

***EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE
NITRÓGENO Y ALTA IRRADIANCIA COMO FACTOR DE
ESTRÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN
Haematococcus pluvialis POR MEDIO DE CULTIVOS
REALIZADOS EN EL BIORREACTOR BIOSTAT® A PLUS***

AUTORES


**MÓNICA ALEJANDRA MANRIQUE PINZÓN
DAVID LEONARDO MARÍN CORREDOR**

ASESORA INTERNA

**JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN
MSC. DOCTORA EN BIOCENCIAS**


**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C 2019**

INTRODUCCIÓN



La importancia de los colorantes a nivel industrial radica en que ellos le proporcionan un color visualmente llamativo, convirtiendo los productos en fácilmente reconocibles y atractivos para su consumo.

Durante mucho tiempo dicha industria ha optado por utilizar colorantes sintéticos en lugar de los naturales, debido a su bajo costo y su alta capacidad de colorear los productos.



El reemplazo de los colorantes artificiales es posible gracias a que se ha evidenciado que se pueden obtener de manera natural que no sean tóxicos para la salud y que además posean las características necesarias a nivel industrial.

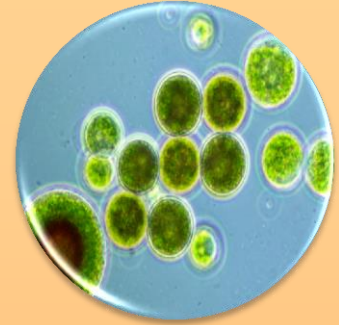
Recientemente se ha observado un cambio en esta práctica por sus actividades mutagénicas y cancerígenas, lo cual ocasiona graves repercusiones en la salud.



La tartrazina un colorante artificial amarillo anaranjado usado en la industria textil, alimentaria y cosmética. Su consumo puede causar reacciones alérgicas como el asma y la urticaria, además de ser posible carcinógeno.



La astaxantina, un pigmento carotenoide producido por síntesis química o naturalmente por una microalga llamada *H. pluvialis*. Dicho pigmento es de gran utilidad en las industrias enfocadas a la producción de medicamentos, alimentos y cosméticos. Precio astaxantina sintética 2500 dólares /kg.



Su producción se ve limitada debido a que la microalga produce este pigmento en condiciones de estrés como mecanismo de resistencia. Cambios evidenciados: proporción clorofila-carotenoide, crecimiento de la célula vegetativa, enquistamiento, maduración y germinación.



El potencial de la astaxantina producida por *H. pluvialis* es por su aplicabilidad en diversas áreas de la industria alimentaria, por ejemplo, su empleo en lugar de la tartrazina.

También en la industria acuícola puede ser utilizada para proporcionar tonalidades rojizas a cultivos de salmónidos y crustáceos. Otras líneas de producción como la cosmética y farmacéutica.

En este proyecto el uso del biorreactor BIOSTAT® A PLUS con medios de cultivo como el BBM y RM nos asegura la generación de un ambiente propicio para el desarrollo y crecimiento de *H. pluvialis* y además nos garantiza un mayor control de las condiciones del cultivo.

FINALIDAD:

- ✓ Ampliar la investigación en el tema de búsqueda de alternativas naturales.
- ✓ Incentivar el uso de sustancias que posean la capacidad de proporcionar las características organolépticas deseables en los alimentos
- ✓ Sustancias que disminuyan los efectos adversos en las personas que los ingieren.
- ✓ Buscar un producto cuya obtención sea sustentable y no requiera de procesos químicos para su síntesis

OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradianza como factor de estrés para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* por medio del cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS.

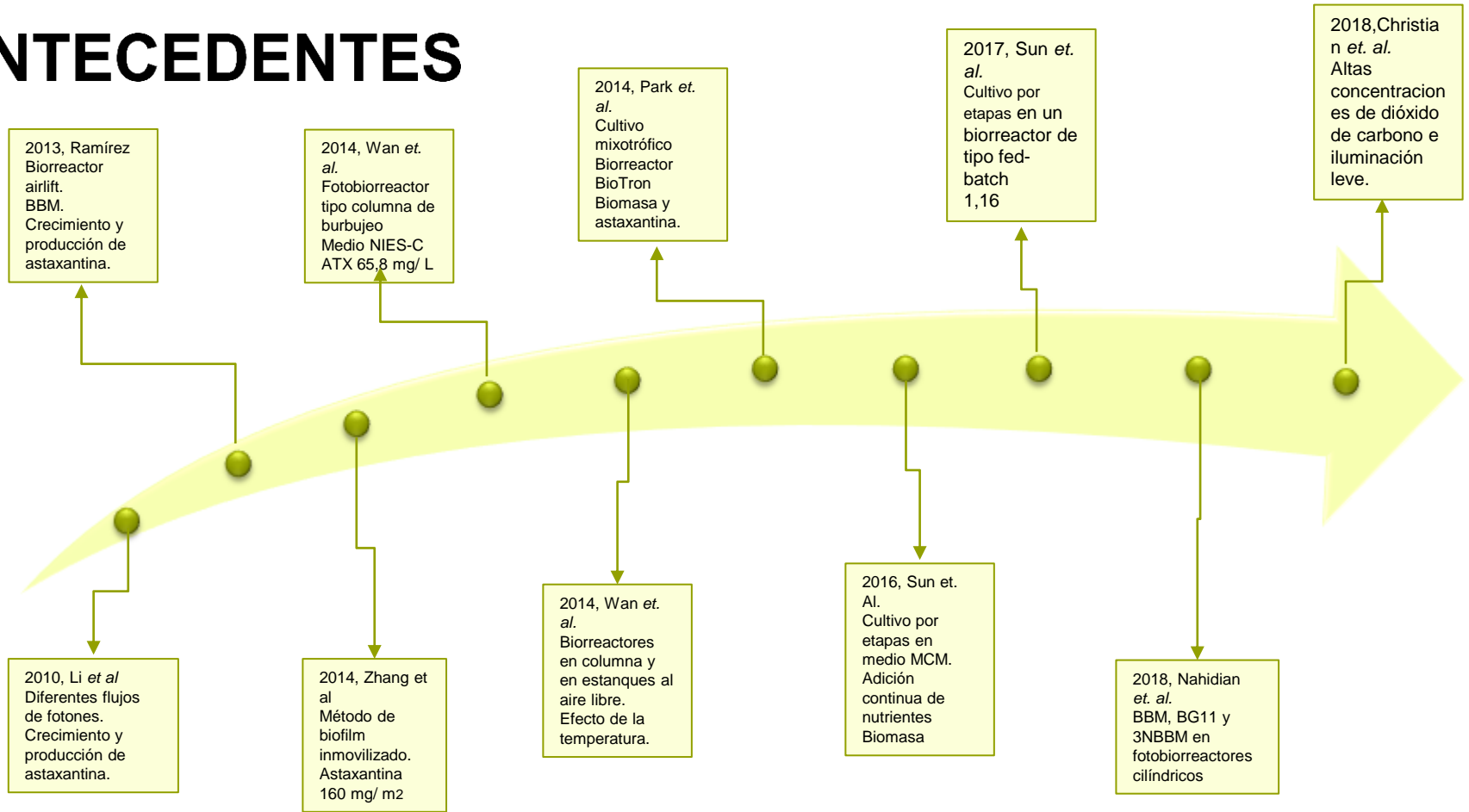
Realizar el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS, a escala de 2L..

Evaluar el cambio morfológico de la microalga durante el periodo de estudio.

Determinar las concentraciones de clorofila y astaxantina producidas por *H.pluvialis* en el tiempo de estudio.

Determinar la concentración de nitrógeno durante el periodo de estudio.

ANTECEDENTES



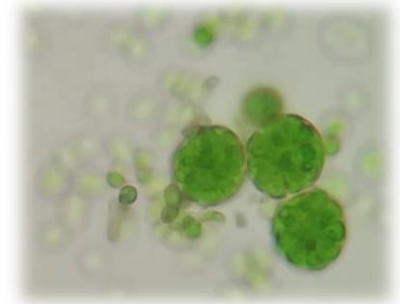
MARCO TEÓRICO

Haematococcus pluvialis

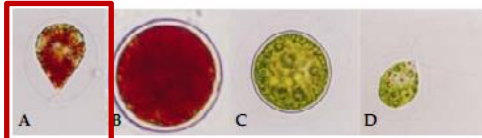
- Microalga unicelular de agua dulce.
- Estados: vegetativo, palmella y aplanospora

- Tamaño que oscila entre los 8 y 50 μm
- Forma ovoidal, presenta flagelos que le brindan movimiento y se reproduce por división celular.

