



**PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ASTAXANTINA A PARTIR *Haematococcus*
pluvialis EN BIORREACTOR TEC-FERM DE 5 LITROS.**

**UNIVERSIDAD COLEGIOMAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA, NOVIEMBRE 2018**



**PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ASTAXANTINA A PARTIR *Haematococcus*
pluvialis EN BIORREACTOR TEC-FERM DE 5 LITROS.**

LAURA GARCIA MARTIN

ANA GRACIELA LANCHEROS (ASESORA)

**UNIVERSIDAD COLEGIOMAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA, NOVIEMBRE 2018**

Dedicado a mi mamá, papá y hermano por su apoyo y amor incondicional en cada proyecto que deseo emprender en mí, porque sin ellos nada de esto sería posible.

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primera instancia a mis padres porque sin su apoyo incondicional y paciencia este sueño jamás hubiera podido ser realidad, a mi hermano por siempre estar ahí en cada paso que doy en mi vida para ser esa ayuda. Gracias a ellos por formar la persona que soy hoy en día y la futura profesional que seré.

Agradezco a mi asesora Ana Graciela Lancheros por pensar en mí cuando el proyecto surgió, por brindarme su apoyo, confianza y paciencia a lo largo del camino, a la profesora Judith Elena Camacho Kurmen, docente de la institución por brindarme el apoyo académico durante el proceso investigativo.

Agradezco finalmente a cada una de las personas que estuvieron conmigo durante el transcurso de este camino, aquellas que me brindaron amistad, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por abrirme las puertas de la institución para llevar a cabalidad mi proceso académico con la mejor formación integral.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	18
INTRODUCCION	20
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
1. ANTECEDENTES	23
2. MARCO REFERENCIAL	30
2.1. Biotecnología	30
2.1.1. Aplicaciones de la biotecnología	30
2.2. Microalga	31
2.2.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	32
2.2.2. Clasificación taxonómica de <i>H. pluvialis</i>	32
2.2.3. Ciclo de vida <i>H. pluvialis</i>	33
2.3. Factores de estrés	34
2.3.1. Luz	34
2.3.1.1. Fotoperiodos	35
2.3.2. Fuentes de carbono	35
2.3.2.1. Acetato de sodio	35
2.3.3. Temperatura	36
2.3.4. pH	36
2.3.5. Agitación	36
2.4. Astaxantina	36
2.4.1. Estructura de la astaxantina	37
2.4.2. Biosíntesis de la astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	37
2.4.3. Aplicaciones de la astaxantina	38
2.5. Biorreactores	39
2.5.1. Tipos de biorreactores	39
2.5.1.1. Sistema abierto	39

2.5.1.2.	Sistema cerrado	40
2.5.1.2.1.	Biorreactor TER-FERM 5 L	40
3.	DISEÑO METODOLOGICO	42
3.1.	Tipo de investigación	42
3.2.	Hipótesis	42
3.3.	Población	42
3.4.	Muestra	43
3.5.	Variables	44
3.5.1.	Variable dependiente	44
3.5.1.1.	Indicadores variable dependiente	44
3.5.2.	Variable independiente	44
3.5.2.1.	Indicadores variables independiente	45
3.6.	Técnicas y procedimientos	45
3.6.1.	Microorganismo	45
3.6.2.	Biorreactor TEC-FERM	46
3.6.3.	Medio de cultivo	46
3.6.4.	Condiciones de estrés	47
3.6.5.	Curva de crecimiento	48
3.6.6.	Determinación de clorofila y astaxantina	48
3.6.7.	Método de determinación	48
3.6.8.	Determinación de pigmentos	48
3.6.9.	Análisis estadístico ANOVA	49
4.	RESULTADOS	50
5.	DISCUSIÓN	65
6.	CONCLUSIONES	71
7.	SUGERENCIAS	73
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
9.	ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular de <i>H. pluvialis</i>	34
Figura 2. Estructura química de la astaxantina	37
Figura 3. Ruta de biosíntesis de la astaxantina	38
Figura 4. Biorreactor TEC- FERM	46
Figura 5. Registro fotográfico microscópico	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>H. pluvialis</i>	32
Tabla 2. Composición química del medio volvox	43
Tabla 3. Composición química de la solución metal P-IV	43
Tabla 4. Composición química de la solución biotina	44
Tabla 5. Composición química del medio RM	46
Tabla 6. Recuento celular del montaje 0,299 mg/L de acetato de sodio	50
Tabla 7. pH del montaje 0,299 mg/L de acetato de sodio	52
Tabla 8. Recuento celular del montaje 1,6 mg/L de acetato de sodio	53
Tabla 9. pH del montaje 1,6 mg/L de acetato de sodio	55
Tabla 10. Velocidad de crecimiento de los montajes analizados	56
Tabla 11. Absorbancias obtenidas en el montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio	56
Tabla 12. Absorbancias obtenidas en el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio	57
Tabla 13. Concentración de clorofila y astaxantina en el montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio.	59
Tabla 14. Concentración de clorofila y astaxantina en el montaje con 1,6 mg /L acetato de sodio	60
Tabla 15. Cuadro comparativo entre los tratamientos 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato de sodio	64

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Curva de crecimiento celular montaje 0,299 mg/L de acetato de sodio	51
Grafica 2. Tendencias de crecimiento modelo logístico montaje 0,299 mg/L de acetato de sodio	51
Grafica 3. pH del montaje 0,299 mg/L de acetato de sodio	52
Grafica 4. Curva de crecimiento del montaje 1,6 mg/L de acetato de sodio	54
Grafica 5. Tendencias de crecimiento modelo logístico montaje 1,6 mg/L de acetato de sodio	54
Grafica 6. pH del montaje 1,6 mg/L de acetato de sodio	55
Grafica 7. Absorbancias obtenidas en el montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio	57
Grafica 8. Absorbancias obtenidas en el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio	58
Grafica 9. Concentración de clorofila y astaxantina en el montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio.	60
Grafica 10. Concentración de clorofila y astaxantina en el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Curso: Operación fermentador TEC- FER 5 L

Anexo B. Curva de calibración para concentración clorofila del trabajo titulado Evaluación de medios de cultivo para la extracción de astaxantina con *H. pluvialis* de Milena Niño en el año 2015

Anexo C. Curva de calibración para concentración astaxantina del trabajo titulado Evaluación de medios de cultivo para la extracción de astaxantina con *H. pluvialis* de Milena Niño en el año 2015

Anexo D. ANOVA curva de crecimiento

Anexo E. ANOVA concentración de clorofila

Anexo F. ANOVA concentración de clorofila



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA**

**PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ASTAXANTINA A PARTIR *Haematococcus
pluvialis* EN BIORREACTOR TEC-FERM DE 5 LITROS.**

RESUMEN

En la actualidad una de las microalgas más estudiadas es *H. pluvialis* debido a que esta presenta la capacidad de acumulación de uno de los principales carotenoides utilizados en la industria como lo es la astaxantina, esto ocurre cuando se encuentra sometida a diferentes factores de estrés, razón por la cual en el presente estudio se manejan dos tratamientos con diferentes concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L Y 1,6 mg/L), las cuales fueron evaluadas en el medio RM con la influencia de diferentes condiciones como pH de 6.7, fotoperiodos 20h luz y 4h oscuridad , luz blanca, temperatura $25 \pm 2^\circ \text{C}$, aire filtrado y agitación a 100 rpm en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros, proponiéndose como objetivo del presente estudio realizar el proceso de producción de astaxantina en *H. pluvialis* bajo las condiciones mencionadas.

Los resultados obtenidos con 0,299 mg/L de acetato de sodio determinaron un crecimiento celular máximo de $2,0 \times 10^4$ Cel/ mL y una concentración máxima de astaxantina de 2,530 $\mu\text{g/mL}$ durante 34 días, mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular máximo de $3,5 \times 10^4$ Cel/mL y una concentración máxima de astaxantina de 1,9 $\mu\text{g/mL}$. La morfología de la microalga se conservó durante el cultivo. El análisis estadístico realizado estableció que no hay diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos, lo cual permite concluir que con las dos concentraciones de acetato de sodio y las demás condiciones del proceso realizado en el biorreactor se obtuvo el colorante astaxantina.

Palabras clave: *H. pluvialis*, astaxantina, biorreactor, factores de estrés, acetato de sodio.

Estudiantes: Laura García Martín

Docente: Ana Graciela Lancheros

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Año: 2018

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo de microorganismos unicelulares fotosintéticos, con capacidad de crecer en diferentes ambientes de manera rápida, debido a esto, han sido utilizadas como suplemento nutricional¹. Actualmente una de las microalgas más estudiadas es *H. pluvialis* o también conocida como “Blood rain microalgae”², la cual ha tomado gran importancia en el último siglo debido a su capacidad para la acumulación de un metabolito secundario como lo es el carotenoide conocido como astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β' - caroteno- 4, 4'- diona), el cual es un pigmento rojizo con actividad antioxidante y ampliamente utilizado en la producción de cosméticos, fármacos, nutracéutica, alimentos de consumo humano y animal³⁻⁴⁻⁵. Su producción de forma sintética equivale a un precio promedio US \$2500/ kg⁶, es allí donde la obtención de forma natural cobra importancia.

H. pluvialis presenta la característica de aumentar su crecimiento celular y por ende su capacidad de acumulación de astaxantina cuando esta se encuentra sometida a factores de estrés como luz, pH, temperatura, agitación y fuentes de carbono, este último incluye acetato de sodio el cual ha sido modificado en estudios anteriores con el fin de hallar la concentración ideal para el crecimiento celular, como el realizado en el 2015 por Niño donde presentó un crecimiento celular de 7.55×10^5 Cel/mL en el medio RM con una concentración de 0,310 mg/L de acetato de sodio⁷, razón por la cual lo anteriormente mencionado se toma de base para determinar las diferentes concentraciones de acetato de sodio (0.299 mg/L y 1,6 mg/L) que se manejan en el presente proyecto las cuales fueron evaluadas en el medio RM con condiciones como pH, fotoperiodos y agitación constante en el biorreactor TEC- FERM 5 L con el fin de evaluar y determinar cuál es la concentración idónea para aumentar el crecimiento celular y la producción de astaxantina a gran escala a partir de *H. pluvialis*.

Debido a la gran diversidad de productos que se pueden desarrollar a partir de la biomasa o metabolitos secundarios de las microalgas y a su reciente aumento en la demanda de producción, la industria ha tenido que utilizar la biotecnología como método alternativo de obtención, ya que esta ha sido útil para promover las propiedades de las microalgas para la producción industrial⁸.

Dentro de estas nuevas alternativas de obtención se encuentra una de las más utilizadas como lo es la tecnología de fermentación, esto haciendo que cobre importancia como método alternativo en la producción de bioactivos de interés comercial, despertando el interés en que los últimos estudios se enfoquen en tratar de ayudar a mejorar el diseño, la operación y las estrategias de aplicaciones del biorreactor ⁹. Estas siendo las razones por las cuales el presente proyecto se llevó a cabo en el biorreactor TEC-FERM de 5 L, el cual es elegido en este estudio debido a que es un sistema básico para la investigación y está indicado para el cultivo de bacterias, hongos, células animales o vegetales que requieren el ajuste de algún parámetro de operación para obtener mejores resultados, lo cual ayudó a mantener constante las condiciones del cultivo¹⁰.

Este trabajo pertenece al proyecto institucional de investigación aprobado del grupo de Bioprocesos y Control titulado “Escalamiento de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina en un biorreactor de 5 litros”. Con el propósito de determinar si el acetato de sodio es el factor de estrés indicado para aumentar el crecimiento celular *H. pluvialis* y la acumulación de astaxantina, para ayudar a contribuir en la sustitución de colorantes de tonalidades amarillas y rojizas con efectos posibles efectos cancerígenos,¹¹ que son utilizados actualmente en la industria para la fabricación de toda clase de productos; así mismo se está contribuyendo en la construcción de conocimiento esencial que sirva como base y herramienta para definir las posibles nuevas estrategias que se pueden implementar en las industrias con el fin de favorecer la disminución de los costos y tiempo que acarrear la producción de biomasa y astaxantina sintética. Por lo anterior, este proyecto se desarrolla en la línea de investigación de ecología y desarrollo sostenible.

OBJETIVO GENERAL

Realizar el proceso de producción de astaxantina en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros con la utilización de un factor de estrés como el acetato de sodio y luz blanca durante el cultivo de *H. pluvialis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar el crecimiento de la microalga en el medio RM utilizando el biorreactor TER-FERM.
- b. Evaluar la producción de astaxantina y clorofila cuando se somete la microalga a factores de estrés.
- c. Determinar el cambio morfológico de *H. pluvialis* durante el cultivo.

1. ANTECEDENTES

En el año 2003 Cifuentes se dedicó a descubrir cuáles eran las condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina en cepas de *H. pluvialis* provenientes de Steptoe, Nevada Estados Unidos en donde sus ensayos presentaban concentraciones de acetato de sodio de 4, 8 y 12 mM, las cuales fueron sometidas a una intensidad de luz de 35 y 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un periodo de incubación de 14 días a $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, sin aireación, con un pH inicial de 6.0, factores de estrés los cuales ayudaron a que el inóculo inicial aumentara de 1.6×10^5 a 1.8×10^5 Cel./mL, resultados que nos ayudan a sustentar que la suplementación con acetato de sodio en los cultivos *H. pluvialis*, ayuda al incremento del crecimiento celular e induce a la formación de quistes¹⁹ forma celular en la que sucede la acumulación de astaxantina. Esta misma línea de investigación fue seguida en el año 2006 cuando Woong decidió observar los efectos que tiene la intensidad de la luz y la concentración de acetato sobre el crecimiento de *H. pluvialis*, razón por la cual se sometió a una intensidad de luz de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 70 mM de acetato de sodio, diseño que ayudó a mejorar la tasa de crecimiento hasta 0.243g/L, resultados con los que se llegó a concluir que el acetato de sodio ayuda a promover el crecimiento de las células, algo muy similar a lo anteriormente dicho por Cifuentes pero Woong en el 2003, afirma que la concentración de acetato deberá controlarse a niveles apropiados con el fin de evitar la inhibición del crecimiento celular por acción del acetato de sodio.²⁰

Dada la importancia que presenta el acetato de sodio en los cultivo de *H. pluvialis* en el año 2009 González, en su estudio decidió comparar el crecimiento celular con el contenido total de carotenoides en las 4 colonias de *H. pluvialis* aisladas de diferentes microhabitat en dos diferentes ubicaciones geográficas de Chile, las cuales fueron sometidas a condiciones de cultivo mixotróficas con 2mM de acetato de sodio y condiciones autotróficas, los cuales en el día 14 tuvieron un recuento celular de 9.9×10^4 Cel/mL y 5.4×10^5 Cel/mL respectivamente; dada las variaciones de los cultivos se concluyó que es evidente la dificultad de establecer condiciones para la promoción del crecimiento celular y acumulación total de carotenoides en *H. pluvialis*.²¹

En año 2012 Zhang decide investigar la inducción del ácido salicílico (SA) en la expresión transcripcional de ocho genes de carotenoides y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, en donde esta es sometida a 25 y 50 mg/L de ácido salicílico y los resultados sugieren que el ácido salicílico constituye señales moleculares en la red de biosíntesis de astaxantina, se llega a esta conclusión puesto que se observó la expresión de genes que regulan la biosíntesis como lo son *ipi-1*, *ipi-2*, *psy*, *crtR-B*, *bkt* y *crtO*.²² Mientras que en el año 2013 Camacho se centró en evaluar los factores de estrés a los cuales puede ser sometida *H. pluvialis*, para una mayor obtención de astaxantina⁶, lo que Moira en el mismo año quiso confirmar al inducir la carotenogenesis de *H. pluvialis* con estrés lumínico y nutricional, dándole como resultado un recuento máximo de 4.45×10^4 Cel/mL en el día 15 del estudio.²¹ Del mismo modo en ese año Ramírez obtuvo resultados similares en su tesis titulada producción de astaxantina por *H. pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift, ya que cuando la sometió a una concentración de 2,5 g/L de salinidad se observó muerte celular, pero cuando se sometió a altas intensidades de luz e irradianza obtuvo una acumulación de astaxantina de 32,99 $\mu\text{m/mL}$ ¹⁵. Así mismo, en el 2012 Millan decidió determinar los efectos que ejercen algunos parámetros en cultivo a escala de *H. pluvialis*, para esto al cultivo se le adicionó Vitamina B 0.01 g.L-1, 7 mg - B1, 7 mg - B2, 5 mg - B6, 33 g-B12, vitamina H 0.1 mg con iluminación blanca constante con intensidad de $94.7 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, donde para el séptimo día el recuento total de células fue 1.33×10^5 Cel/mL, esto demostrando que la suplementación de cultivos con vitaminas también es una buena opción para ayudar al crecimiento celular.²⁴

De esta forma fue despertando la curiosidad en los investigadores por determinar y establecer las condiciones óptimas de producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, dando pie para que Park en el 2014 determine que la composición óptima para medio era de 720 mg/L de acetato, 160 mg/L de nitrato y 14 mg/L de fosfato, asegurando que el crecimiento celular se inhibió notablemente cuando la concentración de cada nutriente era superior a la que él había determinado como óptima y concluye que la combinación racional del cultivo de perfusión y la irradiación por etapas mostró efectos sinérgicos que conducen a la producción mejorada de clorofila 12,3 g/L y astaxantina 602 mg/L a partir de las formas celulares llamadas quistes.²⁵

Por otro lado Kirayag en el 2015 se centró en la realización de una revisión bibliografía que abarcó los años del 2003 al 2013 con el fin de determinar las condiciones adecuadas para generar un estrés suficiente y así obtener una elevada producción de astaxantina de donde determinó que el uso biotecnológico de las microalgas aunque es prometedor aun hoy en día la aplicación de microalgas a escala industrial ha sido escasa, debido a los altos costos;²⁶ Del mismo modo otros investigadores tratan de establecer los medios de cultivo que pueden brindar un mejor rendimiento es aquí donde Niño en el mismo año realiza una evaluación de medios de cultivos para la extracción de astaxantina a partir *H. pluvialis*, donde demuestra que el medio RM con condiciones estables favorece el crecimiento celular a 7.55×10^5 Cel/mL, por ende una mayor acumulación de astaxantina y establece que el acetato de sodio ayudó a una mayor acumulación de astaxantina,²⁷ esto confirmando lo que autores en años pasados habían sugerido.

