a azules a través de feed-back de nutrientes obteniendo mayores concentraciones del pigmento bajo estas condiciones en fase de estrés con LED's de color azul , teniendo en cuenta dicha afirmación, en este trabajo se logró observar que las variaciones de color de luz a las cuales fue sometida *H. pluvialis* luz roja (longitud de onda de 700 nm) y luz azul (longitud de onda de 500 nm) permitieron mejorar la acumulación de astaxantina debido a que la luz roja aumenta la producción final de biomasa y la luz azul actúa como un factor de activación anticipado de la ruta metabólica del pigmento en comparación con otras luces, aumento especialmente en el medio BBM con luz roja donde alcanzo un pico máximo de astaxantina de $7,24 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{Cel.}$ ²²

Del mismo modo Tomohisa et. al (2004) en el cultivo de *H. pluvialis* buscó medir los efectos de los diferentes tipos de luz y las diferentes longitudes de onda llegando a la conclusión de cultivar la microalga usando luz roja a una longitud de onda de 625 nm para la fase de crecimiento que permitió mejorar la biomasa final y la fase de estrés con luz azul donde obtuvo una mayor concentración de astaxantina debido a que la longitud de 470 nm es capaz de activar la ruta metabólica de la astaxantina más rápido, donde obtuvo una producción del pigmento en menor tiempo en cuestión a otro tipo de luces.⁴⁷

El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de la microalga demostrado en los estudios realizados por Harker et al. (1996) ⁴⁸ quien observó que el crecimiento de las algas se limitó severamente y la síntesis de astaxantina se estimuló en gran medida, con lo cual concluyó que se obtiene el máximo crecimiento de la microalga cuando ésta es sometida a una concentración normal de nitrógeno en el medio de cultivo . Por esta razón se pudo comprobar que al limitar este nutriente afecta el crecimiento de la misma, como se observó en el registro fotográfico. Orosa M (2005) menciona la importancia de la concentración de nitratos en el medio de cultivo, debido a su importante papel en la tasa de división celular y en la acumulación de carotenoides secundarios ⁴⁹

Aflato,C (2007) en su estudio concluyó que es favorable el uso de dos etapas en el cultivo de microalga, la primera etapa comprende el tiempo de la producción de biomasa (crecimiento óptimo, etapa verde) y la segunda etapa consiste en la producción del pigmento (estrés permanente, etapa roja), esto permitió ver resultados significativos comparados con cultivo continuo bajo estrés limitante en estado estacionario ⁵⁰ .Espinaco (2016) realizó un ensayo para medir el efecto de diferentes concentraciones de nitrato de sodio en el medio de cultivo BBM; sobre el crecimiento celular y analizó el efecto de estrés por luz donde fue posible determinar que los cultivos que son sometidos a condiciones de estrés por luz sin nitrato de sodio presente en el medio comienzan a sintetizar y acumular el pigmento en forma más rápida ²⁶

Lima (2009) en su ensayo usó concentraciones de nitrógeno de 1.0, y 1.25 g/L y cambio de luz blanca a luz roja para promover el aumento del pigmento por

parte de *H. pluvialis*, obteniendo como resultado disminución del crecimiento de la microalga y aceleración de la fase exponencial de la misma, determinando que las concentraciones de nitrógeno y la luz usada en el transcurso del cultivo afectó el crecimiento y el desarrollo poblacional de la microalga³ Esto se ve relacionado con los resultados obtenidos ya que se usó la concentración de 4.0% de nitrógeno desde el inicio del cultivo, por esta razón se vió afectada la división celular, y favoreció la acumulación de astaxantina en la microalga.

En cuanto a la concentración de astaxantina el segundo tratamiento se evidenció un comportamiento similar en el medio RM con luz blanca (control) y el medio BBM con luz azul (longitud de onda 450 nm), debido al uso del nitrógeno al 4.0% ya que la limitación de este nutriente promueve la acumulación de carotenoides por parte de *H. pluviales* como lo menciona *J. R. Benavente-Valdés (2012)*³⁴ debido a que favorece la forma aplanospora de la microalga como mecanismo de defensa a la deficiencia de este nutriente. Fábregas, J (1998) indica que la deficiencia de nitrógeno actúa como uno de los principales factores bloqueadores de división y estimula la síntesis de astaxantina, así mismo menciona el uso de alta luz para promover la producción del pigmento⁵¹

