

Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés: Revisión

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

INFORME FINAL

Presentado por

Angela Lizeth Rojas Leyton

Asesor

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



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

Agradecimientos

En este camino largo que pronto culminare doy gracias a Dios por ser mi guía en cada momento y mi fortaleza en cada dificultad, también doy gracias a mis padres por darme la oportunidad y el apoyo tan grande para convertirme en profesional , a cada docente que me acompaño en mi formación profesional y personalmente , al grupo de Bioprocesos y control junto con la profesora Judith Elena Camacho Kurmen por cada momento que dedico a la realización del trabajo , agradezco a mis hermanos por día a día motivarme a continuar , a mi abuelita que aun estando lejos me ayudo cuando más lo necesite ,a Sebastián Ciprian por tanto apoyo y colaboración en momentos de difíciles y a mis amigos por tan bellos momentos que pasamos que hoy solo se convierten en recuerdos de un camino largo, difícil pero ante todo lleno de experiencias , por ello hoy el triunfo no es solo mío sino también de cada persona que me acompaño en el proceso y que culminaremos pronto.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Resumen .	7
2.	Introducción.	8
3.	Antecedentes.	10
4.	Marco teórico.	23
4.1	<i>Haematococcus pluvialis</i> .	23
4.2	Condiciones de cultivo.	24
4.3	pH.	24
4.4	Temperatura.	24
4.5	Luz.	24
4.6	Fotoperiodo.	25
4.7	Nutrientes .	25
4.8	Nitrógeno y fosfatos.	25
4.9	Nitrógeno.	25
4.10	Fosforo.	25
4.11	Hierro.	26
4.12	Dióxido de carbono.	26
4.13	Salinidad.	26
4.14	Cultivo foto autótrofo.	26
4.15	Métodos de cultivo de <i>H.pluvialis</i> .	27
4.16	Astaxantina .	28
4.17	Ruta de biosíntesis de astaxantina.	29
4.18	Usos .	31
4.19	Clorofila .	31
4.20	Métodos para determinar astaxantina y clorofila.	32
4.21	Determinación de la producción de astxantina.	33
5.	Diseño metodológico.	35
5.1	Tipo de estudio.	35
5.2	Hipótesis.	35
5.3	Variables .	35
5.4	Metodología.	35
5.5	Determinación de crecimiento.	35
5.6	Determinación de la producción de clorofila y astaxantina.	35
5.7	Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de pigmentos.	36
5.8	Determinación de cambios morfológicos celulares.	36
5.9	Diseño experimental y análisis de datos.	36
6	Resultados.	38
6.1	Crecimiento celular .	38
6.2	Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmentos.	41
6.3	Concentración de cloro y astaxantina.	43
6.4	Caracterización morfológica.	47

7	Discusión.	56
8	Conclusiones .	60
9	Recomendaciones .	61
10.	Bibliografía .	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo celular de <i>H.pluvialis</i> .	23
Figura 2	Cambio morfológico de la microalga.	24
Figura 3	Estructura molecular de la astaxantina.	29
Figura 4	Vía de la biosíntesis de astaxantina en <i>H.pluvialis</i> .	30
Figura 5	Estructura química de la clorofila.	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Antecedentes.	10
Tabla 2	Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas.	26
Tabla 3	Ecuaciones estequiométricas según el metabolismo de las microalgas.	27
Tabla 4	Principales usos de la astaxantina.	31
Tabla 5	Crecimiento celular de <i>H. pluvialis</i> bajo diferentes condiciones	38
Tabla 6	Parámetros cinéticos del cultivo de <i>H.pluvialis</i> bajo diferentes condiciones.	41
Tabla 7	Concentración de astaxantina y clorofila en <i>H.pluvialis</i>.	43
Tabla 8	Caracterización morfológica.	47
Tabla 9	Tabla resumen.	53

1. Resumen

El *Haematococcus pluvialis* es una microalga con gran interés biotecnológico porque es productor del ketocarotenoides astaxantina, con uso como pigmento y como compuesto bioactivo, con aplicación en diferentes industrias, como la alimentaria, cosmética, nutracéutica, farmacéutica y la acuicultura. La astaxantina en la biomedicina tiene usos como antioxidante, anticancerígeno e inmunomodulador.

En diversos estudios se ha demostrado que bajo las condiciones de estrés como el pH, temperatura, luz, color de luz, alta irradiancia, fotoperiodo, deficiencia de nutrientes (nitratos o fosfatos) y salinidad, la microalga incrementa la producción de astaxantina, pero, aún no se conocen las condiciones óptimas solas o combinadas que puedan aumentar su producción, proponiéndose como objetivo de este estudio determinar cuáles de las condiciones de estrés a las cuales se ha sometido la microalga en el trabajo realizado en el grupo de investigación Bioprocesos y control y la revisión bibliografía realizada generan la mayor productividad del carotenoides.

La revisión realizada permitió establecer que las condiciones de estrés más influyentes en la producción de astaxantina al utilizar la microalga *H. pluvialis* UTEX2505, son el uso de medios RM y BBM, adición de acetato de sodio al inicio del cultivo, cloruro de sodio al día 15 del cultivo, uso de luz roja y luz blanca, pH 6.7 a 7.0, CO₂ 5%, alta irradiancia de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, fotoperiodo 20h luz:4 h oscuridad con una productividad de astaxantina entre 1.73×10^{-4} $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ y 7.24×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$, las cuales se sugieren seguir aplicando para el escalamiento del proceso.

Palabras claves

Astaxantina, *Haematococcus pluvialis*, condiciones de estrés, productividad, microalga.

Estudiante: Angela Lizeth Rojas Leyton

Docente: Judith Elena Camacho Kurmen, asesor

2.INTRODUCCIÓN

El *H. pluvialis* es una microalga de interés biotecnológico porque se utiliza para obtener un ketocarotenoide conocido como astaxantina, el cual tiene usos como compuesto bioactivo y pigmento. Se han realizado diversos estudios donde se evalúan las condiciones para su crecimiento y producción de astaxantina utilizando condiciones de estrés, teniendo en cuenta los rangos de luz, fotoperiodo, pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, concentración de CO₂, concentración de fosfatos y nitrógeno y los medios de cultivo que han sido aptos para el crecimiento de esta microalga. En la literatura no se tiene claro las condiciones adecuadas para tener un crecimiento ideal de la microalga y para la producción adecuada de astaxantina.

La microalga presenta lentitud en su crecimiento, entre 10 a 14 días, con posibilidades de contaminación por uso posiblemente de nutrientes inadecuados o vencidos, o inadecuada manipulación.

Al someter la microalga a condiciones de estrés tiene una mayor producción de astaxantina, por ejemplo la deficiencia de nitrógeno y fosfatos favorece la producción del ketocarotenoide aclarando que el cultivo nunca puede carecer o tener bajas concentraciones de estos nutrientes porque se puede inhibir totalmente el crecimiento de la microalga. Otras condiciones a tener en cuenta para una adecuado crecimiento de la microalga es el pH y la temperatura, sugiriéndose utilizar los medios de cultivo a temperaturas que pueden variar entre los 25°C hasta los 37°C, pero esto depende de la evaluación que se esté realizando y el resultado que se desea obtener; el pH se debe mantener cercano a la neutralidad entre 7 -7.6 debido a que un desbalance del pH también puede provocar la inhibición del cultivo.

Los usos que tiene la astaxantina se dan en varios campos de la industria, se suele usar como colorante natural de alimentos como el salmón que al ingerir las algas y el plancton obtiene su color, también es utilizada en la industria alimentaria por el poder de aportar color a una gran variedad de alimentos, en la industria farmacéutica actúa como foto protector, anticancerígeno y antidiabético debido a sus propiedades antioxidantes y también en la ornitología es utilizado para dar el color a la yema de los huevos y la pigmentación de los pollos; posterior a varias investigaciones su impacto en la salud humana ha sido favorable debido a que evita la liberación de radicales libres y la liberación de electrones que causan daño a las células y después a los tejidos humanos en enfermedades relacionadas con estrés oxidativo.

Su producción a nivel natural y sintético ha sido muy provechosa, siendo la forma sintética costosa en comparación a la forma natural obtenida por esta microalga, además es de mejor calidad que la producida por otros microorganismos, tanto para la industria como para en medio ambiente, debido a que no es estrictamente necesario el uso de químicos y equipos para su

producción si no que por el contrario haciendo variaciones en sus condiciones de estrés también puede producir astaxantina, proponiéndose como objetivo de este trabajo establecer las condiciones de estrés a la cual se ha sometido la microalga *H. pluvialis* UTEX 2505 produce la mayor cantidad de astaxantina teniendo en cuenta los trabajos realizados por el grupo Bioprocesos y control en el período del 2015 al 2020 y la revisión bibliográfica realizada, correlacionando la producción de biomasa, cambio morfológico, producción de clorofila y astaxantina y los parámetros cinéticos con las condiciones de estrés utilizadas durante el cultivo y la producción del carotenoide.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de estrés que produzcan la mayor cantidad de astaxantina en los cultivos realizados de *Haematococcus pluvialis* por el grupo Bioprocesos y control y la revisión bibliográfica realizada en bases de datos que se encuentren en el periodo del 2015 al 2020.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo las condiciones trabajadas en los cultivos realizados por el grupo Bioprocesos y control y la revisión bibliográfica realizada en bases de datos que se encuentren en el periodo del 2015 al 2020.
2. Establecer diferencias en el cambio morfológico durante el cultivo de *Haematococcus pluvialis* bajo las condiciones trabajadas en los cultivos realizados por el grupo Bioprocesos y control y la revisión bibliográfica realizada en bases de datos que se encuentren en el periodo del 2015 al 2020.
3. Determinar diferencias entre la concentración de astaxantina y clorofila bajo las condiciones trabajadas en los cultivos realizados de *Haematococcus pluvialis* por el grupo Bioprocesos y control y la revisión bibliográfica realizada en bases de datos que se encuentren en el periodo del 2015 al 2020.

3.ANTECEDENTES

El *H. pluvialis* se ha sometido a diferentes condiciones de estrés, para obtener astaxantina, en la tabla 1 se encuentra la relación de trabajos realizados para la obtención de astaxantina utilizando diferentes condiciones de estrés.

CONDICIONES DE ESTRÉS	PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA	BIBLIOGRAFÍA
<ul style="list-style-type: none"> ● Luz blanca LEDS (600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) ● Cultivo autotrófico, medio BBM, medio libre de fosfato, CO_2 2%, luz con intensidad de 2 ± 0.2 klux ● Alta intensidad de luz, pH 6.3 +/- 0.5, CO_2, agitación ● Temperatura (25°C), aireación de CO_2 (1,5%v/v), alta intensidad de luz blanca (75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$), pH menor de 8.0, fertilizantes (urea + $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ó N-P-K) ● Ciclo luz/oscuridad, temperatura (20°C), pH cercano a 8.0, aireación de CO_2 , fotobioreactor, ciclos luz: oscuridad. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 23,7 % del total de carotenoides ● 55,6 mg/L ● 12 mg/mL ● Biomasa 0,90 g/L ● 460 – 600 mg/mL 	<p>(9)</p>

<p>Temperatura 25 ± 5°C, fotoperiodo 12:12, intensidad de luz 52 μmol/m²s y burbujeo de aire enriquecido con 3% de CO₂, con un pH entre 6.4 – 6.6 en medio BBM.</p>	<p>168.4 μg/mL.</p>	<p>(42)</p>
<p>Temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 12horas luz y 12 horas oscuridad, intensidad de luz de 4850 (1x), medio de cultivo Bristol , se cultivó en 3 concentraciones 0.25,0.75 y 1.25g/l de NaNO₃.</p>	<p>Concentración mayor de Astaxantina con 1.25g/L de NaNO₃</p>	<p>(6)</p>
<p>Extracción con ácido clorhídrico: 86-94% Astaxantina. Extracción con aceites vegetales comunes: 88% de Astaxantina</p> <p>Trató a las células de <i>H. pluvialis</i> con un 40% (v/v) de acetona durante 2 minutos en 80°C, seguido de liofilización o tratamiento de células con enzimas líticas específicas.</p>	<p>Máxima extractabilidad de astaxantina de 2649 ± 359 μg/g.</p>	<p>(14)</p>
<p>Disponibilidad de nitrógeno, temperatura 20-25 °C, fotoperiodo 12 horas de luz 12 horas de oscuridad , medio de cultivo BG11,intensidad de luz variable , 1,5% de CO₂, v/v.</p>	<p>2.2mg/L.</p>	<p>(7)</p>
<p>Las células BM1 fueron cultivadas en el medio BG11 ,luz alta , privación del nitrógeno y fosforo deficiencia de nutrientes, CO₂.</p>	<p>3%-6% del peso seco celular</p>	<p>(15)</p>

<p>pH de 6,8 ,22°C, luz continua entonces bajo luz baja (LL, 20 fotones de $\mu\text{mol/ m}^2 \text{ s}$) o de alta luz (HL, 150 $\mu\text{mol/ m}^2 \text{ s}$) , medio BBM , la adición de Fe^{2+} y Acetato de sodio como fuente de carbono.</p>	<p>Producción de astaxantina de 2.03 mg/mL.</p>	<p>(16)</p>
<p>Protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) con un pH de 6,0 , temperatura de $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo, con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico de 59 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$, medio de cultivo Bristol, sin suministro de CO_2.</p>	<p>0.81pg/cel.</p>	<p>(3)</p>
<p>Medios de cultivo como el BBM, OHM y BG11 bajo condiciones de pH 7, fotoperiodo 20/4, temperatura de 25°C, agitación continua, CO_2 5 % e iluminación con lámparas fluorescentes blancas 40 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$.</p>	<p>9,6 mg/ L día.</p>	<p>(20)</p>
<p>Control de pH, temperatura ambiente (entre $24\text{-}28^{\circ}\text{C}$) ,medio de cultivo BBM modificado, sin NaNO_3, sin agitación, aireación</p>	<p>Velocidad de crecimiento de biomasa (rx): 0,518 mg X/L.h y 0,641 mg X/L.h de astaxantina,</p>	<p>(29)</p>

<p>BBM (Bold Basal Medium), BG11, RM (Rudic's Medium) y el medio de Waris-H, pH se debe de controlar, temperatura entre 25 y 30 °C, la intensidad lumínica concentraciones de CO₂ del 1% en volumen en el aire</p>	<p>Tasas de crecimiento en los dos medios de cultivo con 0.30 y 0.367 día para los medios Waris-H y BBM con tiempos de duplicación de 2.31y 1.92 días para cada medio respectivamente, tras el primer retardo (lag) del crecimiento de astaxantina.</p>	<p>(34)</p>
<p>En fotobiorreactores bajo condiciones de crecimiento estresantes para aumentar su producción.</p>	<p>Hasta 5,02% del peso en célula seca.</p>	<p>(7)</p>
<p>pH de 7, bajas intensidades de luz (< 37 μmol/m² s), medio de cultivo OHM, F1 y BBM, 0.51% de CO₂.</p>	<p>Alta productividad aproximadamente de 1,4 g/L y 0,06 g/Ldía de astaxantina.</p>	<p>(13)</p>

<p>Concentración diferente de nitrato de sodio, conteniendo los cultivos 2N y 3N el doble y triple de la concentración de nitrato de sodio, respectivamente, que los cultivos con la concentración del medio BBM original (1N)</p>	<p>2% de astaxantina a los 10 días.</p>	<p>(25)</p>
<p>Etapa verde cuando el medio nutritivo completo es suministrada bajo condiciones de crecimiento favorables, y la etapa roja cuando los nutrientes se agotan en condiciones de estrés ,bajas temperaturas , luz alta , alta irradiancia ,máxima concentración de CO₂.</p>	<p>Acumula hasta un 5% de Astaxantina de peso de biomasa seca</p>	<p>(53)</p>

<p><i>H. pluvialis</i> se cultivaba en un medio líquido modificado EG/JM (<i>Euglena gracilis</i> Medio: Jaworski's Medium con oligoelementos y vitaminas. Los cultivos se incubaron a 22-25 ± 2 °C con aireación continua y luz 30 μmol / m² s, y agitación manual dos veces al día.</p>	<p>Acumulación de Astaxantina hasta un 90% más elevada por volumen de cultivo llegando a una concentración de 200 μg/mL</p>	<p>(35)</p>
<p>Medio BBM ,temperatura de 24°C, la luz fue continuamente suministrada por una lámpara fluorescente fría con una intensidad de luz con intensidad de 50 μmol/ m² s, agitación 175 rpm por 16 días.</p>	<p>500 mg/L.</p>	<p>(43)</p>
<p>Medio RM con nitrógeno a 4,0 y 5,0 %, pH 6,7; ciclo luz/oscuridad 20 h: 4 h; temperatura 25 °C; agitación continua; CO₂ de 5 %; iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54rs marca Philips); e irradiancia alta de 140 μEmol/m²s</p>	<p>Acumulan un porcentaje mayor alcanzando valores de 2% a los 10 días.</p>	<p>(44)</p>
<p>Luz continua a 3200 lumen, flujo de aire estéril 1.5 L / min y temperatura de 25°C. Posteriormente, bajo las mismas condiciones se procedió a escalar la producción a 14 L utilizando un fermentador.</p>	<p>Productividad estable entre 4,8 g/L y 4,4 g/L</p>	<p>(30)</p>

