



**Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz
sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis***

Kelin Johana Cuero Amú
Jayveri Astrid Domínguez Castillo
Karen Danitza Espitia Sánchez
Laura Andrea Fuentes Cañón

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
TRABAJO DE GRADO
Bogotá D.C.
2019



**Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz
sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis***

Kelin Johana Cuero Amú
Jayveri Astrid Domínguez Castillo
Karen Danitza Espitia Sánchez
Laura Andrea Fuentes Cañón

Asesora interna:

Judith Elena Camacho Kurmen
Química Farmacéutica
EsP. MSc. Dra. en Biociencias

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
TRABAJO DE GRADO
Bogotá D.C.
2019

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a Dios por darme la sabiduría y paciencia para completarlo. A mis padres y a mi hermana a quienes les debo la persona que soy, ya que me enseñaron que la perseverancia es el mejor camino para lograr nuestros objetivos. A la doctora Judith Camacho, por ser una excelente guía, quien nos brindó apoyo incondicional y nos tendió su mano. A mis compañeras y amigas durante toda la carrera Astrid, Andrea y Karen por su paciencia, por no desfallecer, por llenarme de ánimos para seguir adelante, por todo lo que me enseñaron en el ámbito profesional y personal y por ratificar que el trabajo en equipo es el combustible que permite a la gente común lograr excelentes resultados. **Kelin**

Quiero agradecer primero al eje central de mi vida, a Dios, por permitirme llegar tan lejos, por darme las fuerzas necesarias y el valor para siempre continuar. Sin lugar a dudas el amor de Dios y su bondad no tienen fin. A mi mami, hermano y a mi bello ángel, mi polo a tierra y mi más grande orgullo, este logro es de ustedes, gracias por el apoyo, el respaldo, y demostrarme que el amor no tiene límites. A Yei por su paciencia, por recordarme siempre que uno puede ser vencido, pero dos pueden resistir ¡La cuerda de tres hilos no se rompe fácilmente!. A mis familiares, la gratitud es enorme, gracias por nunca dejarme sola, por las buenas energías, y confirmarme que mi más grande bendición s ustedes. **LOS AMO. Jay**

Este trabajo se lo dedico a Dios, por ser mi guía y demostrarme que hay que tener paciencia y no acelerarse, porque todo llega a su tiempo, por darme la oportunidad de vivir esta etapa de mi vida. También quiero dar gracias a mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional durante toda la carrea, a mi tía Margoth por ser mi guía, mi inspiración y por haberme ayudado a escoger esta carrera tan maravillosa, a mi familia que me ha dado apoyo para seguir adelante y tener un mejor futuro. A mis amigas Andrea, Astrid y Kelin que me han apoyado en esta formación como profesional. **Karen**

Dedico este trabajo a Dios y la virgencita María por qué siempre me dieron fortaleza y fuerza para poder lograr este gran reto, a mi mamita porque gracias a ella hoy puedo ser una gran profesional, a mis hermanos, tíos, abuelitos en especial a Miyito quien con sus palabras de aliento siempre me animo, y a mi tesoro porque sin él definitivamente nunca lo hubiese logrado, siempre estuvo apoyándome, aguantándome y trasnochando a mi lado para que este gran sueño se hiciera realidad y a cada una de las personas que directa o indirectamente me ayudaron; muchas gracias. **Andrea**

AGRADECIMIENTOS

“Más valen dos que uno, porque obtienen más fruto de su esfuerzo. Si caen, el uno levanta al otro “. Eclesiastés 4:9-10

Damos infinitas gracias a Dios por habernos permitido cumplir nuestro gran sueño profesional y con los objetivos propuestos en nuestra investigación, por darnos paciencia, sabiduría y comprensión para llevar a cabo cada una de nuestras metas.

Agradecemos a nuestra asesora la Doctora Judith Elena Camacho Kurmen, por su apoyo incondicional, consejos, paciencia y sobre todo por brindarnos tanto conocimiento no solo académico sino también personal, por enseñarnos a ser mejores profesionales cada día y por brindarnos tantas palabras de aliento cuando más lo necesitábamos. Al Grupo Bioprocesos y control por dar el apoyo logístico y material para la realización de este proyecto.

Agradecemos infinitamente a Jorge Alberto Rodríguez Orjuela técnico de laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana, por haber direccionado esta investigación, por siempre brindarnos su apoyo y conocimientos, por enseñarnos lo que es un verdadero profesional a través de las grandes virtudes que lo caracterizan, y su mayor virtud la paciencia ante los diversos fracasos que se presentaron.

Al doctor Luis Eduardo Díaz docente de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana quien direccionó a través de sus consejos esta investigación y nos apoyó incondicionalmente.

Agradecemos a nuestros padres y familiares por ese apoyo incondicional porque sin ellos este sueño no sería posible, siempre estuvieron llenándonos de fuerza y valentía, además de ello nos llevamos gran parte de sus enseñanzas, valores y principios que nos forman cada día.

De igual manera agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y en especial al semillero de Investigación Bioprocesos y Control por abrirnos las puertas y formarnos como los mejores profesionales, así mismo a la Universidad de la Sabana por darnos tan grande oportunidad.

Finalmente queremos agradecer a todas aquellas personas que directa o indirectamente nos apoyaron durante nuestra formación como profesionales.

TABLA DE CONTENIDO

TÍTULO.....	1
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	5
ANTECEDENTES.....	5
MARCO TEÓRICO	20
Estrés oxidativo	20
Antioxidantes.....	20
ASTAXANTINA	21
<i>Haematococcus pluvialis</i>	26
CLOROFILA.....	33
DISEÑO METODOLÓGICO	36
GENERALIDADES.....	36
METODOLOGÍA.....	37
Fase 1	37
Fase 2.....	41
Fase 3.....	41
Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS	43
Cinética de crecimiento y acumulación final de biomasa.....	43
Cambios morfológicos presentados durante el estudio.	50
Observación macroscópica de los cultivos de <i>H. pluvialis</i> en BBM y RM bajo condiciones de estrés.....	53
Producción de astaxantina y clorofila	57
Astaxantina y clorofila en el medio BBM.....	58
Astaxantina y clorofila en el medio RM.....	61
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES.....	79
PARTICIPACIÓN EN EVENTOS	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

INDICE DE GRAFICAS

Grafica N° 1 Cinética de crecimiento celular en medios de cultivo Rudic's medium (RM) y Bold basal medium (BBM) durante 15 días.....	45
Grafica N° 2: Acumulación totalde biomasa (expresada en cel/mL) de todos los tratamientos, obtenidas el día 30 de ensayo (15 días de inducción de estrés). Se encuentran clasificadas por luz (blanca y azul), medio de cultivo (BBM y RM) y la concentración de acetato de sodio utilizada. El control hace referencia a los tratamientos a los cuales no se les proporcionó acetato de sodio.....	48
Grafica N° 3: Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.248 mg/mL de acetato de sodio (AS),irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.	58
Grafica N° 4 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.310 mg/mL de acetato de sodio (AS),irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.	59
Grafica N° 5 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.372 mg/mL de acetato de sodio (AS),irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.	60
Grafica N° 6 producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.248 mg/mL de acetato de sodio (AS), alta irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.	62
Grafica N° 7 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.310 mg/mL de acetato de sodio (AS) irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.....	63
Grafica N° 8: Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.372 mg/mL de acetato de sodio (AS)irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.	64
Grafica N° 9 Concentraciones finales de astaxantina (expresada en $\mu\text{g/mL}$) de todos los tratamientos, obtenidas el día 30 de ensayo (15 días de inducción de estrés). Se clasifican por luz (blanca y azul), medio de cultivo (BBM y RM) y la concentración de acetato de sodio utilizada donde el control hace referencia a los tratamientos que no se les proporcionó acetato de sodio al medio de cultivo. ANOVA con un 95% de confianza.	66

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Estructura química de la astaxantina ³	22
Figura N° 2: Posición superior de astaxantina en la membrana celular ⁴¹	23
Figura N° 3: División celular y ciclo vital de <i>H. pluvialis</i> ⁵⁵	28
Figura N° 4: Ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i> a) célula vegetativa flagelada, b) palmella, c) Célula intermedia, d y f)Aplanospora ⁵	29
Figura N° 5: Trayectoria de la luz y de los ciclos luz oscuridad ⁵⁹	31
Figura N° 6: Ruta de biosíntesis del carotenoide astaxantina en <i>H. pluvialis</i> ²	32
Figura N° 7: Estructura química de la clorofila y la astaxantina ⁶⁹	34
Figura N° 8: Ecuacion para hallar la concentración de Cel/mL	41
Figura N° 9: Preinoculo de <i>H.pluvialis</i> en medio Volvox.....	43
Figura N° 10: Biorreactores en luz blanca durante la fase de crecimiento.....	44

TÍTULO

Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*.

RESUMEN

H. pluvialis es una microalga productora de astaxantina, carotenoide, utilizado en la industria pecuaria, alimentaria y nutracéutica, es por ello que propone determinar las condiciones adecuadas para su producción. Se realizó el cultivo en medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con CO_2 al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8. Posteriormente, se realizó el recuento de biomasa y la evaluación morfológica en hemocitómetro. La cuantificación de clorofila y astaxantina se realiz por espectrofotometría.

Se obtuvo un crecimiento en el medio BBM, de 3.80×10^4 cel/ml, sin diferencias significativas con el medio RM (F:0.7871; P:0.376; GL:2). La biomasa a los 30 días fue de 2.49×10^5 cel/mL y 1.55×10^5 cel/mL en medio BBM y RM respectivamente. Se obtuvo una mayor concentración de astaxantina en el medio RM ($5.06 \mu\text{g/mL}$) significativamente más eficiente para la producción (F=52.74; P=<0.0001; GL=1), en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como factores de estrés.

En cuanto la clorofila, se obtuvieron $29.45 \mu\text{g/mL}$ al utilizar luz azul, alta irradianza y 0.310mg/mL de acetato de sodio en medio RM. La morfología observada fue vegetativa, palmella y enquistante (aplanóspora).

Se concluye que la luz azul, el acetato de sodio a 0.372mg/mL y alta irradianza inducen una mayor síntesis de astaxantina por *H. pluvialis*.

Palabras clave: microalga, factores de estrés, carotenoide, luces de colores, estrés salino irradianza.

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto se basa en la implementación de condiciones de cultivo que favorecen la síntesis biotecnológica de astaxantina, contribuyendo de forma positiva a las industrias que comercializan este carotenoide. *Haematococcus pluvialis* brinda la posibilidad de producir grandes cantidades de astaxantina a costos moderados y debido a su naturaleza biológica, el potencial de brindar múltiples beneficios a la salud humana y animal, siendo por tanto un compuesto de alto valor agregado. Las diferentes investigaciones que se han llevado a cabo posteriormente enfatizan su rol como antioxidante, antiinflamatorio y como suplemento vitamínico. Si bien se han buscado nuevas alternativas de obtención a partir de una gran variedad de organismos, la síntesis biológica de astaxantina continúa siendo costosa, lo que dificulta su escalamiento a nivel industrial, por tal razón en el mercado este carotenoide se encuentra principalmente en forma sintética; sin embargo, esta astaxantina se caracteriza por un poder bajo bioactivo y su consumo está destinado principalmente a la industria pecuaria.

A lo largo del tiempo se han buscado metabolitos que aporten beneficios a la salud y que su producción vaya de la mano del desarrollo sostenible y además de ello que sean de bajo costo de producción y comercialización para las diferentes industrias. La astaxantina es uno de estos metabolitos, ya que genera impactos positivos en la fisiología y la salud de diferentes especies biológicas tales como el efecto preventivo del cáncer, incremento de la respuesta inmune e inhibición de los radicales libres¹ debido a su potencial como antioxidante; siendo utilizada principalmente como suplemento alimenticio en la industria pecuaria.

Existen diferentes maneras de obtener este antioxidante como lo son: la síntesis química y la síntesis biológica esta última a partir de diversos microorganismos, la cual genera rendimiento per cápita considerable (teniendo en cuenta los indicadores socioeconómicos del país). Sin embargo, debido a que la astaxantina química no presenta tantos beneficios como la producida naturalmente, es necesario la implementación de diversas alternativas que fomenten la síntesis biológica a partir de microorganismos como cianobacterias, levaduras y microalgas, ya que estas poseen un poder bioactivo y una estabilidad mayor.

Han sido muchos los estudios que se han llevado a cabo buscando el factor de estrés más adecuado para la producción de astaxantina entre ellos se encuentran el estrés salino, la irradianza, pH, temperatura, agitación, la concentración de nitrógeno, fósforo, dióxido de carbono, minerales, entre otros. Del mismo modo, son empleados diferentes medios de cultivo como el Bold's basal Medium (BBM), Rudic's medium (RM), BG-11, BG11 modificado, Bold's basal Medium modificado (MBBM) y Medio optimizado para *Haematococcus pluvialis* (OHM) para generar el desarrollo de biomasa de *H. pluvialis*.

Es importante resaltar que esta microalga es de difícil cultivo; debido a que tiene un crecimiento lento y un ciclo de vida complejo, por ende se ve afectada la obtención del pigmento en cantidades de interés.

El factor de estrés acetato de Sodio (CH_3COONa) ha sido utilizado ampliamente en diferentes concentraciones como inductor de la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis*; estudios anteriores determinaron que la concentración del acetato de sodio aumenta la producción astaxantina, es por eso que el presente trabajo pretende definir la concentración óptima de acetato de sodio, irradianza y color de luz (blanca o azul) para este fin.

En los últimos años se han investigado los beneficios que tiene la astaxantina; este carotenoide, brinda muchos beneficios para la salud, además genera el color naranja en el salmón y langostinos (acuicultura), estos peces a pesar del alto nivel endógeno de astaxantina que poseen no tienen la capacidad de sintetizarla. Por esta razón para la cría de este tipo de animales es necesario suministrar una cierta cantidad de este carotenoide, pero debido a que los costos de producción son elevados su uso se ve limitado.

Actualmente la principal fuente de astaxantina es la síntesis química de alto costo. Por esta razón, se hace necesaria la implementación de estrategias que vayan de la mano con el desarrollo sostenible y que tengan un menor costo de producción; adicionalmente, debido a su naturaleza, la astaxantina sintética poseen un poder bioactivo considerablemente menor que la astaxantina producida biológicamente y por dicha razón, esta última genera una mayor demanda por parte de los consumidores. Debido a la importancia de *H. pluvialis* para su síntesis de astaxantina, es necesario

establecer las condiciones adecuadas, utilizando diferentes factores de estrés, para que se produzca el carotenoide en concentraciones altas, de tal manera que los costos de producción sean bajos y la obtención se dé en el menor tiempo posible. Por lo tanto, se pretende por medio de esta investigación reforzar y profundizar los conocimientos sobre el cultivo de *H. pluvialis* en medios RM Y BBM, y los factores de estrés como acetato de sodio, alta irradianza, y color de luz, que favorezcan el aumento de la cantidad de astaxantina sintetizada.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer el efecto del factor de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz sobre la producción de astaxantina en *H. pluvialis*.

Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM, bajo el efecto de las condiciones de crecimiento y factores de estrés ensayados.
- Determinar la producción de astaxantina y clorofila en el cultivo y su relación con la concentración de acetato de sodio, alta irradianza y color de luz.
- Establecer el cambio morfológico de *Haematococcus pluvialis* presentado durante el tiempo de cultivo, bajo los efectos de los factores de estrés ensayados.

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

En la actualidad el uso de astaxantina como suplemento nutricional se ha incrementado rápidamente en la industria de alimentos, nutracéuticos y productos farmacéuticos, entre otras. Las fuentes naturales de astaxantina son algas, levaduras, salmón, trucha, krill, camarones y cangrejos de río³.

H. pluvialis, también conocida como *H. lacustris* o *Sphaerella lacustris* es una microalga verde dulceacuícola y unicelular, de distribución geográfica amplia (especialmente en América del Norte y Europa) que presenta la capacidad de sintetizar astaxantina^{4,5}.

“Estudios que datan de la década de 1950 describieron las principales condiciones desencadenantes para la acumulación de astaxantina en células de *H. pluvialis*, como la alta intensidad de luz, estrés salino, limitación de nutrientes y la adición de acetato de sodio como una fuente de carbono orgánico”⁶.

A lo largo del tiempo se han realizado diversos estudios con el fin de determinar la respuesta de *H. pluvialis* a factores de estrés que generan cambios morfológicos y aumento de la acumulación de astaxantina en la misma. En la tabla n°1 se muestran algunas de estas investigaciones.

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, <i>H. pluvialis</i>	Cultivo en medio Basal, (pH 6.8) e inducción de estrés con acetato de sodio 2.25 M , Fe ²⁺ (22.5 mM, pH 1.5) e intensidad de luz de 1.5 a 8.6 klx.	Cambio morfológico de células vegetativas a células de quistes.	Astaxantina: 1.28 mg g ⁻¹ . Cambio morfológico del 90% de las células.	Hemocitómetro. Método de Bradford. Cromatografía en capa fina.	Kobayashi M, Karizono T and Naga S, 1993 Japon ⁷ .
Comparison of the accumulation of astaxanthin in <i>H. pluvialis</i> and other green microalgae under N-starvation and high light conditions.	Cultivo MBBM : -pH 4.0 -Estrés salino: cloruro de sodio 300mM y 600mM, acetato de sodio 100nM -Alta intensidad de luz (350 μmol fotones m ⁻² s ⁻¹) -Cultivo sin fuente de nitrógeno.	Producción de biomasa, astaxantina y otros pigmentos por las microalgas en estudio.	Astaxantina: 22.5 mg g ⁻¹ obtenida por <i>H. pluvialis</i> .	Espectrofotometría HPCL (cromatografía líquida de alta eficiencia).	Orosa M, Valero JF, Herrero C y Abalde J. 2001. España ⁸ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced astaxanthin Formation in the Green Alga <i>H. pluvialis</i>.	Medios suplementados con acetato de sodio 45mM y sulfato ferroso 450µM como condición de estrés. Adición de viologeno de metilo. Incremento de la intensidad de luz.	Expresión de los genes para la biosíntesis de fitoeno sintasa (PSY) y carotenoide hidroxilasa (BKT).	13.5 mg g ⁻¹ de astaxantina y 80% de células enquistadas. Aumento de la expresión de los genes que codifican para PSY y BKT.	Northern Blot. HPLC.	Steinbrenner J y Linden H. 2001. Alemania ⁹ .
Influence of stress on astaxanthin production in <i>H. pluvialis</i> grown under different culture conditions.	-Estrés salino: cloruro de sodio 0.25, 0.5 1.0 y 2.0 % w/V y acetato de sodio al 2.2 mM -Fuentes de nitrógeno: nitrato de calcio, nitrato de potasio, nitrato de amonio y nitrato de sodio al 10% pH: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0.	Biomasa y el contenido de clorofila y astaxantina.	NaCl y acetato de sodio: 1,2 w/w y astaxantina. Nitrato de calcio: 8 mg/L de astaxantina pH 7: se obtuvo la mayor producción.	Hemocitómetro. Espectrofotometría. HPLC.	Sarada R, Tripathi U y Ravishankar GA. 2002. India ¹⁰ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	de	Parámetros de seguimiento	de	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in <i>H. pluvialis</i>.	NaNO ₃ 0,15 g/l, acetato de sodio a concentraciones de 0%, 0.25%, 0.5%, 1% y 2% (p / v), pH a 7.0, temperatura 18 ± 1 ° C y 68,25 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ , con un ciclo de oscuridad: luz de 12:12 h.		Crecimiento celular y la síntesis de pigmentos.		Astaxantina: 0.80% p / v con acetato de sodio al 2%.	Espectrofotometría. HPLC Hewlett Packard.	Orosa M, Franqueira D, Cid A y Abalde J, 2005, Universidad de Coruña ¹¹ .
Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga <i>H. pluvialis</i>.	Intensidad de luz blanca (80-170 mE m ² s ⁻¹) y acetato de sodio de 40 a 70mM.		Aumento en la tasa de crecimiento expresada en g/L por día realizando dos experimentos.		Primer experimento: a 120 mE m ² s ⁻¹ y acetato de sodio a 40 mM obtuvieron 0,138 g/L por día.. Segundo experimento: a 170 mE m ² s ⁻¹ y acetato de sodio a 30 mM se obtuvo 0,243 g/L por día.	Espectrofotometría Cromatografía iónica.	Jeon YC, Cho CW, Yun YS, 2006 ¹² .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Effect of different culture media and light intensities on growth of <i>H. pluvialis</i>.	Cultivo a 25°C con aireación continua Medios de cultivo: BG11, BG11 modificado, OHM (optimal <i>Haematococcus media</i>), basal médium y RM (rudic's medium) Intensidades de luz: 40, 50 y 60 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.	Biomasa de <i>H. pluvialis</i> en diferentes medios de cultivo e intensidades de luz.	Medio RM: biomasa de 9.5×10^5 cel ml ⁻¹ Medio MBBM: 8.85×10^5 cel ml ⁻¹ de biomasa.	Conteo en Cámara de Neubauer.	Imamoglu E, Vardar F y Conk M. 2007. Turquía ¹³ .
Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga <i>H. pluvialis</i> under nutrient stress conditions.	Se incubaron a 25 ° C bajo un ciclo de 16/8 h luz / oscuridad, intensidad de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante un período de 7 días. Fueron sometidos a: NaCl 17.1 mM, acetato sódico (SA) 4.4 mM y NaCl 17.1 mM y SA 4.4 mM (NaCl / SA).	Producción de astaxantina	Astaxantina: 15.7, 6.8, 21.8 y 24.5 mg g ⁻¹ producidos por cultivos de control, NaCl, SA y NaCl / SA, respectivamente.	Espectrofotometría.	Vidhyavathi , Venkatachalam, Sarada and Ravishankar, 2008 india ¹⁴ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga <i>H. pluvialis</i>.	Iluminación mediante lámparas fluorescentes de luz diurna estandar (18W), burbujeo de aire continuo. Cultivo en RM libre de nitrógeno con 100mM de acetato de sodio.	Concentración de astaxantina.	Astaxantina: 27.53mg g-1 y en medio libre de nitrógeno 26.93g.	Matraz con medidor cuántico (Lamba L1-185). Espectrofotometría.	Esra Imamoglu, Meltem Conk Dalay and Fazilet Vardar Sukan, 2009 Turkey ¹⁵ .
Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo diferentes condiciones de estrés.	Objetivo del presente artículo fue realizar una revisión acerca de los diferentes factores de estrés que pueden ser utilizados en <i>H. pluvialis</i> .	Eficiencia de diferentes factores de estrés sobre <i>H. pluvialis</i> al igual que los genes implicados en la carotenogénesis.	El acetato de sodio, fosfatos, nitrógeno, intensidad de luz, entre otros, aumentan la producción de astaxantina y la expresión de genes.	Revisión bibliográfica.	Camacho JE, González G y Klotz B, 2013 ² .
Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications.	Tratamiento de acidos, acido clorhídrico durante 15-30 minutos. Acetona al 40% a 80°C durante 2 minutos.	Porcentaje de rendimiento de astaxantina con tratamiento de diferentes ácidos.	Porcentajes de astaxantina de 80% con ácido clorhídrico y 70% con acetona.	Cromatografía líquida.	Ambati RR et al., 2014 ³ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing <i>H. pluvialis</i> under various stress conditions.	Condiciones de estrés: acetato (Ac), Fe ²⁺ y con luz alta (HL), y luego se aplicaron metabólicamente GC-MS y LC-MS.	-Acumulación de astaxantina - Producción de biomasa en <i>H. pluvialis</i> - Mecanismos moleculares responsables de la acumulación de astaxantina.	2 días después de aplicar el estrés: 3,44 µg/ml de astaxantina. 2.03 µg/ml, 41% menos que después de 2 días de tratamiento.	HPLC usando una columna de partículas Synergi Hydro-RP.	Yingxue Su et al, 2014 ¹⁶ .
Accumulation of astaxanthin by a new <i>H. pluvialis</i> strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia).	Cultivo en medio BG11 y condiciones estresantes (alta luz, nitrógeno y privación de fósforo).	-Acumulación de astaxantina -Cambio morfológico	Astaxantina: 3% al 5.5% del peso seco de la celda (DW).	Hemocitómetro. Espectrofotómetro Agilent Cary 300.	Konstantin C, Elena L , Irina S, Larisa S, Roman S, y Alexei S (2014) Lomonosov Moscow State University ¹⁷ .
Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga <i>H. pluvialis</i>.	-Pretratamiento con ácido clorhídrico -Extracción con: acetona, disolventes de mezcla de hexano/ isopropanol, metanol y aceite de soja.	Se registró la morfología de las células de <i>H. pluvialis</i> antes y después de la extracción.	Pretratamiento con ácido clorhídrico 19.8 mg / g-cell Extracción con metanol 13.8 mg / g-cell. Extracción con acetona: 0.9 mg/g-cell.	HPLC Microscopio electrónico de barrido método H-RMN.	Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. (2014) ¹⁸ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of <i>H. pluvialis</i> during a light–dark cyclic cultivation.	Se utilizó un biorreactor de columna , medio basal con 10 mM de acetato de sodio, temperatura de 25°C, agitación a 40 rpm, pH entre 7.5 y 8 y aireación a 0.04 vvm.	Concentración de biomasa y astaxantina.	La biomasa neta de 2.34 g/L/d y de astaxantina 60 mg/L/d.	Método modificado de Boussiba.	Wan M,Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y,Huang J, and Wang J 2014,China ¹⁹ .
Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in <i>H. pluvialis</i> (Chlorophyceae).	No se determinaron factores de estrés.	Relación entre la síntesis de astaxantina y los ácidos grasos.	3.92 y 7.65 mg g ⁻¹ de astaxantina.	HPLC y cromatografía de gases.	Guanqun C, Baobei W, Danxiang H, Yinghua L, Feng C and Qiang H. (2015) Arizona, USA ²⁰ .
Transcriptome Analysis in <i>H. pluvialis</i>: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA).	Producción de astaxantina mediante la inducción de ácido salicílico (SA) o ácido jasmónico (JA).	Interpretación de las principales vías bioquímicas y la transducción de señales.	Psy, pds, zds y crt R-B regulados por incremento y pds, zds, crt R-B se regularon positivamente.	Illumina Hiseq 2000.	Xiaowen Z et al. (2015) PLOS ONE, China ²¹ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Condiciones de producción de astaxantina por <i>H. pluvialis</i>: Revisión bibliográfica 2003-2013.	La combinación de medio BAR suplementado con 1 g/L de acetato de sodio, iluminación continua (345 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y aireación (1.5 % CO_2).	Se evaluó la producción de astaxantina.	Máxima producción de astaxantina. Concentraciones de hasta 390 mg/L.	Revisión bibliográfica.	Romo CJ, Alcatran LA y Hurtado LA, 2015 ²² .
Astaxanthin from <i>H. pluvialis</i> Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity.	Disolvente DMSO CO_2 para la extracción Prueba de MTT, se basa en la reducción de la sal tetrazolio.	Prevención del estrés oxidativo por la astaxantina en células endoteliales humanas.	Se identificaron picos de 400 nm como monoesteres de astaxantina.	Cromatografía líquida. (HPLC-DAD) y HPLC.	Régnier P et al., 2015 ²³ .
A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga <i>H. pluvialis</i>.	-Intensidad de luz 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. -Acetato de sodio 20mM con nitrato y sin nitrato -Carbonato de sodio 40 mM con nitrato y sin nitrato.	Monitoreo de la producción de biomasa y muerte celular, cambios morfológicos de las células y la cantidad de astaxantina y clorofila producidas.	Se mejoró de 2.5 mg L ⁻¹ day ⁻¹ (normal) a 10.5 mg L ⁻¹ day ⁻¹ la producción de astaxantina. Biomasa de 1.1 g L ⁻¹ dw con acetato de sodio y fuente de nitrógeno.	Espectrofotometría Western Blot Fluorescencia HPLC.	Zhang Z, Wang B, Hu Q, Sommerfeld M, Li Y y Han D. 2016. China ²⁴ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Biofilm cultivation of <i>H. pluvialis</i> enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities.	Uso de luz continua e irradiaciones máximas de 230 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas y medio de cultivo para suspensión y cultivos inmovilizados fue BG11-H modificado.	Número de células para biofilms.	Astaxantina a los 8 días: 0.8% de peso seco. Astaxantina máxima (14 días): 1.6 g m^{-2} .	Espectrofotometría Lector de placas Infinite M200, Tecan, Männedorf, Suiza).	Alice Costa Kiperstok, Petra Sebestyén, Björn Podola, & Michael Melkonian, 2017 Germany ⁶ .
Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in <i>H. pluvialis</i>: Organic and inorganic.	Se utilizó medio NSIII, pH 7.0, temperatura a 25°C, intensidad de la luz 104 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16: 8 h, 2% de CO ₂ . Condiciones de estrés: acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de magnesio y bicarbonato de sodio a concentraciones de 10, 50, y 100 mM.	Cantidad de biomasa y concentración de clorofila y astaxantina	Astaxantina más elevada: 10 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ con acetato de potasio 100 mM.	HPLC Hewlett-Packard Espectrofotometría.	Pan-utai W, Parakulsuksatid P and Phomkaivon N, 2017, Tailandia ²⁵ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i>.	Se compararon 3 medios de cultivo (RM, OHM y BBM) bajo diferentes condiciones de estrés (pH, fotoperiodo 18:6, CO2 5% y agitación).	Mejor productividad de biomasa y astaxantina.	Crecimiento y producción de astaxantina en el medio RM con $7,5 \times 10^5$ cel/ml y 8.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.	Conteo en cámara de Neubauer.	Castillo CM, Rivera FC, Lancheros AG, 2017, Bogotá ²⁶ .
Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of <i>H. pluvialis</i>.	Cultivo por etapas (SC). La intensidad de luz inicial de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la relación de luz mixta de rojo y blanco se estableció en 3: 1, 2: 1, 1: 1 y 1: 2. Acetato de sodio como fuente de carbono orgánico.	Concentración de biomasa	Máxima concentración de biomasa de $0.73 \pm 0.03 \text{ g/L}$.	Método fed-batch.	Han Sun, Bin Liu, Xue Lu, Ka-Wing Cheng, Feng Chen, (2017) China ²⁷ .
Transcriptome Analysis in <i>H. pluvialis</i>: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺.	Se utilizó el medio BBM a 22°C, ciclo de luz y oscuridad 12h:12h, intensidad de luz $195 \mu\text{Em m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 2g/L de acetato y 20 μM Fe ²⁺ .	Mecanismos de inducción para la producción de astaxantina por medio de la expresión de genes.	Expresión de los genes implicados en la producción de astaxantina	PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real.	Bangxiang H et al 2018 China ²⁸ .

