



***Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga  
Haematococcus pluvialis bajo estrés inducido por deficiencia de  
nitrógeno en el biorreactor BIOSTAT Aplus de 5 litros***

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de ciencias de la salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado  
2019  
Bogotá D.C**



***Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga  
Haematococcus pluvialis bajo estrés inducido por deficiencia de  
nitrógeno en el biorreactor BIOSTAT Aplus de 5 litros***

**Erika Tatiana Pérez Zambrano  
Yazmin Ayala Agudelo**

**Asesora  
Ana Graciela Lancheros**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de ciencias de la salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado  
2019  
Bogotá D.C**

## DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.  
A mi familia por ser el pilar de mi vida y siempre apoyarme en cada objetivo que me planteo, por no dejarme desfallecer a pesar de las dificultades y siempre tener una palabra de aliento.

**Erika Tatiana Pérez Zambrano**

Dedico esta tesis en primer lugar a Dios quien me  
Ha regalado las fuerzas para luchar por mis sueños  
Día a día, en segundo lugar a mis padres y hermanos  
Principalmente mi madre hermosa quien con lucha y  
Sacrificio Siempre estuvo conmigo en este camino  
Apoyándome En todo momento, a mis amigos  
Que de una u otra forma Hicieron parte  
De esto tan importante para mi vida.

**Yazmin Ayala Agudelo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Realizar una tesis de grado no es fácil, pero con la ayuda de Dios quien nos dio la fortaleza y puso personas muy importantes en nuestro camino quienes nos ayudaron a hacer este sueño realidad fue posible culminarlo.

Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca por permitirnos hacer parte de ella y formarnos como profesionales íntegros, por permitirnos desarrollar nuestra tesis en sus instalaciones y brindarnos su acompañamiento.

Agradecemos a nuestra asesora Ana Graciela Lancheros, porque siempre estuvo comprometida con nosotras guiándonos, apoyándonos y orientándonos día a día en el desarrollo de nuestra tesis. Igualmente al grupo de Bioprocesos y Control dirigido por la profesora Judit Camacho.

Agradecemos a nuestras familias en especial nuestros padres quienes siempre quieren lo mejor para nosotras y por eso pese a las adversidades estuvieron con una voz de aliento sin dejarnos desfallecer, motivándonos para culminar esta etapa tan importante en nuestras vidas.

## TABLA DE CONTENIDO

1. TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	11
2. RESUMEN	12
3. INTRODUCCIÓN	14
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo General	16
4.2 Objetivos Específicos	16
5. ANTECEDENTES	17
6. MARCO TEÓRICO	33
6.1 Clorofila	33
6.1.1 Estructura química de la clorofila	33
6.1.2 Producción de clorofila	34
6.1.3 Fuentes de clorofila	35
6.1.4 Usos, aplicaciones y propiedades de la clorofila	35
6.1.5 Métodos de extracción de clorofila	36
6.2 Astaxantina	36
6.2.1 Estructura Química de la astaxantina	38
6.2.2 Producción de astaxantina	39
6.2.3 Síntesis de la astaxantina	40
6.2.4 Fuentes de astaxantina	42
6.2.5 Usos, aplicaciones y propiedades de la astaxantina	43
6.2.6 Métodos de extracción de astaxantina	44
6.3 Generalidades de las Microalgas	46
6.3.1 Descripción de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	47
6.3.2 Clasificación de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	49
6.3.3 Ciclo de vida de la Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	50
6.3.4 Vía metabólica de la Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	52
6.3.5 Requerimientos nutricionales y medios de cultivo de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	54
6.3.6 Factores de estrés para la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	56

6.3.7 Medio de cultivo RUDIC (RM)	57
6.4 Fotobiorreactor o fermentador	58
6.4.1 Tipos de biorreactores	58
6.4.2 Modo de operación de un biorreactor	61
6.4.3 Biorreactor BIOSTAT Aplus	62
6.4.4 Características de los métodos del Biorreactor	64
7. METODOLOGÍA	67
7.1 Tipo de estudio	67
7.2 Universo	67
7.3 Población	68
7.4 Muestra	68
7.5 Hipótesis	68
7.6 Unidad de análisis	69
7.7 Variables	69
7.7.1 Variables independientes	69
7.7.2 Variables dependientes	70
7.8.1 Revisión bibliográfica	70
7.8.2 Microorganismo	71
7.8.3 Preparación del inóculo	72
7.8.4 Curva de pH	74
7.8.5 Curva de crecimiento	75
7.8.6 Extracción de clorofila y astaxantina	75
7.8.7 Determinación de clorofila y astaxantina	75
7.8.8 Determinación de nitrógeno en el medio de cultivo	76
7.9 Análisis y resultados	76
8. RESULTADOS	77
8.1 Revisión bibliográfica condiciones de cultivo para la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	77
8.2 Crecimiento celular	79
8.3 Producción de clorofila y astaxantina	83
8.4 Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo	86
8.5 Medición de pH en el medio de cultivo RM	88

9. DISCUSIÓN	89
10. CONCLUSIONES	95
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla No.1.</b> Características de la astaxantina..	27
<b>Tabla No.2.</b> Clasificación taxonómica de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> .	39
<b>Tabla No. 3.</b> Componentes medio RM. 51	
<b>Tabla No.4.</b> Revisión bibliográfica cultivo <i>Haematococcus pluvialis</i> .	57
<b>Tabla No. 5.</b> Microscopia de células de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> ..	65
<b>Tabla No.6.</b> Crecimiento de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> para los diferentes tratamientos..	67
<b>Tabla No.7.</b> Velocidad de crecimiento de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> para los diferentes tratamientos..	69
<b>Tabla No.8.</b> Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo RM para los diferentes tratamientos.	72

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA No. 1</b> <i>Estructura química de la clorofila</i>	24
<b>FIGURA No. 2</b> Isómeros configuracionales de la Astaxantina	29
<b>FIGURA No. 3</b> Posibles rutas de síntesis, con los productos intermediarios, para la obtención de astaxantina a partir de B-caroteno	31
<b>FIGURA No. 4</b> <i>Secuencia de desarrollo de las células de la microalga Haematococcus pluvialis</i> .....	38
<b>FIGURA No. 5</b> Ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i>	39
<b>FIGURA No. 6.</b> Ruta de síntesis de astaxantina en la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> ..	42
<b>FIGURA No. 7</b> <i>Fermentador Biorreactor BIOSTAT® Aplus.</i>	51
<b>FIGURA No. 8</b> esquema de un fermentador	53
<b>FIGURA No. 9</b> Cultivo <i>microalga Haematococcus pluvialis</i> medio RM.	67
<b>FIGURA No. 10</b> Curva de crecimiento microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> para los diferentes tratamientos..	68
<b>FIGURA No. 11</b> Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> medio RM 100% nitrógeno..	70
<b>FIGURA No. 12</b> Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> medio RM 4.0% nitrógeno..	70
<b>FIGURA No. 13</b> Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> medio RM 5.0% nitrógeno.	71
<b>FIGURA No. 14</b> Curva de concentración de nitrógeno en el medio de cultivo RM..	73
<b>FIGURA No. 15</b> Curva pH.	74

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO No. 1</b>	Curva de calibración para concentración de astaxantina	88
<b>ANEXO No. 2</b>	Curva de calibración para concentración de clorofila	89
<b>ANEXO No. 3</b>	Tablas concentración de astaxantina vs clorofila nitrógeno 100%, 4.0% Y 5.0%.	90
<b>ANEXO No. 4</b>	Tabla medición de pH	91
<b>ANEXO No. 5</b>	ANOVA producción de astaxantina	91
<b>ANEXO No. 6</b>	ANOVA producción de clorofila	92
<b>ANEXO No. 7</b>	Ficha técnica biorreactor BIOSTAT Aplus	92

## 1. TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga  
*Haematococcus Pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en  
el biorreactor BIOSTAT Aplus de 5 litros.



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de ciencias de la salud**  
**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus Pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor BIOSTAT Aplus de 5 litros

## **2. RESUMEN**

Las microalgas han tomado gran importancia en los últimos tiempos gracias a los productos que resultan de su metabolismo como los biocombustibles, los carotenoides y los pigmentos, el *Haematococcus pluvialis* es una especie de microalga de la familia de las xantofilas que tiene la capacidad de producir el carotenoide conocido como astaxantina el cual representa aproximadamente el 3.0% del peso seco de la microalga y el pigmento conocido como clorofila que hace parte de su composición natural; estos compuestos son ampliamente usados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria gracias al gran auge que han tomado los productos

elaborados naturalmente para la salud. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de nitrógeno adecuada para brindar las condiciones de crecimiento y estrés necesarias en el medio de cultivo, para lograr optimizar el rendimiento en la producción de astaxantina y clorofila.

Con el fin de determinar las condiciones de cultivo óptimas para la microalga *Haematococcus pluvialis* se realizaron tres ensayos de cultivo en el medio RM sometiendo la microalga a condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno variando las concentraciones del mismo en el medio de cultivo; se hizo un ensayo de control (concentración de Nitrógeno 100%) y dos ensayos con deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo (concentración de Nitrógeno 5%, 4%), con fotoperiodos de 20 horas luz 4 horas oscuridad, pH de 5,7 a 6,3 y agitación constante en un biorreactor Biostat A plus; los resultados demostraron que el mayor rendimiento en producción de astaxantina y clorofila se obtuvo en el cultivo que tenía una concentración de nitrógeno de 5%, logrando una producción de 1,1µg/ml de astaxantina y 13,5µg/ml de clorofila. De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos, se pudo concluir que la deficiencia de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo tiene un papel importante para la creación de condiciones de estrés que desencadenan la formación de células en forma de quiste productoras de astaxantina y el aumento en la fotosíntesis que se ve representado en la producción de clorofila.

**PALABRAS CLAVES:** Astaxantina, Clorofila, Biotecnología, microalgas.

### 3. INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los compuestos naturales tienen gran importancia nutricional en la prevención y retraso de las enfermedades degenerativas en el ser humano, evitando los daños ocasionados por los radicales libres y previniendo el ataque de las sustancias cancerígenas. La clorofila y la astaxantina son dos compuestos naturales producidos por la microalga *Haematococcus pluvialis* que tienen múltiples efectos beneficiosos en la salud por sus propiedades; la astaxantina tiene grandes ventajas respecto a otros carotenoides gracias a su elevado poder antioxidante debido a su mayor estabilidad estructural respecto a los demás ya conocidos, por su composición química la astaxantina traspasa la membrana lipídica de las células protegiendo la superficie interna y externa de la oxidación;<sup>1</sup> la clorofila es un pigmento natural presente en los organismos fotosintéticos que ha sido estudiado por el efecto positivo que tiene en la prevención y tratamiento del cáncer, purificar la sangre de toxinas, rejuvenecer, energizar el cuerpo y estimular el sistema inmunológico.<sup>2</sup>

Los costos que implica para la industria la producción de carotenoides y pigmentos naturales buscan ser reducidos para tener un mejor manejo operacional e implementar nuevas técnicas de producción natural de astaxantina y clorofila mediante el cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*; ya que el crecimiento de la microalga es lento y poco estable se han

estudiado las condiciones de cultivo óptimas para la producción de biomasa, evaluando factores como la luz, nutrientes, pH, agitación, concentración de CO<sub>2</sub>, entre otros.<sup>3</sup> En el caso particular del *Haematococcus pluvialis* la literatura indica que la deficiencia de nitrógeno en el medio de crecimiento de la microalga es uno de los factores cruciales para que se den las condiciones de estrés que llevan a la producción del metabolito denominado astaxantina y el aumento de la productividad fotosintética traducido en la concentración de clorofila, a su vez la evaluación de la concentración de nitrógeno óptima en el medio de cultivo es crucial para la producción de metabolitos, con un mayor rendimiento y producción biotecnológica bajo las mejores condiciones tanto económicas como de uso para la industria.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar la concentración de nitrógeno como factor de estrés en la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y clorofila en el biorreactor BIOSTAT Aplus de 5.0 litros.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Determinar cuantitativamente la producción de astaxantina y clorofila con una concentración del 100%, 4% y 5% de nitrógeno en el medio RM.

Establecer las condiciones ideales bajo factores de estrés de la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y clorofila en el biorreactor BIOSTAT Aplus.

## 5. ANTECEDENTES

Según lo evidenciado en la investigación de **Choi Y, et al (2002)**, las condiciones para la producción de astaxantina son completamente diferentes a las que requiere la microalga *Haematococcus pluvialis* para su crecimiento, por tal motivo este estudio se realizó en el medio OHM en dos etapas, una de crecimiento y otra de limitación de las condiciones de la microalga mediante la implementación de diversos factores para lograr la transformación bioquímica y morfológica que lleva a la producción de astaxantina; se evidenció que la irradiación, la adición de acetato y la deficiencia de nitrógeno son los factores óptimos para el aumento de la biomasa en el cultivo, además se demostró que la deficiencia de nitrógeno por sí sola como factor de estrés no resulta muy efectiva para aumentar la producción de astaxantina pero combinada con otro factor como la irradiación produce mejores resultados<sup>4</sup>.

De acuerdo a lo mencionado por **Imamoglu E, et al (2007)** la microalga *Haematococcus pluvialis* es una fuente natural de la astaxantina, sin embargo tiene la limitación de que su crecimiento es muy lento y puede contaminarse fácilmente, por esta razón se buscan las condiciones adecuadas para obtener un crecimiento óptimo; en este estudio se cultivó el alga a una temperatura controlada de 25°C, iluminación con luz blanca, aireación continua, se agregó CO<sub>2</sub> intermitentemente para proporcionar

carbono inorgánico al cultivo y mantener el pH por debajo de 8,0, la incubación se realizó durante 12 días y se midió la concentración de células en conteo de cámara de Neubauer. Los resultados del estudio muestran que el medio RM fue en el que se obtuvo mayor crecimiento de células de la microalga a la intensidad de la luz de  $40 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la intensidad lumínica es un factor clave en el crecimiento del alga ya que una mayor intensidad de luz conduce a fotoinhibición lo cual es inversamente proporcional al crecimiento celular; el medio de cultivo es otro factor de vital importancia para el crecimiento de la microalga, su elección depende de los requisitos de crecimiento del alga, el costo, los constituyentes del medio y como afectan la calidad del carotenoide producido<sup>5</sup>.

**Han D, et al (2012)**, habla principalmente sobre la evaluación de las distintas fases móviles e inmóviles de la microalga y la importancia de estas etapas acompañados de una intensidad lumínica que termina afectando la densidad de la población en relación a su crecimiento, se observa que en una fase móvil la microalga muere con mayor facilidad por el efecto de radicales libres los cuales destruyeron la membrana celular, por el contrario la fase inmóvil de la célula logró sobrellevar la intensidad de luz, al igual produciendo un almacenamiento de pigmentos, la producción de lípidos neutros y la generación de astaxantina la cual brinda protección ante las especies reactivas de oxígeno<sup>6</sup>.

En la investigación de **Nagaraja S, et al (2012)** evalúan los efectos del pH, las intensidades de luz y varias fuentes de nitrógeno inorgánico en las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis*. La producción de astaxantina se da gracias al cambio morfológico que ocurre en condiciones de estrés cuando esta pasa de su estado vegetativo y móvil a un estado de enquistamiento llamado aplanospora el cual es dado por las condiciones adversas que se presentan en el ambiente de la microalga y ésta como respuesta produce carotenoides como la astaxantina para protegerse de dichas condiciones adversas ocasionadas por la deficiencia de nutrientes. El primer factor tenido en cuenta fue el medio ambiental, se encontró que el crecimiento óptimo se dá a un pH que va de 5.0-7.0; después es importante analizar el medio en el que se va a cultivar la microalga, ya que este determina su crecimiento y producción de carotenoides, además los múltiples nutrientes que la microalga necesita y las variaciones de concentración que se hacen para que la producción de carotenoides aumente; como resultado de este estudio se encontró que la microalga tiene un mejor rendimiento en la producción de astaxantina cuando se encuentra en deficiencia de nitrógeno, fosfatos, altas intensidades de luz continua y a un pH de 7,0<sup>7</sup>.

En el trabajo bibliográfico de **Hernández K, et al (2013)** se evalúan las condiciones óptimas para mejorar la acumulación astaxantina en la microalga *Haematococcus Pluvialis*. En este estudio se tomaron 15 artículos seleccionados con filtros rigurosos con el fin de buscar los factores de estrés

y crecimiento medioambientales y bioquímicos más estudiados y analizados en el proceso de búsqueda de la mayor acumulación de astaxantina en la microalga, según los artículos revisados se indica que en el día 6 después de someter la microalga a óptimas condiciones de crecimiento para que alcance el tamaño celular adecuado es el tiempo adecuado para iniciar el proceso de estrés; la luz intermitente y con color blanco es la mejor fuente de estrés para que el alga tenga mayor acumulación de astaxantina, al igual que someterla a ausencia del nitrógeno y del azufre, según lo demostrado en los estudios favorece tanto el crecimiento celular como la mayor acumulación de carotenoides en las células de *Haematococcus Pluvialis*<sup>3</sup>.

Se revisó el artículo de **Wang J, et al (2013)** el enfoque principal de la investigación era comparar a la par tanto la concentración de nitrógeno como la densidad celular que se aplica en el momento de realizar el inóculo para el cultivo y posterior crecimiento, con la finalidad de combinar ambos factores buscando la mayor productividad posible de astaxantina, para tal propósito se usaron fotobiorreactores con el uso de columnas de vidrio, para el cultivo se trabajó con el medio de cultivo IBD el cual contenía 4.4 mM de nitrógeno el cual tuvo una productividad de astaxantina de 16.0 µg/L, lo cual ratifica la importancia de evaluar la concentración adecuada de nitrógeno en el cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*<sup>8</sup>.

Se consultó también el artículo de **Camacho J, et al (2013)** el cual habla de las condiciones adecuadas de estrés al que puede ser inducida la microalga *Haematococcus pluvialis* para producir astaxantina. La microalga produce este pigmento al estar sometida a grandes condiciones de estrés proporcionadas por el pH, intensidad lumínica, depresión de nutrientes, temperatura, sales y presencia de inhibidores metabólicos, la ingeniería genética es una buena opción para obtener una fuente secundaria de producción de astaxantina mediante la modificación de genes, las condiciones de estrés a las que se somete el alga ocasionan la expresión de genes que son responsables de la carotenogénesis y acumulación de carotenoides, en especial de la astaxantina<sup>9</sup>.