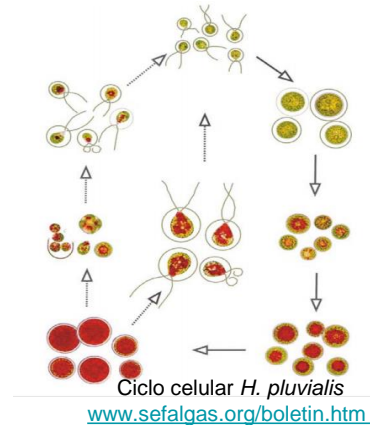
- Capacidad fotosintética para incrementar su biomasa y desarrollarse.
- Genera pigmentos carotenoides como mecanismo de resistencia.



Tomada por los autores



Estadios del ciclo de vida de *H. pluvialis* A) Célula vegetativa procedente de aplanospora; B) Aplanospora; C) Palmella; D) Célula vegetativa www.sefalgas.org/boletin.htm



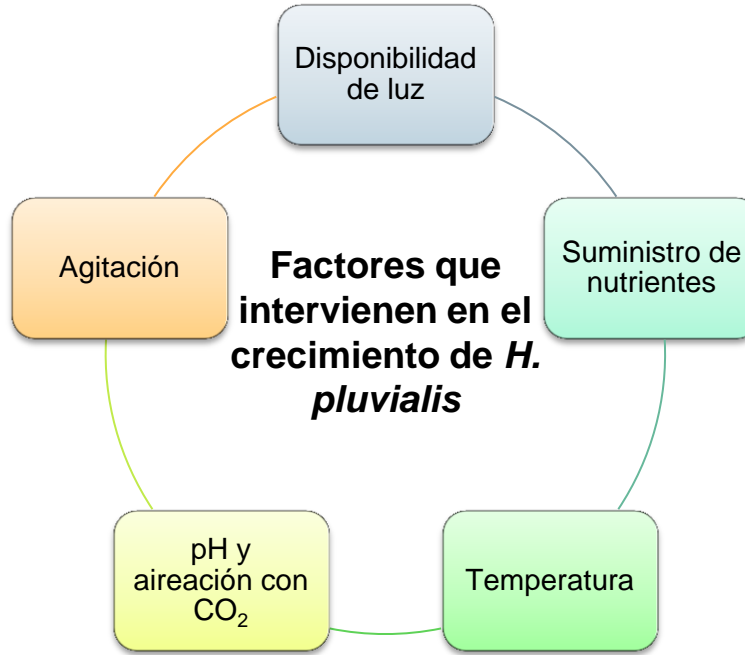
Clasificación :
Imperio Eukaryota
Reino Plantae
Subkingdom Viridiplantae
Infrakingdom Chlorophyta
infrakingdom
Phylum Chlorophyta
Subphylum Chlorophytina
Clase Chlorophyceae
Orden Chlamydomonadales
Familia Haematococcaceae
Género Haematococcus

http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27370&sk=0&from=results



- **Fotoautótrofas**, fotoheterótrofas o mixotróficas.
- Exposición lumínica, colores emitidos.
- **Iluminación roja (625 nm) aumento de la biomasa**
- **Luz entre azul y púrpura (380 y 470 nm) acumulación de astaxantina.** (Katsuda *et.al.* 2004)

- Mezcla homogénea de los nutrientes
- Acceso a condiciones ambientales
- Intercambio gaseoso

- pH que oscila entre 7 y 9
- Acumulan minerales y oxidan compuestos
- Aireación con CO₂ (disminución y fuente C)



- Carbono
- **Nitrógeno (Proteínas)**
- Oxígeno
- Hidrógeno
- **Fósforo (Fotosíntesis)**
- Macronutrientes
- Micronutrientes
- Vitaminas

- Disociación de las moléculas de carbono
- Alteración de las rutas metabólicas
- Biomasa: 28 a 35 °C
- Biomasa y astaxantina: 23 a 28 °C 
- Inf. 28 °C 

Clorofila



Fotosíntesis: metabolismo, crecimiento y reproducción

- Clorofila-a: fotoquímica
- Clorofila-b: estabilizar las proteínas captadoras de luz de la molécula

Colorante natural en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos

Anti inflamatorios, antioxidantes, profilácticos, antiagregante plaquetario, vasoconstrictores y reductores en el riesgo de contraer cáncer.

Astaxantina ($C_{40}H_{52}O_4$)

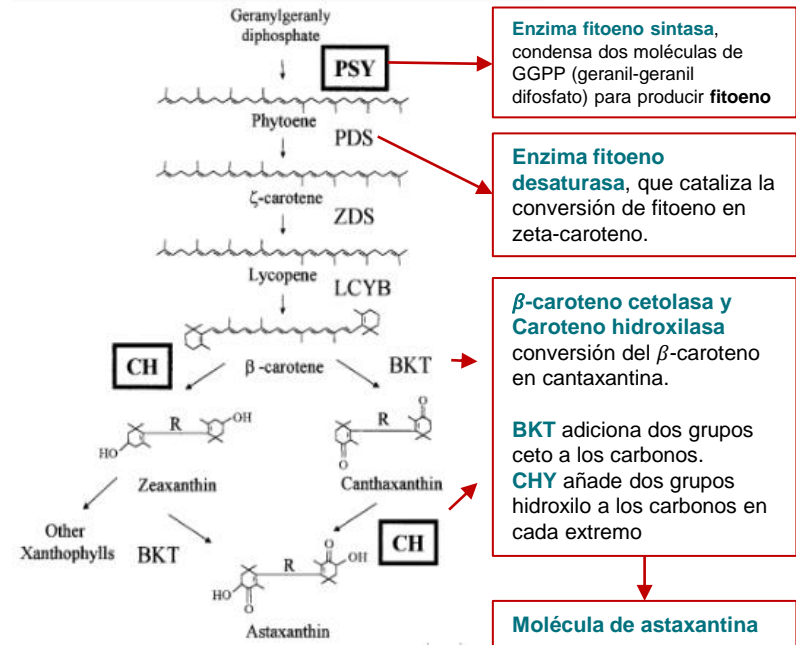
Presente en animales, algunos hongos, bacterias y algas

Uso industrial: alimentos, cosméticos, farmacéutica y textil.

Actividad antioxidante, anti inflamatoria, promueve el s. inmune y anticancerígeno.

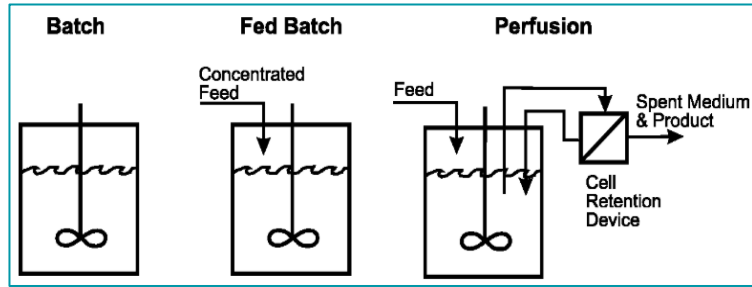
H. Pluvialis mecanismo de resistencia.

Luego del paso a través de diferentes carotenoides que sufren **procesos de oxidación**, se concluye la formación de la molécula de astaxantina.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161038>

Sistemas de cultivo

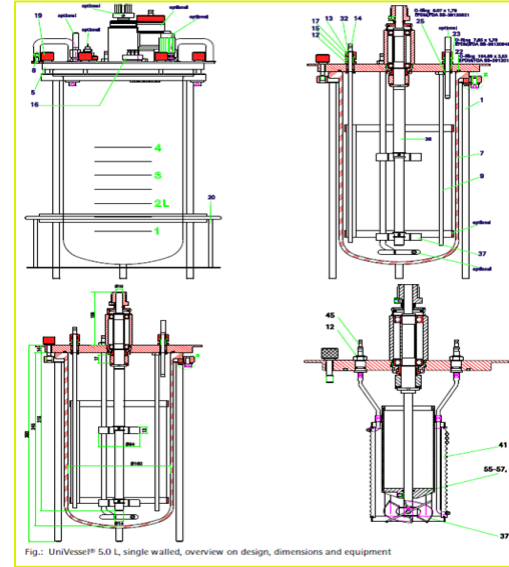


Cantidad fija de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos.

Asegura una alta producción

Asegura producción estable a través del tiempo.

BIOSTAT® A PLUS:



- Cultivo de microorganismos y células de manera continua o discontinua (bacterias, levaduras, hongos y de células animales y vegetales).
- Es un equipo compacto, autoclavable, de material de vidrio translúcido, capacidad de 5 L y sistema electrónico de control para pH, agitación, aireación, temperatura, etc.
- Ideal para proyectos educativos e investigativos

Modelos de crecimiento

- Permiten predecir el comportamiento poblacional que tendrá un microorganismo en un periodo de tiempo determinado.
- Crecimiento similar al microbiano: fase logarítmica; fase estacionaria y fase de muerte.