Con el pasar de los años los investigadores siguen en búsqueda de las condiciones de estrés adecuadas para elevar la acumulación astaxantina, es aquí donde nace la idea de que estas sean innovadoras y de bajo costos con el fin de que estas nuevas alternativas resulten beneficiosas para disminuir los costos de producción de astaxantina en la industria y con esto hacer que la astaxantina obtenida a través de la síntesis natural sea la primera opción en la industria, siguiendo esta idea Wen en 2015, investigó si el etanol tiene el potencial para ser utilizado como un reactivo eficaz para inducir la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, y sus resultados demostraron que la acumulación de astaxantina se producía con la adición de etanol incluso en condiciones de poca luz, además de que la productividad de la astaxantina podría alcanzar los 11,26 mg/L y que el etanol ayudó a mejorar la transcripción de los genes isopentenil difosfato (IPP) isomerasa (ipi-1 e ipi-2), encargados en la biosíntesis de astaxantina.²⁸

Debido a la gran importancia que en los últimos años ha cobrado la astaxantina, se han creado nuevos métodos para la obtención como el descrito por Poonkum en el año 2015, en donde experimenta la inducción de astaxantina a partir *H. pluvialis* con fotobiorreactores tipo flat panel airlift de 17, 50 y 90 L (FP-APBR) en condiciones interiores y exteriores, en donde el experimento con 17L FP-APBR con agua limpia esterilizada, 3% de aireación de CO₂, mejoró la acumulación de astaxantina hasta obtener a 26,63 mg/L, esto se le atribuye potencialmente a la

fuerza de elevación del reactor que ayudó a evitar la precipitación celular al permitir que las células circularan dentro del reactor. Además, los diversos tamaños de FP-APBR exhibieron un rendimiento similar, lo que implica una oportunidad de aplicar. Sin embargo, una operación similar en condiciones exteriores exhibió un rendimiento ligeramente inferior debido al efecto de inhibición de la luz, el mejor rendimiento al aire libre se obtuvo con el FP-APBR cubierto con una capa de red de sombreado, donde se obtuvieron 20,11 mg de astaxantina.²⁹ En el mismo año Wanna, estudia si la secuencia de Heterotrophy-Dilution-Photoinduction (SHDP) sirve para la producción altamente eficiente de astaxantina natural de *H. pluvialis* para satisfacer la gran demanda de este producto en la industria, la estrategia utilizada fue el peso de la celda seca de 26g/L y la productividad de la biomasa de 64.1 mg/L se obtuvieron en la etapa de heterotrofia, mientras tanto, las células podían acumular considerable astaxantina hasta un 4,6% del peso de las células secas después del décimo día de fotoinducción, lo que indica que el método se aplicó con éxito en el cultivo de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina en interiores y exteriores. En particular, SHDP tiene ventajas sobre la biomasa de *Haematococcus* y la producción de astaxantina que los modos de producción convencionales, lo que indica que esta nueva estrategia proporciona una forma prometedora de aumentar el beneficio económico y reduce considerablemente el costo de producción de astaxantina natural de *H. pluvialis*.³⁰

Por otro lado Wang, en el año 2016 decidió mejorar la biomasa de *H. pluvialis* y producción de astaxantina mediante cultivo fed-batch con pH controlado, el cual consistía en 7.88 g/L de nitrato, 1.83 g/L de fosfato y 24.0 g/L de acetato de sodio, con el cual en el día 15 se obtuvo 60.23 g/L de astaxantina,³¹ lo cual se correlaciona con lo mencionado en los años anteriores a este, frente a producción de astaxantina obtenida mediante el nitrato, acetato y fosfato, demostrando nuevamente que un cultivo suplementado con ellos dará un mejor rendimiento en la obtención. En el mismo año Cheng se centró en el aumento de la tasa de crecimiento y el rendimiento de astaxantina de *H. pluvialis* bajo irradiación nuclear y alta concentración de estrés por dióxido de carbono, en donde con 6% de CO₂ y luz blanca de 108 μmol fotones m⁻² s⁻¹, se obtuvo un incremento el recuento celular el cual aumento de 0.16mg/L a 46.0 mg/L³².

Por su parte Haquea, en el año 2017 investigó la producción intensificada de astaxantina en *H. pluvialis*, en donde evalúa las corrientes de aguas residuales de bioetanol como posibles medios para cultivar microalgas y como resultado obtiene que *H. pluvialis* creció en diferentes muestras de agua residual mostrando un mayor crecimiento celular de 0.704 ± 0.016 mg/ml en el décimo día y en la fase estacionaria los quistes presentaron una acumulación de 0.574 ± 0.002 mg/ml en el día 21,³³ esto creando una nueva alternativa para que el cultivo de *H. pluvialis* sea llevado en las corrientes de aguas residuales de bioetanol, puede ser una alternativa más ecológica si se compara con los medios convencionales, ya que no solo permite dar un uso de las aguas residuales disponibles, sino que también elimina la dependencia de los productos químicos industrializados para la preparación de medios de cultivo; gracias a esta investigación en el año 2017 junto con Dutta, investigó como sería la producción integrada de biomasa de *H. pluvialis* y eliminación de nutrientes utilizando efluente de residuos de plantas de bioetanol, el cual fue llevado a cabo en un fotobiorreactor de elevación de aire para utilizar el agua residual y un suministro de gas enriquecido con 5% de CO₂. La densidad de biomasa y la tasa de crecimiento específica máxima alcanzada fue 4.37 ± 0.007 g/L y 0.317 día,³⁴ respectivamente, esto dándole una nueva alternativa de utilidad al cultivo de *H. pluvialis* ya que los efluentes de bioetanol sirven para combinar el tratamiento de aguas residuales, la utilización de CO₂ y la producción simultánea de astaxantina.

Con el pasar del tiempo los investigadores tratan de hacer menos convencionales sus investigaciones con el fin de observar cómo estas le pueden dar grandes giros a la investigación, razón por la cual cada día son más novedosos, como Marcellinus que en el año 2017 investiga los efectos del sonido audible para mejorar la tasa de crecimiento y por ende acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, es así como determina que el estrés por sonidos audibles mejora hasta en un 58% la tasa de crecimiento y que en su estudio las células tratadas con la música “Blues for Elle” obtuvieron un recuento celular final de 3.467×10^2 Cel/mL, donde podemos concluir que el sonido audible es útil para estimular la tasa de crecimiento³⁵. Así mismo le sucede a Cheng cuando en el 2017 monitoreó la dinámica espacio-temporal in vivo de lípidos y la evolución de astaxantina en mutantes de *H. pluvialis* con 15% de CO₂ y alta intensidad de luz, en donde obtuvo un incremento de 3.5 veces dentro de las 12h en la acumulación de astaxantina

tras someterla a 15% de CO₂; Resultados de los modelos sugieren que los lípidos se acumulan mucho más rápido que la astaxantina y que se pueden explorar más estudios sobre la conversión mutua entre sustancias intracelulares durante la transición utilizando microespectroscopía Raman.³⁶

Mientras Wanida en el 2017 centró su investigación en los efectos de los agentes inductores sobre el crecimiento y producción de astaxantina, donde utiliza acetato de sodio en 10g/L y es aquí donde determina que el acetato debe aplicarse como una fuente de carbono orgánico para uso como agente inductor en cultivos mixotrópicos con el fin de obtener una mayor acumulación de astaxantina.³⁷ Por otra parte Zhengab, en su investigación titulada los efectos del selenito en la microalga verde *H. pluvialis*: Bioacumulación de selenio y mejora de la producción de astaxantina, en donde demostró que una dosis baja de selenito 3mg/L presenta una tasa de crecimiento de 24 mg/L, pero que por el contrario niveles de selenito superiores a 13 mg/L puede llegar a inhibir el crecimiento; mientras que los experimentos de bioacumulación demostraron que *H. pluvialis* puede llegar a acumular hasta 646 µg/g de astaxantina, sin embargo cuando el tratamiento se realiza a altas concentraciones es directamente proporcional a los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular, la actividad de la enzima antioxidante y la producción de astaxantina, sugiriendo que la bioacumulación puede llegar a ser tóxica para ella, pero que la toxicidad siempre va a depender de la dosis de selenito utilizada.³⁸

Debido a los grandes avances que se han tenido en las investigaciones sobre como los factores de estrés inducen a un mayor acumulación de astaxantina, actualmente las investigaciones y estudios se centran en, como esos factores de estrés ayudan en la expresión de genes encargados de la biosíntesis de astaxantina, esto gracias a los avances y a la facilidad de acceso que presenta la biología molecular, razón por la cual en el año 2018 Sawdon, investigó la posibilidad del aumento de la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* usando una alta concentración de CO₂ e iluminación leve con el fin de proponer un método económico de dos etapas para la producción de astaxantina natural de *H. pluvialis* sin una etapa de reemplazo del medio. En donde las etapas se dividieron en etapa 1, *H. pluvialis* creció bajo iluminación de poca luz hasta que alcanzaron la biomasa óptima, En la etapa 2, las células se cambiaron a las condiciones de inducción de astaxantina utilizando la combinación de iluminación de alta luz y niveles elevados de dióxido de

carbono (5 o 15%). El rendimiento de astaxantina resultante fue de 2 a 3 veces el de usar cualquiera de los factores de estrés solo, induciendo hasta un 36 mg/g,³⁹ Esta investigación abre la posibilidad a una mejoraría en la eficiencia y la economía de la producción de astaxantina.

Por otra parte Ruijuan, observó los perfiles de de expresión génica de astaxantina y vías de ácidos grasos en *H. pluvialis* en respuesta a diferentes condiciones de iluminación LED, en donde con iluminación LED blanca de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y LED azul de (B-70), con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a 25°C , donde se consiguió una mayor producción de astaxantina por debajo de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y donde se activaron los genes de transcripción de biosíntesis de astaxantina *psy*, *crtO*, y *bkt2* fueron bajo W-150, mientras que los genes *psy*, *lcy*, *crtO*, and *crtR-B* fueron activados por B-70.⁴⁰ Mientras que en el mismo año Bangxiang, se centró en el análisis transcripcional en *H. pluvialis* cuando la astaxantina es inducida por luz intensa con acetato y Fe^{2+} , obteniendo como resultado que bajo condiciones de alta iluminación la expresión de genes relacionados con muchas vías habían cambiado, como la ruta de biosíntesis de carotenoides, elongación de ácidos grasos, proteínas de antena de fotosíntesis, fijación de carbono en organismos fotosintéticos, etc. La adición de acetato de sodio y la alta luz promovió significativamente en la expresión de genes claves relacionados con las vías para la biosíntesis de carotenoides y la elongación de ácidos grasos. Además, el acetato podría obviamente inhibir la expresión de genes relacionados con la ruta de las proteínas de antena de fotosíntesis. Para la adición de Fe^{2+} , los genes relacionados con las proteínas de antena de fotosíntesis se promovieron significativamente y no hubo un cambio obvio en las expresiones génicas relacionadas a la síntesis de carotenoides y ácidos grasos.⁴¹

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Biotecnología

La biotecnología es definida como cualquier técnica que involucre procesos biológicos destinados a la mejora biológica mediante la explotación de sistemas vivos y sus componentes con el fin de beneficiar la vida humana, algunos sistemas vivos que pueden ser utilizados son las plantas, microorganismos, animales.

Esta es una disciplina que ha tenido un rápido incremento e impacto en la sociedad, pues ha sido utilizada en diferentes áreas de la ciencia, debido a que desde sus inicios de producción de vino y alcohol, se ha utilizado con el fin de crear nuevos productos, mejorar la vida útil de los productos o con el fin de mejorar sus procesos de producción.⁴²

Se puede decir que gracias a los beneficios que traen las aplicaciones de la biotecnología, se prevé un impacto tanto positivo como negativo, sobre la perspectiva de las ciencias, además de una posible afectación de la economía en las industrias, probablemente también una afectación social, debido a las creencias culturales y religiosas de cada uno de los individuos de la sociedad. Por esto, se puede afirmar que el éxito o fracaso de la biotecnología en la sociedad, depende de que tan bien esté preparada la población para recibir y beneficiarse de los impactos que el uso de esta trae.

2.1.1. Aplicaciones de la biotecnología.

En el área de las ciencias de la salud, la biotecnología ha sido de gran ayuda, debido a que ha intervenido en la realización de medicamentos para el tratamiento y control de enfermedades,

con un objetivo claro que es la reducción de los costos de los tratamientos para que estos sean accesibles a todas las clases sociales. Además de esto la biotecnología ha trabajado en la utilización de nuestra información genética con la recombinación de DNA, para tratar de crear sustancias útiles para los humanos, un ejemplo claro de los productos, que son de origen de recombinación del DNA es la insulina, producto utilizado por pacientes con diabetes mellitus; Conjuntamente con la insulina, como tratamiento de la diabetes mellitus, la biotecnología ha descubierto la fertilización in vitro, gracias a la utilización de las diferentes características de las stem cells, aunque la biotecnología ha traído grandes avances para el ámbito para las ciencias de la salud, al momento de su utilización han surgido diferentes cuestionamientos bioéticos.

Por otro lado, en la agricultura la biotecnología ha intervenido de forma positiva, debido a que ha optimizado los cultivos, pues interviene en el control de plagas, ayuda a la producción de alimentos transgénicos lo cuales vienen con mejores características y alargamiento de la vida útil de los mismos. Esto ha ayudado a incrementar las economías de los cultivos. Aunque estudios recientes demuestren que gracias a la intervención de la biotecnología en los cultivos y por ende la aparición de los alimentos transgénicos, se han reducido los problemas de hambre y desnutrición a nivel mundial, aun se debaten cuestionamientos éticos ante la utilización de estos 8-42.

Al mismo tiempo la biotecnología, también ha sido útil, para promover las propiedades de las microalgas, tanto para la salud como para la producción industrial, debida a la gran diversidad de productos que se pueden desarrollar a partir de la biomasa o los metabolitos secundarios de las microalgas. En la industria han sido aplicadas a diferentes áreas, como lo son, la alimenticia, farmacéutica, cosmética, alimento de animales, así mismo, la biomasa de las microalgas pueden ser utilizadas para la generación de energía, debido a que estas tienen la capacidad de generar diferentes tipos de biocombustibles renovables.⁸

2.2. Microalga

Las microalgas se encuentran distribuidas mundialmente en agua dulce y marina persistiendo en numerosos tipos de ambientes, pues estas hacen parte de microorganismos unicelulares

fotosintéticos, con la capacidad de un crecimiento rápido, actualmente hacen parte de un grupo de diversos microorganismos fijadores del 50% de carbono orgánico en la tierra.¹

Gracias a la gran cantidad de estudios que se han realizado con ellas, se les atribuye la capacidad de la producción de pigmentos, lípidos, nutrientes; Este último siendo de gran importancia debido a que el incremento constante de la población mundial, ha obligado a buscar alternativas de nutrición económica, es así como las microalgas se están volviendo fuentes sustentables y rentables de nutrientes, debido a su rápido crecimiento facilitando la realización de productos con los cuales ellas tienen el valor nutricional necesario para la dieta diaria de un individuo.¹⁻³

Recientemente las microalgas fotosintéticas han sido consideradas efectivas para la descontaminación ambiental debido a que ayudan a la reducción de emisión de CO₂ y gases de invernadero, además de que su biomasa se considera útil en la producción química, comidas saludables y en el tratamiento de aguas residuales.²⁰

2.2.1. *Haematococcus pluvialis*.