Tabla N°1: Estudios de *H. pluvialis* bajo diferentes factores de estrés

Título del estudio	Condiciones de estrés	Parámetros de seguimiento	Resultados del estudio	Método de análisis	Referencias
Investigation on models for light distribution of <i>H. pluvialis</i> during astaxanthin accumulation stage with an application case.	- 150 mM de acetato de sodio - 25µmol/m ² .s de iluminación.	-Concentración de biomasa -Producción de astaxantina -Influencia de la biomasa y la astaxantina en la absorbancia y dispersión de la luz.	Biomasa: 2.5 g/L Astaxantina: 3.04%.	-Peso seco -HPLC.	Shenga B et al. (2018) University of Science and Technology, Shanghai ²⁹ .
Enhanced astaxanthin Accumulation in <i>H. pluvialis</i> Using High Carbon Dioxide Concentration and Light Illumination.	CO ₂ al 0.04%, 5% y 15% Alta intensidad de luz.	Producción de astaxantina y biomasa.	astaxantina: 36 mg/g al usar alta intensidad de luz y 15% de CO ₂ .	Espectrofotometría.	Christian D, Zhang J, Sawdon AJ, Peng C. (2018). University of Idaho, Moscow ³⁰ .

Fuente: Elaborada por autoras.

Los estudios anteriormente descritos en la tabla N° 1 corresponden a una revisión bibliográfica, en los cuales se citan algunos factores de crecimiento y de estrés que influyen de forma directa en *H. pluvialis* e inducen en la misma una mayor producción de astaxantina.

Kobayashi y su grupo de investigación⁷ en el año 1993 usaron como condición de estrés acetato de sodio en concentración de 2.25 M que permitió la obtención de 1.28 mg g⁻¹ de astaxantina; así mismo se implementó esta sal sódica en investigaciones realizadas posteriormente^{8,9,11,12} teniendo como resultado alta producción de astaxantina en todos los estudios.

Steinbrenner y colaboradores⁹ en el 2001 concluyeron que el acetato de sodio en combinación con sulfato ferroso y aumento de la intensidad de la luz permitían obtener grandes cantidades de carotenoide (13,5 mg g⁻¹ peso seco después de 72 h).

En cuanto a otros factores de estrés se puede mencionar la acetona³, la cual indujo la síntesis de astaxantina en un 70%. Por último, Vidhyavathi y colaboradores¹⁴ en el 2008 afirman que en respuesta a condiciones desfavorables para la microalga tales como alta intensidad de la luz, salinidad, y agotamiento de nutrientes, se produce la efectiva acumulación de pigmentos. Durante este estudio se añadió estrés salino (en el cual principalmente se utilizó cloruro de sodio), obteniendo 15.7 de mg g⁻¹, baja cantidad, en comparación con el medio al cual se le adiciono estrés salino (acetato de sodio y NaCl en combinación) y NaCl.

En el 2018 se realizó una investigación en la Universidad de Ciencia y Tecnología de Shanghái²⁹ sobre la influencia de la luz y acetato de sodio como condiciones de estrés, y se concluyó que el cultivo *H. pluvialis* fue capaz de producir 3.04% de carotenoide.

En el cultivo de microalgas el dióxido de carbono (CO₂) constituye un componente importante para la producción de energía de las mismas y consecuentemente su metabolismo celular; por dicha razón es importante regular el aporte de este compuesto al medio de cultivo, Christian y colaboradores³⁰ en el 2018 implementaron múltiples concentraciones de CO₂ con el fin de determinar la indicada para la máxima producción de astaxantina y determinaron que al usar un 15% de CO₂ en combinación con alta intensidad de luz podrían llegar a producir hasta 36 mg/g de astaxantina. Sin embargo, la mayoría de estudios usan bajas concentraciones de CO₂^{22, 25, 26}

Así mismo, se ha determinado que el medio de cultivo influye directamente en la concentración de biomasa de *H. pluvialis* obtenida, por lo tanto, a lo largo del tiempo se han usado medios como MES volvox, BBM, RM, BG11, BG11 modificado, OHM y basal medium (ver tabla N°1). En el año 2007 Imamoglu et al¹³, realizaron la comparación del crecimiento celular de *H. pluvialis* múltiples medios de cultivo y como resultado obtuvieron que la mayor biomasa (9.5×10^5 cel ml⁻¹) era producida en el medio RM (Rudic's medium).

La producción de astaxantina en *H. pluvialis* está mediada por genes involucrados en la ruta metabólica de los carotenoides, dentro de la cual se encuentran genes de interés como lo son los codificantes para fitoeno desaturasa (PDS), licopeno β -ciclase (LCY), fitoeno sintasa (PSY) licopeno ciclase (LCY), β -caroteno ketolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CHY)^{2, 31}. La relación de los genes para la fitoeno desaturasa (PDS) y la β -caroteno hidroxilasa (CHY) y el estrés inducido en *H. pluvialis* a través del tiempo fue evaluada por Steinbrenner et al⁹, y observaron que a partir de la inducción de estrés en la células, la expresión de estos dos genes fue directamente proporcional a la producción de astaxantina a través de los días.

La información plasmada en la tabla N°1 permiten la orientación sobre los factores de estrés que podrían ser determinantes en el desarrollo de *H. pluvialis* y que contribuyen en el planteamiento de nuestra investigación, puesto que uno de los factores de estrés de mayor eficiencia es el acetato de sodio.

MARCO TEÓRICO

Estrés oxidativo

El oxígeno, a pesar de ser esencial para la vida de múltiples organismos, ejerce efectos dañinos a nivel celular debido a los denominados radicales libres que se producen tras el metabolismo oxidativo celular y actúan directamente sobre la integridad y funcionalidad de estructuras celulares al producir reacciones en cadena; dicha reactividad de los radicales libres se debe a que poseen electrones desapareados en la última órbita, lo que los hace inestables y les permite reaccionar con cualquier molécula oxidandola de esta manera. No obstante, el cuerpo tiene mecanismos para contrarrestar estos radicales libres llamados antioxidantes que actúan como un sistema de defensa; algunos ejemplos son el ascorbato, ubiquinol y enzimas que actúan de forma coordinada con el fin de proteger la célula; pero cuando el equilibrio entre antioxidantes y radicales libres se pierde se da el proceso nocivo llamado estrés oxidativo. Dicho proceso no es causado únicamente a nivel interno del organismo, también es producido externamente por factores ambientales tales como la radiación ultravioleta, contaminación del aire y algunos alimentos como aceites vegetales entre otros³².

Este estrés oxidativo puede generar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, diabetes, artritis reumatoide, entre otras. Por estas alteraciones en el organismo, causadas por procesos de oxidación, se requiere el uso de antioxidantes con el fin de anular o mitigar estos procesos de un sustrato oxidable como lo es el DNA, lípido, proteína o cualquier otra molécula^{32,33}. Uno de estos antioxidantes es la astaxantina está protege las neuronas y puede ralentizar los efectos del deterioro cognitivo y deterioro de la función psicomotora relacionados con el envejecimiento³⁴.

Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas o sustancias con mayor afinidad hacia los radicales libres que otras como las proteínas, DNA, lípidos, etc, evitando que estas moléculas se oxiden. La mayoría de los antioxidantes se encuentran en frutas, vegetales, etc³⁵ y también son generados por algunas microalgas, dentro de sus mecanismos de acción se encuentran la acción enzimática, que tiene un efecto catalizador que involucra los radicales libres, o la oxidativa al ceder un electrón al radical libre, volviéndolo menos

reactivo y oxidándose en el proceso³⁶. Este mecanismo antioxidante fue desarrollado evolutivamente por los organismos ya que las reacciones metabólicas oxidativas son importantes e inevitables; estos antioxidantes pueden ser producidos endógenamente por las células del organismo y también se pueden consumir en la dieta (exógenos)³². Dentro de los antioxidantes exógenos se resaltan las vitaminas E y C, el betacaroteno, los flavonoides y el licopeno; por su parte los antioxidantes endógenos se componen principalmente por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), entre otros³⁶.

Los principales efectos beneficiosos de los antioxidantes son la disminución de la oxidación lipídica, proteica y del ADN, y consecuentemente del estrés oxidativo³⁷. Se ha observado que la Astaxantina tiene un poder antioxidante 500 veces mayor que la vitamina E y 38 veces mayor que el β - caroteno ^{24,25}, ya que previene daños oxidativos, apoptosis celular y desarrollo de múltiples enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

ASTAXANTINA

Composición química de los carotenoides

Los carotenoides son compuestos tetraterpenoides, formados principalmente por ocho unidades de isopreno unidos con enlaces dobles. Debido a esta insaturación, son sensibles al oxígeno, algunos metales, la luz y otros compuestos³⁸. Son considerados compuestos indispensables para la vida debido a las funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (captación de luz y fotoprotección³⁹) Estos pigmentos naturales liposolubles se dividen en carotenos, cuando son hidrocarburos y las xantofilas que se caracterizan por tener una o más funciones oxigenadas como aldehído, ácido carboxílico o grupos hidroxilo⁶.

Generalidades de la astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4,4'-diona) es una xantofila, porque dentro de su estructura no sólo contiene carbono e hidrógeno sino también átomos de oxígeno, este tipo de carotenoide secundario, rojo brillante de la misma familia que el licopeno, luteína y β -caroteno, que actúa como colorante y suplemento alimentario. Es sintetizado por algunas microalgas, plantas, levaduras, bacterias, presentes en muchos mariscos, y

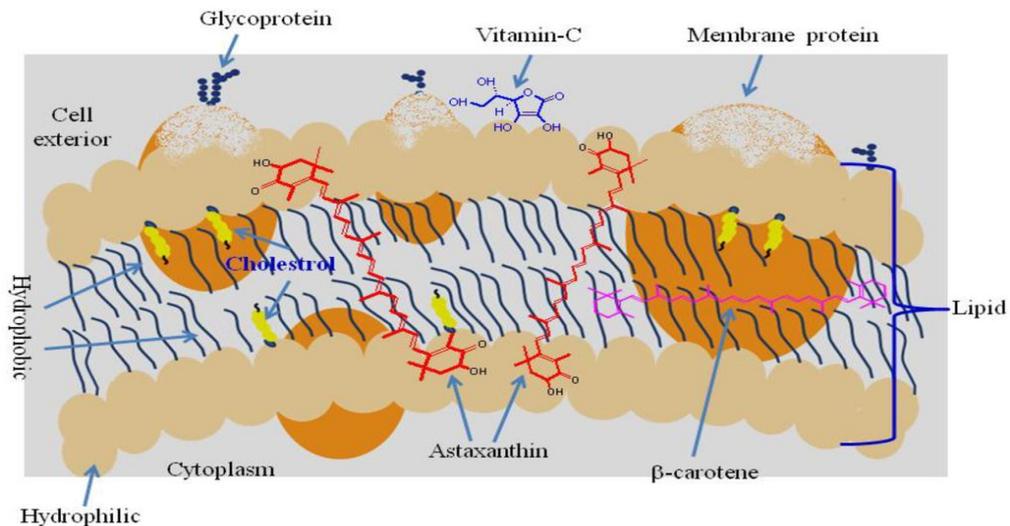


Figura N° 2: Posición transmembranal de la astaxantina: a diferencia de otros antioxidantes, se sitúa en la interfaz lipófila-hidrófila de la membrana lipídica, lo que le confiere su gran poder antioxidante⁴¹.

Funciones en el organismo

La astaxantina, tiene un gran valor científico debido a que posee propiedades antioxidantes, las cuales permiten retardar los procesos de oxidación en el cuerpo que están implicados en lesiones o enfermedades cerebrales, y además hacen parte de la dieta humana. Este pigmento carotenoide puede a su vez modular la respuesta inmune, es antiinflamatorio, previene los efectos de rayos UV y el desarrollo de diferentes patologías². Estas características se deben a que, como se observa en la figura N°2, posee la capacidad de ubicarse en la membrana celular gracias a su naturaleza lipofílica.

Rol en las industrias y aplicaciones comerciales

Los carotenoides son pigmentos precursores de fitohormonas que desempeñan un rol funcional en la fotosíntesis y estabilidad de la membrana celular, dan protección contra el daño fotodinámico y proveen adaptación ambiental; todo esto debido a su potencial como antioxidantes⁴⁶, además son los encargados del color natural amarillo, rojo y anaranjado. Son ampliamente utilizados en la industria cosmética, nutracéutica, farmacéutica, acuicultura, avicultura y de igual manera en la industria alimentaria en el enriquecimiento de alimentos debido a su alta actividad provitamina A, ayudan al fortalecimiento del sistema inmunológico y disminuyen el riesgo de enfermedades

degenerativas. Por tanto, la obtención de estos carotenoides es de gran valor e impacto en industrias anteriormente mencionadas⁴⁷.

La astaxantina además de poseer las funciones previamente descritas tiene la capacidad antioxidante. Este carotenoide actúa de forma específica sobre los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen en el cuerpo durante las reacciones metabólicas y producen daños en los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos constituyentes de la membrana celular⁴¹.

El uso de antioxidantes actualmente genera opciones de gran impacto a nivel científico e industrial, para ser usado con el fin de prevenir e incluso combatir enfermedades degenerativas debido a sus amplios mecanismos de acción en el organismo⁴⁸. La producción de astaxantina a partir de fuentes naturales se ha convertido en una de las actividades más exitosas para la biotecnología, debido a que esta tiene una gran demanda en alimentos, aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas. Además de ello si se obtienen a través de microalgas representan una opción sostenible ya que las mismas no compiten por el uso de tierras agrícolas⁴⁹. Este pigmento se encuentra en presentaciones como cápsulas, extractos, aceites, geles, tabletas, entre otros, al igual que en productos multivitamínicos y en combinación con ácidos grasos²⁶.

Organismos biosintéticos de astaxantina

Como se mencionó anteriormente, la astaxantina se puede encontrar en crustáceos como el krill, la langosta, el camarón y la gamba, en peces como el salmón y la trucha, e incluso en aves como el flamenco; sin embargo, dichos animales al igual que el ser humano no tienen la maquinaria enzimática para sintetizar astaxantina de novo, por lo cual ésta debe ser ingerida por medio de la dieta. Esta xantofila es sintetizada por algunas plantas superiores, la levadura *Phaffia rhodozyma*, el hongo *Xanthophyllomyces dendrorhous* y por una gran variedad de microalgas, dentro de las cuales se resalta a *H. pluvialis*^{37, 50}.

H. pluvialis tiene la capacidad de producir hasta el 5.02% de peso seco celular de astaxantina, la cual se caracteriza de ser de alta calidad debido a que se compone principalmente del isómero 3S, 3'S. Para su producción industrial la microalga es cultivada bajo condiciones de estrés capaces de inducir la acumulación de astaxantina, la cual posteriormente es extraída y purificada. Empresas como la Roche, Sigma,

Cardax Pharmaceuticals, entre otras, producen astaxantina sintética, la cual a pesar de presentar una solubilidad en agua mayor que la astaxantina biosintética, poseen un poder antioxidante limitado debido a que no se encuentra esterificada³⁷.

Métodos de extracción y cuantificación de astaxantina

Debido a que en su estructura química la astaxantina posee un alto contenido de enlaces dobles, esta es susceptible a la degradación por el efecto de la luz, temperatura y oxígeno. Por lo tanto, para garantizar su estabilidad, es necesario que durante su extracción y cuantificación se mantengan condiciones de bajas temperaturas, poca luz y en lo posible en ausencia de oxígeno^{46, 50}.

Extracción: La astaxantina, al igual que otros carotenoides es soluble en solventes orgánicos tales como éter etílico, acetona, metanol, cloroformo, entre otros. En algunos casos es necesaria la previa lisis celular por medio de enzimas líticas y posteriormente se deben calentar las células con el solvente para una mejor extracción. Dentro de las técnicas de extracción más comúnmente usadas se encuentran la técnica de Soxhlet (usa acetona como solvente) y la extracción con fluidos supercríticos⁴⁶.

Cuantificación: La cuantificación de astaxantina se puede realizar por medio de varios métodos; el método espectrofotométrico se basa en la capacidad que presenta este carotenoide de absorber la luz UV (250-550nm), dicha capacidad se la otorga, como se mencionó anteriormente, su estructura rica en enlaces dobles. Por otra parte, la cromatografía de alta resolución, conocida por sus siglas en inglés como HPLC; esta técnica, actualmente es la técnica de selección por parte de la mayoría de investigadores⁴⁶.

Microalgas: Las microalgas son microorganismos eucarióticos unicelulares, cuyo hábitat es acuático (ya sea en aguas saladas o dulces), que utilizan la energía solar con el fin de hacer fotosíntesis para la obtención de materia orgánica como fuente de energía y para la producción de biomasa (al alcanzar la máxima tasa de crecimiento)⁵¹ esto se les facilita debido a que en su medio es relativamente fácil la captación de nutrientes y de CO₂.

En la actualidad, las microalgas son organismos fotosintéticos de elevado valor biotecnológico, industrial, farmacéutico y nutracéutico debido a que pueden presentar

gran variedad de aplicaciones, como la capacidad de producir biodiesel y bioetanol, propiedades para la biorremediación en aguas residuales o ser útiles en la producción de bioproteínas para la alimentación animal y humana, así como también, poseen la característica especial de acumular metabolitos de interés como los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga y los carotenoides^{22,52}.

Las principales microalgas que se utilizan y cultivan comercialmente son *Chlorella byenrinch* y *Aethrospira stizenberger* las cuales son implementadas en alimentos de origen natural; *Dunaliella salina* de la cual se obtiene beta caroteno y *Haematococcus pluvialis* en la obtención del pigmento de astaxantina²³.

Haematococcus pluvialis.

“Haematococcus: El nombre de esta microalga está compuesto por dos partes, **Haemato** debido a su color rojo sangre, **cooccus** puesto que sus quistes son de forma esférica.

pluvialis: este nombre hace referencia a que se puede encontrar en lugares con agua de lluvia”⁴³.

H. pluvialis perteneciente a la clase Chlorophyceae y al orden Volvocales como se aprecia en la tabla N°2, es una microalga unicelular de agua dulce (aunque también existen terrestres y marinas), biflagelada con sus células encapsuladas por una pared ovoide, elipsoide cilíndrica o prácticamente esférica, considerada como la mejor fuente natural del carotenoide llamado astaxantina (siendo capaz de acumular hasta 30 g en peso seco)²¹ y el principal organismo productor comercial²². La síntesis de novo de la Astaxantina tiene lugar en el citosol, acumulándose como pequeñas gotas en el citoplasma (cuerpos lipídicos citosólicos)⁵³.

H. pluvialis es sometida a condiciones de estrés con el fin de promover su cambio morfológico a un estadio en el que pierde la motilidad y cambia a una forma esférica (fase roja o aplanospora).

Después de 24 horas de estrés las células se enquistan, en esta etapa aumentan de tamaño y desarrollan una pared celular resistente llegando a producir cerca del 4% de peso seco. Sin embargo, a pesar de ser una opción con gran potencial, todavía se

requiere mejorar los parámetros de operación para optimizar los rendimientos, así como, disminuir los costos de producción, con el propósito de hacer más competitiva esta fuente natural¹⁵.

Tabla N° 1: Clasificación taxonómica de *H.pluvialis* ^{4,43}

Dominio	Eucaryota
Reino	Viridiplantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Haematococcaceae
Género	<i>Haematococcus</i>
Especie	<i>H. pluvalis</i>

Hábitat natural

H. pluvalis se encuentra distribuido ampliamente en Europa, Canadá y África, excepto en la Antártida; suele encontrarse en la corteza de las rocas, en depósitos de agua o estanques entre otros con altos porcentajes de humedad, se halla en cursos de agua estacionales, cuando las condiciones de ese curso de agua dejan de ser óptimas, esta microalga se enquistada. De igual manera, tiene la capacidad de adaptarse a condiciones desfavorables de luz, temperatura, sales y nutrientes al tener la capacidad de enquistarse rápidamente⁵.

Ciclo de vida

Cuando *H. pluvalis* se encuentra en condiciones desfavorables para su desarrollo como lo son el aumento de temperatura, intensidad de luz, salinidad, irradianza, pH, estrés oxidativo, presencia de nutrientes orgánicos como acetato ó combinación cloruro de sodio/acetato de sodio (estrés salino) y disminución de micronutrientes, se da un

cambio morfológico adoptando un quiste rojo que contiene grandes cantidades de astaxantina².

El ciclo de vida de esta microalga se puede dividir en cuatro etapas:

I Crecimiento de células vegetativas denominadas Macrozooides (zoosporas) que se caracterizan por tener dos flagelos lo que permite su capacidad móvil, forma ovoidea de 8-50m de diámetro⁵⁴.

II Enquistamiento (células de quistes vegetativas a inmaduras); la microalga aumenta de tamaño, entra en fase de reposo rodeada por una gruesa pared cística compuesta principalmente por celulosa⁴³. El proceso I y II se dan gracias a las condiciones inductivas encontradas en el medio⁵⁴.

III Maduración (células quísticas inmaduras a maduras)

IV Germinación (quiste maduro a células vegetativas), aquí ya la astaxantina se encuentra acumulada²⁸.

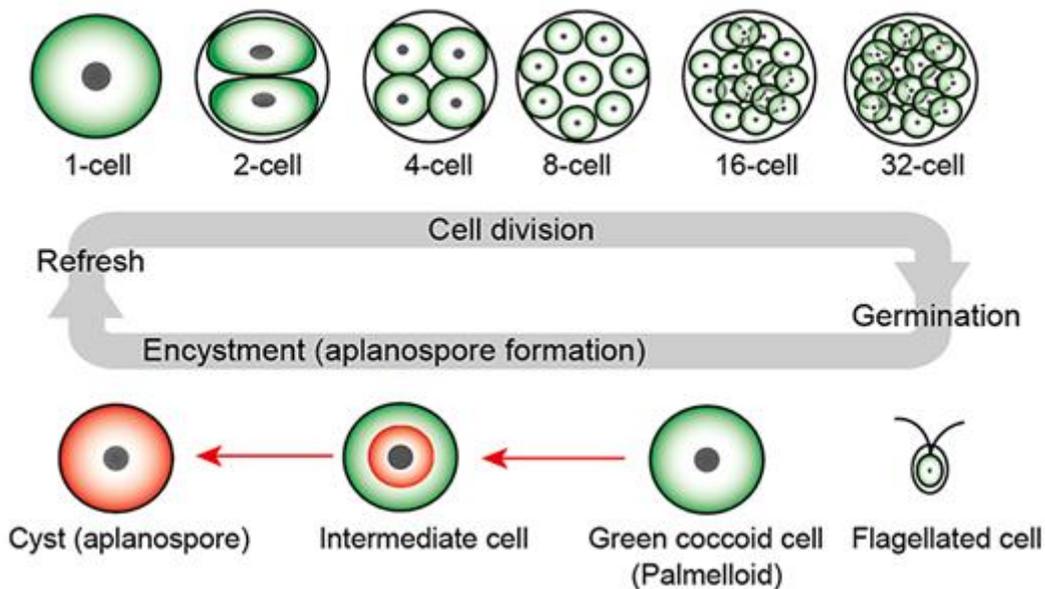


Figura N° 3: División celular y ciclo vital de *H. pluvialis*, que se caracteriza por acumular hasta 32 células, que durante la germinación darán lugar a la formación de células flageladas y finalmente a aplanosporas⁵⁵.

La astaxantina se acumula principalmente en la etapa II y la etapa III²⁸. Como se observa en la figura N°3, en esta etapa la microalga en forma de célula vegetativa

pierde sus flagelos y se denomina palmella; a continuación, se forma el quiste rojo o aplanospora el cual se caracteriza por la acumulación de astaxantina y la formación de una matriz extracelular⁵⁶. Se dan por tanto, cambios en las actividades celulares y en los componentes celulares, caracterizándose por un aumento en el contenido de hidratos de carbono (hasta 63% del peso seco), síntesis de compuestos de bajo requerimiento energético, aumento de lípidos que permiten acumular el pigmento, obteniendo células rojas con un 98% del total de carotenoide y 4% del peso seco celular⁵⁴. Los cambios morfológicos que presenta *H. pluvialis* se pueden evidenciar en la figura N°4.

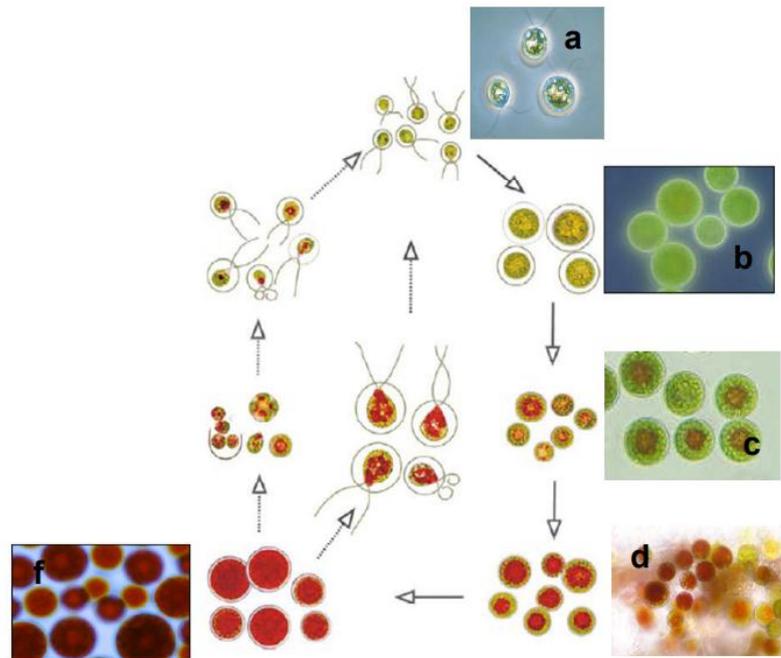


Figura N° 4: Ciclo de vida de *H. pluvialis* a) célula vegetativa flagelada, b) palmella, c) Célula intermedia, d y f) Aplanospora⁵.

Reproducción

H. pluvialis se reproduce de forma asexual. Las células flageladas dejan de dividirse cuando ya se han duplicado cinco veces aproximadamente dando lugar a las zoosporas (ocurre la fusión celular) y éstas a su vez se desarrollan en palmella y en condiciones de estrés luego a aplanosporas. Las aplanosporas ya han perdido los flagelos y adoptan una forma esférica no móvil⁵. En condiciones favorables, se puede dar lugar a la formación de entre 2 y 8 zoosporas, al enquistarse la aplanospora normalmente produce, de igual manera, entre 2 y 8 nuevas aplanosporas; sin embargo se ha observado que ocasionalmente puede llegar a producir hasta 32 nuevas células⁵⁷.