MODELO	N	FORMULA
Modificado Logístico	3	$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_{max}}{A}(\lambda - t)\right] + 2\right\}}$
Modificado Gompertz	3	$y = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} e}{A}(\lambda - t)\right] + 1\right\}$
Modificado Richards	4	$y = A \left\{1 + v \exp(1 + v) \exp\left[\frac{\mu_{max}}{A}(1 + v)\left(1 + \frac{1}{v}\right)(\lambda - t)\right]\right\}^{\left(\frac{-1}{v}\right)}$
Modificado Schunte	4	$y = \left(\mu_{max} \frac{(1 - \beta)}{\alpha}\right) \left[\frac{1 - \beta \exp(\alpha\lambda + 1 - \beta - \alpha)}{1 - \beta}\right]^{\frac{1}{\beta}}$
Baranyi- Roberts	4	$y = A + \mu_{max} x + \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left(\frac{e^{-\mu_{max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max} x - h_0}}{e^{\mu_{max} x + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max} x - h_0})}} - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} x + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max} x - h_0})}}{e^{(\mu_{max} x - A)}}\right)\right)$
Von Bertalanffy	3	$y = K \left[1 - \left[1 - \left(\frac{A^3}{K}\right)\right] \exp\left(-\frac{t}{K^{\frac{1}{3}}}\right)\right]^3$
Huang	4	$y = A + y_{max} - \ln(e^\lambda + (e^{y_{max}} - e^\lambda)e^{-\mu_{max} B(x)})$ $B(x) = x + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-n(n-1)}}{1 + e^{n-1}}$
Buchanan Fase Tres Modelo Lineal	3	$Y = A \text{ IF } X < LAG$ $Y = A + K(X - \lambda) \text{ IF } \lambda \leq X \leq X_{max}$ $Y = Y_{max} \text{ IF } X \geq X_{max}$

nota:

a= asíntota bacteriana inferior

μ_{max} = tasa maxima de crecimiento específico

v= punto cerca del cual se presenta un crecimiento máximo asíntótico

λ = tiempo de retraso

y_{max} = asíntota bacteriana superior

e= exponente (2.718281828)

t= tiempo de muestreo

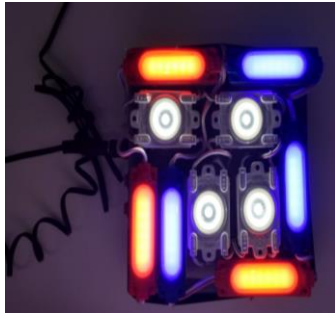
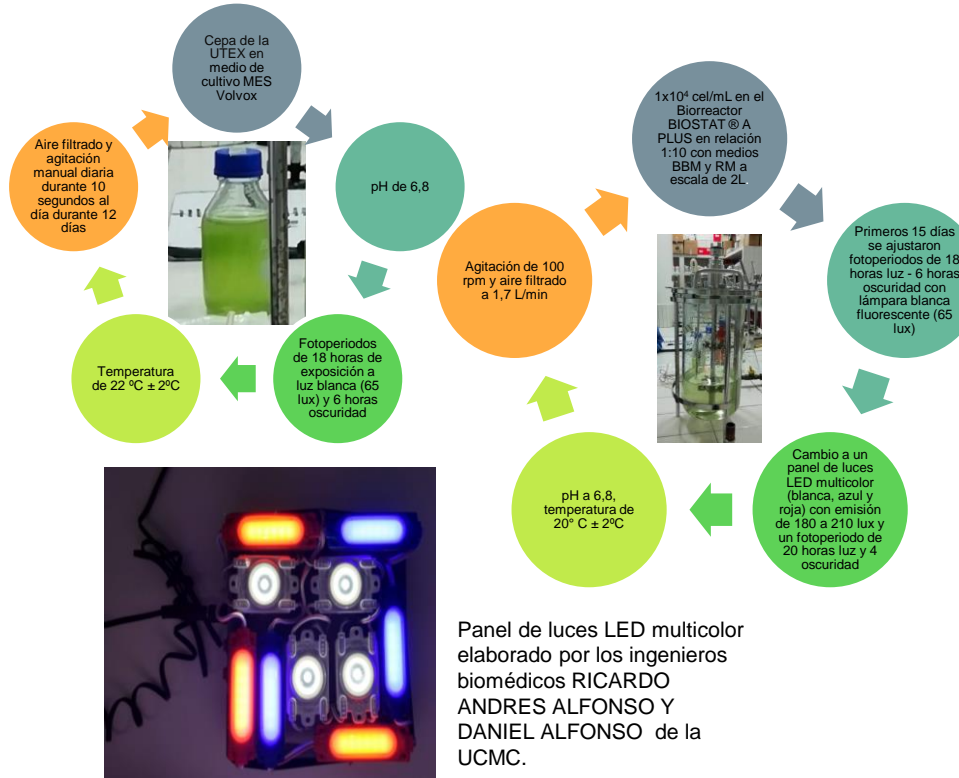
α, β, k = parámetros de ajuste de curva

h_0 = parámetro dimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células

(dia^{-1}) puede ser calculado como $h_0 = \mu_{max}$

DISEÑO METODOLÓGICO

FASE 1: Realización del cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio MES Volvox, BBM y RM.



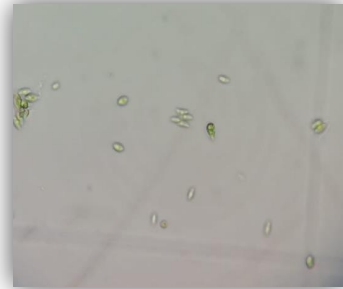
FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
17/08/2018	2	5,66 X10 ⁷	4,33 X10 ⁷	5	5	5,00 X10 ⁵
21/08/2018	6	17	20,33 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	1,87 X10 ⁶
24/08/2018	9	56,33 X1 ⁶	38,66 X10 ⁶	52,66 X10 ⁶	49,22 X10 ⁶	4,92 X10 ⁶
27/08/2018	12	106,66 X10 ⁶	135	86,33 X10 ⁶	109,33 X10 ⁶	1,09 X10 ⁷
30/08/2018	15	153,33 X10 ⁶	203,66 X10 ⁶	225,33 X10 ⁶	194,11 X10 ⁶	1,94 X10 ⁷
03/09/2018	19	270,33 X10 ⁶	234,66 X10 ⁶	269	258	2,58 X10 ⁷
06/09/2018	22	319	264,66 X10 ⁶	235	272,88 X10 ⁶	2,73 X10 ⁷
11/09/2018	27	246,66 X10 ⁶	255,33 X10 ⁶	236,33 X10 ⁶	246,11 X10 ⁶	2,46 X10 ⁷
13/09/2018	29	308,33 X10 ⁶	238,66 X10 ⁶	261,66 X10 ⁶	269,55 X10 ⁶	2,70 X10 ⁷
20/09/2018	36	344,66 X10 ⁶	266,66 X10 ⁶	252,33 X10 ⁶	287,88 X10 ⁶	2,88 X10 ⁷

Conteo celular de *H. pluvialis* en medio BBM. Elaborada por los autores, 2018.

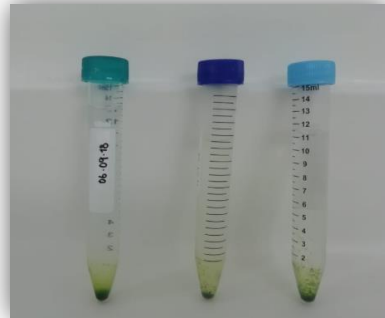
FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
08/10/2018	4	27	18	21,66 X10 ⁶	22,22 X10 ⁶	2,22 X10 ⁶
11/10/2018	7	30,33 X10 ⁶	19,33 X10 ⁶	62	37,22 X10 ⁶	3,72 X10 ⁶
16/10/2018	12	46	43	41,33 X10 ⁶	43,44 X10 ⁶	4,34 X10 ⁶
18/10/2018	14	48,66 X10 ⁶	50	53	50,55 X10 ⁶	5,06 X10 ⁶
22/10/2018	18	71,33 X10 ⁶	73	63,66 X10 ⁶	69,33 X10 ⁶	6,93 X10 ⁶
25/10/2018	21	100,33 X1 ⁶	98,66 X10 ⁶	101	100	1,00 X10 ⁷
29/10/2018	25	192,66 X10 ⁶	168,66 X10 ⁶	156	172,44 X10 ⁶	1,72 X10 ⁷
01/11/2018	28	211,66 X10 ⁶	204,33 X10 ⁶	210	208,66 X10 ⁶	2,09 X10 ⁷
06/11/2018	33	225,66 X10 ⁶	232	232,66 X10 ⁶	230,11 X10 ⁶	2,30 X10 ⁷
08/11/2018	35	241,33 X10 ⁶	241,66 X10 ⁶	245,66 X10 ⁶	242,88 X10 ⁶	2,43 X10 ⁷

Conteo celular de *H. pluvialis* en medio RM. Elaborada por los autores, 2018.