H. pluvialis también conocida como *H. lacustres*, *Sphaerella lacustris*, *Blood rain alga*, es una microalga verde unicelular de agua dulce, que es bien conocida por su capacidad de alta concentración de astaxantina³ y se caracteriza por ser un tipo de microalga autótrofa, ya que es capaz de obtener la energía necesaria para fijar el carbono mediante la fotosíntesis. Así mismo es especialmente sensible a las variaciones lumínicas, las cuales pueden hacer que varíen sus características morfológicas.²⁻¹⁶⁻⁴³

H. pluvialis presenta gran importancia en la industria, en cuanto a su capacidad de producción natural de proteínas y astaxantina, debido a que un cultivo de *H. pluvialis* en condiciones apropiadas puede llegar a sintetizar y acumular gran cantidad de astaxantina. Además de esto la importancia de que el *H. pluvialis* es la fuente con mayor producción de astaxantina frente a las levaduras y crustáceos.¹⁴⁻¹⁶

2.2.1.1. Clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *H. Pluvialis*.

Filo	<i>Chlorophyta</i>
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Haematococcaceae
Género	<i>Haematococcus</i>
Especie	<i>H. pluvialis</i>

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

2.2.1.2. Ciclo de reproducción

H. pluvialis, presenta un ciclo de vida muy distintivo y complejo debido a que va cambiando su morfología celular en función de las condiciones ambientales a las cuales se encuentra expuesta.

La primera etapa denominada crecimiento vegetativo ocurre cuando se presentan condiciones ambientales favorables, la morfología de las células, se conoce como aplanospora las cuales presentan un color verde y movimiento gracias a los dos flagelos que posee, los cuales le brindan la capacidad de nadar por el medio y se dividen activamente. La segunda etapa denominada de descanso ocurre cuando las condiciones ambientales no son favorables, ni óptimas es decir la microalga se encuentra bajo condiciones de estrés y ocurre una dramática transformación morfológica de las células que se conoce como quiste los cuales presentan color rojizo, con una pared celular gruesa y resistente e inmóvil debido a que es donde detiene por completo su división y se dedica a acumular astaxantina.¹⁴⁻⁴⁴

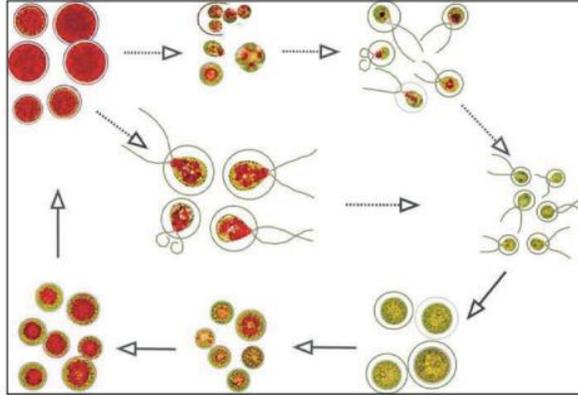


Figura 1. Ciclo celular de *H. pluvialis*. Fuente: Córdoba. N. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. (Artículo). Colombia Universidad la Gran Colombia, 2015. ¹⁴

2.3. Factores de estrés

H. pluvialis cuando se desarrolla en ambientes hostiles, presenta una mayor biosíntesis y acumulación de astaxantina, razón por la cual es importante determinar los distintos factores que interfieren en los procesos naturales de la microalga.

2.3.1. Luz.

La intensidad de la luz es uno de los factores de estrés para las microalgas, debido a que según su intensidad de luz influye notablemente en el aumento o disminución su tasa de crecimiento, actividad fotosintética, acumulación de pigmentos por ello su aplicación en todas las investigaciones, con el fin de establecer su intensidad, calidad espectral y establecer un fotoperiodo.

Esta puede estar de forma artificial (lámparas fluorescentes o diodos emisores de luz), natural, aparte de esto la intensidad y periodo que tenga la microalga varían según el género de la misma. También es importante mencionar que se puede llegar a una etapa de fotoinhibición.⁴⁵⁻⁴⁶

2.3.1.1. Fotoperiodos

Los tiempos de exposición a luz y oscuridad tienen efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas que se encuentran bajo condiciones de laboratorio o en la naturaleza. En condiciones naturales las microalgas establecen periodos alternos de luz/oscuridad debido a que estos ayudan a favorecer la división celular.⁵⁹

2.3.2. Fuente de carbono.

El CO₂ es la fuente de carbono más utilizada en cultivos de microalgas. Al consumirse el carbono, el oxígeno es producido por fotólisis del agua y este es diluido en el medio de cultivo, aunque este puede variar según el metabolismo utilizado por las microalgas para su crecimiento, debido a que puede ser orgánico (glucosa, acetato, entre otros) e inorgánico (CO₂) es la fuente de carbono más utilizada.⁴⁷ Existen diferentes tipos de metabolismo utilizados por las microalgas, estos son:

- Fotoautótrofo: Aquí se utiliza la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono, con el fin de obtener energía química a través de la fotosíntesis.
- Heterótrofo: Aquí la ausencia de luz las obliga a utilizar compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono.
- Mixotrófico: Aquí utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de energía y captan la energía de la luz.⁴⁶

2.3.2.1. Acetato de sodio

Es una sal sódica del ácido acético. Es una de las fuentes de carbono inorgánica más comúnmente utilizada en cultivos mixotróficos, ya que se ha descrito que gracias a este *H. pluvialis* puede sintetizar astaxantina, debido a que este estimula el crecimiento celular y acumulación de lípidos.⁶⁰⁻⁶¹

2.3.3. Temperatura.

La temperatura adecuada varía para cada especie pero esta generalmente se encuentra en un rango entre 28° y 35°C ayudando a aumentar la tasa de crecimiento de la microalga, aunque cuando esta se encuentra por encima es causal de que se aumente la respiración, esto se puede controlar de diferentes formas según el sistema que se utilice para su cultivo, es decir, si es cerrado o abierto.⁴⁷

2.3.4. pH.

Cada especie requiere un rango determinado de pH que le permita un crecimiento óptimo, ya que si se presenta un aumento o disminución habrá una disminución en la productividad, este puede ser controlado por inyecciones de CO₂ el cual también ayuda a aumentar la productividad.⁴⁵⁻⁴⁷

2.3.5. Agitación.

Es importante con el fin de evitar la sedimentación celular y para asegurar su exposición uniforme a la luz, si no se lleva a cabo un mezclado o se realiza un mezclado inadecuado va a reducir la producción de la biomasa.¹⁰⁻⁴⁶

2.4. Astaxantina

El carotenoide rojo o metabolito secundario de *H. pluvialis* (3, 3'-dihidroxi- β , β' - caroteno- 4, 4'- diona), perteneciente a la familia de las xantofilas, es un pigmento biológicamente activo con diferentes aplicaciones en la industria. Posee una actividad antioxidante 10 veces mejor que la de otros carotenoides como lo son zeaxantina, luteína, cantaxantina, b-caroteno y a la vitamina E.³⁻¹³

Actualmente la astaxantina es ampliamente vendida en su forma sintética, es decir la que se obtiene por medio del proceso de síntesis química, pero esta puede llegar a ser sintetizada por microorganismos de agua dulce como lo son bacterias, levaduras, y algunas microalgas verdes; Presenta una ventaja cuando esta es sintetizada por *H. pluvialis* ya que acumula cantidades >30g de astaxantina por kilogramo de biomasa, esto siendo cantidades superiores a la producida por las otras fuentes.³⁻⁴⁻¹⁸

2.4.1. Estructura de la astaxantina.

Es una cadena larga de 40 carbonos con doble ligaduras, dos grupos hidroxilo libres en sus anillos terminales.⁴⁸ Formula química $C_{40}H_{52}O_4$ ¹⁴

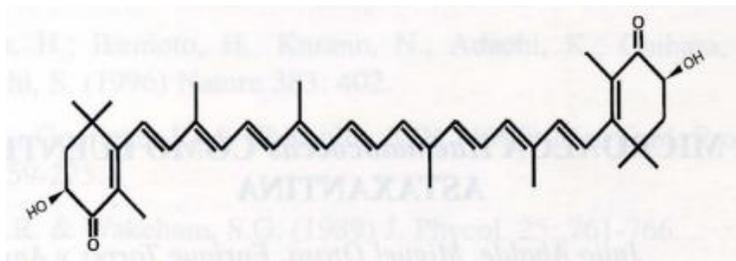


Figura 2. Estructura química de la astaxantina. Fuente: Abalde. J. La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina. (Artículo). España Universidad e da Coruña

2.4.2. Biosíntesis de la astaxantina en *H. pluvialis*.

La acumulación de astaxantina ocurre cuando se da la transformación morfológica que se da durante la fase de crecimiento en donde la fase aplanosporas como respuesta a los diferentes inductores de estrés, se transforma en su fase quística la cual tiene la capacidad de la acumulación de astaxantina.³⁻¹³

De esta manera podemos hacer hincapié en que la biosíntesis de la astaxantina se limita estrictamente en la fase quística, por lo que hace frente a cualquier estrés oxidativo generado en una variedad de ambientes hostiles y desfavorables.⁴⁴

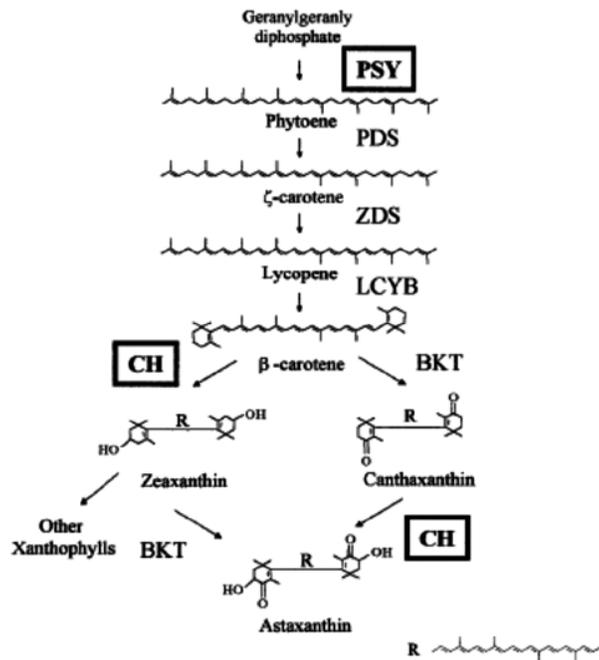


Figura 3. Ruta de biosíntesis astaxantina ¹⁵

2.4.3. Aplicaciones de la astaxantina.

Actualmente la astaxantina, ocupa un papel importante en la industria debido a que tiene aplicaciones para cosméticos, alimentos de consumo humano, alimento industrial, fármacos y nutracéutica. Además la astaxantina, es reconocida como un fuerte colorante de tonos rojizos, al día de hoy, también se conoce por su alta actividad antioxidante; ¹³⁻¹⁷ debido a que esta puede absorber la energía excitada sobre el oxígeno dentro de la cadena de la astaxantina degradándola pero previniendo el daño a otros tejidos. ¹⁸

Como esta es sintetizada por microorganismos de agua dulce, se ha encontrado, que la astaxantina es de vital importancia para la función biológica, ya que gracias a su alto potencial antioxidante, brinda una protección contra los efectos secundarios de los UV y ácidos grasos poliinsaturados. Además de esto juegan un papel importante tanto en la pigmentación, comunicación, el comportamiento reproductivo y la respuesta inmune. ³⁻¹⁸

En la industria alimentaria, la astaxantina es utilizada como pigmento, para colorantes de comidas, suplemento alimentario para animales de producción industrial nacidos en cautiverio, especialmente utilizado en la acuicultura.¹⁸

2.5. Biorreactores

Cada día toma mayor fuerza e importancia el interés de las industrias por mejorar los valores de rendimiento y productividad por lo cual se ha tratado de implementar diferentes estrategias para la estimulación del crecimiento de los microorganismos y el correcto conocimiento de los metabolitos secundarios, es allí donde surge la utilización de la fermentación.

La fermentación tiene como objetivo el crecimiento celular y la fermentación del mismo en condiciones de estrés, ya que durante estas condiciones los microorganismos desarrollan respuestas específicas debido al estrés genético, fisiológico y metabólico los cuales dan origen a productos de la fermentación y procesos con características novedosas.⁵⁰

2.5.1. Tipos de biorreactores

2.5.1.1. Sistema abierto.

Aunque los primeros cultivos de microalgas se realizaron en sistemas cerrados, hoy en día los más utilizados son los sistemas abiertos debido a las ventajas que presentan al ser más económicos y más sencillos de escalar. Sin embargo solo un pequeño grupo de especies de algas pueden cultivarse con este tipo de sistemas.

Actualmente existen cuatro tipos principales de sistemas abiertos en uso como lo son: estanque grande poca profundidad, tanques, estanques rectangulares y estanques tipo raceway, todos presentando sus ventajas y desventajas.⁵² Una de las desventajas más conocidas es la baja productividad que presentan frente a la esperada teóricamente debido la dificultad para controlar las condiciones del cultivo.¹⁵

2.5.1.2. Sistema cerrado.

Los sistemas cerrados se caracterizan por presentar grandes ventajas que aumentan sus beneficios frente a los sistemas abiertos, como lo son reducir los riesgos de contaminación por metales pesados u otros microorganismos, ya que estos presentan una mayor esterilidad; condiciones de cultivo reproducibles, menos pérdida de CO₂, una alta eficiencia en la utilización de la luz, control de temperatura, la posibilidad de utilizar la luz del día, menos pérdidas de vapor y diseño más flexible.

Todas las ventajas que presenta hacen que se pueden cultivar diferentes especies de microalgas sin ningún tipo de problema, además de esto el reactor puede ser operado a diferentes condiciones climáticas y la facilidad para controlar las condiciones de cultivo dan como resultado un producto final de mayor calidad y composición¹⁵⁻⁵¹ Sin embargo frente a todas las ventajas su elevado costo aun ha permitido su utilización, razón por la cual se sugieren más estudios con el fin de disminuir sus costos al momento de su utilización.

2.5.1.2.1. TEC-FERM 5L

El fermentador TecFerm es un sistema básico para investigación, indicado para el cultivo de bacterias y hongos. Para el cultivo de células animales o vegetales se requiere ajustar algunos parámetros de configuración y operación.

El equipo consta de un reactor tipo tanque agitado (ST), con una capacidad total de 7.5 L y un volumen útil de trabajo de 5 L. El volumen mínimo es de 2 L para lo cual se requiere ajustar la altura de las espas y del electrodo de pH.

Se puede manejar rangos de agitación entre 0 y 800 rpm, rango de temperatura usual entre 30 y 40° C, el pH puede controlarse en un rango entre 0 y 14, la aireación puede ser ajustada desde menos de un litro por minuto hasta 30 litros. Además el equipo se puede manejar de forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases como CO₂ o nitrógeno.¹⁰

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Esta investigación es un estudio experimental, correlacional, sujeto a variaciones investigativas, como son, diferentes concentraciones de acetato de sodio (0.299 y 1,6 mg/L), como condiciones de estrés en el medio RM en fermentador TEC-FERM de 5 litros, con el fin de evaluar que concentración, es la idónea para aumentar el crecimiento celular y la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*.

3.2. Hipótesis

Hay un aumento en la biomasa y en la producción de astaxantina de *H. pluvialis* en el medio RM, el cual fue escogido por brindar las condiciones adecuadas⁷ para el crecimiento óptimo de la microalga *H. pluvialis*, bajo dos concentraciones de acetato de sodio (0.299 mg/L y 1,6 mg/L), acompañado de condiciones de trabajo en el biorreactor TecFerm 5L, como lo son pH 6.7, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20h luz blanca y 4h oscuridad, aire filtrado, agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm, los cuales son señalados como factores que ayudan al aumento de la producción de astaxantina, según la bibliografía consultada.⁴⁵⁻⁴⁷

3.3. Población

La población analizada es la microalga *H. pluvialis* cepa UTEX suministrada por la Universidad de la Sabana, con la cual se trabajó durante 34 días, tiempo en el cual se espera terminar la fase experimental y obtener los resultados necesarios para determinar la importancia de la producción de astaxantina en la industria.

3.4. Muestra

Para la investigación se utiliza un inóculo de *H. pluvialis* en el medio volvox⁷, con condiciones de cultivo, pH 6.8, temperatura 20± 1°C, fotoperiodo 18h luz blanca y 6h oscuridad, aire filtrado, agitación manual diaria por 10 segundos, hasta obtener un recuento celular de 1.0 x 10⁴ Cel/mL; El cual se cultivó en el biorreactor TEC-FERM de 5 L con dos diferentes concentraciones de acetato de sodio (0.299 y 1,6 mg/L), que son adicionadas en el día 0 y se detuvo el crecimiento en el día 34, con el fin de hacer la obtención de biomasa y realizar los procedimientos de espectrofotometría para la cuantificación de astaxantina y clorofila.