En cuanto a los análisis moleculares realizados para evidenciar la expresión de los genes de la ruta biosintética de la astaxantina, el gen fitoeno sintasa (PSY) se encontró presente en un 72,2% de las muestras analizadas (13 de 16 muestras), y el gen CHY aproximadamente en un 62,5% (10 de las 16 muestras analizadas), se cree que esto se debe a la variación de color de luz usado en los dos tratamientos, y es comparable a lo encontrado

por Steinbrenner et al. (2001) donde obtuvo como resultado un aumento en los niveles de ARNm de ambos genes, la expresión de la fitoeno sintasa (PSY) y la carotenoide hidroxilasa (CHY) mediante aplicación de estrés por medio de altas intensidades de luz y un alto contenido de salinidad en el medio, afirmando que estos son claves de la producción de astaxantina ³⁶

Del mismo modo Vidhyavathi et al (2008) demostró de igual manera que el estrés nutricional de NaCl, acetato de sodio y las altas intensidades de luz en la microalga, aumentaron el contenido total de astaxantina a 32.0 mg con acetato de sodio y 24.5 mg con NaCl, indujeron la expresión de los genes biosintéticos de la astaxantina de los genes BKT y CHY que se expresaron transitoriamente dependientes del estrés nutricional y de luz.²⁴

6. CONCLUSIONES

- Al usar la variación de color de luz como factor de estrés se observó que las mayores concentraciones de astaxantina se obtuvieron con la luz roja en el medio BBM llegando a alcanzar un pico máximo en el día 18 de 7.24×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{cel}$ y un alto crecimiento de la microalga en dicho medio. Por lo tanto, se recomienda el uso del medio de cultivo BBM en *H. pluvialis* por ser un medio autotrófico estándar, el cual permite concentrar las células en fase estacionaria y someterlas a estrés por elevada variación de color de luz, debido a que este sistema permite una mayor acumulación y productividad de astaxantina.
- El conteo celular se vio disminuido en la fase de crecimiento debido al déficit de nitrógeno, aun así la producción de astaxantina mejoró al unir dos factores de estrés como el Nitrógeno al 4.0% y la variación de color de luz, formando una acumulación más veloz del caroteno, debido a esto se recomienda la utilización de dos o más tipos de estrés (nutricional, salinidad, lumínico, ambiental, de temperatura, pH) para ayudar a estimular a la microalga a activar la ruta biosintética de este caroteno de una manera mucho más eficaz.
- Según los resultados obtenidos la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno indujeron la expresión de los genes como el PSY que se expresó en un 87,5% y el CHY en un 62,5% del total de las muestras analizadas, se estableció que los efectos nutricionales como el

nitrógeno a una concentración del 4.0% y la variación del color de luz con diferentes longitudes de onda son métodos de estrés óptimos para promover mayor acumulación del caroteno.

REFERENCIAS

- 1 Cordoba Astroc N, Astroc NC, Reyes NA, Buitrago LD, Aguilar JJ, Jiménez JAS. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. UGCiencia [Internet]. 2016;21:73. Available from: <http://dx.doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>
- 2 Gu W, Xie X, Gao S, Zhou W, Pan G, Wang G. Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: from a perspective of photosynthesis. PLoS One [Internet]. 2013 Jul 26;8(7):e67028. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067028>
- 3 lima aes. cultivo de la microalga *haematococcus pluvialis*, en lote y fotobiorreactor para la producción de carotenoides. 2009; Available from: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI14736.pdf>
- 4 Gao Z, Meng C, Zhang X, Xu D, Zhao Y, Wang Y, et al. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*. PLoS One [Internet]. 2012 Aug 1;7(8):e42243. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042243>
- 5 Grünewald K, Eckert M, Hirschberg J, Hagen C. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). Plant Physiol [Internet]. 2000 Apr;122(4):1261–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759523>
- 6 Abalde J, Orosa García M, Torres E, Cid A. La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina. 1999; Available from: <https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10777/CC%2048%20art%205.pdf?sequence=1>
- 7 Ramirez D, Landínez R. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift [tesis]. Bogotá: Universidad nacional de Colombia. 2013;
- 8 Wan M, Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y, Huang J, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. Bioresour Technol [Internet]. 2014 Sep;167:276–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>
- 9 Huang J-C, Chen F, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. J Biotechnol [Internet]. 2006 Mar 23;122(2):176–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.002>
- 10 Meyers SP. Papel del Carotenoide Astaxantina en la Nutrición de Especies Acuáticas. 2015 Mar 10 [cited 2018 Aug 27]; Available from: <http://dx.doi.org/>
- 11 Murray MT. The Whole Body benefits of Natural Astaxanthin. November; 2016.