FASE 2: Evaluación del cambio morfológico de las microalgas.



Formas vegetativas biflageladas de *H. pluvialis* en medio MES Volvox. Tomada por los autores, 2018. Tamaño 10X

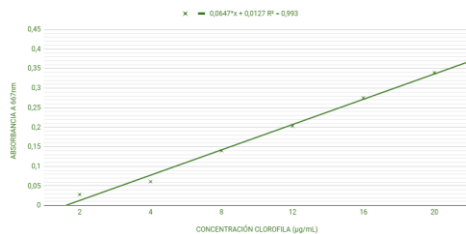
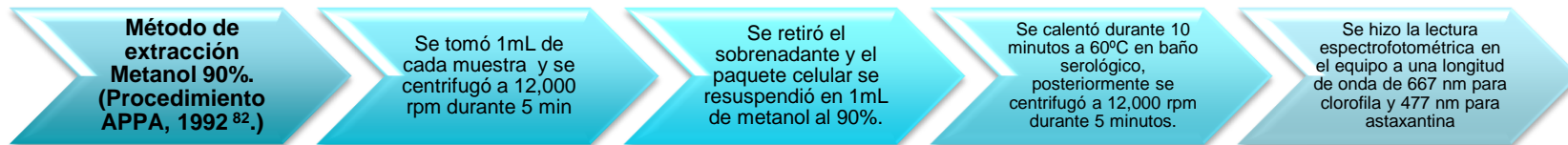


Se evaluó el crecimiento del primer cultivo en medio MES volvox y de los dos cultivos siguientes en los medios BBM y RM por medio de microscopía en cámara de Neubauer, donde se observó el color, morfología y viabilidad celular cada tercer día durante 36 días tomando tres muestras cada día

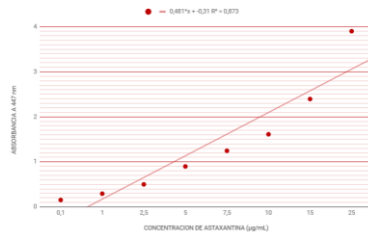
Curva de crecimiento de *H. pluvialis*: número de células contadas en la cámara de Neubauer de las muestras de cada tercer día, desde el día cero hasta el día 12 para el inóculo en el medio mes volvox y para los dos siguientes cultivos en los medios BBM y RM desde el día 0 hasta el día 36.

pH: Se realizó control en el cultivo con un pHmetro (Marca Hanna instruments) cada tercer día durante 36 días, cada día se realizó una medición por triplicado.

FASE 3: Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio.



Curva de calibración para la determinación de la concentración de clorofila. Elaborada por Niño et al, 2017 ⁸⁹.



Curva de calibración para la determinación de la concentración de astaxantina. Elaborada por Niño et al, 2017 ⁸⁹.

MEDIO DE CULTIVO BBM				
DIA	CLOROFILA		ASTAXANTINA	
	µg/ml	µg/cel	µg/ml	µg/cel
2	1	2.00E-07	0	0.00E+00
6	3.8	2.04E-07	0	0.00E+00
9	6.3	1.28E-07	1.2	2.44E-08
12	15.3	1.40E-07	1.7	1.55E-08
15	26.8	1.38E-07	2.5	1.29E-08
19	28.3	1.10E-07	2.6	1.01E-08
22	14.2	5.20E-08	2.7	9.89E-09
27	6.3	2.86E-08	2.9	1.19E-08
29	3.9	1.45E-08	3	1.11E-08
36	2.1	7.29E-09	3.1	1.08E-08
MEDIO DE CULTIVO RM				
DIA	CLOROFILA		ASTAXANTINA	
	µg/ml	µg/cel	µg/ml	µg/cel
4	1	4.50E-08	0	0.00E+00
7	1.2	3.22E-08	0	0.00E+00
12	5.9	1.36E-07	1.3	2.99E-08
14	13.6	2.69E-07	1.6	3.16E-08
18	15.8	2.28E-07	2.4	3.46E-08
21	20.2	2.02E-07	2.5	2.56E-08
25	21.8	1.26E-07	2.6	1.51E-08
28	16.4	7.86E-08	2.71	1.30E-08
33	6.5	2.39E-08	2.83	1.23E-08
35	2.9	1.19E-08	2.9	1.19E-08

Concentración de clorofila y astaxantina para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

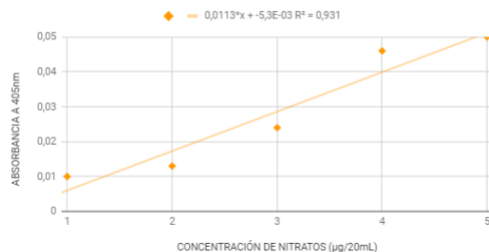
FASE 4: Determinación de la concentración de nitrógeno en el periodo de estudio

Método de colorimetría por nitración con ácido salicílico. (Filippini y colaboradores, 2004 ⁸³.)

Durante 20 minutos se incubaron 20 μL de medio de cultivo diluidos con 400 μL de ácido salicílico al 2,5% (p/v) en H_2SO_4 al 98%

Transcurrido este lapso cada muestra se neutralizó con 500 μL de Hidróxido de sodio (NaOH) 3,8 M ⁸⁴.

Se hizo la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 405 nm, las concentraciones se hallaron en $\mu\text{g}/20\text{mL}$.



Curva de calibración para la determinación de la concentración de nitratos. Elaborada por Leiton, 2018 ⁹⁴.

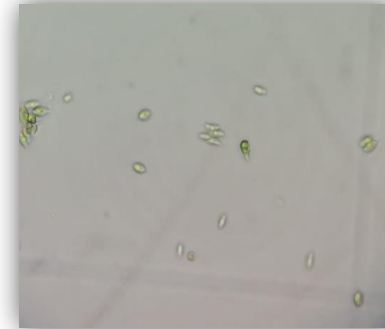
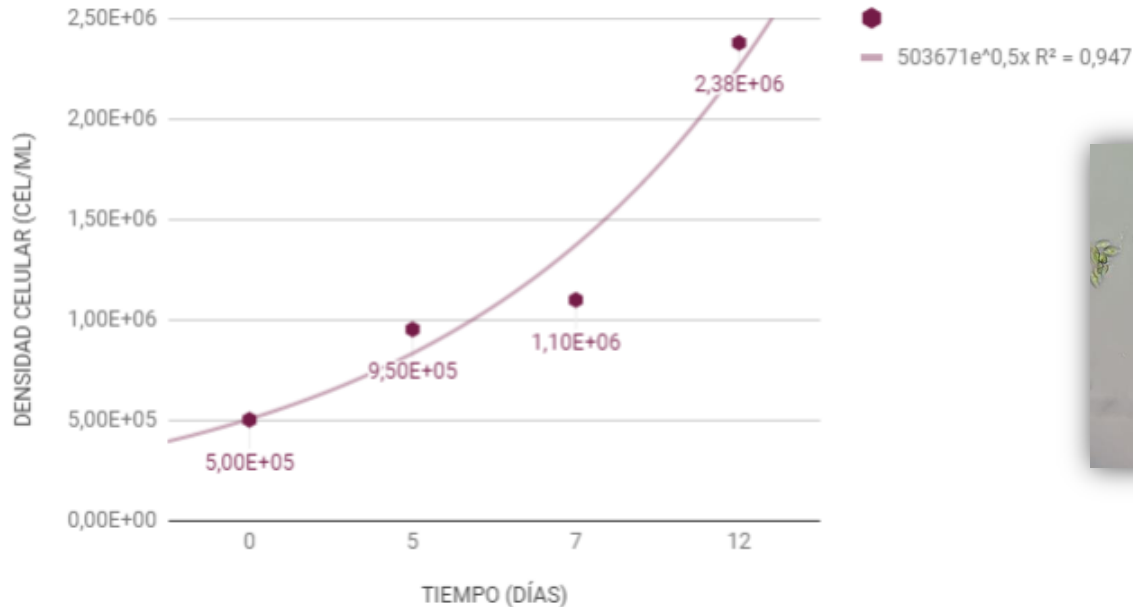
MEDIO DE CULTIVO BBM	
DÍA	NITRATOS ($\mu\text{g}/20\text{mL}$)
12	80,32
15	55,63
19	47,04
22	44,39
27	44,18
29	14,68
36	6,51
MEDIO DE CULTIVO RM	
DÍA	NITRATOS ($\mu\text{g}/20\text{mL}$)
12	50,82
14	43,83
18	40,14
21	33,59
25	31,14
28	22,85
33	21,47
35	16,66