<p>Se utilizaron 3 medios de cultivo a base de fertilizantes orgánicos y con diferentes intensidades de iluminación. Los medios de cultivo fueron utilizados a tres concentraciones diferentes(0.10%,0.25%,0.50%)</p> <p>Medio NITROFOSKA</p> <p>Medio ALGAENZIM</p> <p>Medio FUERZA VERDE</p> <p>Temperatura de 25°C-27°C, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad , luz de 4580 lux, medio de cultivo Bristol .</p>	<p>En Medio NITROFOSKA con una producción de astaxantina de 0.21mg/g</p>	<p>(47)</p>
<p>Temperatura óptima entre 28°C-35°C,pH 8, nitrógeno y fósforo fundamental.</p>	<p>Acumulación de 0.7g/L</p>	<p>(18)</p>

<p>Precultivo primero en medio MCM Modificado a 25 ± 1° C. 5 L con cultivos de algas de 3 L fueron iluminados bajo un fotoperiodo de 14L/10D . La luz a una intensidad de 200 µmol/ m² s fue proporcionada desde la parte superior por lámparas fluorescentes rojas, CO₂ se ajustó según el pH (7,5 - 8,5), agitación manual 6 a 7 veces al día para evitar que se pegaran.</p>	<p>Medio CM disminuyó el contenido de astaxantina significativamente durante la incubación 1.2%.</p>	<p>(27)</p>
<p>La temperatura durante la fase verde debe 25-30 °C . La intensidad de la luz por debajo de 150 µmol fotones/ m²s permite la división celular. La irradiación típica es de 40-50 µmol fotones/ m²s y el pH debe mantenerse en 7 .Los ciclos de alternancia de luz y oscuridad son 12:12 o 16:8 . Los medios más utilizados</p> <p>KM1, BBM, Z8, BG- 11, OHM y sus versiones modificadas. BBM y Z8 se utilizan</p> <p>BBM y Z8 se utilizan para cultivos autótrofos, mientras que el medio KM1 es adecuado para cultivos heterótrofos. Una mezcla de medio BBM y una fuente de carbono orgánico, por ejemplo, acetato de sodio, se puede utilizar en un medio mixotrófico.</p>	<p>La microalga <i>H. pluvialis</i> que puede acumular hasta el 5% del peso.</p>	<p>(55)</p>
<p>Temperatura de 50°C .</p>	<p>Rendimiento de extracción es menor 60g/L.</p>	<p>(40)</p>
<p>Luz constante (24 h) de 40 µmol de fotones/ m² s, temperatura de 25°C, y flujo de aire de 1 L/min, medio BBM</p>	<p>0,5-5,0 g/ L de peso seco de biomasa de astaxantina.</p>	<p>(56)</p>
<p>Medio BG-11, pH: 7 – 7.5, 20 y 28 ° C. La irradiación para el cultivo de <i>H. pluvialis</i> oscila entre 40 y 50 µmol de fotones m-2s -1</p>	<p>5% peso seco de biomasa</p>	<p>(50)</p>

Medio bristol a una concentración de 1.25g/L de NaNO ₃ , 25°C iluminación continua	2.5g/L de astaxantina	(49)
Medio BBM al 1% con agua destilada estéril, temperatura constante de 23 °C +/- 1, fotoperiodo con luz blanca fría de 13:11 horas luz-oscuridad a un pH de 6.8.	1.7g/L de astaxantina	(58)
Parámetros: iluminación con lámparas fluorescentes laterales a una intensidad luminosa de 58 μmol quanta/m ² .s) medio de cultivo Zarrouck y Bristol para <i>Arthrospira maxima</i> y <i>H. pluvialis</i> respectivamente, con un fotoperiodo de 14:10 h, temperatura 17 ± 2 °C y a un pH inicial de 9.0 y 7.0 para <i>A. maxima</i> y <i>H. pluvialis</i> respectivamente	0.083 mg/mL de peso seco	(51)
Se cultivó en un fotobiorreactor de 1 L, con iluminación constante (24h) a 40 μM fotón/m ² s, temperatura de 25°C, y flujo de aire de 1 L/min. Una serie de cuatro fotobiorreactores se inocularon con 1 x 10 ⁴ células/mL en fase de hematocisto. Tratamiento 1: Adición de FeSO ₄ hasta una concentración de 0.45 mM de Fe ⁺² . Tratamiento 2: Adición de FeSO ₄ hasta una concentración de 1.35 mM de Fe ⁺² . Tratamiento 3: Adición de FeSO ₄ hasta una concentración de 4.05 mM de Fe ⁺² .	Biomasa de 1.2 g/L de astaxantina.	(52)
Medio BBM modificado enriquecido con NaNO ₃ (0,75 g/l). Las células (fase verde) se cultivaron fotoautótrofamente en 20 L burbujeados con aire, a 25°C, en ciclos de luz:oscuridad (16:8) con lámparas fluorescentes blancas que proporcionaban 80 μmol m ⁻² s ⁻¹	2.0gr/L	(4)
Medio BBM sustituyendo el nitrato como fuente de nitrógeno por amonio, luz continua a 3200 lumen, temperatura de 28°C y agitación de 2000 rpm y concentraciones de 5μL/L, 40 μL/L y 100 μL/L.	Con la concentración de 40 μL/L fue más efectivo con una densidad celular de 6.62x 10 ⁵ Cel./mL de astaxantina.	(39)

Tabla 1. Condiciones de estrés a las que se ha sometido la microalga *H. pluvialis* relacionados con la producción de astaxantina,

En la tabla 1 se puede observar distintas condiciones a las que se ha sometido la microalga *H. pluvialis* para lograr una producción mayor de astaxantina, se encontró que la mayor acumulación del ketocarotenoide de interés fue cuando se usó Medio BBM, Luz constante (24 h) de 40 μmol de fotones/ m² s, temperatura de 25°C, y flujo de aire de 1 L/min obteniendo hasta 5 g/L (56). En los estudios donde se obtuvo un 5% del peso de *H. pluvialis* como astaxantina se utilizaron como condiciones de estrés medios de cultivo como el Bristol, BG-11, KM1, BBM, Z8, BG- 11, OHM, con adición de acetato de sodio, deficiencia de nutrientes, temperatura promedio de 25°C, una alta intensidad de

luz con fotoperiodos de 12:12, y una concentración de CO₂ del 5%(6,7,50,53). Se reporta el uso de fotobiorreactores obteniendo hasta 4,4 g/L de astaxantina (7,9,30,52)

4.MARCO TEÓRICO

4.1.*Haematococcus pluvialis*

El *H. pluvialis* es una microalga que pertenece al grupo de las clorofitas actualmente con gran interés biotecnológico biflagelada unicelular perteneciente a la clase *Chlorophyceae* (18), se caracteriza por su particular producción de grandes cantidades de carotenoides como la astaxantina siendo

de gran importancia para la salud humana debido a sus propiedades ,además de los usos que le puede dar la medicina también es utilizada en la industria alimentaria como colorante puesto que es uno de los principales pigmentos de carotenoides xantofilas (11) , este carotenoide puede ser obtenida de dos formas, en primer lugar la sintética que acarrea consigo un gran costo y la natural que puede tener diferentes orígenes, derivados de algas, crustáceos o krill, y se extraen de muchas maneras diferentes como lo describe (16) y también por el plancton los cuales son ingeridos por diversas especies acuáticas, incluyendo a los crustáceos, entre los que se encuentran los langostinos, que almacenan el pigmento en su cubierta, dando lugar a su color rojizo externo. A su vez, los crustáceos son ingeridos por los peces (como el salmón o la trucha) o por las aves (flamencos, ibis rojo).

H. pluvialis posee un ciclo de vida muy sencillo en el cual va cambiando su tamaño y pigmento, en primer lugar tenemos el estadio de vegetativo donde tiene un pequeño tamaño, cuenta con un color verde y flagelos , en segundo lugar está el estadio de palmella donde aumenta su tamaño y pierde los flagelos preparándose para su última fase que es donde pasa a ser aplanospora done cambia a una pigmentación roja que indica la producción de astaxantina y se forma una matriz extracelular gelatinosa dando resistencia a la microalga. (ver figura 1)

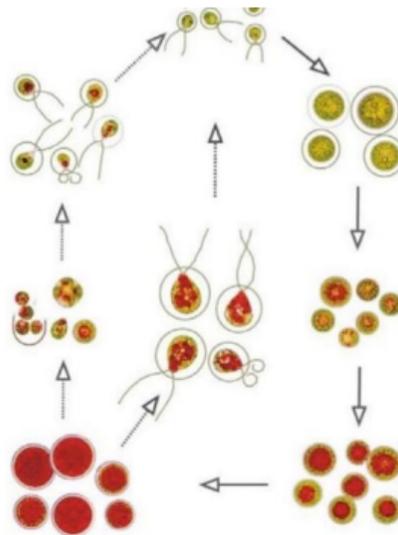


Figura 1. Ciclo celular de *Haematococcus pluvialis*.

(27)

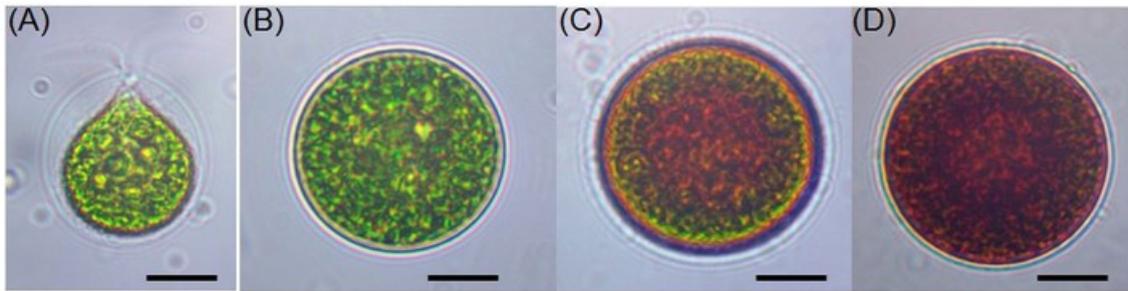


Figura 2. Cambio morfológico de la microalga. (A) Célula móvil vegetativa;(B) Célula vegetativa palmella verde; (C) Célula palmella con acumulación de astaxantina en transición a aplanospora; (D) Célula aplanospora con acumulación de astaxantina (21)

4.2. Condiciones de cultivo de la microalga

Los cultivos de algas están expuestos a una variedad de cambios en las condiciones ambientales como: ciclo luz/oscuridad, variación en luz, temperatura, pH, factores nutricionales (nitrógeno, fósforo, hierro), salinidad, fuentes de carbono. Es importante además tener en cuenta los efectos sinérgicos de la combinación de factores químicos y físicos sobre la composición celular(18).

4.3.pH

La literatura no da un pH específico en el cual se de el crecimiento de *H. pluvialis*, de la misma forma es un factor que se debe tener controlado, debido a que como producto del mantenimiento de pH tendremos la cantidad de segregación de astaxantina por parte de la microalga. Por lo tanto, la literatura enuncia que se debe mantener un pH entre 6.8 que se acerque al punto neutro esto depende de las condiciones que el medio de cultivo requiera.(10)

4.4.Temperatura

La temperatura óptima que describen los autores revisados, es la cual se encuentre entre un rango de 20°C a 25°C señalada como temperatura ambiente debiendo establecerse tras la realización de experimentos en laboratorio y en foto biorreactor, la temperatura óptima de crecimiento, dependiendo de otros factores como el medio de cultivo a utilizar o la luz a la que estará sometido el cultivo (26).

4.5Luz

La intensidad lumínica es uno de los factores más importantes tanto en el crecimiento de la célula como en la acumulación de astaxantina. Diferentes estudios concluyen en que la intensidad de luz óptima está directamente relacionada con la cepa seleccionada (26).

Cada cepa deberá tener la capacidad de adaptación al medio y los factores de crecimiento que se le ofrezcan, debido a que algunas pueden acelerar su ritmo de crecimiento, otras lo pueden mantener estable como hay otras donde su crecimiento se puede ver totalmente inhibido por la intensidad lumínica que se le dé, pudiendo afirmar que la cantidad de astaxantina producida por la microalga puede ser directamente proporcional a la cantidad de luz suministrada. (26)

4.6.Fotoperiodo

Los fotoperiodos es un parámetro que tampoco se ha establecido formalmente muchos autores y dependiendo el objetivo de su estudio varían los fotoperiodos utilizados en la microalga, no obstante, a eso la mayoría de los estudios se realizan utilizando 12 horas de luz/12 horas de oscuridad o 20 horas de luz y 4 de oscuridad. (10;26)

4.7.Nutrientes

Como en toda forma de vida la disponibilidad de nutrientes es necesario para el crecimiento y desarrollo de cualquier individuo y *H. pluvialis* no es la excepción, pero la literatura ha demostrado en algunas ocasiones donde la disponibilidad de nutrientes no es total (10) también se logra una producción de astaxantina por parte de la microalga.

4.8.Nitrógeno y Fosfatos

El nitrógeno y los fosfatos es un factor crucial en el crecimiento de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina los estudios determinan que sin una cantidad considerable (1.0g/L) no es posible el crecimiento de *H. pluvialis* en el medio. (28)

4.9.Nitrógeno

El nitrógeno se encuentra generalmente alrededor del 7 – 10% de la célula por peso seco, es un constituyente esencial de todas las proteínas funcional y estructuralmente en las células del alga. En general, la microalga tiene una limitada habilidad para producir materiales almacenados de nitrógeno cuando crece bajo condiciones suficientes de nitrógeno. Cuando la microalga esta creciendo bajo condiciones limitadas de nitrógeno, el efecto más golpeado es la degradación específica y activa de ficobilisomas(45).

4.10.Fósforo

El fósforo es otro macronutriente que juega un importante rol en el proceso metabólico celular por la formación de algunos componentes estructurales y funcionales requeridos para el crecimiento normal y desarrollo de la microalga(45). Los ortofosfatos son incorporados como componentes orgánicos a través de la fosforilación. El fosfato inorgánico se presenta en las células en forma de polifosfatos, acumulándose en gránulos. Estos gránulos de polifosfato

a menudo aparecen en crecimiento celular normal bajo suficiente fosfato, pero desaparece en deficiencia de fosfato.

4.11. Hierro

El hierro juega un rol importante en la composición bioquímica celular por sus propiedades redox y su implicación en procesos fundamentales como la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno y síntesis de ADN. La deficiencia de hierro puede inducir varios cambios bioquímicos.

4.12. Dióxido de carbono (CO₂)

Utilizando el CO₂ como fuente de carbono se ha encontrado en la bibliografía que con concentraciones del 0,5% al 1% en volumen en el aire se optimiza el crecimiento de *H. pluvialis* (26).

4.13. Salinidad

La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. La tolerancia a la sal varía según las especies, algunas sólo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas. Lo que supone un estrés salino letal para un grupo es fácilmente tolerado por otro grupo. Respecto a la adaptación a la salinidad, las algas pueden dividirse en halotolerantes y halofílicas (1). Algunas microalgas son capaces de acumular moléculas pequeñas de sustancias osmoreguladoras (osmotocantes) en respuesta aun incremento en la salinidad o presión osmótica del ambiente. Cantidades de osmotocantes encontrados en microalgas son polioles. Los más comunes polioles son: glicerol, manitol, galactitol, sorbitol, sucrosa, tehalosa y glicerol galactosidasa (18).

4.14- Cultivo Fotoautotrófico

La eficiencia de la incorporación de una fuente de carbono inorgánico y orgánico para los cambios de biomasa durante el crecimiento fotosintético, dependen de: especie del alga, intensidad de la luz, fuente de energía y carbono (orgánico o inorgánico) y fase de crecimiento (ver tabla No 2).

TABLA NO 2. FUENTES DE ENERGÍA Y CARBONO EN DIFERENTES METABOLISMOS ENCONTRADOS EN MICROALGAS

Metabolismos	Fuente de energía	Fuente de carbono
Foto autótrofo	Luz	Inorgánico

Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Foto heterótrofo	Luz	Orgánico
Mixotrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y Orgánico

Tabla 2. Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas.

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

Metabolismo	Ecuación estequiométrica
Foto autótrofo	$H_2O + HCO_3^- \xrightarrow{hv} C(\text{biomass}) + 1/2O_2 + 3OH^- \Rightarrow \text{pH incrementa}$
Heterótrofo	$(1 + a) CH_2O + O_2 \rightarrow C(\text{biomass}) + aCO_2 + (1+a) H_2O \Rightarrow \text{pH decrece}$
Mixotrófico	$bHCO_3^- + cCH_2O \xrightarrow{hv} (b + (c-a))C(\text{biomass}) + 3OH^- + aCO_2 \Rightarrow \text{pH changes not significant}$

Tabla 3. Ecuaciones estequiométricas según el metabolismo de las microalgas.

El cultivo fotoautótrofo utiliza la luz como única fuente de energía, la cual se convierte en energía química en las reacciones fotosintéticas. Los factores limitantes de crecimiento estudiados son luz y CO₂.