- 12 Camacho Kurmen JE, Kurmen JEC, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova* [Internet]. 2013;11(19):93. Available from: <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.1022>
- 13 Sarada R, Tripathi U, Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem* [Internet]. 2002;37(6):623–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(01\)00246-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(01)00246-1)
- 14 Gajardo Solari S, Benites Vílchez J, López Vivar J, Burgos Hermosilla N, Caro Galán C, Rojas Arredondo M. BIOFARBO. *BIOFARBO* [Internet]. [cited 2018 Aug 28];6. Available from: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632011000200002&lng=es.
- 15 Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, Yazawa K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2007 Apr;71(4):893–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60521>
- 16 Propiedades, beneficios y usos de la astaxantina [Internet]. *EcoInventos*. 2016 [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://ecoinventos.com/propiedades-beneficios-y-usos-de-la-astaxantina/>
- 17 Seabra LMJ, Pedrosa LFC. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Rev Nutr* [Internet]. 2010 [cited 2018 Aug 30];23(6):1041–50. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415-52732010000600010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- 18 Hix LM, Frey DA, McLaws MD, Østerlie M, Lockwood SF, Bertram JS. Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetrasodium diphosphate astaxanthin derivative. *Carcinogenesis* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2018 Aug 30];26(9):1634–41. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-pdf/26/9/1634/7089691/bgi121.pdf>
- 19 Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravishankar GA. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2008 Aug 20;590(1-3):387–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.042>
- 20 Lababpour A, Katsuda T, Katoh S. Astaxanthin Production by *H. pluvialis* in Sequential Batch Followed by Fed-Batch Culture Illuminated by LED Lamps. Available from: <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/aiche-2004/pdf/papers/483b.pdf>
- 21 Domínguez-Bocanegra AR, Guerrero Legarreta I, Martínez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* [Internet]. 2004 Apr;92(2):209–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693455>
- 22 Lababpour A, Shimahara K, Hada K, Kyoui Y, Katsuda T, Katoh S. Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2005 Sep;100(3):339–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243287>

- 23 Morales H, Jearim K, Pérez Morales ME, Jáuregui Romo C, Alcántara Jurado LA, Hurtado Ayala LA. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* [Internet]. 2015;46(1):7–16. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952015000100007&script=sci_arttext&tlng=pt
- 24 Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot* [Internet]. 2008 Mar 14;59(6):1409–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern048>
- 25 Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *N Biotechnol* [Internet]. 2009;26(3-4):199–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.08.007>
- 26 Espinaco BY. Efectos de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina a partir de *haematococcus pluvialis*. 2016; Available from: <http://web10.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/8372/2.3.4.pdf>
- 27 Martínez A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios. México DF, México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología avanzada. 2010;
- 28 Fernandez J. *haematococcus pluvialis* | Comunicar Ciencia [Internet]. [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://comunicarciencia.bsm.upf.edu/?tag=haematococcus-pluvialis>
- 29 Cerón M. Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de Estudios Agroalimentarios*. 2013;5:1–19.
- 30 Niño Castillo CM, Castillo CMN, Rivera FCR, Díaz LE, Díaz AGL. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova* [Internet]. 2017;15(28):19. Available from: <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.2073>
- 31 Salazar M, Monroy O, Cuevas F, Beristain R, Mendoza C. FOTOPRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE *Haematococcus pluvialis*. Available from: https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/OII-7.pdf
- 32 Boussiba S, Fan L, Vonshak A. [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1992. p. 386–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799213140S>
- 33 Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res* [Internet]. 2003;36(3-4):343–57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631867>