De acuerdo a **Zou T, et al (2013)** en este trabajo se realizó la extracción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* asistida por ultrasonido, la cual se considera una técnica efectiva gracias a que las ondas permiten que penetre mejor el disolvente en el tejido aumentando el área de la superficie de contacto, permitiendo que el soluto se difunda más rápidamente de la fase sólida al solvente. Para la extracción del pigmento se usó como disolvente una mezcla de etanol 50% y acetato de etilo y se aumentó la temperatura; el tiempo de extracción ocasionó un incremento en la proporción líquido-sólido aumentando consigo el rendimiento de astaxantina respecto a las técnicas comunes, alcanzando un valor de hasta  $7.58 \pm 0.40 \mu\text{g} / \text{g}^{10}$ .

Según el artículo de **Gómez P, et al (2013)** el desarrollo de cultivos comerciales de *Haematococcus pluvialis* como fuente de astaxantina requiere cepas altamente productivas. Cultivaron cepas mutantes y de tipo salvaje en estanques de 120m<sup>3</sup>, un volumen de cultivo significativamente mayor y obtuvieron una producción de astaxantina de 2% para la cepa de tipo salvaje y 2,6% para la cepa mutante, de igual manera en este trabajo se demostró que la selección al azar es una estrategia efectiva para mejorar genéticamente las cepas de *Haematococcus pluvialis*. Se mantuvo una mayor capacidad carotenogénica en cultivos experimentales pequeños cuando los cultivos se ampliaron hasta alcanzar un tamaño comercial<sup>11</sup>.

En el estudio, realizado por **Gu W, et al (2013)** consideraron las diferencias de desarrollo entre las células vegetativas verdes (GV) y las células de descanso naranjas (OR) mediante la comparación de los cambios morfológicos y bioquímicos, incluido el estado de la membrana tilacoidal, la evaluación de los niveles de proteínas y carotenoides. Los resultados demostraron que los cambios morfológicos de la OR a nivel celular y subcelular fueron significativos, por ejemplo, la acumulación masiva de astaxantina, la acumulación de almidón y cuerpos lipídicos, el desmontaje de los tilacoides y otros. El OR se obtuvo dejando GV crecido exponencialmente en el medio MCM sin suplementación adicional de nutrientes durante

aproximadamente 10 días, en las condiciones de incubación mencionadas anteriormente<sup>12</sup>.

En el artículo realizado por **Islam M, et al (2013)** indican que las enfermedades que más preocupan en la actualidad son las degenerativas causadas por los daños oxidativos originados por los radicales libres que se producen a diario dentro del cuerpo como consecuencia de las actividades cotidianas, los antioxidantes son los compuestos que pueden revertir las consecuencias que ocasionan los radicales libres en el cuerpo humano, por esto han tomado gran interés entre las personas con el fin de cuidar su salud, los carotenoides de acuerdo a su capacidad de absorción de radicales libres son los mejores antioxidantes entre los que se encuentra la astaxantina, descrita como el más versátil y potente de los antioxidantes producido por la microalga *Haematococcus pluvialis*, que concentra astaxantina hasta 3-5% de su peso seco, este tiene gran variedad de beneficios en la salud usado como prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas debido a la protección que ofrece frente al estrés oxidativo y la inflamación, además de sus múltiples aplicaciones en la industria demostrada a través de patentes otorgadas<sup>1</sup>.

Durante la revisión bibliográfica fue consultado el trabajo de **Ambati R, et al (2014)** en esta investigación se ilustra acerca de las fuentes de astaxantina más comunes, su composición química y sus diferentes

aplicaciones en la industria. Se demostró que la técnica más efectiva para la extracción de astaxantina es la del ácido clorhídrico y que su cuantificación se realiza con cromatografía líquida de alta eficiencia<sup>13</sup>.

Otro trabajo consultado fue el artículo de investigación de **Dong S, et al (2014)**, se realizó la comparación de las diferentes técnicas de extracción de astaxantina para encontrar la más efectiva y eficiente. Existen dos formas principales de producir la astaxantina, las cuales son: la forma química y por medio de fuentes naturales, sin embargo la forma química ha sido rechazada porque no resulta segura para su uso y por su baja biodisponibilidad, por esta razón es que últimamente ha aumentado significativamente el estudio de producción de astaxantina por medio de fuentes naturales y la producción por *Haematococcus pluvialis* es la más efectiva ya que se producen hasta 9.2 µg/g celular, en este estudio se emplearon 4 métodos de extracción: ácido clorhídrico pretratamiento seguido de extracción de acetona (HCl-ACE), extracción de disolventes de mezcla de hexano / isopropanol (6: 4, v / v) (HEX-IPA), extracción de metanol seguida de extracción de acetona (MET-ACE, extracción en 2 pasos) y extracción de aceite de soja; después de realizar el estudio de estos cuatro métodos para encontrar el más efectivo y eficaz se encuentra que los 4 son técnicamente viables, pero en términos de rendimiento el mejor método de extracción es el de ácido clorhídrico pretratamiento seguido de extracción de acetona (HCl-ACE)<sup>14</sup>.

De acuerdo a la investigación de **Cuellar S, et al (2014)**, la astaxantina es uno de los carotenoides que más cuesta producir en la industria y el 80% de estos costos están asociados a la extracción y purificación del metabolito. La microalga *Haematococcus pluvialis* es la especie que acumula el pigmento en sus células en un 90%; según lo indicado actualmente se usan varios medios para la extracción de astaxantina como solventes orgánicos, proceso de pre-tratamiento de ruptura de células enquistadas, lisis enzimática, entre otros, sin embargo la recuperación de metabolitos intracelulares a grandes escalas sigue siendo un desafío e incluso se están estudiando modificaciones genéticas para conseguir una mayor producción y estabilidad. El reto es conseguir producir estos carotenoides a escala industrial y poder disfrutar de sus múltiples beneficios enfocándose en la reducción de la pérdida de producto, un modelo económico viable, amigable con el ambiente, costo de equipos y energía asociado a la extracción y purificación<sup>15</sup>.

El artículo de **Leonardi R, et al (2015)**, expresan que la microalga *Haematococcus pluvialis* tiene un ciclo celular complejo que consta de varias formas celulares las cuales se conocen como célula vegetativa, palmella y aplanospora, en este artículo se establece la técnica más adecuada para la cuantificación de astaxantina producida por la microalga llegando a la conclusión de que la técnica espectrofotométrica es la más adecuada y específica de cuantificación de astaxantina a partir de la biomasa puesto que no requiere mucho tiempo ni mayor complejidad en la rutina de laboratorio,

además confirmó este estudio que los cultivos de color rojo superan el 3.0% de astaxantina en peso seco de la biomasa<sup>16</sup>.

La investigación de **Tavares L, et al (2015)**, en su estudio indica que la demanda de los productos derivados de las microalgas crecen cada día más, por esta razón los estudios apuntan a que la producción de los mismos cada vez sea más eficiente y menos costosa, uno de estos productos de interés en la industria es la astaxantina, la cual es producida por la microalga *Haematococcus pluvialis*, se busca con base a los medios de cultivo ya conocidos para la microalga, modificar la condiciones en busca de un mejor crecimiento y producción del carotenoide, se ha encontrado tras varios estudios que el nitrógeno y la luz son las variables más influyentes en el crecimiento de la microalga y que el amonio es la forma más adecuada de proporcionar nitrógeno debido a que su aceptación no requiere mayor gasto de energía y que la modificación del medio de cultivo mejora el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga<sup>17</sup>.

En el estudio de **Liang C, et al (2015)**, se evaluó la relación que existe entre el contenido de lípidos, carotenoides y capacidad fotosintética con el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* en condiciones de deficiencia de nitrógeno y alta intensidad lumínica, se hicieron tres ensayos, uno con deficiencia de nitrógeno, uno con alta intensidad lumínica y otro donde estaban combinados los dos factores; se demostró que no había

ninguna relación entre estos factores y la producción de lípidos y carotenoides, mientras sí existe una relación con la capacidad fotosintética de la microalga que se ve aumentada bajo estas condiciones<sup>18</sup>.

En la labor de consulta e investigación se encontró el trabajo de **Córdoba N, et al (2015)**, en el cual se analizaron los métodos más usados para la extracción y cuantificación de la astaxantina, la producción de este pigmento lleva consigo inmerso el proceso de evolución del alga en el paso por sus diferentes fases como célula vegetativa, palmella y aplanospora, la cual es una estructura de resistencia de la célula a los factores adversos y de estrés del medio, por lo cual al dejarse de producir estrés sobre esta la célula incluso puede retornar a su fase vegetativa y no producir el pigmento, es por esto que las condiciones de cultivo para producción de biomasa y para producción de astaxantina son totalmente diferentes; para la extracción de este pigmento es necesario que se realice en ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, en ausencia de oxígeno, con la mayor rapidez posible y en material biológico limpio y deshidratado para evitar su degradación. En este estudio se utilizó la técnica de extracción por solvente, extracción con enzimas líticas, extracción por soxhlet, extracción por fluidos supercríticos y posteriormente cuantificada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrofotometría UV, con el fin de encontrar el mejor aprovechamiento del pigmento en su extracción, cuantificación y estabilización; se obtuvo como resultado del estudio que el método más

adecuado para la extracción de astaxantina es el método de fluidos supercríticos, ya que se obtiene mayor cantidad del compuesto y más puro, en cuanto a su cuantificación la más adecuada fue con la espectrofotometría UV y la estabilización molecular para poder lograr un aprovechamiento de la astaxantina<sup>19</sup>.

En el trabajo realizado por **Panis G, et al (2016)**, Se creó un modelo de proceso que simula la producción a gran escala de astaxantina natural. El modelo calcula la productividad de astaxantina en biomasa de área y constituyó el punto de referencia para determinar la masa teórica y los flujos de energía a lo largo de las tres fases (cultivo, cosecha, extracción) del proceso de producción así como para evaluar el rendimiento económico de tales emprendimientos. Se utilizaron dos métodos en el proceso de cosecha: 1) Un enfoque de dos pasos, donde la suspensión de algas se espesa 2) Un enfoque de un solo paso, donde se fusionan los procesos de espesamiento y deshidratación, ya por último se realizó la extracción en donde se eligió la molienda de perlas para romper la célula. Este método es más efectivo y energético, cuando la concentración de biomasa después de la cosecha en el pastel de algas está entre 100 y 200g/l. Después de que las paredes de las células de algas se han alterado, la biomasa debe procesarse más rápidamente o puede dañarse en pocas horas, por lo tanto, la deshidratación es un proceso aplicado antes de la recuperación del metabolito deseado, para extender la vida útil de la biomasa de algas<sup>20</sup>.

Según el artículo de **Machado R, et al (2016)** en el cual analizan las diferentes técnicas enzimáticas para la ruptura de la pared celular de *Haematococcus pluvialis* para la extracción de carotenoides y la posterior encapsulación de extractos en el polímero la aplicación de fluidos supercríticos, como alternativa al proceso convencional de encapsulación, secado por pulverización, coacervación, liofilización y polimerización interfacial, puede superar los inconvenientes de estas técnicas tradicionales, aplicando técnicas de control del tamaño de partícula y la morfología, degradación de compuestos termosensibles, baja eficiencia de encapsulación y bajo rendimiento. La lisis enzimática asistida por ultrasonido sin congelar usando Glucanex fue elegido como la técnica más adecuada para obtener un extracto de carotenoides a partir de *Haematococcus pluvialis* biomasa con esta técnica de ruptura celular, fue posible obtener carotenoides totales de  $1235.89 \mu\text{g g}^{-1}$  y una extractabilidad de  $83.90\%$ <sup>21</sup>.

En la investigación de **Sun H, et al (2016)**, indican que la producción de astaxantina a partir del *Haematococcus pluvialis* normalmente se basa en dos etapas, la primera de adecuación de condiciones para la microalga para que ésta aumente sus biomasa y la segunda es la acumulación de astaxantina, en este estudio se evaluó el cultivo repetitivo de la microalga para eliminar la ruptura celular; se sometió a diferentes condiciones como la iluminación que muestra un aumento de la fotosíntesis y a la extracción del

metabolito mediante la disrupción celular que fue más efectiva en la primera etapa cuando las células se sometieron a alta intensidad lumínica y su pared celular estaba dañada, de lo contrario este método no es eficiente para la extracción del metabolito<sup>22</sup>.

De acuerdo al artículo realizado por **Zhen Zhang et al (2016)**, donde se desarrolló un nuevo modelo que integraba el cultivo heterotrófico, la aclimatación de células cultivadas a regímenes de luz y nutrientes específicos. En primer lugar, las condiciones ambientales como el pH, la fuente de carbono, nitrógeno y la intensidad de la luz se optimizaron para inducir la acumulación de astaxantina en las células de crecimiento en oscuridad, luego realizaron una serie de experimentos con el objetivo de unir el cultivo heterotrófico y la foto-inducción mediante la introducción de un proceso para aclimatar las células de algas a varios regímenes de luz y nitrógeno. Se demostró que la luz optimizada y los regímenes de nitrógeno permitieron que las células de *H. pluvialis* cultivadas en la oscuridad reconstruyeran rápidamente la maquinaria fotosintética competente para utilizar mejor la luz fuerte para la producción de astaxantina con un mínimo efecto dañino<sup>23</sup>.

Igualmente se consultó el trabajo de **Boateng R, et al (2016)** en el cual el objetivo principal de la investigación fue encontrar la concentración de cloruro de sodio (NaCl) adecuada que debe tener el medio para el crecimiento y

mayor producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*, en este experimento se probó con diferentes concentraciones de NaCl para ver cuál era la más apropiada en la producción de astaxantina, se tomó una cepa de la microalga productora de astaxantina y se le dieron todas las condiciones de crecimiento necesarias para aumentar su densidad celular, al llegar a la densidad celular adecuada y requerida para el experimento se tomó el cultivo y se distribuyó en diferentes tubos de ensayo en cantidades iguales dejando una como control sin concentración de NaCl y las otras con concentraciones de NaCl de 40, 70 y 100 mM, de acuerdo a las observaciones microscópicas, los resultados de la absorbancia y la producción de astaxantina se demostró que la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* es mayor cuando está sometida a altas concentraciones de salinidad, además de ser un factor de estrés efectivo este ayuda a controlar los posibles contaminantes que se pueden presentar en el crecimiento y producción del carotenoide en el laboratorio<sup>24</sup>.

La investigación realizada por **Espinaco B (2016)**, tiene como objetivo principal evaluar la influencia de la concentración de nitrógeno y la intensidad de luz que recibe el alga *H. Pluvialis* respecto a la producción de astaxantina, en esta investigación se busca someter el alga a diferentes condiciones de estrés para evaluar cómo afecta la producción de este carotenoide a partir de la microalga, para tal fin se tomaron 3 medios de cultivo cada uno con

concentraciones diferentes de nitrógeno (1N, 2N y 3N), usando como fuente principal el nitrato de sodio, en combinación con una gran intensidad lumínica sobre el cultivo; los resultados obtenidos de este estudio indican que al someterse el alga al estrés por luz y tener un bajo contenido de nitrógeno en el medio, la producción del pigmento aumenta considerablemente hasta en un 2.0% en 10 días ya que la astaxantina se produce como una respuesta de las células al daño oxidativo al que están siendo sometidas por la intensidad lumínica<sup>25</sup>.

En la investigación de **Castillo C, et al (2017)**, la microalga *Haematococcus pluvialis* es una de las mejores fuentes de astaxantina ya que está comprende hasta el 3.0% de su peso seco, sin embargo, esta microalga presenta limitaciones pues su crecimiento es lento, tiene baja concentración celular, alta susceptibilidad a los daños y un ciclo de vida complejo; por lo tanto es una labor complicada cumplir las condiciones óptimas para su crecimiento y producción de metabolitos, en este estudio se evalúa el medio de cultivo adecuado, que de las mejores condiciones de crecimiento a la microalga comparando su crecimiento en tres medios de cultivo diferentes RM, OHM y BBM, obteniendo como resultado un mayor crecimiento en el medio de cultivo RM con un recuento de  $7,55 \times 10^5$  acompañada de un pH adecuado, temperatura, aireación y agitación<sup>26</sup>.

## 6. MARCO TEÓRICO

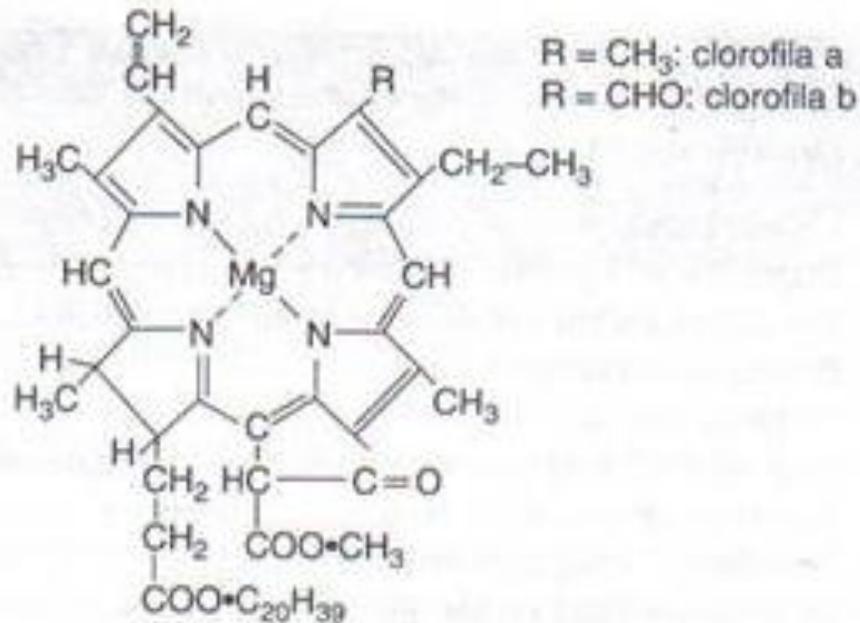
### 6.1 Clorofila

Es una biomolécula presente en la biomasa de plantas y microalgas, además de los carotenoides y ficobilinas las clorofilas son moléculas que se producen de forma integral en estos microorganismos<sup>27</sup>. La clorofila corresponde del 0.50% al 1.50% en peso seco de la biomasa microalgal. Químicamente, la molécula de clorofila no es aislada, pero comprende una familia de sustancias similares, designado como clorofila A, B, C, D y E. La clorofila-a ( $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ ) es la estructura más abundante e importante de la familia, corresponde aproximadamente al 75% de los pigmentos verdes encontrados en la naturaleza<sup>28</sup>.