En un cultivo fotoautótrofo la luz puede ser considerada como un sustrato físico, la influencia de la intensidad de la luz sobre la tasa de crecimiento es descrita con las ecuaciones de Monod (si no se observa fotoinhibición):

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

Ó Haldane (cuando ocurre fotoinhibición):

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

A bajos valores de I_0 (luz incidente) la ecuación de Monod, es una ecuación de primer orden donde la tasa específica de crecimiento esta relacionada linealmente a la limitación de la intensidad de luz incidente, después de que $\mu < \mu_m$, como se expresa en la siguiente ecuación (3):

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

4.15. Métodos de cultivo de *H. pluvialis*

Los métodos de cultivo de las micro algas se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas abiertos y sistemas cerrados.

- **Sistemas abiertos:** tienen una constante comunicación con la atmosfera pueden utilizar aguas de estanques, lagos y lagunas o estanques artificiales. Este tipo de producción es la más rentable ya que no necesita de grandes inversiones ni mucho mantenimiento, a pesar de que presenta una menor productividad y eficiencia es más susceptible a contaminaciones por otras algas o bacterias indeseadas, y a las condiciones ambientales, ya que no se puede controlar ni la temperatura del agua, ni el CO₂, ni la luz que reciben los cultivos. Por ello, estos sistemas son utilizados para aquellas especies de microalgas que puedan crecer bajo condiciones menos específicas que otras. (54 no cambiar).
- **Sistemas cerrados o fotobiorreactores:** las condiciones e crecimiento se encuentran más controladas por los humanos que permite una producción garantizada de la microalga de interés a. Estos sistemas presentan una mayor productividad y eficiencia que los sistemas abiertos, ya que permiten mantener las condiciones necesarias para el crecimiento de los cultivos. Además, dificultan la proliferación de otros organismos no deseables, sin embargo, también implican un mayor costo. (54)

A pesar de que el proceso de cultivo se considera complejo debido a las condiciones que se deben mantener, el proceso es de un más complejidad y es dependiente del método utilizado , las condiciones y el método de control, entre los cuales encontramos :

- **Centrifugación:** No es el método utilizado para la recolección a gran escala, pero es el más rápido y económico luego de tener el equipo.
- **Sedimentación:** Es el método más eficiente en relación con su efectividad y costo de realización. Posee la ventaja de servir para diferentes tipos de microalgas.
- **Filtración:** Se considera eficiente en la separación de células grandes, como *Spirulina*, pero no en las especies de menor tamaño como *Chlorella*.

- Flotación: Es un método innovador en la recolección de algas unicelulares pequeñas y ensayos de laboratorio. La técnica consiste en la incorporación de gases, como el ozono o el aire, que interactúan con la carga de las paredes celulares permitiendo la flotación de las microalgas y su 21 separación. Económicamente el precio se ve incrementado por la utilización de ozono. (54 no cambiar)

4.16.Astaxantina

La astaxantina es un ketocarotenoide altamente utilizado en la biotecnología por los beneficios que ha tenido en la salud humana por su efecto antioxidante debido a que los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir las reacciones químicas de transferencia de electrones ,este tipo de reacciones de oxidación son los causantes del daño celular ya que se producen radicales libres (19) ,se distingue por tener una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados, responsables del intenso color rojo brillante del cromóforo (10).(ver figura 3)

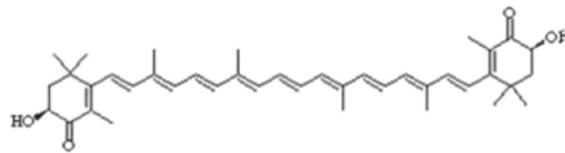


Figura 3. Estructura molecular de la Astaxantina.

(10)

4.17.Ruta de Biosíntesis de Astaxantina

Cuando la célula se encuentra en su estadio vegetativo está compuesta principalmente por luteína (75-80%) y E-caroteno (10-20%) (10). Posteriormente a que la microalga es estresada y se encuentra en su estadio de aplanospora la composición será únicamente de astaxantina, el β - 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 β -caroteno cetolasa (4,4'- oxigenasa; CRTW, BKT o CRTO) y β caroteno hidroxilasa (3,3'- oxigenasa; BCH o CRTZ), respectivamente. La presencia de echinenona y astaxantina 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 β -caroteno cetolasa (BKT) con el intermediario mono ketocarotenoide (echinenona), mientras que la formación de grupos hidroxílicos está catalizada por una hidrolasa para formar la astaxantina (10). (ver figura 4)

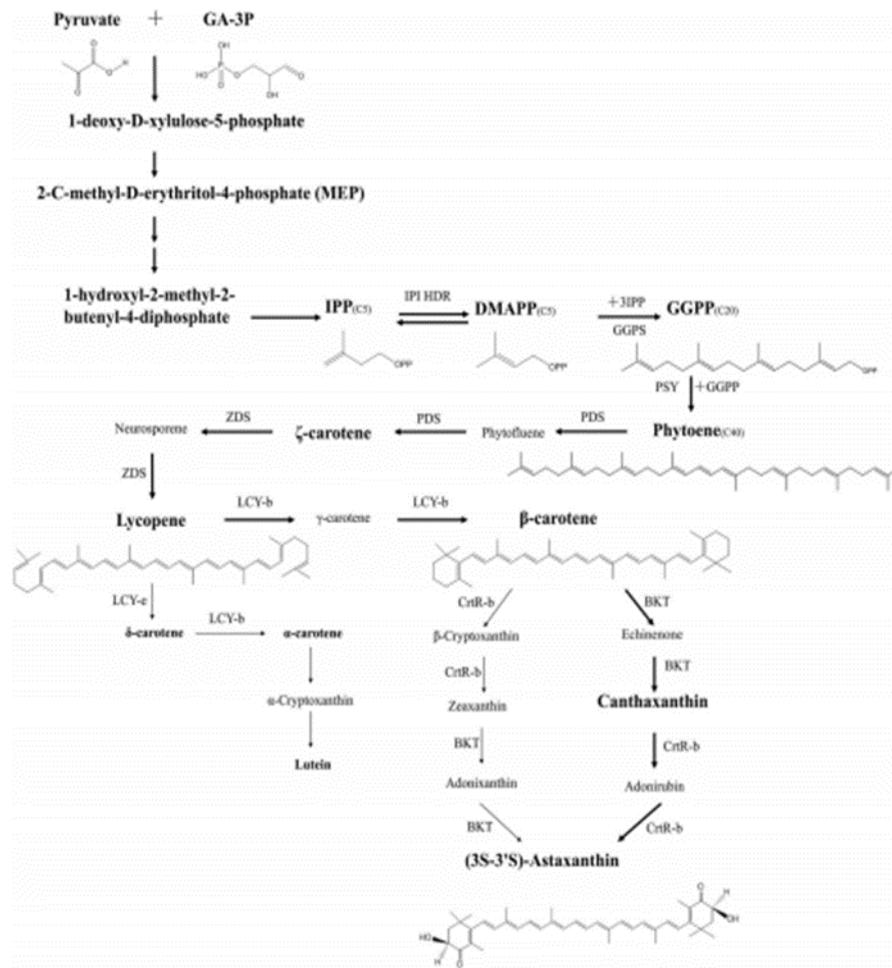


Figura 4. Vía de la biosíntesis de (3S-3'S)-astaxantina en *H. pluvialis*.

(21)

4.18. Usos

Sector	Aplicación	Función	Fuente
Acuicultura	Salmón y Trucha	Pigmentación Etapas del crecimiento	(Dominguez <i>et al.</i> , 2005; Lawlor & O'Brien, 1995; Lorenz & Cysewski, 2000)
	Peces Marinos- Besugo	Pigmentación	
	Peces ornamentales	Pigmentación	
	Cultivos de camarón	Pigmentación	
Ornitología	Gallinas	Color yema de los huevos	(Inbarr, 1998)
	Pollos	Pigmentación	
Farmacéutica	Radicales libres	Antioxidante	(Barros <i>et al.</i> , 2001; Guerin <i>et al.</i> , 2003; Kamath <i>et al.</i> , 2008; Mortensen <i>et al.</i> , 1997; Naguib, 2000; Pashkow <i>et al.</i> , 2008)
	Peroxidación	Antioxidante	
	Salud humana	Anti-cancerígeno	
	Piel, ADN y retinas	Foto-protector	

(10)

Tabla 4. Principales usos de la Astaxantina.

Como lo describe la tabla anterior la astaxantina tiene diversas aplicaciones como: la acuicultura, la ornitología y la farmacéutica, sin embargo, actualmente es de gran interés biotecnológico debido a se ha encontrado múltiples beneficios para la salud humana.

4.19. Clorofila

La clorofila a es el pigmento fotosintético primario en todas las microalgas (incluidas cianobacterias)(1). Existen tres tipos de clorofila b, c y d , pero en el caso de las microalgas se forma un complejo natural proteína-clorofila , la síntesis de dicha clorofila depende netamente de la capacidad fotosintética de cada planta o microorganismos junto con la obtención de más nutrientes que le ayudan en su proceso fotosintético, en el caso de las microalgas interviene la disponibilidad de nutrientes como: eficiencias en hierro, nitrógeno y magnesio inhiben la síntesis y acumulación de clorofila. La abundancia de carbono orgánico en el medio y la alta intensidad luminosa también inhiben la formación de clorofilas en algunas microalgas (1). Ver figura 7

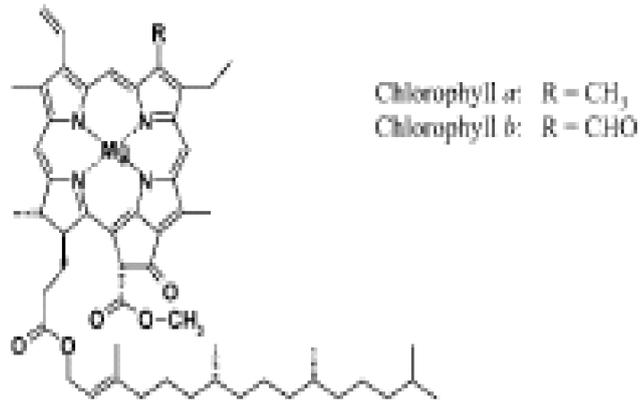


Figura 5. Estructura química de la clorofila
(6)

Todas las clorofilas tienen su mayor banda de absorción: azul o verde-azul (450-475 nm) y rojo (630-675 nm). La clorofila *a* está presente en todos los fotoautótrofos oxigénicos como parte del núcleo y centro de reacción de los complejos proteína-pigmento, y en los complejos antena está acompañada por la clorofila *b* o clorofila *c*. Los así llamados pigmentos accesorios (antena) clorofila *b*, *c* y *d* extienden el rango de absorción de la luz (18).

Métodos para determinar biomasa: Los métodos utilizados para determinar la biomasa de los microorganismos se encuentran a continuación:

Conteo celular cámara Neubauer: se utiliza para el conteo de células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo (9). Este recuento se realiza en el microscopio, se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas en las cuales se encuentra una cuadrícula para poder contar las células, estas cámaras funcionan por capilaridad y se cubren con una lámina de cuarzo para que sea visible ante el microscopio.

Peso seco: se realiza posterior a la extracción del exceso de líquido de la muestra a analizar pesando la muestra antes y después de la deshidratación, el tiempo de deshidratación puede variar según la muestra que puede ir desde 24 horas hasta 8 días (1).

Epifluorescencia: utilizada para investigaciones y medicina, se utilizan para la observación de partes de las células con ayuda de fluorocromos (23).

4.20. Métodos para determinar astaxantina y clorofila

Espectrofotométrico: se conoce la sustancia problema por medio la cantidad de luz que absorbe la sustancia cuando pasa por un haz de luz arrojando una absorbancia con la que posteriormente se realizarán cálculos para dar solución a la muestra problema. (9)

Determinación de la producción de clorofila

Se determinará la concentración del pigmento por la clorofila a se determina usando el procedimiento de la APHA, 1992. Se toman 5mL de muestra, se centrifuga y se lava a 12,000 r.p.m. durante 5 min Posteriormente al paquete celular se le agrega 5 mL de metanol al 90% y se calienta durante 10 min a 60°C. Se centrifuga y se lee la absorbancia a 665 nm y 750 nm en un espectrofotómetro.

Cálculo de la concentración de clorofila

Clorofila a (mg/L) = 13.9 (DO 665 - DO 750) U/V

Donde: U = volumen del metanol

V = volumen de la muestra

HPLC: conocida como Cromatografía de Alta Eficiencia, se trata de el paso de una muestra por un disolvente que es más conocido como fase móvil y esta fase móvil posteriormente se pasa por una columna que contiene la fase estacionaria, la separación de los compuestos ocurre por la interacción de la muestra entre las dos fases de la columna (29).

y HPLC.

Los extractos se obtienen usando metanol por 20 min. Los extractos se dividen para 10% (vol/vol) éter de petróleo, y se determina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando clorofila comercial como estándar, en una columna de 25-cm C18 Vydac 218TP54 con metanol como fase móvil a 20°C y detector UV. Los picos se integrarán a 645 nm para detectar clorofila.. Los valores de clorofila son expresados con desviaciones estándar para cuatro determinaciones independientes.

El pico de identificación y el valor λ_{max} de este componente se confirma por su tiempo de retención(20 – 30 min) y se cuantifica tomando el área de su pico en relación al respectivo estándar de referencia.

Estándar de referencia (control): clorofila comercial

Manejo de las fracciones en la oscuridad. (33)

4.21.Determinación de la producción de astaxantina

Por (1) técnica colorimétrica y (2) HPLC (Método de Briton,1985 modificado) :

Tomar un mL de muestra (medio de cultivo con células), someter a rompimiento celular empleando un homogenizador vortex y perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diámetro durante 3 min en presencia de una mezcla de solventes (hexano: acetona: alcohol etílico en una relación de 42%:29%:29%).

Posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 5 min., queda en la epifase el hexano con la astaxantina disuelta, la cual se recupera con una pipeta Pasteur. Esta operación se repite hasta obtener un precipitado de color blanco. El

volumen total del extracto se mide y lee en un espectrofotómetro a 474 nm y se cuantifica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando astaxantina comercial, como estándar. Para cuantificar por HPLC se utiliza un cromatógrafo (LDC Analytical) con detector de UV de longitud variable y una columna C18 fase inversa de 25 cm de longitud y 3.4 mm de diámetro interno.

La fase móvil es metanol:agua:hexano (95%/4%/1%) y un flujo de 0.5 ml/min. Una vez obtenido el extracto, se evapora la muestra con nitrógeno, se afora a 10 ml con metanol y se inyectara 20µL de muestra en el cromatógrafo.

Cálculo de la concentración de astaxantina:

$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/g}) = (\text{D.O}) (\text{V}) (100) / 0.16 (\text{W})$$

donde:

W = peso seco de la muestra

V = ml de hexano con el pigmento (extracto)

100 = factor de corrección

Estándar de referencia: astaxantina comercial

Manejo de las fracciones en la oscuridad.

El pico de identificación y el valor λ máx. de este componente se confirma por su tiempo de retención (21 min) y se cuantifica tomando el área de su pico en relación al respectivo estándar de referencia (18).

5.DISEÑO METODOLÓGICO

5.1.Tipo de estudio: descriptivo

5.2. Metodología

Se realizó una revisión de los trabajos realizados por el grupo Bioprocesos y control entre el periodo 2015 al 2020, donde la microalga *H. pluvialis* UTEX2505 se sometió a diferentes condiciones de cultivo y de estrés. Criterios de inclusión: trabajos realizados en biorreactores con tamaño menores de 500 mL, aplicando dos o más condiciones de estrés.

Los trabajos del grupo Bioprocesos y control se compararon con los artículos originales encontrados en inglés y español publicados en las bases de datos de NCBI, MEDLINE/PubMed, SciELO, SeDICI y UNLP de 2015 a 2020, de estudios sobre condiciones de cultivo y de estrés aplicados para la producción de astaxantina en *H. pluvialis*.

Los criterios de inclusión fueron: *Haematococcus pluvialis*, producción de astaxantina y condiciones de cultivo y condiciones de estrés. Se realizó la búsqueda con las palabras clave: “*Haematococcus pluvialis*”, “astaxantina”, “producción de astaxantina”, “condiciones de cultivo”, “condiciones de estrés”, “astaxanthin”, “astaxanthin production”, “estres condition”, “culture condition”.

Variables a analizar:

Crecimiento celular

Se evaluó el crecimiento celular de los diferentes estudios, bajo diferentes condiciones de cultivo, para seleccionar la que produjo la mayor biomasa expresada en células/mL, evaluando los efectos de los componentes nutritivos, especialmente las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono, y la intensidad de la iluminación y colores de luz durante la etapa verde.

Producción de clorofila y astaxantina

Se correlacionó la producción de pigmentos con las condiciones de estrés trabajadas: la concentración de clorofila (clorofila a) y la concentración de astaxantina. Se evaluaron los efectos de los componentes nutritivos, especialmente las fuentes de nitrógeno y carbono, fosfatos y la intensidad de la iluminación y colores de luz durante la etapa verde. Se evaluara también las de la estrategia de deficiencia de nitrógeno, fosfato, y de otros factores exógenos que comprenden salinidad, la iluminación, y la temperatura, que se consideran para la producción de la astaxantina durante la etapa roja.

Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmentos

Se revisó el ajuste al modelo logístico, modelo Baranyi y Roberts con los cuales se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmento.