Factores que afectan el cultivo

Hay diferentes parámetros de cultivo determinantes en el crecimiento de *H. pluvialis* permitiendo la transformación de la microalga desde el estado vegetativo a aplanospora (fase verde y roja respectivamente) cuando cesa su crecimiento en la fase estacionaria y que generan a su vez la acumulación de astaxantina como la intensidad lumínica, temperatura, nutrientes (concentración de nitrógeno, fósforo, dióxido de carbono entre otros), fotoperiodo, pH, especies reactivas de oxígeno, burbujeo y sales.

Intensidad lumínica: Es uno de los factores más importantes puesto que la tasa de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de luz, debido a que esta es convertida en energía metabólica. La luz puede ser dividida en dos partes principales; la intensidad lumínica, que se define como la concentración de luz que afecta un volumen determinado de medio de cultivo dentro del fotobiorreactor y la longitud de onda que describe el color de luz utilizada para el cultivo⁵⁸. Esta se puede brindar de forma artificial, solar o en combinación, dependiendo del lugar donde se lleve a cabo el cultivo, por ejemplo, en las investigaciones que se llevan a cabo a nivel de laboratorios se brinda de manera artificial con lámparas fluorescentes, donde las longitudes de onda deben estar entre 600 y 700 nm⁵⁹.

Las microalgas gracias a su capacidad fotosintética aprovechan la energía solar y el dióxido de carbono, para sintetizar diferentes metabolitos⁴⁶. En condiciones de baja intensidad lumínica sintetizan pigmentos como la clorofila, y en caso de altas intensidades se produce la acumulación de pigmentos carotenoides secundarios como la astaxantina, como un factor protector frente a las condiciones inductivas.

Bohne y Linden afirman en el 2002 que la luz (longitudes de onda entre 600-700 nm) es la más eficiente para la fotosíntesis. Los diodos emisores de luz (LED) con una longitud de onda máxima de 643 nm son la fuente de luz más rentable, y en caso de aumentarse produce una elevación de la temperatura y por ende impedirá el buen desarrollo en el cultivo⁶⁰.

Temperatura: Es el factor ambiental más determinante, que afecta el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos. Para los cultivos de microalgas la temperatura óptima está entre 20°C y 24°C⁶¹, tolerando incluso temperaturas de entre 16 y 27 °C, sin embargo, las variaciones en la temperatura afectan la composición y respiración

celular, así como a los ciclos de fotosíntesis, de los cuales dependen las reacciones enzimáticas y biológicas del proceso⁵⁸, a temperaturas menores a 16°C disminuyen su crecimiento por la falta de absorción de nutrientes, y a temperaturas mayores la división celular se ve alterada, pero no la síntesis de proteínas, lo que aumenta la producción de carotenoides⁵⁸, a temperaturas como los 35°C resulta ser letal para un gran número de especies¹⁹.

Nutrimientos: El CO₂ es la fuente de carbono más utilizada en los cultivos de microalgas, puesto que pueden sobrevivir a altas concentraciones de dióxido de carbono, los gases del efecto invernadero, entre otros, que de diversas fuentes pueden convertirse en suficientes nutrientes para la microalga⁵⁹. La presencia de diversos iones como el hierro, acetato, fósforo, glucosa, magnesio, especies reactivas de oxígeno favorecen una producción efectiva de carotenoides, así como el nitrógeno, carbono, y azufre según lo afirman en el artículo “Evaluación del efecto de la longitud de onda y la concentración de hierro sobre el crecimiento en aguas residuales de la cepa microalgal *Chlorella vulgaris*”, son una fuente ideal para las microalgas al permitir la formación de nueva biomasa y favorecer reacciones metabólicas.

Fotoperiodo: la disponibilidad de luz y sus periodos determinan la velocidad específica a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determinan también la tasa específica de crecimiento. En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 cm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10–30%) del volumen total del cultivo⁵⁹ (ver figura N°5).

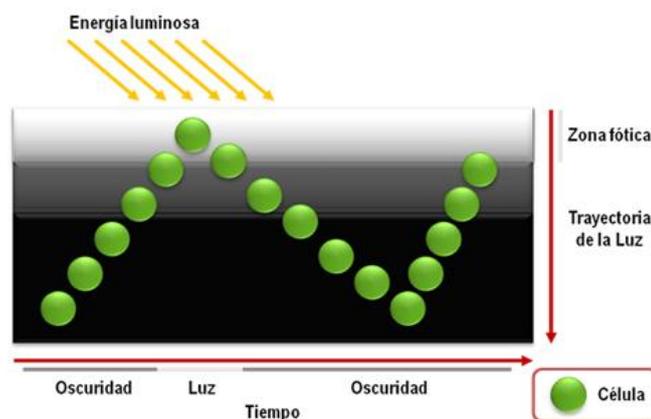


Figura N° 5: Trayectoria de la luz y de los ciclos luz oscuridad⁵⁹.

pH: Las microalgas durante su crecimiento requieren diferentes niveles de pH, en la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO₂⁶².

Burbujeo: Es un factor indispensable en los cultivos, puesto que se debe proporcionar un mezclado eficiente con el fin de producir una dispersión uniforme de las microalgas en el medio, eliminando así los gradientes de concentración de luz, nutrientes (entre ellos CO₂) y temperatura⁶³, si estos factores se usan de forma inadecuada, puede causar daños severos para la estructura celular e impedir el crecimiento y la producción de metabolitos.

Sales: Están incorporadas dentro de los componentes de los medios de cultivo y son aprovechadas por las microalgas durante su crecimiento y desarrollo, gracias al proceso de ósmosis⁶⁴, la deficiencia o aumento de estas pueden causar efectos secundarios en las células. Es necesario tener en cuenta que el enquistamiento de *H. pluvialis* y la posterior síntesis de astaxantina es una respuesta de protección de la microalga al someterse a condiciones de estrés al aumentar o disminuir los factores previamente descritos².

Genes implicados.

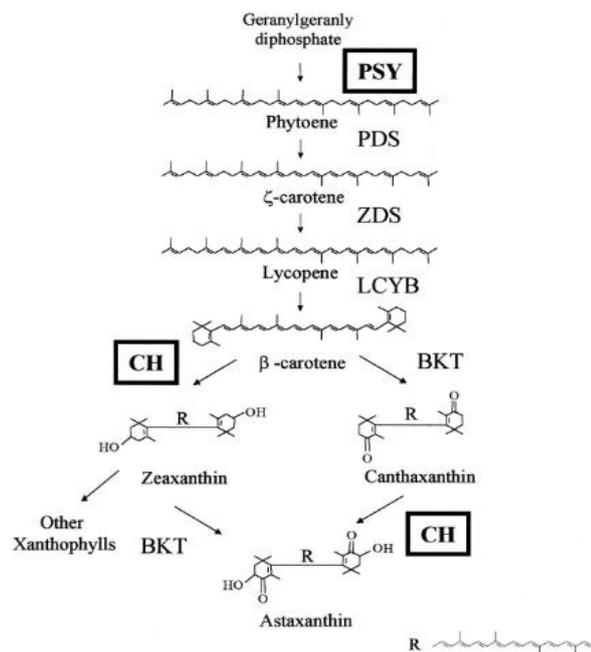


Figura N° 6: Ruta de biosíntesis del carotenoide astaxantina en *H. pluvialis*².

Esta xantina se sintetiza a partir de la expresión de aproximadamente 25 genes, entre los cuales se puede encontrar fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasa (LCY), β -caroteno Ketolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CHY), que suelen aumentar su actividad cuando el organismo está en condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, o alta intensidad de luz en combinación con cloruro de sodio o acetato de sodio².

En la ruta de biosíntesis de astaxantina que se muestra en la figura N°6, se llevan a cabo reacciones en el interior de la membrana y en el citoplasma; al interior de la membrana se encuentra el acetato proveniente de fotosíntesis y respiración. La generación de astaxantina comienza con geranylgeranyl pirofosfato (GGP), el cual se condensa y da lugar al fitoeno gracias a la acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY). Estas reacciones son reguladas a nivel transcripcional y traduccional. A continuación se producen reacción de denaturación fuera de la membrana y se da lugar a la síntesis de enzimas como fitoeno desaturasa (PDS) (este es regulada por los niveles del mRNA) generando licopeno, posteriormente la enzima licopeno β -ciclasa cataliza la reacción que resulta en la formación de β -caroteno, transformado seguidamente a equinenona y cantaxantina por acción de la β -caroteno ketolasa (BKT) y finalmente por la β -caroteno hidroxilasa conduce a la producción de astaxantina².

El estudio de las rutas de la carotenogénesis ayuda a conocer de manera detallada el metabolismo de esta microalga y la posibilidad de incrementar la síntesis de carotenoides². La expresión de genes carotenoides durante la carotenogénesis, los cuales codifican para las enzimas anteriormente nombradas indican su regulación en los diferentes estados de acumulación del carotenoide. En diversos estudios se ha reportado que al implementar factores de estrés en el cultivo de *H. pluvialis* aumentan de manera exponencial la expresión de estos genes y por ende la traducción de estas enzimas⁹. Los caracteres moleculares y genéticos se ven afectados menos que los morfológicos por las condiciones ambientales, por lo que son más estables y de esta manera se pueden hacer una clasificación de las microalgas⁶⁵.

CLOROFILA

Las clorofilas son una familia de pigmentos de color verde que se encuentran en las cianobacterias en todos aquellos organismos que contienen cloroplastos en sus células

(plantas y protistas) es crítica en la fotosíntesis, proceso que permiten a los organismos absorber energía a partir de la luz solar y transformarla en compuestos orgánicos y oxígeno⁶⁶.

La clorofila (Chl) es un pigmento fotosintético, el cual posee un anillo de tetrapirrol, que a su vez contiene un átomo central de magnesio, un anillo de porfirina y una cadena larga de fitol (ver figura N°7). Estructuralmente se encuentran diversos tipos de clorofila (a,b,c y d); estos difieren en los sustituyentes en los grupos laterales en el anillo de tetrapirrol⁶⁷.

En la clorofila a y b cambia el grupo R; en la Chl a se encuentra un grupo metilo (CH_3), y por el contrario, en la Chl b se encuentra CHO, la cola hidrocarbonada de fitol facilita la unión de la clorofila a las regiones hidrófobas de la proteína⁶⁸, la Chl c no contiene la cadena lateral de fitol^{67,68}.

Todas las clorofilas tienen dos bandas de absorción principales: azul o azul verdoso (450-475 nm) y rojo (630-675 nm) lo que resulta en su característico color verde.

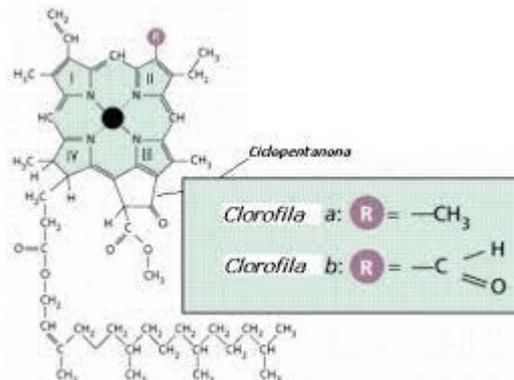


Figura N° 7: Estructura química de la clorofila y la astaxantina⁶⁹.

Función de la clorofila en fotosíntesis

Los carotenoides tienen varias funciones en la fotosíntesis, la clorofila a y la clorofila b son los principales pigmentos fotosintéticos.

1. La absorción de luz, se da en el anillo de porfirina que contiene el ion magnesio, la clorofila a tiene la función de convertir la energía de la luz en energía química esto se produce cuando la energía de luz absorbida, pasa a un estado de excitación, este electrón cede su energía a otro tipo de clorofila o pigmento accesorio, al final el electrón excitado facilita la reducción de una molécula de energía luminosa en energía

química⁶⁷,

68.

2. Posee moléculas requeridas para la protección contra el exceso de irradiación y especies de oxígeno reactivas. Las cianobacterias y algas roja, contienen un pigmento accesorio (antena) se encuentran en los tipos de clorofila b, c y d, su función es ampliar el rango de absorción de luz, Flicobinas es un pigmento que en su estructura química posee tetrapirroles lineales y no utilizan el ion magnesio, absorbe luz azul-verde, verde, amarilla o naranja (500-650 nm.).

En las algas algunos pigmentos no transfieren energía de excitación, este grupo de pigmentos es denominado carotenoides secundarios como las xantofilas de color rojo y anaranjado (astaxantina y cantaxantina), estas se sobreproducen en algunas especies de algas (Ej: *Haematococcus* spp.) cuando se cultivan en condiciones de deficiencia de nutrientes (nitrato, magnesio, sulfato y fosfato)⁷⁰, alta salinidad, temperaturas extremas y alta intensidad de luz⁶⁷.

Metodo de determinacion de la clorofila

Para la cuantificación de clorofila y carotenoides, se realiza la extracción utilizando solventes orgánicos como: el metanol, etanol, acetona, etc⁷¹. Posteriormente, se procede a su lectura mediante espectrofotometría y el contenido del pigmento se calcula usando fórmulas matemáticas; mientras que la separación y cuantificación de los carotenoides se puede realizar mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)⁶⁷,

72.

DISEÑO METODOLÓGICO

GENERALIDADES

Universo: Reino protista

Población: Microalgas

Muestra: *H. pluvialis* UTEX 2505

Tipo de investigación: Experimental

Enfoque de la investigación: Tipo mixto (cuantitativo y cualitativo); durante la investigación se llevará a cabo un proceso lineal en el cual se hará la recolección de datos numéricos, que posteriormente serán analizados. De igual manera se recolectarán datos cualitativos en cuanto a la morfología celular en cada etapa del cultivo.

Alcance de la investigación: Descriptivo correlacional (exploratorio, analítico-descriptivo, longitudinal) debido al análisis de la biomasa, concentración de astaxantina y clorofila y cambios morfológicos bajo las condiciones de inducción de estrés utilizadas en el ensayo.

Hipótesis: El estrés inducido por el acetato de sodio, color de luz y alta irradianza hace que *Haematococcus pluviales* sea capaz de producir en condiciones apropiadas (temperatura, pH, irradianza, nutrientes, luz en determinada longitud de onda, etc.) una mayor cantidad de astaxantina.

Variables dependientes: Crecimiento celular, concentración de astaxantina y clorofila (mg/L).

Variables independientes: Factores de estrés (acetato de sodio, alta irradianza y color de luz) y medios de cultivo.

METODOLOGÍA

En este estudio se utilizará la microalga *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA) suministrada por la facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana, Colombia.

Fase 1

Preparación del inóculo

La preparación del preinóculo se realizó a partir de la cepa de referencia de *H. pluvialis* UTEX 2505, dicho preinóculo se agregó en un erlenmeyer con capacidad aproximada de 3 L, al cual se le adicionaron 2 litros de medio de cultivo MES VOLVOX (composición en anexo 1) con un ajuste de pH a 6.52, en condiciones de fotoperiodo de 20 horas Luz y 4 horas de oscuridad (20:4 LO), CO₂ 5%, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 20°C \pm 2°C y agitación por burbujeo continuo. Este cultivo se realizó por un periodo de 15 días, posteriormente se evaluó el crecimiento obteniéndose una biomasa de 4x10⁵ células/ml correspondientes al inóculo a utilizar en el estudio.

Preparación de biorreactores

Se prepararon 40 biorreactores con 350 mL de cada medio RM (Rudic's medium) y BBM (Bold's basal medium), cada uno de los cuales tenía una concentración inicial de *Haematococcus pluvialis* de 1x10⁴ cel/ml suministradas a partir del inóculo cultivado en medio MES Volvox.

Cinética de crecimiento

Los biorreactores con medio Rudic's medium -RM (ver preparación en la tabla N°3) y Bold's basal medium-BBM (ver preparación en las tablas N°4, 5, 6 y 7) fueron inoculados (día 0) y cultivados por agotamiento de nutrientes; durante 15 días se midió la cinética de crecimiento con el fin de llegar a una concentración de 3x10⁵ cel/ml, por lo tanto, durante este periodo se mantuvieron en condiciones libres de estrés, luz blanca, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tlt 20w/54RS marca Philips), como fuente de iluminación

artificial, CO₂ 5% y aire 95%, pH 6.8, fotoperiodo de 20:4 LO, temperatura de 25°C y agitación por burbujeo.

Tabla N° 2: Composición del medio de cultivo Rudic's medium (RM)²⁶.

Componente	mg/L
NaNO₃	300
K₂HPO₄	80
KH₂PO₄	20
MgSO₄·7H₂O	10
CaCl₂·2H₂O	58.5
EDTA	7.5
NaCl	20
H₃BO₃	0.3
MnSO₄· H₂O	1.5
ZnSO₄·7H₂O	0.1
(NH₄)₆Mo₇O₂₄· 4H₂O	0.3
CuSO₄· 5H₂O	0.08
Co(NO₃)₂· 6H₂O	0.026
FeCl₃· 6H₂O	17

Preparación

1. Se prepararon 3 litros de medio en 2 Erlenmeyer de 3 litros, por lo cual en cada uno se inició con un volumen de 1.5 litros de agua destilada.
2. Se pesaron cada una de las sales y se disolvió en el agua destilada
3. Se completaron los volúmenes a 3 litros y se ajustó a pH 6.5 con HCL.
4. Por último el medio fue esterilizado autoclave a 121°C.

Tabla N° 3: Composición del medio de cultivo Bold's basal medium (BBM)²⁶.

COMPONENTES	SOLUCIÓN STOCK (g.l⁻¹ dH₂O)	CANTIDAD USADA (para 1 litro)	SOLUCIÓN STOCK (g.40mL⁻¹ dH₂O)
NaNO₃	25	10 ml	1.5
CaCl₂.2H₂O	2,5	10 ml	0.15
MgSO₄.7H₂O	7,5	10 ml	0.45
K₂HPO₄	7,5	10 ml	0.45
KH₂PO₄	17,5	10 ml	1.05
NaCl	2,5	10 ml	0.15
Solución EDTA	Ver tabla (5)	1 ml	Ver tabla (5)
Acidified iron solution	Ver tabla (6)	1 ml	Ver tabla (6)
H₃BO₃	11,42 g	1 ml	0,06
Trace metals solution	Ver tabla (7)	1 ml	Ver tabla (7)

Tabla N° 4: Preparación de la solución EDTA²⁶.

Componentes	Cantidad usada (para 1 litro)
EDTA	50,00 g
KOH	31,00g

Tabla N° 5: Preparación de la solución Acidified Iron ²⁶.

Componentes	Cantidad usada (para 1 litro)
FeSO₄.7H₂O	0,498g
H₂SO₄ (96%)	0,1 ml

Tabla N° 6: Preparación de la solución Trace metals ²⁶.

Componentes	Cantidad usada (para 1 litro)
ZnSO₄.7H₂O	8,82 g
MnCl₂.4H₂O	1,44 g
MoO₃	0,71 g
CuSO₄.5H₂O	1,57 g
Co(NO₃)₂.6H₂O	0,49 g

Preparación

1. Se prepararon 3 litros de medio en 2 Erlenmeyers de 3 litros, por lo cual en cada uno se inició con un volumen de 1.5 litros.
2. Las soluciones se prepararon separadamente y se agregaron los volúmenes especificados en las tablas.
3. Se completaron los volúmenes a 3 litros, se ajustó a pH 6.5 con HCL y se esterilizó el medio en autoclave a 121°C.

Condiciones de estrés con acetato de sodio y luces

En el día 15, los cultivos fueron sometidos a estrés con acetato de sodio y luces blanca y azul y fueron incubados en estas condiciones durante otros 15 días, en los cuales se observaría la producción de astaxantina.

De los 40 biorreactores, 10 correspondían a los controles (sin acetato de sodio) en medio RM y BBM incubados en luz blanca y azul, irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como fuente de iluminación artificial, CO₂ 5%, pH 6.8, fotoperiodo de 20:4 LO, temperatura de 25°C y agitación. En los biorreactores restantes se utilizaron tres concentraciones de acetato de sodio, correspondientes a 0.372 mg/ml, 0.310 mg/ml⁷³ y 0.248 mg/ml, que se realizaron por duplicado en el medio RM (16 biorreactores) y por triplicado en el medio BBM (24 biorreactores), teniendo en cuenta que cada medio, con cada una de las concentraciones de acetato de sodio se incubaron en luz blanca y azul; se utilizaron las mismas condiciones de cultivo que para los controles.

Fase 2

Curva de crecimiento

Se realiza una toma de muestra a los biorreactores cada tres días durante los primeros 15 días, tiempo en el cual se encontraban sin condiciones de estrés (con luz blanca y sin acetato de sodio). Las muestras fueron tomadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y conservadas con formol-salina 1.9% en una relación 1:1 de muestra y formol-salina (200 μL de cada una).

Posteriormente se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer⁷⁴.

- 1) Se tomaron 10 μL de la muestra con una micropipeta
- 2) Se usó una lámina de cuarzo sobre la cámara de Neubauer
- 3) Se introdujo la punta de la pipeta en el borde de lámina de cuarzo, en el extremo de la cámara de Neubauer esta fue llenada por capilaridad.
- 4) El recuento se realizó en objetivo 10X.
- 5) Se contaron un total de 8 cuadrantes por muestra.
- 6) Para hallar la concentración de Cel/mL se debe aplicar la fórmula detallada en la figura N°8:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de Células} \times 10000}{\text{Número de cuadrantes} \times \text{dilución}}$$

Figura N° 8: Ecuacion para hallar la concentración de Cel/mL

- 7) Con los resultados obtenidos se graficó la cinética de crecimiento siendo el eje Y la densidad celular expresada en cel/mL y en el eje X el tiempo en el que se tomó la muestra.

Ajuste de curvas de crecimiento

A cada medio de cultivo se le realizó un ajuste de crecimiento celular según el modelo logístico empleado, utilizando el software DMFit basado en el modelo de Baranyi⁷⁵.

Fase 3

La extracción y cuantificación de astaxantina y clorofila se realizó tomando muestras de un volumen de 10 mL en tubos falcon de cada biorreactor cada tres días durante los

últimos 15 días de la fase experimental (en condiciones de estrés). Estas muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

Extracción de astaxantina y clorofila con metanol 90%

Los carotenoides, debido a que poseen enlaces dobles en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide, el calor favorece reacciones térmicas de degradación, por estas razones la extracción de carotenoides se debe realizar preferiblemente en ausencia de luz y temperatura ambiente⁴⁶.

Los disolventes polares más utilizados para la extracción de carotenoides son el éter de petróleo y el éter etílico, pero presentan ciertos inconvenientes como ser inflamables, tóxicos y los carotenoides se degradan fácilmente al estar expuestos a los mismos. Para la extracción de xantofilas se utilizan disolventes menos polares como la acetona, metanol y el etanol⁵.

Este proceso se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento APHA 1992⁷⁶, en el cual se tomó 1 mL de muestra, la cual fue centrifugada a 12,000 rpm durante 5 min (Eppendorf centrifuge 5702), posteriormente se retiró el sobrenadante el cual contenía medio de cultivo. Al paquete celular se le adicionó 1 mL de metanol al 90% debido a que la clorofila y los carotenoides son solubles en compuestos orgánicos tales como los alcoholes⁷⁷. Posteriormente se calentó durante 10 min a 60°C en baño serológico Memert y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos⁷⁸.

Cuantificación de clorofila y astaxantina

La cuantificación de Clorofila y astaxantina se realizó por el método espectrofotométrico en el equipo Jenway 6405 uv/vis, en el cual se utilizó una longitud de onda de 667 nm para determinar la absorbancia de la clorofila y en el caso de astaxantina 477 nm. Esta longitud de onda se utilizó debido a que la astaxantina presenta absorción de luz en un rango de 250 y 550 nm⁴⁶. Posteriormente se determinó la concentración de dichos pigmentos con ayuda de una curva de calibración para cada uno (anexo 2).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por el método ANOVA, utilizando el software Graph Pad Prism 7.0. Se utilizó un grado de confianza de 95% con un valor de probabilidad ($p=0,05$).

RESULTADOS

Cinética de crecimiento y acumulación final de biomasa

Se realizó un preinoculo de la microalga *H. pluvialis* en medio MES-Volvox (figura N°9), en condiciones de luz blanca, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, agitación por burbujeo continuo, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo 20:4 LO e irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 15 días anteriores al inicio de la curva de crecimiento esto con el fin de obtener un número de células favorables para la posterior fase de crecimiento en los dos medios de cultivo seleccionados RM y BBM.

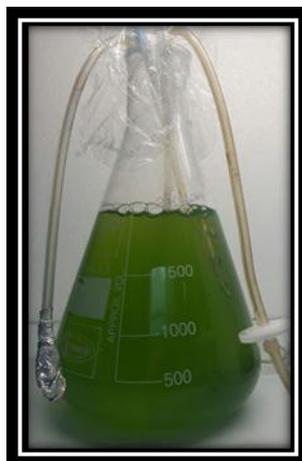


Figura N° 9: Preinoculo de *H.pluvialis* en medio Volvox

Fuente: Foto tomada por autoras.

Posteriormente se utilizaron los medios de cultivo Rudic's medium (RM) y Bold basal medium (BBM), seleccionados según revisión bibliográfica (Archivo Nova, 2017 Graciela Lancheros) sobre la efectividad en el crecimiento celular de *H. pluvialis*. Estos biorreactores fueron incubados durante 15 días bajo condiciones de luz blanca, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, agitación por burbujeo continuo, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo 20:4 LO e irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como se muestra en la figura N°10.



Figura N° 10: Biorreactores en luz blanca durante la fase de crecimiento.

Fuente: Foto tomada por autoras.

Se realizó la curva de crecimiento a partir del número de células por mililitro cuantificados en cámara de Neubauer durante 15 días, con un total de 5 datos obtenidos por cada medio a través del tiempo, de esta manera, se construyó la cinética de crecimiento (ver gráfica N°1)

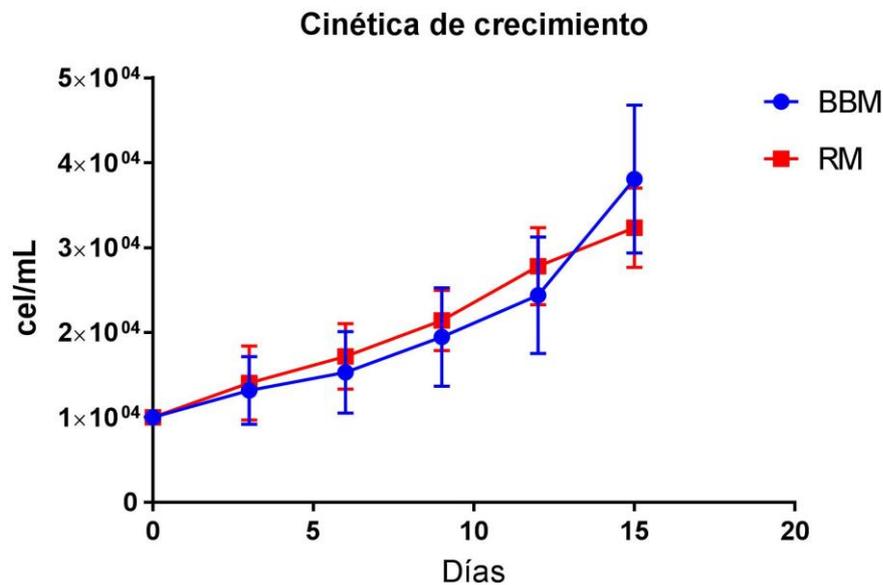
Tabla N° 7: Análisis de varianza (ANOVA) del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM a los 15 días de cultivo (Ver tabla completa en el anexo 3).