#### 6.1.1 Estructura química de la clorofila

Desde un punto de vista estructural la clorofila, es una molécula compleja que pertenece a la clase de las porfirinas, formado por cuatro anillos de pirrol y un quinto anillo isocíclico situado al lado del tercer anillo pirrol. Los anillos están interconectados por puentes metilénicos y la molécula contiene un átomo de magnesio en su interior. En el cuarto anillo de pirrol, el ácido propiónico allí presente, se esterifica por un alcohol acíclico de cadena larga, generalmente un fitol que le confiere un carácter hidrófobo a la clorofila<sup>28</sup>.

Figura No. 1 Estructura química de la clorofila Fuente: Manrique E. Los pigmentos fotosintéticos algo más que la captación de luz. Ecosistemas. Revista científica de ecología y medio ambiente. Abril 2013.



### 6.1.2 Producción de clorofila

La biomasa de microalgas es una fuente de compuestos biológicamente activos, tales como clorofilas, carotenoides, ficobilinas, ácidos grasos poliinsaturados y compuestos fenólicos los cuales son utilizados como productos intermedios y finales en procesos relacionados con la producción de compuestos bioactivos. La producción de pigmentos a partir de biomasa de microalgas depende de varios factores fisicoquímicos que dirigen la síntesis de estas biomoléculas. Sin embargo, se debe considerar que independientemente de esos factores, la clorofila-a es un bioproducto de

naturaleza intracelular y por lo tanto, la productividad global del pigmento viene a ser el producto entre el contenido de clorofila-a de la célula y la productividad en biomasa. De esta forma, el rendimiento de biomasa es un criterio principal para la obtención de pigmentos microbianos.<sup>27</sup>

### 6.1.3 Fuentes de clorofila

En las plantas y otros organismos fotosintéticos existen diferentes tipos de clorofilas. La clorofila-a se encuentra en todos los organismos fotosintéticos (plantas, ciertos protistas, proclorobacterias y cianobacterias). Los pigmentos accesorios absorben energía que la clorofila es incapaz de absorber. Los pigmentos accesorios incluyen clorofila b (en algas y protistas las clorofilas c, d y e), xantofila (amarilla) y caroteno, anaranjado (como el beta caroteno, un precursor de la vitamina A).<sup>29</sup>

### 6.1.4 Usos, aplicaciones y propiedades de la clorofila

Esta molécula se utiliza actualmente como colorante natural en las industrias farmacéuticas y de alimentos, además de estar relacionado con las propiedades nutraceuticas y actividades aplicadas a la promoción de la salud tales como anti-inflamatorio, antioxidantes, profilácticos, integridad de tejidos, retraso del envejecimiento, antiagregante y vasoconstrictor plaquetario<sup>30</sup>. Algunos estudios muestran la reducción en el riesgo de cáncer asociado con

el consumo de dietas con clorofila-a, lo que hace de esta molécula un aditivo importante para su uso como un ingrediente en la producción comercial de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos.<sup>31</sup>

#### 6.1.5 Métodos de extracción de clorofila

Las técnicas más usadas para la extracción de clorofila son la fluorométrica y la espectrofotométrica, de las cuales se demostró que los dos métodos presentan una tendencia semejante, y que el método espectrofotométrico puede utilizarse con precaución en ecosistemas acuáticos con baja concentración de nutrientes. La pendiente de los modelos indica que en estos ecosistemas el método espectrofotométrico sobreestima la clorofila con respecto al método fluorométrico. Sin embargo, este método es útil para describir patrones espaciales y temporales, ante la dificultad de utilizar en forma rutinaria metodologías más exactas pero costosas. El método espectrofotométrico puede utilizarse en sistemas acuáticos con baja concentración de nutrientes y con concentraciones de clorofila-a inferiores a 60mg/m-3.<sup>32</sup>

## 6.2 Astaxantina

La Astaxantina es un pigmento de color rojo producido principalmente por la microalga *Haematococcus pluvialis*, ni los animales ni los seres humanos

pueden sintetizarla por lo que estos últimos deben obtenerla a través de la alimentación para satisfacer sus requerimientos nutricionales metabólicos.<sup>33</sup>

Es un carotenoide perteneciente a la familia de las xantofilas debido a la presencia de oxígeno en su estructura, es el pigmento carotenoide más abundante encontrado en los animales marinos, es el responsable de la coloración roja de los crustáceos, moluscos y de los salmónidos, así como de algunas aves como los flamencos; otras funciones biológicas de la astaxantina incluyen el efecto preventivo del cáncer, incremento de la respuesta inmune e inhibición de los radicales libres, gracias a sus múltiples utilidades la astaxantina se ha convertido en un producto con gran potencial en la industria alimenticia y farmacéutica.<sup>19</sup>

*Tabla No 1. Características de la astaxantina. Fuente: Córdoba N. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga Haematococcus pluvialis. UG CIENCIA.*

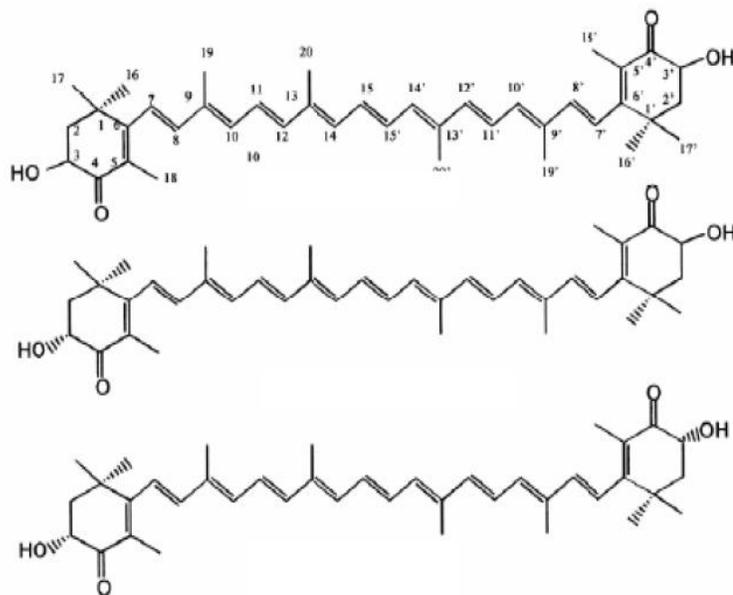
CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
<b>Fuente</b>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
<b>Nombre químico</b>	Astaxantina
<b>Peso molecular</b>	596,8 Daltons
<b>Formula Química</b>	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>
<b>Estado físico</b>	Aceite viscoso
<b>Solubilidad</b>	Insoluble en agua o agua caliente, parcialmente soluble en etanol. Soluble en hexano, acetona éter.
<b>Color</b>	Rojo oscuro
<b>Almacenamiento</b>	Almacenar en bolsas oscuras selladas a 10°C sin exceder los 69°C

### 6.2.1 Estructura Química de la astaxantina

La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' sobre los dos anillos bencénicos al final de la molécula. Diferentes enantiómeros de la molécula son resultantes de la unión de los grupos hidroxilo a los átomos de carbono, que son centros de asimetría. Cuando los grupos hidroxilo se unen sobre el plano de la molécula se dice que están en la configuración R y cuando los grupos hidroxilo se unen bajo el plano de la molécula se dice que están en la configuración S; así, los tres posibles enantiómeros son designados R, R'; S, S' y R, S'.<sup>34</sup>

El *Haematococcus pluvialis* contiene mono ésteres de astaxantina; la composición de los ésteres de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es similar a la de los crustáceos, fuente de dieta natural de los salmones. Siendo el contenido de astaxantina en quistes de *Haematococcus pluvialis* aproximadamente de 70% monoésteres, 25% diésteres y 5.0% libre; la microalga *Haematococcus pluvialis* provee la configuración 3S, 3'S de astaxantina, mientras la levadura *Phaffia* contiene 3R, 3'R astaxantina pura, y la astaxantina sintética es una mezcla de los tres isómeros.<sup>35</sup>

Figura No. 2 Isómeros configuracionales Astaxantina (3S, 3'S) astaxantina; (3R, 3'S) astaxantina; (3R, 3'R) astaxantina. Fuente: Martínez. A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada en diferentes medios. Tesis de grado. México D.F. Instituto politécnico Nacional. Enero 2010.



### 6.2.2 Producción de astaxantina

La producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* está fuertemente relacionada con los cambios morfológicos producidos en la misma desde un estado vegetativo verde en el que se da el crecimiento y producción de biomasa hasta un estado de enquistamiento rojo de alta acumulación de astaxantina. Estos cambios son inducidos por diversos factores como la deficiencia de nutrientes (nitrato, fosfato, sulfato), la intensidad lumínica, la salinidad del medio y las altas temperaturas, entre

otros.<sup>29</sup> Las microalgas son una fuente importante de sustancias de alto valor agregado tales como ácidos grasos y carotenoides; *Haematococcus pluvialis* sometida a condiciones de estrés, como intensidades altas de luz, deficiencia de nutrientes, altas concentraciones de sales, baja y alta temperaturas pierde su motilidad y cambia a una forma esférica, las células se enquistan en esta etapa y aumentan su tamaño desarrollando una pared celular resistente, la microalga sobresale por su habilidad para sintetizar grandes cantidades de astaxantina, siendo una de las fuentes de producción más prometedora de este antioxidante, llegando a producir cerca del 4.0% de peso seco.<sup>3</sup>

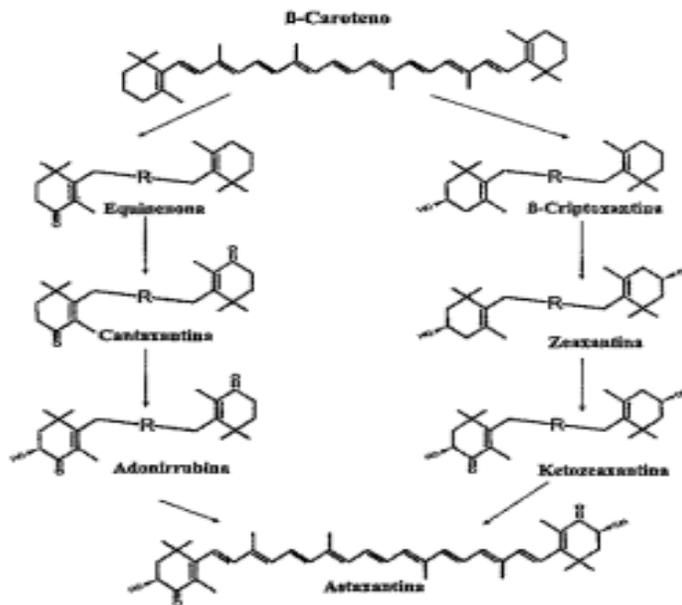
### 6.2.3 Síntesis de la astaxantina

La síntesis de astaxantina, se produce a partir de  $\beta$ -caroteno, aunque las xantofilas se encuentran universalmente en los cloroplastos de las plantas, la biosíntesis de astaxantina está limitada casi de manera exclusiva a los microorganismos, como la levadura *Phaffia rhodozyma*, la microalga *Haematococcus pluvialis* y bacterias marinas como *Agrobacterium* y *Alcaligenes*, la rutas de síntesis propuestas son diferentes en los distintos microorganismos.<sup>26</sup>

En la microalga *Haematococcus pluvialis* la fracción de carotenos en las células vegetativas está compuesta principalmente por luteína (75-80%) y  $\beta$ -

caroteno (10-20%). Una vez la célula es estresada y llega a la fase aplanóspora su composición se transforma prácticamente en el caroteno astaxantina. El  $\beta$ -caroteno es convertido en astaxantina por la adición de grupos carbonilos en la posición 4 y 4', y grupos hidroxil en la posición 3 y 3'. Estas reacciones son catalizadas por  $\beta$ -caroteno cetolasa (4,4'- oxigenasa; CRTW, BKT o CRTO) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (3,3'- oxigenasa; BCH o CRTZ), respectivamente. La presencia de echinenona y cantaxantina en los microorganismos muestra que es prioritaria la formación de los grupos carbonilos frente a la hidroxilación. La formación de estos grupos es catalizada por  $\beta$ -caroteno cetolasa (BKT) con el intermediario mono cetocarotenoide (echinenona), mientras que la formación de grupos hidroxílicos esta catalizada por una hidrolasa para formar la astaxantina.<sup>36</sup>

*Figura No. 3 Posibles rutas de síntesis, con los productos intermediarios, para la obtención de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno. Fuente: Abalde J. La microalga Haematococcus como fuente de astaxantina. Laboratorio de microbiología, departamento de biología celular y molecular. Facultad de ciencias, universidad de Coruña.*



#### 6.2.4 Fuentes de astaxantina

Las fuentes naturales de astaxantina incluyen varios organismos marinos como el camarón y el salmón, sin embargo, estas criaturas no pueden sintetizar astaxantina internamente si no que al igual que los humanos deben consumirla de fuentes externas. En los últimos años ha tomado gran relevancia la obtención de la biomolécula a partir de microorganismos fotosintéticos como las levaduras y las microalgas, las cuales pueden producir diferentes metabolitos aprovechando la energía solar y capturando el CO<sub>2</sub> de la atmósfera, se ha encontrado que *Haematococcus pluvialis* es uno de los microorganismos que mayor potencial presenta en la producción de astaxantina.<sup>37</sup>

La astaxantina es un carotenoide que ha revolucionado la industria gracias a sus múltiples beneficios antioxidantes, lo cual ha llevado a la búsqueda de su producción industrial de manera sintética bajo diferentes procesos como la producción a partir de compuestos como 3-acetoxi-4-oxo-E-ionona o 3-hidroxi-4-oxoE-ionona, los cuales son disueltos en solventes derivados del petróleo (tetrahidrofurano, etilenglicol, metanol, etc.) y enfriados a temperaturas que van desde -5.0°C hasta -75°C, terminando con un proceso de extracción y cristalización utilizando éter y hexano, otro procedimiento conocido es el proceso de producción de astaxantina a partir de la reacción de una sal de trifenilfosfonium con un dialdehído de 10 carbonos; la reacción se da en etanol o metanol a una temperatura entre 40°C hasta 60°C, finalizando con la adición de agua para la precipitación de la astaxantina.<sup>37</sup>

#### 6.2.5 Usos, aplicaciones y propiedades de la astaxantina

La astaxantina es uno de los pigmentos carotenoides que tiene importantes aplicaciones en la industria nutracéutica, cosmética y alimenticia el carotenoide que es extraído de la microalga *Haematococcus pluvialis* fuente natural de astaxantina presenta un gran poder antioxidante siendo 550 veces más potente que la vitamina E y 11 veces más que el  $\beta$ -caroteno.<sup>31</sup> La astaxantina es un antioxidante muy potente y captador de radicales libre, este carotenoide puede ser activo tanto en un ambiente hidrófilo como

lipófilo. Aparte de captar los radicales libres y prevenir la peroxidación lipídica, la astaxantina activa su propio sistema antioxidante por medio de la producción del factor de la transcripción Nrf2. La actividad antioxidante de la astaxantina es de 10 hasta 1000 veces más potente que la vitamina E, la vitamina C y de los carotenoides como la luteína, licopeno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y la zeaxantina.<sup>38</sup>

La astaxantina ha demostrado muchos beneficios para la salud y para aplicaciones industriales evidenciados por los patentes otorgados. La astaxantina tiene el potencial de prevenir y tratar muchas enfermedades como cáncer, diabetes, síndromes metabólicos, problemas cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, estomacales, hepáticas, cutáneas, oculares, entre otras el éxito clínico de la astaxantina se extiende más allá de la protección contra el estrés oxidativo y la inflamación, es la promesa demostrable para la desaceleración funcional relacionada al envejecimiento.<sup>1</sup>

#### 6.2.6 Métodos de extracción de astaxantina

Para extraer, cuantificar y estabilizar la astaxantina producida por la microalga *Haematococcus pluvialis*, teniendo en cuenta la aplicabilidad comercial se han investigado diferentes procesos, los cuales se describen a continuación:

Extracción con solventes: En la técnica reportada por Miao et al.<sup>19</sup> Se tomó una cantidad de muestra, utilizándose éter de petróleo para posterior centrifugación, posteriormente el sobrenadante se llevó a recuperación utilizando un rota vapor para obtener finalmente el extracto; en este tipo de técnicas es importante cuidar la exposición al oxígeno así como las altas temperaturas que puedan llegar a degradar las muestras.

Extracción con enzimas líticas: Kobayashi<sup>19</sup> y colaboradores, reportan la efectividad en la extracción de astaxantina de *Haematococcus pluviialis* utilizando una combinación de enzimas líticas, el procedimiento utilizado describe que las células fueron tratadas con el fin de extraer la clorofila con acetona por 24 horas, una vez las células libres de clorofila se liofilizaron y se trataron con enzimas líticas comerciales, se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células tratadas con enzimas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos, y se lavó dos veces con agua. La extracción de astaxantina se estimó como astaxantina libre y total, la primera se obtuvo después de 1 hora de tratar las células con acetona al 90 %v/v y la segunda después de la hora de tratamiento; se aplicó ultrasonido. La concentración de astaxantina se determinó espectrofotométricamente.

Extracción de astaxantina por Soxhlet: En investigación realizada por Thana, et al.<sup>19</sup> se realizó la extracción de astaxantina en la microalga *Haematococcus pluvialis*, utilizando un Soxhlet, con el que se extrajo de una muestra utilizando como solvente acetona, durante 6 horas hasta que el color del solvente condensado en el superior del aparato estaba claro. Los rendimientos obtenidos fueron de 13,73 mg o 2,75 % del peso seco.