Se determinó la productividad (P, g.L./d) utilizando la ecuación, donde X (células/mL) representa la concentración celular final, X₀ (células /mL) representa la concentración de inicial cultivo de biomasa, t (d) representa el tiempo final y t₀ representa el tiempo inicial de cultivo:

$$P = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)}$$

Se compara la máxima velocidad de crecimiento (rata de crecimiento) ($\mu_{\text{máx.}}$) reportadas en los trabajos revisados, la cual se obtiene por regresión exponencial en la fase exponencial (fase log), donde se multiplican las células y el tiempo de generación se obtiene de la siguiente ecuación. (56)

:

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}}$$

Cambios morfológicos celulares

Se realizó la comparación en los trabajos revisados de la caracterización morfológica macroscópica y microscópica, que se relacionó con las condiciones de trabajo, analizando la morfología observada (formas vegetativas, biflageladas, palmella, enquistada, aplanospora, con un ejemplo de cada morfología), tiempo de duración del estudio, el tiempo en que en cada uno empieza el enquistamiento y el tiempo en que se ven aplanosporas.

5.1 Diseño experimental y análisis de datos

Se realizó un análisis multicriterio de los resultados obtenidos de los trabajos desarrollados desde el 2015 al 2020 sobre la producción de astaxantina utilizando diferentes condiciones de estrés. Se tuvieron en cuenta los parámetros cinéticos de crecimiento como la biomasa (células/mL), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), tiempo de duplicación (td), concentración de clorofila ($\mu\text{g/L}$), producción del pigmento astaxantina ($\mu\text{g/L}$) y la productividad de astaxantina ($\mu\text{g/cel. mL}$).

El análisis multicriterio incluyó las condiciones utilizadas : inoculo, pH, temperatura, CO₂, aireación, luz, ciclos luz/oscuridad, agitación, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de fosfatos y estrés salino con acetato de sodio y cloruro de sodio y su influencia en el crecimiento celular, en el cambio morfológico y en la producción de astaxantina.

Los datos fueron analizados usando Excel 2016 con diferentes variables a analizar, incluyendo año de publicación e idioma (Figura 7) y temas del estudio. Se utilizó estadística descriptiva para analizar los resultados.

6.RESULTADOS

En la búsqueda electrónica se encontraron 91 documentos entre los que están trabajos de grado, libros y artículos científicos y de revisión sobre *H. pluvialis*. Al aplicar los criterios de inclusión y el rango de fecha de publicación de 2015 a 2020, quedaron 58 artículos, de los cuales se analizó el resumen de cada uno y se eliminaron que no cumplieron con los criterios de inclusión, por lo que quedaron 18 artículos para el análisis y evaluación en esta revisión.

Se analizaron las condiciones de estrés que tuvieron un efecto en la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Estos estudios se realizaron en Colombia, Chile, China, Corea, Bélgica, India, Estados Unidos, España.

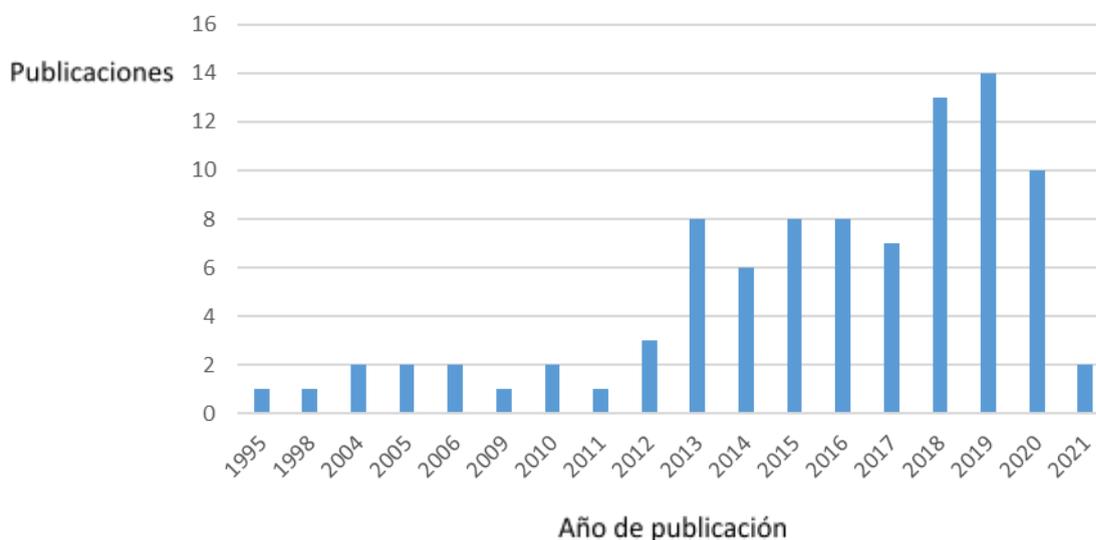


Figura 6. Relación de publicaciones revisadas por año de publicación

El 67% de las publicaciones revisadas se encuentran entre el periodo de tiempo comprendido entre el año 2015 al año 2020. Las publicaciones revisadas incluyen 78 artículos, 12 trabajos de grado y 1 libro (Figura 6).

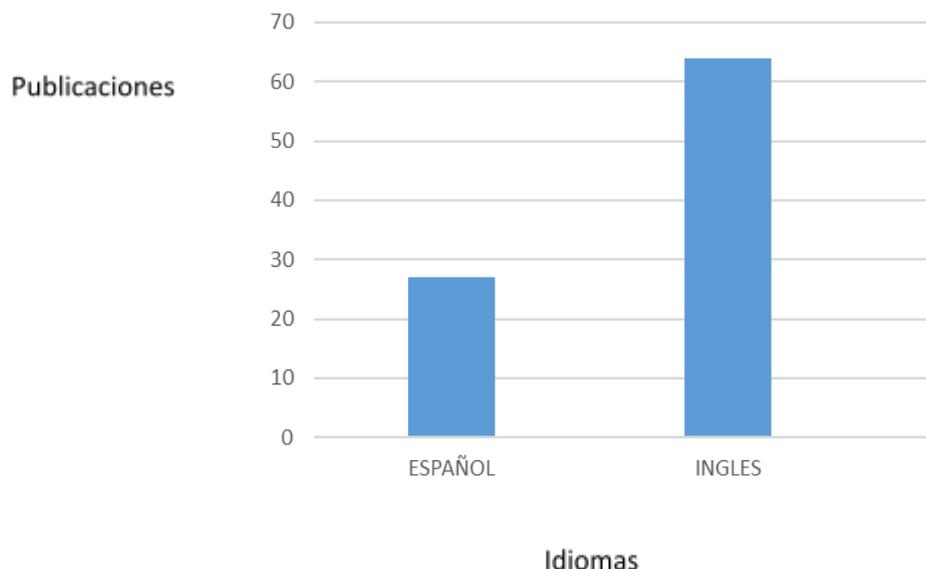


Figura 7. Idioma de las publicaciones revisadas

La Astaxantina es un ketocarotenioide de gran interés biotecnológico por sus múltiples usos como colorante y compuesto bioactivo. Con base en la revisión bibliografía realizada se puede evidenciar los cambios macroscópicos y microscópicos de los cultivos de *H. pluvialis*, la evaluación de la eficacia de los distintos medios de cultivo utilizados para el cultivo de la microalga y las condiciones de estrés que se han estudiado en la revisión bibliográfica realizada y en la investigación realizada por el grupo de bioprocesos y control de Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en 7 trabajos realizados, para lograr la mayor productividad de Astaxantina.

6.1. Crecimiento celular

De los artículos y trabajos revisados para la realización de este trabajo se destacan algunas condiciones que favorecen el crecimiento de la microalga y a su vez la obtención de Astaxantina, como se evidencia a continuación:

GRUPO DE BIOPROCESOS Y CONTROL 2015-2020			
Trabajo	Condiciones de cultivo	Resultados	Bibliografía
1.Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i>	Medios de cultivo (BBM, OHM, RM) en Biorreactores de 500mL, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO ₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 μE/m ² s	Medio RM con 7,5 x 10 ⁵ cel./mL en el día 36, velocidad de crecimiento 0,092 Células/día (0,97%). 36 días de cultivo	(31)

<p>2.Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i></p>	<p>medio RM con nitrógeno al 4.0% y 5.0%, utilizando las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO2 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$</p>	<p>Medio RM con concentración de nitrógeno al 4.0% fue $1,76 \times 10^6$ cel./mL y para el tratamiento con concentración con nitrógeno al 5.0% fue $2,50 \times 10^6$ cel./mL, Velocidad de crecimiento para el tratamiento con concentración de nitrógeno al 4.0% fue 0,0029 cel./día y para el tratamiento con concentración de nitrógeno al 5.0% fue 0,0028 cel./día.</p> <p>21 días de cultivo</p>	<p>(39)</p>
<p>3.Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en <i>H. pluvialis</i> usando medio BBM</p>	<p>Medio Basal Bold (BBM) con deficiencia de Nitrógeno, en una concentración de 4% y 5%, fotoperiodo 20/4 luz/oscuridad con lámparas fluorescentes blancas, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos.</p>	<p>Método 1: BBM que presenta 5% de deficiencia de nitrógeno, el mayor crecimiento de la población celular es de $1,05 \times 10^6$ cel./mL en el día 18, con un recuento final de $8,6 \times 10^5$ cel./mL. El tratamiento donde se usa BBM con deficiencia de nitrógeno al 4% alcanza su máximo crecimiento el día 21 con $1,12 \times 10^6$ cel./mL. Método 2: con BBM que presentan deficiencia del 4% de nitrógeno y deficiencia del 5% de nitrógeno, se presenta su máximo crecimiento en el día 24 con $7,5 \times 10^5$ cel./mL. Tiempo de cultivo 24 días</p>	<p>(40)</p>

<p>4.Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradiancia y color de luz para la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>.</p>	<p>Medios RM y BBM, suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con CO_2 al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.</p>	<p>La biomasa a los 30 días fue de $2,49 \times 10^5$ cel./mL y 1.55×10^5 cel./mL en medio BBM y RM respectivamente</p> <p>Tiempo de estudio 30 días</p>	<p>(68)</p>
<p>5.Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio.</p>	<p>Medio RM bajo un pH de 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de acetato de sodio.</p>	<p>El tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L + cloruro de sodio 1,28 g/L presentó el mayor crecimiento celular de $1,64 \times 10^5$ células/mL</p> <p>Tiempo del estudio 56 días</p>	<p>(55)</p>
<p>6.Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz.</p>	<p>Medio RM (RM1) y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L (RM2), 30 mg/L(RM3) y 40 mg/L (RM4), además de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno (RM5). Condiciones: pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Agitación diaria 10 segundos.</p>	<p>El tratamiento con mayor crecimiento fue el RM3: 40 mg/L de fosfatos con $9,69 \times 10^5$ cel./mL</p> <p>Tiempo del estudio 62 días</p>	<p>(82)</p>
<p>ARTÍCULOS REVISADOS</p>			

<p>Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de <i>H. pluvialis</i> flotow y ausencia de nitrógeno.</p>	<p>Campo magnético de 0.03T sobre el crecimiento, la viabilidad celular y la acumulación de pigmentos en <i>H. pluvialis</i></p>	<p>Densidades celulares máximas a los 16 días de cultivo ($123.0 \pm 2.83 \times 10^4$ cel./mL), valores que no difieren significativamente de los controles, desarrollados sin exposición al campo magnético ($125.5 \pm 3.54 \times 10^4$ cel./mL)</p>	<p>(4)</p>
<p>Optimización del crecimiento y producción de carotenoide astaxantina por la microalga <i>H. pluvialis</i> en diferentes condiciones de cultivo.</p>	<p>Medio selectivo Basal Bold 3N (MBB), tres temperaturas (21, 23 y 25 °C) y cuatro intensidades de luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en 100 mL de cultivo.</p>	<p>El mayor número de células se obtuvo con 21°C y 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$: 3, 20 x10⁵ cel./ mL</p>	<p>(32)</p>
<p>Efectos de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i></p>	<p>Medio de cultivo BBM, en condiciones de baja intensidad de luz (70 μmol fotón.$\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, concentración doble y triple de nitrato de sodio.</p>	<p>100mg</p>	<p>(38)</p>
<p>Producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i> y evaluación de posibles aplicaciones.</p>	<p>El medio de cultivo empleado del medio BBM, se cultivo en seis matraces Erlenmeyers, en cámara de cultivo bajo 70 μmol de fotones/$\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente (entre 24-28 ° C), sin agitación, aireación y control de pH.</p>	<p>Velocidad de crecimiento rx adquiriendo valores de 1,5 mg X/L.h para el cultivo iluminado de manera continua y 0,805 mg X/L.h para el cultivo iluminado mediante ciclos L-O.</p>	<p>(46)</p>

Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo	. El medio utilizado fue el MBB 3N, fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas, diferentes temperaturas (21, 23 y 25 °C) e intensidades de 11 luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).	tratamientos a 21°C junto con con 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con biomasa de $2,143 \times 10^5$ Cél/mL	(51)
Sobreacumulación de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> mediante ingeniería genética de cloroplastos	Los cultivos se incubaron a $22-25 \pm 2$ °C con aireación continua y luz (30 μmol de fotones $\times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$),	$6,88 \times 10^5$ células/mL	(54)
Cultivo de <i>H. pluvialis</i> y el efecto de la captación de amoníaco usando un extracto de <i>Yucca shidigera</i> .	Como medio de cultivo se utilizó el medio basal Bold sustituyendo el nitrato como fuente de nitrógeno por amonio a 3 mM, luz continua, temperatura de 28°C y una agitación de 2000 rpm.	Con amonio usando 40 $\mu\text{L/L}$ se obtuvo una densidad celular de 6.62×10^5 cel/ml.	(63)
Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i> UTEX 2505	Medio BBM, temperatura 25 ± 5 °C, fotoperiodo 12:12, intensidad de luz 52 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y burbujeo de aire enriquecido con 3% de CO_2	Concentración celular de 0.85- 1.0 g/L.	(66)

Tabla 5. Crecimiento celular de *H. pluvialis* bajo diferentes condiciones de cultivo.

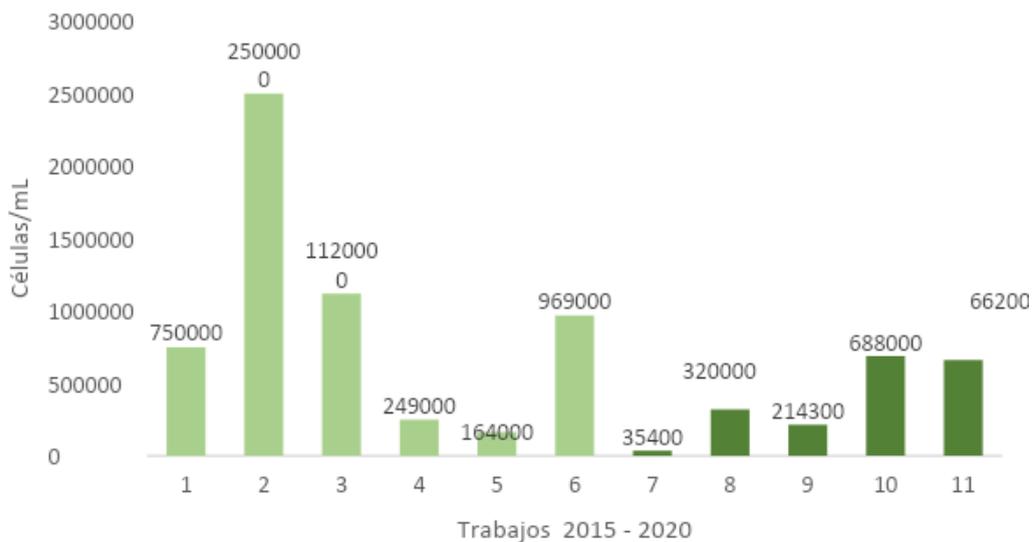


Figura 8. Crecimiento celular de *H. pluvialis*. Revisión 2015-2020. Trabajos GBYC: 1,2,3,4,5 y 6

En la tabla 5 y figura 8 se observa que el estudio que presentó la mayor producción de biomasa en menor tiempo en células/mL fue en el que se utilizó medio: RM que presenta 5% de deficiencia de nitrógeno con un recuento final de $2,5 \times 10^6$ cel./ml a los 21 días de cultivo, bajo las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO₂ 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (TIt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de 140 $\mu\text{Em}^2\text{s}$ (39), Seguido por el estudio donde se usó medio BBM con deficiencia de nitrógeno al 4%, con un valor de $1,12 \times 10^6$ cel./mL en el día 21, ciclo luz:oscuridad 20h/4h con lámparas fluorescentes blancas TIt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos (40).

En los artículos publicados se puede observar que las condiciones que favorecieron la producción de astaxantina fueron la incubación a $22-25 \pm 2$ °C con aireación continua y luz ($30 \mu\text{mol}$ de fotones $\times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$)(54), que arroja un crecimiento celular de $6,88 \times 10^5$ células/mL siendo, la publicación que arroja números más altos de crecimiento celular, seguido de condiciones de cultivo como medio de cultivo se utilizó el medio BBM sustituyendo el nitrato como fuente de nitrógeno por amonio a 3 mM, luz continua, temperatura de 28°C y una agitación de 2000 rpm(63), con una densidad celular de 6.62×10^5 cel/ml

6.2. Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmentos

A continuación se presenta un resumen de los parámetros cinéticos determinados para los trabajos revisados reportándose, el modelo matemático

realizado, la velocidad de crecimiento, el tiempo de duplicación y el coeficiente de correlación que nos indica como los diferentes tratamientos utilizados se ajustan al modelo matemático aplicado según la determinación del coeficiente de correlación con un valor cercano a 1.