Tabla ANOVA	DF	F (DFn, DFd)	P value
Interacción	4	F (4, 186) = 3,976	P=0,0040
Tiempo (días)	4	F (4, 186) = 92,39	P<0,0001
Medio de cultivo	1	F (1, 186) = 0,7871	P=0,3761
Residual	186		

DF: grados de libertad; **F:** valor F; **DFn:** grados de libertad; **DFd:** residual; **P:** probabilidad

Fuente: Elaborado por autoras.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza de dos vías (ANOVA con un 95% de confianza) ilustrado en la tabla N°8, el cual reveló que no hubo diferencias significativas entre ambos medios de cultivo en cuanto a la producción de biomasa ($F=0.7871$, $P=0.37$, $GL:1$). Dichos medios partieron de una concentración celular inicial de 1×10^4 cel/mL (día 0) y a través del tiempo se observó un crecimiento homogéneo. Sin embargo, a los 15 días de cultivo las células en el medio BBM continuaban en crecimiento exponencial llegando a acumular 3.80×10^4 cel/mL de biomasa, a diferencia del cultivo en RM en el cual se obtuvo un crecimiento de 3.23×10^4 cel/mL a los 15 días como se observa en la gráfica N°1; esta diferencia puede deberse a que el medio BBM contiene macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, posee micronutrientes como molibdeno, hierro, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro^{26, 79}, para el crecimiento celular en mayor cantidad que RM. Sin embargo, no se observó la fase estacionaria de crecimiento en ninguno de los medios de cultivo, lo cual se puede justificar en un tiempo de cultivo limitado.



Grafica N° 1: Cinética de crecimiento celular en medios de cultivo Rudic's medium (RM) y Bold basal medium (BBM) durante 15 días.

Fuente: Elaborado por autoras.

Las curvas de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico, para lo cual se calculó el logaritmo base 10 de la concentración celular obtenida cada día y se realizaron las gráficas de tendencia log vs tiempo del crecimiento celular (ver gráficas en anexo 5). A

partir de estos resultados se calculó la velocidad de crecimiento en ambos medios de cultivo (ver tabla N°9). En el caso del medio de cultivo BBM se observó una velocidad de crecimiento de 0.0326 cel/día, mientras que en el caso del medio RM fue de 0.0329 cel/día, lo cual confirma que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento celular en ambos medios de cultivo a los 15 días.

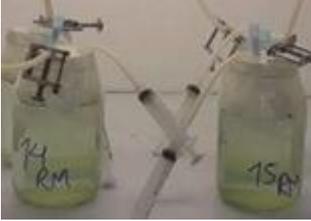
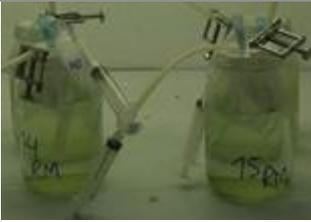
Tabla N° 8: Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los medios de cultivo BBM y RM.

Medio de cultivo	N° de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM	5	4	4,509	0.0329 cel/día	98.98%
BBM	5	4	4,580	0.0326 cel/día	97.9%

Fuente: Elaborado por autoras.

En la tabla N°10 se presentan las características macroscópicas del cultivo de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo BBM y RM:

Tabla N° 9: Observación macroscópica del cultivo de *H. pluvialis* en medios BBM y RM durante la medición de la cinética de crecimiento.

Día de ensayo	BBM	RM
3		
6		

9		
12		
15		

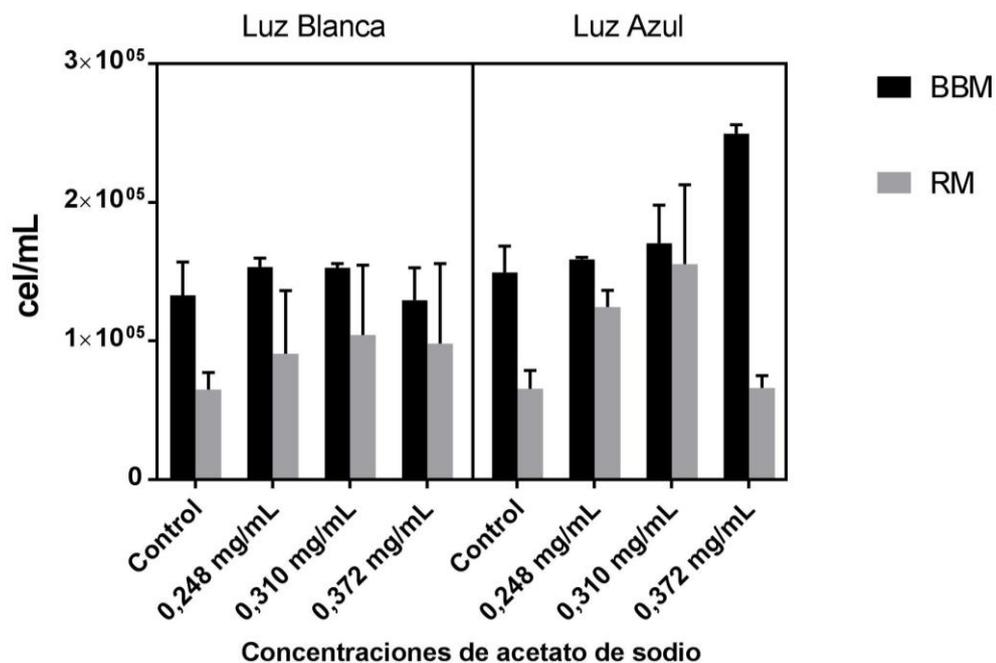
Fuente: Elaborada por autoras.

En la tabla N°10 se muestra el seguimiento fotográfico de las características macroscópicas de *H. pluvialis* en los medios RM y BBM durante el periodo de estudio. Este registro se llevó a cabo durante, los primeros 15 días donde la microalga no tenía factores inductores de estrés, al contrario, contaba con todos los requerimientos nutricionales ideales y condiciones para su adaptación y crecimiento en los medios de cultivo. Se evidencia en los biorreactores el aumento en la intensidad del color verde en el medio, lo cual se correlaciona con el aumento de la biomasa de *H. pluvialis*, generando de esta manera un aumento en la turbidez; este cambio se ve más reflejado en los biorreactores con medio de cultivo RM lo cual sugiere mejor adaptación de *H. pluvialis* al medio.

Adicionalmente, se realizó la medición del pH con el fin de analizar y controlar dicho factor que favorece el crecimiento celular; se apreció que a los 15 días de cultivo los biorreactores con medio BBM alcanzaron en promedio un pH de 7.15, con un coeficiente de variación de 15% (ver anexo 4) y en el caso de los cultivos en RM un pH de 7.73, con un coeficiente de variación de 13% (ver anexo 4) demostrando que hay repetibilidad de los datos, evidenciando de esta manera la alcalinización en los medios de cultivo, principalmente en RM (pH inicial: 6.8). Este aumento en el pH de los medios de cultivo se genera por el aumento en la actividad fotosintética; ya que las

microalgas consumen HCO_3^- disociandolo en CO_2 (para su consumo) y el ion OH^- responsable del incremento del pH⁸⁰.

Posteriormente a los 15 días de la etapa de cinética de crecimiento donde todos los biorreactores se encontraban con las mismas condiciones de cultivo (exceptuando el medio de la fase inicial de crecimiento), se realizó la inducción de estrés durante los 15 días posteriores, con concentraciones de 0.248 mg/ml, 0.310 mg/ml² y 0.372 mg/ml de acetato de sodio, irradianza de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luces blanca y azul, observándose que la concentración celular continuó aumentando durante este periodo. Los resultados de la acumulación final de biomasa microalgal se muestran en la gráfica N°2.



Grafica N° 2: Acumulación total de biomasa (expresada en cel/mL) de todos los tratamientos, obtenidas el día 30 de ensayo (15 días de inducción de estrés). Se encuentran clasificadas por luz (blanca y azul), medio de cultivo (BBM y RM) y la concentración de acetato de sodio utilizada. El control hace referencia a los tratamientos a los cuales no se les proporcionó acetato de sodio.

Fuente: Elaborada por autoras.

Al analizar los resultados obtenidos de la acumulación total de biomasa utilizando el método estadístico de ANOVA con un 95% de confianza (ver tabla N°11), se deduce que hubo diferencia significativa en cuanto a la concentración celular obtenida en el periodo de estudio ($F=92.39, P<0.0001, GL=4$, ver anexo 3); como se presenta en la

gráfica N°2 el medio de cultivo BBM mostró mejores resultados en cuanto a la producción de biomasa, mostrando su máxima acumulación al utilizar 0.372 mg/mL de acetato de sodio, irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz azul como factores de estrés, alcanzando una concentración de 2.49×10^5 cel/mL. En el caso del medio de cultivo RM donde la producción de biomasa fue más baja, los mejores resultados se observaron en el tratamiento con 0.310 mg/mL de acetato de sodio en luz azul obteniendo 1.55×10^5 cel/mL.

Como se muestra en la tabla N°11, no se observaron diferencias significativas en el efecto ejercido por la concentración de acetato de sodio utilizada en los tratamientos ($F=3.03, P=0.060, GL=3$, ver anexo 3), lo que sugiere que el acetato de sodio no interviene directamente en la producción de biomasa de *H. pluvialis*. Por su parte, las luces a las que fueron sometidos los cultivos si mostraron diferencias significativas en cuanto a la obtención de biomasa en las mismas ($F=6.43, P=0.022, GL=1$, ver anexo 3), evidenciando mejores resultados al utilizar la luz azul.

Tabla N° 10: Análisis de varianza del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM a los 30 días de cultivo (Ver tabla completa en el anexo 3).

Tabla ANOVA	DF	F (DFn, DFd)	P value
Concentración de acetato de sodio	3	F (3, 3) = 3,03	P=0,0600
Luz	1	F (1, 3) = 6,43	P=0,0220
Medio de Cultivo	1	F (1, 3) = 39,43	P<0,0001
Concentración de acetato de sodio x Luz	3	F (3, 3) = 0,5585	P=0,6500
Concentración de acetato de sodio x Medio de Cultivo	3	F (3, 3) = 2,479	P=0,0984
Luz x Medio de Cultivo	1	F (1, 3) = 1,601	P=0,2238
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio de Cultivo	3	F (3, 3) = 4,251	P=0,0218
Residual	16		

DF: grados de libertad; **F:** valor F; **DFn:** grados de libertad; **DFd:** residual; **P:** probabilidad

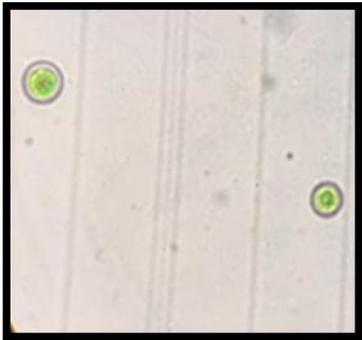
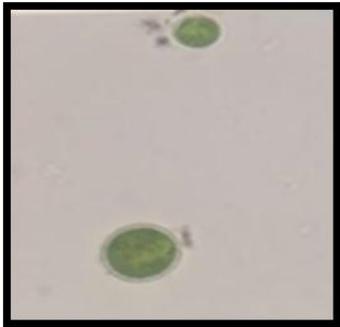
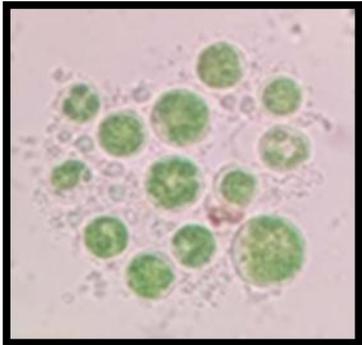
Fuente: Elaborada por autoras.

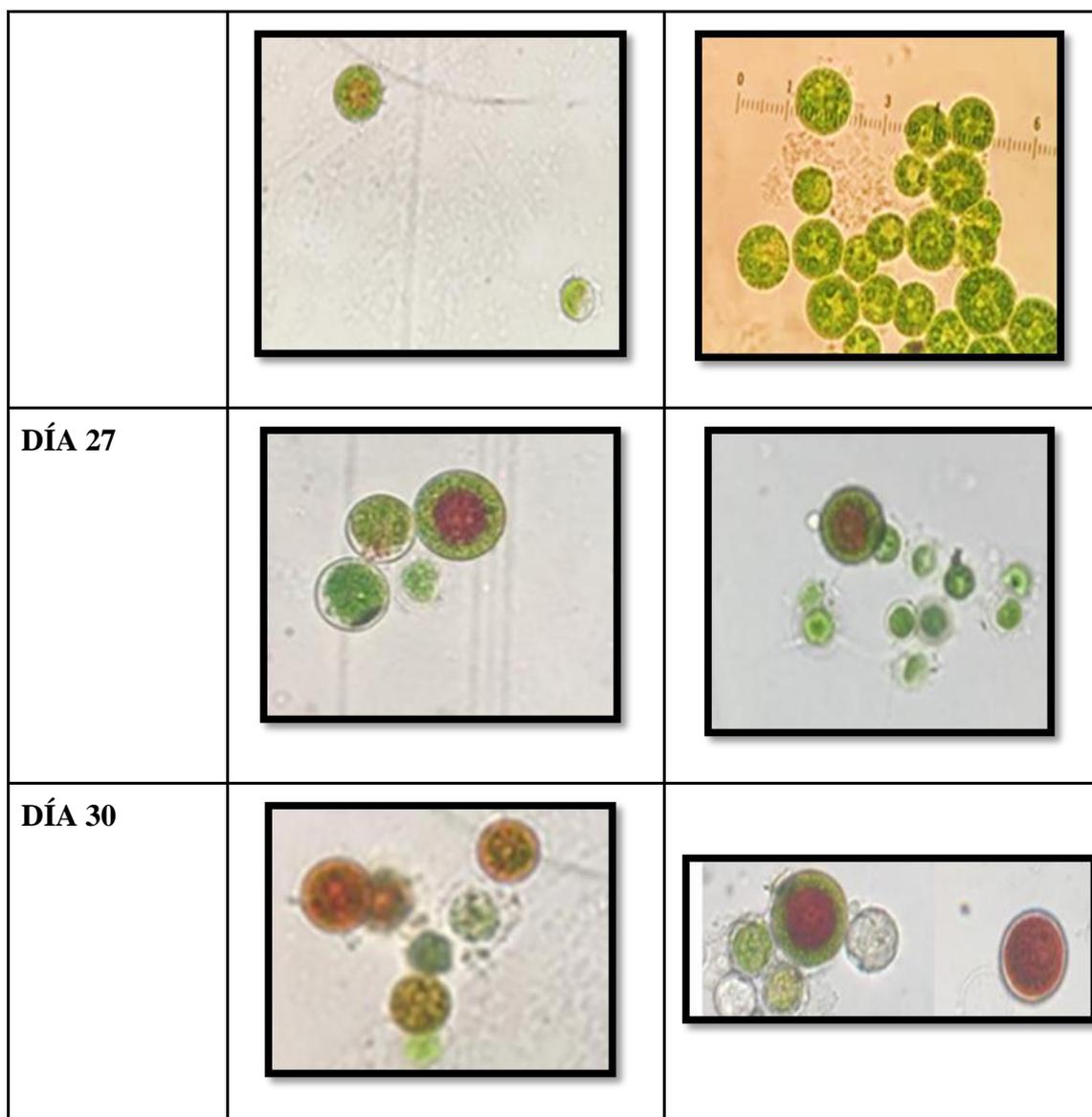
Cambios morfológicos presentados durante el estudio.

La morfología celular fue analizada durante el estudio por medio de la observación en cámara de Neubauer o hemocitometro⁸¹, con el fin de detectar los cambios estructurales en las células de *H. pluvialis* al exponerse a condiciones inductoras de estrés.

Cambios en la morfología celular

Tabla N° 11: Registro fotográfico obtenido por microscopio óptico olympus CX31 en objetivo de 40X de *H. pluvialis* en medio BBM Y RM bajo factores inductores de estrés.

DÍA DE MUESTREO	MEDIO BBM	MEDIO RM
DÍA 18		
DÍA 21		
DÍA 24		



Fuente: Elaborada por autoras.

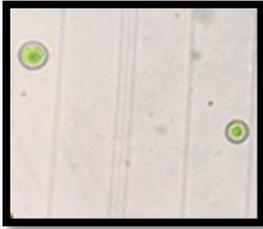
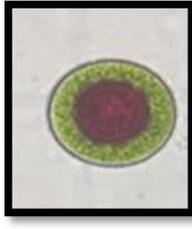
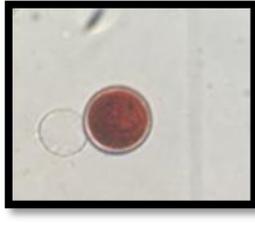
En la tabla N° 12 se observan las fotografías tomadas durante la fase de exposición a las condiciones de estrés en cada uno de los biorreactores (luz azul, blanca, irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones de acetato de sodio 0,310 mg/ml, 0.372 mg/ml y 0.248 mg/ml en los medios de cultivo BBM y RM). En este registro se puede observar los diferentes cambios morfológicos que presenta *H. pluviialis* durante las condiciones de estrés a la cual fue sometida.

En ambos medios de cultivo al comienzo del estímulo de producción de astaxantina (día 18), las células en su mayoría se observaron en fase vegetativa móvil (zoosporas), no obstante también se observaron células en forma de palmella, las cuales aún no se encontraban acumulando astaxantina, por lo tanto su contenido estaba representado

principalmente por clorofila. En el día 21 de inducción de estrés las células se observaron en forma de palmella, donde se pudo evidenciar la pérdida de flagelos y aumento de tamaño de las mismas. Para los días 24 y 27 la población celular observada fue principalmente como células intermedias, caracterizadas por el inicio de acumulación de astaxantina, la cual se observa como una coloración rojiza en el centro del protoplasto, rodeada por clorofila y una pared celular gruesa.

Finalmente el día 30 de ensayo se observaron tanto células intermedias como aplanosporas; estas últimas corresponden al estado morfológico en el cual las células tienen un protoplasto rico en astaxantina y ácidos grasos donde está disuelta la misma, además, se observa el engrosamiento en la pared celular. Todos estos cambios se deben a la activación de un mecanismo de protección ante las condiciones desfavorables a las que fue sometida *H. pluvialis*.

Tabla N° 12: Fases de celulares de *H. pluvialis* durante el ensayo.

FLAGELADA	PALMELLA	CÉLULA INTERMEDIA	QUISTE O APLANOSPORA
			

Fuente: Fotografías tomadas por autoras.

En la tabla N°13 se observa las diferentes fases que *H. pluvialis* presentó durante el ensayo, los cambios morfológicos y fisiológicos que se presentan durante su ciclo de vida. El registro detallado de las fotografías se llevó a cabo durante los 30 días del ensayo, se seleccionaron las fotografías que corresponden a cada fase (flagelada, palmella, célula intermedia, quiste o aplanospora)

Observación macroscópica de los cultivos de *H. pluvialis* en BBM y RM bajo condiciones de estrés

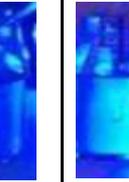
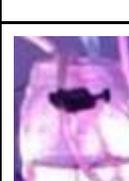
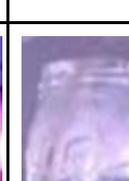
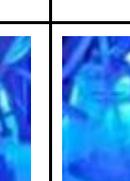
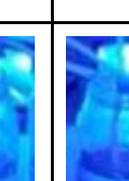
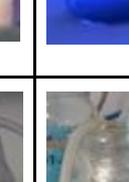
Tabla N° 13: Tratamientos para la inducción de estrés utilizados en el medio BBM

Tratamiento	Luz	Concentración de acetato de sodio (mg/mL)	Irradianza
1	Blanca	0.372	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
2	Blanca	0.310	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3	Blanca	0.248	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
4	Blanca	sin acetato de sodio (control)	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
5	Azul	0.372	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
6	Azul	0.310	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
7	Azul	0.248	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
8	Azul	sin acetato de sodio (control)	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fuente: Elaborada por autoras.

A continuación se presenta el registro fotográfico macroscópico que presenta el cultivo de *H. pluvialis* en medio BBM durante los 15 días con las distintas condiciones de estrés previamente descritas en la tabla N°14.

Tabla N° 14: Cambios macroscópicos presentados en los cultivos en el medio BBM con cada uno de los tratamientos de inducción de estrés de los días 18 al 30 de ensayo.

Día	Luz blanca				Luz azul			
	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml
18								
21								
24								
27								
30								

TTo: tratamiento

Fuente: Elaborada por autoras.

En la tabla N° 15 se muestra el registro fotográfico de las características macroscópicas del cultivo de *H. pluvialis* en medio BBM, durante los 15 días posteriores a la fase de crecimiento celular, en donde se proporcionaron las condiciones de estrés a cada uno de los biorreactores mencionados previamente.

Macroscópicamente se apreció un aumento en la biomasa celular evidenciado por el aumento en la turbiedad de los medios de cultivos, los cuales adquirieron un color verde más oscuro (días 18-24). De igual manera se observó que las células tenían la tendencia a precipitarse en el medio de cultivo, apareciendo al fondo del biorreactor, lo cual se correlaciona con el cambio a palmella (enquistamiento y pérdida de flagelos) que se observó en esta fase del ensayo. Los días 27-30 se puede apreciar que es más evidente el cambio de color entre los biorreactores, aquellos que se encontraban en luz azul son los que presentan mayor variación del color, tornándose pardo-rojizo al final del ensayo. Todos estos cambios (tanto macroscópicos como microscópicos) se dan gracias a que los factores de estrés influyen dentro de la pared celular de la microalga.

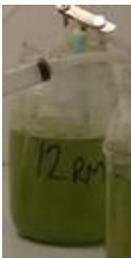
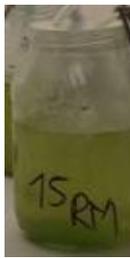
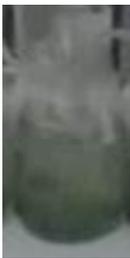
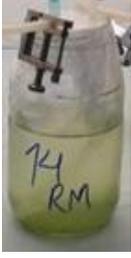
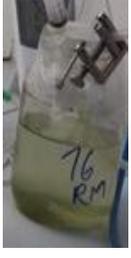
Tabla N° 15: Tratamientos para la inducción de estrés utilizados en el medio RM

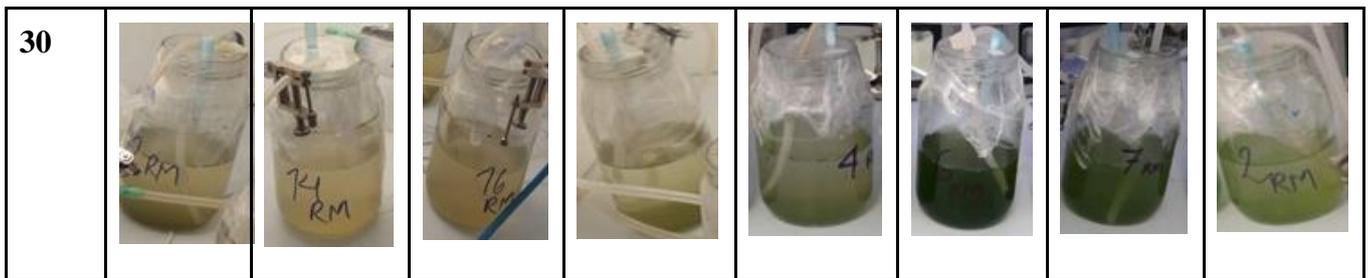
Tratamiento	Luz	Concentración de acetato de sodio (mg/mL)	Irradianza
1	Blanca	0.372	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
2	Blanca	0.310	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3	Blanca	0.248	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
4	Blanca	sin acetato de sodio (control).	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
5	Azul	0.372	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
6	Azul	0.310	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
7	Azul	0.248	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
8	Azul	sin acetato de sodio (control).	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fuente: Elaborada por autoras.

A continuación se muestra el registro fotográfico macroscópico que presenta el cultivo de *H. pluvialis* en medio RM durante los 15 días con las distintas condiciones de estrés previamente descritas en la tabla N°16.

Tabla N° 16: Cambios macroscópicos presentados en los cultivos en el medio RM en cada uno de los tratamientos de inducción de estrés de los días 18 al 30 de ensayo.

Día	Luz blanca				Luz azul			
	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml
18								
21								
24								
27								



Fuente: Elaborada por autoras.

Se muestra el registro fotográfico de las características macroscópicas del cultivo de *H. pluvialis* en el medio de cultivo RM durante los 15 días de inducción de estrés (tabla N° 17). Al igual que en el medio de cultivo BBM, en los días 18 y 21 de ensayo, en el medio RM se observó un aumento en la intensidad del color verde correspondiente al aumento de la biomasa. El día de 24, en el tratamiento 1 (luz blanca, 0.372 mg/mL de acetato de sodio) se pudo observar claramente una precipitación debido al cambio de células vegetativas a palmellas y de igual manera en esta fase del cultivo se observó que el cultivo cambio a un color rojo-parduzco. Para los tratamientos 2 y 3 (luz blanca; 0.372 mg/mL de acetato de sodio y luz blanca; 0.372 mg/mL de acetato de sodio respectivamente) el cambio de color fue apreciable el día 27 y se intensificó notoriamente para el día 30 de cultivo. Es de resaltar que no se apreció un cambio de color notorio en el tratamiento 4 (luz blanca, sin acetato de sodio) utilizado como control para verificar que la concentración de acetato de sodio si ejerce una influencia en la acumulación de astaxantina.

En cuanto a los tratamientos en luz azul, no se observó un cambio de color evidente, sinembargo se pudo apreciar macroscópicamente el aumento en la biomasa de estos biorreactores ya que la intensidad del color verde en estos biorreactores fue clara a través del tiempo. A diferencia del medio de cultivo BBM, en este medio se pudo percibir al final del ensayo un color rojizo más fuerte; cabe resaltar que los cambios de color en este medio de cultivo fueron más evidentes en los tratamientos que se encontraban en luz blanca.

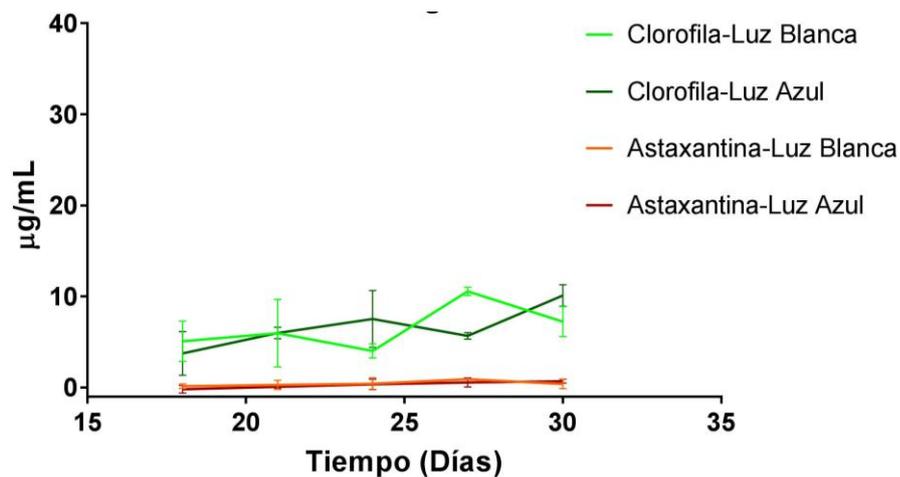
Producción de astaxantina y clorofila

Para la cuantificación de clorofila y astaxantina, las muestras recolectadas durante la etapa de estrés celular fueron sometidas al procedimiento APHA 1992 para la extracción de dichos pigmentos utilizando metanol al 90% y posteriormente estos fueron cuantificados espectrofotométricamente. Se realizaron cultivos de control tanto en luz azul como en luz blanca los cuales carecían de acetato de sodio, y cuyo objetivo fue validar el efecto del acetato de sodio en la producción de astaxantina.

Los datos obtenidos fueron sometidos análisis de varianza (ANOVA con un 95% de confianza) de tres vías ya que se quería determinar el efecto de las variables medio de cultivo, concentración de acetato de sodio, color de luz y irradianza sobre la producción de astaxantina y clorofila en *H. pluvialis*. Se observó que la combinación de los factores mencionados anteriormente induce la producción de astaxantina.

Astaxantina y clorofila en el medio BBM

A continuación, se describen los resultados obtenidos empleando las diferentes concentraciones de acetato de sodio, alta irradianza, luz blanca y azul en el medio de cultivo BBM.