Extracción con fluidos supercríticos: La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una tecnología moderna con aplicaciones cada vez mayores en la industria de transformación farmacéutica y alimentaria. El principio del proceso consiste en utilizar un fluido en condiciones supercríticas (presión-temperatura) en las que sus propiedades fisicoquímicas se encuentran entre las de un líquido y un gas.<sup>19</sup>

### **6.3 Generalidades de las Microalgas**

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, que las constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica. Por su tamaño reducido y variado (5.0–50.0 µm en promedio) son de fácil captura y

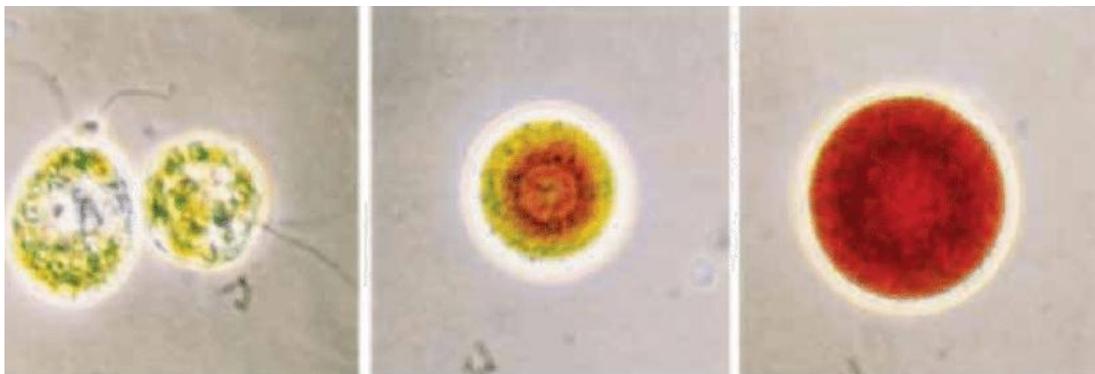
digestión. Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos nos ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo.<sup>34</sup> En los últimos años se han logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines como salud humana, cosmetología, purificación de aguas residuales, prevención de contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, entre otros. Se han reportado aproximadamente 493 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre y otros animales.<sup>32</sup>

#### 6.3.1 Descripción de la microalga *Haematococcus pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* es alga unicelular de agua dulce, con un tamaño celular entre 8.0 y 50 Pm, que se caracteriza por presentar dos flagelos con los que se desplaza. Usualmente se encuentra en las regiones templadas alrededor del mundo, con una coloración rojiza, debido a la producción de astaxantina como medio de protección frente a los rayos ultravioletas provenientes del sol, pero sus esporas pueden volver al estado vegetativo verde de la célula después de un tiempo de inactividad en condiciones favorables para el crecimiento.<sup>36</sup>

La microalga verde dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* tiene una forma elipsoide hasta redondeada al final de la parte anterior y posterior, biflagelada y móvil en su estado vegetativo, la cubierta celulósico-péctica no está adherida al protoplasma, pero está unido a él por tractos; durante periodos de estrés las células se reúnen, pierden sus flagelos y forman una gruesa y persistente pared quística, al mismo tiempo que empiezan a acumular masivamente astaxantina, notándose la disposición alrededor del núcleo y continuando radialmente hasta que todo el protoplasto es de color rojo, los quistes maduros podrían contener más de un 3.0% de su peso seco como astaxantina esterificada, describiéndose valores máximos de un 5.0%.<sup>34</sup>

*Figura No.4 secuencia de desarrollo de las células de la microalga Haematococcus pluvialis. Fuente: Camacho J, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo diferentes condiciones de estrés; NOVA 2013;11(19).*



### 6.3.2 Clasificación de la microalga *Haematococcus pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* es una microalga verde, unicelular, de agua dulce, que en su clasificación taxonómica pertenece al Phylum Chlorophyta. El Phylum Chlorophyta incluye todas las algas con plástidos rodeados por dos membranas que contienen los pigmentos fotosintéticos de clorofila a y b y forman estados flagelados de esporas.<sup>35</sup>

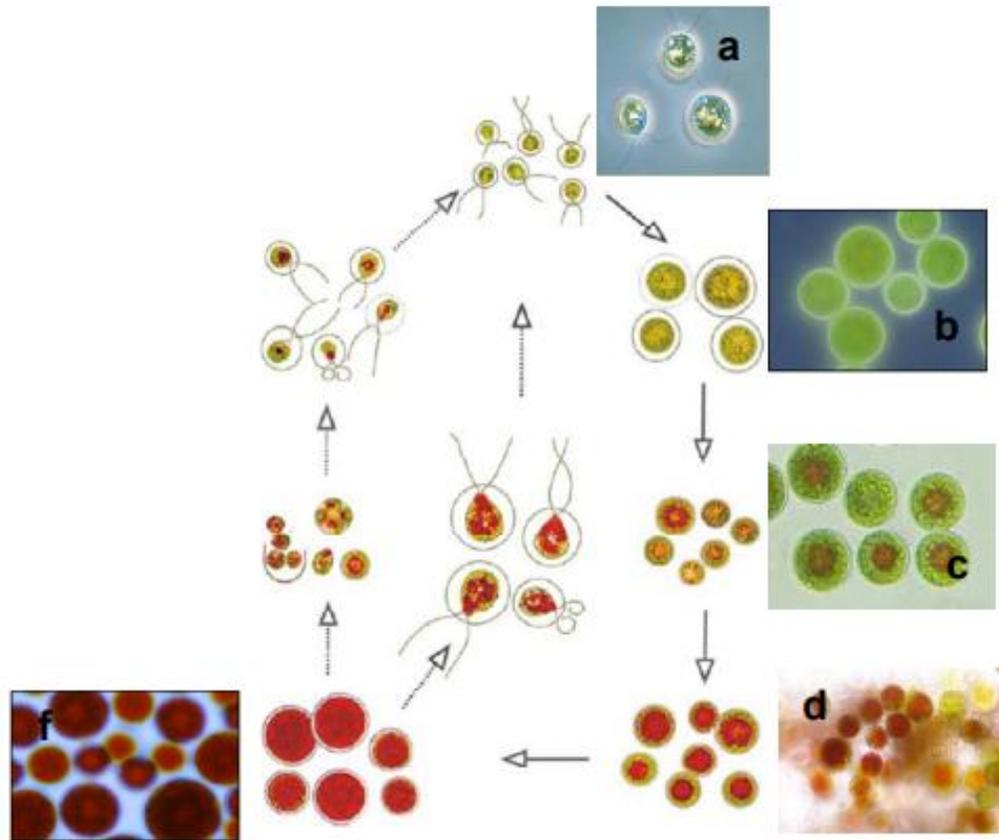
*Tabla No. 2 Clasificación taxonómica de la microalga Haematococcus pluvialis Fuente: Martínez. A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga Haematococcus pluvialis cultivada en diferentes medios. Tesis de grado. México D.F. Instituto politécnico Nacional. Enero 2010.*

<b>PHYLLUM</b>	<b>CHLOROPHYTA</b>
<b>CLASE</b>	CHOROPHYCEAE
<b>ORDEN</b>	VOLCOCALES
<b>FAMILIA</b>	Haematococcaceae
<b>GÉNERO</b>	<i>Haematococcus</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>pluvialis</i>

### 6.3.3 Ciclo de vida de la Microalga *Haematococcus pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* presenta un ciclo con diferentes formas celulares respondiendo a los estímulos del medio en el tiempo se caracteriza por mostrar 3 morfologías: vegetativa (verde con presencia de flagelos), palmella (verde, esférica sin flagelos) y aplanóspora (roja, esférica sin flagelos) es en esta última donde se produce la astaxantina como respuesta a los estímulos del medio.<sup>19</sup>

*Figura No. 5 Ciclo de vida de Haematococcus pluvialis, a. célula vegetativa flagelada, b célula vegetativa sin flagelo, c. palmela. d y f aplanospora*  
*Fuente: Astroc NC, Reyes NA, Buitrago LD, Aguilar JJ, Jiménez JAS.*  
*Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga Haematococcus pluvialis. UG Ciencia 2015 /01/27; 21(0):73-82.*



En el ciclo vital de *Haematococcus pluvialis* se pueden distinguir los siguientes estados. La típica célula de resistencia o hematoquiste, rodeada por una gruesa membrana celulósica, la forma flagelada alargada o macrozoide, las pequeñas formas flageladas esbeltas o microzooides y el estado de aplanosporas no móvil, encerrada en una fina membrana de celulosa, el hematoquiste es la forma de resistencia, con una gruesa pared separada por un apreciable espacio del protoplasma, cuando los hematoquistes de cultivos con nutrientes agotados se traspasan a otro medio con nutrientes adecuados, la gruesa pared quística pronto desaparece y

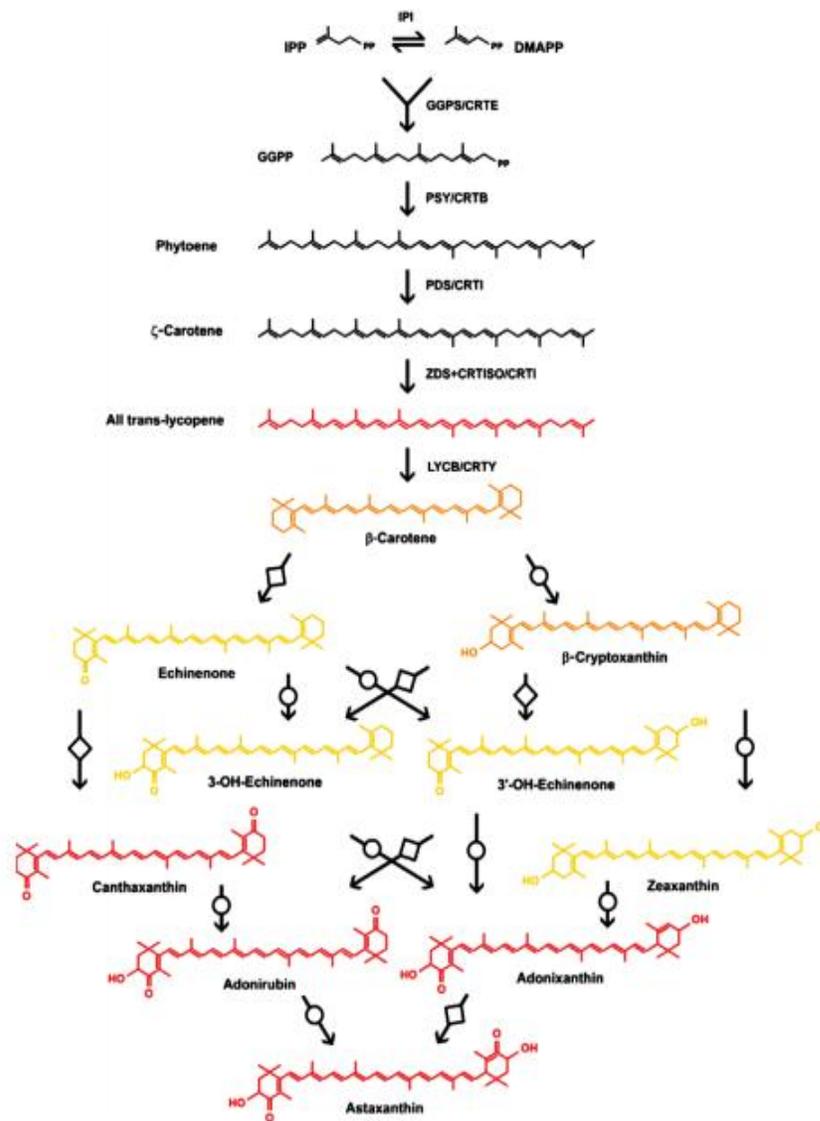
como resultado aparecen células hijas flageladas, las cuales nadan dentro de la vieja pared celular; esos macrozooides contienen mucha astaxantina, aunque aparece en la periferia de la célula una fina línea de clorofila, la cual tras las subsiguientes divisiones, aumenta en grosor, las aplanosporas, formas esféricas no móviles siguen a los macrozooides en la secuencia normal de células en el cultivo y salvo por la ausencia de flagelos la estructura de los protoplastos varía muy poco con respecto a la de los macrozooides, tienen una membrana lisa, dura, y división activa en el interior, de modo que después de algún tiempo brotan hasta 60 células hijas, las cuales pueden permanecer mucho tiempo en la membrana (falsamente designada palmela); de las aplanosporas a su vez con o sin división brotan individuos normales móviles o los pequeños microzooides, pero a estos no se los ha observado todavía en su función sexual, bajo condiciones de crecimiento desfavorables, o debido a diferentes tipos de estrés ambiental, las células de *Haematococcus pluvialis* forman quistes y acumulan grandes cantidades de astaxantina en su citoplasma, dando lugar a una coloración rojiza de la célula.<sup>48</sup>

#### 6.3.4 Vía metabólica de la Microalga *Haematococcus pluvialis*

En la biosíntesis de carotenoides el primer paso es la condensación del geranyl-geranyl difosfato (GGPP) a fitoeno modificado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), Los siguientes pasos son llevados fuera de la membrana

localizando enzimas como; fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno Î2-cyclasa (LCY), según estudios realizados la fitoeno desaturasa es regulada por los niveles del mRNA y se ha establecido que los carotenoides secundarios se acumulan fuera del cloroplasto, siendo transportados del sitio de biosíntesis (cloroplasto) al sitio de acumulación (vesículas localizadas en el citoplasma), todas las enzimas de la ruta son reguladas por genes y son sintetizadas en el citoplasma de las células como precursores polipeptídicos.<sup>9</sup>

*Figura No.6 Ruta de síntesis de astaxantina en la microalga Haematococcus pluvialis. Fuente: Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis de investigación Universidad Nacional Bogotá 2013.*



### 6.3.5 Requerimientos nutricionales y medios de cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*

#### Requerimientos nutricionales

El cultivo de microalgas está dado por la presencia de una variedad de condiciones necesarias para la producción de biomasa y metabolitos secundarios como: ciclo luz/oscuridad, variación de la luz, pH, factores

nutricionales (concentración de elementos orgánicos en el medio), salinidad y fuentes de carbono.

### Medios de cultivo

La microalga *Haematococcus pluvialis* tiene una tasa de crecimiento baja lo que constituye uno de los principales problemas para su reproducción a gran escala. Los medios de cultivo usados de manera habitual para su cultivo han sido adaptados de los empleados para otras microalgas, bacterias o incluso una mezcla de ambos y no han sido diseñados para soportar altos crecimientos.<sup>32</sup> Se han reportado diferentes medios de cultivo para el crecimiento autotrófico de *Haematococcus pluvialis* entre los que se destacan los medios OHM, Basal y RM por su alta productividad, se han realizado diversos estudios en los que se hace una comparación entre los medios OHM, RM y Basal, con otros medios utilizados en la literatura por diferentes autores como los medios M1, M6, Hong Kong, BG-11 y una mezcla de Basal:BG-1; estos autores han encontrado una alta dependencia del crecimiento de *Haematococcus pluvialis* con relación al medio de cultivo utilizado, reportando un bajo crecimiento en los medios M1 y M6, y una alta densidad celular en el medio RM.<sup>26</sup>

### 6.3.6 Factores de estrés para la microalga *Haematococcus pluvialis*

Se ha demostrado en varias investigaciones que la microalga *Haematococcus pluvialis* fuente natural de astaxantina logra incrementar la producción de la misma cuando es sometida a condiciones de estrés como: periodos de luz/oscuridad, pH, temperatura, salinidad, disminución nutrientes orgánicos en el medio de cultivo como el nitrógeno, concentración de CO<sub>2</sub>, entre otros.

#### Luz

La intensidad lumínica es uno de los factores más importantes tanto en el crecimiento de la célula como en la acumulación de astaxantina, al someter la microalga a periodos de alta intensidad lumínica genera un periodo de foto adaptación ocasionando la formación de quistes como estructura de resistencia y por lo consiguiente la producción de astaxantina.<sup>26</sup>

#### Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los nutrientes principales para el crecimiento y producción de metabolitos secundarios por parte de la microalga, se ha demostrado que a bajas concentraciones de este elemento se estimula la síntesis y acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*.<sup>50</sup>

## Salinidad

La concentración de NaCl en el medio de cultivo de la microalga es un factor importante para su crecimiento y producción de astaxantina, se ha demostrado que concentraciones mayores de 1.0% son letales para la microalga mientras que una concentración de 0,5% favorece la acumulación de astaxantina.<sup>50</sup>

## pH

El pH en el medio de cultivo de la microalga es un factor crucial para su crecimiento, se ha demostrado en varios estudios que la máxima densidad celular alcanzada se da en un pH de 7,0, mientras que a pH mayor de 9,0 y menor de 5,0 hay muy baja densidad celular.<sup>26</sup>

## CO<sub>2</sub>

La concentración de CO<sub>2</sub> es la principal fuente de carbono para la microalga, se ha encontrado que al aplicar una concentración del 1.0% en volumen en el aire se optimiza el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*.<sup>50</sup>

### 6.3.7 Medio de cultivo RUDIC (RM)

RUDIC (RM) es un medio de cultivo líquido que está compuesto por una gran variedad de sales entre las que se encuentran: NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, EDTA, NaCl, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,

$\text{NH}_4)_6\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Este medio de cultivo se caracteriza por alcanzar una concentración celular máxima a los 10 días, luego va disminuyendo ligeramente, presenta un aumento significativo con relación a otros medios como el G11 modificado, BBM y OHM. No tiene ni requiere ningún suplemento lo cual hace que sus costos sean mínimos y que sea muy común su uso en el cultivo de microalgas.