Modelo	Medio de cultivo	N° de Datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de Crecimiento (μ máx.)	Coeficiente de Determinación (R^2)	Tiempo de duplicación (td)	Bibliografía
Logístico	RM	13	4	5,878	0,092	0,97	7,53	(31)
	OHM	13	4	5,535	0,062	0,99	11,18	
	BBM	13	4	5,588	0,056	0,97	12,38	
Logístico	RM	5	4	4,509	0.0329	0,99	21,06	(68)
	BBM	5	4	4,580	0.0326	0,98	21,26	
Logístico	RM1	10	4	6,222	0,041	0,73	16,90	(68)
	RM2	10	4	5,975	0,317	0,62	2,19	
	RM3	10	4	5,986	0,292	0,48	2,37	
	RM4	10	4	5,853	0,009	0,35	7,7	
	RM5	10	4	6,368	0,285	0,73	2,43	
Baranyi-Roberts	RM2	11	4.0	5.97	0.315	0.90	2,2	
Baranyi-Roberts	RM	10	4	6,684	0,292	0,87	2,37	(39)
	RM N 4%	13	4	6,571	0,240	0,93	2,89	
	RM N 5%	13	4	6,559	0,248	0,90	2,79	
ARTÍCULOS REVISADOS								
No reporta	BBM cultivo iluminado de manera continua				1,5 mg X/L.h.		2,16	(46)
No reporta	BBM cultivo iluminado mediante				0,805 mg X/L.h		1,16	(46)

	ciclos L-O							
--	---------------	--	--	--	--	--	--	--

RM2: 20 mg/L de fosfatos, RM3: 30 mg/L de fosfatos, RM4: 40 mg/L de fosfatos, RM5: 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno. RMN4%: deficiencia de 4% de nitrógeno, RMN5%: deficiencia de nitrógeno al 5%

Tabla 6. Parámetros cinéticos del cultivo de *H. pluvialis* bajo diferentes condiciones.

En la tabla 6 podemos observar que los parámetros cinéticos determinados para los trabajos revisados se obtuvieron al aplicar los modelos matemáticos logístico y Baranyi-Roberts, observando que el modelo que más se ajusta para explicar el crecimiento de la microlaguna bajo las condiciones de cultivo es el modelo logístico, porque el coeficiente de correlación (R^2) obtenido en los trabajos donde aplicó, se aproxima más a 1, usando los medios de cultivo RM y BBM con valores de 0,99 usando medio OHM (31) y RM (68). Los valores de tiempo de duplicación más bajos con valores de 2, 19 días (modelo logístico) y 2,2 días (Modelo Baranyi-Roberts), se presentaron para el estudio donde se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos(82). Los tiempos de duplicación más altos se reportaron para el trabajo realizado bajo las condiciones donde se usan los medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de $150 \mu E m^{-2} s^{-1}$, con CO_2 al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ C \pm 2^\circ C$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.de las células, con valores de 21,06 días para medio RM y 21.26 días para medio BBM

La velocidad de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x.}$), según el modelo logístico es 0,092 por día para el tratamiento donde se usó medio RM con las condiciones de cultivo: pH 6.7 a 7.0, CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia $70 \mu E/m^2s$ (31). Cuando se utilizó fosfatos en diferentes concentraciones, se incrementó la velocidad de crecimiento observándose que el tratamiento con mayor valor en este parámetro es en el que se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos (RM2) bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos(82), con un valor de 0,317 células/día (R^2 : 0,62).según modelo logístico y de 0,315 cél./día (R^2 :0,90), según modelo Baranyi-Roberts.

6.3. Concentración de clorofila y astaxantina.

La deficiencia de nitrógeno es una condición de estrés que favorece una mayor producción de astaxantina. Se han usado otras condiciones que también contribuyen a la acumulación de este ketocarotenoide en los trabajos realizados, lo cual se reporta a continuación:

Trabajo	Condiciones de estrés y de cultivo	Concentración de clorofila	Concentración de astaxantina	Productividad de astaxantina (Xp/Xx)	Bibliografía
1. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i>	Medios de cultivo (BBM, OHM, RM) en Biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1×10^4 cel/ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$		Medio RM con una concentración de 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$1,10 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel.mL}$	(31)
2. Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	medio RM con nitrógeno al 4.0% y 5.0%, utilizando las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO2 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$		La producción de astaxantina fue de $3,52 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ con una concentración de nitrógeno al 4.0% y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, correlacionado con expresión de genes <i>psy</i> , <i>pds</i> , <i>lcy</i> , <i>bkt</i> y <i>chy</i> ,	$3,52 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$	(39)

<p>3. Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en <i>H. pluvialis</i> usando medio BBM</p>	<p>Medio Basal Bold (BBM) con deficiencia de Nitrógeno, en una concentración de 4% y 5%, fotoperiodo 20/4 luz/oscuridad con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos.</p>	<p>Clorofila inicial de 3,247 ug/mL, en el día 15 aumenta a 11,063 ug/mL y en el día final disminuye a 6,178 ug/mL en el método 1 con BBM con deficiencia de Nitrógeno al 4%</p>	<p>Medio BBM con deficiencia de Nitrógeno al 4%: 0,102 ug/ml a 3,058 ug/mL.</p>	<p>3,55x10⁻⁶ µg/cel. mL</p>	<p>(40)</p>
<p>4. Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradiación y color de luz para la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>.</p>	<p>Medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiación de 150 µE m⁻² s⁻¹, con CO₂ al 5%, agitación con burbujeo, temperatura 20°C ± 2°C, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.</p>	<p>Se obtuvieron 29.45µg/mL al utilizar luz azul, alta irradiación y 0.310mg/mL de acetato de sodio en medio RM.</p>	<p>Medio RM 5.06µg/mL, se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiación 150 µE m⁻² s⁻¹ como factores de estrés.</p>	<p>3.26x10⁻⁵ µg/cel. mL</p>	<p>(68)</p>
<p>5. Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno,</p>	<p>Biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1x10⁴cel/ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo</p>	<p>En el medio BBM una concentración inicial de 7,54 x 10⁻⁷ µg/cel x ml, y finalizó con 3,90 x 10⁻⁷ µg/cel x ml.</p>	<p>Uso de luz roja en el medio BBM: 7.24 x10⁻⁵ µg/cel. mL de astaxantina</p>	<p>7.24 x10⁻⁵ µg/cel. mL</p>	<p>(67)</p>

sobre la expresión de genes y producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO ₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ con variación del color de luz y un segundo tratamiento con variación del color de luz y nitrógeno al 4.0%, cada fase se desarrolló en un periodo de 30 días, de los cuales 15 días fueron de crecimiento y 15 días de estrés (luz roja, luz azul) ; se llevó a cabo en los medios RM y BBM				
6.Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio.	medio RM bajo un pH de 6,8, temperatura 20 \pm 2°C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos, durante 56 días.	El tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L + cloruro de sodio 1,28 g/L presentó la concentración de clorofila de 0,245 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	El tratamiento al cual se le adicionó 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio: 7,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.73 x10 ⁻⁴ $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$	(55)
7.Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo el efecto de	Medio RM y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L, además	La mayor concentración de clorofila fue obtenida para el tratamiento RM3 (40 mg/L	El tratamiento RM2 (30 mg/L de fosfatos) obtuvo mayor concentración de astaxantina	6.12 x10 ⁻⁶ $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$	(82)

la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz.	de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno y un medio control. Se utilizó un pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ±1 °C. agitación diaria 10 segundos.	de fosaftos), con 26.2 µg/mL	con 5.772 µg/mL		
--	--	------------------------------	-----------------	--	--

ARTÍCULOS REVISADOS

Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de <i>H. pluvialis</i> flotow y ausencia de nitrógeno.	pH:6, sin suministro de CO ₂ ; con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico de 59 µE m ⁻² s ⁻¹ y 20°±2°C.	35 pg/cel a los 2 días de cultivo	2.5 pg/cel en el día 8 de cultivo.	2.5 pg/cel.	(4)
Optimización del crecimiento y producción de carotenoides astaxantina por la microalga <i>H. pluvialis</i> en diferentes	Se realizaron tres bioensayos con diferentes condiciones de estrés, primero exponiendo los cultivos a ocho intensidades de luz (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600 µmol·m ⁻²	Se registró la absorbancia de astaxantina (476 nm) como indicador de acumulación del pigmento. Mayor grado de inducción con las intensidades			(32)

condiciones de cultivo.	·s-1), en la segunda prueba se limitó la fuente de nitrógeno (NaNO ₃) en el medio de cultivo (0, 50, 75 y 100%), con base en el MBB. En el tercer bioensayo se añadió NaCl al medio (0, 0.034, 0.13, 0.25 y 0.43 M).	de 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en combinación de 0 y 100% de NaNO ₃ , y con las salinidades de 0.034, 0.25 M.			
Efectos de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina a partir de <i>H. pluvialis</i>	Se utilizó el medio de cultivo BBM, en condiciones de baja intensidad de luz (70 $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, concentración diferente de nitrato de sodio, conteniendo los cultivos 2N y 3N el doble y triple de la concentración de nitrato de sodio		1000 mg/L	10mg/L	(38)
Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en <i>H. pluvialis</i> UTEX 2505.	medio Basal Boldtemperatura $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 12:12, intensidad de luz 52 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y burbujeo de aire enriquecido con 3% de CO ₂ , bajas concentraciones en la fuente de nitrógeno y altas concentraciones de fósforo,		168.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de astaxantina	$1,684 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{g}$	(66)

<p>Optimización del crecimiento y producción del carotenoides astaxantina por la microalga <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo</p>	<p>El medio utilizado fue el BBM 3N, con un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas, diferentes temperaturas (21, 23 y 25 °C) e intensidades de 11 luz (30, 40, 50 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)</p>		<p>Con el 100% de nitratos en el BBM: 197.75 y 166.64 ng/ mg de astaxantina</p>	<p>7.77 x10⁻⁴ ng/cel. mL</p>	<p>(51)</p>
<p>Microalga verde productora de astaxantina <i>Haematococcus pluvialis</i> : de una sola célula a productos comerciales de alto valor</p>	<p>Medio BBM ,temperatura de 24°C, la luz fue continuamente suministrada por una lámpara fluorescente fría con una intensidad de luz con intensidad de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ s, agitación 175 rpm por 16 días.</p>		<p>500mg/L de astaxantina</p>		<p>(43)</p>

Tabla 7. Concentración de astaxantina y clorofila en *H. pluvialis*.

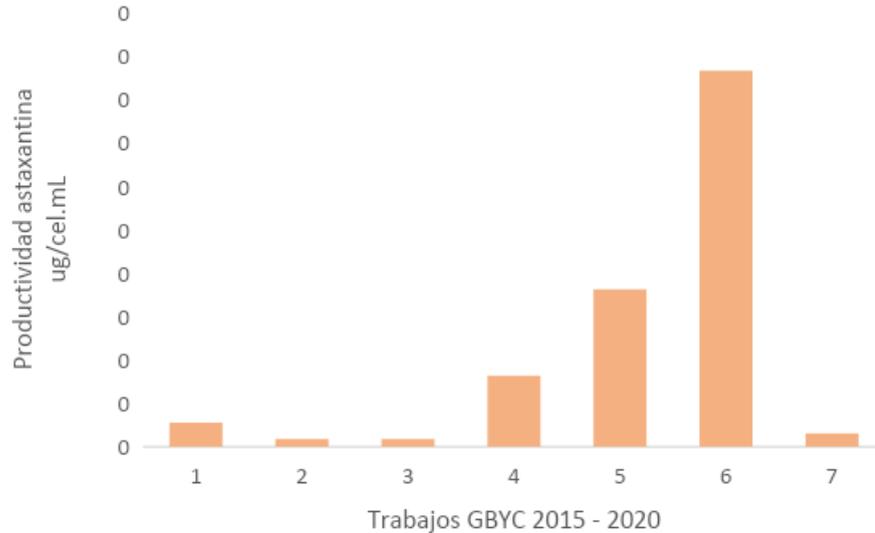


Figura 9. Productividad de astaxantina en *H. pluvialis*. Trabajos GBYC 2015-2020.

Se puede observar en la tabla 7 y figura 9, que las condiciones de estrés utilizadas permitieron obtener astaxantina con una productividad entre $1.73 \times 10^{-4} \mu\text{g/cel}$ y $3.52 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel mL}$. Las condiciones de estrés revisadas con las cuales se obtuvo la mayor productividad de astaxantina (1.73×10^{-4} (0,000173) $\mu\text{g/cel. mL}$), son el uso de medio RM, pH de 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas fluorescentes, fotoperiodo 20h luz/4h oscuridad, irradiancia $70 \mu\text{E/m}^2\text{s}$, $1,6 \text{ g/L}$ de acetato de sodio y $6,4 \text{ g/L}$ de cloruro de sodio, 56 días de cultivo. Seguido por las condiciones donde se usó luz roja, medio BBM, pH 6.7 a 7.0 CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia $140 \mu\text{E/m}^2\text{s}$, 30 días de cultivo con una producción de 7.24×10^{-5} (0.0000724) $\mu\text{g/cel. mL}$ de astaxantina (67). El trabajo donde se obtuvo la menor productividad de astaxantina utilizó las condiciones de estrés medio RM con nitrógeno al 4.0%, utilizando pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C , agitación continua, CO_2 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de $140 \mu\text{E/m}^2\text{s}$, obteniendo $3,52 \times 10^{-6}$ (0,00000352) $\mu\text{g/cel. mL}$ de astaxantina (32).

Los resultados de producción de astaxantina y clorofila en los estudios revisados son muy variables, sin embargo se evidencia una coincidencia en las condiciones de cultivo a las que se somete la microalga, el medio de cultivo más utilizado es el BBM(38,42,43,51,55,58,66), fotoperiodo de 12 horas de luz 12 horas de oscuridad (12:12)(42,51,66), por otra parte se puede evidenciar que las bajas concentraciones de CO_2 o la inanición de este compuesto favorece la producción de astaxantina (4,66) con productividad de astaxantina de 10 mg/L (38), sin embargo en se observaron documentos donde utilizaron altas concentraciones de CO_2 , bajas temperaturas, luz alta y irradiancia que oscila

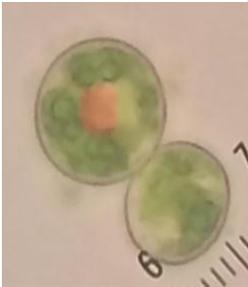
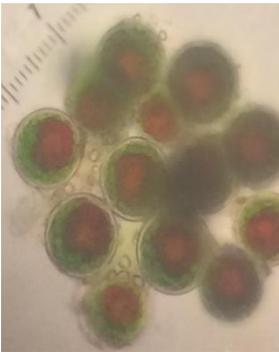
entre 40 y 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y los autores lograron obtener hasta un 5% de peso seco de astaxantina (50,53), siendo de gran relevancia debido en muchos reportes la cantidad no es la que se estima con valores de 0.083mg/ml de peso seco de astaxantina(51)

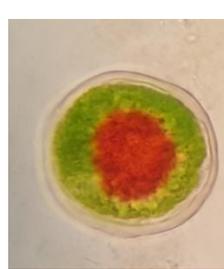
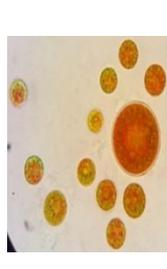
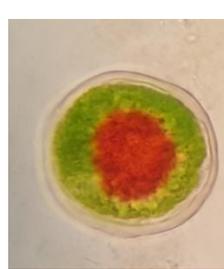
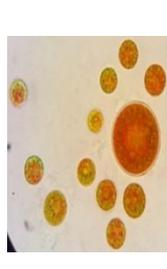
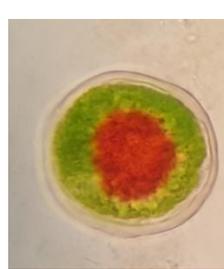
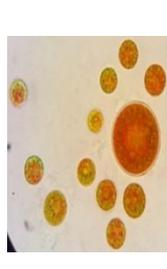
Los nitratos cumplen un papel importante en el cultivo de *H.pluvialis*, sin embargo se han desarrollado estudios donde se sustituyen algunos componentes del medio de cultivo por otros , por ejemplo en 2016 se sustituyó los nitratos por amonio y con la concentración de 40 $\mu\text{L/L}$ de amonio fue efectivo(39)

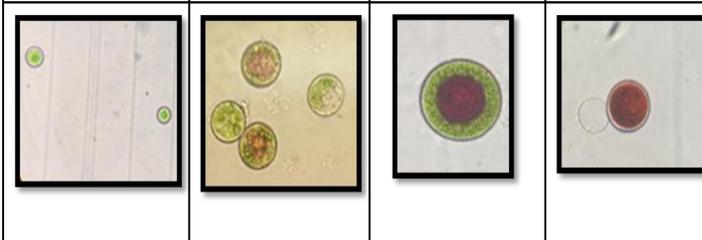
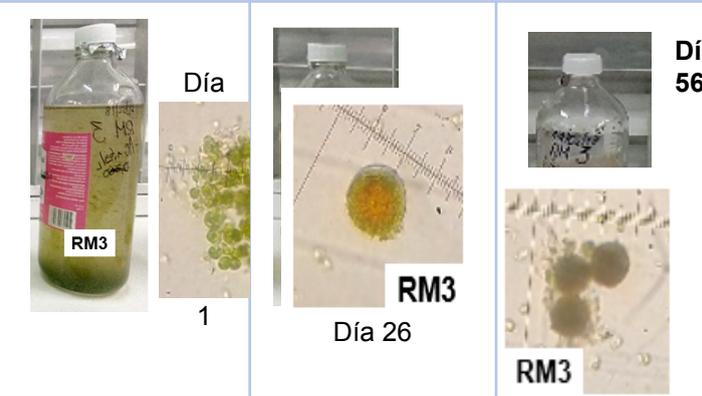
6.4.Caracterización morfológica

La tabla 8 presenta un resumen de las condiciones de estrés utilizadas y la morfología presentada relacionada con la concentración de astaxantina, incluyendo registro fotográfico de los trabajos realizados por el grupo bioprocesos y control y los artículos publicados.