Tabla 2. Composición química del medio volvox⁵⁸

Composición química	mL	g
Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	1	11.8
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1	4
Na ₂ glicerofosfato * 5H ₂ O	1	5
KCL	1	5
Glicilglicina	10	5
Solución metal P-IV*	6	-
Vitamina B12	1	-
Solución vitamina biotina **	1	-

NOTA: Medidas brindadas para 1 litro de medio

*Solución metal P- IV, esta se encuentra conformada por:

Tabla 3. Composición química de la solución metal P-IV⁵⁸

Composición química	g/L
FeCl ₃ * 6H ₂ O	0.097
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0.041
ZnCl ₂	0.005
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.002

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.004
---	-------

** Solución vitamina biotina, esta se encuentra conformada por:

Tabla 4. Composición química de la solución vitamina biotina ⁵⁸

Composición química	g/200mL
HEPES buffer pH 7,8	2.4
Biotina	0.005

3.5. Variables

3.5.1. Variable dependiente.

- Crecimiento celular
- Morfología celular
- Producción de astaxantina y clorofila
- Concentración de astaxantina y clorofila

3.5.1.1. Indicadores variable dependiente.

- Crecimiento celular, cuantificado por recuento en cámara de Neubauer (Cel/MI)
- Cambios morfológicos observados en cámara de Neubauer
- Producción de astaxantina y clorofila, cuantificado por espectrofotometría.
- Concentración de astaxantina y clorofila en $\mu\text{g/ml}$

3.5.2. Variable independiente.

- Biorreactor TecFerm 5L
- Inoculo inicial
- Condiciones de trabajo

3.5.2.1. Indicadores variable independiente

- pH 6.7
- Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$
- Fotoperiodo 20h luz blanca y 4h oscuridad
- Aire filtrado
- Agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm
- Concentración de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato de sodio

3.6. Técnicas y procedimientos

3.6.1. Preparación inóculo.

Se realiza el pre inóculo a partir de la cepa de referencia transferida un Erlenmeyer (de 3.0 L de capacidad) con dos litros de medio de cultivo volvox estériles ajustado a pH 6.7, con fotoperiodo de 18 horas de luz blanca y 6 horas de oscuridad, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y con agitación diaria por 10 segundos.

Se evaluó el crecimiento del pre inóculo por medio de microscopia en cámara de Neubauer, donde se observaron los siguientes parámetros: color, morfología y viabilidad celular, se realizó el conteo celular cada tercer día por triplicado hasta obtener un recuento de 1.0×10^4 Cel/mL.

Se inoculo un volumen inicial de 200 mL (10% del cultivo total) con una concentración de 1.0×10^4 Cel/mL en el biorreactor con un volumen de 2 L de medio RM con condiciones de trabajo, pH 6.7, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20h luz blanca y 4h oscuridad, aire filtrado, agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm.

3.6.2. Biorreactor TEC-FERM.

El biorreactor TEC- FERM es un sistema básico para la investigación, indicado para el cultivo de bacterias, hongos, células animales o vegetales¹⁰. Razón por la cual fue el escogido para obtener mejor productividad tanto en biomasa como astaxantina, ya que gracias a que es un sistema cerrado podemos tener más control sobre condiciones de estrés el biorreactor de 5 litros con 2 litros del medio del cultivo RM estandarizado con 10% del inóculo al 1.0×10^4 Cel/ml de *H. pluvialis*. (Anexo A)



Figura 4. Biorreactor TEC-FERM

Fuente: Autora, 2017

3.6.3. Medio de cultivo

El cultivo de *H. pluvialis* se realizó en un biorreactor de 5 litros con un volumen de medio de cultivo de 2 litros, después de cada toma de muestra por triplicado, se evaluó producción de astaxantina y clorofila, así como el crecimiento celular bajo las condiciones de estrés aplicadas al

medio de cultivo seleccionado RM con concentraciones de acetato de sodio de 0.299 mg/L y 1,6 mg/L.

Tabla 5. Composición química del medio RM. Medio utilizado en los dos montajes con acetato de sodio.⁷

Composición química	mg/L
NaNO ₃	0.300
K ₂ HPO ₄	0.080
KH ₂ PO ₄	0.023
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.012
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.060
EDTA	0.008
NaCl	0.024
H ₃ BO ₃	0.001
MnSO ₄ H ₂ O	0.002
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.001
(NH ₄) ₆ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0013
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.001
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.001
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.018

3.6.4. Condiciones de estrés.

En los dos montajes realizados con acetato de sodio 0.299 mg/L y 1,6 mg/L en el biorreactor de 5 L, con 2 L del medio del cultivo RM estandarizado con un inóculo (al 10%) con 1.0×10^4 Cel/mL de *H. pluvialis* y pH 6.7, se aplicaron como condiciones agitación constante fluctuante entre 90 y 180 rpm, fotoperiodos de 20 horas luz blanca y 4 horas oscuridad, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, concentraciones de acetato de sodio de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L cada tratamiento se dejó por un periodo de 34 días con muestras por triplicado cada 7 días.

3.6.5. Curva de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento a partir del número de células por mililitro cuantificados en cámara de Neubauer³⁷ durante 34 días, obteniendo un total de 6 datos obtenidos por cada tratamiento con acetato de sodio.

3.6.6. Determinación de clorofila y astaxantina

Los carotenoides presentan solubilidad en lípidos o en solventes no polares, es por ello que los solvente más utilizados para la extracción de los carotenoides son el éter etílico y el éter petróleo, ya que a pesar de existir más presentan inconvenientes debido a la gran toxicidad y que se puede llegar a presentar una degradación de carotenoides, sin embargo la acetona, el metanol y el etanol aunque son menos polares, son más eficientes para la extracción de astaxantina y clorofila.¹⁹

En el estudio se realizó la extracción con método de extracción con metanol al 90% con el cual se garantiza una mejor concentración de astaxantina.⁷

3.6.7. Método de determinación

Procedimiento de la APHA, 1992. Se tomó 10 mL de la muestra por triplicadas, las cuales fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se retira el sobrenadante (medio de cultivo) y al paquete celular o precipitado se le adicionó 1ml de metanol al 90%, se calentó por 10 minutos a 60° en baño serológico y posteriormente se centrifuga con 12,000 rpm durante 5 minutos.⁷

3.6.8. Determinación de pigmentos

Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se toma la curva de calibración (absorbancia y en función de la concentración expresada en ug/mL) con patrones de referencia con lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina⁷ (Anexo B),(Anexo C), se hallaron las concentraciones en (ug/mL) con ayuda de la ecuación de la recta simplificada.

$$y = mx + b$$

3.6.9. Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (crecimiento celular) para los tratamientos (medios de cultivo) por triplicado con un nivel de confianza del 95%, para este análisis se empleó el programa Excel 2010.

4. RESULTADOS

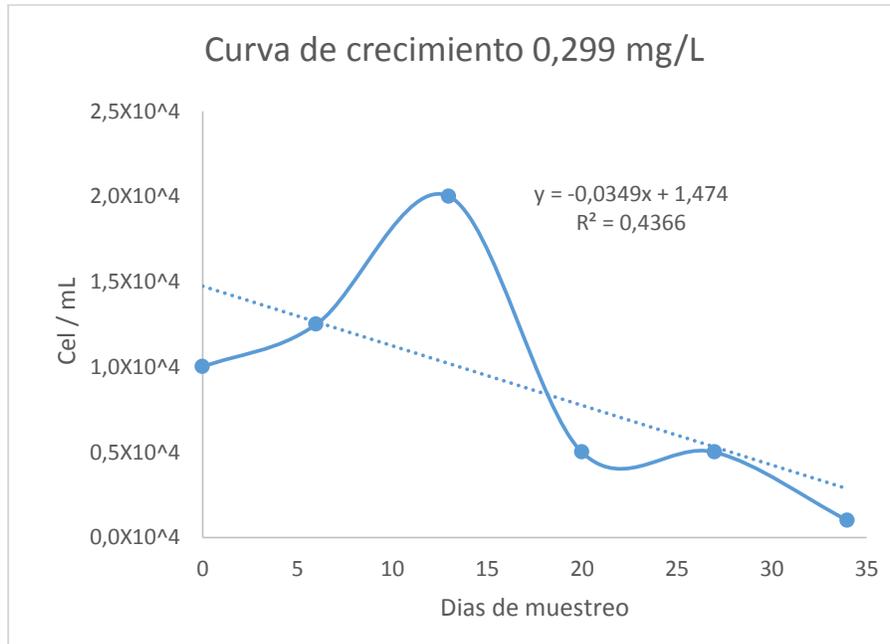
En el primer tratamiento realizado en el biorreactor TEC – FERM de 5 L durante el 9 de agosto y 13 de septiembre del 2017, se utilizó una concentración de 0.299 mg/L de acetato de sodio en el medio RM, bajo las condiciones de trabajo previamente establecidas. Obteniéndose un recuento de inicial de $1,0 \times 10^4$ Cel/mL y un recuento final del 1×10^3 Cel/mL durante los 34 días del estudio (Ver Tabla y Ver gráfica). El pH se presentó fluctuaciones entre 6,7 a 7,5, cercano a la neutralidad (ver Tabla, ver gráfica).

Tabla 6. Recuento celular 0,299 mg/L de acetato de sodio

Curva de crecimiento	
Días	Cél/mL
0	1.0×10^4
6	$1,25 \times 10^4$
13	$2,0 \times 10^4$
20	5×10^3
27	5×10^3
34	1×10^3

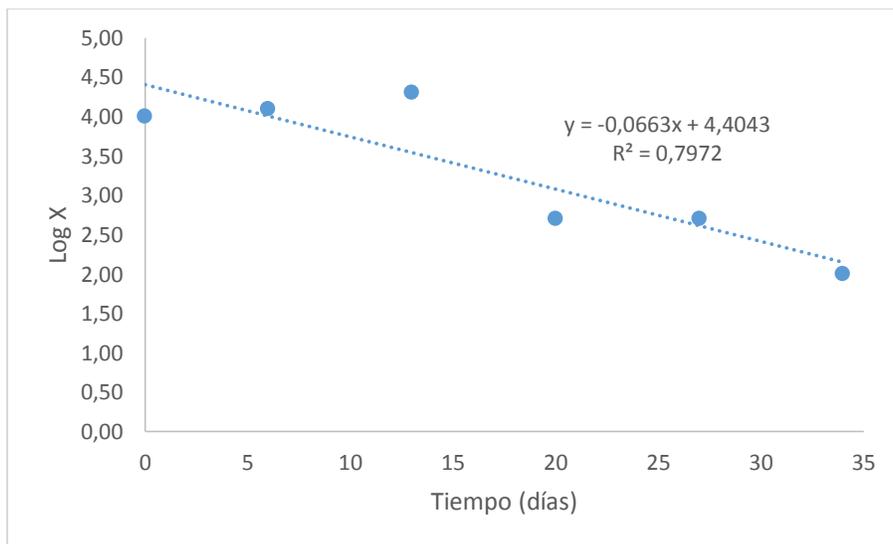
El recuento celular obtenido con el tratamiento de 0,299 mg/L de acetato de sodio se puede inferir que al pasar de los días la microalga presenta crecimiento exponencial hasta el día 13 en donde presenta un recuento celular de $2,0 \times 10^4$ Cel/mL, pero a partir del día 20 comienza a disminuir el recuento celular, tanto así que al día 34 termina con un recuento celular de 1×10^3 Cel/mL; Esto se le puede atribuir a que su fuente de carbono (acetato de sodio) se ha agotado y de esta forma se está induciendo a la muerte celular de la microalga. Esto se correlaciona con lo descrito por la literatura consultada la cual menciona que *H. pluvialis* tiene un crecimiento

exponencial hasta el día 15 y apartir de este momento sus recuentos tienen a disminuir e inician la aparición aplanosporas.¹⁴⁻⁴⁴



Grafica 1. Curva crecimiento celular con 0,299 mg/L de acetato de sodio.

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante transformación de los valores de Y a los que se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. La idea de realizar el ajuste fue para determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tratamientos probados.



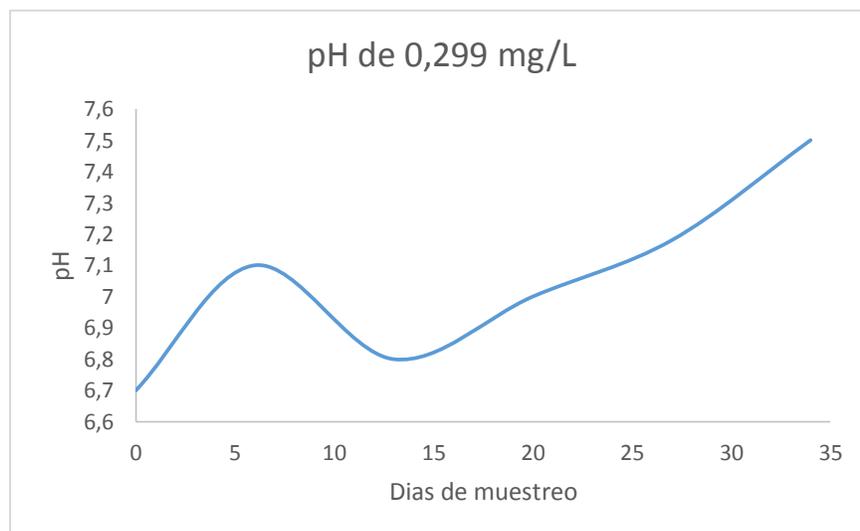
Grafica 2. Tendencia de crecimiento modelo logístico tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio.

A cada una de las muestras tomadas por triplicado se les realizó la medición de pH por medio del potenciómetro, para luego sacar un promedio de la mediciones realizadas, donde en el montaje realizado con 0,299 mg/L de acetato de sodio hubo un fluctuación de pH entre 6.7 a 7.5.

Tabla 7. pH montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio

Muestra	pH
0	6,7
6	7,1
13	6,8
20	7,0
27	7,2
34	7,5

El este primer tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio, se manejó un pH fluctuante entre 6,7 (inoculo inicial) y 7,5 (día 34), lo que nos dice que las condiciones de trabajo de este tratamiento mantuvieron al medio de cultivo en neutralidad, ayudando al crecimiento celular de la microalga, ya que esta no puede crecer cuando se encuentra a pH ácidos.⁴⁵



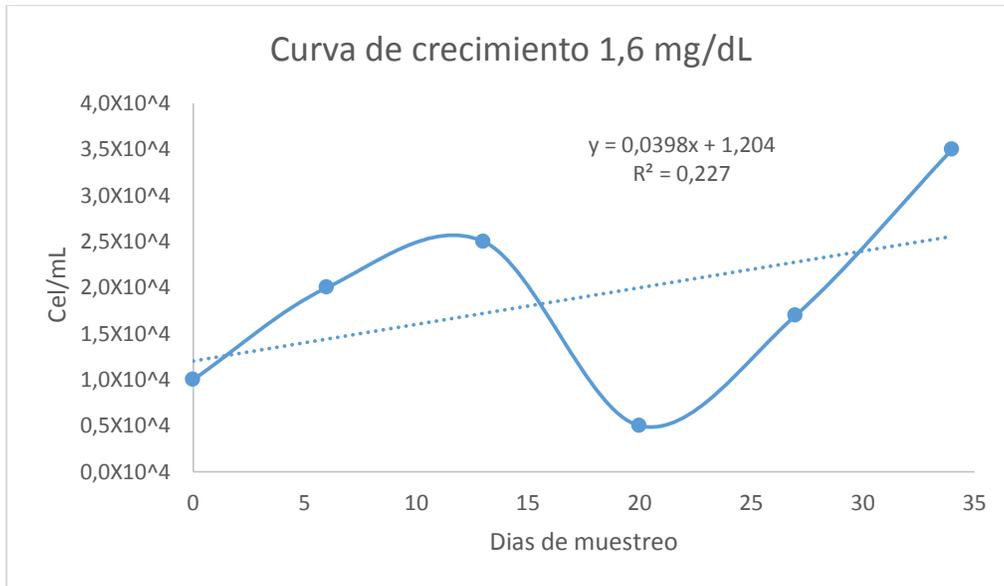
Grafica 3. pH montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio

En el segundo tratamiento realizado en el biorreactor TECFERM de 5L durante el 27 de Septiembre y 25 de octubre del 2017 con una concentración de 1.6 mg/L de acetato de sodio, se obtuvo un recuento de inicial de $1,0 \times 10^4$ Cel /mL y un recuento final del $3,5 \times 10^4$ Cél/mL durante los 34 días del estudio (Ver Tabla, ver gráficas). El pH presentó fluctuaciones entre 6,7 (inoculo inicial) y 8,6 (día 34). (Ver tabla, ver gráfica).

