



**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**

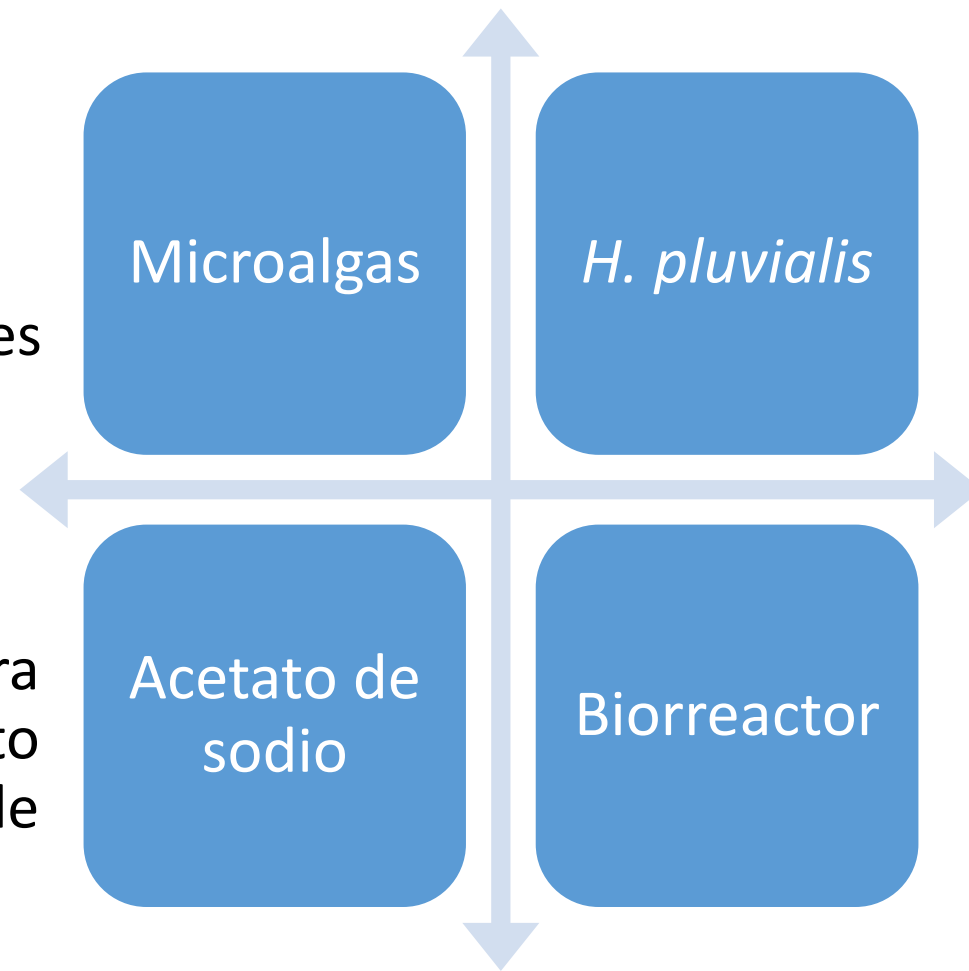
INTRODUCCIÓN

Escalamiento de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina en un biorreactor de 5 litros

- Unicelulares
- Fotosintéticas
- Diferentes ambientes

- Factores de estrés

¿Cuál es la [] ideal para aumentar el crecimiento celular y producción de astaxantina a gran escala?