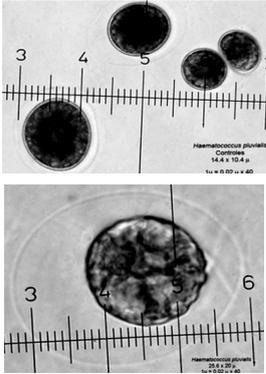
TRABAJOS GRUPO BIOPROCESOS Y CONTROL			
Trabajo	Condiciones	Resultados	Bibliografía
Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno, sobre la expresión de genes y producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	Biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1×10^4 cel/ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ con variación del color de luz y un segundo tratamiento con variación del color de	<p>El tratamiento óptimo para mejorar la producción del pigmento fue con una deficiencia de nitrógeno al 4.0%, agregando una variación del color de luz roja en el medio BBM, alcanzando una producción de 7.24 $\times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{cel.}$ de astaxantina.</p> <p>Esta concentración de astaxantina es comparable con la cantidad de células aplanosporas observadas en el medio, así como el cambio macroscópico observado en los biorreactores, esto debido a las condiciones de estrés a las que fue sometido el cultivo</p>	(67)

	<p>luz y nitrógeno al 4.0%, cada fase se desarrolló en un periodo de 30 días, de los cuales 15 días fueron de crecimiento y 15 días de estrés (luz roja, luz azul) ; se llevó a cabo en los medios RM y BBM</p>			
<p>Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i></p>	<p>Medios de cultivo (BBM, OHM, RM) en Biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1×10^4 cel/ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 μE/m²s</p>	<p>En el medio RM, se pudo evidenciar que las células pasaron de ser células flageladas móviles, a células palmellas verdes quienes iban empezando a acumular el carotenoide en el interior de su citoplasma, hasta convertirse para el día 24 en células aplanosporas, estas últimas multiplicando su cantidad para el día 36 de cultivo.</p>		<p>(31)</p>
		<p>RM</p>		
		<p>Día</p>		
		<p>18</p>		
				
	<p>36</p>			
				

<p>Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i></p>	<p>medio RM con nitrógeno al 4.0% y 5.0%, utilizando las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO2 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$</p>	<p>Los cambios microscópicos que presentó el cultivo con nitrógeno al 4.0%, es decir, el que obtiene mayor producción de astaxantina, se pudo observar como a través del tiempo el cultivo que inicialmente es incoloro, adquiere una tonalidad verdosa por el aumento del metabolismo de células palmellas verdes, aunque para el día 15, los biorreactores adquieren un color rojo, debido a la producción de células aplanosporas quienes acumulan la astaxantina. Para el día 27 de cultivo, todos los biorreactores tenían esta coloración, debido a las condiciones de estrés a las que estaba sometido el cultivo.</p> <p style="text-align: center;">Morfología celular <i>H. pluvialis</i>. Tratamiento con deficiencia de Nitrógeno al 4%.</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td data-bbox="579 734 834 1025"></td> <td data-bbox="842 734 1082 1025"></td> <td data-bbox="1090 734 1273 1025"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="579 1037 834 1137">Día 0</td> <td data-bbox="842 1037 1082 1137">Día 12</td> <td data-bbox="1090 1037 1273 1137">Día 24</td> </tr> </table>				Día 0	Día 12	Día 24	<p>(67)</p>
									
Día 0	Día 12	Día 24							
<p>Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en <i>H. pluvialis</i> usando medio BBM</p>	<p>Medio Basal Bold (BBM) con deficiencia de Nitrógeno, en una concentración de 4% y 5%, fotoperiodo 20/4 luz/oscuridad con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una</p>	<p>En el día 24 se observaron la mayor cantidad de células aplanosporas, lo que se relaciona con la acumulación del pigmento rojo en los biorreactores para el día 21 de cultivo, en el medio BBM con nitrógeno al 4.0 %, quien, en las condiciones de estrés mencionadas, fue el que acumuló mayor concentración del carotenoide (0,102 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,058 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td data-bbox="571 1429 699 1731">Día 18</td> <td data-bbox="707 1429 922 1731"> 40x</td> <td data-bbox="930 1429 1018 1731">Día 24</td> <td data-bbox="1026 1429 1265 1731"> 40x</td> </tr> </table>	Día 18	 40x	Día 24	 40x	<p>(40)</p>		
Día 18	 40x	Día 24	 40x						

	vez al día durante 10 minutos.		
Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz para la producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> .	Medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con CO_2 al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.	<p>La mayor concentración de astaxantina se presentó en el medio de cultivo RM (5.06$\mu\text{g/mL}$) significativamente más eficiente para la producción ($F=52.74; P<0.0001; GL=1$), en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiancia 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como factores de estrés.</p> <p>En cuanto la clorofila, se obtuvieron 29.45$\mu\text{g/mL}$ al utilizar luz azul, alta irradiancia y 0.310mg/mL de acetato de sodio en medio RM. La morfología observada fue vegetativa, palmella y aplanóspora. Se concluyó que la luz azul, el acetato de sodio a 0.372 mg/mL y una alta irradiancia ayudan a inducir una mayor síntesis de astaxantina en <i>H. pluvialis</i></p>	(68)
			
Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio.	Medio RM bajo un pH de 6,8, temperatura $20\pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de	<p>Como resultados se obtuvo que, el tratamiento con 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio obtuvo la mayor producción astaxantina en un 20% superando los demás tratamientos con 7,3 $\mu\text{g/ml}$.</p>	(55)
			

	sodio adicionadas a diferentes tiempos, durante 56 días.		
Producción de astaxantina en <i>H. pluvialis</i> bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz.	Medio RM y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L, además de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno y un medio control. Se utilizó un pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ±1 °C. agitación diaria 10 segundos.	Los cambios morfológicos observados demostraron mayor acumulación de células aplanosporas para 20 mg/L y 30 mg/L de fosfatos El tratamiento con 30 mg/L obtuvo la mayor concentración de astaxantina con 5.772 µg/mL.	(82)
		 <p>Día 5</p>	

Artículos revisados			
Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y	Campo magnético de 0.03T	 <p>Aumento de la matriz extracelular de aproximadamente 6 µm, respecto a las células control, con repercusión en su morfología.</p>	(4)

<p>composición pigmentaria de <i>Haematococcus pluvialis</i> fotow y ausencia de nitrógeno.</p>			
<p>Producción de astaxantina a partir de la microalga <i>H. pluvialis</i> y evaluación de posibles Aplicaciones</p>	<p>medio BBM , bajo 70 $\mu\text{mol defotones/m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente (entre 24-28 ° C), sin agitación, aireación y control de pH.</p>	<p style="text-align: center;">Recuentos Celulares a lo largo del Tiempo Luz Continua</p>	<p>(46)</p>
<p>Optimización del crecimiento y producción del carotenoi de astaxantina por la microalga <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes condiciones de cultivo</p>	<p>8 intensidades de luz (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 y 1600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)</p>	<p>Los tratamientos con 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ permitieron la acumulación de pigmentos carotenoides sin ocasionar daño en la pared celular, en las intensidades de luz 100 y 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ no se observó la formación de células con acumulación completa de pigmentos .</p>	<p>(51)</p>
<p>Microalga verde productora de astaxantina <i>Haemato</i></p>	<p>Medio BBM ,temperatura de 24°C, la luz fue continuamente suministrad</p>	<p>Se encontró que el nitrato de sodio es la fuente de nitrógeno inorgánico más óptima ,cuando el cultivo se somete a una deficiencia de nutrientes, conduce a la acumulación de astaxantina dentro de las células.</p>	<p>(43)</p>

coccus pluvialis : de una sola célula a productos comercia les de alto valor	a por una lámpara fluorescente fría con una intensidad de luz con intensidad de 50 µmol/ m² s, agitación 175 rpm por 16 días.	1-cell stage		2-cell stage			4-cell	8-cell	16-cells	32-cells	
		DIC									
		CHL									

Tabla 8. Caracterización morfológica de *H. pluvialis*.

En la tabla 8 se puede evidenciar los resultados obtenidos por el grupo de Bioprocesos y control junto con los resultados analizados para esta revisión, se observa que la acumulación de astaxantina la mayoría de los estudios se comienza a ver desde el día 21 de cultivo, sin embargo es de importancia enfatizar que este tiempo puede variar dependiendo las variables que maneje cada estudio, los medios de cultivo más utilizados son el RM y el BBM (34), las intensidades de luz también es un factor que influye en el cultivo (34) la intensidad que tuvo un resultado más favorable fue de con 400 y 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ permitieron la acumulación de pigmentos carotenoides sin ocasionar daño en la pared celular (51).

En 2015 se realizó un estudio donde se utilizaron las siguientes condiciones BBM (Bold Basal Medium), BG11, RM (Rudic's Medium) y el medio de Waris-H, pH se debe de controlar, temperatura entre 25 y 30 °C, la intensidad lumínica concentraciones de CO₂ del 1% en volumen en el aire y se obtuvieron tasas de crecimiento en los dos medios de cultivo con 0.30 y 0.367 por día para los medios Waris-H y BBM (34)

La concentración de algunos compuestos en el medio de cultivo es de gran importancia para un correcto desarrollo de la microalga, en 2016 se utilizó una concentración de 40 µL/L de amonio obteniéndose una densidad celular de 6.62x 10⁵ Cel./mL de astaxantina (39).

La temperatura promedio que se ha utilizado para el correcto desarrollo del cultivo de *H. pluvialis* es de 25°C y este parámetro se ha definido como uno de los más influyentes debido a que si se trabajan con temperaturas muy elevadas hay un poco de crecimiento celular y por lo tanto poca producción de astaxantina, un estudio trabajó con una temperatura de 50°C en el crecimiento celular y obtuvo un rendimiento de extracción menor a 60g/L (40).

A continuación se relaciona una tabla resumen de los trabajos realizados por el GBYC entre el 2015 y 2020, relacionando condiciones de estrés, morfología observada, tiempo de estudio, tiempo de enquistamiento, biomasa y producción de astaxantina,

Tabla resumen

Referencia	Condiciones de estrés de cultivo	Morfología observada	Tiempo de estudio	Tiempo de enquistamiento	Tiempo de observación células aplanosporas	Biomasa	Producción de astaxantina
1.Niño <i>et al.</i> 2015 (31)	CO ₂ al 5%, un pH de 6.7 a 7, un periodo de luz de 16:8 e irradiancia de 70 μE/m ² s; fase de estrés con fotoperiodo de 20:4 y 140 μE/m ² s de irradiancia.	-Célula flagelada móvil -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	36 días	18 días	24 días	7.5 x10 ⁵ cel./ml	1.11x10 ⁻⁵ μg/cel mL 8.3 μg/mL
2.Gómez <i>et al.</i> 2016 (39)	Medio RM con nitrógeno al 4.0%, de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, agitación continua, CO ₂ 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas y una irradiancia de 140 μE.	-Célula flagelada móvil -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	36 días	12 días	24 días	2.10x10 ⁶ cel./ml	3.52x10 ⁻⁶ μg/cel. mL 7.4 ug/mL
3.Rios <i>et al.</i> 2016 (40)	Medio BBM con deficiencia de nitrógeno al 4%, fotoperiodo 20:4 con lámparas fluorescentes blancas, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 minutos.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	24 días	15 días	18 días	1.12x10 ⁶ cel./ml	2.73x10 ⁻⁶ μg/cel.mL 3.058 ug/mL

4.Ávila <i>et al.</i> 2019 (67)	Deficiencia de nitrógeno al 4.0%, agregando una variación del color de luz roja en el medio BBM.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	30 días	18 días	21 días	- *	7.24 x10 ⁻⁵ µg/cel.mL
5.Cuero <i>et al.</i> 2019. (68)	Medio RM usando 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiancia 150 µE m ⁻² s ⁻¹ , CO ₂ al 5%, agitación con burbujeo, fotoperiodo 20:4 y pH 6.8.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	30 días	27 días	30 días	1.55x10 ⁵ cel./ml	3.26x10 ⁻⁵ µg/cel.mL 5.06µg/mL
6.Rodríguez. 2018 (55)	Medio RM, pH de 6,8, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 µE m ⁻² s ⁻¹ . Acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio y adición de cloruro de sodio 6,4 g/L, a los 15 días.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	56 días	28 días	35 días	4.2x10 ⁴ cel./ml	1.738 x10 ⁻⁴ µg/cel. mL 7.3 µg/ml
7.Rodríguez. 2020 (82)	Medio RM, fosfatos de 30 mg/L, pH de 6.8, fotoperiodo de 20 h luz:4 h oscuridad irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	62 días	28 días	46 días	9.43x10 ⁵ cel./ml	6,12 x10 ⁻⁶ µg/cel. mL µg/ml

Tabla 9. Tabla resumen.

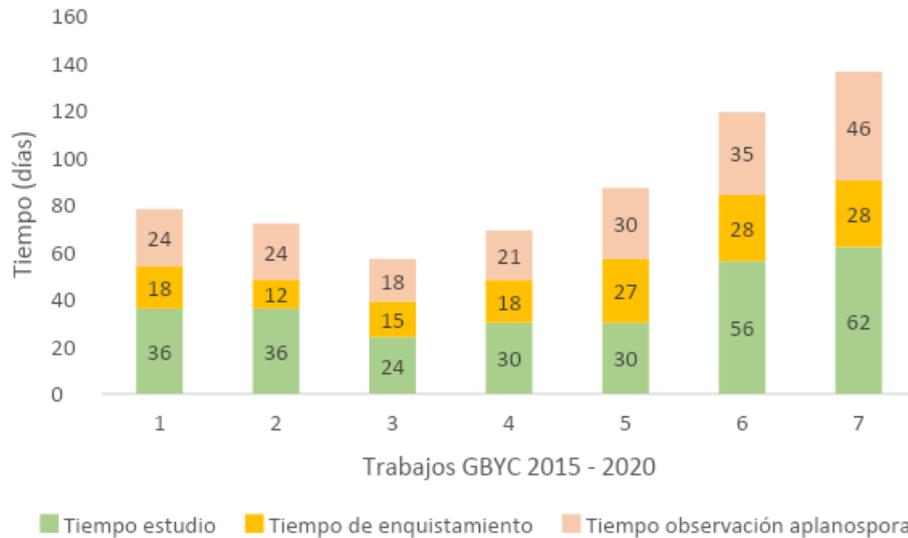


Figura 10. Tiempos del cultivo y de producción de astaxantina en *H. pluvialis*. Trabajos GBYC 2015-2020.

En la tabla 8, Figura 10 y tabla 9 se pudo evidenciar que en todos los tratamientos se observa la morfología de la microalga desde sus formas vegetativas, biflageladas móvil, célula palmella, célula intermedia y célula aplanospora, bien definidas y relacionadas con la producción de astaxantina. El estudio en el cual se presentó el menor tiempo de enquistamiento fue en el que se trabajo medio RM con nitrógeno al 4.0%, de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, agitación continua, CO₂ 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas y una irradiancia de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ (39).

Los estudios que presentan el mayor tiempo de enquistamiento de 28 días son en los cuales se utilizó como condiciones de estrés medio RM, concentración de fosfatos de 30 mg/L, pH de 6.8, fotoperiodo de 20hluz:4h oscuridad, irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca con una productividad de astaxantina $6,12 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{cel. mL}$ (82) y el estudio donde se usó medio RM, pH de 6,8, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio y adición de cloruro de sodio 6,4 g/L, a los 15 días con la mayor productividad de astaxantina de $1.738 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cel. mL}$ de los estudios revisados (55). , Es de gran importancia resaltar que la producción del ketocarotenoide se logra cuando la morfología del *H. pluvialis* está en aplanosporas y que en los estudios reportados estas células se producen en el día 24 luego del comienzo de cultivo sin embargo la acumulación puede comenzar desde el día 9 (46), dependiendo de las condiciones de estrés utilizadas con tiempos de enquistamientos de 11 días.