Tabla 8. Recuento celular 1,6 mg/L de acetato de sodio

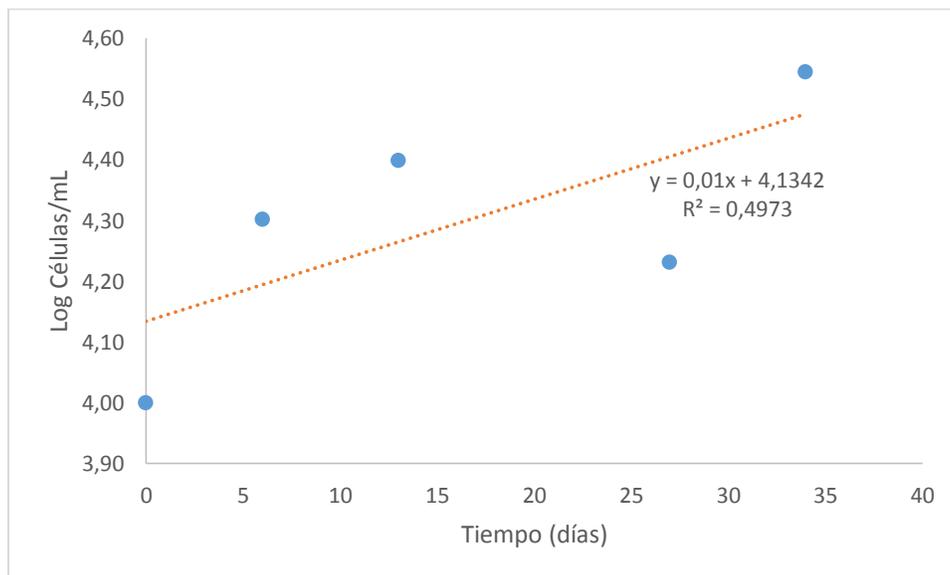
Curva de crecimiento	
Días	Células / mL
0	1.0×10^4
6	$2,0 \times 10^4$
13	$2,5 \times 10^4$
20	5×10^3
27	$1,7 \times 10^4$
34	$3,5 \times 10^4$

En el recuento celular obtenido con el tratamiento de 1,6 mg/L de acetato de sodio se puede inferir que al pasar de los días la microalga presenta crecimiento exponencial hasta el día 13, donde alcanzo un recuento de $2,5 \times 10^4$ Cel/mL pero apartir del dia 20 comienza a disminuir hasta el dia 27 con $1,7 \times 10^4$ Cel/mL,pero en el dia 34 se obtiene un aumento del recuento celular inesperado de $3,5 \times 10^4$ Cel/mL, este siendo superior al del dia 13.



Gráfica 4. Curva crecimiento celular con 1,6 mg/L de acetato de sodio

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante transformación de los valores de Y a los cuales se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. La idea de realizar el ajuste fue para determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tratamientos ensayados.



Gráfica 5. Tendencia de crecimiento modelo logístico tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio.

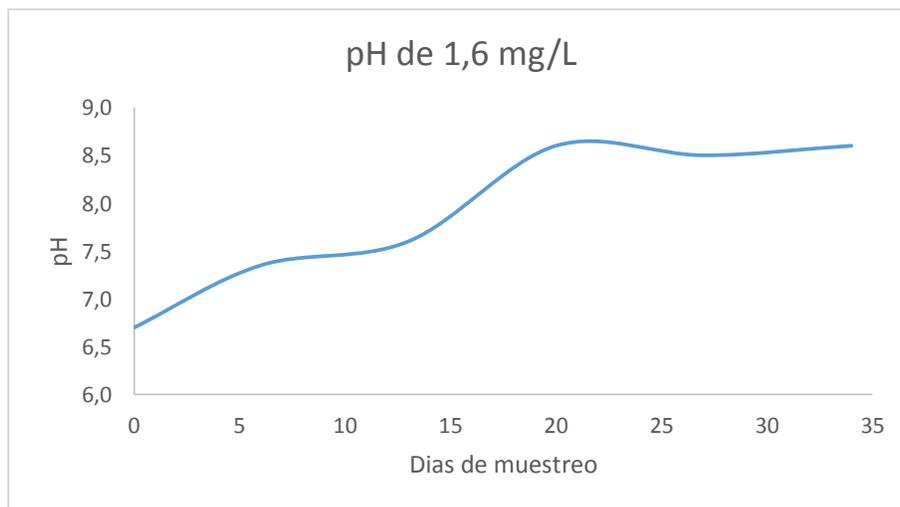
Nota grafica 5: Al momento de realizar la grafica de curva de crecimiento, se elimina el dato 5×10^3 del dia 20 en el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio, debido a que no permite que la grafica presente lineabilidad.

En el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un promedio de las mediciones de pH realizadas, donde hubo una fluctuación de pH entre 7,4 (primer día) y 8,6 (último día).

Tabla 9. pH montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio

Muestra	pH
0	6,7
6	7,4
13	7,6
20	8,6
27	8,5
34	8,6

En el segundo tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio, se manejó un pH fluctuante entre 6,7 (inoculo inicial) y 8,6 (día 34), lo que nos dice que las condiciones de trabajo en este tratamiento inclinaron al medio de cultivo hacia la alcalinidad del mismo, esto ayudando al crecimiento celular de la microalga, ya que esta no puede crecer cuando se encuentra a pH ácidos.⁴⁵



Grafica 6. pH montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio

El medio de cultivo con mayor velocidad especifica de crecimiento fue RM **con concentración de acetato 0,299 mg/L** con una velocidad especifica de crecimiento de 0.029 Cel/día (Ver tabla) (Ver curvas ajustadas Log X vs Tiempo)

Tabla 10. Velocidad de crecimiento de los montajes analizados

Medio de cultivo	Numero de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM y acetato 0,299 mg/L	6	4.204	4,300	0,029 Cel/día	79%
RM y acetato 1,6 mg/L	6	4.301	4,540	0,014 Cel/día	49%

Al realiza el ANOVA (95%), se estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($P=0,795$; $gl=1$; $F=0,071$). (Ver anexo D). Lo cual indica que el tratamiento que brinda mejores resultados es el de 0,299 mg/L , ya que con él se obtiene un mayor crecimiento de velocidad lo que mejora el crecimiento y por ende nos llevara a una mayor acumulación de astaxantina.

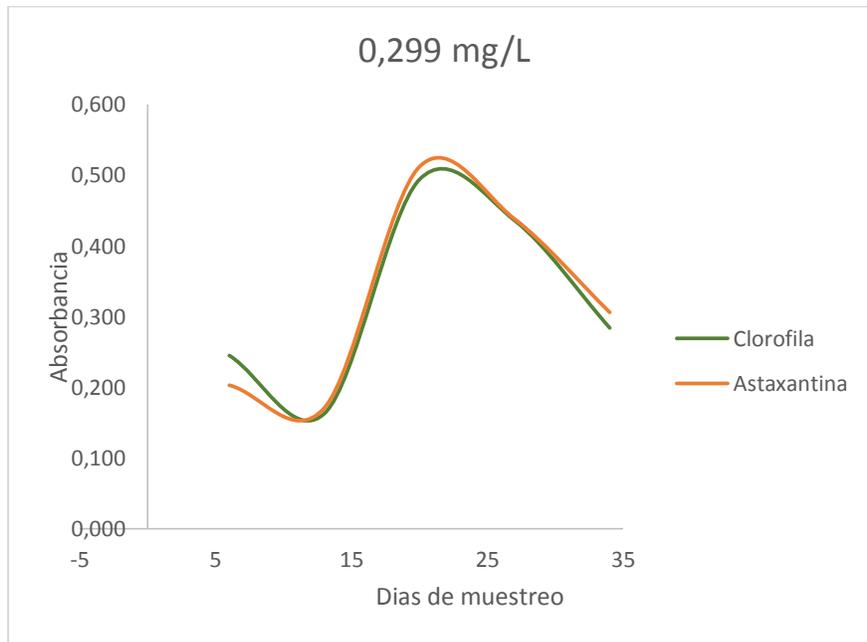
Pasados los 34 días respectivos para cada montaje se realizó la determinación de clorofila y astaxantina con metanol al 90%.

Tabla 11. Absorbancia obtenidas en el montaje con 0,299mg/L de acetato de sodio

DIAS	CLOROFILA	ASTAXANTINA
6	0,245	0,203
13	0,163	0,171
20	0,494	0,512

27	0,436	0,438
34	0,284	0,306

Nota: Las absorbancias de clorofila y astaxantina fueron medidas en rango de lectura de 677nm y 477 nm respectivamente



Grafica 7. Absorbancias obtenidas en el montaje con 0,299 mg/L de acetato de sodio

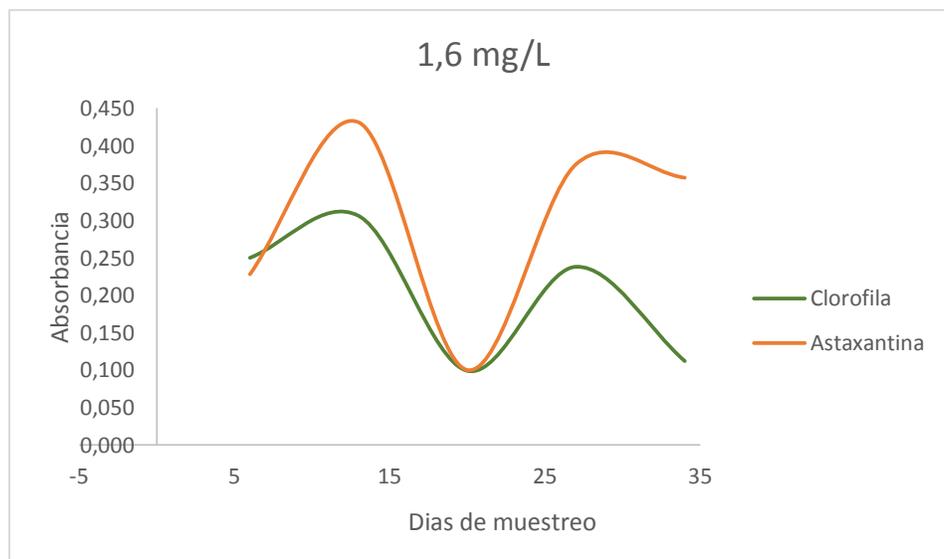
Con las absorbancias obtenidas después de la determinación con metanol al 90% de astaxantina y clorofila en el tratamiento con 0,299 mg/L, podemos decir que los datos obtenidos para ambos pigmentos tienen un comportamiento muy similar y se obtiene un mayor absorbancia en el día 20 en donde para clorofila con lectura a 677 nm, se obtiene una absorbancia de 0,494 nm y para astaxantina con lectura a 477 nm, se obtiene una absorbancia de 0,512 nm; a diferencia del día 34, en donde clorofila tiene una absorbancia de 0,284 nm y astaxantina una absorbancia de 0,306 nm, lo cual es consecuente con el recuento celular obtenido para esos días y con lo descrito en la literatura en donde menciona que la astaxantina y clorofila son inversamente proporcionales.¹³

Tabla 12. Absorbancia obtenidas en el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio con

DIAS	CLOROFILA	ASTAXANTINA
-------------	------------------	--------------------

6	0,250	0,228
13	0,306	0,431
20	0,099	0,100
27	0,238	0,375
34	0,112	0,357

Nota: Las absorbancias de clorofila y astaxantina fueron medidas en rango de lectura de 677nm y 477 nm respectivamente



Grafica 8. Absorbancias obtenidas en el montaje con 1,6 mg/L de acetato de sodio.

Con las absorbancias obtenidas después de la determinación con metanol al 90% de astaxantina y clorofila en el tratamiento con 1,6 mg/L, podemos decir que los datos obtenidos para ambos pigmentos no presentan un comportamiento muy similar a excepción del día 20 que fue un de las absorbancias más bajas obtenidas, un comportamiento totalmente diferente al tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio.

Aquí se obtiene la mayor absorbancia en el día 13 en donde para clorofila con lectura a 677 nm, se obtiene una absorbancia de 0,306 nm y para astaxantina con lectura a 477 nm, se obtiene una absorbancia de 0,431 nm; a diferencia del día 34 en donde clorofila tiene una absorbancia de 0,112 nm y astaxantina una absorbancia de 0,357 nm, lo cual es consecuente con el recuento

celular obtenido para esos días y con lo descrito en la literatura en donde menciona que la astaxantina y clorofila son inversamente proporcionales.¹³

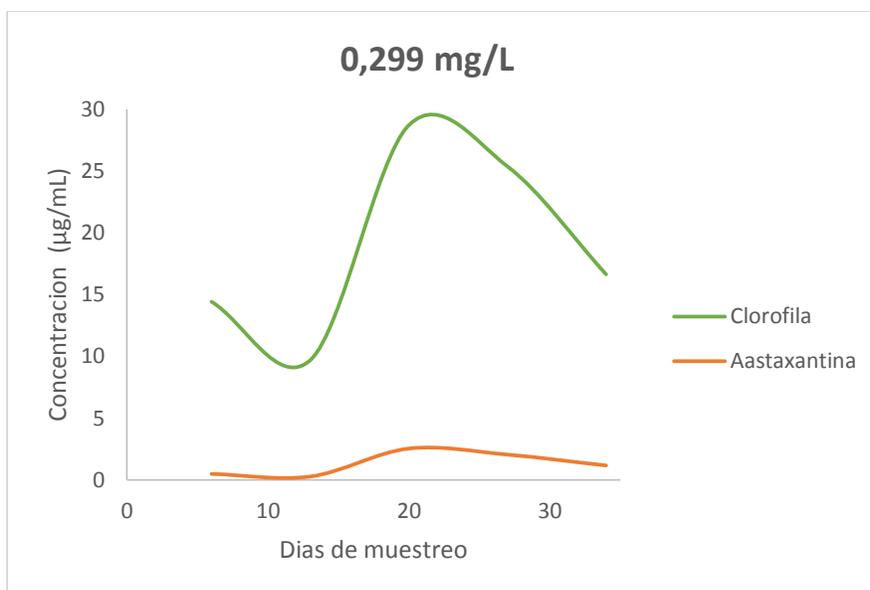
Luego de haber realizado las mediciones de las absorbancias se procede a hallar la concentración para cada una de las muestras de los dos montajes para clorofila y astaxantina con ayuda de la curva de calibración para concentración de astaxantina y clorofila. (Ver anexo C), (Ver anexo D).

Se puede decir que según la literatura consultada argumenta que la concentración de astaxantina en el primer día, sin importar el tratamiento no se podrá determinar debido a que aún no se ha producido un estrés adecuado por las condiciones de trabajo, lo que lleva a que no haya acumulación o producción de la astaxantina.⁴⁵ Razón por la cual la determinación de astaxantina y clorofila se inició desde el sexto día.

Tabla 13. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 0,299 mg/L

CLOROFILA		ASTAXANTINA
DIAS	CONCENTRACION (µg/mL)	CONCENTRACION (µg/mL)
6	14,415	0,476
13	9,683	0,264
20	28,706	2,530
27	25,373	2,038
34	16,637	1,161

En cuanto a las concentraciones de astaxantina y clorofila expresadas en µg/mL, en el tratamiento con 0,299 mg/L, se puede decir que ya no presentan un comportamiento similar, debido a que en este caso se encuentra mayor concentración de clorofila que de astaxantina ambas presentando su pico máximo en el día 20, en donde presentan concentraciones de 28,706 µg/mL de clorofila y 2,530 µg/mL de astaxantina, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular y absorbancias obtenidas.



Grafica 9. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 0,299 mg/L

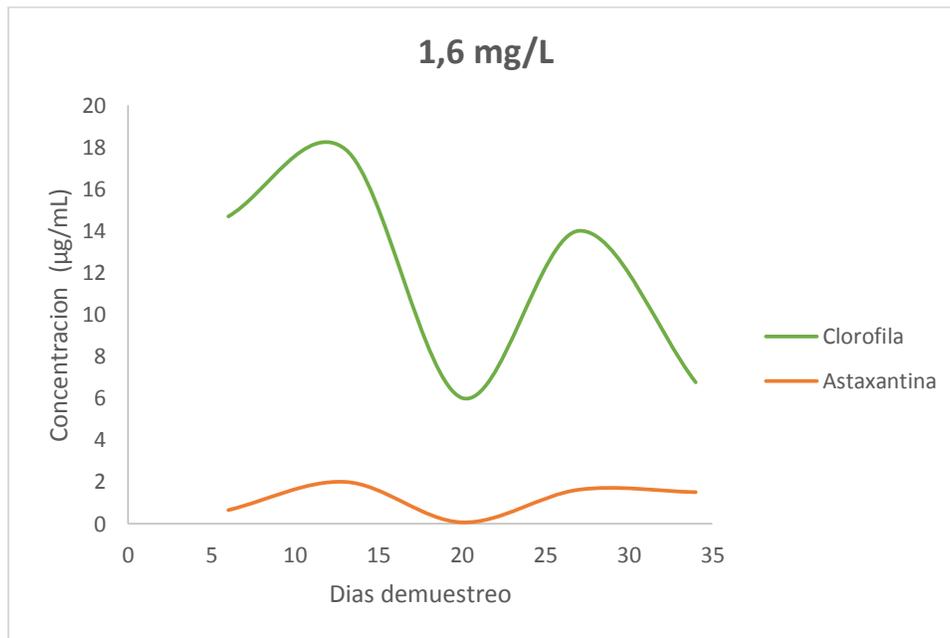
A partir del sexto día se halló una concentración de astaxantina de 0,476 µg/mL y una concentración de clorofila de 14,415 µg/mL, lo cual se puede atribuir a que el acetato de sodio se adiciono desde el primer día, de esta forma *H. pluvialis* presento condiciones poco favorables en el cultivo lo que la indujo a iniciar la acumulación de astaxantina desde este día. En el día 20 se obtuvo una concentración de astaxantina de 2,530 µg/mL y de una concentración de clorofila de 28,706 µg/mL, siendo esta una de las mayores concentraciones obtenidas en el tratamiento, mientras que en el día 34 se obtuvo 1,161 µg/mL de astaxantina y 16,637 µg/mL de clorofila. Estas concentraciones se pueden atribuir al crecimiento exponencial durante 15 días y agotamiento de fuente de carbono al día 34, debido a que el acetato fue adicionado desde el primer día de inicio del tratamiento.