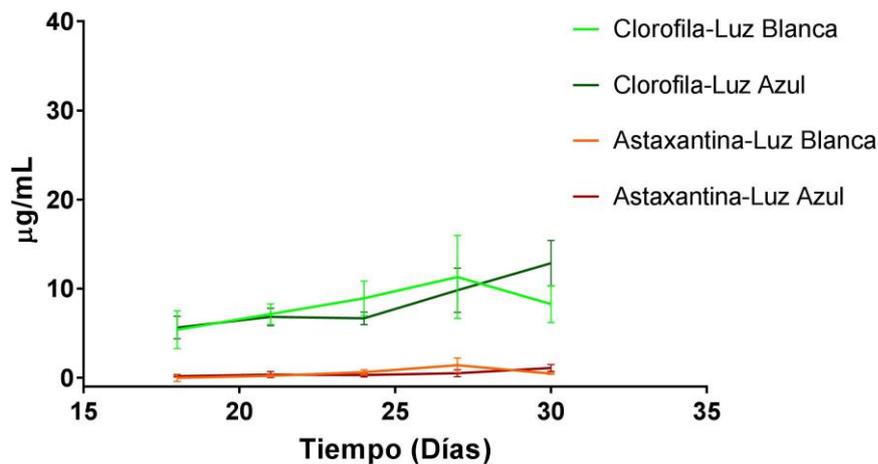


Grafica N° 3: Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.248 mg/mL de acetato de sodio (AS), irradianza 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborada por autoras.

Al utilizar la concentración de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, combinada con luz blanca e irradianza 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el día 18 del ensayo se detectó una concentración

de clorofila promedio de 5.08 $\mu\text{g/mL}$ y para el ultimo día de ensayo (día 30), ésta había alcanzado una concentración de 7.23 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra que hubo un aumento de 20.4 % en la concentración de la misma y por lo tanto en la actividad fotosintética en este tratamiento. De igual manera, se observó un aumento de 27.3% en la concentración de astaxantina de 0.15 $\mu\text{g/mL}$ (día 18) a 0.40 $\mu\text{g/mL}$ (día 30). Por otra parte, al utilizar la luz azul con esta misma concentración de acetato de sodio (0.248 mg/mL) se observó un aumento del 62.8 % en la concentración de clorofila la cual pasó de 3.76 $\mu\text{g/mL}$ (día 18) a 10.11 $\mu\text{g/mL}$ (día 30) y la astaxantina tuvo una concentración inicial promedio de 0.11 $\mu\text{g/mL}$ y al final del ensayo se obtuvieron 0.80 $\mu\text{g/mL}$ de la misma, obteniendo un aumento del 86 % en su concentración (ver gráfica N°3).

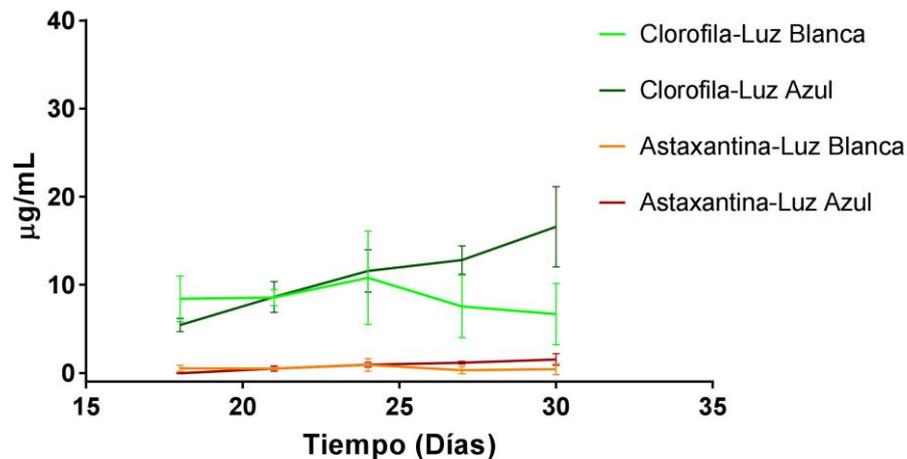


Grafica N° 4 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.310 mg/mL de acetato de sodio (AS), irradiancia $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborada por autoras.

En la grafica N°4 se observa que en el caso de los tratamientos en los cuales se utilizó la concentración de acetato de sodio de 0.310 mg/mL , se observa un aumento del 52% en la concentración de clorofila con luz blanca hasta el día 27 alcanzando una concentración 11.31 $\mu\text{g/mL}$, la cual posteriormente disminuyó un 26% dando como resultado una concentración de clorofila final de 8.28 $\mu\text{g/mL}$. Empleando luz azul se observa un aumento de 56% obteniendo una concentración final de 12.87 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la astaxantina de igual manera se observó un aumento del 68 % con la luz blanca, la cual el día 27 de ensayo alcanzó una concentración de 1.42 $\mu\text{g/mL}$, pero para

el día 30 se observó una disminución del 62% en la concentración de la misma llegando a 0.53 $\mu\text{g/mL}$. En el caso del tratamiento con luz azul se observa un aumento del 86% desde la concentración inicial de astaxantina de 0.17 $\mu\text{g/mL}$ (día 18) y esta alcanzó una concentración final de 1.32 $\mu\text{g/mL}$ (ver gráfica N°4).



Gráfica N° 5 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo BBM, utilizando como factores de estrés 0.372 mg/mL de acetato de sodio (AS), irradiancia 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborado por autoras.

Al contrario de los tratamientos con las demás concentraciones de acetato como factor de estrés, al utilizar la concentración de 0.372 mg/mL de acetato de sodio y luz blanca en este medio de cultivo, se observó un aumento de 22 % en la concentración de clorofila el día 24 del ensayo, alcanzando un nivel de 10.80 $\mu\text{g/mL}$, el cual decayó en un 38.2% para el día 30, obteniéndose una concentración final de clorofila de 6.67 $\mu\text{g/mL}$, lo cual evidencia la disminución de la actividad fotosintética que va de la mano con el aumento de la en la concentración de astaxantina. Por el contrario al usar esta misma concentración de acetato de sodio y la luz azul como factores de estrés se contempló un aumento progresivo en la concentración de clorofila; esta partió de una concentración inicial de 5.44 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzó una concentración de 16.60 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando el aumento del 67.9 %. (ver gráfica N°5).

Respecto a la concentración de astaxantina lograda al utilizar esta concentración de acetato de sodio, se observó un incremento de la concentración a los 30 días, siendo el tratamiento en luz azul en el cual se obtuvo la mayor concentración de astaxantina

llegando a 1.93 $\mu\text{g/mL}$ (día 30) en tanto al tratamiento en luz blanca la concentración de astaxantina final fue de 0.78 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla N° 17: Resumen de las concentraciones finales de clorofila y astaxantina obtenidas en el medio de cultivo BBM con factores de estrés.

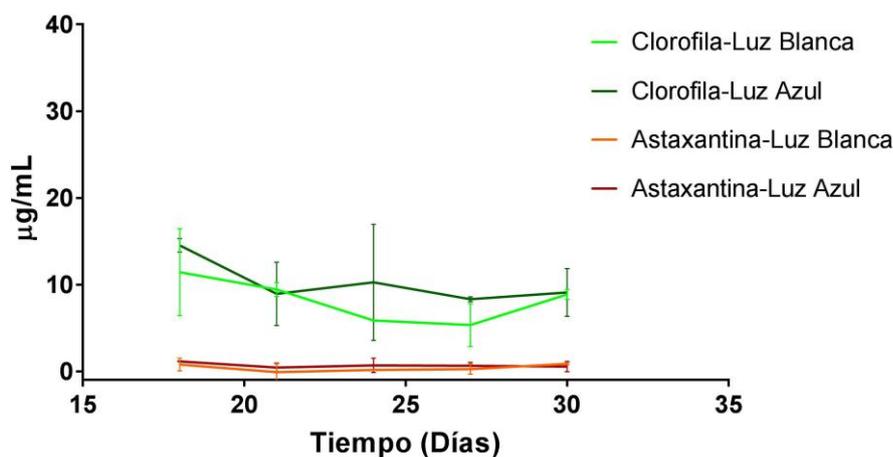
Factores de estrés			Clorofila		Astaxantina	
Concentración acetato de sodio	Luz	Irradianza	Concentración inicial (día 18)	Concentración final (día 30)	Concentración inicial (día 18)	Concentración final (día 30)
0.248 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.08 $\mu\text{g/ml}$	7.23 $\mu\text{g/ml}$	0.15 $\mu\text{g/ml}$	0.40 $\mu\text{g/ml}$
0.248 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	3.76 $\mu\text{g/ml}$	9.44 $\mu\text{g/ml}$	0.11 $\mu\text{g/ml}$	0.80 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.40 $\mu\text{g/ml}$	9.10 $\mu\text{g/ml}$	0.45 $\mu\text{g/ml}$	0.53 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.65 $\mu\text{g/ml}$	11.45 $\mu\text{g/ml}$	0.17 $\mu\text{g/ml}$	1.32 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	8.43 $\mu\text{g/ml}$	8,67 $\mu\text{g/ml}$	0.52 $\mu\text{g/ml}$	0.78 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.44 $\mu\text{g/ml}$	19.18 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	1.93 $\mu\text{g/ml}$

Fuente: Elaborado por autoras.

En resumen, al realizar el cultivo en el medio de cultivo BBM, el tratamiento que indujo a la mayor síntesis de astaxantina correspondió al tratamiento 5 (ver tabla N° 18) en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiación 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como factores de estrés.

Astaxantina y clorofila en el medio RM

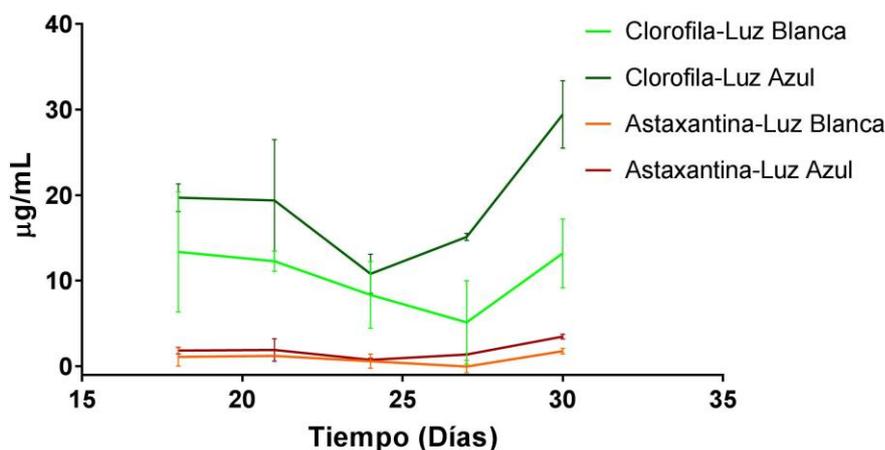
A continuación, se describen los resultados obtenidos empleando las diferentes concentraciones de acetato de sodio, alta irradiación, luz blanca y azul en el medio de cultivo RM.



Grafica N° 6 producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.248 mg/mL de acetato de sodio (AS), alta irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborada por autoras.

En la gráfica N° 6 se observa el comportamiento de astaxantina y clorofila durante los 15 días de inducción de estrés, con la concentración de acetato de sodio de 0.248 mg/mL en luz blanca y azul. Se observó un descenso en la concentración de clorofila del 53% para luz blanca alcanzando una concentración de $5.34 \mu\text{g/mL}$ el día 27 y posteriormente hubo un aumento del 30% el día 30, llegando de esta manera a una concentración final de $8.87 \mu\text{g/mL}$. En luz azul se evidenció una disminución del 37% en la concentración de clorofila, con una concentración final de $9.1 \mu\text{g/mL}$ de la misma, lo cual se correlaciona con el aumento en la concentración de astaxantina en los mismos; esta última alcanzó para el día 30 del ensayo una concentración de $0.87 \mu\text{g/mL}$ en luz blanca y $0.91 \mu\text{g/mL}$ en luz azul (ver gráfica N° 6)

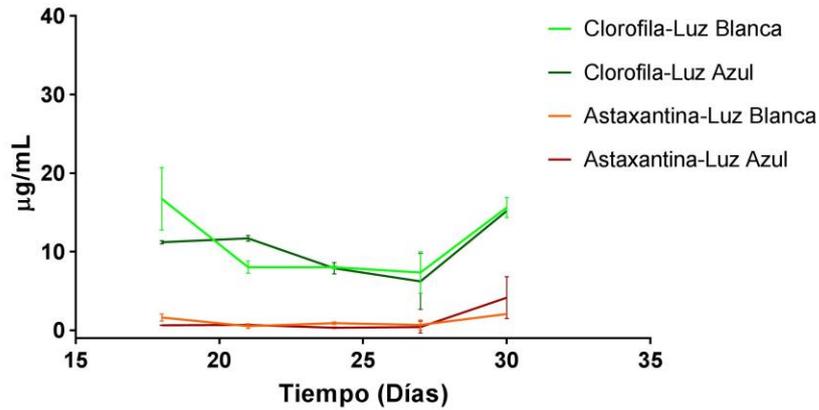


Grafica N° 7 Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.310 mg/mL de acetato de sodio (AS) irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborada por autoras.

Al adicionar 0.310 mg/mL de acetato de sodio al medio RM (gráfica N° 7), se observó un aumento en la concentración de clorofila y astaxantina debido a la exposición a los factores de estrés, color de luz y concentración de acetato de sodio, siendo así la luz azul en la cual se observaron las mayores concentraciones. En luz blanca, la concentración de clorofila decayó progresivamente hasta el día 27 (5.14 µg/mL) y posteriormente aumentó un 60 % para el día 30 llegando a un total de 13.20 µg/mL, mientras que en la luz azul se observó una concentración 19.72 µg/mL en el día 18, la cual disminuyó progresivamente hasta el día 24 llegando a una concentración mínima de 10.82 µg/mL y aumentando un 63% el día 30, alcanzando una concentración de 29.46 µg/mL (indicando el tratamiento con la concentración más alta de clorofila).

Por otra parte, la concentración de astaxantina también mostró un comportamiento ascendente, al combinar los factores de estrés color de luz y acetato de sodio a concentración de 0.310 mg/mL, sin embargo se resalta que en la luz blanca en el día 18 alcanzó una concentración de 1.10 µg/mL obteniendo un aumento del 38% y alcanzando una concentración final de astaxantina de 1.77 µg/mL, por el contrario en la luz azul en el día 18 del ensayo se obtuvo 1.85 µg/mL aumentando así un 47% hasta llegar a una concentración de 3.48 µg/mL de astaxantina.



Grafica N° 8: Producción de astaxantina y clorofila en el medio de cultivo RM, utilizando como factores de estrés 0.372 mg/mL de acetato de sodio (AS) irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz blanca y azul.

Fuente: Elaborada por autoras.

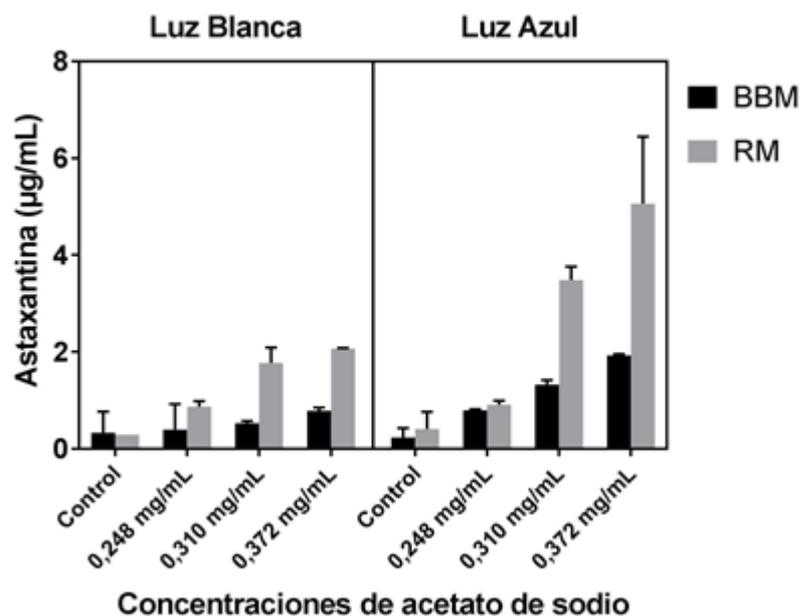
Finalmente, la concentración de acetato de sodio de 0.372 mg/mL (concentración más alta de este factor de estrés utilizada en el ensayo) alcanzó una concentración final de clorofila de aproximadamente $15.62 \mu\text{g/mL}$ en luz blanca y $23.66 \mu\text{g/mL}$ en luz azul (gráfica No. 8). En cuanto a la producción de astaxantina, esta mostró un aumento de 62.8% en luz blanca y un 79.2 % en luz azul, alcanzando concentraciones de $2.07 \mu\text{g/mL}$ y $5.06 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Cabe resaltar que con la luz azul se obtuvo una concentración más elevada de astaxantina que al usar luz blanca, lo cual también se pudo observar en los tratamientos donde se usaron las demás concentraciones de acetato de sodio.

Tabla N° 18: Resumen de los resultados promedio obtenidos en el medio de cultivo RM, factores de estrés y concentraciones finales de clorofila y astaxantina.

Factores de estrés			Clorofila		Astaxantina	
Concentración acetato de sodio	Luz	Irradianza	Concentración inicial (día 18)	Concentración final (día 30)	Concentración inicial (día 18)	Concentración final (día 30)
0.248 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	11.42 $\mu\text{g/ml}$	8.87 $\mu\text{g/ml}$	0.77 $\mu\text{g/ml}$	0.87 $\mu\text{g/ml}$
0.248 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	14.53 $\mu\text{g/ml}$	9.1 $\mu\text{g/ml}$	1.14 $\mu\text{g/ml}$	0.91 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	13.38 $\mu\text{g/ml}$	13.2 $\mu\text{g/ml}$	1.10 $\mu\text{g/ml}$	1.77 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	19.72 $\mu\text{g/ml}$	29.46 $\mu\text{g/ml}$	1.85 $\mu\text{g/ml}$	3.48 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	16.74 $\mu\text{g/ml}$	15.62 $\mu\text{g/ml}$	1.62 $\mu\text{g/ml}$	2.07 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	11.19 $\mu\text{g/ml}$	23.66 $\mu\text{g/ml}$	0.64 $\mu\text{g/ml}$	5.06 $\mu\text{g/ml}$

Fuente: Elaborada por autoras.

En resumen, al realizar el cultivo en el medio RM, el tratamiento que indujo a la mayor síntesis de astaxantina correspondió al tratamiento en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiación 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ como factores de estrés (ver tabla N°19).



Grafica N° 9 Concentraciones finales de astaxantina (expresada en µg/mL) de todos los tratamientos, obtenidas el día 30 de ensayo (15 días de inducción de estrés). Se clasifican por luz (blanca y azul), medio de cultivo (BBM y RM) y la concentración de acetato de sodio utilizada donde el control hace referencia a los tratamientos que no se les proporcionó acetato de sodio al medio de cultivo. ANOVA con un 95% de confianza.

Fuente: Elaborada por autoras.

Tabla N° 19: Análisis de varianza del efecto de los factores de estrés concentración de acetato de sodio, luz (blanca y azul) y medio de cultivo sobre la concentración de astaxantina producida a los 30 días de cultivo (Ver tabla completa en el anexo 3).

Tabla ANOVA	DF	F (DFn, DFd)	P value
Concentración de acetato de sodio	3	F (3, 3) = 43,98	P<0,0001
Luz	1	F (1, 3) = 36,46	P<0,0001
Medio	1	F (1, 3) = 52,74	P<0,0001
Concentración de acetato de sodio x Luz	3	F (3, 3) = 10,54	P=0,0005
Concentración de acetato de sodio x Medio	3	F (3, 3) = 12,71	P=0,0002
Luz x Medio	1	F (1, 3) = 4,94	P=0,0410
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio	3	F (3, 3) = 2,608	P=0,0875

Residual	16		
----------	----	--	--

DF: grados de libertad; **F:** valor F; **DFn:** grados de libertad; **DFd:** residual; **P:** probabilidad

Fuente: Elaborada por autoras.

Al analizar la acumulación final de astaxantina, es decir, el total de astaxantina obtenida durante los 15 días de inducción de estrés (día 30 del total del ensayo), se pudo observar que la concentración de astaxantina obtenida fue directamente proporcional a la cantidad de acetato de sodio que contenía el medio de cultivo (gráfica No. 9). Al someter los datos a estudio estadístico por medio ANOVA con un 95% de confianza de tres vías, se observó que hubo diferencias significativas en los tratamientos ($F=43.98, P<0.0001, GL=3$) como se observa en la tabla N°20, en cuanto al efecto ejercido por las diferentes concentraciones de acetato de sodio, el color de luz y los medios de cultivo sobre la producción de astaxantina.

Se observó que los controles en ambas luces (medios de cultivo sin adición de acetato de sodio) llegaron a acumular concentraciones bajas de astaxantina, llegando a un máximo de 0.33 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en el caso del medio de cultivo BBM y 0.29 $\mu\text{g/mL}$ por RM en luz blanca, entre tanto, en luz azul los controles llegaron a acumular 0.23 $\mu\text{g/mL}$ y 0.41 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en medio BBM y RM respectivamente.

Los tratamientos en los que se utilizó la concentración de 0,248 mg/mL acetato de sodio mostraron una acumulación más alta de astaxantina que los controles, no obstante la producción de la misma fue menor que en las demás concentraciones de acetato de sodio combinados con las luces blancas y azul. En luz blanca se obtuvo en promedio 0.40 $\mu\text{g/mL}$ y 0,87 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en los medios de cultivo BBM y RM respectivamente y al igual que se observó en los controles y los tratamientos con las demás concentraciones de acetato de sodio, en luz azul se obtuvieron mejores concentraciones del carotenoide (ilustrado en la gráfica No. 9), llegando a acumular 0.80 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en el medio BBM y 0.91 $\mu\text{g/mL}$ en el medio de cultivo RM.

En el presente estudio el promedio de astaxantina que se obtuvo al utilizar la concentración de acetato de sodio de 0.310 mg/mL en luz blanca fue de 0.53 $\mu\text{g/mL}$ y 1.77 $\mu\text{g/mL}$ en BBM y RM respectivamente. Por otro lado, al utilizar esta misma concentración de acetato de sodio como factor de estrés en sumatoria a la luz azul, se obtuvo 1.32 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en medio BBM y 3.48 $\mu\text{g/mL}$ en medio RM.

Finalmente, se utilizó la concentración de 0.372 mg/mL de acetato de sodio para determinar si al aumentar la concentración de acetato de sodio en el medio de cultivo era posible optimizar la producción de astaxantina en los cultivos de *H. pluvialis*. Esta hipótesis fue comprobada ya que se observó que al utilizar la concentración de 0,372 mg/mL de acetato de sodio, la síntesis de astaxantina fue considerablemente mayor que al utilizar concentraciones más bajas de dicha sal. En luz blanca en promedio se obtuvieron concentraciones de astaxantina de 0.78 µg/mL en medio BBM y 2.07 µg/mL en medio RM, mientras que utilizando luz azul, se alcanzó la acumulación del pigmento de 1.93 µg/mL y 5.06 µg/mL en los medios de cultivo BBM y RM respectivamente.

El acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) es una sal orgánica que al entrar en contacto con el agua es hidrolizada en los iones acetato (CH_3COO^-) y sodio. El ion acetato reacciona con el agua produciendo ácido acético (CH_3COOH) y liberando iones OH^- ⁸². La liberación de iones hidroxilo generan un aumento en el pH del cultivo y al ser una especie reactiva de oxígeno induce estrés oxidativo⁸² en las células de *H. pluvialis* la cual produce astaxantina como mecanismo de defensa; por esta razón se observó en la investigación (gráficaN°9) que al aumentar la concentración de acetato de sodio adicionado en los medios de cultivo aumentó la acumulación de astaxantina en los mismos, como se aprecia en los resultados anteriormente descritos y en la gráfica No. 9, la luz con la mayor eficiencia para la producción de astaxantina fue la luz azul (ver tabla N°21). Esto se debe principalmente a la presencia receptores llamados fototropina, los cuales se activan con la longitud de onda azul e intervienen con el metabolismo celular; además se a determinado que esta luz, influye en una mejor extracción de la astaxantina, ya que induce la germinación celular y por tanto disminuye el grosor de la pared celular de la aplanospora⁸⁴.

Tabla N° 20: 1 Resumen de los resultados promedio obtenidos en los medios de cultivo RM y BBM, factores de estrés y concentraciones finales de clorofila y astaxantina.

Factores de Estrés			Medio BBM Concentracion final de:		Medio RM	Concentracion final de:
Concentración acetato de sodio	Luz	Irradianza	Clorofila	Astaxantina	Clorofila	Astaxantina
0.248 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	7.23 $\mu\text{g/ml}$	0.40 $\mu\text{g/ml}$	8.87 $\mu\text{g/ml}$	0.87 $\mu\text{g/ml}$
0.248 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	9.44 $\mu\text{g/ml}$	0.80 $\mu\text{g/ml}$	9.1 $\mu\text{g/ml}$	0.91 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	9.10 $\mu\text{g/ml}$	0.53 $\mu\text{g/ml}$	13.2 $\mu\text{g/ml}$	1.77 $\mu\text{g/ml}$
0.310 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	11.45 $\mu\text{g/ml}$	1.32 $\mu\text{g/ml}$	29.46 $\mu\text{g/ml}$	3.48 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Blanca	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	8,67 $\mu\text{g/ml}$	0.78 $\mu\text{g/ml}$	15.62 $\mu\text{g/ml}$	2.07 $\mu\text{g/ml}$
0.372 mg/mL	Azul	150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	19.18 $\mu\text{g/ml}$	1.93 $\mu\text{g/ml}$	23.66 $\mu\text{g/ml}$	5.06 $\mu\text{g/ml}$

Fuente: Elaborada por autoras.

DISCUSIÓN

La astaxantina es un carotenoide de alto valor comercial con aplicaciones en la industria alimentaria, nutracéutica y cosmética. *Haematococcus pluvialis* representa una importante fuente de astaxantina, llegando a acumular, según investigaciones, hasta un 3% del pigmento^{85, 86}. *H. pluvialis* requiere de micronutrientes esenciales como el sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cloro, azufre y los macronutrientes como carbono, hidrógeno, oxígeno y fósforo, que son de origen inorgánico²⁶, que propician su crecimiento para la producción de biomasa y la síntesis de astaxantina⁸⁷.

El producir este carotenoide de forma natural implica diversos beneficios, desde hace años, investigadores se han propuesto encontrar las condiciones óptimas para su producción utilizando medios de cultivo cuyos componentes permitan la adaptación de la biomasa microalga y su estimulación por medio de factores de estrés que inducen a su síntesis en concentraciones significativas⁸⁸. En el presente trabajo de investigación se utilizaron los medios de cultivo Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), puesto que en la revisiones bibliográficas estos medios habían presentado alto rendimiento en la producción de biomasa y por ende de astaxantina.

En el artículo de Mahfuzur et al⁵⁵. del 2016, se menciona que una composición ideal del medio para lograr una alta tasa de crecimiento y acumulación de biomasa de *H. pluvialis* es diferente de la composición ideal para la acumulación de astaxantina (también conocida como conducción inductora). En diversos estudios se ha encontrado que el nitrato de sodio es utilizado por la microalga como fuente de nitrógeno inorgánico y como una alternativa es posible utilizar urea como una fuente orgánica del mismo. Ambos medios de cultivos utilizados en la investigación (RM y BBM) utilizan como fuente de nitrógeno inorgánico nitrato de sodio, que como lo evidenciaron Orosa et al¹¹. en el año 2005 influye positivamente en el crecimiento de *H. pluvialis*.

En los últimos años la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca a trabajado de la mano con la Universidad de la Sabana en diversos estudios con el objetivo de optimizar la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Niño et al ²⁶. en el 2017 compararon la producción de biomasa microalga de *H. pluvialis* en los medios de cultivo RM, BBM y OHM bajo las condiciones de cultivo de pH 6.7, fotoperiodo 18/6 LO, irradianza de 70 microeinsteins, luz blanca, agitación manual una vez al día y CO₂ 5%; a los 36 días de cultivo obtuvieron un recuento celular de 7.55x10⁵ células/ml con el medio RM y de

3.88x10⁵ células/ml con BBM mostrando un mayor rendimiento por parte del medio RM, lo que concuerda con lo reportado en la literatura. Al realizar la comparación con los resultados obtenidos durante el presente estudio, en el cual a los 30 días de cultivo se obtuvo un crecimiento celular final en BBM de 1.51x10⁵ cel/mL y 1.98x10⁵ cel/mL en luz blanca y azul respectivamente y en medio de cultivo RM 0.89x10⁵ cel/mL en luz blanca y 1.03x10⁵ cel/mL en luz azul bajo condiciones de irradianza de 150 μE m⁻² s⁻¹, acetato de sodio a diferentes concentraciones, CO₂ 5% y demás condiciones previamente mencionadas; dichos resultados presentan una disminución significativa en cuanto a los obtenidos por Niño et al. en el 2017, teniendo en cuenta que ellos utilizaron un tiempo de cultivo más prolongado que el utilizado en el presente estudio. En otra investigación realizada en asociación de ambas instituciones por Díaz et al ⁷⁶ en el 2016, los resultados obtenidos mostraron que la microalga tuvo un buen desempeño durante la fase de crecimiento después de 36 días de cultivo, llegando a producir 2.10x10⁶ cel/mL y 1.38x10⁶ cel/mL de *H. pluvialis* al utilizar condiciones de nitrógeno al 4% y 5% respectivamente, mostrando de esta manera diferencias aún mayores con el presente estudio, en el cual se observó una acumulación de biomasa menor a los 30 días de cultivo.