Concentración de nitratos para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1: Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medios Mes Volvox, BBM y RM

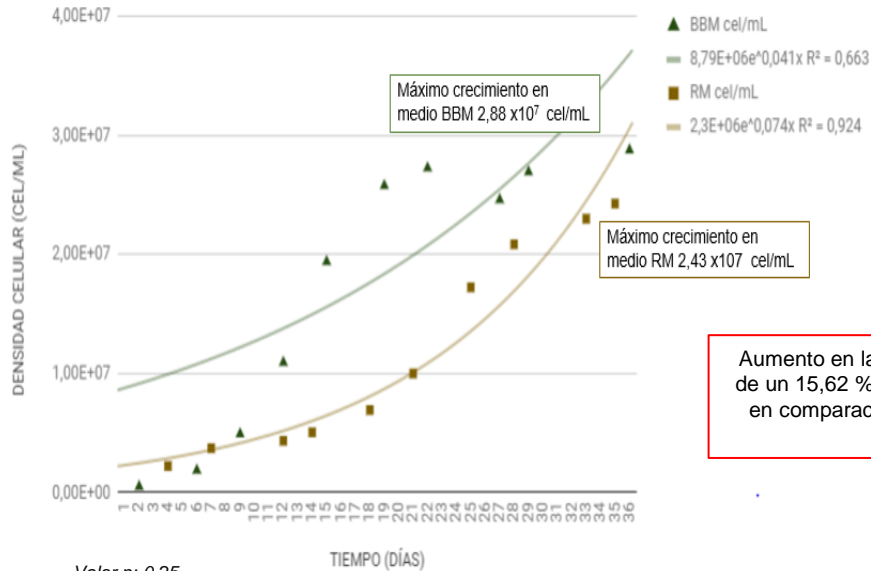
CURVA DE CRECIMIENTO *H. pluvialis* INÓCULO MES VOLVOX



Formas vegetativas biflageladas de *H. pluvialis* en medio MES Volvox. Tomada por los autores, 2018. Tamaño 10X

Fase 1: Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medios Mes Volvox, BBM y RM

CURVA DE CRECIMIENTO *H. pluvialis* COMPARATIVO MEDIO BBM vs RM



Niño *et al*, 2013

Leiton, 2018

Imamoglu *et al*, 2007

Ramírez, 2013

Aumento en la densidad celular de un 15,62 % en el medio BBM en comparación con el medio RM.

FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
17/08/2018	2	5,66 X10 ⁶	4,33 X10 ⁶		5	5,00 X10 ⁶
21/08/2018	6	17	20,33 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	18,66 X10 ⁶	1,87 X10 ⁷
24/08/2018	9	56,33 X10 ⁶	38,66 X10 ⁶	52,66 X10 ⁶	49,22 X10 ⁶	4,92 X10 ⁷
27/08/2018	12	106,66 X10 ⁶	135	86,33 X10 ⁶	109,33 X10 ⁶	1,09 X10 ⁷
30/08/2018	15	153,33 X10 ⁶	203,66 X10 ⁶	225,33 X10 ⁶	194,11 X10 ⁶	1,94 X10 ⁷
03/09/2018	19	270,33 X10 ⁶	234,66 X10 ⁶		269	2,58 X10 ⁷
06/09/2018	22	319	264,66 X10 ⁶		235	2,73 X10 ⁷
11/09/2018	27	246,66 X10 ⁶	255,33 X10 ⁶	236,33 X10 ⁶	246,11 X10 ⁶	2,46 X10 ⁷
13/09/2018	29	308,33 X10 ⁶	238,66 X10 ⁶	261,66 X10 ⁶	269,55 X10 ⁶	2,70 X10 ⁷
20/09/2018	36	344,66 X10 ⁶	266,66 X10 ⁶	252,33 X10 ⁶	287,88 X10 ⁶	2,88 X10 ⁷

Conteo celular de *H. pluvialis* en medio BBM. Elaborada por los autores, 2018.

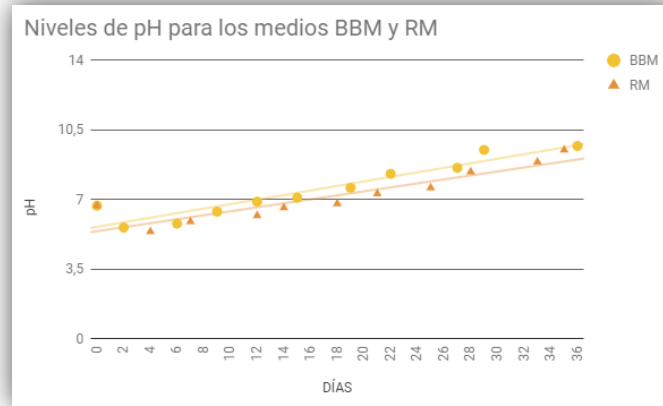
FECHA	DÍA	RÉPLICAS			PROMEDIO cel/mL	Número de cel/mL
		Réplica 1 cel/mL	Réplica 2 cel/mL	Réplica 3 cel/mL		
08/10/2018	4	27	18	21,66 X10 ⁶	22,22 X10 ⁶	2,22 X10 ⁷
11/10/2018	7	30,33 X10 ⁶	19,33 X10 ⁶	62	37,22 X10 ⁶	3,72 X10 ⁷
16/10/2018	12	46	43	41,33 X10 ⁶	43,44 X10 ⁶	4,34 X10 ⁷
18/10/2018	14	48,66 X10 ⁶	50	53	50,55 X10 ⁶	5,06 X10 ⁷
22/10/2018	18	71,33 X10 ⁶	73	63,66 X10 ⁶	69,33 X10 ⁶	6,93 X10 ⁷
25/10/2018	21	100,33 X10 ⁶	98,66 X10 ⁶		101	1,00 X10 ⁸
29/10/2018	25	192,66 X10 ⁶	168,66 X10 ⁶		156	1,72 X10 ⁸
01/11/2018	28	211,66 X10 ⁶	204,33 X10 ⁶		210	2,09 X10 ⁸
06/11/2018	33	225,66 X10 ⁶	232	232,66 X10 ⁶	230,11 X10 ⁶	2,30 X10 ⁸
08/11/2018	35	241,33 X10 ⁶	241,66 X10 ⁶	245,66 X10 ⁶	242,88 X10 ⁶	2,43 X10 ⁸

Conteo celular de *H. pluvialis* en medio RM. Elaborada por los autores, 2018.

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
BBM	10	5,7	7,5	2,03	73%
RM	10	6,3	7,4	2,56	92%

El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM incrementándose en un 20,7% frente al crecimiento en el BBM por día.

Fase 1: Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medios Mes Volvox, BBM y RM



Benavente *et al*,
2012

García, 2012

Los medios de cultivo BBM y RM inicialmente se ajustaron a un pH de 6,8 (día 0).

Niveles disminuyen a 5,6 y 5,4 respectivamente a los dos días de cultivo.

Aumento progresivo en el nivel de pH llegando hasta una medición de 9,7 para el cultivo en el medio BBM y a 9,5 para el cultivo en el medio RM a los 36 días.

Porcentaje de disminución inicial para el medio BBM de 16,4 % y para el medio RM de 19,4%

Adaptación al entorno.