Tabla 14. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 1,6 mg/L

CLOROFILA		ASTAXANTINA
DIAS	CONCENTRACION (µg/mL)	CONCENTRACION (µg/mL)
6	14,683	0,643
13	17,902	1,991

20	6,005	0,058
27	13,994	1,619
34	6,752	1,5

En cuanto a las concentraciones de astaxantina y clorofila expresadas en $\mu\text{g/mL}$, en el tratamiento con 1,6 mg/L, se puede decir que ya no presentan un comportamiento similar, debido a que en este caso se encuentra mayor concentración de clorofila que de astaxantina ambas presentando su pico máximo en el día 13, en donde presentan concentraciones de 17,902 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila y 1,991 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular y absorbancias obtenidas.



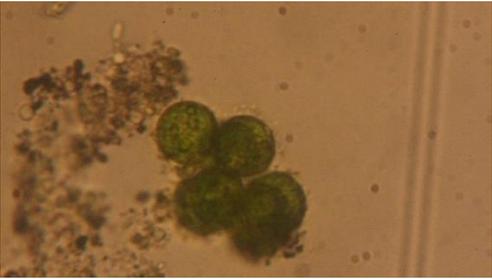
Grafica 10. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 1,6 mg/L

El segundo tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio, presenta un comportamiento similar al tratamiento con 0,299 mg/L, debido a que a partir del sexto día se hallaron concentraciones de astaxantina, la cual para este tratamiento fue de 0,643 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración de clorofila de 14,683 $\mu\text{g/mL}$, lo que se le puede atribuir a que el acetato de sodio se adiciono desde el primer día.

En el día 13 se obtienen los picos más altos de las concentraciones en este tratamiento, pues la concentración de astaxantina es de 1,991 $\mu\text{g/mL}$ y de una concentración de clorofila de 17,902 $\mu\text{g/mL}$, siendo esta una de las mayores concentraciones obtenidas en el tratamiento, mientras que en el día 34 se obtuvo 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina y 6,752 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila. Estas concentraciones se pueden atribuir al crecimiento exponencial durante 15 días y agotamiento de fuente de carbono al día 34, debido a que el acetato fue adicionado desde el primer día de inicio del tratamiento.

Al realizar el ANOVA (95%), se estableció que no existen diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos ensayados para la concentración de clorofila ($P=1$; $gl=1$; $F=0$). (Ver anexo D). Lo mismo se realizó para la concentración de astaxantina, en donde al realizar el ANOVA (95%), se estableció que no existen diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos ensayados para la concentración de astaxantina ($P=0,820$; $gl=1$; $F=0,054$). (Ver anexo F). Lo que significa que en relación a concentración de astaxantina no existe gran diferencia en usar la concentración de 0,299 mg/L o usar la concentración de 1,6 mg/L de acetato de sodio, pues los dos van a presentar una concentración similar

Durante cada montaje se llevó un registro fotográfico microscópico con el fin de evaluar la morfología de la microalga desde sus formas vegetativas hasta sus formas enquistadas

	0,299 mg/L	1,6 mg/L
DÍA	IMAGEN	IMAGEN
6		

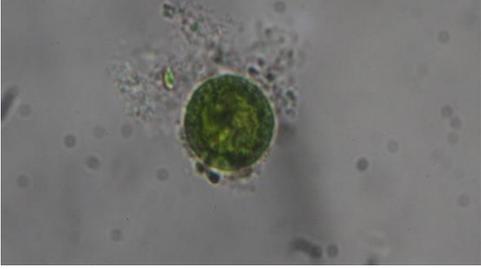
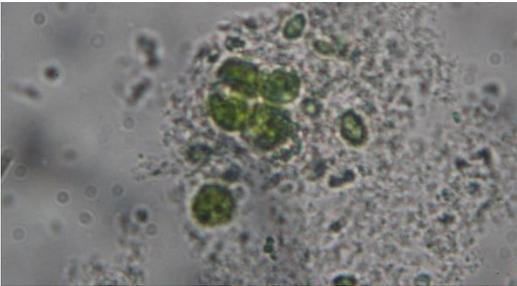
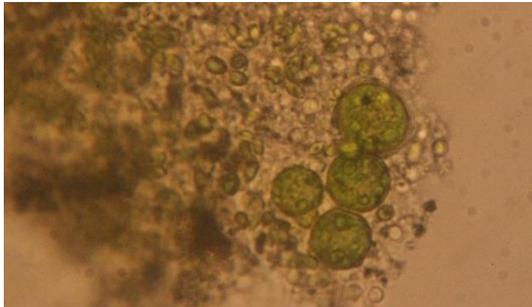
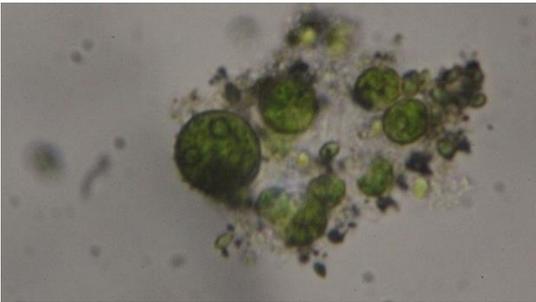
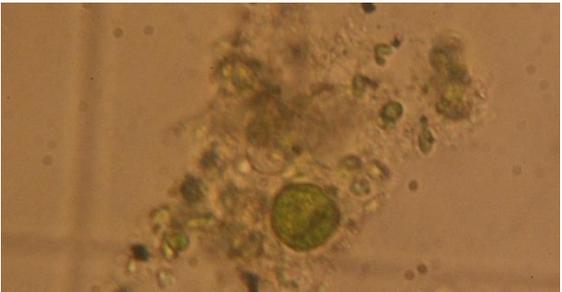
13		
20		
27		
34		

Figura 5. Registro fotográfico microscópico – **Fuente:** Autora, 2017

En cuanto al registro fotográfico de los dos tratamientos 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato de sodio, no existe alguna diferencia morfológica pues los dos presentaron formas celulares aplanosporas y quistes sin acumulación de astaxantina, esto gracias a que aunque si se hallaron concentraciones de astaxantina, al momento de realizar el registro fotográfico no se pudieron enfocar u observar formas quísticas con acumulación de astaxantina.

Entre los días 13 y 20 fue en donde se observaron mayor cantidad de formas celulares aplanosporas, debido a que el crecimiento exponencial de *H. pluvialis* ha terminado e inicia su fase de deceso, mientras que en los días finales de los tratamientos se observaron formas celulares quísticas debido a que se iban agotando los nutrientes y estas formas son más resistentes.¹⁴⁻⁴⁴

Para finalizar, a continuación, se presenta tabla resumen en donde se comparan los dos tratamientos para realizar un mejor análisis a partir de ella.

[] ACETATO DE SODIO	RECuento CELULAR Cel/mL	PH	[] DE ASTAXANTINA µg/mL	[] DE CLOROFILA µg/mL	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Cel/día
0,299 mg/L	2,0 x10 ⁴ Día 20	7,5 Día 34	2,530 Día 20	28,706 Día 20	0,029
1,6 mg/L	3,5 x10 ⁴ Día 34	8,6 Día 34	1,991 Día 13	17,902 Día 13	0,014

Tabla 15. Cuadro comparativo entre el tratamiento de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato sodio

Se sugiere utilizar el tratamiento de 0,299 mg/L de acetato de sodio, debido a que este presenta una tasa de crecimiento 2 veces mayor al tratamiento con 1,6 mg/L, lo que posiblemente se le puede atribuir al pH manejado en el tratamiento ya que se acerca más a la neutralidad.

5. DISCUSION

Debido a los avances en las investigaciones sobre la utilización de microalgas en la producción, obtención de biomasa y carotenoides en la última década; estas han tomado gran importancia gracias a que se ha visto gran viabilidad al trabajar con ellas, ayudando a las industrias que deciden utilizarlas por su gran actividad biológica, su potencial en las industrias alimentaria y farmacéutica, puesto que son utilizadas por su habilidad producción de pigmento y contribuir mejoramiento en la tasa de supervivencia de los animales acuaticos⁵⁴.

Esto es gracias a que la astaxantina producida por *H. pluvialis* es acumulada en forma de gotas de aceite en los plásmidos o en el citoplasma del organismo, los cuales son acumulados cuando se encuentran en ambientes poco favorables para su supervivencia, en respuesta al estrés ocasionado por diferentes factores como la falta de nutrientes, el alto grado de salinidad, periodos prolongados de luz, entre otros. Este mecanismo ha sido denominado como una estrategia de supervivencia del organismo por varios autores⁵³⁻⁵⁵⁻⁵⁴. De esta forma cuando el estrés desaparece, las moléculas de astaxantina acumuladas con anterioridad son utilizadas como fuente de carbono y para el crecimiento celular, razón por la cual este último se puede ver restaurado nuevamente a la normalidad con producción de biomasa únicamente.

Es así como a modo de suplir la necesidad de la obtención de astaxantina a gran escala, realizamos los tratamientos en un biorreactor TEC-FERM de 5 L. Debido a que con la

disposición de nuevas tecnologías que se van implementando para la realización de escalamientos se concluye que el uso de los biorreactores con sistemas cerrados como el usado en este trabajo de investigación proporcionan mejores opciones para el crecimiento de la mayoría de microalgas, pues estos protegen el cultivo de la contaminación por microorganismos no deseados y de esta forma se permite que se tenga un control integral de las condiciones de cultivo⁷⁻⁵⁵. Además de esto, tomando como base los resultados del trabajo de grado titulado “Evaluación de condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis*” realizada en el 2015,⁷ se toma la decisión de la utilización del medio RM bajo las condiciones de estrés como lo son las diferentes concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L Y 1,6 mg/L), pH 6.7, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20h luz blanca y 4h oscuridad, aire filtrado, agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm, todo con el fin de aumentar el crecimiento del inóculo inicial $1,0 \times 10^4$ Cel/mL y así inducir en la microalga la acumulación de astaxantina en su forma química, con lo cual se pueda corroborar lo dicho por Niño en 2015⁷ y por Cifuentes en 2003¹⁹.

Del mismo modo muchos autores se han dedicado a investigar cuáles son los factores de estrés que ayudan a la adecuada acumulación de astaxantina, como el tipo, color y nivel de intensidad de luz, la agitación, el pH los cuales han arrojado buenos resultados como Ramírez en el 2013, en donde realizo cultivo en un fotobioreactor tipo airlift, en donde manejo elevadas concentraciones de salinidad y altas intensidad de luz como condiciones de trabajo y obtuvo una acumulación de astaxantina de $32,99 \mu\text{g/mL}$.¹⁵

De esta forma es como nace la inquietud por investigar nuevos factores de estrés para *H. pluvialis*, en como variar las concentraciones de acetato de sodio ya que este ayuda a promover el crecimiento celular^{19,7,20}, pero también dejan abierto el campo a nuevas investigaciones, afirmando que la concentración de acetato de sodio se debe controlar ya que con niveles inapropiados se puede generar la inhibición del crecimiento celular²⁰. Precisamente de esta afirmación es cómo surge la inquietud de ¿Cuál es la concentración adecuada de acetato de sodio para poder lograr una buena acumulación de astaxantina y evitar la inhibición de su crecimiento?.

Con la única finalidad de responder el anterior interrogante se decide realizar el estudio con diferentes concentraciones de acetato de sodio (0.299 mg/L Y 1.6 mg/L) y así determinar si la concentración de acetato de sodio en el medio hace variar la creación de un ambiente no favorable para *H. pluvialis* y de esta forma ayudar a la acumulación de astaxantina como lo vimos en el estudio de Niño en el 2015 cuando sometió a *H. pluvialis* en un medio RM con 0.310 mg/L de acetato de sodio en 350 mL, en donde obtuvo un crecimiento celular de 7.55×10^5 Cel/mL y una velocidad de crecimiento de 0,092 Cel/día en 36 días,⁷ siendo este el que presentó mejor rendimiento en cuanto a crecimiento celular y obtención de astaxantina en comparación con los otros medios ensayados en este trabajo (OHM, BBM).

Por esta razón se decidió realizar el presente estudio en el medio RM en donde se obtuvo un crecimiento de $2,0 \times 10^4$ Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,029 Cel/día con 0,299 mg/L de acetato de sodio y el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular de $3,5 \times 10^4$ Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,014 Cel/día, resultados obtenidos pasados los 34 días del estudio utilizando el biorreactor, demostrando que la utilización del biorreactor para el escalamiento de cultivos para *H. pluvialis*, es viable debido a que se evita la contaminación del cultivo, ya que se tiene bajo control ciertas condiciones como las rpm de agitación, no se modifica la morfología de las células y la temperatura. Además de esto se puede concluir que el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio tuvo mejor tasa de crecimiento lo que ayuda mayor acumulación de astaxantina, esto siendo muy consecuente con lo mencionado con Poon en el 2015, debido a que él realiza sus tratamientos con un fotobiorreactor tipo APBR y en sistema batch con las mismas condiciones de trabajo, obtiene mejores resultados en el cultivo manejado con el fotobiorreactor, debido a que en él se pueden mantener bajo mayor control las condiciones de trabajo.³¹

Por otra parte, se puede decir que con las concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L y 1,6 mg/L) se obtiene mejor tasa de crecimiento, ya que se obtuvieron los recuentos anteriormente mencionados mientras que Cifuentes en el año 2009, solo pudo obtener un aumento de 1.0×10^4 a $1,8 \times 10^4$, lo que nos lleva a validar su postulado de que la suplementación de medios con acetato de sodio ayuda al incremento del crecimiento celular y a la formación de formas celulares quísticas.¹⁹

Del mismo modo aunque se obtuvo mayor recuento celular que algunos otros estudios en los cuales se realizó suplementación con acetato de sodio,¹⁹⁻²⁰ se observa que los recuentos celulares que se obtuvieron entre los días 15 y 20 del estudio para los dos montajes estuvieron en un rango de $2,0 \times 10^4$ Cel/mL y 5×10^3 Cel/mL para el tratamiento con 0,299 mg/L y el tratamiento con 1,6 mg/L se obtuvo un rango de crecimiento de $2,5 \times 10^4$ Cel/mL y 5×10^3 Cel/mL cada uno para los días respectivamente mencionados anteriormente esto se puede explicar de dos formas diferentes.

En la primera se puede decir que el microorganismo simplemente siguió su ciclo natural de crecimiento de aproximadamente 15 días¹⁴⁻⁴⁴ como lo describe la literatura, o la segunda mencionada por Woong en el año 2006 en donde afirma que la concentración de acetato deberá ser controlada a niveles apropiados con el fin de evitar la inhibición del crecimiento celular por acción del acetato de sodio, debido a que en su investigación con altas concentraciones de acetato de sodio 50 Mm, obtuvo un rápido cambio morfológico de células vegetativa a forma quística y realizaba el blanqueamiento total de las células quísticas,²⁰ lo que nos lleva a cuestionarnos si la adecuada concentración de acetato de sodio es de 0,310 mg/L⁷.

Un factor a resaltar es que la mayoría de los estudios suplementados con acetato de sodio tienden a tener una mayor producción de biomasa que de astaxantina como lo observado en el presente estudio y es que así como se puede hacer referencia a los autores que han descrito anteriormente que las células de *H. pluvialis* solo requiere carbono como principal nutriente en la “etapa de crecimiento” y este se le puede ser suministrado diariamente por inyección de CO₂ o por aire filtrado como en el presente estudio y con alta irradiación, fotoperiodos 20h luz y 4 oscuridad, se proporciona mayor energía para la fijación fotosintética del carbono, lo que conduce a que haya un mayor tasa de síntesis de astaxantina⁵⁵; Lo que lleva a deducir que en el estudio posiblemente no hubo la adecuada fijación fotosintética debido a que el biorreactor TERFERM presenta una especie de ventana pequeña para su tamaño por donde entra la luz ,lo que posiblemente fue un factor determinante que evitó que se diera una elevada tasa de síntesis de astaxantina pero si una adecuada producción de biomasa.