Fábregas et al ⁸⁹ en el 2000 realizaron estudios con el propósito de optimizar el cultivo de *H. pluvialis* y la producción de biomasa del mismo, durante su estudio en el 2000, utilizaron los medios de cultivo OHM, BBM y el medio Chu modificado. Durante su estudio el medio ideal de cultivo fue el OHM, el cual llegó a producir 3.77x10⁵ células/ml mientras que en BBM obtuvieron una biomasa de 1.2x10⁵ células/ml, resultado que fue 3 veces menos al obtenido en OHM lo cual se debe principalmente a que este último se encuentra suplementado con vitaminas B12, biotina y tiamina. Los resultados de éste proyecto de investigación se asemejan a lo hallado por Fábregas et al. (2000), ya que se logró la obtención de una biomasa en medio de cultivo BBM de 1.51x10⁵ cel/ml y 1.98x10⁵ cel/ml en luz blanca y azul respectivamente, en combinación con acetato de sodio e irradianza de 150 μE m⁻² s⁻¹.

Las condiciones a las cuales se somete el cultivo de *H. pluvialis* de igual manera influyen en la producción de biomasa y astaxantina del mismo. Se ha reportado que esta microalga tiene la capacidad de crecer en cultivos fotoautotróficos, mixotróficos y heterotróficos según la fuente de carbono que se le proporcione (orgánica y/o

inorgánica) y la presencia o ausencia de luz⁹⁰. El acetato de sodio es utilizado en el cultivo mixotrófico de *H. pluvialis* como fuente de carbono orgánico y se ha reportado que aumenta la tasa de crecimiento de la microalga¹²; sin embargo, como lo observaron Hata et al⁹¹ en el 2001 y se corroboró en ésta investigación, el incremento en la concentración de acetato de sodio no aumenta la producción de biomasa pero si se ve directamente implicada en la acumulación de astaxantina, por que al usar la concentración de acetato de sodio de 0.372 mg/mL (concentración más elevada) en combinación de luz azul e irradianza de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se obtuvo la mayor concentración de astaxantina con una concentración final de 5.06 $\mu\text{g/mL}$ de este carotenoide.

Durante el presente proyecto no se observaron diferencias significativas ($F=3.03$; $P=0.06$; $GL=3$) sobre la producción de biomasa microalgal al aumentar la concentración de acetato de sodio, sin embargo al adicionarlo después de finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga (15 días) a los medios de cultivo, en combinación con los factores de estrés luz blanca, luz azul y alta irradianza, se observó un incremento en el crecimiento celular de 3.80×10^4 cel/ml a un promedio de 1.75×10^5 cel/ml en el medio BBM y de 3.23×10^4 cel/ml a 9.63×10^4 cel/ml en promedio en los cultivos en RM. Se observó que el uso de luz azul y blanca a las que fueron sometidos los cultivos mostraron diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa, demostrando que la luz azul mejora de manera significativa ($F=6.43$; $P=0.02$; $GL=1$) el metabolismo y reproducción de *H. pluvialis*; Hanan et al⁹² en el año 2013 concluyeron que las condiciones para optimizar el crecimiento de *H. pluvialis* se obtienen al utilizar luz, ya que genera un ambiente óptimo en los medios de cultivo; Schenk et al⁸⁴ en el 2018 de igual manera encontraron que la luz azul mejora la germinación de esta microalga ya que tiene efectos sobre el metabolismo, gracias a que la célula posee receptores para esta longitud de onda conocidos como fototropina, los cuales activan diversas funciones fisiológicas a nivel celular, así como lo afirman Fernández et al. en el 2013 debido a que ésta luz permite un incremento en el contenido total de los carotenoides⁵⁸.

Las diferentes condiciones de estrés que se emplean en el cultivo de *H. pluvialis*, permiten que los carotenoides secundarios se sinteticen en mayores cantidades, debido a los mecanismos de protección que se generan en la microalga.

Rammuni et al. en el 2019 mencionan que los carotenoides secundarios como la astaxantina y la cantaxantina le brindan a la clorofila fotoprotección al formar una capa de defensa sobre la microalga cuando está expuestas a intensidades de luz extremas⁹³.

La temperatura óptima para el desarrollo de *H. pluvialis* se encuentra entre 20 y 28 ° C. Temperaturas por encima de los 30°C inducen el enquistamiento de la célula vegetativa a la fase de aplanospora (etapa roja). Dicha transición se acompaña de la reducción en la división celular y el incremento en la acumulación de astaxantina. El aumento de la temperatura afecta la síntesis de astaxantina a través de la estimulación de la formación de radicales de oxígeno y su mayor reactividad, lo que respalda la afirmación de Torrentera y Tacon propuesta en 1989 que indicaba que las altas temperaturas afectan la división celular, pero no la síntesis de proteínas, lo que aumenta la producción de carotenoides⁵⁸. En este trabajo de investigación se utilizaron temperaturas de 20°C ± 2°C las cuales aseguraban su correcto desarrollo.

El pH también puede afectar significativamente el crecimiento celular y la síntesis de clorofila y carotenoides en *H. pluvialis*, de acuerdo con lo expresado por Moronta, Mora y Morales en el 2006⁹⁴, este factor permite la solubilidad de dióxido de carbono y de los minerales presentes en el cultivo; como demostraron Sarada et al. en su investigación en el año 2001, un pH igual a inferior a 5 puede inhibir el crecimiento celular de la microalga, mientras que un pH 7 se correlaciona con un mejor crecimiento y mayor producción de astaxantina¹⁰. Durante el presente estudio se mantuvo un rango de pH entre 6.5 y 8, observando buenos resultados en la acumulación de biomasa y astaxantina.

La iluminación LED blanca o azul o la mezcla de ambos en una proporción de 3:1 a 7000 lx ($\sim 95 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) promueven el cambio morfológico de las células vegetativas verdes a células rojas enquistadas, y la mayor longitud de onda de mayor absorción por parte de las células en la azul⁹⁵. Ruijuan et al⁹⁶. realizaron un cultivo de *H. pluvialis* en medio BBM expuesto a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ LED blanco, LED azul (440 nm) y LED rojo (660 nm) según el estudio, esta intensidad de luz LED es la adecuada para la germinación de hematocistos y la estabilidad de astaxantina; éstos se incubaron durante 5 días con un ciclo de L:O de 16/8 h a 25 ° C y se airearon constantemente con aire filtrado (0,22 μm), como resultados se encontró que la luz roja puede aumentar el consumo de nitrato para la síntesis de clorofila y la luz azul redujo el consumo de

nitrate, lo que disminuye la síntesis de clorofila y retardar la degradación de la astaxantina. Al igual que en nuestro estudio, donde se halló mayor rendimiento en cuanto a la producción de biomasa y astaxantina por *H. pluvialis*, ellos encontraron que la luz azul aumenta la acumulación de astaxantina durante el enquistamiento y el mayor contenido de astaxantina ya que obtuvieron 37.24 mg g^{-1} de astaxantina, mostrando diferencias significativas en cuanto a la acumulación de astaxantina al utilizar la luz azul en comparación con las luces blanca y roja⁹⁶. De igual manera, Kong et al. en el 2015 encontraron resultados similares, demostrando que la luz azul tiene una mayor eficiencia en la acumulación de astaxantina que la luz blanca, lo cual se debe a una mayor absorción de esta longitud de onda por parte de las células enquistadas, sin embargo, ellos realizaron también el estudio sobre el efecto de una combinación de luz azul y blanca en proporción 3:1, la cual mostró resultados aún mejores⁹⁵. Dichos resultados coinciden con los obtenidos durante el presente estudio, ya que se logró la obtención de $5.06 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de astaxantina al utilizar luz azul en combinación con acetato de sodio en concentración de 0.372 mg/mL , medio de cultivo RM e irradianza de $150 \text{ }\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Ruijuan et al⁸⁴. en el 2018 comprobaron la expresión del gen *phot* en *H. pluvialis*, el cual aumenta su expresión a los 4 días de cultivo principalmente en presencia de luz azul (en comparación con luz blanca y roja). Este gen codifica para la fototropina (PHOT), la cual es un receptor de luz azul que regula un rango de respuestas fisiológicas fotosintéticas en las plantas, como el fototropismo, la apertura estomática inducida por la luz y los movimientos del cloroplasto, el gen *phot* detecta la señal luminosa y regula la transcripción de los genes *psy* y *pds* de la biosíntesis de carotenoides⁸⁴. Así mismo Steinbrenner et al⁹ en el 2001 consideran que además del gen *psy*, también es fundamental el gen *ch* (carotenoide hidroxilasa) al mostrar una expresión génica aumentada en respuesta a una alta irradianza, lo cual posiblemente ocurrió en este estudio ya que se llevó a cabo bajo condiciones de alta irradianza ($150 \text{ }\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), un fotoperiodo de 20:4 LO y luces blanca y azul. Estos hallazgos llegan a dilucidar el efecto de la luz azul sobre la producción de biomasa y astaxantina en *H. pluvialis* encontrado por múltiples autores a través del tiempo.

En cuanto al efecto del acetato de sodio utilizado como factor de estrés salino en la producción de astaxantina, se ha demostrado que este induce la síntesis de astaxantina

incluso en condiciones de oscuridad; en nuestro estudio se observó que juega un papel importante en la acumulación de dicho carotenoide al ser combinado con luz azul, alta irradianza y el medio de cultivo RM, tal como lo muestra el estudio de Vidhyavathi et al¹⁴. en el 2008, en el cual al adicionar acetato de sodio y acetato de sodio/NaCl al cultivo de *H. pluvialis* después de la fase exponencial de crecimiento, y se logró obtener 21.8 mg g⁻¹ y 24.5 mg g⁻¹ peso seco de astaxantina, mostrando un sinergismo entre ambas sales; esto se debe a que el estrés salino aumenta la producción total de carotenoides y astaxantina a través de la activación post-traducciona. Así mismo Vidhyavathi et al. en el 2008 observaron que a medida que la concentración de astaxantina aumentaba, la concentración de clorofila y los carotenoides primarios (luteína, β -caroteno) descendía¹⁴; en la presente investigación se observó que la producción de astaxantina aumentaba con el tiempo y hubo una disminución progresiva del contenido de clorofila en las células.

En el año 2015, la Universidad de la Sabana y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca realizaron un estudio en el cual Niño y Rodríguez evaluaron el efecto de medios de cultivo (BBM, OHM y RM), acetato de sodio y alta intensidad de luz sobre la acumulación de biomasa y producción de astaxantina en *H. pluvialis*. Al igual que en nuestra investigación, ellos utilizaron la concentración de 0.310 mg/mL de acetato de sodio como inductor de estrés obteniendo una concentración final de astaxantina de 8.3 μ g/mL en medio de cultivo RM adicionado con acetato de sodio⁷⁸. En esta investigación se obtuvo una concentración de astaxantina máxima de 5.06 μ g/mL, se pudo observar que aunque la concentración de acetato de sodio 0.310 mg/mL es efectiva en la producción de astaxantina, al aumentar la concentración de este factor de estrés utilizando una concentración de 0,372 mg/mL de este compuesto en el medio de cultivo RM, con luz azul y alta irradianza, se obtuvieron los mejores resultados, ya que se incrementó el de este carotenoide en un 32% demostrando que la concentración de astaxantina obtenida fue directamente proporcional a la concentración de acetato de sodio utilizada como factor de estrés combinado con el color azul.

Zhang Z. et al, en el 2016 utilizaron acetato de sodio/nitrato, acetato de sodio/sin nitrato y otros componentes como factores de estrés con el fin de identificar su efecto en la producción de biomasa, cambio morfológico y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Observaron que al utilizar acetato de sodio/sin nitrato se obtenían los mejores

resultados en cuanto a la producción de biomasa (0.86% de peso seco)²⁴, corroborando de esta manera, con lo observado en el presente estudio, que el acetato de sodio influye positivamente en la acumulación de este carotenoide así como se muestra en el estudio de Sarada et al, y Zhang et al en el 2016, estudiaron el uso del acetato de sodio combinado con otros factores de estrés como luz, NaCl y deficiencia de nitrógeno generan un efecto de sinergismo que resulta en un mejor rendimiento para la producción de astaxantina²⁴; a diferencia de lo encontrado en el artículo de Wanida et al en el 2017, donde el acetato de sodio usado como único factor de estrés, indujo menor síntesis de astaxantina (20-22 mg g⁻¹) en comparación con el acetato de potasio (25-43 mg g⁻¹), magnesio (19-33 mg g⁻¹) y bicarbonato de sodio (25-35 mg g⁻¹) utilizado²⁵. Paralelamente, otros autores establecieron la relación del acetato de sodio con otras sales como es el caso del nitrato, en la que Zhang et al concluyeron que cuando hay presencia de ambas sales se da un aumento considerable en el número de células, sin embargo para obtener un aumento en las concentraciones de astaxantina no se requiere nitrato²⁴, ya que su deficiencia es un factor inductor de estrés, por lo cual la combinación de factores como la luz, alta irradianza, y la concentración de acetato de sodio inducen la producción de astaxantina como se observó en este trabajo al utilizar luz azul, irradianza de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0.372 mg/mL de acetato de sodio.

Zhang et al en el 2016 demostraron que al utilizar acetato de sodio en combinación con sulfato ferroso y alta intensidad de luz se obtienen mejores resultados en la producción de astaxantina (3.2 $\mu\text{g/mL}$) que al utilizar únicamente acetato de sodio y baja intensidad de luz (0.5 $\mu\text{g/mL}$); esto se debe a que además de activar los genes carotenogénicos, se induce la formación de ácidos grasos indispensables para la acumulación de astaxantina en el protoplasto de *H. pluvialis*¹⁶. Estudios como el realizado por Qiang et al. ratifican que la acumulación de astaxantina es directamente proporcional a la acumulación de lípidos, ya que la astaxantina es un pigmento liposoluble y para su estabilidad en el protoplasto, se sitúa en los glóbulos grasos²⁰.

La acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* está acompañada de cambios morfológicos y fisiológicos en sus células, que se activan como mecanismo de defensa ante condiciones medioambientales adversas. La etapa vegetativa de *H. pluvialis* se caracteriza por presentar dos flagelos, palmella en la cual la célula pierde sus flagelos y por último la aplanospora, también conocida como fase roja, que se induce por

condiciones desfavorables, como deficiencia de nutrientes, alta irradianza, temperatura y pH no adecuados entre otras. Estas fases fueron observadas durante la realización de esta investigación, por efecto de los factores de estrés correlacionándose con la cantidad de astaxantina generada, como ya se ha descrito anteriormente las células vegetativas tienen la capacidad de ser móviles gracias a la presencia de dos flagelos que sobresalen en su papila interior; a su vez está formada por una pared, vacuolas, cloroplasto, pirenoides y núcleo. Cuando la microalga se somete a condiciones inductivas como deficiencia de nutrientes, temperatura, entre otros factores de estrés, se da un cambio en los componentes y actividades celulares, produciendo una transformación de célula verde a aplanospora, la cual funciona como una estructura de resistencia⁵⁴. Esto se da como resultado a las condiciones adversas que se presentan en el medio, así mismo como factor protector de la microalga, induciendo la generación del compuesto⁴⁶. En nuestro caso se lograron evidenciar estos cambios hasta la fase final de quiste o aplanospora donde podemos observar la presencia de astaxantina.

Sarada et al en el 2008 encontraron que al utilizar acetato de sodio y acetato de sodio en combinación con cloruro de sodio, se acelera el proceso de enquistamiento de las células de *H. pluvialis*, observando que al segundo día de inducción de estrés el 82% y 89% de células se habían transformado en quistes al usar acetato de sodio y acetato de sodio/NaCl respectivamente¹⁴. De la misma manera en la presente investigación se observó que a los 3 días de inducción de estrés con el acetato de sodio, luz azul y alta irradianza (día 18 de ensayo) las células habían empezado su proceso de enquistamiento, y para el día 21 (6 días de inducción) la mayoría de las mismas habían cambiado su morfología (ver tabla de cambios morfológicos). En algunos estudios se ha reportado que *Haematococcus pluvialis* puede producir astaxantina en heterotrofia y mixotrofia utilizando acetato de sodio como fuente de carbono debido a que el acetato promueve la obtención de mayores concentraciones celulares, la alta irradianza y los fotoperíodos también contribuyen a que la microalga sea capaz de sintetizar este carotenoide⁵⁹.

El sometimiento a factores de estrés en el cultivo, indujo la transformación de las células vegetativas a aplanosporas. En el presente estudio se utilizó una alta irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para inducir una mayor acumulación de astaxantina, y como

observaron Zhang et al., al utilizar baja intensidad de luz en la fase de inducción de estrés, después de culminado el periodo de crecimiento exponencial, el enquistamiento de las células inicia a los 4 días, entre tanto al utilizar alta intensidad de luz este cambio morfológico se apreció a los 2 días¹⁶.

En definitiva, el uso de acetato de sodio en concentración de 0.372 mg/mL en combinación con luz azul, alta irradianza y medio de cultivo RM generando la producción de astaxantina en mayores concentraciones, al inducir que las células de *H. pluvialis* cambiaran su morfología de vegetativas a enquistadas. Por lo tanto se sugiere usar luz azul, irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y acetato de sodio (0.372 mg/mL) en el cultivo de esta microalga, para inducir la generación del compuesto en concentraciones significativas una vez finalizada la fase exponencial de crecimiento de la misma.

CONCLUSIONES

- Al evaluar el crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM, bajo las condiciones de cultivo de pH 6.8, fotoperiodo 20:4 LO, CO₂ 5%, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, luz blanca e irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se determinó que no hay diferencias significativas ($F=0.7871; P=0.3761; GL=1$) en cuanto a la producción de biomasa durante la etapa de crecimiento exponencial de *H. pluvialis*, hallándose 3.80×10^4 cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0.326 cel/día en BBM y 3.23×10^4 cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0.329 cel/día en RM a los 15 días de cultivo donde las células no se encontraban sometidas a estrés. Sin embargo, se observa que tras la inducción de estrés el crecimiento en el medio de cultivo BBM es significativamente mayor ($F=39.43; P<0.0001; GL=1$) en comparación con el medio RM.
- Los factores de estrés empleados en la investigación ejercen efectos significativos en la síntesis de astaxantina. Se observó que el medio de cultivo BBM fue ideal en la producción de biomasa microalgal, y el medio RM fue significativamente más eficiente para la producción de astaxantina en $5.06 \mu\text{g/mL}$ ($F=52.74; P<0.0001; GL=1$) en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradianza $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como factores de estrés. Se observó un aumento progresivo en la concentración de clorofila, lo cual se correlaciona con el aumento de la biomasa en los biorreactores, sin embargo en los tratamientos con el mayor aumento de astaxantina se observó una disminución en la cantidad de clorofila.
- Durante la investigación se observaron las tres principales fases morfológicas de *H. pluvialis*; durante la fase de crecimiento se observó que la mayoría de células estaban en fase vegetativa debido a las condiciones óptimas del medio de cultivo. Tras la inducción de estrés con acetato de sodio, alta irradianza y luces blanca y azul, las células iniciaron un proceso de enquistamiento (palmella) aproximadamente a los 6 días de inducción y la posterior acumulación de astaxantina dando lugar a aplanosporas de tamaño aumentado y pared celular gruesa. No se observaron diferencias con los tratamientos analizados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar los factores de estrés seleccionados por la mayor producción de astaxantina para realizar la etapa de escalamiento.

Se sugiere el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para analizar el contenido de astaxantina.

Adicionalmente, se sugiere realizar el estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis de astaxantina bajo los factores de estrés estudiados.

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

En el desarrollo de esta investigación se realizó la participación en cuatro eventos nacionales. Dentro de los eventos en los cuales se participó fue en el “ VII ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN” que se desarrolló en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca el 26 septiembre del año 2017, donde se presentaron los objetivos y parte del marco teórico de la investigación.

De igual manera se llevó a cabo la participación en “ III CONGRESO COLOMBIANO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR C2B2” llevado a cabo en la ciudad de Bogotá del 1 al 3 de Noviembre de 2018, donde se presentó la primera parte del proyecto en la modalidad de póster.

Se llevó a cabo la participación en “ 18° CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA “ llevado a cabo en la ciudad de Barranquilla del 9 al 12 de noviembre en la modalidad de poster, esta se realizó el día 10 de Noviembre a la 1:00pm, donde se mostraron resultados de la primera parte de la investigación.

También se realizó la participación “ VIII ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN” que se llevó a cabo en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca el 30 de Enero del 2019, donde se presentó el proyecto en su totalidad.

Finalmente se participó en el “XVII ENCUENTRO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN” RedColsi realizado en la Universidad Autónoma de Colombia del 08 al 10 de mayo del 2019 en la ciudad de Bogotá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Nguyen KD. Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production. Chemical and Biomolecular Engineering [Internet]. 2013 [citado 2018 agosto 20]; Available in: https://www.researchgate.net/publication/305150785_Astaxanthin_a_comparative_case_of_synthetic_vs_natural_production
- ² Camacho JE, González G, Klotz B. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. NOVA [Internet]. 2013 [citado 2017 oct 7];11(19):94-103 Disponible en:<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1022/1019>
- ³ Ambati RR, Phang SM, Ravi S, et al. astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. Mar drugs [Internet]. 2014[citado 2018 abril 19];12(1), 128-152 Available in: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/128/htm>
- ⁴ Fernández J, Oterino AG, Alonso GG, Flores JA y Turrado JP. Presencia de *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) en la provincia de Zamora (Haematococcaceae). Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol. [Internet] 2015 [citado 2018 abril 23]; 149, 101-107. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903000787>
- ⁵ Martínez S. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) cultivada en diferentes medios.[Trabajo de grado de para obtener el titulo de doctora en tecnología avanzada] [Internet] 2011 Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional., México, D.F., págs. 103. [citado 2018 Abril 19] Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1>.
- ⁶ Kiperstok AC,Sebestyén P, Podola B, Melkonian M.Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. Algal Research [Internet] 2017 [citado 2018 abril 24]; 213-222 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641630594X>

- ⁷ Makio K, Toshihide K and Shiro N. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis* Appl Environ Microbiol [Internet] 1993 [citado 2018 abril 24];59(3): 867–73. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202201/>
- ⁸ Orosa M, Valero JF, Herrero C, et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. Biotechnology Letters [Internet].2001 [citado 2018 abril 22];23 (13), 1079-85 Available in: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1010510508384>
- ⁹ Steinbrenner J and 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*. Planta Physio [Internet].2001 [citado 2018 abril 22];125 (2): 810 - 17 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC64882/>
- ¹⁰ Sarada R, Tripathi U and Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry [Internet].2002 [citado 2018 abril 22];37 (6): 623-27 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201002461>
- ¹¹ Orosa M, Franqueira D, Cid A and Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology [Internet].2005 [citado 2018 abr 2]; (96) 373–378 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404001476>
- ¹² Jeon Y, Cho C and Yun Y. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology [Internet].2006 [citado 2018 marz 29]; (39) 490–495 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022906001098?via%3Dihub>

- ¹³ Imamoglu E, Vardar F and Conk M.. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. International Journal of Natural and Engineering Sciences [Internet]. 2007 [citado 2018 abril 22]; 1 (3): 05-09 Available in:
https://www.researchgate.net/publication/284261435_Effect_of_different_culture_media_and_light_intensities_on_growth_of_Haematococcus_pluvialis
- ¹⁴ Vidhyavathi, Venkatachalam and Sarada. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. J Exp Bot [Internet].2008 [citado 2019 marz 25];59(6):1409-18. Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343887>
- ¹⁵ Imamoglu E, Dalay MC and Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*.New Biotechnology [Internet]. 2009 [citado 2018 abril 22]; 26 (3): 199-204 Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712763>
- ¹⁶ Su Y, Wang J, Shi M, et al. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. Bioresource technology [Internet]. 2014 [citado 2019 marz 10]; 26 170:522-529 Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164345>
- ¹⁷ Chekanov K, Lobakova E, Selyakh I, et al. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). Marine drugs [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 4]; 12(8):4504-20. Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196836>
- ¹⁸ Dong, Huang, Zhang, et al. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*.The Scientific World Journal [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 4]; 7 Available in:
<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/694305/>
- ¹⁹ Wan, Zhang, Hou, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource Technology [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 2] ;167 :276-283

Available

in:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414008748>

- ²⁰ Chen G, Wang B, Han D, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Plant J. [Internet]. 2015 [citado 2019 marz 10] ; 81(1):95-107 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25353310>
- ²¹ Zhengquan G, Yan L, Guanxun W, et al. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA). PLoS One [Internet]. 2015 [citado 2018 sep 3] ; 10(10) Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4979887/>
- ²² Hernández KJ, Pérez ME, Romo CJ, Alcatran LA, Hurtado LA. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. Rev Mex Cienc Farm [Internet]. 2015 [citado 2017 oct 8]; 46 (1): 7-16. Available in: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57946147002.pdf>
- ²³ Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, et al. astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. Mar drugs [Internet]. 2015 [citado 2018 abril 19]; 13(5): 2857–2874 Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446609/>
- ²⁴ Zhang Z, Wang B, Hu Q, et al. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering [Internet]. 2016 [citado 2019 marz 29]; 3(10):2088-99 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563850>
- ²⁵ Pan-utai W, Parakulsuksatid P and Phomkaivon N. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology [Internet]. 2017. [citado 2019 marz 25]; (12) 152-158 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117304619#bib16>
- ²⁶ Castillo CM, Rivera FC, Díaz AG. Evaluation of Cell Growth Conditions for the astaxanthin Production as and of *Haematococcus pluvialis* Microalgae. Evaluación

de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; [Internet] 2017 [citado 2019 ener 19]. Available in:

<http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>

- ²⁷ Sun H, Liu B, Lu X, Cheng KW, Chen F Anonymous Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. [Internet] 2017 [citado 2018 mar 30]; 233:326-331. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285225>
- ²⁸ Bangxiang He, Lulu Hou, Manman Dong, et al. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. *Int. J. Mol. Sci* [Internet] 2018 [citado 2018 mar 30]; 19(1) 175 Available in: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/175>
- ²⁹ Sheng B, Fan F, Huang J, et al. Investigation on models for light distribution of *Haematococcus pluvialis* during astaxanthin accumulation stage with an application case. *Algal Research* [Internet] 2018 [citado 2018 sep 4]; 33: 182-189 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417311761>
- ³⁰ Christian D, Zhang J, Sawdon AJ, et al. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresour Technol* [Internet] 2018 [citado 2018 sep 4]; 256:548-551 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29482971>
- ³¹ Kathiresan s, Chandrashekar A, Ravishankar G and Sarada R, Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of β -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*, *Journal of Biotechnology* [Internet] 2015 [2019 abril 4]; 196–197: 33-41 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615000152>
- ³² Constanza L and Muñoz MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *NOVA* [Internet] 2012 [citado 2018 abril 24]; 10 (18) 135-250 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

- ³³ Solari S, Vilchez J et al. astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética. Chile: Universidad Arturo Prat; 2011 [citado 2018 mar 30]. Available in:
<http://www.unap.cl/admision/carreras/pregrado/2012/images/farmacia/papers/2011-B-1.pdf>
- ³⁴ Mercola, Investigación sobre la astaxantina demuestra que tiene beneficios significativos en todo el cuerpo [Internet] 2017 [2019 abril 3] Disponible en:
<https://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2017/02/20/beneficios-de-la-astanxatina-para-todo-el-cuerpo.aspx>
- ³⁵ Islam M, Gracia F, los antioxidantes para la salud óptima, Rev méd cient [Internet] 2013 [2019 abril 3]; 26(2): 3-9 Disponible en:
https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/371/pdf_54
- ³⁶ Mayor R, Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. [Internet] 2010 [citado 2018 abril 24];5(2):23-29 Disponible en:
<http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>
- ³⁷ López P and Mach N. Efecto del consumo de astaxantina en la salud. Revisión. Rev Esp Nutr Comunitaria [Internet] 2012 [citado 2019 ener 23];18(3):164-177 Disponible en:
http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC%202012-3_art%206.pdf
- ³⁸ Carranco M, Calvo M and Fernandos G, Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Archivos Latinoamericanos de Nutrición [Internet] 2011 [citado 2019 enero 9];61(3):233-41 Disponible en:
<https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
- ³⁹ carotenoides [Internet] 2012 [2019 abril 3]; Disponible en:
<http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/carotenoides.pdf>
- ⁴⁰ Danxiang H , Yantao L and Qiang H, Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications, Algae [Internet] 2013 [2019 abril 4]; 28(2): 131-147 Available in: https://www.e-algae.org/upload/pdf/ALGAE_28_2_01.pdf