7.DISCUSIÓN

El *H. pluvialis* es una micro alga de gran interés biotecnológico debido a que es la principal productora de astaxantina y este ketocarotenoide tiene amplios usos en las diversas industrias por sus características antioxidantes, anticancerígenos e inmunomoduladores, necesita para su crecimiento agua, luz, CO₂, y sales minerales entre las que se encuentran principalmente alguna fuente de nitrógeno como nitrato o amonio y una fuente de fósforo que suele ser algún fosfato inorgánico ,sin embargo , la gran problemática rodea a este compuesto es su crecimiento lento(78).

En la revisión realizada acerca del tema se ha logrado evidenciar las condiciones en las que se ha trabajado la microalga para lograr una mayor producción del ketocarotenoide es importante tener en cuenta que para una buena producción de astaxantina se tiene que tener un buen cultivo de la microalga productora , para lo cual se debe realizar el cultivo en un medio que tenga los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la microalga pasando por cada una de sus fases de crecimiento como la fase de adaptación , fase exponencial (15 días), fase estacionaria de estrés natural y fase de muerte(6). Se observa también un cambio morfológico desde célula biflajelada, célula palmeloide , célula intermedia hasta llegar a aplanospora donde se logra la acumulación de astaxantina (39) .Por ello es importante la elección del medio entre los cuales se encontró que los que incrementaron la biomasa fueron el medio RM(82) y BBM (40)que están compuestos principalmente por micronutrientes como sales inorgánicas de nitratos y fosfatos inorgánicas, aunque cabe resaltar que cuando se necesitan una especificidad más alta del

medio se le pueden adicionar nutrientes como como los factores de crecimiento , vitaminas como tiamina, biotina, vitamina B₁₂, agentes solidificantes, adición de acetato de sodio, etc(28).

Como se mencionó previamente de los estudios revisados, el que presentó la mayor producción de biomasa indicador del crecimiento celular en menor tiempo en células/mL fue en el que se utilizó medio: RM que presenta 5% de deficiencia de nitrógeno con un recuento final de a $2,5 \times 10^6$ cel./ml a los 21 días de cultivo, bajo las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO₂ 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de 140 $\mu\text{Em}^2\text{s}$ (39), Seguido por el estudio donde se usó medio BBM con deficiencia de nitrógeno al 4%, con un valor de $1,12 \times 10^6$ cel./mL en el día 21, ciclo luz:oscuridad 20h/4h con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos (40), por ello Parra et al, enuncia que el nitrógeno es el nutriente más importante en los cultivos, pero también uno de los más difíciles de manejar y se usa para la producción aminoácidos, que producen las proteínas que construyen las células y es esencial para el crecimiento celular debido a que es un compuesto principal de la clorofila(88).

En la Tabla 6 podemos observar que los parámetros cinéticos determinados para los trabajos revisados se obtuvieron al aplicar los modelos matemáticos logístico y Baranyi-Roberts, observando que el modelo que más se ajusta para explicar el crecimiento de la microlaga bajo las condiciones de cultivo es el modelo logístico, porque el coeficiente de correlación (R^2) obtenido en los trabajos donde aplicó, se aproxima más a 1, usando los medios de cultivo RM, BBM y OHM, con valores de 0,99 (31) y RM (68).

Los valores de tiempo de duplicación más bajos con valores de 2, 19 días (modelo logístico) y 2,2 días (Modelo Baranyi-Roberts), se presentaron para el estudio donde se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos(82).

Los tiempos de duplicación más altos se reportaron para el trabajo realizado bajo las condiciones donde se usan los medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con CO₂ al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.de las células, con valores de 21,06 días para medio RM y 21.26 días para medio BBM. En este trabajo se reportó un crecimiento celular a los 30 días con una concentración de acetato de sodio de 0.372 mg/mL fue de 2.49×10^5 cel/mL y 1.55×10^5 cel/mL en medio BBM y RM respectivamente y lo cual evidencia la disminución de la actividad fotosintética que va de la mano con el aumento de

la en la concentración de astaxantina, la concentración del carotenoide llego hasta 1.93 µg/mL (día 30).(68)

La velocidad de crecimiento ($\mu\text{máx.}$), según el modelo logístico es 0,092 por día para el tratamiento donde se uso medio RM con las condiciones de cultivo: pH 6.7 a 7.0, CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (31). Cuando se utilizó fosfatos en diferentes concentraciones, se incrementó la velocidad de crecimiento observándose que el tratamiento con mayor valor en este parámetro es en el que se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos (RM2) bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos(82), con un valor de 0,317 células/día (R^2 : 0,62).según modelo logístico y de 0,315 cél./día (R^2 :0,90), según modelo Baranyi-Roberts.

Miranda et al, con su estudio realizado con bajas concentraciones de fosfatos en el cultivo de *H.pluvialis* creció en los diferentes tratamientos del medio de cultivo BBM- modificado a diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno (NaNO_3) y fósforo (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) (55), obteniendo como resultado que la mayor concentración celular obtenida fue para los tratamientos que contenían niveles de las fuentes de nitrógeno y fósforo más alto (1.0 g/L), mostrando valores entre 1.5 – 1.9 g/L; a diferencia con los tratamientos donde la concentración de los factores era menor (0.2 g/L), los cuales arrojaron valores de concentración celular de 0.85- 1.0 g/L (55) ;concluyendo que no se obtuvo un efecto positivo por parte de la disminución de la fuente de nitrógeno y fósforo en cuanto al crecimiento celular debido a que la microalga tiene una limitada habilidad para producir materiales almacenados de nitrógeno cuando crece bajo condiciones suficientes de nitrógeno y el fósforo es otro macronutriente que juega un importante rol en el proceso metabólico celular por la formación de algunos componentes estructurales y funcionales requeridos para el crecimiento normal y desarrollo de la microalga(45) y a su vez la producción de astaxantina como se menciona en el estudio anterior que la disminución de nitrógeno no favorece positivamente la producción del carotenoide de interés.

En los estudio revisados se observó la incidencia del color de la luz en el crecimiento de *H. pluvialis* , utilizándose luces de color blanco , azul y rojo con altas irradiancias, observándose que el uso de la luz azul tiene una mayor eficacia en el crecimiento y desarrollo de la microalga mostrando un crecimiento exponencial hasta el día 36 después de iniciado el cultivo. El color de la luz depende de su longitud de onda (o frecuencia), medida en nanómetros, la luz visible o espectro visible (lo que el ojo humano puede percibir) está compuesta por radiaciones de entre 380 nm (azul) a unos 740 nm (rojo)(86) , por ejemplo el color azul es responsable del crecimiento vegetativo y favorece el proceso de fotosíntesis , el color rojo en la luz crea un tipo de competencia entre las células provocando una disminución en la fotosíntesis afirmando que la cantidad de astaxantina producida por la microalga puede ser directamente proporcional a la cantidad de luz suministrada. (68).

El estudio que tuvo la mayor productividad de astaxantina (1.73×10^{-4} (0,000173) $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$), fue en el que se usó medio RM, pH de 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas fluorescentes, fotoperiodo 20h luz/4h oscuridad, irradiancia $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, $1,6 \text{ g/L}$ de acetato de sodio y $6,4 \text{ g/L}$ de cloruro de sodio, 56 días de cultivo, Montañón en 2015 se utilizaron fuentes de luz (fluorescente, led blanca, led azul y led roja), intensidad de luz (40 y $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para el cultivo de *Haematococcus pluvialis*, encontrando que los más favorables fueron la luz fluorescente e intensidad lumínica de $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Como resultado de las condiciones de estrés, se logró identificar que los cultivos a los cuales se les adicionó cloruro de sodio, aumentó la tasa de crecimiento en $7.47 \times 10^5 \text{ cel./mL}$ y la tasa de astaxantina fue de $2.49 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el cambio de la fuente de luz sin adición de soluciones alcanzó una tasa celular de $3.43 \times 10^5 \text{ cel./mL}$ y una concentración de astaxantina de $2,62 \mu\text{g}/\text{mL}$.(85), también Nava et al, en 2017 realizó un ensayo dos medios de cultivo mixotrófico con diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Los medios de cultivo se diseñaron a diferentes concentraciones de nitrato de sodio, fosfato de potasio y acetato de sodio / carbonato de amonio como fuente de carbono allí se pudo observar que la concentración de los nutrientes en los cultivos mixotróficos afecta la producción de metabolitos(51), sin embargo se pudo evidenciar en los estudios revisados que el acetato de sodio y el fosfato ejercen un efecto positivo en la producción de astaxantina debido a que la concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. La tolerancia a la sal varía según las especies, algunas sólo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas(19).

Seguido por el estudio donde se usaron las condiciones de estrés luz roja, medio BBM, pH 6.7 a 7.0 CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 30 días de cultivo con una producción de 7.24×10^{-5} (0.0000724) $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ de astaxantina (40).

El trabajo donde se obtuvo la menor productividad de astaxantina utilizó las condiciones de estrés medio RM con nitrógeno al 4.0%, utilizando pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C , agitación continua, CO_2 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, obteniendo $3,52 \times 10^{-6}$ (0,00000352) $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ de astaxantina (45), Rios et al, en 2017 enuncia que la deficiencia de nitrógeno es una condición que favorece la producción de astaxantina, combinada con alta irradiancia (40).

Entre las condiciones tenidas en cuenta durante el cultivo de *H. pluvialis* y el estrés para la obtención de astaxantina está el pH, utilizándose en todos los estudios revisados cercano a la neutralidad (6.7 a 7,0), ya que el pH del medio de cultivo en el cual se desarrollan las microalgas es un factor el cual no puede tener una variación muy drástica, por ejemplo si existe una elevación disminuye la biodisponibilidad e induce la eliminación de fosfatos vía coprecipitación

química con Ca²⁺ y formación de fosfato de calcio cuando se llega a un intervalo de pH entre 9 y 11 (67).

Es importante la selección de las condiciones de estrés que pueden favorecer el crecimiento de la microalga y la producción de astaxantina, debido a que se pudo observar que la producción es muy variable y está influenciada por las condiciones de estrés utilizadas sugiriendo para producir biomasa de la microalga utilizar los medios de cultivo BBM y RM, con pH 6.7, CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, tiempo de cultivo 36 días(68).

Las condiciones de estrés necesarios para lograr una alta productividad de astaxantina son uso de medio RM, pH de 6,8, temperatura 20 \pm 2°C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas fluorescentes, fotoperiodo 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 1,6 g/L de acetato de sodio adicionado desde el inicio del cultivo y 6,4 g/L de cloruro de sodio adicionado en el día 15 del cultivo, 56 días de cultivo. Seguido por el estudio donde se usaron las condiciones de estrés luz roja, medio BBM, pH 6.7 a 7.0 CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 30 días de cultivo con una producción de 7.24 x10⁻⁵ (0.0000724) $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ de astaxantina (68).

En la revisión realizada a otras publicaciones entre el periodo de 2015-2020 se puede evidenciar *H.pluvialis* ha sido una microalga de alto interés que se ha sometido a diversas condiciones para evaluar las situaciones en la que logra una alta producción de astaxantina ,se pudo observar que en el día 21 del cultivo de la microalga es cuando se logra la acumulación del pigmento con un rendimiento celular de 6,88 x 10⁵ células/mL (54) que es un valor parecido al que dio el grupo de bioprocesos y control con las siguientes condiciones: Medio RM (RM1) y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L (RM2), 30 mg/L(RM3) y 40 mg/L (RM4), además de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno (RM5). Condiciones: pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 \pm 1 °C. Agitación diaria 10 segundos, donde se obtuvo que el tratamiento con mayor crecimiento fue el RM3: 40 mg/L de fosfatos con 9,69 x 10⁵ cel./ml(82), existiendo una alta productividad celular en muchos casos se puede lograr una alta producción de astaxantina en este caso el grupo de bioprocesos y control con el tratamiento RM2 (30 mg/L de fosfatos) obtuvo mayor concentración de astaxantina con 5.772 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El grupo de bioprocesos y control obtuvo una mayor concentración de 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con las siguientes condiciones medio RM ,pH 6.7 a 7.0 CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (31) y comparado con los documentos revisados se evidencio que la mayor producción de astaxantina se obtuvo con condiciones como ;medio de cultivo BBM, con baja intensidad de luz (70 $\mu\text{mol fotón.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, concentración diferente de nitrato de sodio, conteniendo los cultivos 2N y 3N el doble y triple de la concentración de nitrato de sodio, dando como resultado 100 mg/l de astaxantina (38)m, con estas condiciones se puede afirmar que las condiciones de cultivo pueden variar desde el inicio como la elección del medio de cultivo

en el cual se va a desarrollar la microalga , pasando por el fotoperiodo y llegando hasta la disponibilidad que van a tener las células para su desarrollo; si bien se conoce que hay condiciones que pueden ser variables también existen situaciones que tienen que ser constantes como el ph que en las condiciones expuestas anteriormente se mantiene en un rango de 6.5 a 7.0 .

8.CONCLUSIONES

1. Las condiciones que favorecen el crecimiento de *H. pluvialis* son el uso de medio: RM que presenta 5% de deficiencia de nitrógeno con un recuento final de a $2,5 \times 10^6$ cel./ml a los 21 días de cultivo, bajo las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO₂ 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de 140 $\mu\text{Em}^2\text{s}$, Seguido por el estudio donde se usó medio BBM con deficiencia de nitrógeno al 4%, con un valor de $1,12 \times 10^6$ cel./mL en el día 21, ciclo luz:oscuridad 20h/4h con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS

- marca Phillips, temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos
2. La mayor productividad de astaxantina con un valor de (1.73×10^{-4} µg/cel. mL), se presentó usando medio RM, pH de 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas fluorescentes, fotoperiodo 20h luz/4h oscuridad, irradiancia $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio, 56 días de cultivo. Seguido por el estudio donde se usaron las condiciones de estrés luz roja, medio BBM, pH 6.7 a 7.0 CO_2 al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 30 días de cultivo con una producción de 7.24×10^{-5} µg/cel. mL de astaxantina
 3. Se observaron las cuatro formas del ciclo de vida de *H. pluvialis*, es decir, célula flagelada móvil, célula palmella, célula intermedia y célula aplanospora, bien definidas y relacionadas con la producción de astaxantina.
 4. Se utilizaron los modelos logísticos y Baranyi Roberts para ajustar las curvas de crecimiento *del H. pluvialis* y obtener los parámetros cinéticos como velocidad de crecimiento (μ_{max}), biomasa final y tiempo de duplicación (td), los cuales sirven para monitorear los cultivos realizados viendo la influencia de los medios de cultivo BBM y RM, nutrientes como acetato de sodio y fosfatos sobre el crecimiento celular, el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento.
 5. Con la revisión realizada se pudo establecer que condiciones de estrés que se pueden seguir utilizando en forma individual o combinada para mejorar la productividad de astaxantina, como el uso de medios RM y BBM, adición de acetato de sodio al inicio del cultivo, cloruro de sodio al día 15 del cultivo, uso de luz roja y luz blanca, pH 6.7 a 7.0, CO_2 5%, irradiancia alta $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, fotoperiodo 20h luz:4 h oscuridad.

9.RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones por parte del grupo de bioprocesos y control para determinar las mejores condiciones de cultivo.
- Tomar en cuenta las condiciones evaluadas con mejores resultados de esta revisión para realizar ensayos y mirar sus resultados.

10.BIBLIOGRAFÍA

1.Abalde J, Cid A, Fidalgo J, Torres E , Herrero C.Microalgas: Cultivo y Aplicaciones.España: Universidade da coruña servicio de publicaci3n;1995.[citado el 4 de Noviembre de 2020].Disponible en :<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=391762>

2. Meyers S. Papel del Carotenoide Astaxantina en la Nutrición de Especies Acuáticas.[Internet].1998.Disponible en: <file:///C:/Users/lenovo/Downloads/admin,+28.pdf>
3. CHOJNACKA, Katarzyna; MARQUEZ-ROCHA, Facundo-Joaquin. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*. 2004. vol. 3, no 1, p. 21-34.[Citado el 14 de julio de 2021].
4. Meléndez A, Vicario I, Heredia F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides.[Internet].2004.vol.54.[Citado el 10 de Agosto de 2021].Disponible en:http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222004000200003&script=sci_arttext
5. Rivera C, Zapata , Gabriel; Donato J ,Chaparro B. Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico.[Internet].2005. vol. 10, núm. 2, pp. 95-103.Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028577004.pdf>
6. Lohr M, Im Ch., Grossman A. Genome-Based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamidomonas Reinhardtii*.*Plant Physiology*.2005. Vol.138,pp 490-515.
7. Nobre B, Marcelo F, Passo R, Beirao L, Palabra A, Gouveia L,et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet] 2006 [citado el 23 de octubre de 2020] Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-006-0270-8>
8. Serpa R, Calderón A. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Teod.[Internet].2006.vol 5.disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162006000100013&script=sci_arttext
9. Gómez L, Menéndez J, Álvarez I, Flores I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. *Bioteología Vegetal* .[Internet].2009[citado el 9 de Septiembre de 2020];Vol. 9, No. 2: 105 - 117, .Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283268944_Efecto_de_diferentes_protocolos_de_aplicacion_de_un_campo_magnetico_003T_sobre_el_crecimiento_viabilidad_y_composicion_pigmentaria_de_Haematococcus_pluvialis_Flotow_en_suficiencia_y_ausencia_de_nitrogeno.
10. Jaime L, Rodríguez R, Cifuentes A, Santoyo S, Suarez S, Ibañes E,et al . Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. [Internet] 2010 [Citado 4

de enero de 2021]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643809001959>

11. Martínez A. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta volvocales) cultivada en diferentes medios. [Internet]. 2010 [citado el 4 de Noviembre de 2020]. Disponible en:

http://www.lareferencia.info/vufind/Record/MX_9af8b7051984a7ba05c7f815575f9a81

12. Valle J. Extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* usando CO₂ supercrítico. [Internet]. [Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Ciencias de la Ingeniería]. Santiago de Chile. 2011. [Citado el 14 de junio de 2021]. Disponible en:

<https://repositorio.uc.cl/xmlui/bitstream/handle/11534/1487/567778.pdf>

13. Salazar M, Monroy O, Beristain R, Cuevas F, Mendoza C. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2012 [citado el 24 de Agosto de 2020]. Disponible en:

https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/CII-82.pdf

14. López P. Efecto del Consumo de Astaxantina en la Salud. [Internet]. 2012 [citado el 26 Octubre de 2020] Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/281565262_Efecto_del_consumo_de_astaxantina_en_la_salud

15. Filomena M, Alcina M, Ruiz M. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. [Internet] 2012 [Citado el 7 de enero de 2021] Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805845/>

16. Camacho J, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. [Internet]. 2013 [citado el 24 de Agosto de 2020]. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S179424702013000100009&script=sci_abstract&tlng=es

17. Ordoñez, R. Bioquímica generalidades de los lípidos. [Internet]. 2013. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/richardordonez940/bioquimica-generalidades-de-los-lipidos> [Accessed 14 Mar. 2016].