#### **6.4 Fotobiorreactor o fermentador**

Un fotobiorreactor es un contenedor biológico artificial cuyo ambiente interno es capaz de generar las condiciones necesarias para que la fotosíntesis de las clorofilas existentes en microorganismos, células o tejidos fotosintéticos que en ellos se cultiva, crezca y se desarrollen de manera rápida y eficiente para generar biomasa y los productos metabólicos que se encuentren dentro de ella. En este sentido el término fotobiorreactor se refiere a sistemas cerrados para el medio ambiente externo, es decir, que no tienen intercambio directo de gases y contaminantes con el medio ambiente externo.<sup>27</sup>

##### **6.4.1 Tipos de biorreactores**

Fotobiorreactores abiertos: En los fotobiorreactores abiertos el cultivo está en contacto con la atmósfera. Son instalaciones que intentan compensar con un bajo costo, una baja productividad debida a un control poco estricto o inexistente de condiciones como el pH o la temperatura. Al estar abiertos son susceptibles a la invasión por otros microorganismos incluyendo microalgas, por lo que son especialmente adecuados para especies robustas y de rápido crecimiento.<sup>28</sup>

- OPEN PONDS: son simples bolsas de la forma y profundidad adecuada que se llenan de medio con los nutrientes adecuados y se dejan crecer. El proceso es, pues, muy económico y los costos de operación son muy bajos, pero la productividad por unidad de superficie y la concentración de biomasa son muy bajas.<sup>28</sup>
- RACEWAYS: son dispositivos más sofisticados en el sentido de que proveen agitación y mezcla. También pueden suministrar CO<sub>2</sub> al cultivo de forma relativamente eficiente y con pocas pérdidas, lo que permite también un cierto control del pH. El dispositivo de impulsión más común es la rueda de paletas y consigue mantener el cultivo en suspensión y mezclado con un gasto de potencia de unos pocos watos por metro cúbico.<sup>28</sup>

Fotobiorreactores cerrados: Los fotobiorreactores cerrados se denominan así porque mantienen al cultivo totalmente aislado del medio ambiente exterior. Típicamente están equipados con sistemas de agitación, aireación,

control del pH, intercambio del calor, adición de medio y CO<sub>2</sub>. Estos son dispositivos muy especializados, a menudo diseñados específicamente para una especie concreta. Los fotobiorreactores tubulares, además, tienen partes separadas para la captación de la luz y para la desgasificación, por lo que permiten optimizar ambas funciones a cambio de un costo mayor que puede ser compensado por una mayor productividad.<sup>28</sup>

- COLUMNAS: consisten en una columna de burbujeo de material transparente de diámetro (d) y altura (H) Son dispositivos sencillos ya que el burbujeo proporciona la mezcla del sistema, la retirada del O<sub>2</sub> y el aporte de CO<sub>2</sub> que se puede mezclar con la corriente de aireación. Se han utilizado columnas con recirculación interna con el objeto de mejorar el flujo y prolongar el contacto de los gases, mejorando así la transferencia de materia.<sup>28</sup>
- REACTORES PLANOS: Los reactores de placas planas (“Flat Plat Reactors” o FPR) siguen un concepto de diseño simple que busca un uso eficiente de la luz. Están formados por paneles estrechos contruidos para lograr una relación área a volumen alta. Estas placas o paneles forman un sistema mediante la conexión de unas con otras. Dichas conexiones también son utilizadas para introducir gas y sustancias nutritivas. La introducción del CO<sub>2</sub> se suele realizar por la parte baja del panel para asegurar que tenga suficiente tiempo para interaccionar con las algas. En general, las principales ventajas de

estos fotobiorreactores son su alta productividad y una distribución uniforme de la luz.<sup>29</sup>

- REACTORES TUBULARES: son los más sofisticados y los más especializados, pero son también los más caros de construir. El diseño distingue dos partes: lazo y desgasificador:<sup>28</sup>
- LAZO: es la parte en la que se lleva a cabo la captación de la energía solar. Se denomina "lazo" porque es un tubo dispuesto de alguna manera que proporcione una forma compacta, lo que requiere codos y curvas. El lazo está específicamente diseñado para la captación de la luz, sin tener que preocuparnos por los intercambios de calor o materia, lo que permite optimizar la productividad maximizando la eficiencia fotosintética.<sup>28</sup>
- DESGASIFICADOR : es la parte en la que se lleva a cabo el intercambio de materia, especialmente la desorción de O<sub>2</sub> y los intercambios térmicos a través de cambiadores de calor que se pueden instalar al efecto.<sup>28</sup>

#### 6.4.2 Modo de operación de un biorreactor

Operación discontinua o por lotes (batch): donde se retira medio en lotes, cada cierto tiempo para dejar que los organismos lleven a cabo su crecimiento y la síntesis de las moléculas deseadas. Este tipo de operativos suelen asociarse con crecimientos de bacterias o levaduras destinados a la

alimentación, donde al alcanzar el estado deseado del medio (yogur, cerveza o vino, por ejemplo) se retira todo el medio y se vuelve a iniciar el proceso de nuevo con medio inicial y organismos nuevos.<sup>50</sup>

Operación continua: Operar de forma continua: extrayendo medio del biorreactor del que se obtendrá la molécula deseada y, simultáneamente, introduciendo nuevo medio fresco con nutrientes para que las células del biorreactor sigan produciendo durante todo el tiempo. Este tipo de operación suele asociarse con cultivos industriales bacterianos, que son los de crecimiento más rápido.<sup>29</sup>

Varios tipos de operaciones semicontinuas: en sistemas con crecimiento exponencial puede añadirse alimento en tandas para mejorar el rendimiento del cultivo. Este modo de operar un biorreactor se asocia a sistemas de crecimiento celular animal o vegetal, que son los tipos celulares que tardan más en crecer. En ellos se espera a que las células estén en crecimiento exponencial. Cuando están a punto de saturar el medio se retiran células que van a ser procesadas y se renueva el medio de cultivo, permitiendo la proliferación exponencial continuada del cultivo.<sup>29</sup>

#### 6.4.3 Biorreactor BIOSTAT Aplus

El BIOSTAT Aplus es un fermentador biorreactor compacto y autoclavable especialmente adecuado para tareas de formación y desarrollo. El diseño compacto de la unidad de control centraliza todos los componentes, tales como sistema electrónico de control y medida, bombas, sistemas de control de temperatura, etc. todo en una sola carcasa, ayudando especialmente en el ahorro de espacio. Los sistemas pre-configurados para las aplicaciones microbianas o de cultivo celular facilitan la selección y permiten un inicio rápido y sin complicaciones en el laboratorio. El BIOSTAT® Aplus puede adquirirse con diferentes recipientes de cultivo con pared simple fabricados en vidrio al borosilicato que permiten un volumen de trabajo de un máximo de 1.0, 2.0 o 5.0 litros. Para el cultivo celular puede utilizarse también un recipiente de cultivo desechable de policarbonato con un volumen de trabajo de 2.0 litros. Todos los recipientes de cultivo de vidrio o desechables pueden utilizarse con el mismo motor, lo que los hace fácilmente intercambiables sin provocar costos adicionales. Cada sistema incluye además un potente ordenador portátil para el control del biorreactor así como el software BioPAT® MFCS/DA para la adquisición y evaluación de los datos.<sup>41</sup>

*Figura No. 7 Fermentador Biorreactor BIOSTAT® Aplus. Fuente: Biostat® Aplus El fermentador|biorreactor compacto autoclavable. Disponible en: [http://mon.uvic.cat/u360/files/2016/09/Biorreactor2\\_Sartorius-BiostatAplus.pdf](http://mon.uvic.cat/u360/files/2016/09/Biorreactor2_Sartorius-BiostatAplus.pdf)*



#### 6.4.4 Características de los métodos del Biorreactor

Método de mezcla y agitación: permite la dispersión del gas en la solución de nutrientes, la homogeneización de la temperatura, del pH y la y de la concentración de nutrientes en el fermentador. Gracias a la agitación se consigue suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos, así como la dispersión de los líquidos inmiscibles<sup>42</sup>.

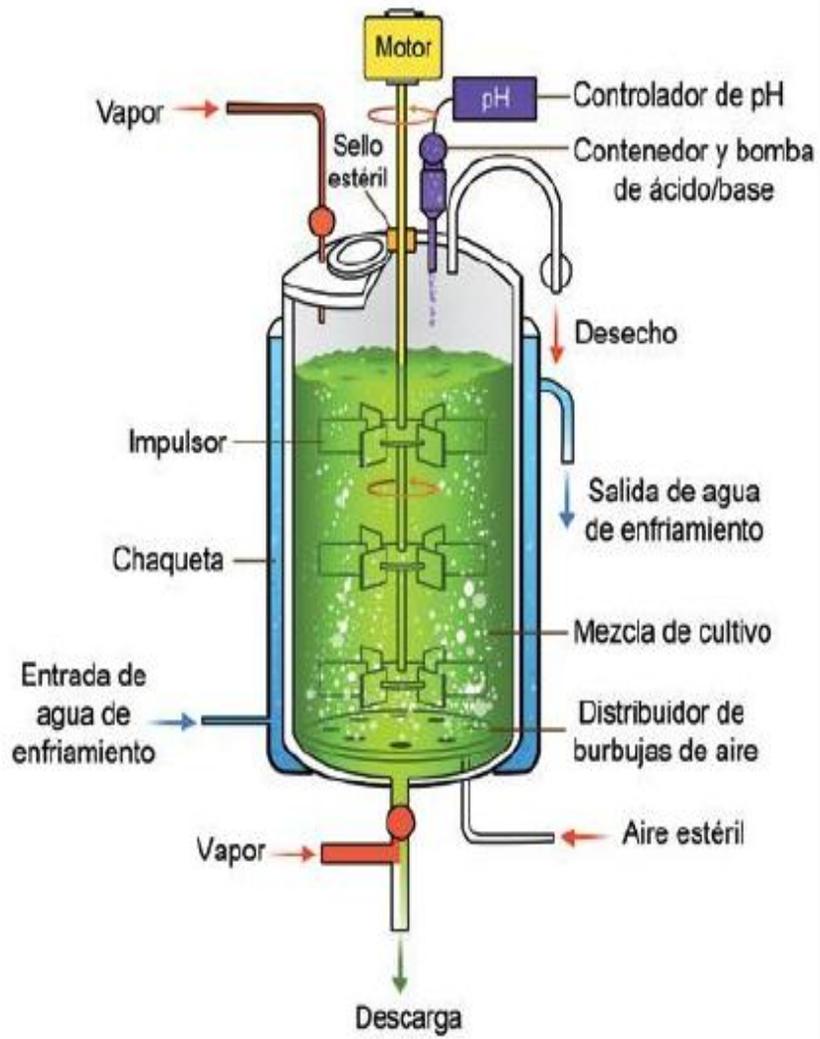
Método de control de temperatura: el control de la temperatura en el interior de los fermentadores es un factor físico que afecta el rendimiento del proceso. Una temperatura inferior a la óptima provoca el retardo en el crecimiento y la reducción de la producción celular, una temperatura superior a la óptima produce choque térmico, inducción a una respuesta de estrés celular, producción de proteasas celulares y reducción de los productos

proteicos, la fermentación se debe llevar en un margen de temperatura constante<sup>42</sup>.

Método de control de pH: durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio lo que puede originar un cambio de pH, del medio de cultivo, sin embargo la mayor parte de microorganismos crecen a un pH entre 5,5 y 8,5. Para mantener constante el pH y que su variación no perjudique el crecimiento debe realizarse la medida de pH in-situ y el ajuste con reactivos ácidos o básicos en caso de que sea necesario<sup>42</sup>.

Método de control de concentración de oxígeno o aireación: el control de la correcta aireación se llevara a cabo mediante la medida de oxígeno in – situ, la concentración de oxígeno en el caso de los microorganismos anaerobios, deberá asegurarse una perfecta transferencia gas-líquido que se burbujea desde la parte inferior del biorreactor.<sup>42</sup>

*Figura No. 8 esquema de un fermentador Fuente: Lizarazo A. tecnología-de-los-bioprosesos-diseño-de-fermentadores-y-biorreactores.*



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Tipo de estudio

Esta investigación es un estudio descriptivo experimental, sujeto a las variables investigadas las cuales tenían como fin comparar el crecimiento celular, producción de clorofila y astaxantina por parte de la microalga *Haematococcus pluvialis* en el medio RM a diferentes concentraciones de nitrógeno (100%, 4.0% y 5.0%) consideradas como principales factores de estrés para la microalga en un biorreactor Biostat APlus.

Por otra parte se realizó una revisión bibliográfica con la cual se hizo un estudio deductivo de las condiciones de estrés en el medio de cultivo RM para obtener un mayor rendimiento en la producción de astaxantina, gracias a la comparación de valores teóricos y normales de las concentraciones de nitrógeno más usadas en el medio de cultivo para lograr el estado de estrés en la microalga *Haematococcus pluvialis*, además de otras variables como iluminación, pH, temperatura y agitación.

### 7.2 Universo

En este trabajo de investigación el universo comprendido es la microalga *Haematococcus pluvialis*, la cual pertenece a la familia *Haematococcaceae*, analizada experimentalmente durante 4 meses para obtener resultados que permitan concluir la importancia en la industria de la producción de clorofila y astaxantina.

### **7.3 Población**

La población analizada es la microalga *Haematococcus pluvialis* cepa de referencia suministrada por la Universidad de la Sabana, con la cual se trabajó durante 4 meses para realizar la fase experimental del trabajo.

### **7.4 Muestra**

Para este trabajo de investigación la muestra fue el inóculo tomado de la microalga *Haematococcus pluvialis* el cual se cultivó en el biorreactor Biostat A Plus con tres concentraciones de nitrógeno diferentes (100%, 5.0% y 4.0%), de cada ensayo se evaluó el crecimiento celular, producción de biomasa, producción de clorofila y producción de astaxantina empleando los procedimientos correspondientes para la obtención de datos cuantitativos.

### **7.5 Hipótesis**

Como resultado de este trabajo se espera lograr una producción de clorofila y astaxantina mayor a las registradas en anteriores estudios donde se usó el RM como medio de cultivo y el nitrógeno como factor de estrés principal para la microalga *Haematococcus pluvialis*, acompañado por un estrés de irradianza/oscuridad, pH, agitación constante; los cuales gracias a la revisión bibliográfica fueron elegidos por brindar a la microalga las condiciones necesarias para un óptimo crecimiento y que pueden llegar a estimular una mayor producción de astaxantina y clorofila.

## **7.6 Unidad de análisis**

- Crecimiento celular, evaluado por medio de recuento en cámara de Neubauer.
- Cuantificación de las producciones de clorofila y astaxantina, evaluadas mediante la técnica de espectrofotometría.
- Cuantificación de nitrógeno en el medio RM, evaluado mediante técnica de colorimetría.

## **7.7 Variables**

### **7.7.1 Variables independientes**

- Concentración de nitrógeno
- Porcentaje de O<sub>2</sub> en la aireación

- Intensidad de luz

### 7.7.2 Variables dependientes

- Crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis*
- Producción de astaxantina
- Producción de clorofila

VARIABLES	INDICADORES
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de nitrógeno</li> <li>- Porcentaje de O<sub>2</sub> en la aireación</li> <li>- Intensidad de luz</li> <li>- Crecimiento de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i></li> <li>- Producción de astaxantina</li> <li>- Producción de clorofila</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- medición de la cantidad de nitrógeno en mg/dl en el medio de cultivo RM.</li> <li>- aireación continua de 1.75% en el medio de cultivo</li> <li>- Proporción de luz controlada en periodos de 20h luz/ 4h oscuridad e irradiancia de 70 μEm-2s.</li> <li>- Conteo de crecimiento celular en cámara de Neubauer cada 7 días</li> <li>- Cuantificación de pigmentos mediante espectrofotometría.</li> </ul>

## 7.8 Técnicas y procedimientos

### 7.8.1 Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos de los últimos 5 años (2013-2018) donde se definieron las condiciones de cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y clorofila, con el fin de encontrar las mejores condiciones nutricionales y ambientales para el crecimiento y producción de biomasa, el medio de cultivo apropiado y las condiciones de estrés que permitieran lograr un mayor rendimiento en la producción de astaxantina y clorofila (ver tabla No.3).

#### 7.8.2 Microorganismo

La microalga *Haematococcus Pluvialis* es un alga unicelular de agua dulce aproximadamente 8.0 y 50.0  $\mu\text{m}$ , tiene un ciclo celular complejo que consta de varias formas celulares, la célula verde que presenta flagelos se denomina célula vegetativa; la forma sin flagelos y verde se denomina palmella, y otra forma roja, en donde se da la acumulación de astaxantina, se denomina aplanospora. Cuando las condiciones ambientales llegan a ser adversas (privación de nutrientes, alta irradiación de luz, alta salinidad), las células sufren cambios morfológicos resultando así la formación de grandes aplanosporas rojas resistentes a las condiciones ambientales extremas y producción de astaxantina.<sup>48</sup>

La cepa de referencia de la microalga *Haematococcus pluvialis* con la que se realizó la investigación fue suministrada por la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana y fue conservada en el medio Volvox con todas las condiciones ideales para su crecimiento.

### 7.8.3 Preparación del inóculo

Se realizó el inóculo a partir de una cepa de referencia de la microalga *Haematococcus pluvialis* de la universidad de la Sabana en un Erlenmeyer de 2.0 L de capacidad, se hizo transferencia de un inóculo de  $1.0 \times 10^4$  al biorreactor Biostat A Plus junto con 2.0 L del medio RM estéril ajustado a pH de 6.7, con fotoperiodos de luz y oscuridad, temperatura de 25°C, provisión de aire y agitación constante durante 28 días. Se evaluó el crecimiento del inóculo por medio de microscopia en cámara de Neubauer, donde se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: color, morfología y viabilidad celular, se realizaron conteos cada 7

- Concentración de nitrógeno
- Porcentaje de O<sub>2</sub> en la aireación

Intensidad de luz

- Concentración de nitrógeno
- Porcentaje de O<sub>2</sub> en la aireación

Intensidad de luz días acompañados de medición de pH.

Para cumplir con los objetivos del ensayo se realizaron 3 tratamientos, los cuales se describen a continuación:

- Tratamiento uno: esta fase del experimento se realizó para hacer un control del estudio experimental, en la cual se evaluó el crecimiento celular, viabilidad celular y la producción de astaxantina y clorofila de la microalga *Haematococcus pluvialis* en el biorreactor Biostat A plus con el medio RM (concentración de nitrógeno de 100%), sometiéndola a fotoperiodos de 20 horas luz y 4 horas oscuridad, provisión de aire y agitación constante.

**Tabla 3.** Componentes medio RM. Fuente: Autoras del proyecto.

MEDIO RM CON 100% DE NITRÓGENO		MG/L
NaNO <sub>3</sub>		300
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		20
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		10
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		58.5
E.D.T.A		7.5
NaCl		20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.3
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		1.5
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O		0.3
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O		0.08
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		0.26

- Tratamiento dos: esta fase del experimento se centró en la evaluación del crecimiento celular y la producción de astaxantina y clorofila bajo condiciones de estrés, para lo cual se utilizó como medio de cultivo de la microalga el RM con una concentración de nitrógeno del 4.0%, fotoperiodos de 20 horas luz y 4 horas oscuridad, agitación constante y provisión de aire partiendo de un inóculo de  $1.0 \times 10^4$  cel/ml de *Haematococcus pluvialis*.
- Tratamiento tres: en esta fase del experimento se evaluó la producción de clorofila y astaxantina en el medio RM con una concentración de 5.0% de nitrógeno, con fotoperiodos de 20 horas luz y 4 horas oscuridad, agitación constante y provisión de aire partiendo de un inóculo de  $1.0 \times 10^4$  cel/ml de *Haematococcus pluvialis*.