- 34 Benavente-Valdés JR, Montañez JC, Aguilar CN, Méndez-Zavala A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* [Internet]. 2012;7(4):1–12. Available from: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>
- 35 Díaz Sánchez JC, Gómez Varela LF, Orozco Carvajal MI, Quiroga Charry NC. Efecto del Estrés Producido por la Deficiencia de Nitrógeno sobre el Crecimiento y Producción de Astaxantina y la Expresión de Genes Relacionados con la misma en Cultivo de *Haematococcus pluvialis*. Msc Myriam Judith, editor. 2016 Nov;
- 36 Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol* [Internet]. 2001 Feb;125(2):810–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161038>
- 37 Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci* [Internet]. 2016 Apr 28;7:531. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- 38 Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2003 May;21(5):210–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
- 39 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). *Mar Drugs* [Internet]. 2014 Aug 15;12(8):4504–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/md12084504>
- 40 Cordero BF. Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis* [Internet]. Universidad de Sevilla; 2013. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=39214>
- 41 Silva Rodríguez NJ, Preciado Vargas M. Estimación de concentración clorofila-a, con técnicas de teledetección a partir de un derrame de petróleo. 2015; Available from: <http://ridum.umanizales.edu.co:8080/jspui/handle/6789/2650>
- 42 Vargas M, Rodríguez N. Estimación de concentración clorofila-a, con técnicas de teledetección a partir de un derrame de petróleo. *Ventana Informática*. (32):199–215.
- 43 Pérez de Castro AM. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 2010;
- 44 Ángel Díaz JE, García Domínguez C (thesis A. Repositorio institucional UN [Internet] [masters]. Universidad Nacional de Colombia; 2011 [cited 2018 Aug 27]. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8688/>
- 45 Casal Bejarano C. Caracterización de la radiación ultravioleta en la provincia de Huelva e incidencia en la productividad y el valor biotecnológico de cultivos de interés comercial [Internet]. 2008. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/60638775.pdf>
- 46 Florez CEA. ELECTROFORÉISIS Illán Morales Becerril. [cited 2018 Aug 29]; Available from:

http://www.academia.edu/28173799/ELECTROFOR%C3%89SIS_III%C3%A1n_Morales_Becerril

- 47 Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, Katoh S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2004 Jul 6;35(1):81–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022904000912>
- 48 Harker M, Tsavalos AJ, Young AJ. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* [Internet]. 1996 Mar 1 [cited 2018 Aug 30];55(3):207–14. Available from: https://www.researchgate.net/publication/223462763_Factors_responsible_for_astaxanthin_formation_in_the_Chlorophyte_Haematococcus_pluvialis
- 49 Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* [Internet]. 2005 Feb;96(3):373–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.006>
- 50 Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S. On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2007;98(1):300–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.21391>
- 51 Sci-Hub | | 10.1023/A:1005322416796 [Internet]. [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://sci-hub.tw/10.1023/A:1005322416796>

ANEXOS.

ANEXO 1. CONCENTRACIONES DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA

Medios Con nitrógeno normal y variación de luces.

Dia de muestreo	medio	biorreactor	formula final ug/cel astaxantina	formula final ug/cel clorofila
15	BBM	1	2,05315E-05	9,19734E-07
	BBM	4	3,02146E-05	7,64166E-07
	BBM	7	2,24831E-05	7,54715E-07
	RM	3	1,98392E-05	2,80928E-07
	RM	6	1,26125E-05	4,27403E-07
	RM	9	3,84228E-05	1,17633E-06
18	BBM	2	3,00317E-05	8,63214E-07
	BBM	5	4,39327E-05	1,24204E-06
	BBM	8	7,24765E-05	1,5879E-06
	RM	2	0,000113463	2,97172E-06
	RM	5	5,1363E-05	1,3138E-06
	RM	8	6,49043E-05	1,83679E-06
21	BBM	3	6,46465E-05	1,66703E-06
	BBM	6	6,43458E-05	1,83573E-06
	BBM	9	6,20511E-05	1,71325E-06
	RM	1	8,12197E-05	1,53625E-06
	RM	4	5,80661E-05	1,20025E-06
	RM	7	4,02708E-05	1,23624E-06
24	BBM	1	4,69482E-05	-1,57873E-07
	BBM	4	4,06031E-05	-1,1046E-07
	BBM	7	6,56977E-05	8,76449E-07
	RM	3	7,08464E-05	-2,87996E-07
	RM	6	3,03399E-05	7,03345E-07
	RM	9	4,70219E-05	-2,21535E-07
27	BBM	2	5,78278E-05	4,42969E-07
	BBM	5	5,3377E-05	1,29532E-06
	BBM	8	5,45657E-05	-3,39796E-08
	RM	2	3,93243E-05	3,90967E-07
	RM	5	3,20706E-05	3,4017E-07
	RM	8	4,63253E-05	1,04092E-06
	BBM	3	no hay mx	-7,24517E-08
	BBM	6	3,18176E-05	-3,33663E-08
	BBM	9	4,46902E-05	3,90575E-07