Actualmente compañías dedicadas a la producción comercial de astaxantina a partir de microalgas (Cyanotech y Aquasearch), recurren a un sistema compuesto por dos etapas, la

primera o también llamada “etapa verde” que consiste en producir biomasa verde en condiciones óptimas de crecimiento y la segunda o también llamada “etapa roja” que se inicia cuando la microalga es expuesta a condiciones ambientales adversas para inducir a la acumulación de astaxantina⁵⁵. Es aquí donde la suplementación con acetato de sodio puede ser implementada desde el día 15, debido a que va a presentar un rendimiento adecuado en cuanto a la producción de biomasa y ayuda a la formación de quistes los cuales son la forma celular adecuada para acumulación de astaxantina.

En cuanto a la concentración de astaxantina ($\mu\text{g/mL}$) obtenida en el estudio se puede decir que al momento de la determinación y cuantificación se puede decir que si se obtuvo, pues para el tratamiento de 0,299 mg/L la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el día 20 con 2,530 $\mu\text{g/mL}$ y para el día 34 fue de 1,161 $\mu\text{g/mL}$; mientras que el tratamiento con 1,6 mg/L obtuvo una elevada concentración de astaxantina en el día 13 con 1,991 $\mu\text{g/mL}$ y para el día 34 fue de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, resultados que pueden ser correlacionados perfectamente con el recuento celular obtenido para esos días. Por otro lado, en cuanto a la concentración de clorofila se puede decir que sucedió algo muy similar, ya que en el tratamiento de 0,299 mg/L en el día donde halló mayor concentración fue en el día 20 con 28,706 $\mu\text{g/mL}$ y en el día 34 fue de 16,637 $\mu\text{g/mL}$; mientras que para el montaje con 1,6 mg/L se halló una mayor concentración en el día 13 con 17,402 $\mu\text{g/mL}$ y para el día 34 fue de 6,752 $\mu\text{g/mL}$.

Aunque la concentración de clorofila fue disminuyendo a medida que el final del estudio se acercaba a su final, la astaxantina iba aumentando su concentración como se demostró con la determinación de la misma, lo cual era lo realmente importante del proyecto, pero se observa que durante todo el estudio en los dos tratamientos realizados la clorofila y astaxantina fueron inversamente proporcionales, lo cual es lo descrito por todos los autores consultados.⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶ Es aquí donde se reafirma la situación planteada anteriormente en donde el estudio puede ser llevado en “etapa verde” hasta el día 20, ya que en este día se obtiene una buena producción de biomasa y después de este día se puede suministrar inyecciones directas de CO_2 , acetato de sodio y alta irradianza con fotoperiodos de 20h luz y 4h oscuridad con el fin de generar el estrés indicado para la iniciación de la “etapa roja” para que las células inicien el verdadero estrés de las condiciones poco favorables que se le están brindando y de esta forma comience la acumulación de astaxantina y por lo tanto una buena obtención de la misma a futuro.

Las inyecciones de CO₂ también pueden ser sustentadas gracias a que este ayuda a regular el pH, lo que es un claro ejemplo de lo que se observó en el tratamiento con 1,6mg/L de acetato de sodio, donde el aumento de pH inclinado hacia la alcalinidad del medio fue una posible causa de que la velocidad de crecimiento celular fuera menor a comparación del tratamiento con 0,299 mg/L, ya que este presentó un pH más neutral y presentó una mejor velocidad de crecimiento celular, razón por la cual se planea o se sugiera que la inyección directa de CO₂ se sume a las condiciones de trabajo para los estudios de escalamiento de *H. pluvialis*.

Todos los resultados obtenidos hasta el día 20 se deben a la etapa de crecimiento o “etapa verde”, generalmente dura de 9 a 20 días según la relación entre la biomasa celular y la actividad celular, lo cual se pudo evidenciar en el estudio debido a que en este tiempo fue en donde se obtuvo un mayor crecimiento celular.

Luego llegando a la etapa de acumulación de astaxantina o “etapa roja”, la morfología de aplanosporas cambian en consecuencia a la disminución de nutrientes y el aumento del ambiente de estrés, las cuales son diferentes a las condiciones óptimas para el crecimiento celular, de esta manera se deduce que para que el estudio presente mejores resultados, el estrés con el acetato de sodio puede ensayarse aplicándolo a partir del día 15 u 20 y no desde el primer día, ya que los diferentes estudios han tenido mejores rendimientos han aplicado el estímulo desde el día 15 sin importar su fuente de carbono⁵⁴.

6. CONCLUSIONES

- El crecimiento de la microalga con el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio y las demás condiciones establecidas para el proceso fue de $2,0 \times 10^4$ Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,029 Cel/día, mientras que el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio obtuvo un crecimiento celular de $3,5 \times 10^4$ Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,014 Cel/día, resultados obtenidos en los 34 días del estudio con la utilización del biorreactor, lo que nos indica que el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio presentó una velocidad de crecimiento 2 veces mayor al tratamiento con 1,6 mg/L. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$).
- La concentración de astaxantina ($\mu\text{g/mL}$) obtenida con el tratamiento de 0,299 mg/L de acetato de sodio fue de 2,530 $\mu\text{g/mL}$, en el día 20 del cultivo y la concentración con el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio fue 1,991 $\mu\text{g/mL}$, en el día 13 del cultivo y para el día 34 fue de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, resultados que pueden ser correlacionados perfectamente

con la morfología celular obtenida. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P>0.05$).

- La concentración de clorofila se puede decir que sucedió algo muy similar a lo ocurrido con la astaxantina, ya que en el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio en el día donde se halló mayor concentración fue en el día 20 con 28,706 $\mu\text{g/mL}$; mientras que para el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio se halló una concentración en el día 13 con 17,402 $\mu\text{g/mL}$, resultados que pueden ser correlacionados perfectamente con la morfología celular obtenida. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P>0.05$).
- El tratamiento en el cual se utilizó la concentración de 0,299mg/L de acetato de sodio fue el más adecuado en cuanto velocidad de crecimiento (0,029 Cel/día) y acumulación de astaxantina (2,530 $\mu\text{g/mL}$), lo cual se le puede atribuir a que una elevada concentración de acetato de sodio no es adecuada, ya que después de este y anteriores estudios queda comprobado que se puede trabajar con concentraciones inferiores o iguales a 1 mg/L de acetato de sodio.
- Los biorreactores de sistemas cerrados como el utilizado en este estudio proporcionan condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, ya que nos ayudan a proteger el cultivo de la contaminación por microorganismos no deseados y de esta forma se permite que se tenga un control integral de las condiciones de cultivo. Además, se produjo el colorante astaxantina bajo las condiciones ensayadas y se conservó la morfología de esta microalga.

7. SUGERENCIAS

- Seguir con la utilización de la influencia de diferentes factores de estrés como acetato de sodio, altas irradianzas, ya que son condiciones de estrés que crean un ambiente hostil para el crecimiento de *H. pluvialis* y de esta forma inducir a la acumulación de astaxantina. Se recomienda adicionar el acetato de sodio después del cumplimiento de la fase exponencial de la microalga.
- Continuar con el escalamiento de cultivos para *H. pluvialis* en el biorreactor TEC-FERM de 5 L de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, ya que a pesar de ser este el

primer estudio realizado en él, es una excelente opción ya que gracias a su sistema cerrado se tiene mayor control de las condiciones de trabajo. Además de ser un sistema, sencillo de manejar, cumple con lo requerido y brinda un acercamiento a lo utilizado en la industria para los escalamientos de cultivos.

- Realizar el suministro de CO₂ por inyección directa en los próximos estudios, ayudando a la inducción de acumulación de astaxantina en la forma quística de *H. pluvialis*; Además de ayudar a regular el pH del medio, lo cual es beneficioso para el crecimiento de la microalga.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia J, De Vicente M, Galan B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. Rev Microbial Biotechnology. España. 2017 Sept [Citado 2018 Febrero 27]. Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/154331>
2. Allewaert C, Vanormelingen P, Proschold T, Gomez P, Gonzalez M, Bilcke G, D'Hondt S, Vyverman W. Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Rev. Phycologia. Germany. 2015 octubre. [Citado 2018 Febrero 27]. Disponible en: <http://www.phycologia.org/doi/10.2216/15-55.1>
3. Juun J, Choi S, Kim J, Chang W, Sim S. Development of thin-film photo-bioreactor and its application to outdoor culture of microalgae 2013. Rev PubMed. Japón. [Internet].

2013 Jun [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361185>

4. Kang J, Lee H, Park S. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity . Rev. PubMed. Estados Unidos. [Internet]. 2013 Abril [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17216459>
5. Bangxiang H, Hou L, Dong M, Shi J, Huang X, Ding Y, Cong X, Zhang F, Zhang X, Zang X. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. Rev International Journal Molecular Sciences. China. 2018 Enero. [Citado 2018 Febrero 27]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316673>
6. Camacho J, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. Rev. Nova. Colombia [Internet]. 2013 Mayo. [Citado 2017 Febrero 25]. Disponible en:
<http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/227/458>
7. Niño Milena. Evaluación de medios de cultivo para la extracción de astaxantina con *Haematococcus pluvialis*. Tesis. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2013 [Citado 2017 Octubre 29]. Disponible en:
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/2073/2273>
8. Hamed I. The Evolution and Versatility of Microalgae Biotechnology: A Review. Rev Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Estados Unidos. 2016 Sept [Citado 2017 Febrero 26]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12227/full>

9. Sidharth Arora, Richa Rani, Sanjoy Ghosh. Review Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. Rev Journal of Biotechnology. India. 2018 Febrero. [Citado 2018 Febrero 27]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561830018X?via%3Dihub>
10. Zuluaga D. Curso: Operación fermentador TECFERM 5L. (Anexo A)
11. Center for Science in the Public Interest. CSPI Says Food Dyes Pose Rainbow of Risks Cancer, Hyperactivity, Allergic Reactions. Rev Estados Unidos. Nutrition Action [Internet]. 2010 Jun. [citado 2017 Febrero 25]. Disponible en: <https://cspinet.org/new/201006291.html>
12. Cortázar. A, Coronel. C, Escalante. A., González. C. Contaminación generada por colorantes en la industria textil. Rev. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México [Internet]. 2014 Ene. [Citado 2017 Febrero 25]. Disponible en: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>
13. Kang J, Lee H, Park S. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity . Rev. PubMed. Estados Unidos. [Internet]. 2013 Abril [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17216459>
14. Córdoba N, Acero N, Duque L, Jiménez J, Serna J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Rev. UGciencia. Colombia [Internet]. 2011. [Citado 2017 Febrero 26]. Disponible en: <http://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/426>
15. Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. 2013 [Citado 2017 Febrero 25]. Disponible en:

<http://www.bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>

16. Aravena I. Extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* usando co₂ supercrítico. Tesis. Universidad Pontificia Universidad Católica de Chile [Internet]. 2011. [Citado 2017 Febrero 26]. Disponible en: <https://repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/1487/567778.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
17. Yoo J, Choi S, Kim B, Sim S. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. Rev. Bioprocess Biosyst Eng. Korea [Internet]. 2012 Mayo. [Citado 2017 Febrero 26]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909667>
18. Valdés J, Montañez J, Águila C, Méndez A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Rev. AQM . México [Internet]. 2012 Enero [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>
19. Cifuentes S, Gonzalez M, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Rev Biol Res. Chile. [Internet]. 2003 Marzo. [citado 2018 Marzo 01]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631867>
20. Woong C, Jeon Y, Sang Y. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Rev Enzyme and Microbial Technology. Corea del Sur. 2006 Julio. [accessed Mar 01 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228353480_Combined_effects_of_light_intensity_and_acetate_concentration_on_the_growth_of_unicellular_microalga_Haematococcus_pluvialis

21. Gonzalez M, Cifuentes A, Gomez P. Growth and total carotenoid content in four chilean strains of *Haematococcus pluvialis* flotow, under laboratory conditions. Rev Guayana Botanica.Chile.2009 [Citado 2017 Febrero 25]. Disponible en: <https://search.proquest.com/openview/9248d4f7903018ebac4313376fed3923/1?pq-origsite=gscholar&cbl=54986>
22. Zheng G, Chunxiao M, Xiaowen Z, Dong X, Xuexia M, Yitao W, Limin Y, Hongxin L, Lingling C, Naihao Y. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Rev Enzyme and Microbial Technology.China. 2012 Septiembre. [accessed Mar 01 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022912001147?via%3Dihub>
23. Nunes, Moira, Vieira, Armando Augusto Henriques, Pinto, Ernani, Carneiro, Ronaldo Leal, & Monteiro, Antonio Carlos. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. Rev Pesquisa Agropecuária Brasileira, Sao Paulo [Internet]. 2013 Agosto [2017 Oct 28] 48(8), 825-832. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100204X2013000800006&script=sci_abstract&tlng=es
24. Sipaúba-Tavares LH., Millan RN., Berchielli-Morais FA.. Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. Braz. J. Biol. [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 Mar 01]; 73(3): 585-591. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151969842013000300585&lng=en&nrm=iso&tlng=en
25. Park J, Choi S,Hong M, Sim S. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. Rev. Bioprocess and Biosystems Engineering, Corea del sur [Internet]. 2014 Octubre[2018 Mayo 01] 10, 2039-2047.Disponible en:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00449-014-1180-y>

26. Kiryag Jearim Hernández Morales, María Eugenia Pérez Morales' Carmen Jáuregui Romo, Luis Alberto Alcántara Jurado, Lilia Angélica Hurtado Ayala. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. Rev. mex. cienc. farm , Mexico [Internet]. 2013 Agosto [2017 Oct 28] Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000100007
27. Hernández A. Labbé J. Yoo J. Microalgas, cultivo y beneficios. Rev. biol. mar. oceanogr. [Internet]. 2014 Ago [citado 2018 Ago 26] ; 49(2): 157-173. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572014000200001&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>.
28. Wen Z, Liu Z, Hou Y, Liu C, Gao F, Zheng Y Chen F. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. Rev. Enzyme and Microbial Technology. Corea del sur. 2015 Octubre.[cited 2018 Mar 01] ; 78(3): 10-17. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915300168?via%3Dihub>
29. Poonkum W, Powtongsook S, Pavasant P. Astaxanthin induction in Microalga *H. pluvialis* with flat panel airlift photobioreactors under indoor and outdoor conditions. Rev Prep Biochem Biotechnol. 2015 Enero.[cited 2018 Mar 01] ; 45(1): 1-17. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105532>
30. Wan M, Zhang Z, Wang J, Huan J, Fan J, Yu A, Wang W, Li Y. Sequential Heterotrophy-Dilution-Photoinduction Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin. Rev Bioresour Technol. 2015 Diciembre.[cited 2018 Mar 01] ; 63: 198-557. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433152>

31. Wang N, Guan B, Kong Q, Sun H, Zhao Y, Duan L. Enhancing biomass of *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production by pH . controlled fed- batch culture. Rev Food and Fermentation Industries. China. 2016 Junio. [cited 2018 Mar 01] ; 42(2): 120-124. Available from: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-SPFX201602021.htm
32. Cheng J, Li K, Yang Z, Zhou J, Cen K. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. Rev. [Bioresource Technology](#). Corea del sur. 2016 Marzo. [cited 2018 Mar 01] ;49-54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415017162?via%3Dihub>
33. Fatima Nasrin Haque. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Tesis. The University of Guelph. 2016 [Citado 2018 Mar 01]. Disponible en: https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/9933/Haque_Fatima_201609_MASc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
34. Fatima Haque, Animesh Dutta, Mahendra Thimmanagari, Yi Wai Chiang. Integrated *Haematococcus pluvialis* biomass production and nutrient removal using bioethanol plant waste effluent. Rev. Process Safety and Environmental Protection, Canada [Internet]. 2017 Junio [2017 Oct 29]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.javeriana.edu.co:2048/science/article/pii/S0957582017301945>
35. Marcelinus Christwardana, H. Hadiyanto. The effects of audible sound for enhancing the growth rate of microalgae *Haematococcus pluvialis* in vegetative stage. Rev. HAYATI Journal of Biosciences , Indonesia [Internet]. 2017 Agosto [2017 Oct 28] . Disponible en: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.javeriana.edu.co:2048/science/article/pii/S1978301917301420>