#### 7.8.4 Curva de pH

Se realizó una curva de la variación del pH en el medio de cultivo a partir de las mediciones realizadas cada 7 días en el pHmetro HI8424 ya que es una de las variables que se debe tener en cuenta para el óptimo crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* cuyo rango de pH va de 5,0 hasta 7,0.

### 7.8.5 Curva de crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* a partir del número de células cuantificadas en cámara de Neubauer cada 7 días, desde el día 7 hasta el día 28 de crecimiento.

### 7.8.6 Extracción de clorofila y astaxantina

La determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos permite evaluar los productos resultantes del metabolismo de las microalgas, como lo son en este caso la astaxantina y la clorofila cuyo método de extracción por la naturaleza de sus componentes fue realizado con solventes orgánicos; en el caso particular de la microalga *Haematococcus pluvialis* el procedimiento con el que se obtiene mejor rendimiento es la extracción con metanol al 90% de acuerdo a la investigación de Niño C, et al<sup>26</sup>, el cual consiste en someter el paquete celular después de centrifugado al contacto con el metanol al 90% durante 10 minutos para lograr fragmentar las células liberando los carotenoides y que estos se disuelvan en el metanol para su posterior cuantificación.

### 7.8.7 Determinación de clorofila y astaxantina

Para la cuantificación de astaxantina y clorofila se hizo la lectura en el espectrofotómetro Genesys 10s uv-vis con el fin de obtener la absorbancia

de las muestras, la astaxantina fue leída a una longitud de onda de 477nm y para la clorofila 667nm; tomando como referencia la curva de calibración de patrones con concentraciones ya conocidas (absorbancia en función de la concentración expresada en  $\mu\text{g/ml}$ ) se hallaron las concentraciones con los datos obtenidos en el experimento.

#### 7.8.8 Determinación de nitrógeno en el medio de cultivo

La determinación de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo se efectuó mediante la técnica BUN/color en el equipo BTS-350, la cual es una técnica de cuantificación espectrofotométrica que permite determinar la concentración de nitrógeno en mg/dl.

### **7.9 Análisis y resultados**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (producción de clorofila y producción de astaxantina) para los tres tratamientos (concentración de nitrógeno 4.0%, 5.0% y 100%) por triplicado con un nivel de confianza del 95% usando como herramienta el software Excel.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Revisión bibliográfica condiciones de cultivo para la microalga *Haematococcus pluvialis*

Tabla No. 4 Revisión bibliográfica cultivo *Haematococcus pluvialis*.  
Fuente: Autoras del proyecto

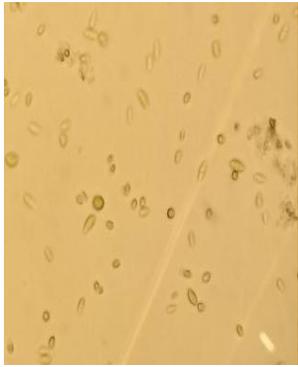
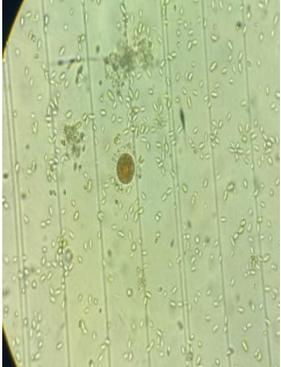
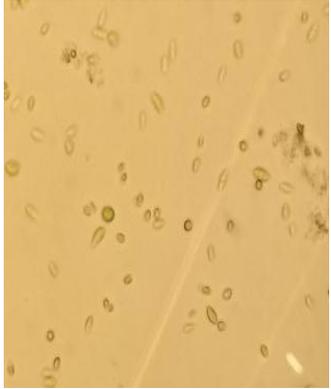
TITULO DEL ARTICULO	AUTOR	CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO	PH	IRRADIANZA	PRODUCCIÓN DE METABOLITOS	AGITACIÓN	MEDIO DE CULTIVO
EFFECTOS DE LA CONCENTRACION INICIAL DE NITROGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA A PARTIR DE <i>Haematococcus pluvialis</i>	Espinaco Brenda.		6.2	110µmol foton. m <sup>-2</sup> .s-1	Astaxantina 2µg/ml	Baja velocidad	BBM
EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO CELULAR PARA LA PRODUCCION DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA <i>Haematococcus pluvialis</i> .	Clara Niño, Francis Rodríguez, Luis Díaz, Ana Lancheros	300mg/L	6.7 - 7.0	70 µEm-2s-1 Fotoperiodo 16 h luz, 6 oscuridad	Astaxantina 8.3µg/ml	manual 10 segundos una vez al día	RM
CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR RELACION CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN <i>Haematococcus Pluvialis</i>	Camacho Ana, Huerfano J.		7.0	Fotoperiodo 2 Lámparas Fluorescente Blancas 40Umol/M <sup>2</sup> S			BBM, OHM Y BG11
UNA REVISIÓN DE LA MICROALGA <i>Haematococcus Pluvialis</i> COMO FUENTE DE ASTAXANTINA NATURAL.		3 Mm	7.0	<37 Umol/M <sup>2</sup> S	Astaxantina 2,7µg/ml	Baja velocidad	OHM
EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA EN UNA CEPA NATIVA DE <i>Haematococcus</i>	Landínez		7.5	2500 ± 50 Lux 18 Horas de luz y 6 de oscuridad	Astaxantina 1,5µg/ml	120 rpm	BBM

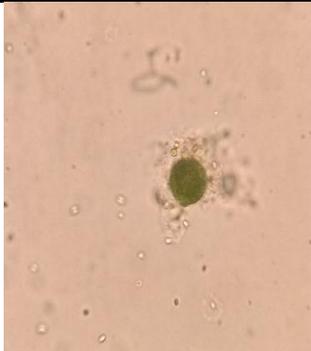
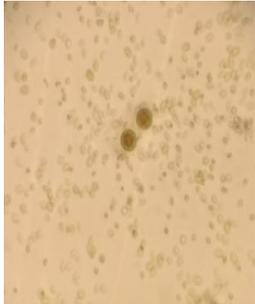
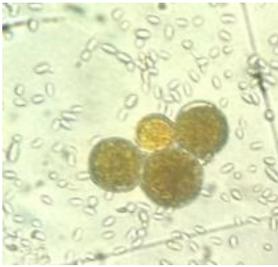
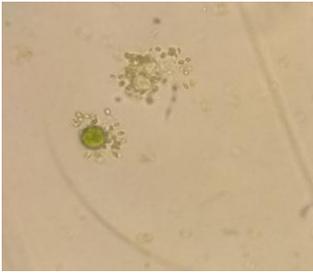
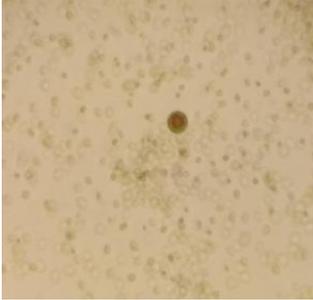
<b>Pluvialis</b>							
<b>OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA NATIVA <i>Haematococcus Pluvialis</i></b>	Landínez	3,28x10 <sup>-3</sup> M de Nitrógeno		11000 lux de Iluminancia (12:12 LO)	Astaxantina 2,99µg/ml	Manual 30 segundos	BBM
<b>PRODUCCION DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA <i>Haematococcus Pluvialis</i></b>	Gabriela Granada.	10%	6.8	5000 A 8000 por 6 días 12:12 Lo	Astaxantina 0,267µg/ml	150rpm	NITROFOSK A 0.50%
<b>EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y DE LOS PIGMENTOS OBTENIDOS DE LA MICROALGA <i>Haematococcus Pluvialis</i> CULTIVADA EN DIFERENTES MEDIOS.</b>	Alicia	1.0g/L	7.5	4541,03 LUX		100 rpm	BBM
<b>INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE <i>Haematococcus Pluvialis</i></b>	Margarita Salazar, Oscar Monroy, Ricardo Beristain, Fátima cuevas, Carlos Mendoza.	0.25- 0.75-1		4850 lux 12 – 12 horas		Orbital 100rpm	
<b>CULTIVO DE LA MICROALGA <i>Haematococcus Pluvialis</i>, EN LOTE Y FOTOBIO REACTOR PARA LA PRODUCCION DE CAROTENOIDES</b>	Antonieta Sosa	1.5 g/L		12 hrs. luz 12 hrs. Oscuridad	Astaxantina 0.74 mg/L	100 rpm	BRISTOL
<b>CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE LA MICROALGA NATIVA <i>CHLORELLA SP.</i> AISLADA DE LA REPRESA DE TULÉ, MUNICIPIO MARA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA</b>	Roberta Mora, Reyna Moronta, José Ortega y Ever Morales		7.0	intensidad luminosa de 58µmol quanta/m <sup>2</sup> .s	Clorofila 3.49pg/cel	fotoperíod o 12:12h, aireación continua	ALGAL

## 8.2 Crecimiento celular

En esta etapa de la investigación se evaluó el comportamiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* de manera microscópica (ver Tabla No.5) y macroscópica en el medio RM con diferentes concentraciones de nitrógeno 100%, 5.0% y 4.0% (ver Figura No.9).

Tabla No. 5 Microscopía de células de la microalga *Haematococcus pluvialis* (40x). Fuente: autoras del proyecto.

TIEMPO O (DIAS)	NITROGENO 4.0%	NITROGENO 5.0%	NITROGENO 100%
7			

14			
21			
28			

*Figura No. 9 Cultivo microalga Haematococcus pluvialis medio RM. Fuente: Autoras del proyecto.*



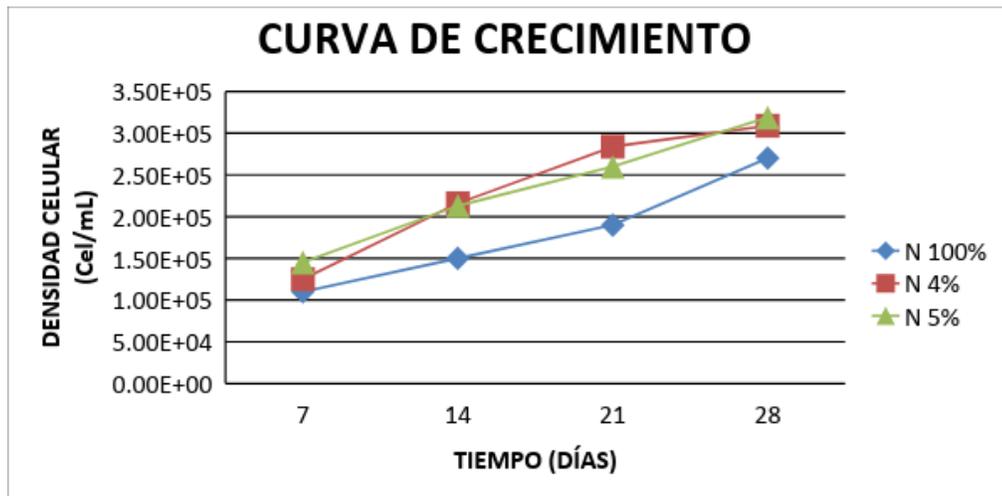
El crecimiento de la microalga fue evaluado por microscopía realizando conteos en cámara de Neubauer cada semana durante los 28 días que duraron los ensayos. Los resultados de crecimiento obtenidos se muestran en la tabla No. 6, donde se observó que el cultivo con mayor biomasa fue el que contenía el medio RM con una concentración de 5.0% de nitrógeno, cuyo recuento celular fue de  $31,9 \times 10^4$  cel/ml.

*Tabla No. 6. Crecimiento de la microalga Haematococcus pluvialis para los diferentes tratamientos. Fuente: Autoras del proyecto.*

<b>TIEMPO (DÍAS)</b>	<b>Nitrógeno 4.0%</b>	<b>Nitrógeno 5.0%</b>	<b>Nitrógeno 100%</b>
<b>7</b>	$12,5 \times 10^4$ cel/ml	$14,5 \times 10^4$ cel/ml	$11 \times 10^4$ cel/ml
<b>14</b>	$21,6 \times 10^4$ cel/ml	$21,3 \times 10^4$ cel/ml	$15 \times 10^4$ cel/ml
<b>21</b>	$28,4 \times 10^4$ cel/ml	$26 \times 10^4$ cel/ml	$19 \times 10^4$ cel/ml
<b>28</b>	$30,9 \times 10^4$ cel/ml	$31,9 \times 10^4$ cel/ml	$27 \times 10^4$ cel/ml

La curva de crecimiento fue elaborada mediante transformación de los valores de Y, que fueron calculados por medio de su logaritmo en base 10 para obtener log vs tiempo del crecimiento celular y las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico. La curva de crecimiento que se observa en la figura 10 de la microalga *Haematococcus pluvialis* demuestra que la misma, a pesar de tener un crecimiento mayor en el medio de cultivo RM con una concentración de nitrógeno del 5.0%, tuvo mayor velocidad de crecimiento en una concentración de nitrógeno del 4.0% equivalente a 0,034 cel/día (ver tabla No 7).

Figura No. 10 Curva de crecimiento microalga *Haematococcus pluvialis* para los diferentes tratamientos. Fuente: Autoras del proyecto.



*Tabla No. 7 Velocidad de crecimiento de la microalga Haematococcus pluvialis para los diferentes tratamientos. Fuente: Autoras del proyecto.*

CONCENTRACION NITRÓGENO	Nº DATOS	DATO MINIMO	DATO MAXIMO	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	COEFICIENTE DE DETERMINACION
100%	4	11	19	0,032	96%
4.0%	4	11	28	0,034	97%
5.0%	4	11	26	0,022	95%

### 8.3 Producción de clorofila y astaxantina

El objetivo principal de la investigación fue la producción de clorofila y astaxantina con los diferentes tratamientos a los que se sometió la microalga, en esta fase de la investigación se evaluó la producción de clorofila y astaxantina por parte de la microalga *Haematococcus pluvialis* en el medio RM con tres concentraciones diferentes de nitrógeno en el medio de cultivo (100%, 5.0%, 4.0%). Obteniendo como resultado concentraciones en µg/ml. Se evidenció que el cultivo con mayor producción de clorofila y astaxantina en el medio RM fue el que contenía una concentración de 5.0% de nitrógeno cuya concentración de clorofila fue 13,15 µg/ml y de astaxantina fue 1,1µg/ml.

Figura No. 11 Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis* medio RM 100% nitrógeno. Fuente: Autoras del proyecto.

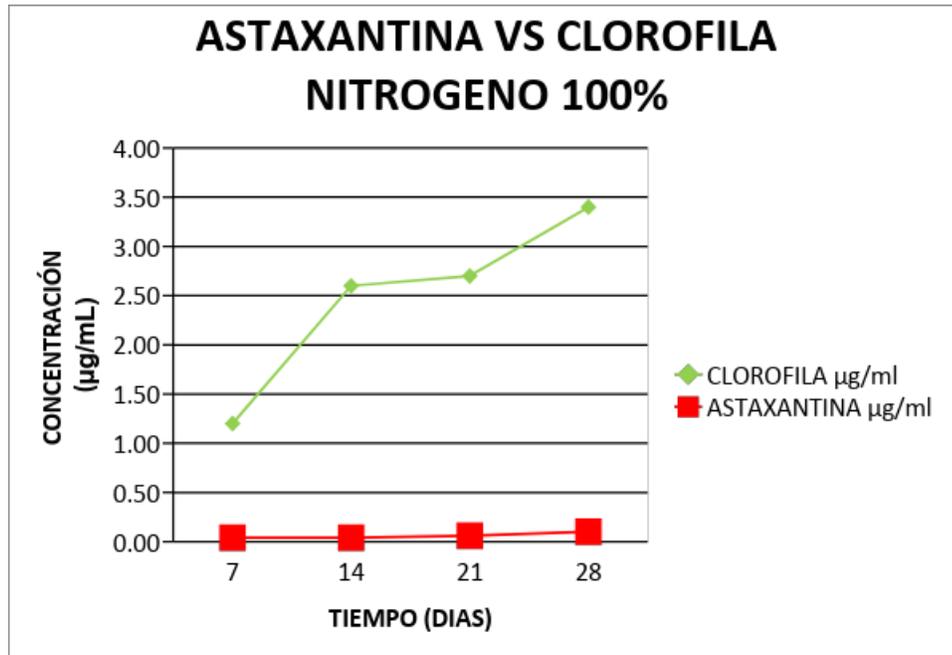


Figura No.12 Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis* medio RM 4.0% nitrógeno. Fuente: Autoras del proyecto.