18. Richmond, Amos. "Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae." Handbook of microalgal culture: applied phyecology and biotechnology : 169-204. 2013. [citado el 2 de Agosto de 2021].

19. Nunes, M., Vieira, A. A. H., Pinto, E., Carneiro, R. L., & Monteiro, A. C. . Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells induced by light and nutrient

stresses.[Internet].2013. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48(8), 825-832.[citado el 2 de Agosto de 2021]Disponible en:http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2013000800006&script=sci_arttext

20.Wayama M, Ota S, Matsuura H , Nango N , Hirata A, Kawano S.Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. [Internet].2013[citado el 27 de Agosto de 2020].Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053618>

21.Ranga A, Sindhuja H, Dharmesh S,Udaya K, Sarada R, Aswathanarayana G.Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. [Internet].2013[citado el 27 de Agosto de 2020].Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/235894204_Effective_Inhibition_of_Skin_Cancer_Tyrosinase_and_Antioxidative_Properties_by_Astaxanthin_and_Astaxanthin_Esters_from_Green_Alga_Haematococcus_pluvialis

22.Wang J , Han D , Sommerfeld M,Lu C , Hu Q.Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor.[Internet].2013 [citado el 27 de agosto de 2020];25:253–260.Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-012-9859-4>

23.Ramírez D.Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. [Internet].2013[citado el 26 de Octubre de 2020].Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>

24.Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource technology [Internet].2014. 167, 276-283[Citado el 30 de Junio de 2021].Disponible en:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414008748>.

25.Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y.Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. [Internet].2014[citado el 27 de Agosto de 2020];Volume 2014.Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/694305/>

26.Chekanov K,Lobakova E, Selyakh I, Semenova L,Sidorov R,Solovchenko A.Accumulation of Astaxanthin by a New *Haematococcus pluvialis* Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia)[Internet].2014[Citado el 27 de Agosto de 2020]; 12, 4504-4520.Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25196836/>

27. Su Y , Wang J , Shi M, Niu X, Yu X, Gao L, et al. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. [Internet]. 2014 [citado el 27 de Agosto de 2020]; 170:522-529. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/265134288_Metabolomic_and_network_analysis_of_astaxanthin_producing_Haematococcus_pluvialis_under_various_stress_conditions
28. Alcántara A, Contreras A, Reyes N, Castro J, Castañeda H, Castro G, et al. Comparación de la densidad población de *Daphnia pulex* Müller, 1785 en cultivos de laboratorio alimentadas con tres microalgas verdes unicelulares (*Sphaerocystis* sp., *Chlorella vulgaris* y *Haematococcus pluvialis*). [Internet]. 2014 [citado el 9 de Septiembre de 2020]; Vol. 1 (5): 18-25. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/274710395_Comparacion_de_la_densidad_poblacion_de_Daphnia_pulex_Muller_1785_en_cultivos_de_laboratorio_alimentadas_con_tres_microalgas_verdes_unicelulares_Sphaerocystis_sp_Chlorella_vulgaris_y_Haematococcus_pluvialis.
29. Hernández A , Labbé J. Microalgas, cultivo y beneficios. [Internet]. 2014 [citado el 4 de Noviembre de 2020]; Vol. 49, N°2: 157- 173. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572014000200001
30. Streit N, Ramírez L, Queiroz L, Lopes E, Queiroz M. Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. [Internet]. 2015. Vol. 8, N° 2, págs. 27-34. [Citado el 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5327571>
31. Niño C, Rodríguez F. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2015. [Citado el 11 de agosto de 2021].
32. Régnier P, Bastias J, Rodriguez V, Caballero N, Caballo C , Sicilia D, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. [Internet]. 2015 [citado el 27 de agosto de 2020]; 13, 2857-2874. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446609/>
33. Camacho J, Lancheros A., Huerfano M. Condiciones de cultivo estándar relacionados con la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2015 [citado el 9 de Septiembre de 2020]; Volumen 14 No. 1, p. 70-80. Disponible en: http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view

/2127

34. Hernández K, Pérez M, Jáuregui C, Alcántara L, Hurtado L. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. [Internet]. 2015 [citado el 9 de Septiembre de 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000100007

35. Granda G. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2015 [citado el 26 de Octubre de 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009

36. Benavente M, Solania L. Evaluación del efecto pigmentante y nutricional del *Haematococcus pluvialis* como bioagente aplicado en la dieta de truchas en el criadero [Internet] 2015 [Citado el 8 de enero de 2021] Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCSM_c856e0c4705d0398200328df6b08f733

37. Córdoba N, Acero N, Duque L, Jiménez J, Andrea J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet] 2015 [Citado el 16 de enero de 2021] Disponible en: <https://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/426>

38. Espinaco B. Efectos de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2016 [citado el 26 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1564/2.3.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

39. Gómez L, Orozco M, Quiroga N, Díaz J. Efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2016. [Citado el 11 de agosto de 2021].

40. Ríos SL, Vargas ME. Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en *Haematococcus pluvialis* usando medio BBM. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2016. [Citado el 11 de agosto de 2021].

41. Gil M. Algas como una alternativa en la nutrición en avicultura. [Internet]. [Trabajo de grado para optar por título de Médico veterinario]. 2016. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/8596/Gil_sm.pdf?sequence=1

42. Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. *Mar Drugs*. 2016.vol.
43. Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products.[Internet].2016[citado el 5 de Noviembre de 2020].Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00531/full>
44. Zhang C, Zhang L, Liu J. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. [Internet] 2016 [Citado el 23 de enero de 2021] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942816301991>
45. Pacheco N. carotenoides: obtención, caracterización y aplicaciones. [Internet] 2016 [Citado el 25 de enero de 2021] Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Rogelio-Rodriguez-Rodriguez/publication/317275062_ACIDOS_GRASOS_CLASIFICACION_E_IMPORTANCIA_EN_LA_SALUD_HUMANA/links/593405f745851553b6da2e6f/ACIDOS-GRASOS-CLASIFICACION-E-IMPORTANCIA-EN-LA-SALUD-HUMANA.pdf#page=57
46. Ibañez M. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* y evaluación de posibles aplicaciones .[Internet].2017[citado el 9 de Septiembre de 2020].Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/xmlui/bitstream/handle/11185/1859/10.2.2.pdf>
47. Ruiz A. Implementación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del carotenoide all-trans-B-caroteno en la microalga *Arthrospira platensis*. [Internet]. [Trabajo de grado para optar por el título de industria alimentaria].2017.Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UUNI_892f214d508573176c0f58a4112ba41c
48. Rimmig B, Kim SH, Nash K, Bickford PC, Douglas Shytle R. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *Geroscience*. 2017 .vol,1 p:19-32.
49. Guajardo C , Beltrán J , Mora A , Gallegos J , López U , Galán L ,et al.Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides totales producidos por la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo distintos periodos de estrés .[Internet].2017[citado el 26 de Octubre de 2020].Disponible en: <http://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/92>
50. Niño C , Rodríguez F , Díaz L , Lancheros A.Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet].2017[citado el 4 de noviembre de

2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>

51. Nava B. Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo. [Internet]. 2017 [citado el 4 de Noviembre de 2020]. Disponible en: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1278>

52. Martínez L, Ramírez L. Estado actual de las empresas productoras de microalgas destinadas a alimentos y suplementos alimenticios en América Latina. [Internet] 2017 [Citado el 30 de enero de 2021] Disponible en: <http://oaji.net/articles/2017/4924-1517430955.pdf>

53. Alcaraz N , Gilabert J. “Caracterización del crecimiento de *Hematococcus pluvialis* con vistas a la producción de inóculos para cultivos en fotobiorreactores para la obtención de astaxantina” . [Internet]. 2018 [citado el 9 de Septiembre de 2018]. Disponible en: <http://galpemun.es/wp-content/uploads/2019/09/591Informe-Geohabitat-Hematococcus-201812132007.pdf>

54. Galarzaa J, Gimpelb J , Rojasc V , Arredondo B , Henríquez V. Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. [Internet]. 2018 [citado el 26 de Octubre de 2020]; 31, 291-297. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926417302175#:~:text=The%20carotenoid%20biosynthesis%20pathway%20of,pigment%20of%20high%20commercial%20value.&text=Astaxanthin%20accumulated%20up%20to%2067,light%20intensity%20and%20nitrogen%20depletion.>

55. Rodríguez LJ. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018. [Citado el 11 de agosto de 2021].

56. De mendonça, Vieira H, et al. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment* .2018. Vol. 633. 1-11. [Citado el 2 de Agosto de 2021].

57. Davinelli S, Nielsen ME, Scapagnini G. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*. [Internet] .2018 . Disponible en: <https://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=5060881>

58. Brown D, Gough L, Deb S, Sparks S, McNaughton L. Astaxanthin in Exercise Metabolism, Performance and Recovery. 2018.

59. Nai Y, Liu H, Bi X, Gao H, Ren C. Protective effect of astaxanthin on acute cerebral infarction in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2018. Vol,9.pg: 929-936.
60. Acien F, Fernandez J, Molina E. Contribución de las microalgas al desarrollo de la bioeconomía. [Internet] 2018 [Citado el 30 de enero de 2021] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6648783>
61. Ota S, Morita A, Ohnuki S, Hirata A, Sekida S, Okuda K, et al. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. [Internet] 2018 [Citado el 04 de febrero de 2021] Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23854-w>
62. Parada V, Pauchard A, Ramirez M, Macaya E. Macroalgas exóticas en la costa de Chile: patrones espaciales y temporales en el proceso de invasión. [Internet] 2018 [Citado el 06 de febrero de 2021] Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-560X2018000100147&lng=pt&nrm=iso
63. Guajardo C. Cultivo de *Haematococcus pluvialis* y el efecto de la captación de amoníaco mediante el uso de un extracto de *Yucca shidigera*. [Internet] 2018 [Citado el 08 de febrero de 2021] Disponible en: <http://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/139>
64. R. Gallego, M. Bueno, A.M. Chourio, E. Ibáñez, M.D.A. Saldaña, M. Herrero. Efecto del uso de altas presiones en la extracción de compuestos bioactivos a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2018 [citado el 12 de Febrero de 2021]. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/194511>
65. García J, Vicente M, Galán B. Presente y futuro del cultivo de las microalgas para su uso como superalimentos. [Internet]. 2018 [citado el 25 de Febrero de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6648784>
66. Miranda A, Ossa E, Vargas G, Sáez A. Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. [Internet]. 2019 [citado el 24 de Agosto de 2020]; Vol. 30(1), 23-32. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000100023
67. Ávila KR, Rico ED, Rivero CA. Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno, sobre la expresión de genes y producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019. [Citado el 11 de agosto de 2021].
68. Cuero KJ, Domínguez JA, Espitia KD, Fuentes LA. Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz para la producción de

astaxantina en *H. pluvialis*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019. [Citado el 11 de agosto de 2021].

69. Sanchez A. Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia.[Internet].2019.[Citado el 13 de Agosto de 2021].Disponible en: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5ddb915d24571NPvolumen20-46-58.pdf>

70.Bauer A , Minceva M.Direct extraction of astaxanthin from the microalgae *Haematococcus pluvialis* using liquid– liquid chromatography.[Internet].2019[citado el 26 de Octubre de 2020].Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ra/c9ra03263k#!divAbstract>

71.Gómez L, Orozco M, Quiroga C, Díaz J, Huérfano Díaz L, et al.Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia.[Internet].2019[citado el 26 de Octubre de 2020];Vol. 9 (2) pp. 7-24.Disponible en: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1532>

72.HOYS C. Análisis de metabolitos de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo durante la acumulación de astaxantina .[Internet].2019[citado el 1 de Marzo de 2021].Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=233443>

73.Shiong K,YingLee Sb,WeiOoi Cc,Fu X ,Miao X, ChuanLing T , LokeShow P. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. [Internet].2019[citado el 1 de Marzo de 2021].Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852419308363?via%3Dihub>

74.Sánchez A. . Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia. . [Internet].2019[citado el 1 de Marzo de 2021].Disponible en:<https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5ddb915d24571NPvolumen20-46-58.pdf>

75.Camacho J,Lancheros A,Huerfano M.Expresion de genes en ruta biosintética para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* utilizando diferentes factores de estrés;vol 10.[Internet].2019[citado el 1 de Marzo de 2021].Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/343843265>

76.Salazar M,Monroy O,Beristain R , Cuevas F,Mendoza C.Cultivo continuo de *Haematococcus pluvialis* en quimiostato.2019.[Internet].[citado el 5 de Marzo de 2021].Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/OII-12.pdf

77. Corrales J. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de la microalga *Haematococcus pluvialis*, por el ensayo oracfl en el lector de placas varioskan lux. 2019.[Internet].[citado el 5 de Marzo de 2021]. Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCSM_c417ba088ffa785e763baef43bd2249d
78. Colorado M, Ospina M, Lerma S. Evaluación de producción de *Haematococcus pluvialis* y *Arthrospira maxima* hasta 500 ml como fuente alternativa de proteína y antioxidantes para seguridad alimentaria, en condiciones ambientales de la Sabana de Bogotá, Colombia. 2019. Vol 5; Pág 61-67 [Internet].[citado el 5 de Marzo de 2021]. Disponible en: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/rtyp>
79. Guajardo C. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de lípidos y carotenoides totales en un extracto hexánico de *Haematococcus pluvialis* en distintos periodos de estrés. [Internet].[citado el 7 de Marzo de 2021]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/18353/>
80. Lia X, Wanga X, Duana C, Yia S, Gaob Z, Xiaoc C et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. 2020 [citado el 26 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073497502030104X>
81. Agudelo E. Las microalgas como fuente de nutrientes en vías de desarrollo. [Internet]. 2020 [citado el 10 de Marzo de 2021]. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/107312/1/Las_microalgas_como_fuente_de_nutrientes_en_vias_de_d_Agudelo_Rivera_Esteban.pdf
82. Rodríguez N. Camacho JE. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2020. [Citado el 11 de agosto de 2021].
83. Quintero E. Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la producción del pigmento astaxantina. [Internet]. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico] Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2020. [Citado el 11 de agosto de 2021].
84. Cara E. Caracterización y extracción de lípidos de microalgas. [Internet]. [Trabajo de grado para optar por el título de INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL]. 2020. [Citado el 25 de julio de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/8941/tfg-miq-car.pdf?sequence=1>
85. Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. [Internet]. 2020 [citado el

16 de Marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/9/459>

86. Guajardo C, Galán L, Beltrán , Quintero I, Pacheco F, Pereyra B, et al. Effect of *Ascophyllum nodosum* extracts on the growth, yield and antioxidant capacity of *Haematococcus pluvialis* carotenoids. [Internet]. 2020 [citado el 16 de Marzo de 2021]. Disponible en: <https://panambi.uv.cl/index.php/rbmo/article/view/2396>

87. Aparicio R. Evaluación del efecto & la astaxantina y del licopeno sobre el síndrome metabólico. [Internet]. 2020 [citado el 23 de Marzo de 2021]. Disponible en: <https://gredos.usal.es/handle/10366/145530>

88. Parra B. Incremento en la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* cultivada en agua residual de invernadero. [Internet]. 2020 [citado el 10 de Abril de 2021]. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2263>

89. Lienqueo M, Leyton A. Extracción de compuestos antimicrobianos y antioxidantes desde microalgas. [Internet]. 2020. pág. 20-22 [citado el 20 de Abril de 2021]. Disponible en: <https://vrip.unmsm.edu.pe/seminario-internacional-de-biotecnologia/>

90. Flores L, Hernández H , Ruiz A , Oscanoa A. Protocolo para determinación de astaxantina en microalgas cultivadas. [Internet]. 2021. Vol 48 [citado el 20 de Abril de 2021]. Disponible en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/3532>

91. Ezquerro J, Chan J. Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos. [Internet]. 2021. vol, 5. [Citado el 3 de julio de 2021]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582021000100186&script=sci_arttext