- ⁴¹ Guerin M, Huntley ME and Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology [Internet] 2003 [citado 2018 abril 24];21(5):210-6. Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727382>
- ⁴² Tominaga K, Hongo N, Karato M and Yamashita E, Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects actabp [Internet] 2012 [2019 abril 3]; 59 (1) 43–47 Available in: http://www.actabp.pl/pdf/1_2012/43.pdf
- ⁴³ Maquera SL, “EVALUACION DEL EFECTO PIGMENTANTE Y NUTRICIONAL DEL *Haematococcus pluvialis* COMO BIOAGENTE APLICADO EN LA DIETA DE TRUCHAS EN EL CRIADERO C.E.D.E.PEZ PUNO 2014”. [tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica]. AREQUIPA – PERÚ Universidad catolica de Santa Maria 2015 [citado 2018 abril 25] Disponible en:<https://core.ac.uk/download/pdf/54220179.pdf>
- ⁴⁴ Ciapara I, Valenzuela L and Goycoolea FM. astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. Crit Rev Food Sci Nutr. [Internet] 2006 [citado 2018 abril 24];46(2):185-96. Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431409>
- ⁴⁵ García A, Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Universidad de leon. Departamento Biología Molecular [Internet] 2012 [citado 2019 enero 9] Disponible en: https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/2144/tesis_1a2340.PDF?sequence=1
- ⁴⁶ Córdoba NM, Acero NL, Duque LF, Jiménez LJ, Serna JA. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. AGCIENCIA [Internet]. 2015 [citado 2019 marz 29];21:73-82. Disponible en: <http://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/426/729>.
- ⁴⁷ Meléndez A, Vicario I y Francisco J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición [Internet]. 2004 [citado 2019 ene 6];54(2) . Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262738748_Importancia_nutricional_de

[los pigmentos carotenoides](#)

- ⁴⁸ Meyers, S. P. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. [Internet]. 2004 [citado 2019 abril 3]; 473-491. Disponible en:
https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/28meyers.pdf
- ⁴⁹ Ibañez M producción de astaxantina a partir de la microalga *haematococcus pluvialis* y evaluación de posibles aplicaciones, XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral [Internet] 2017 [2019 abril 3]; 26(2): 3-9
Disponible en:
<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/xmlui/bitstream/handle/123456789/8673/10.2.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ⁵⁰ Herrera M, Sánchez D, López J, Nuñez A y Moreno O, Extracción de la astaxantina y su estabilidad, Revista Latinoamericana de Recursos Naturales [Internet] 2011 [2019 abril 3]; 7 (1): 21-27 Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Jose_Alberto_Nunez-Gastelum/publication/271707353_Extraccion_de_la_astaxantina_y_su_estabilidad/links/54d063c10cf298d656667a43/Extraccion-de-la-astaxantina-y-su-estabilidad.pdf
- ⁵¹ Hernández A and Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía [Internet] 2014 [citado 2018 agos 4]; 49 (2): 157-173
Available in:
https://www.researchgate.net/publication/267629066_Microalgas_cultivo_y_beneficios
- ⁵² Odjadjare EC, Mutanda T and Olaniran AO. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. Critical Reviews in Biotechnology [Internet] 2017 [citado 2018 mar 30]; 3737-52 Available
in <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2015.1108956?journalCode=ibty20>
- ⁵³ Miranda A, Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505 Inf. tecnol. [Internet] 2019 [2019 abril 3]; 30 (1): 23-32 Disponible en:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000100023

- ⁵⁴ Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* [Internet] 2000.[citado 2019 marz 29]; 108: 111–117 Available in:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>
- ⁵⁵ Shah M, Liang Y, Cheng JJ, et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in plant science* [Internet] 2016 [citado 2019 ene 12] Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200009>
- ⁵⁶ Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift [Tesis presentada para optar el título de Magíster en Ingeniería Química] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia ;2013[citado 2017 nov 3]. Available in:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
- ⁵⁷ Zhang C, Liu J and Zhang L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chin J of Ocean Limnol.*[Internet] 2017 [citado 2018 abril 24]35 (5) 1205–12111. Available in:<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00343-017-6103-8>
- ⁵⁸ Fernandez D, Barrera N, Fonseca L y Jaimes L, Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas, Fundación Universidad de América Semilleros Formación Investigativa [Internet] 2017 [citado 2019 ene 10]; 3 (1): 35-48. Disponible en :<http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6436>
- ⁵⁹ Benavente J, Montañez C, et al. Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. *Revista científica de la universidad autónoma de coahuila.* [Internet] 2014 [citado 2019 marz 29];7(4). Disponible en
https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores

- ⁶⁰ Bohne F and Linden H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et biophysica acta* [Internet] 2002 [citado 2019 ene 14]; 13;1579(1):26-34. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401216>
- ⁶¹ Khanam I and Deb U. Calculation of the Average Irradiance and the Microalgae Growth for a Year at CUET, Bangladesh. *American Journal of Computational Mathematics* [Internet] 2016 [citado 2018 septiembre 14]; 6(3). Available in: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=70402>
- ⁶² Bravo F, LeMay V, Jandl R, et al. *Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change*. Springer Netherlands [Internet] 2008.[citado 2018 septiembre 14]. Available: <https://www.springer.com/la/book/9781402083426>
- ⁶³ Albarracin I. Microalgas: potenciales productoras de biodisel. centro de energias [Internet] 2007 [citado 2018 septiembre 14]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>
- ⁶⁴ Granada G, Produccion de astaxantina a partir de microalgas *Haematococcus pluviialis*, [Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar titulo de ingenieria en biotecnología]. udlu [Internet] 2015 [citado 2019 ene 25] Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
- ⁶⁵ Mostafa N, Hishamuddin O, Soon G and Suhaimi N. studies on the Genetic Variation of the Green Unicellular Alga *Haematococcus pluviialis* (Chlorophyceae) Obtained from Different Geographical Locations Using ISSR and RAPD Molecular Marker, *Molecules* [Internet] 2011 [2019 abril 3]; 16, 2598-2608 Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/16/3/2599/htm>
- ⁶⁶ Cuantificación clorofila a [Internet] 2015 [2019 abril 3] Disponible en: http://www.cofes.org.ar/descargas/relas/5_jornada/4_CLOROFILA.pdf

- ⁶⁷ Masojidek J, Torzillo G and Koblizek M, Photosynthesis in Microalgae, Richmond A and Hu Q, Manual de Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, [Internet] 2015 [citado 2018 septiembre 20] 2: 21-736 Available in: https://books.google.com.co/books?id=SM6m4GZ_Ok0C&printsec=frontcover&dq=%20microalgas+de+Amos+Richmond&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjVo9PJxMjdAhWM%20uFMKHVRKAIQ6AEIKDAA#v=snippet&q=microalgas%20de%20Amos%20Rich%20mond&f=false
- ⁶⁸ Lodish H, Berk A, Matsudaira P et al, Biología celular y molecular 7ma Edición, Argentina: Editorial Médica Panamericana, [Internet] 2016 [citado 2018 septiembre 20] Available in: <https://books.google.com.co/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA334&dq=clorofila&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiCjo2bwMrdAhUQ2FMKHUprBSsQ6AEIMjAC#v=onepage&q=clorofila&f=false>
- ⁶⁹ Rosas C, “PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN LA COLUMNA DE AGUA DETERMINADOS MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y CROMATOGRÁFICAS (HPLC-RP): VARIABILIDAD ESPACIO-TEMPORAL Y EFECTOS DE RADIACIÓN UV”. [Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas.]. Chile Universidad Austral de Chile [Internet] 2007 [citado 2019 ene 25] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcr789p/doc/fcr789p.pdf>
- ⁷⁰ Camacho J, Lancheros A, Huerfano M, condiciones de cultivo estándar relacionados con la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, @limentech ciencia y tecnología alimentaria [Internet] 2016 [2019 abril 4]; 14 (1) 70 -80 Disponible en: http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/2127/1265
- ⁷¹ Hernández E, Aguirre N Y Palacio J. Relación entre la determinación del pigmento Clorofila a y el Biovolumen geométrico algal en un lago de planicie de inundación

(Ciénaga de Ayapel, Córdoba-Colombia) Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia [Internet] 2011 [2019 abril 4]; 60 159-169 Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n60/n60a16.pdf>

⁷² Butnariu M, Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products, Butnariu, J Ecosys Ecograph [Internet] 2016 [2019 abril 4]; 6 (2): 2-19 Disponible en:
<https://www.omicsonline.org/open-access/methods-of-analysis-extraction-separation-identification-and-quantification-of-carotenoids-from-natural-products-2157-7625-1000193.php?aid=77160>

⁷³ Vargas M y Ríos S. Producción de ácidos grasos y Astaxantina en *H. pluvialis* bajo condiciones de, estrés [Proyecto de grado Bacteriología y laboratorio clínico] Bogotá: Universidad Colegio Mayor and de Cundinamarca; 2015[citado 2017 oct 3]. referencia Producción de ácidos grasos y Astaxantina en *H. pluvialis* bajo condiciones de estrés.

⁷⁴ Bastidas O,Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro, Celeromics [Internet] [citado 2018 abril 30] Disponible en:
<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

⁷⁵ M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. Asian Journal of Plant Biology [Internet] 2014 [citado 2018 abril 7]; 2 (1) 01-06 Available in:
<https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/AJPB/article/view/81/161>

⁷⁶ Díaz J, Gómez L, Orozco M, Quiroga N. Efecto de estrés producido por la deficiencia de nitrógenos sobre el crecimiento y producción de astaxantina y la expresión de genes relacionados con la misma en el cultivo de *H. pluvialis*. [Proyecto de grado Bacteriología y Laboratorio Clínico]. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2016[citado 2017 oct 3].

⁷⁷ Lallana, V.H. y Lallana Ma. del C Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal.[Internet], 2003 [citado 2018 agos 20] Disponible en:

http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/ExtPig_bED.pdf

- ⁷⁸ Niño C.; Rodríguez. F. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluviialis*.(Trabajo de grado para obtener el título de Bacteriología y laboratorio clínico) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia. 2015 [citado 2019 marzo 10] Disponible en: Biblioteca Universidad Colegio Mayor de cundinamarca.
- ⁷⁹ Martínez A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.[Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente]Universidad Politécnica de Valencia [Internet] 2011 [citado 2019 marz 22] Disponible en:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
- ⁸⁰ Beltran J, Guajardo C, Barceló I y López U .Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. Revista de Biología Marina y Oceanografía [Internet] 2017 [citado 2019 enero 23] 52 (3): 417-27 Disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v52n3/art01.pdf>
- ⁸¹ Bustillo A, método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos universidad nacional de palmira [Internet] 2010 [2019 abril 3]; Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/277870402_METODO_PARA_CUANTIFICAR_SUSPENSIONES_DE_ESPORAS_DE_HONGOS_Y_OTROS_ORGANISMOS
- ⁸² Dickerson R, Gray H, Darensbourg M y Darensbourg D. Principios de química, 3^{era} edición, España, Editorial reverté, equilibrio en disolución: ácidos y bases [Internet] 1992 [citado 2019 marz 3] Cap 5 163-208 Disponible en:
<https://books.google.com.co/books?id=vVt6frGy9mgC&pg=PA190&dq=disociacion+del+acetato+de+sodio+en+agua&hl=es->

[419&sa=X&ved=0ahUKEwjzcxuOfgAhV11lkKHxOtDqkQ6AEIKTAA#v=onepage&q=disociacion%20del%20acetato%20de%20sodio%20en%20agua&f=false](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415012134?via%3Dihub)

- ⁸³ Viada E, Gómez L, y Reyna I Estrés oxidativo *ccm* [Internet] 2017.[citado 2019 marz 3]21 (1) ;Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014
- ⁸⁴ Ruijuan M, Skye T, Elvis C, Eladl E and et al ,Blue light enhances astaxanthin biosynthesis metabolism and extraction efficiency in *Haematococcus pluvialis* by inducing haematocyst germination. *Algal Research* [Internet] 2018 [citado 2019 feb 26]35; 215-222 Available in: :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641830328X>
- ⁸⁵ Rio M. Producción de astaxantina por la microalga *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo, Universidad de Sevilla [Internet] 2007 [citado 2019 marz 5] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=138280>
- ⁸⁶ La astaxantina natural vs su homólogo sintético XVII Congreso nacional de acuicultura cartagena [Internet] 2019 [citado 2019 enero 23] Disponible en: <http://www.mispecies.com/nav/actualidad/reportajes/reportaje/La-astaxantina-natural-vs-su-homlogo-sintico/#.XKGDyJKjtS>
- ⁸⁷ Dong K, Durairaj V, Ramasamy P, Jong I et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus* *Bioresource Technology* [Internet] 2016 [citado 2019 marz 5]199; 300-310 Available in:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415012134?via%3Dihub>
- ⁸⁸ EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. *EFSA Journal* [Internet] 2014 [citado 2019 ene 23] 12(6):3724 Available in: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3724.pdf>

- ⁸⁹ Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M and Maseda A, Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluviialis*, Appl Microbiol Biotechnol. [Internet] 2000 [citado 2019 marz 25] ;53(5):530-5. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10855711>
- ⁹⁰ Jeeji N, Beena B and and Shashirekha V. Biology of growth conditions, nutrition and biomass development in *Haematococcus pluviialis*, Haematococcaceae, Chlorophyceae Phycological Society, India [Internet] 2016 [citado 2019 marz 7] 46 (2): 20-28 Available in: <http://www.phykosindia.com/paper4vol46no2.pdf>
- ⁹¹ Hata1 N, Ogonnal J, Hasegawa1 Y, Taroda H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluviialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture Journal of Applied Phycology [Internet] 2001 [citado 2019 marz 7] 13: 395–402 Available in: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011921329568>
- ⁹² Hanan N, Kaid N, Shukor H, Rahman N at eal. Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluviialis* Growth. International Journal [Internet] 2013 [citado 2019 marz 7] 3 (2) 70-73 Available in: <http://insightsociety.org/ojaseit/index.php/ijaseit/article/viewFile/307/277>
- ⁹³ Rammunia M, Ariyadasaa T, Nimarshana P, and Attalage R. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluviialis* and β -carotene from *D. salina* Food Chemistry [Internet] 2019 [citado 2019 marz 7] 277; 128-134 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618318417?via%3Dihub>
- ⁹⁴ Moronta, R., Mora, R., y Morales, E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista de la Facultad de Economía, [Internet] 2006 [citado 2019 marz 25] 23(1), 28-43 Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182006000100003&script=sci_abstract
- ⁹⁵ Sun H, Kong Q, Geng Z, Duan L at eal Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluviialis* Bioresource Technology [Internet]

2015 [citado 2019 marz 9]186; 67-73 Available

in:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415002874?via%3Dihub>

- ⁹⁶ Ruijuan Ma, Skye R., Elvis T, Faisal A at eal Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions Bioresour Technol. [Internet] 2018 [citado 2019 marz 9]250; 591-602 Available
in:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417320989?via%3Dihub>

ANEXO 1
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. MES-VOLVOX 37

COMPONENTE	PARA 1 LITRO
MES buffer	1.95 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	117.8 mg
Na ₂ glicerofosfato·5H ₂ O	60 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 mg
KCl	50 mg
NH ₄ Cl	26.7 mg
Biotina (vitamina H)	0.0025 mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	0.0015 mg
P-IV metal solution	6 mL

P-IV Metal solution

COMPONENTE	PARA 1 LITRO
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	750 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg

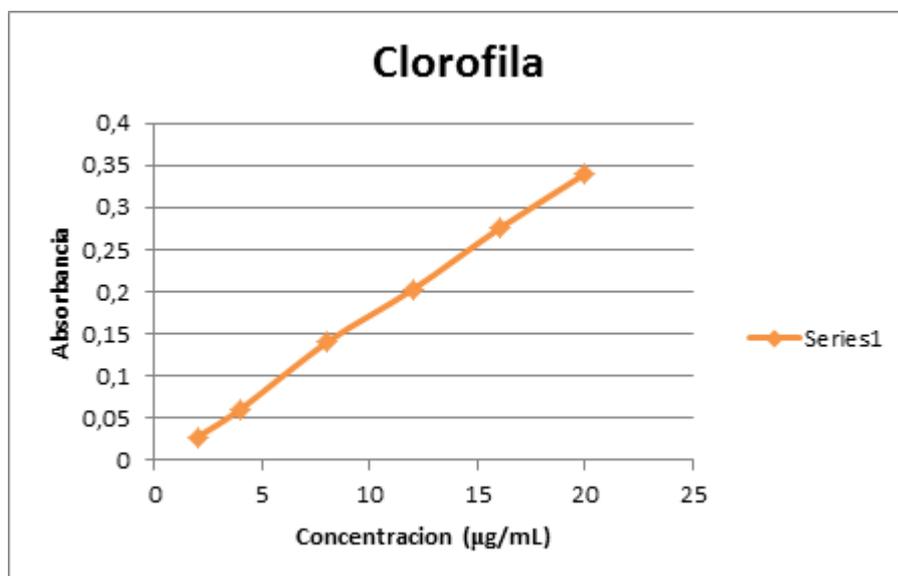
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 mg

Preparación

- Se añadió 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer de 3 litros
- Los componentes del medio fueron pesados y añadidos
- Se completó el volumen a 2 litros
- El medio fue ajustado a pH 6.5 con HCl 0.1N
- Se esterilizó el medio en autoclave a 121 °C
- Posteriormente al autoclavado, se agregaron las proteínas asépticamente.

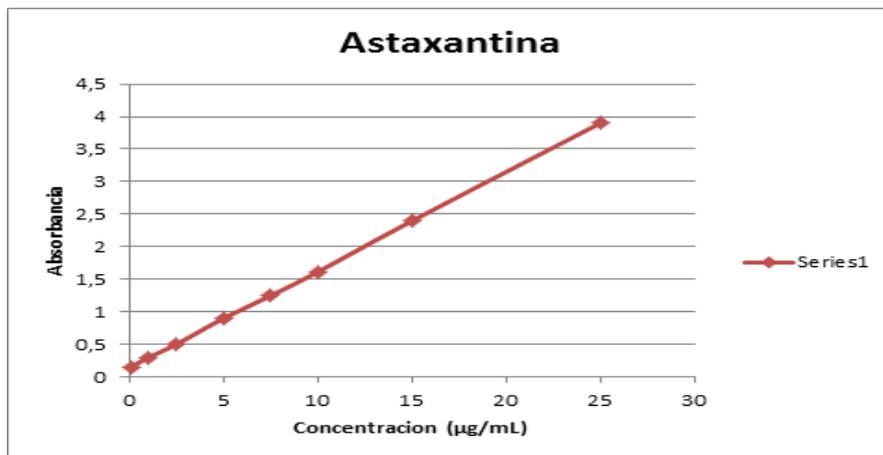
ANEXO 2
CURVAS DE CALIBRACIÓN DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA

CLOROFILA			
X= Concentración (µg/mL)	Y= absorbancia	Datos	
2	0,028	Pendiente	0,01741233
4	0,061	Intersección	-0,0054274
8	0,14	Coeficiente de correlación	0,99958371
12	0,203		
16	0,275		
20	0,34		



Fuente: Elaborado por autoras.

ASTAXANTINA			
X= Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Y= absorbancia	Datos estadísticos	
0,1	0,153	Pendiente	0,15045198
1	0,293	Intersección	0,1313905
2,5	0,5	Coeficiente de correlación	0,99994077
5	0,898		
7,5	1,245		
10	1,612		
15	2,395		
25	3,9		



Fuente: Elaborada por autoras.

ANEXO 3
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

TABLE ANALYZED	CINÉTICA DE CRECIMIENTO (15 días)				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2,626	0,0040	**	Yes	
Tiempo (días)	61,02	<0,0001	****	Yes	
Medio de cultivo	0,13	0,3761	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	482604486	4	120651122	F (4, 186) = 3,976	P=0,0040
Tiempo (días)	11213715082	4	2803428770	F (4, 186) = 92,39	P<0,0001
Medio de cultivo	23883132	1	23883132	F (1, 186) = 0,7871	P=0,3761
Residual	5643575149	186	30341802		

Fuente: Elaboradas por autoras.

TABLE ANALYZED	BIOMASA ACUMULADA (30 días)				
Three-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Concentración de acetato de sodio	9,627	0,0600	ns	No	
Luz	6,81	0,0220	*	Yes	
Medio de Cultivo	41,76	<0,0001	****	Yes	
Concentración de acetato de sodio x Luz	1,775	0,6500	ns	No	
Concentración de acetato de sodio x Medio de Cultivo	7,876	0,0984	ns	No	
Luz x Medio de Cultivo	1,696	0,2238	ns	No	
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio de Cultivo	13,51	0,0218	*	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Concentración de acetato de sodio	8002230000	3	2667410000	F (3, 3) = 3,03	P=0,0600
Luz	5660480000	1	5660480000	F (1, 3) = 6,43	P=0,0220
Medio de Cultivo	34716125000	1	34716125000	F (1, 3) = 39,43	P<0,0001
Concentración de acetato de sodio x Luz	1475110000	3	491703333	F (3, 3) = 0,5585	P=0,6500
Concentración de acetato de sodio x Medio de Cultivo	6547305000	3	2182435000	F (3, 3) = 2,479	P=0,0984
Luz x Medio de Cultivo	1409805000	1	1409805000	F (1, 3) = 1,601	P=0,2238
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio de Cultivo	11227885000	3	3742628333	F (3, 3) = 4,251	P=0,0218
Residual	14086260000	16	880391250		

Fuente: Elaborada por autoras.

TABLE ANALYZED		ACUMULACIÓN FINAL DE ASTAXANTINA			
Three-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Concentración de acetato de sodio	41,27	<0,0001	****	Yes	
Luz	11,41	<0,0001	****	Yes	
Medio	16,5	<0,0001	****	Yes	
Concentración de acetato de sodio x Luz	9,895	0,0005	***	Yes	
Concentración de acetato de sodio x Medio	11,93	0,0002	***	Yes	
Luz x Medio	1,545	0,0410	*	Yes	
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio	2,447	0,0875	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Concentración de acetato de sodio	22,83	3	7,61	F (3, 3) = 43,98	P<0,0001
Luz	6,31	1	6,31	F (1, 3) = 36,46	P<0,0001
Medio	9,127	1	9,127	F (1, 3) = 52,74	P<0,0001
Concentración de acetato de sodio x Luz	5,474	3	1,825	F (3, 3) = 10,54	P=0,0005
Concentración de acetato de sodio x Medio	6,599	3	2,2	F (3, 3) = 12,71	P=0,0002
Luz x Medio	0,8548	1	0,8548	F (1, 3) = 4,94	P=0,0410
Concentración de acetato de sodio x Luz x Medio	1,354	3	0,4513	F (3, 3) = 2,608	P=0,0875
Residual	2,769	16	0,173		

Fuente: Elaborada por autoras.

ANEXO 4

DATOS DE PH TOMADOS

pH- BBM

TOMA 1		TOMA 2		TOMA 3		TOMA 4		TOMA 5	
Biorreactor	pH								
3	6,56	2	7,18	5	7,90	1	8,22	4	8,55
6	6,45	8	7,41	7	7,00	3	8,45	5	8,61
11	6,48	5	7,45	9	7,40	7	9,26	11	10,41
14	6,53	11	7,55	12	7,80	10	9,3	16	10,05
17	6,50	19	7,62	19	7,70	12	8,34	18	9
21	6,40	12	7,32	22	7,60	20	8,67	23	9,3

pH-BBM	
Varianza	1,22
Des. Estándar	1,10
Coefficiente de variación	15%

Fuente: Elaborada por autoras.

pH-RM

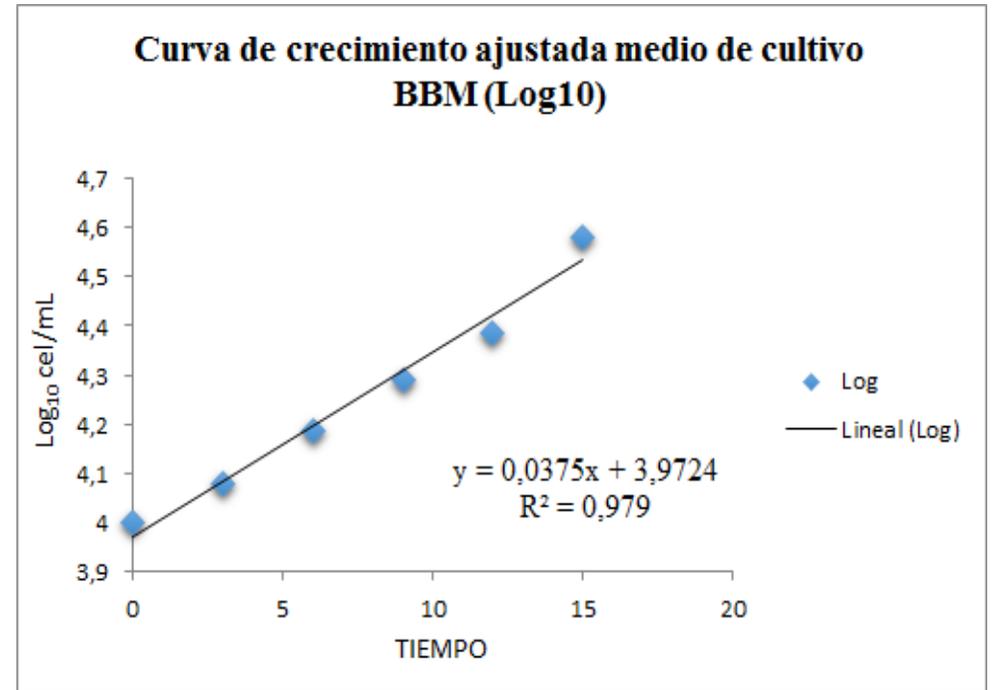
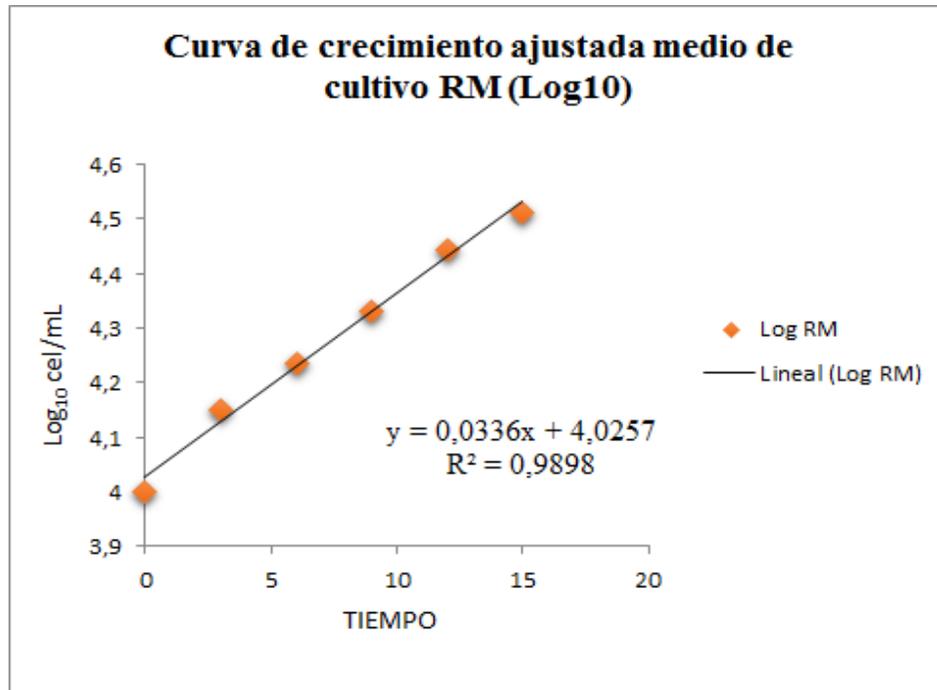
TOMA 1		TOMA 2		TOMA 3		TOMA 4		TOMA 5	
Biorreactor	pH								
2	6,53	6	9,35	1	7,70	4	7,32	11	7,85
8	6,60	3	8,60	8	7,30	7	8,78	6	9,21
14	7,02	15	9,02	13	7,00	9	8,99	11	9,81
12	6,95	18	9,16	10	7,60	11	8,3	15	8,72

pH-RM	
Varianza	1,04
Des. Estándar	1,02
Coefficiente de variación	13%

Fuente: Elaborada por autoras.