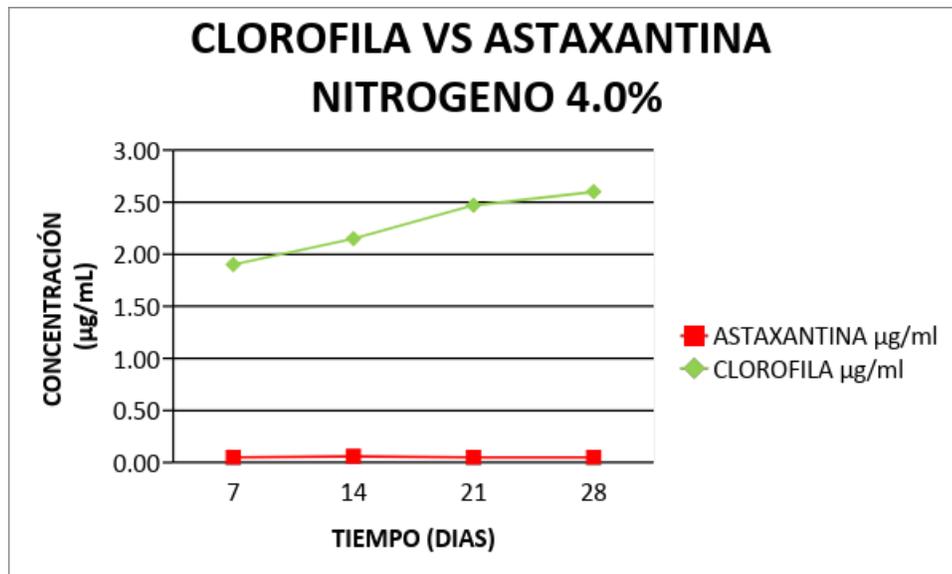
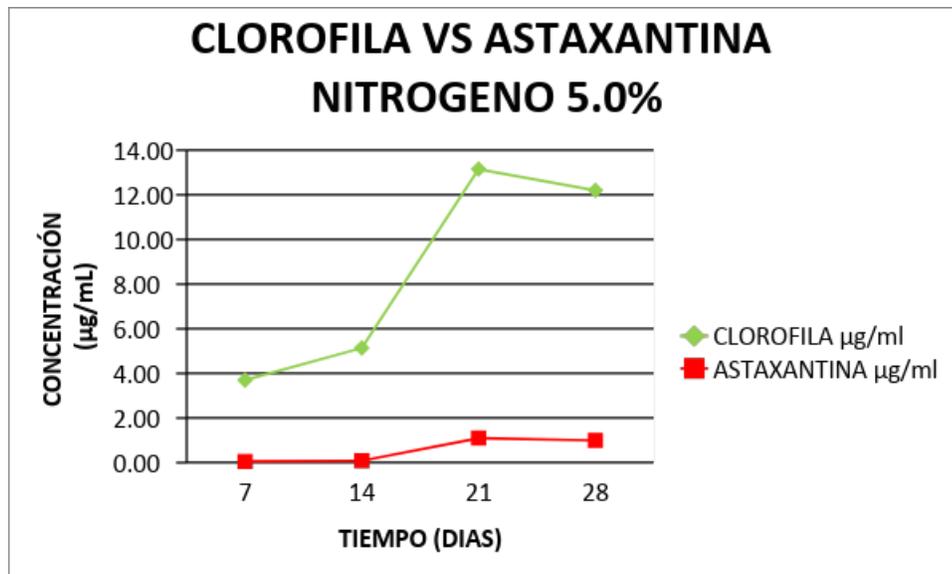


Figura No. 13 Curva de clorofila vs astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis* medio RM 5.0% nitrógeno. Fuente: Autoras del proyecto.



Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de un factor para las variables, producción de astaxantina y producción de clorofila para los tres tratamientos a los que fue sometida la microalga *Haematococcus pluvialis* (concentración de nitrógeno 4.0%, 5.0% y 100%), encontrando que para una confianza del 95% la varianza que existe entre los diferentes tratamientos respecto a la producción de astaxantina no es considerada como un dato estadísticamente significativo, ya que el resultado del p valor fue de 0,09078, mientras que la varianza que existe en los tres tratamientos respecto a la producción de clorofila es estadísticamente significativa con un p valor de 0,0195 siendo el tratamiento en el que se empleó el medio RM con una concentración de nitrógeno del 5.0% el que permite obtener mayor producción de clorofila.

#### 8.4 Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo

Con el objetivo de evidenciar el consumo de nitrógeno como nutriente en el medio de cultivo RM se cuantificó la concentración del mismo cada semana, la cual fue expresada en mg/dl de la muestra (tabla No.9), debido a que el nitrógeno es una de las fuentes de nutrición más importantes para el crecimiento y producción de biomasa de la microalga, sin embargo, como se demostró en la investigación de Espinaco B<sup>25</sup> una mayor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo no aumenta el consumo por parte de *Haematococcus pluvialis*, mientras que su deficiencia ocasiona estrés celular.

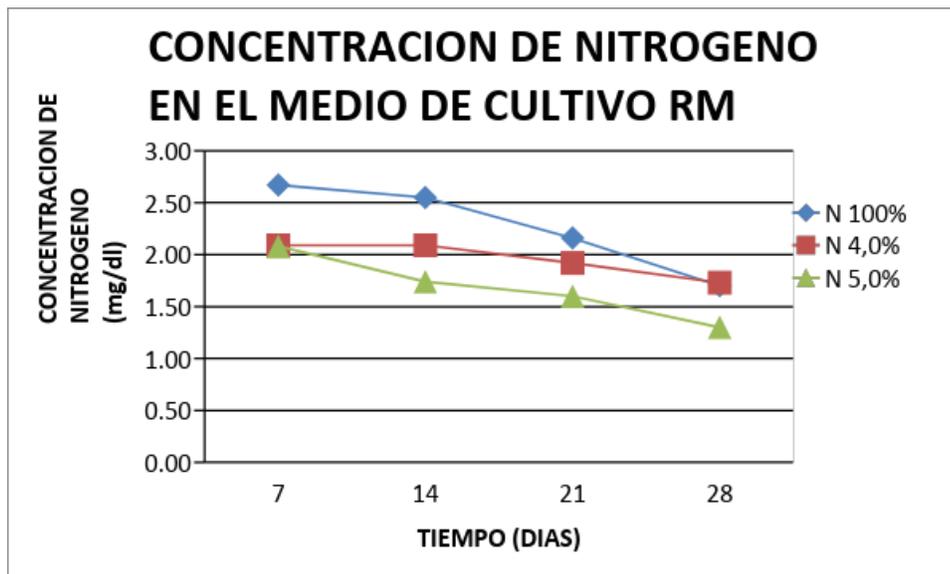
Tabla No. 8. Concentración de nitrógeno en el medio de cultivo RM para los diferentes tratamientos. Fuente: Autoras del proyecto

Concentración de nitrógeno (mg/dl)			
Tiempo (Días)	Nitrógeno 100%	Nitrógeno 5.0%	Nitrógeno 4.0%
7	2.67	2.18	2.09
14	2.55	1.74	2.09
21	2.16	1.6	1.92
28	1.70	1.3	1.73

Los cultivos de la microalga *Haematococcus pluvialis* que tienen una baja concentración de nitrógeno combinado con el estrés por aumento en la iluminación sintetizan de manera más rápida y en mayor proporción la

astaxantina, mientras que los cultivos que tienen mayor concentración de nitrógeno en el medio acumulan la astaxantina en menor proporción y tardan más en hacerlo.<sup>25</sup> En concordancia con los resultados del consumo de nitrógeno en el medio de cultivo se puede evidenciar que la concentración de este nutriente fue disminuyendo considerablemente cada semana (figura No.14) mientras la acumulación de astaxantina en la células de la microalga aumentaba.

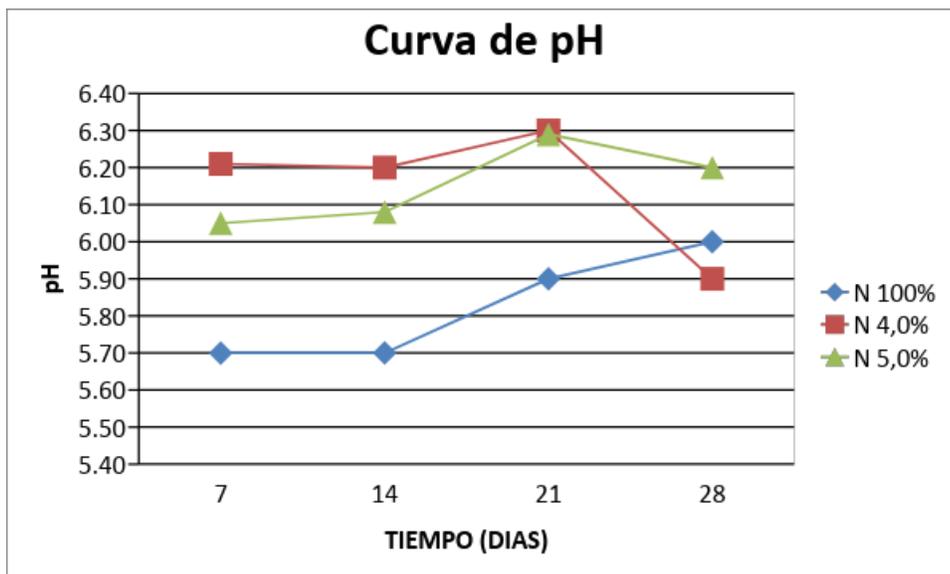
Figura No. 14 Curva de concentración de nitrógeno en el medio de cultivo RM. Fuente: Autoras del proyecto.



## 8.5 Medición de pH en el medio de cultivo RM

La medición de pH en el medio de cultivo RM se realizó cada semana con el fin de determinar la acidez o alcalinidad que presentaba, ya que, de acuerdo al estudio de Niño C<sup>26</sup> el pH ideal para la producción de biomasa y metabolitos por parte de *Haematococcus pluvialis* va de 5.0 a 7.0, por lo tanto un pH fuera de este rango representaría una muerte del cultivo celular al cambiar las condiciones. De acuerdo a las mediciones efectuadas el pH del medio de cultivo se mantuvo en un rango de pH de 5,7-6,3 para los tres tratamientos (concentración de nitrógeno 4.0%, 5.0% y 100%) garantizando el óptimo crecimiento de la microalga.

Figura No.15 Curva pH Fuente. Autoras del proyecto.



## 9. DISCUSIÓN

Las microalgas son microorganismos unicelulares que tienen un gran valor en la industria, ya que, gracias a su metabolismo son la principal fuente de obtención de productos como el biodiesel, metabolitos, carotenoides, pigmentos, entre otras propiedades que hacen que estos microorganismos despierten gran interés en la industria y la producción biotecnológica de donde se derivan muchos de los estudios científicos en los últimos tiempos.<sup>32</sup>

En la actualidad es muy común la preocupación por el daño ocasionado por los radicales libres que se traduce en el envejecimiento acelerado y en las enfermedades degenerativas, razón por la cual los antioxidantes han tomado gran importancia en la industria, entre los más conocidos se destacan resveratrol, licopeno, luteína, zeaxantina, curcumina, astaxantina y clorofila.<sup>11</sup> La astaxantina es uno de los antioxidantes más reconocidos por su amplio poder de acción, siendo considerado como el mejor de los antioxidantes de la industria actual cuya fuente principal de obtención es la microalga *Haematococcus pluvialis*,<sup>15</sup> de la cual se puede obtener paralelamente la clorofila que ha tomado gran importancia en el tratamiento y prevención de enfermedades cancerígenas, además de su amplia aceptación como alimento nutritivo en la dieta;<sup>48</sup> gracias a que la microalga es fuente de obtención de estos metabolitos, ha sido objeto de varios estudios

biotecnológicos que buscan definir las condiciones de crecimiento y producción óptimas para el microorganismos; de ahí deriva el interés en hacer este trabajo, para poder realizar un aporte a la producción biotecnológica de clorofila y astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*, definiendo condiciones de cultivo como el medio, agitación, fotoperiodos y pH.

Hernández K, et al,<sup>3</sup> Camacho J, et al<sup>9</sup> y Choi Y, et al<sup>4</sup> han realizado experimentos con el fin de lograr el mayor rendimiento en la producción de astaxantina mediante su fuente natural que es la microalga *Haematococcus pluvialis* evaluando varias condiciones de cultivo como el pH, temperatura óptima, agitación, CO<sub>2</sub>, radiación, luz, factores de estrés, medios de cultivo, adición de sales, evaluación de nutrientes en el medio de cultivo, entre otros. Mencionando el estrés como la condición adecuada a la que debe ser sometida la microalga para lograr un aumento del rendimiento en la producción de la astaxantina, el cual es alcanzado cambiando las condiciones del medio de cultivo, ya sea aumentando o disminuyendo la concentración de nutrientes, sometiéndola a periodos de irradianza y oscuridad, tratamiento con luz UV, aumentando o disminuyendo la concentración de CO<sub>2</sub>, entre otros.<sup>18</sup> En nuestro experimento las variables que fueron tenidas en cuenta para estresar las células de la microalga fueron la agitación constante del cultivo, suministro de aire constante, 20 horas de

luz y 4 horas de oscuridad, control de pH en el medio de cultivo y disminución en la concentración de nitrógeno en el medio RM, lo cual permitió que las células pasaran al enquistamiento y se produjera clorofila y astaxantina.

Gracias a la investigación de Niño C, et al<sup>26</sup> se logró concluir que el medio RM es el medio de cultivo en el que la microalga *Haematococcus pluvialis* alcanza la mayor producción de biomasa y astaxantina por esta razón fue usado durante nuestro ensayo como medio de cultivo, ya que, cumple con los requerimientos nutricionales y las condiciones necesarias para el crecimiento y producción de carotenoides por parte de la microalga *Haematococcus pluvialis*; en el estudio de Niño C, et al<sup>26</sup> se obtuvo como resultado en el medio de cultivo RM un crecimiento celular de  $7.55 \times 10^5$  cel/ml, mientras que en nuestro trabajo experimental el mayor dato de crecimiento reportado es de  $31,9 \times 10^4$  cel/ml lo cual se debe a los factores de estrés aplicados a la microalga como agitación constante, control de pH, irradianza, suministro de aire y el uso de un biorreactor a escala de laboratorio.

La intensidad lumínica es uno de los factores más importantes tanto en el crecimiento de la célula como en la acumulación de astaxantina de acuerdo

al estudio de Ramírez D<sup>45</sup>. Se ha encontrado que se puede obtener gran cantidad de biomasa y una alta tasa de supervivencia de las células de *Haematococcus pluvialis* al usar bajas intensidades de luz. Por otra parte Harker et al<sup>35</sup>, han encontrado altas tasas de crecimiento cuando se usa una intensidad de luz de 2.0 a 37 Pmol/m<sup>2</sup>s e inhibición del crecimiento a 89 Pmol/m<sup>2</sup>s; además se logró concluir que los ciclos de luz y oscuridad facilitan un rendimiento en el crecimiento de la microalga. En nuestro trabajo de investigación la microalga fue sometida a fotoperiodos de 20 horas luz y 4 oscuridad a una irradianza de 70μE/m<sup>2</sup>s lo cual logró generar en el microorganismo un cambio más rápido de un estado vegetativo a una forma roja esférica sin flagelo, ya que la luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original de los metabolitos producidos por la microalga *Haematococcus pluvialis*.

Cuando *Haematococcus pluvialis* es cultivada en medios con limitaciones de nitrógeno, el crecimiento del alga se ve restringido y la síntesis de astaxantina es estimulada; se obtienen efectos similares cuando el alga es sometida a altas concentraciones de hierro, bajas concentraciones de fosfatos y a medios salinos; Harker et al<sup>35</sup>. La concentración de nitrógeno es un aporte fundamental para ocasionar el estrés en la microalga y generar cambios en su morfología, esto se pudo determinar en nuestro trabajo mediante los tres tratamientos de deficiencia de nitrógeno (4.0% 5.0%y

100%) a las que fue sometida la microalga, como resultado del experimento se pudo concluir que el medio de cultivo RM con una concentración del 5.0% de nitrógeno consiguió exponer a la microalga a un estado de máximo estrés cuyo resultado se traduce en la producción de metabolitos, proporcionando una concentración de astaxantina de 1,1ug/ml y 13,15ug/ml de clorofila, resultado superior que en los tratamientos realizados con nitrógeno al 4.0% y 100%. Estos datos se pueden comparar con el trabajo realizado por Espinaco B<sup>24</sup> en el que se puede evidenciar que los cultivos que contienen mayor o deficiente concentración de nitrógeno en el medio de cultivo al comenzar la producción de astaxantina está resulta más lenta, acumulando porcentajes menores del carotenoide en las células de la microalga.

Se encontraron estudios acerca de la producción de astaxantina de manera natural mediante el cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* donde desarrollaron el ensayo en dos etapas en discontinuo, la primera fase se cultivó con las condiciones constantes de luz, nitrógeno y fosfato, lo cual proporciona el máximo crecimiento celular y en la segunda fase se toman las células de la microalga en estado estacionario y se adiciona NaCl para generar estrés y acumular astaxantina, produciendo el 2,7% en peso de este carotenoide con más del 95% de la astaxantina esterificada<sup>12</sup>. Este trabajo experimental se realizó mediante tres tratamientos en donde las células fueron cultivadas en un biorreactor Biostat A Plus junto con 2.0 L del medio

RM, con el fin de obtener producción de biomasa, y producción de clorofila y astaxantina en un mismo ensayo; se sugiere realizar estos dos procesos por separado ya que para generar una mayor cantidad de biomasa se requiere que el medio tenga unas condiciones de disponibilidad de nutrientes ilimitada para obtener una gran producción celular y luego si someter el mismo a condiciones de estrés con los diferentes factores ya mencionados.

El interés comercial en *Haematococcus Pluvialis* radica en su capacidad de acumular altos niveles de astaxantina natural comparada con otras fuentes. El principal problema para su escalamiento industrial es su elevado costo de producción comparado con el de la astaxantina sintética,<sup>45</sup> sin embargo, aún hace falta realizar más investigaciones en esta área, que requerirá una mejor comprensión del efecto de los factores de crecimiento y estrés que permitan mejorar los resultados.

## 10. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el trabajo se pudo determinar que con una concentración de nitrógeno del 100% en el medio de cultivo la microalga *Haematococcus pluvialis* no se encuentra sometida a condiciones de estrés para la formación de células en forma de quistes productoras de astaxantina.
- En este trabajo se evaluó la concentración de nitrógeno como factor de estrés en la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y clorofila, en la cual se determinó que a una concentración de 5.0% de nitrógeno la microalga tenía un mayor rendimiento tanto a nivel vegetativo como en obtención de metabolitos, se obtuvo una biomasa de  $3,19 \times 10^5$  cel/ml.
- Se calculó la producción de astaxantina en diferentes concentraciones de nitrógeno, determinando que la mayor producción de este carotenoide se dio en el medio RM, con el tratamiento del 5.0% de nitrógeno cuyo nivel de astaxantina fue de  $1,1 \mu\text{g/ml}$ .
- Se calculó la producción de clorofila en diferentes concentraciones de nitrógeno, determinando que la mayor concentración de este pigmento se dio en el medio RM, con el tratamiento del 5.0% de nitrógeno cuyo nivel de clorofila fue de  $13,15 \mu\text{g/ml}$ .
- Al evaluar los efectos de irradianza, agitación, deficiencia de nutrientes y pH, se estableció que es importante tener en cuenta una

agitación constante en el medio, fotoperiodos de 20 horas luz y 4 oscuridad y un pH entre 5.0 a 7.0, para que el microorganismo entre en un cambio morfológico y producción de metabolitos.