30	RM	1	2,24337E-05	1,66257E-07
	RM	4	1,53605E-05	7,7933E-08
	RM	7	4,65389E-05	1,10076E-06

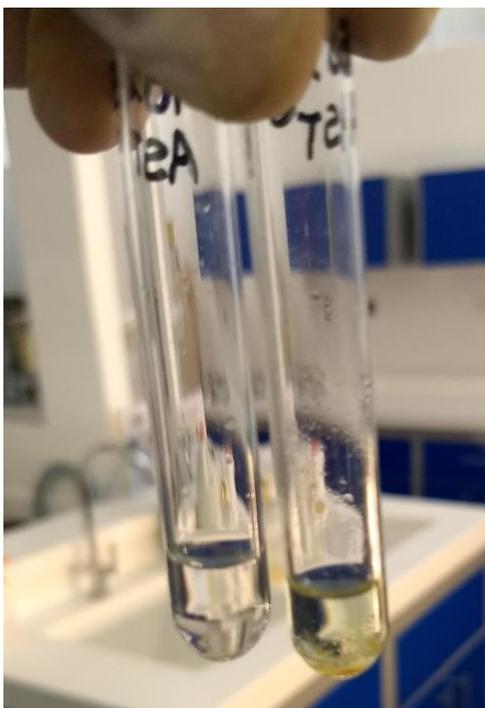
Medios con nitrógeno al 4.0 % y variación de luces

Día de muestreo	medio	biorreactor	formula final ug/cel astaxantina	formula final ug/cel clorofila
15	BBM	2	2,31606E-05	-2,56421E-07
	BBM	5	1,41351E-05	-9,94282E-08
	BBM	8	2,33488E-05	9,47534E-07
	RM	2	8,97034E-06	-3,56295E-08
	RM	6	1,03682E-05	-7,82751E-08
	RM	7	2,56089E-05	6,72363E-08
18	BBM	3	1,07479E-05	-1,77925E-07
	BBM	6	1,63339E-05	-9,70208E-08
	BBM	8	2,14686E-05	4,44846E-08
	RM	2	4,42884E-05	1,03544E-07
	RM	5	8,06299E-06	-4,41727E-08
	RM	9	3,83094E-05	2,70125E-07
21	BBM	2	2,02777E-05	-1,97867E-07
	BBM	5	2,87634E-05	1,6466E-08
	BBM	8	2,76758E-05	-1,07658E-07
	RM	1	7,90189E-05	4,73077E-07
	RM	4	1,0842E-05	-1,16362E-07
	RM	7	3,87879E-05	1,40776E-07
24	BBM	2	4,06676E-05	4,92461E-07
	BBM	4	3,3664E-05	1,97675E-07
	BBM	7	2,8605E-05	9,66872E-07
	RM	2	5,42605E-05	1,48225E-07
	RM	6	1,38501E-05	-2,61814E-07
	RM	9	3,63323E-05	9,55141E-08
27	BBM	2	1,77638E-05	-1,59998E-07
	BBM	4	3,82445E-05	-1,01051E-07
	BBM	9	3,15831E-05	-1,79997E-07
	RM	1	3,94247E-05	-1,69409E-07
	RM	4	2,09426E-05	-7,4804E-08
	RM	8	3,32834E-05	-8,47046E-08
	BBM	NO HAY		
	BBM	5	3,91635E-05	-5,14329E-08
	BBM	8	3,13647E-05	-8,63613E-08

30	RM	2	6,6966E-05	-1,47799E-07
	RM	5	1,49356E-05	9,26367E-08
	RM	9	2,34413E-05	3,31491E-07

ANEXO 2. PROCESAMIENTO DE MUETRAS

Fotografías procesamiento de controles, curva de calibración de Astaxantina y Clorofila



ANEXO 3. Fotografías procesamiento de muestras para la extracción de Astaxantina y Clorofila.

Cada tercer día se tomaron 3 muestras en tubos falcón de 10 ml, los cuales fueron usados para cuantificación de Astaxantina- Clorofila y para la realización de PCR para la determinación de genes que intervienen en la ruta biosintética de astaxantina. Además, se tomó en ependorff 1 ml, para posterior conteo celular.



ANEXO 4. Fotografías de equipos y procesamiento de muestras, usados en la determinación de genes que intervienen en la ruta de síntesis de la Astaxantina.