ANEXO 5

CURVAS DE CRECIMIENTO AJUSTADAS



Fuente: Elaborada por autoras.

ANEXO 6
CONCENTRACIONES DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA
MEDIO BBM

		BBM											
		Muestreo 1 (Julio 2 de 2018)				Muestreo 2 (Julio 5 de 2018)				Muestreo 3 (Julio 8 de 2018)			
		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina	
Biorreactor	Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)
1	0,372 mg/mL luz blanca	11,28	1,35E-04	0,75	8,94E-06	9,50	9,05E-05	0,47	4,47E-06	10,65	8,52E-05	0,85	6,84E-06
2	Control luz blanca	5,31	5,31E-05	0,02	1,73E-07	6,74	8,99E-05	0,03	4,09E-07	6,57	1,12E-04	0,04	6,35E-07
3	Control luz blanca	2,26	3,48E-05	-0,57	-8,83E-06	3,99	5,41E-05	-0,33	-4,54E-06	3,18	4,17E-05	-0,37	-4,83E-06
4	Control luz blanca	4,16	6,40E-05	-0,33	-5,05E-06	6,00	1,17E-04	0,07	1,38E-06	4,73	6,53E-05	0,06	8,81E-07
5	0,372 mg/mL luz blanca	6,23	7,02E-05	0,14	1,54E-06	7,66	6,01E-05	0,37	2,90E-06	16,16	1,03E-04	1,67	1,06E-05
6	0,372 mg/mL luz blanca	7,78	9,88E-05	0,68	8,66E-06	8,52	8,52E-05	0,66	6,62E-06	5,60	3,22E-05	0,23	1,32E-06
7	0,310 mg/mL luz blanca	7,72	6,37E-05	0,45	3,71E-06	6,57	7,30E-05	0,12	1,30E-06	10,42	8,17E-05	0,76	5,92E-06
8	0,310 mg/mL luz blanca	4,96	5,52E-05	-0,13	-1,43E-06	8,47	7,13E-05	0,37	3,11E-06	9,62	7,85E-05	0,80	6,49E-06
9	0,310 mg/mL luz blanca	3,53	4,28E-05	-0,34	-4,14E-06	6,40	1,83E-04	0,18	5,05E-06	6,74	4,86E-05	0,32	2,33E-06
10	0,248 mg/mL luz blanca	5,94	6,02E-05	-0,03	-2,96E-07	3,76	3,90E-05	-0,21	-2,17E-06	3,47	4,21E-05	-0,21	-2,53E-06
11	0,248 mg/mL luz blanca	2,55	3,35E-05	-0,48	-6,31E-06	3,87	5,43E-05	-0,08	-1,06E-06	4,56	6,29E-05	-0,06	-7,69E-07
12	0,248 mg/mL luz blanca	6,74	5,68E-05	0,32	2,72E-06	10,25	1,67E-04	0,64	1,04E-05	12,66	1,81E-04	0,88	1,26E-05
13	Control luz azul	3,93	4,69E-05	-0,08	-9,04E-07	6,23	1,99E-04	-0,08	-2,64E-06	4,91	9,13E-05	0,18	3,29E-06
14	Control luz azul	4,16	4,27E-05	-0,31	-3,23E-06	6,51	2,27E-04	0,42	1,47E-05	7,32	9,15E-05	0,53	6,61E-06
15	Control luz azul	3,70	2,23E-05	-0,30	-1,81E-06	4,45	1,27E-04	0,04	1,07E-06	4,39	4,75E-05	-0,20	-2,11E-06
16	0,372 mg/mL luz azul	5,25	4,62E-05	0,01	9,40E-08	9,39	1,42E-04	0,76	1,14E-05	12,37	1,48E-04	1,17	1,40E-05
17	0,372 mg/mL luz azul	6,28	4,98E-05	0,00	-2,06E-08	9,85	8,95E-05	0,56	5,05E-06	8,87	6,69E-05	0,60	4,50E-06
18	0,372 mg/mL luz azul	4,79	3,91E-05	-0,08	-6,72E-07	6,63	6,31E-05	0,18	1,75E-06	13,52	1,01E-04	1,00	7,48E-06
19	0,310 mg/mL luz azul	5,65	4,27E-05	0,16	1,23E-06	5,71	1,20E-04	-0,01	-1,95E-07	7,20	5,59E-05	0,23	1,79E-06
20	0,310 mg/mL luz azul	6,92	4,65E-05	0,27	1,81E-06	7,43	7,34E-05	0,38	3,72E-06	5,88	5,23E-05	0,12	1,10E-06
21	0,310 mg/mL luz azul	4,39	2,62E-05	0,09	5,40E-07	7,38	8,43E-05	0,68	7,72E-06	6,97	6,49E-05	0,58	5,35E-06
22	0,248 mg/mL luz azul	1,98	1,46E-05	-0,60	-4,45E-06	6,40	4,83E-05	0,16	1,23E-06	10,82	7,59E-05	0,76	5,35E-06
23	0,248 mg/mL luz azul	2,78	5,06E-05	-0,49	-8,99E-06	5,25	3,00E-04	-0,09	-5,09E-06	4,62	3,59E-05	-0,06	-4,85E-07
24	0,248 mg/mL luz azul	6,51	8,99E-05	0,11	1,52E-06	6,34	3,38E-04	0,14	7,31E-06	7,15	6,21E-05	-0,87	-7,59E-06

Fuente: autoras del proyecto, 2019

MEDIO BBM

		Muestreo 4 (Julio 11 de 2018)				Muestreo 5 (Julio 14 de 2018)			
		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina	
Biorreactor	Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)
1	0,372 mg/mL luz blanca	6,69	6,52E-05	0,36	3,48E-06	8,24	7,32E-05	0,74	6,53E-06
2	Control luz blanca	9,79	1,67E-04	0,34	5,84E-06	7,72	6,64E-05	-0,02	-1,94E-07
3	Control luz blanca	8,41	8,85E-05	0,18	1,86E-06	7,66	6,26E-05	0,64	5,24E-06
4	Control luz blanca	1,35	1,68E-05	-0,44	-5,52E-06	3,47	2,31E-05	0,02	1,16E-07
5	0,372 mg/mL luz blanca	4,50	3,40E-05	-0,12	-9,23E-07	9,10	3,73E-05	0,83	3,40E-06
6	0,372 mg/mL luz blanca	11,45	7,76E-05	0,69	4,67E-06	2,67	1,82E-05	-0,28	-1,93E-06
7	0,310 mg/mL luz blanca	8,01	8,90E-05	0,62	6,91E-06	10,59	6,18E-05	0,56	3,28E-06
8	0,310 mg/mL luz blanca	14,61	1,24E-04	1,41	1,20E-05	7,61	5,03E-05	0,50	3,28E-06
9	0,310 mg/mL luz blanca	22,82	1,98E-04	2,22	1,93E-05	6,63	4,28E-05	0,38	2,43E-06
10	0,248 mg/mL luz blanca	2,03	3,70E-05	4,31	7,84E-05	6,05	4,32E-05	0,02	1,71E-07
11	0,248 mg/mL luz blanca	10,25	1,19E-04	0,92	1,07E-05	2,38	1,60E-05	-0,31	-2,12E-06
12	0,248 mg/mL luz blanca	10,88	1,58E-04	0,89	1,30E-05	8,41	5,34E-05	0,77	4,88E-06
13	Control luz azul	7,89	1,80E-04	0,16	3,74E-06	2,26	1,19E-05	-0,23	-1,20E-06
14	Control luz azul	5,77	9,05E-05	0,20	3,09E-06	6,17	3,80E-05	0,37	2,27E-06
15	Control luz azul	5,25	8,24E-05	0,26	4,03E-06	5,42	3,98E-05	0,10	7,61E-07
16	0,372 mg/mL luz azul	11,97	1,33E-04	1,09	1,22E-05	11,45	4,51E-05	0,76	3,00E-06
17	0,372 mg/mL luz azul	11,80	8,58E-05	1,02	7,43E-06	20,13	8,21E-05	1,91	7,80E-06
18	0,372 mg/mL luz azul	14,67	8,96E-05	1,35	8,26E-06	18,23	5,88E-05	1,95	6,30E-06
19	0,310 mg/mL luz azul	11,74	8,95E-05	0,64	4,84E-06	12,08	6,36E-05	1,26	6,63E-06
20	0,310 mg/mL luz azul	10,71	9,85E-05	0,82	7,55E-06	15,70	6,54E-05	1,39	5,78E-06
21	0,310 mg/mL luz azul	7,03	5,31E-05	0,09	6,83E-07	10,82	7,15E-05	0,67	4,42E-06
22	0,248 mg/mL luz azul	13,12	8,53E-05	1,13	7,38E-06	11,45	6,41E-05	0,78	4,37E-06
23	0,248 mg/mL luz azul	5,42	7,89E-05	0,27	3,93E-06	9,21	5,85E-05	0,44	2,77E-06
24	0,248 mg/mL luz azul	5,94	8,64E-05	0,24	3,54E-06	9,67	6,05E-05	0,81	5,05E-06

Fuente: Elaborada por autoras.

MEDIO RM

		RM											
		Muestreo 1 (Julio 2 de 2018)				Muestreo 2 (Julio 5 de 2018)				Muestreo 3 (Julio 8 de 2018)			
		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina	
Biorreactor	Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)
1	Control luz azul	4,45	5,08E-05	-0,24	-2,76E-06	7,32	1,43E-04	0,00	-5,06E-08	7,20	1,11E-04	0,39	5,99E-06
2	Control luz azul	7,32	1,15E-04	0,21	3,30E-06	4,91	1,15E-04	-0,28	-6,47E-06	7,38	1,40E-04	0,17	3,24E-06
3	0,372 mg/mL luz azul	11,05	1,43E-04	0,66	8,54E-06	11,97	8,47E-05	0,78	5,53E-06	7,38	7,20E-05	0,25	2,44E-06
4	0,372 mg/mL luz azul	11,34	1,28E-04	0,62	7,01E-06	11,45	1,15E-04	0,59	5,89E-06	8,41	8,74E-05	0,40	4,19E-06
5	0,310 mg/mL luz azul	20,87	7,26E-05	2,13	7,41E-06	14,38	9,92E-05	0,97	6,67E-06	12,43	7,31E-05	0,89	5,22E-06
6	0,310 mg/mL luz azul	18,57	8,95E-05	1,57	7,55E-06	24,43	1,35E-04	2,85	1,57E-05	9,21	5,26E-05	0,62	3,56E-06
7	0,248 mg/mL luz azul	13,98	1,05E-04	1,17	8,78E-06	6,34	4,03E-05	0,10	6,59E-07	5,54	5,91E-05	0,10	1,04E-06
8	0,248 mg/mL luz azul	15,07	9,96E-05	1,11	7,32E-06	11,51	1,11E-04	0,75	7,21E-06	15,01	1,31E-04	1,26	1,10E-05
9	Control luz blanca	5,88	4,32E-05	-0,11	-8,00E-07	7,61	9,22E-05	0,33	4,00E-06	3,41	6,50E-05	-0,31	-6,00E-06
10	Control luz blanca	5,14	4,37E-05	-0,12	-1,04E-06	6,00	1,85E-04	-0,71	-2,20E-05	4,10	1,93E-04	-0,30	-1,42E-05
11	0,372 mg/mL luz blanca	13,92	9,94E-05	1,31	9,33E-06	7,49	6,89E-05	0,32	2,91E-06	7,89	7,89E-05	0,80	7,95E-06
12	0,372 mg/mL luz blanca	19,55	9,96E-05	1,94	9,88E-06	8,58	1,60E-04	0,74	1,37E-05	8,18	2,18E-04	1,01	2,69E-05
13	0,310 mg/mL luz blanca	8,41	5,51E-05	0,34	2,25E-06	13,12	7,00E-05	1,21	6,44E-06	5,60	9,14E-05	0,00	6,61E-08
14	0,310 mg/mL luz blanca	18,34	1,04E-04	1,87	1,06E-05	11,45	9,54E-05	1,26	1,05E-05	11,11	1,78E-04	1,19	1,91E-05
15	0,248 mg/mL luz blanca	7,89	5,69E-05	0,24	1,75E-06	10,02	9,00E-05	-0,87	-7,85E-06	5,88	5,12E-05	0,13	1,13E-06
16	0,248 mg/mL luz blanca	14,96	7,25E-05	1,29	6,24E-06	8,87	2,03E-04	0,70	1,59E-05	5,83	9,32E-05	0,18	2,83E-06

Fuente: Elaborada por autoras.

MEDIO RM

		Muestreo 4 (Julio 11 de 2018)				Muestreo 5 (Julio 14 de 2018)			
		Clorofila		Astaxantina		Clorofila		Astaxantina	
Biorreactor	Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)	Concentración (µg/mL)	Concentración (µg/cel)
1	Control luz azul	9,33	7,11E-05	0,31	2,36E-06	7,26	1,29E-04	0,66	1,18E-05
2	Control luz azul	8,52	8,97E-05	0,36	3,75E-06	7,49	9,99E-05	0,16	2,09E-06
3	0,372 mg/mL luz azul	8,75	8,44E-05	0,94	9,07E-06	15,19	2,53E-04	4,08	6,81E-05
4	0,372 mg/mL luz azul	3,70	3,84E-05	-0,12	-1,27E-06	32,13	4,43E-04	6,04	8,33E-05
5	0,310 mg/mL luz azul	15,42	1,64E-04	1,43	1,52E-05	26,67	1,36E-04	3,29	1,68E-05
6	0,310 mg/mL luz azul	14,84	1,05E-04	1,33	9,44E-06	32,24	2,80E-04	3,68	3,20E-05
7	0,248 mg/mL luz azul	8,12	5,04E-05	0,36	2,21E-06	7,15	5,39E-05	0,11	8,33E-07
8	0,248 mg/mL luz azul	8,52	7,75E-05	0,91	8,25E-06	11,05	9,51E-05	0,97	8,38E-06
9	Control luz blanca	3,18	3,22E-05	-0,30	-2,99E-06	8,18	1,11E-04	0,29	3,93E-06
10	Control luz blanca	2,78	3,09E-05	-0,49	-5,42E-06	8,29	1,47E-04	0,29	5,15E-06
11	0,372 mg/mL luz blanca	5,48	3,99E-05	0,23	1,67E-06	16,51	2,87E-04	2,08	3,61E-05
12	0,372 mg/mL luz blanca	9,21	9,83E-05	1,15	1,23E-05	14,73	1,06E-04	2,06	1,48E-05
13	0,310 mg/mL luz blanca	1,69	1,29E-05	-0,52	-3,97E-06	16,05	1,15E-04	2,00	1,43E-05
14	0,310 mg/mL luz blanca	8,58	7,63E-05	0,49	4,35E-06	10,36	1,51E-04	1,55	2,25E-05
15	0,248 mg/mL luz blanca	3,59	3,41E-05	-0,15	-1,42E-06	9,27	7,57E-05	0,79	6,44E-06
16	0,248 mg/mL luz blanca	7,09	7,99E-05	0,66	7,39E-06	8,47	1,44E-04	0,95	1,62E-05

Fuente: Elaborada por autoras.

ANEXO 7
PRESUPUESTO

PRESUPUESTO GLOBAL	FUENTES		VALOR		TOTAL
	UCMC	Unisabana	UCMC	Unisabana	
Personal	Si	Si	\$60000000	\$60000000	\$120000000
Equipos usados	Si	Si	-	-	-
Servicio técnico	-	Si	-	\$1000000	\$1000000
Materiales	Si		\$1360000	-	\$1360000
Software	-	-	-	-	-
Publicaciones	-	-	-	-	-
Reactivos	Si	-	\$2812447	-	\$2812447
Transporte	-	-	-	-	\$700000
TOTAL	-	-	\$64172447	\$61000000	\$125872447

Reactivos

REACTIVO	VALOR
MES Volvox	\$255.800
Medio BBM	\$194.247
Medio RM	\$ 200.000
Acetato de sodio	\$7.000
Metanol 90%	\$20.400

ANEXO 8

REGISTRO FOTOGRÁFICO

PREINÓCULO E INÓCULO

Inicialmente se realizó un pre inóculo en condiciones normales durante 15 días con el fin de obtener una buena cantidad de células, posteriormente se realizó el inóculo en medio MES VOLVOX, el cual se cultivó durante 15 días en condiciones de fotoperiodo de 20 horas Luz y 4 horas de oscuridad (20:4 LO), CO₂ 5%, irradianza de 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 20°C \pm 2°C y agitación por burbujeo continuo, logrando así una concentración celular de 4x10⁵ células/ml.

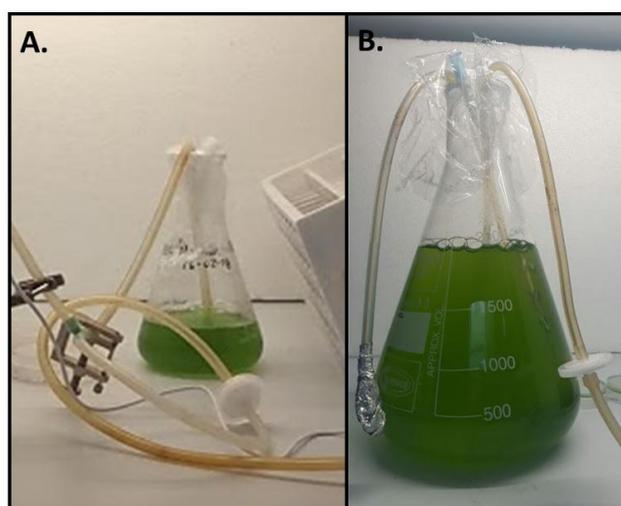
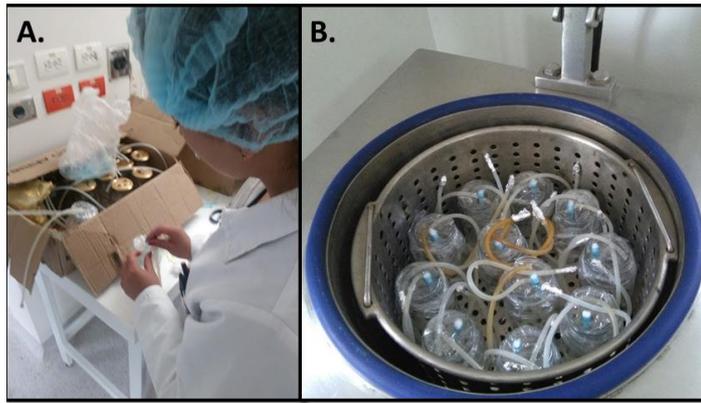


Foto del inóculo de *H. pluvialis*: **A.** Preinóculo y **B.** Inóculo

Fuente: Foto tomada por autoras.

PREPARACIÓN DE BIORREACTORES

Para la preparación de los biorreactores se utilizaron frascos de vidrio sellados con vinipel industrial, al los cuales se les introdujo un conducto para intercambio gaseoso, una manguera para la entrada de CO₂ y una manguera para la toma de muestra. Posteriormente fueron esterilizados en autoclave.

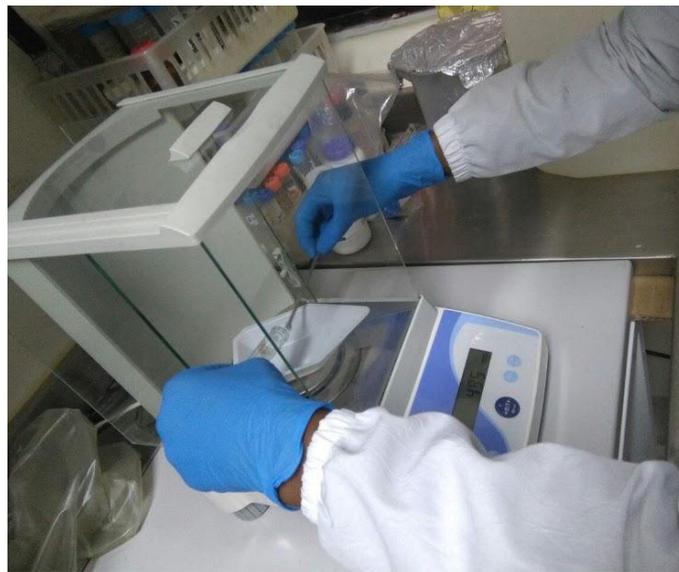


Preparación (A) y esterilización (B) de biorreactores para el cultivo de *H. pluvialis*.

Fuente: Foto tomada por autoras.

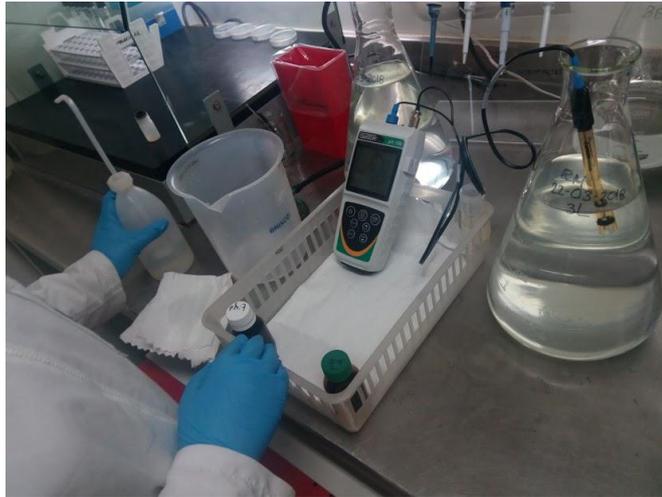
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo MES VOLVOX, RM y BBM fueron preparados con sales minerales y agua destilada según la formulación de cada uno y posteriormente se realizó el debido ajuste de pH según lo indicado para cada uno.



Preparación de medios de cultivo

Fuente: Foto tomada por autoras.



Ajuste de pH

Fuente: Foto tomada por autoras.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Los biorreactores que contenían medios de cultivo BBM y RM fueron inoculados con 1×10^4 cel/mL a partir del inóculo preparado previamente.



Inoculación de biorreactores

Fuente: Foto tomada por autoras.

Posteriormente se incubaron durante 15 días con un fotoperiodo de 20 horas Luz y 4 horas de oscuridad (20:4 LO), CO_2 5%, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y agitación por burbujeo continuo.



Incubación de biorreactores durante la fase de crecimiento

Fuente: Foto tomada por autoras.

TOMA DE MUESTRA

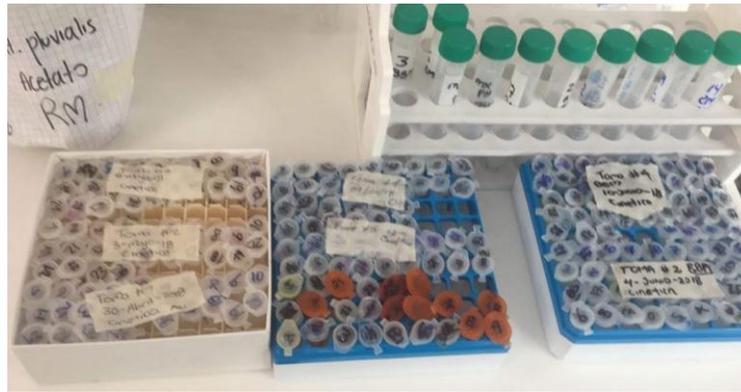
Durante la fase de cinética de crecimiento se tomó 1 ml de cada biorreactor cada 3 días, este fue conservado en formol-salina en relación 1:1 hasta su recuento celular. Durante los 15 días de etapa de inducción de estrés con acetato de sodio, alta irradianza y luz blanca y azul.

Durante la fase de inducción de estrés se tomaron muestras de 10 mL para para la cuantificación de astaxantina y clorofila, y 1 mL para recuento celular y evaluación de la morfología celular.



Toma de muestra

Fuente: Foto tomada por autoras.



Almacenamiento de muestras

Fuente: Foto tomada por autoras.

INDUCCIÓN DE ESTRÉS

Durante la etapa de inducción de estrés, se incidió luz blanca y azul en los biorreactores, se realizó un aumento de la irradianza y se añadieron concentraciones de acetato de sodio.



Biorreactores durante inducción de estrés

Fuente: Foto tomada por autoras.

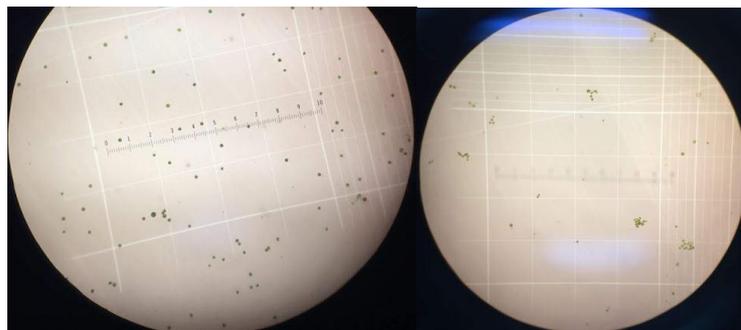


Aspecto macroscópico de los biorreactores

Fuente: Foto tomada por autoras.

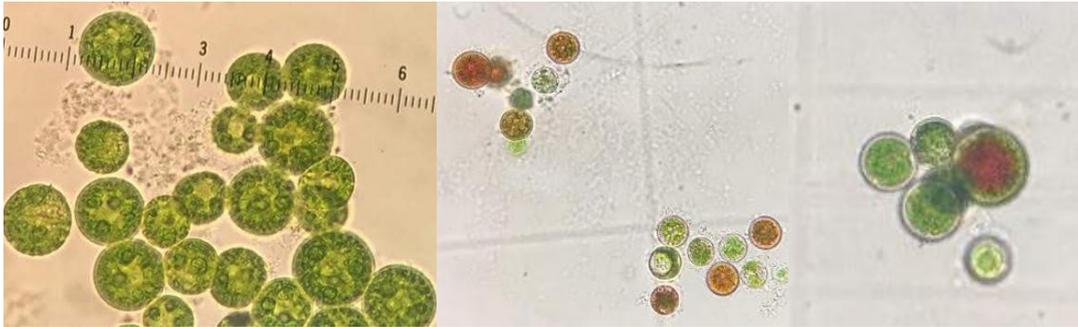
RECUESTO CELULAR Y OBSERVACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO

El recuento celular se hizo en cámara de neubauer y se observaron los diferentes estadios morfológicos de *H. pluvialis*.



Recuento de *H. pluvialis* en cámara de neubauer

Fuente: Foto tomada por autoras.



Fases morfológicas de *H. pluvialis*.

Fuente: Foto tomada por autoras.

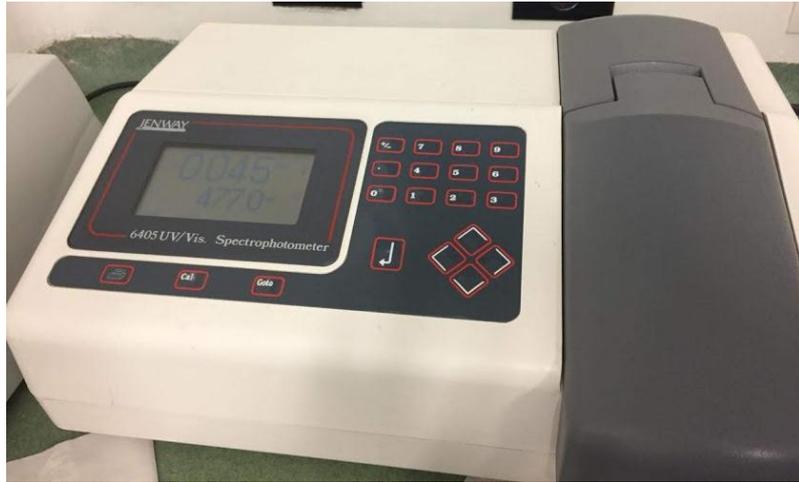
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA Y ASTAXANTINA

La extracción se realizó por el método de metanol al 90% y la cuantificación se realizó espectrofotométricamente en el equipo Jenway 6405 UV/Vis.



Extracción de clorofila y astaxantina

Fuente: Foto tomada por autoras.



Jenway 6405 UV/Vis

Fuente: Foto tomada por autoras.