- El medio de cultivo RM por su composición nutricional, favorece el crecimiento celular que se puede evidenciar microscópicamente a partir del día 15 del experimento.
- Gracias a este proyecto se determinó que la producción de astaxantina y clorofila a gran escala es favorable, en un biorreactor con capacidad de 5 litros, y que a nivel industrial se podrían obtener estos productos provenientes de la microalga *Haematococcus pluvialis* de una forma más fácil, económica y con grandes beneficios.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Islam M, Gracia F. los antioxidantes para la salud óptima. revista médico científica 2013;26(2):3-9.
2. Reardon W, Troxler S. ¿por qué la clorofila es saludable?. North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services. Food and Drug Protection Division r [Internet]. Disponible en: <https://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/documents/PorquelaClorofilaEsSaludable.pdf>
3. Morales H, Jearim K, Morales P, Eugenia M, Jáuregui Romo C, Jurado A, et al. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas 2015 03;46(1):7-16.
4. Choi, Yun Y, Park J. Evaluation of Factors Promoting Astaxanthin Production by a Unicellular Green Alga, *Haematococcus pluvialis*, with Fractional Factorial Design. *Biotechnol. Prog* 2002. 1170:1175
5. Imamoglu E, Fazilet v, Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *Int J Nat Eng Sci* 2007 January 1;1:5.
6. Han D, Wang J, Sommerfeld M, Hu Q. susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) to photooxidative stress(1). *J Phycol* 2012 Jun;48(3):693-705.
7. Nagaraja S, Arulmurugana P, Rajarama M, Sundararajband R, Rengasamy R. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Phykos* 2012;42(1):59-71.
8. Junfeng W, Sommerfeld R, Congming L, Qiang H. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *ALGAE*;28(2):193-202.
9. Camacho J, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés; *NOVA* 2013;11(19).
10. Zou T, Jia Q, Li H, Wang C, Wu H. Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Mar Drugs*. 2013. 11 (5): 1644-55

11. Gomez P, Inostroza I, Pizarro M, Perez J. From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga *Haematococcus pluvialis* with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin. *Aob PLANTS* 5: plt026.20131:7
12. Gu W, Xie X, Gao S, Zhou W, Pan G, Wang G. Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *Plos ONE* 8(6): e67028. 2013. 1.10.
13. Ambati R, Phang S, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs* 2014 -01-07;12(1):128-152.
14. Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal* 2014;2014:1-7.
15. Cuellar S, Aguilar I, Cardenas D, Ornelas N, Romero M, Parra R. Extraction and purification of high value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb Biotechnol.* 2015 Mar; 8(2): 190–209.
16. Leonardi R, Niizawa I, Irazoqui H. Estudio de la producción de astaxantina a partir de cultivo de microalgas *Haematococcus pluvialis*. XVIII encuentro de jóvenes investigadores de la UNL; 15 octubre 2015;2015. Disponible en:  
<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/xmlui/bitstream/handle/123456789/8249/F.2.3.8.pdf?sequence=1>
17. Lianga C, Zhaia Y, Xub D, Yeb N, Zhangb X, Wang Y, Zhanga W, Yua J. Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis* grown under high light and nitrogen deprivation stress. 2015. 0017-3495
18. Tavares S, Morais B, Truzzi B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology* 2015 11;/75(4):796-803.
19. Astroc N, Reyes N, Buitrago L, Aguilar J, Jiménez J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UG Ciencia* 2015 /01/27;21(0):73-82.
20. Panis G, Rosales J. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research* 18 (2016) 175–190.

21. Machado F, et al. Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biotechnology [internet] 218 (2016) 108–114. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685712>.
22. Sun H, Guan B, Kong Q, Geng Z, Wang N. Repeated cultivation: non cell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. Scientific Reports. Feb 2016. 1:12. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep20578>.
23. Zhang Z, Wang B, Hu Q, Sommerfeld M, Li Y, Han D. A New Paradigm for Producing Astaxanthin From the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering. Mar 2016. 1:12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563850>
24. Boateng R, Faez-Sorkhabi K, Veluvolu V, Wu P. Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. The Canadian Society for Bioengineering 2016; CSBE 16-117. Disponible en: <http://www.csbe-scgab.ca/docs/meetings/2016/CSBE16117.pdf>
25. Espinaco BY. Efectos de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*. Universidad Nacional del Litoral 2016 12. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/8372/2.3.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
26. Niño C, Rodríguez F, Díaz, Lancheros A. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. NOVA. Abr 2017. 15 (28): 19-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>.
27. Acuña R. Diseño de fotobiorreactores para cultivo de microalgas oleaginosas. Biotecnología practica y aplicada. Disponible en: <https://bioreactorcrc.wordpress.com/2011/05/21/diseo-de-foto-bioreactores-para-el-cultivo-micro-algas-oleaginosas-parte-2-bioprocso-y-especificidades/>.
28. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Fotobiorreactores para el cultivo masivo de microalgas. Disponible en: <https://w3.ual.es/~jfernand/procmicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>.

29. Fotobiorreactores, blog sobre biorrefinería e ingeniería química sostenible. Disponible en:  
<https://biorrefineria.blogspot.com/2017/01/descubriendo-el-primer-proyecto-de-biorrefineria-algal-Canada-planta-demostracion-acc.html>.
30. Contreras R. Modo operativo de un biorreactor. Biología la Guía. 2015. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/biotecnologia/modo-operativo-de-un-biorreactor>
31. Ramírez M, et al. Microalgas y cianobacterias Aplicación en Medicina. Revista Electrónica Portales Médicos, 2014. Disponible en:  
<https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/microalgas-y-cianobacterias-aplicacion-en-medicina/>
32. Nivia S, et al. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales, Ciencia y Tecnología, 2015. 8(2): 29-36
33. Molinero I. Astaxantina, un potente antioxidante. Departamento Médico de Soria Natural. Disponible en:  
[http://sorianatural.es/files/publicaciones\\_archi\\_776\\_913.pdf](http://sorianatural.es/files/publicaciones_archi_776_913.pdf)
34. Gómez L. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. Laboratorio de Ecotoxicología Marina, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente. 2007.(2) 3-20
35. Martínez A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada en diferentes medios. Tesis. Instituto politécnico Nacional. México. 2010. Disponible en:  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
36. Harker M, Tsavalos A, Young A.. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 2003. 207-214.
37. Manrique E. Los pigmentos fotosintéticos algo más que la captación de luz. Ecosistemas. Revista científica de ecología y medio ambiente. 2003. (1) 1-11.
38. Becker W. Microalgae for human and animal consumption. In: Borowitzka, M.M., and L.J. Borowitzka. Microalgal biotechnology, 2007. (2) 207-210.
39. Balder, et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2006.15 (4): 717-25.
40. Producción del pigmento astaxantina. Disponible en:  
<http://www.astaxanthin.pe/produccion/>.

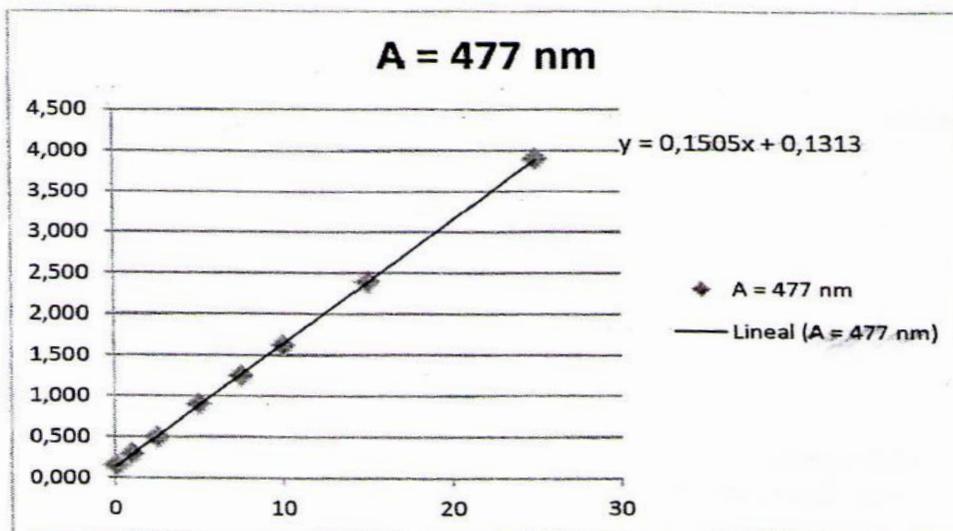
41. Biostat® Aplus El fermentador biorreactor compacto autoclavable.  
Disponible en:  
[http://mon.uvic.cat/u360/files/2016/09/Biorreactor2\\_Sartorius-biostataplus.pdf](http://mon.uvic.cat/u360/files/2016/09/Biorreactor2_Sartorius-biostataplus.pdf)
42. Tecnología de los bioprocesos diseño de fermentadores y biorreactores. Disponible en:  
<https://www.yumpu.com/es/document/view/35961459/tecnologia-de-los-bioprocesos-diseno-de-fermentadores-y-biorreactores>
43. Natura Foundation. Fucoxantina y astaxantina Terapia ortomolecular. Mastering health. Disponible en:  
[http://www.naturafoundation.es/monografie/Fucoxantina\\_y\\_astaxantina.html](http://www.naturafoundation.es/monografie/Fucoxantina_y_astaxantina.html)
44. Clorofila y pigmentos accesorios. Disponible en  
[http://almez.pntic.mec.es/~jrem0000/dpbg/Fotosintesis/clorofila\\_y\\_pigmentos\\_accesorios.html](http://almez.pntic.mec.es/~jrem0000/dpbg/Fotosintesis/clorofila_y_pigmentos_accesorios.html)
45. Martínez. A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada en diferentes medios. Tesis de grado. México D.F. Instituto Politécnico Nacional. Enero 2010. Disponible en:  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
46. Gajardo S. Astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en la cosmética. Biofarbo [online] 2011.19(2), 6-12
47. Meyers S. Papel del carotenoide astaxantina en la nutrición de especies acuáticas. Professor Emeritus, department of food science/oceanography and coastal sciences Louisiana State University, Baton Rouge, Disponible en:  
[http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/IV/archivos/28meyers.pdf](http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/28meyers.pdf)
48. Abalde J. La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina. Laboratorio de microbiología, departamento de biología celular y molecular. Facultad de ciencias, universidad de coruña. Disponible en:  
<http://bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
49. Rivera C, Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. Acta Biologica Colombiana. Vol. 10 No. 2, 2005.
50. Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis de investigación Universidad Nacional Bogotá 2013. Disponible en:  
<http://bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>

51. Medina J, Valdez P, Nieves M, Arzola F, Guerrero M. La importancia de las microalgas. CONABIO. Biodiversitas. 2012. 103:1-5. Disponible en:  
[http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/\\_11\\_articulosrevistasindexadas/486.pdf](http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/_11_articulosrevistasindexadas/486.pdf).
52. Salazar M, et al. Fotoproducción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*. Universidad Autónoma Metropolitana Depto. de biotecnología. 55-535

## 12. ANEXOS

### ANEXO No. 1 Curva de calibración para concentración de astaxantina

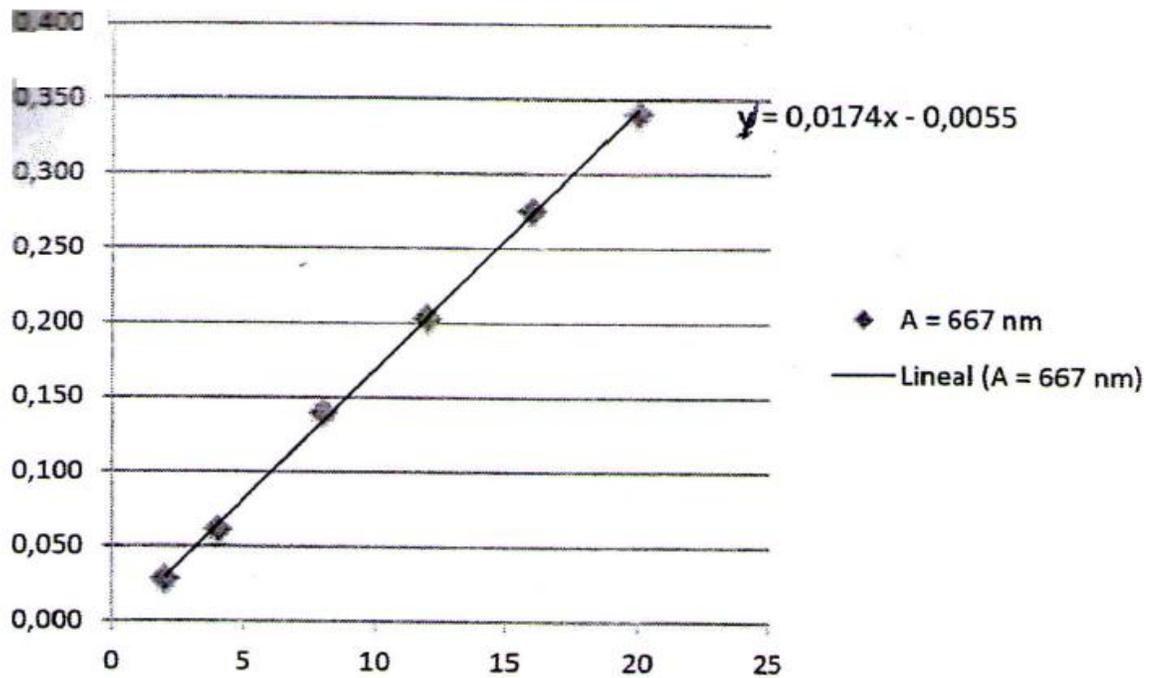
CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABS= 477nm
0.1	0.153
1	0.293
2.5	0.500
5	0.898
7.5	1.245
10	1.612
15	2.395
25	3.900



## ANEXO No. 2 Curva de calibración para concentración de clorofila

CONCENTRACION (µg/ml)	ABS= 667nm
2	0.028
4	0.061
8	0.140
12	0.203
16	0.275
20	0.340

### CURVA CALIBRACIÓN



**ANEXO No. 3** Tablas concentración de astaxantina vs clorofila nitrógeno 100%, 4.0% Y 5.0%.

- Nitrógeno 100%

TIEMPO (DIAS)	CLOROFILA $\mu\text{g/ml}$	ASTAXANTINA $\mu\text{g/ml}$
7	1,2	0,04
14	2,6	0,04
21	2,7	0,06
28	3,4	0,1

- Nitrógeno 4.0%

TIEMPO (DIAS)	CLOROFILA $\mu\text{g/ml}$	ASTAXANTINA $\mu\text{g/ml}$
7	1,9	0,05
14	2,15	0,06
21	2,47	0,05
28	2,6	0,05

- Nitrógeno 5.0%

TIEMPO (DIAS)	CLOROFILA $\mu\text{g/ml}$	ASTAXANTINA $\mu\text{g/ml}$
7	3,7	0,055
14	5,14	0,09
21	13,15	1,1
28	12,2	1

**ANEXO No. 4** Tabla medición de pH

TIEMPO (DIAS)	N 100%	N 4.0%	N 5.0%
7	5,7	6,21	6,05
14	5,7	6,2	6,08
21	5,9	6,3	6,29
28	6	5,9	6,2

**ANEXO No. 5** ANOVA producción de astaxantina

Resumen de datos						
	Tratos					
	1	2	3	4	5	Total
norte	4	4	4			12
$\Sigma X$	0.245	0.21	2.245			2.7
Media	0.0613	0.0525	0.5613			0.225
$\Sigma X^2$	0.0172	0.0111	2.2211			2.2495
Std.Dev.	0.0272	0.005	0.566			0.3864

Detalles del resultado				
Fuente	SS	df	SRA	
Entre tratamientos	0.6785	2	0.3393	$F = 3.16938$
Dentro de los tratamientos	0.9634	9	0.107	
Total	1.642	11		

El valor de  $f$ -ratio es 3.16938. El  $p$ -valor es .090789. El resultado no es significativo en  $p < .05$ .

## ANEXO No. 6 ANOVA producción de clorofila

Resumen de datos						
	Tratos					
	1	2	3	4	5	Total
norte	4	4	4			12
$\Sigma X$	9.95	9.12	34.19			53.26
Media	2.4875	2.28	8.5475			4.4383
$\Sigma X^2$	27.3225	21.0934	361.8721			410.288
Std.Dev.	0.9259	0.3161	4.8178			3.9761

Detalles del resultado				
Fuente	SS	df	SRA	
Entre tratamientos	101.3976	2	50.6988	$F = 6.29323$
Dentro de los tratamientos	72.5048	9	8.0561	
Total	173.9024	11		

El valor de  $F$ -ratio es 6.29323. El  $p$ -valor es .019511. El resultado es significativo en  $p < .05$ .

## ANEXO No. 7 Ficha técnica biorreactor BIOSTAT Aplus

### BIOSTAT® Aplus... plug in and grow

El BIOSTAT® Aplus es un fermentador/bioreactor compacto y autoclavable especialmente adecuado para tareas de fermentación y desarrollo.

El diseño compacto de la unidad de control centraliza todos los componentes, tales como sistema electrónico de control y medida, bombas, sistemas de control de temperatura, etc. todo en una sola carcasa, ayudando especialmente en el ahorro de espacio.

Los sistemas preconfigurados para las aplicaciones microbianas y de cultivo celular facilitan la selección y permiten un inicio rápido y sin complicaciones en el laboratorio.

El BIOSTAT® Aplus puede adquirirse con diferentes recipientes de cultivo con pared simple fabricados en vidrio al borosilicato que permiten un volumen de trabajo de un máximo de 1, 2 o 5 litros. Para el cultivo celular puede utilizarse también un recipiente de cultivo desechable de polycarbonato con un volumen de trabajo de 2 litros. Todos los recipientes de cultivo de vidrio o desechables pueden utilizarse con el mismo motor, lo que les hace fácilmente intercambiables sin provocar costes adicionales.

Cada sistema incluye además un potente ordenador portátil para el control del bioreactor así como el software BioPAT® MFC/DA para la adquisición y evaluación de los datos. El software de control puede adquirirse también por separado para poder utilizar los ordenadores ya disponibles.