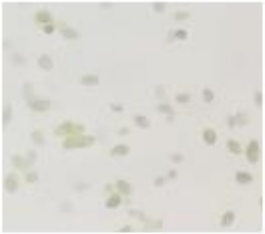


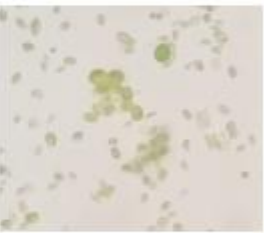
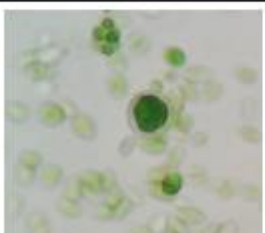
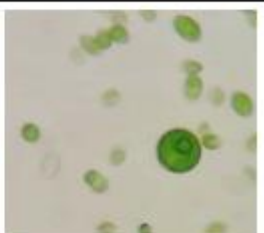
Porcentaje de aumento al final de los estudios de 44,7% y de 41,7% respectivamente

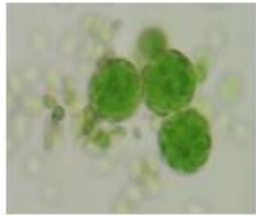
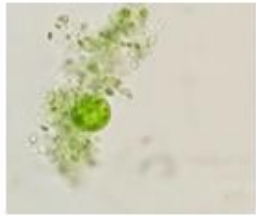






Oxidación de compuestos

Fase 2: Evaluación del cambio morfológico de las microalgas. Caracterización macroscópica de *H. pluvialis* en medio BBM y RM

Día de cultivo	Medio BBM	Medio RM						
1			12			29		
9			15			33		
			22			36		

Caracterización microscópica de *H. pluvialis* en medio BBM y RM

Día de cultivo	Medio BBM	Medio RM
5		
12		
15		

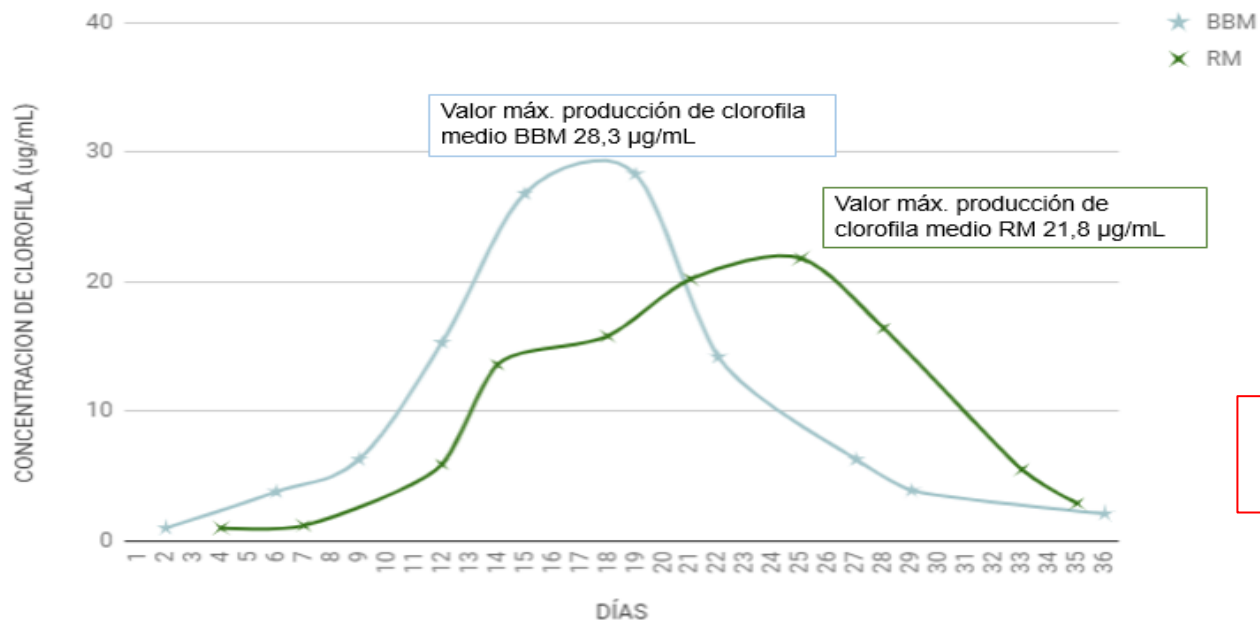
22		
29		
33		
36		

FASE 3: Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio en los medios BBM y RM.

Pérez y Ayala,
2018

Leiton, 2018

Concentración de clorofila en $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM

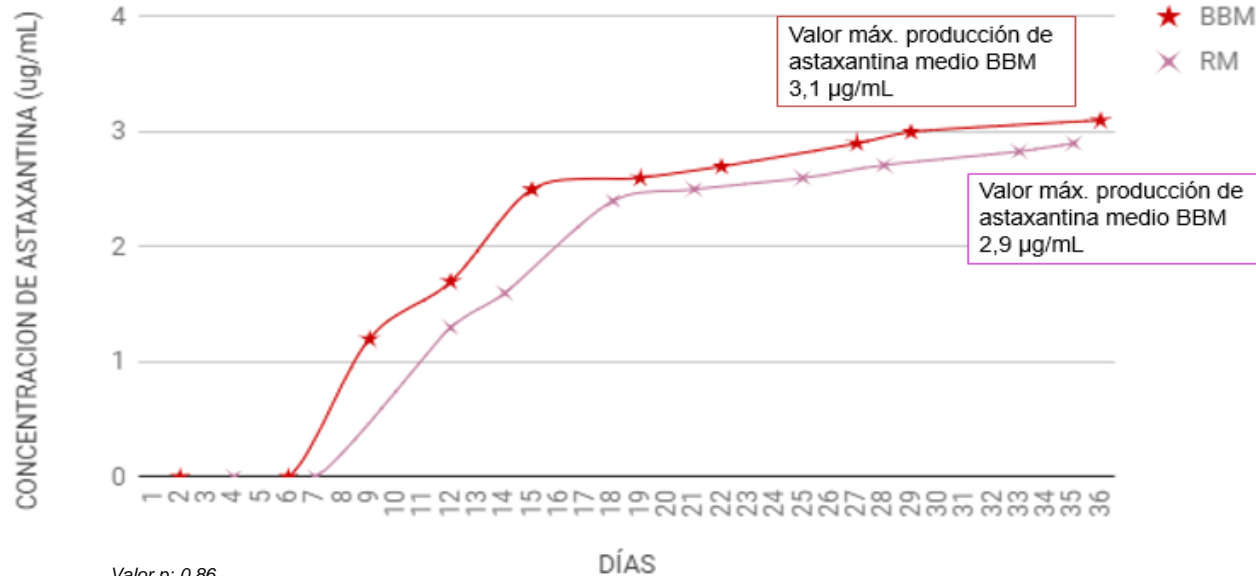


Valor p: 0,92

Aumento en el medio BBM del 22,96% en relación al medio RM.

FASE 3: Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina producidas por *H. pluvialis* en el tiempo de estudio en los medios BBM y RM.

Concentración de astaxantina $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM.



Pérez y Ayala, 2018

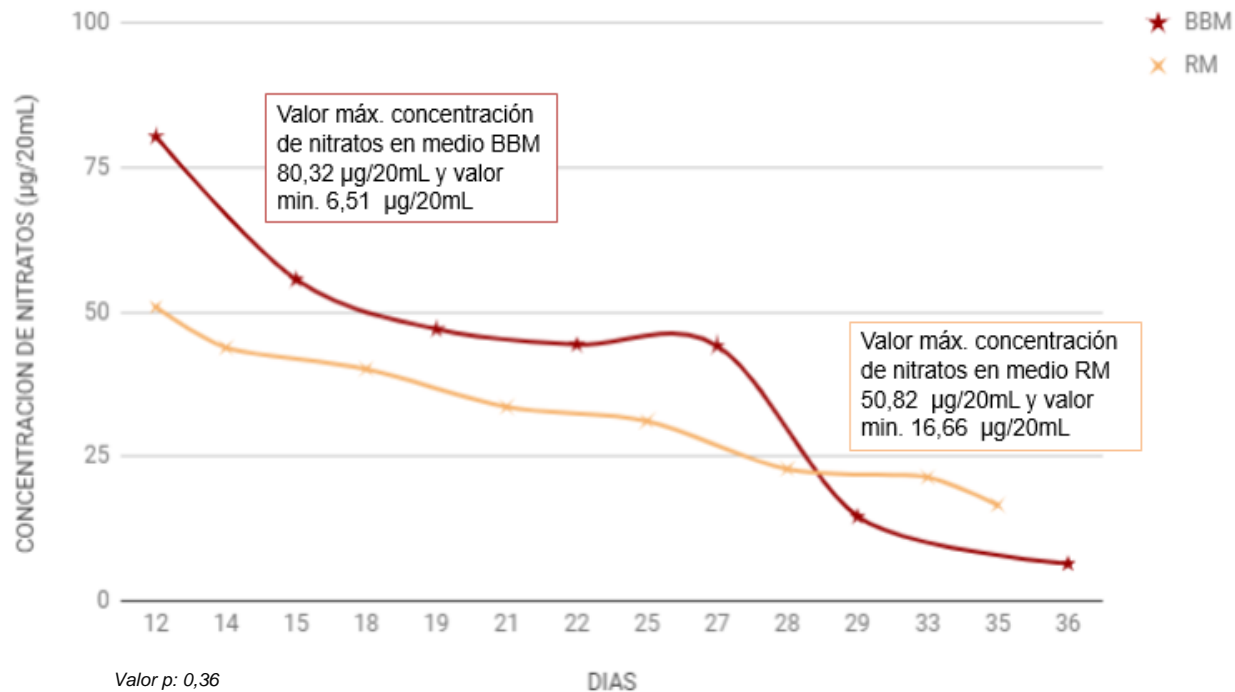
García, 2018

Valor p : 0,86

El medio BBM se incrementó solamente en un 6,4% frente al medio RM hacia el último día del cultivo.