36. Ke Li, Jun Cheng, Qing Ye, Yong He, Junhu Zhou, Kefa Cen. In vivo kinetics of lipids and astaxanthin evolution in *Haematococcus pluvialis* mutant under 15% CO₂ using Raman microspectroscopy. Rev. Bioresource Technology, Zhejiang [Internet]. 2017 Mayo [2017 Oct 29]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect-com.ezproxy.javeriana.edu.co/science/article/pii/S0960852417306247>
37. Wanida Pan-utai, Pramuk Parakulsuksatid, Naraporn Phomkaivon. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: organic and inorganic. Rev. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Tailandia [Internet]. 2017 Septiembre [2017 Oct 29]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.javeriana.edu.co:2048/science/article/pii/S1878818117304619>
38. Zheng Y, Li Z, Tao M, Li J, Hu Z. Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. Rev Aquatic Toxicology, Amsterdam [Internet]. 2017 Diciembre [2018 May 01]; 183:21-27. Available from:
<http://europepmc.org/abstract/med/27987436>
39. Christian D, Zhang J, Sawdon A, AnPeng C. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. Rev Bioresource Technology, Moscú [Internet]. 2018 Febrerp [2018 May 01]. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418302712>
40. Ma R, Skye R, Chua E, Alsenani F, Eltanahy E, Netzel M, Lu Y, Peer M. Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus*

- pluvialis* in response to different LED lighting conditions. Rev Bioresource Technology, Australia [Internet]. 2018 Febrero [2018 May 01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417320989?via%3Dihub>
41. Bangxiang H, Lulu H, Manman D, Shi J, Huang X, Ding Y, Cong X, Zhang f, Zhang X, Zang X. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. Rev. International Journal of Molecular Sciences. China. [Internet]. 2018 Febrero [2018 May 01]. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/17>
42. Matheus V, Sant' ana L. Biotechnology: the role of science and technology upon society. Rev Unisaita Science and Technology. Colombia [Internet]. 2016 December. [Citado 2017 Febrero 25]. Disponible en: <http://ojs.unisanta.br/index.php/sat/article/view/753/796>
43. Fernández J, Guillén A, Gutiérrez G, Flores J, Pérez J. Presencia de *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) en la provincia de Zamora (Haematococcaceae). Bol. Real Sociedad Española de Historia Sección Biología. España [Internet]. 2015. [Citado 2017 Febrero 26]. Disponible en: <http://historia.bio.ucm.es/rsehn/cont/publis/boletines/296.pdf>
44. Xi T, Dae K, Woon R. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. Rev. AGRIS. Estados Unidos. [Internet]. 2015 Febrero [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600261036>
45. Valdés J, Montañez J, Águila C, Méndez A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Rev. AQM . México [Internet]. 2012 Enero [citado 2017 Oct. 26]. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>

46. Arias M, Martínez J, Cañizares R. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta biol.Colomb. [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Oct 26] ; 18(1): 43-68. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2013000100004&lng=en
47. Hernández A, Labbé J, Garzón E. REVISIÓN: Microalgas, cultivo y beneficios. Rev. Biología Marina y Oceanografía. Chile [Internet]. 2014 Agosto [2017 Oct 26]; 157-173. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47931776001>
48. Hernández J, Pérez M, Jáuregui C, Alcántara L, Hurtado A. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. Rev. mex. cienc. farm [Internet]. 2015 Mar [citado 2017 Oct 26]; 46(1): 7-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000100007&lng=es
49. Abalde. J. La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina. (Libro). España Universidad e da Coruña [Internet]. 2010 Mar [citado 2017 Oct 26]; 95-96. Disponible en: <http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10777/CC%2048%20art%205.pdf?sequence=1>
50. Mota M, Lopes R, Koubaa M, Roohinejad S, Barba F, Delgadillo I, Saraiva J. Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies. Rev. Critical Reviews in Biotechnology. [Internet]. 2017 Abril [citado 2018 Marzo 03]; 38(1): 122-140. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2017.1312272?scroll=top&needAccess=true>

51. Moheimani N, Isdepsky A, Lisec J, Raes E, Borowitzka M. Coccolithophorid Algae Culture in Closed Photobioreactors. Rev Biotechnology and bioengineering. [Internet]. 2011 Mayo [citado 2018 Marzo 05]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.23161/full>
52. Borowitzka M. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Rev Journal of Biotechnology. [Internet] 1999 Enero [citado 2018 Marzo 05]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165699000838>
53. Lemoine Y. Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. Rev Photosynth Res. [Internet]. 2010 Noviembre [citado 2018 agosto 20]. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11120-010-9583-3#citeas>
54. Baobei W. Zhen Z. Qiang H. Sommerfeld M. Yinghua L. Danxiang H. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*. Rev Plos One. [Internet]. 2014 Septiembre. [Citado 2018 agosto 20]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4164365/>
55. Catarina A. Amaro H. Malcata F. Microalgae as sources of carotenoids. Rev Mar Drugs. . [Internet]. 2011 Abril. [Citado 2018 agosto 20]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3124977/>
56. Goksan T. Ak I. Gokpinar S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). Rev J Microbiol

- Biotechnol. [Internet]. 2010 Sep. [Citado 2018 agosto 20]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890091>
57. Choi Y. Yun Y. Park J. Yang J. Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluviialis* cultivation. Rev. Bioresour Technol [Internet]. 2011 Dic. [Citado 2018 agosto 20]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004594>
58. Culture Colletion of Algae at The University at Austin (UTEX). Composición de medios para microalgas. [Internet]. . [Citado 2018 septiembre 20]. Disponible en: <https://utex.org/products/volvox-medium>
59. Villa A. Herazo D. Torrez A. Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (CLON C-CAL) en cultivos estaticos. Rev Intropical. [Internet]. 2014 Dic. [Citado 2018 Septiembre 20]. Disponible en: <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1438/818>
60. González A. Barajas A. Ardila A. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. Rev Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. [Internet]. 2017 Dic. [Citado 2018 Septiembre 20]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n3/0122-8706-ccta-18-03-00451.pdf>
61. Benavete J. Montañez C. Aguilar N. Méndez A. Valdivia B. Tecnología de cultivos de microalgas en fotobioreactores. Rev. Acta química mexicana. [Internet]. 2012 Dic. [Citado 2018 Septiembre 20]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/262560081 Tecnologia de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores](https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores)

9. ANEXOS

Anexo A. Curso: Operación fermentador TEC-FERM 5 L

CURSO: OPERACIÓN FERMENTADOR TECFERM 5L

Danilo Zuluaga A.

✓ OK

OBJETIVOS. Dar a conocer el equipo tecferm 5L y su operación básica.

CONTENIDO

1. Descripción del equipo:

El fermentador Tecferm es un sistema básico para investigación, indicado para el cultivo de bacterias y hongos. Para el cultivo de células animales o vegetales se requiere ajustar algunos parámetros de configuración y operación.

El equipo puede operar con vasos de 2, 5, 10 o 20 litros.

Consta de un reactor tipo tanque agitado (ST), con una capacidad total de 7.5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 5 Litros. El volumen mínimo es de 2 litros para lo cual se requiere ajustar la altura de las aspas y del electrodo de pH.

El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm. Se recomienda operar entre 60 y 300 rpm. Dependiendo del medio de cultivo se puede presentar espuma, la cual puede ser controlada con antiespumantes.

El rango de temperatura usual es entre 30 y 40 grados, pero puede operar en un rango desde ambiente hasta 60 °C.

El pH puede ser controlado automáticamente en un rango entre 0 y 14.

La aireación puede ser ajustada desde menos de un litro por minuto hasta 30 litros por minuto. Lo usual para cultivos aeróbicos es operar entre 1 o 2 vvm (Volumen de aire / volumen de líquido / minuto).

Puede operar en forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases como CO₂ o Nitrógeno.

El K_{la} (coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno) a 200 rpm, 37 °C y 1 vvm de aire para medios de cultivos acuosos es superior a 1.200.

Puede operar en batch y en batch realimentado. Para la operación en continuo se requiere una bomba de adición (No incluida).

1.1. Bioreactor:

- Consta de un vaso en acero inoxidable con mirilla lateral, empaque y aro de cierre
- Consta de una tapa (Tipo Head plate) con los siguientes servicios (Ver manual):
 - Puerto de inoculación
 - Puertos de adición (medio, ácido, base)
 - Puertos auxiliares
 - Puerto de toma muestras
 - Puerto de cosecha
 - Puerto para el filtro de salida (venteo)
 - Puerto de electrodo de pH (Incluido)
 - Puerto de electrodo de oxígeno
 - Tobera de inyección de aire / gases con filtro de ingreso
 - Termopozo
 - Intercambiador de calor (con ingreso y salida)
 - 4 deflectores, baffles o cortacorrientes.
 - Sistema de agitación con eje y 2 aspas tipo Rushton de 6 paletas.

Los siguientes elementos se requieren, más no se suministran con el equipo:

- Mangueras siliconadas (autoclavables) se suministran muestras.
- Pinzas de cierre de mangueras
- Conectores (tubitos inox o vidrio delgados)
- Filtros de venteo y suministro de aire (Tipo Millex hidrofóbico)
- Matraz de inoculación con su sifón, manguera y conector.
- Jeringa para toma de muestras
- Botellon de cosecha
- Llaves bristol y llaves expansivas.
- Amarres plásticos
- Papel Kraft
- Cintas de enmascarar y de esterilización.

1.2 Módulo de control

- Mueble con entrada de corriente (110 V, 30 Amp, 60 HZ).
- Motor DC 2 HP
- Sistema de agitación
- Sistema calefactor (Resistencias, bombas, válvulas)
- Entrada y salida de aire y agua
- Sensor de temperatura
- Sensor de PH
- Control de temperatura

- Control de velocidad de agitación
- Control de pH
- Bomba peristáltica
- Control de aireación (Rotámetro).

2. Acondicionamiento para el proceso

- Antes de iniciar un proceso se debe verificar el correcto funcionamiento de todos los sistemas y se verifica que la altura de las espas y el electrodo estén acorde con el volumen a fermentar
- Se conectan las mangueras y se amarran
- Se acondicionan las pinzas (El filtro de venteo no lleva pinza)
- Se cubren los extremos libres con papel kraft.
- Se acondicionan los filtros de venteo y suministro
- Se acondiciona el electrodo de pH
- Se carga el medio de cultivo al que previamente se le ha ajustado el pH.

3. Esterilización

- Se corre un ciclo de 45 minutos a 121 °C y 20 PSI.
- Al abrir el autoclave se verifica que las mangueras y filtros estén en su puesto y que no haya derrames del medio.
- Se deja enfriar dentro del autoclave de manera suave, sin corrientes de aire hasta una temperatura cercana a la de cultivo.

4. Operación de cultivo

- Se pone el reactor sobre la plataforma
- Se acondiciona el sistema de agitación del módulo al vaso
- Se acondiciona el sensor de temperatura
- Se acondiciona el cable del electrodo de PH
- Se acondiciona el sistema de intercambio de temperatura
- Se conectan los filtros de venteo y suministro
- Se enciende el equipo
- Se programa la temperatura, agitación y pH deseados.
- Se conecta el matraz con el inóculo a la manguera de adición
- Se hace pasar el contenido del matraz al reactor mediante presión suave
- Se suministra aire o el gas requerido al sistema y se programa su control en el rotámetro
- Se conecta el matraz con soda / ácido a la manguera de suministro y se acondiciona a la bomba peristáltica
- Se toma una muestra del cultivo al tiempo 0 y a los tiempos deseados acondicionando una jeringa a la manguera de toma muestras.
- Para cosechar, se acondiciona la manguera de cosecha al botellón y se retira la pinza de la manguera.

5. Desinfección

- Se desmonta el vaso de la plataforma.
- Se adiciona agua corriente al vaso
- Se esteriliza de la manera en que se describió anteriormente.

6. Lavado

- Una vez el vaso está frío, se desmonta el electrodo de pH y se lava por separado
- Se retiran las pinzas y se corre agua por las mangueras
- Se restrega el equipo con un paño suave y con jabón neutro.
- Se enjuaga con abundante agua
- Se seca con un paño.

7. mantenimiento

7.1. Preventivo

- Se revisa cada ciclo que la agitación sea suave, en caso contrario se pide al proveedor cambio de rodamientos internos.
- Se revisa cada seis meses la corea de agitación
- Se pide al fabricante una inspección cada seis meses.

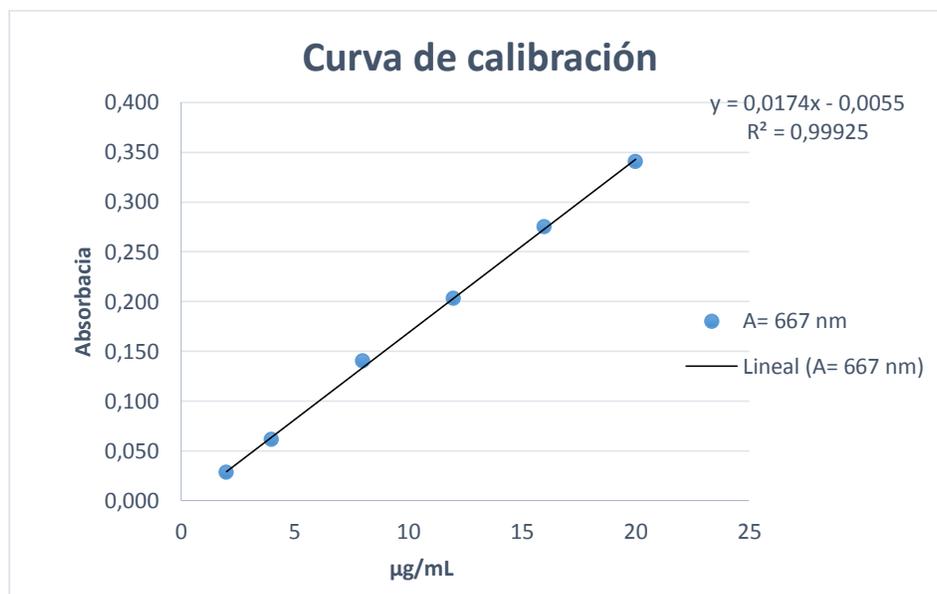
7.2. Correctivo

Ante alguna falla, verifique si puede ser solucionada mediante la lista de posibles fallas y soluciones del manual.

En caso de requerirse mantenimiento correctivo, solo debe ser efectuado por el fabricante.

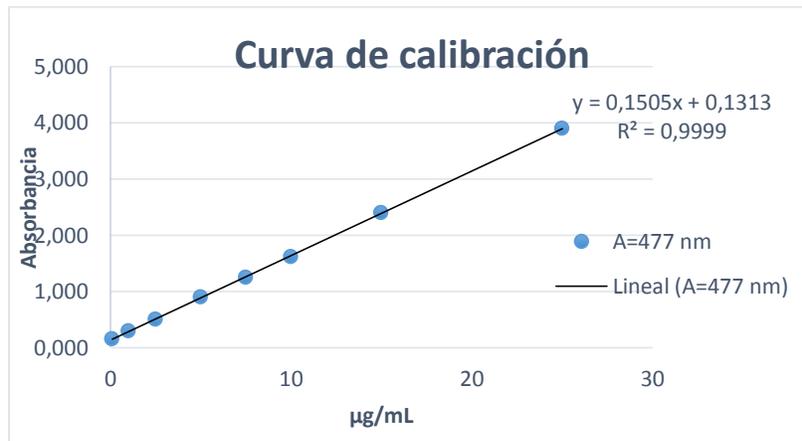
Anexo B. Curva de calibración para concentración clorofila del trabajo titulado Evaluación de medios de cultivo para la extracción de astaxantina con *Haematococcus pluviialis* de Milena Niño en el año 2015.⁷

CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	A= 667 nm
2	0,028
4	0,061
8	0,140
12	0,203
16	0,275
20	0,340



Anexo C. Curva de calibración para concentración astaxantina del trabajo titulado Evaluación de medios de cultivo para la extracción de astaxantina con *Haematococcus pluvialis* de Milena Niño en el año 2015.⁷

CONCENTRACION (µg/mL)	A= 477 nm
0,1	0,153
1	0,293
2,5	0,500
5	0,898
7,5	1,245
10	1,612
15	2,395
25	3,900



Anexo D. ANOVA curva de crecimiento

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Primer montaje	6	98500	16416,6667	313041667
Segundo montaje	6	112000	18666,6667	114666667

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	15187500	1	15187500	0,07101802	0,79527467	0,00413425
Dentro de los grupos	2138541667	10	213854167			
Total	2153729167	11				

Anexo E. ANOVA concentración de clorofila

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0,299	5	6,469	1,2938	0,9572362
1,6	5	5,811	1,1622	0,6246277

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0	1	0	0	1	0,00463591
Dentro de los grupos	248,227129	3	82,7423763			
Total	248,227129	4				

Anexo F. ANOVA concentración de clorofila

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
	0,299	5 6,469	1,2938	0,9572362
	1,6	5 5,811	1,1622	0,6246277

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0432964	1	0,0432964	0,05474099	0,82088617	0,00418616
Dentro de los grupos	6,3274556	8	0,79093195			
Total	6,370752	9				