FASE 4: Determinación de la concentración de nitrógeno.

Concentración de nitratos en $\mu\text{g}/20\text{mL}$ para los medios BBM y RM.



Imamoglu *et al*,
2009

Pérez y Ayala,
2018

En el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de 91,89% y en el medio RM fue de 67,21%.

Tabla resumen de resultados obtenidos en los cultivos de la microalga *H. pluvialis* en medios BBM y RM.

Característica	Resultados obtenidos en medio BBM	Resultados obtenidos en medio RM	
Crecimiento celular	2,88 x10 ⁷ cel/mL	2,43 x10 ⁷ cel/mL	Aumento en la densidad celular de un 15,62 % en el medio BBM en comparación con el medio RM.
Velocidad de crecimiento	2,03 cel/día	2,56 cel/día,	El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM incrementándose en un 20,7% frente al crecimiento en el BBM por día.
Valor máximo de concentración de clorofila	28,3 µg/mL	21,8 µg/mL	Aumento en el medio BBM del 22,96% en relación al medio RM.
Valor máximo de concentración de astaxantina	3,1 µg/mL	2,9 µg/mL	El medio BBM se incrementó solamente en un 6,4% frente al medio RM hacia el último día del cultivo.
Porcentaje de consumo de nitrógeno	91,89%	67,21%,	En el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de 91,89% y en el medio RM fue de 67,21%.

CONCLUSIONES

Se observa el efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS.

BBM presentó una mayor biomasa de la microalga *H. pluvialis* hacia el día 36 del estudio con una densidad celular de $2,88 \times 10^7$ cel/mL en comparación al medio RM con un conteo de $2,43 \times 10^7$ cel/mL.

Macroscópicamente se apreció una variación en el color del medio desde un verde muy claro hasta un verde oscuro intenso por la alta producción de biomasa y microscópicamente se observó la presencia de células en fase vegetativa y en fase de palmella, algunas aplanosporas enquistadas en los cultivos realizados en los medios BBM y RM.

La producción y acumulación de clorofila se vio incrementada en el medio BBM, en el cual hacia el día 19 se llega hasta una acumulación de $28,3 \mu\text{g/mL}$ y por otra parte en el medio RM se observa la mayor producción de clorofila de $21,8 \mu\text{g/mL}$ hasta el día 25.

La acumulación de astaxantina en la etapa final de los cultivos también fue mayor en el medio BBM con una concentración de $3,1 \mu\text{g/mL}$ en relación al medio RM que llegó a una acumulación de $2,9 \mu\text{g/mL}$.

La disponibilidad de nitratos en el medio de cultivo BBM decreció en un 91,89% desde una concentración de $80,32 \mu\text{g/20mL}$ hasta $6,51 \mu\text{g/20mL}$, mientras tanto para el medio RM decreció en un 67,21% desde $50,82 \mu\text{g/20mL}$ hasta $16,66 \mu\text{g/20mL}$.

RECOMENDACIONES

Uso del biorreactor BIOSTAT ® A PLUS y de cualquiera de los medios BBM o RM bajo las condiciones trabajadas para próximos estudios en microalgas.

Prolongar el periodo de cultivo y el uso de lámparas LED de mayor irradiancia.

Evaluar la expresión génica involucrada en el proceso de acumulación del caroteno.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a:

- UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA, lugar donde se desarrolló el proyecto.
- Doctora en biociencias JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN, asesora del proyecto.
- Al Grupo de Bioprocesos y Control por la logística y apoyo material del proyecto.
- Al Laboratorio central de la universidad y a los ingenieros biomédicos RICARDO ANDRES ALFONSO Y DANIEL ALFONSO de SMM INGENIERIA S.A.S.
- DOCENTES Y DIRECTIVOS UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA – FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.
- A las docentes Myriam Stella Silva Marin, Carolina Jaime Rodriguez y Angie Johanna Sánchez Castro, jurados asignadas al proyecto.

REFERENCIAS

1. Luna, L. G., Menéndez, J., Álvarez, I., & Autor, F. (2009). 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, 9 (2), 105–117. 2.
2. González, M. A., Cifuentes, A. S., & Gómez, P. I. (2009). GROWTH AND TOTAL CAROTENOID CONTENT IN FOUR CHILEAN STRAINS OF *Gayana Bot*, 66 (1). [Internet]. Available from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gbot/v66n1/art06.pdf>
3. Imamoglu, E., Dalay, M. C., & Sukan, F. V. (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 26 (3–4), 199–204. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2009.08.007>
4. Silva, A. S. M. (2010) EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR Y DE LOS PIGMENTOS OBTENIDOS DE LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) CULTIVADA EN DIFERENTES MEDIOS . [Internet]. Available from: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., & Hu, Q. (2010). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22 (3), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9453-6>
6. Ramírez, D. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift . [Internet]. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
7. Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Lie, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 158, 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.02.044>
8. Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresource Technology*, 163, 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.04.017>
9. Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 167, 276–283. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.06.030>
10. Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M.-E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37 (10), 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>

11. Zhao, Y., Shang, M., Xu, J.-W., Zhao, P., Li, T., & Yu, X. (2015). Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry* , 50 (12), 2072–2077. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.09.004>
12. Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., & Yamaji, H. (2015). Effects of 72 temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 119 (3), 345–350. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2014.09.002>
13. Granda G. (2015). PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS . [Internet]. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
14. Sun, H., Guan, B., Kong, Q., Geng, Z., & Wang, N. (2016). Repeated cultivation: non-cell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports* , 6 (1), 20578. <https://doi.org/10.1038/srep20578>
15. Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology* , 204 , 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.12.076>
16. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and Bioprocess Processing* , 99 , 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2016.03.002>
17. Lv, H., Xia, F., Liu, M., Cui, X., Wahid, F., & Jia, S. (2016). Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research* , 20 , 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.09.019>
18. Panis, G., & Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research* , 18 , 175–190. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.06.007>
19. Gao, X., Wang, X., Li, H., Roje, S., Sablani, S. S., & Chen, S. (2017). Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Research* , 23 , 20–27. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.12.018>
20. Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* , 233 , 326–331. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.011>

21. Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* , 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
22. Pang, N., & Chen, S. (2017). Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Algal Research* , 21 , 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.12.003>
23. Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., & Hu, Z. (2017). Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. *Aquatic Toxicology* , 183 , 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2016.12.008>
24. Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M., & Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology* , 255 , 229–237. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.01.130>
25. Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., & Peng, C.-A. (2018). Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology* , 256 , 548–551. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.02.074>
26. Córdoba-castro, N. M., Acero-reyes, N. L., Duque-buitrago, L. F., Juliana, L., & Serna-jiménez, J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*, 73–82. [Internet]. Available from: <http://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/download/426/729>
27. Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology . [Internet]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118567166>
28. Ruiz, G. (2016). Caracterización microbiológica y mantenimiento de dos cepas de microalgas para la producción de complemento alimenticio, lípidos y otros productos de valor agregado. [Internet]. Available from: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/22400/RUIZ%20BECERRA%2C%20GABRIELA%20ANALI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology* , 37 (2), 217–226. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003669>

30. Domínguez, A., Fábregas, J., & Otero, A. (2006). Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *ALGAS* , 35 , 4–8. [Internet]. Available from: www.sefalgas.org/boletin.htm
31. Fábregas, J., Domínguez, A., Maseda, A., & Otero, A. (2003). Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 61 (5–6), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1204-4>
32. Domínguez, A., Ferreira, M., Coutinho, P., Fábregas, J., & Otero, A. (2005). Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain. *Aquaculture* , 250 (1–2), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.005>
33. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA. (2014). INGENIERÍA DE PROCESOS APLICADA A LA BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS. [Internet]. Available from: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>
34. Camacho J., Lanjeros Ana., Huérfano M. (2015). CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* , 14 (1), 54–69.
35. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances* , 36 (1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
36. Li, Y., Huang, J., Sandmann, G., & Chen, F. (2009). HIGH-LIGHT AND SODIUM CHLORIDE STRESS DIFFERENTIALLY REGULATE THE BIOSYNTHESIS OF ASTAXANTHIN IN *CHLORELLA ZOFINGIENSIS* (CHLOROPHYCEAE). *Journal of Phycology* , 45 (3), 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
37. Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., & Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* , 35 (1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.016>
38. Kim, Z.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-S., & Lee, C.-G. (2006). Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* , 39 (3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.041>
39. Fabregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., & Otero, A. (1999). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* . [Internet]. Available from: <https://eurekamag.com/pdf/009/009930160.pdf>

40. Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.-P., Zarka, A., & Chen, F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters* , 21 (7), 601–604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
41. Steinbrenner, J., & Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology* , 125 (2), 810–817. [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161038>
42. Kurmen, J., C., Gonzalez, G., & Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés 1. *Nova*, 11(19), 91–102. [Internet]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702013000100009&script=sci_arttext&tlng=pt
43. Benavente, J., Montañez, J., Aguilar, C., Mendez, A., & Valdivia, B. (2012). Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7).
44. Bouterfas, R., Belkoura, M., & Dauta, A. (2002). Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 489(1), 207–217. <https://doi.org/10.1023/A:1023241006464>
45. Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* , 102 (1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.158>
46. FAO. (2009). LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO Y SU IMPORTANCIA EN ACUACULTURA. [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>
47. García, L. M. (2012). ELIMINACIÓN DE CO₂ CON MICROALGAS AUTÓCTONAS [Internet]. Available from: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ON-MART%25C DNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>
48. CONTRERAS, C., PEÑA, J., FLORES, L., Cañizares, R. (2003). AVANCES EN EL DISEÑO CONCEPTUAL DE FOTOBIORREACTORES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS (Vol. 28). [Internet]. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33908304.pdf>
49. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances* , 36 (1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.09.009>

50. Vallero, D. A. (2010). Systems. *Environmental Biotechnology* , 167–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375089-1.10004-2>
51. Streit, N., Ramírez L, G., Zepka, L., Jacob-Lopes, E., & Queiroz, M. (2015) Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. Retrieved from [http://www.uteg.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N2_3Streit et al.pdf](http://www.uteg.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N2_3Streit%20et%20al.pdf)
52. Ropp, R. C. (2013). The Alkaline Earths as Metals. *Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds* , 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59550-8.00001-6>
53. Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* , 1807 (8), 968–976. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2011.01.002>
54. İnanç, A. L. (n.d.). Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils . Retrieved from <http://www.academicfoodjournal.com>
55. Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* , 13 (11), 361–371. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00182-6)
56. Rubio Fernández, D., Barrera Flórez, N. A., Angélica, L., Buitrago, F., & Jaimes Baquero, C. E. (2017). Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Semilleros Formación Investigativa* , 3 (1), 35–48. [Internet]. Available from: http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6436/1/COL004696_1-2017-1-IQ.pdf
57. Hammond, B. R., Renzi, L. M., & Renzi, L. M. (2013). Carotenoids. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* , 4 (4), 474–476. <https://doi.org/10.3945/an.113.004028>
58. Baldomero Fernandez. (2013). Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis* . universidad de sevilla. [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Baldo_Fernandez_Cordero/publication/308631830_Produccion_de_carotenoides_por_microalgas_y_caracterizacion_de_la_ruta_carotenogenica_en_Chlorella_zofingiensis/links/5808cb7408aefaf02a2feaa5/Produccion-de-carotenoides-po
59. Martínez. A., Vicario. I., & Heredia. F. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109–117. [Internet]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2007/2/art-2/>

60. Martínez, A, Vicario, I, & Heredia, F. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* , 54 (2), 149–155. [Internet]. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003
61. Carranco, M, Calvo, M, & Pérez, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* , 61 (3). [Internet]. Available from: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
62. Johnson, E. J. (2002). The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in Clinical Care* , 5 (2), 56–65. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5408.2002.00004.x>
63. Rao, A., & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* , 55 (3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
64. Linnewiel-Hermoni, K., Paran, E., & Wolak, T. (2016). Carotenoid Supplements and Consumption. In *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. 473–489). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00034-0>
65. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2003; 21(5):210–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903000787>
66. Sánchez, A, Flores-Contreras L, Langley, E, Martín, R., Maldonado G., y Sánchez S. Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología* [Internet]. 1999; 41:175–91. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-1999/mi993j.pdf>
67. Kobayashi M. In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2000; 54(4):550–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000416>
68. Lorenz R. A technical review of *Haematococcus* algae. *Naturose Tech Bull* [Internet]. 1999; 1–15. Available from: <https://www.cyanotech.com/pdfs/bioastin/axbul60.pdf>
69. Zhu C, Naqvi S, Capell T, Christou P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2009; 483(2):182–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992217>

70. Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga. *Plant Mol Biol* [Internet]. 2003; 343–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12856941>
71. López Emparán A, Gajardo H, Stange CR, Federico ML. Ingeniería metabólica del contenido de carotenoides en *Brassica napus* L. a través de la sobreexpresión semilla-específica de un gen PSY endógeno. *Rev agronómica del noroeste argentino* [Internet]. 2017; 37(2):133–43. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314-369X2017000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
72. Chang JJ, Thia C, Lin HY, Liu HL, Ho FJ, Wu JT, et al. Integrating an algal β -carotene hydroxylase gene into a designed carotenoid-biosynthesis pathway increases carotenoid production in yeast. *Bioresour Technol* [Internet]. 2015; 184:2–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25537137>
73. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* [Internet]. 1991; 63(1):141–6. Available from: <https://www.iupac.org/publications/pac/pdf/1991/pdf/6301x0141.pdf>
74. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Agric Food Chem* [Internet]. 2000; 48(4):1150–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775364>
75. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T., Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* , 231–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00007-8>
76. Sartorius. Biostat® aplus El fermentador biorreactor compacto autoclavable . Retrieved from www.sartorius-stedim.com
77. BIOSTAT® A Your professional start in cell cultivation and microbial fermentation . (2014). Retrieved from http://biofermenter.ru/d/708035/d/broch_biostat-a.pdf
78. Halmi, M., Shukor, M., Johari, W. and Shukor, M. (2014). Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta* . *Asian Journal of Plant Biology* (Vol. 2). Retrieved from <http://journal.hibiscuspublisher.com>
79. Sampieri, R. (2014). *METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION* (6ta ed.). Retrieved from <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>

80. Biocyclopedia. Mes-Volvox Medium Composition / Algae Culture Media / Botany / Retrieved from: https://biocyclopedia.com/index/algae/algal_culturing/mes_volvox_medium_composition.php
81. Sociedad Latinoamericana de Nutrición, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Archivos latinoamericanos de nutrición. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (Vol. 54). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011
82. APHA, American Public Health Association, American Waterworks, Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF). Standard Methods for Examination of Water and Sewage and Wastewater. 20a ed. New York; 1992. Retrieved from <https://store.awwa.org/store/productdetail.aspx?productid=28493774>
83. María, A. V., Filippini, F., Martí, L., & Salcedo, C. (n.d.). Determinación de nitratos en vegetales COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS ANALÍTICOS DETERMINATION OF NITRATES IN VEGETABLES COMPARATION OF FOUR ANALYTIC METHODS . Retrieved from http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/153/ValdesAgrarias1-04.PDF
84. Tocquin, P., Fratamico, A., & Franck, F. (2012). Screening for a low-cost Haematococcus pluvialis medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. Journal of Applied Phycology, 24(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>
85. Rodríguez H. Producción de Compuestos de Interés Industrial por Microalgas y Cianobacterias. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Retrieved from <https://www.ibvf.us-csic.es/producción-de-compuestos-de-interés-industrial-por-microalgas-y-cianobacterias>
86. Bolaños, E. (2015). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, Volumen 14, N.º 1. Retrived from: https://www.researchgate.net/publication/266730483_Aplicaciones_biotecnologicas_de_las_microalgas_Biotechnologic_uses_of_microalgae
87. Cobelas, M. A., & Gallardo, T. (1989). Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas . Complutensis NY (Vol. 15). Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/38807363.pdf>
88. Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 49, N°2: 157-173, agosto 2014. Retrieved from <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
89. Milena, C., Castillo, N., Carolina, F., Rivera, R., Díaz, L. E., Graciela, A., & Díaz, L. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis Articulo original producto de la investigación . Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>

90. Domínguez-Bocanegra, A., Guerrero Legarreta, I., Martínez Jeronimo, F., & Tomasini Campocosio, A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92 (2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
91. Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., & Nagai, S. (1992). Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74 (1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R)
92. Imamoglu, E., & Sukan, F. V. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis* Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*, (December 2015).
93. Erika Tatiana Pérez Zambrano y Yazmin Ayala Agudelo. Producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor BIostat® A PLUS de 5 litros. 2018 Trabajo de grado UCMC
94. Yeni Andrea Leiton Arcos. Producción de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM, 2018. Trabajo de grado. UCMC
95. Laura García Martín. Producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluviales*. 2018. Trabajo de grado. UCMC
96. Yoo, J. J., Choi, S. P., Kim, B. W., & Sim, S. J. (2012). Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototrophic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (1–2), 309–315. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0616-x>
97. Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>

GRACIAS