- Astaxantina US 2500/kg⁶
- <Crecimiento celular, < acumulación

- Nuevas alternativas
- Mayor control de las condiciones

OBJETIVO GENERAL

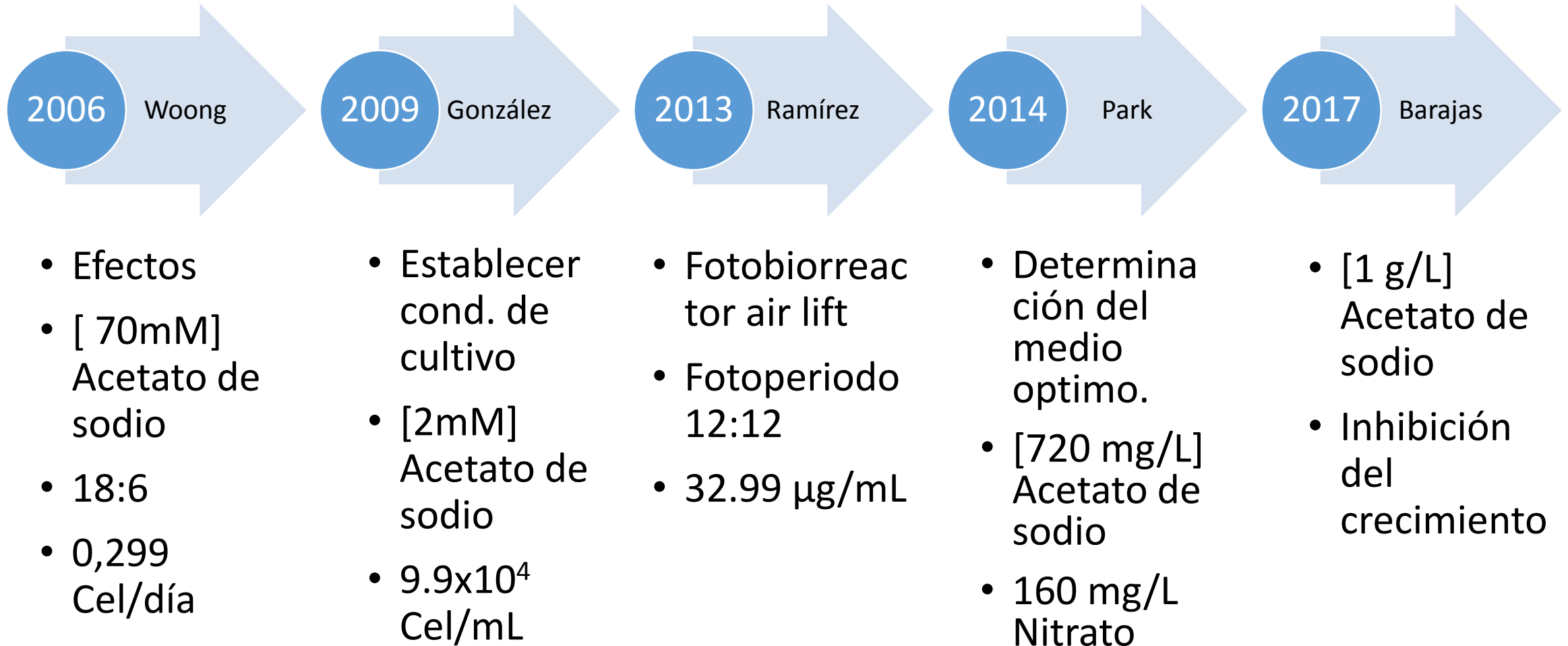
Realizar el proceso de producción de astaxantina en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros con la utilización de un factor de estrés como el acetato de sodio y luz blanca durante el cultivo de *H. pluvialis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

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



ANTECEDENTES



MARCO REFERENCIAL

Biotecnología



Fuente: Agriculturers (2016)

Procesos destinados a la mejora biológica, mediante la explotación de sistemas vivos.

- Medicamentos
- Optimización de cultivos agrícolas
- Alimentos transgénicos
- Promover las propiedades de las microalgas

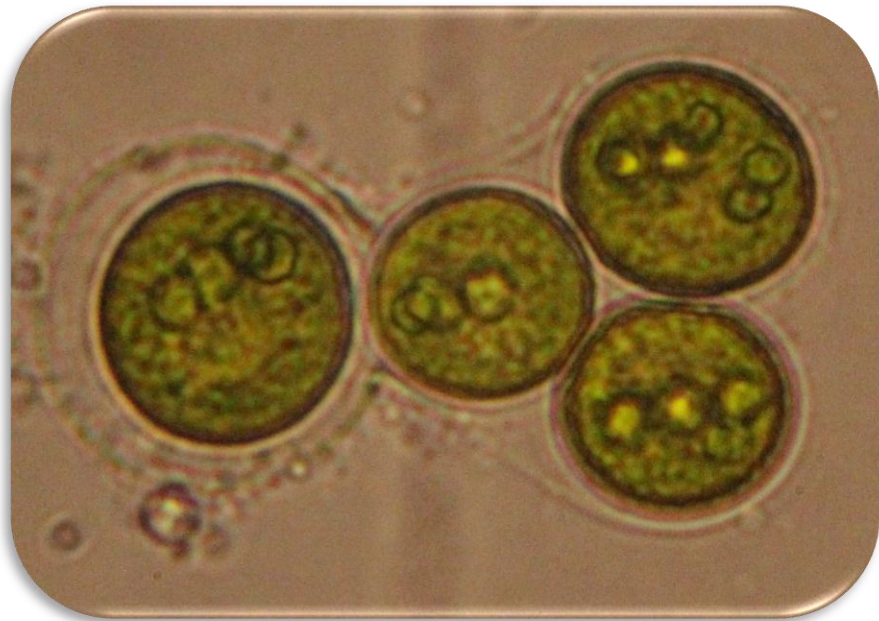
“Mejorar procesos de producción”

Haematococcus pluvialis

“Blood rain alga”

- Autótrofa
- Unicelular
- Fotosintética

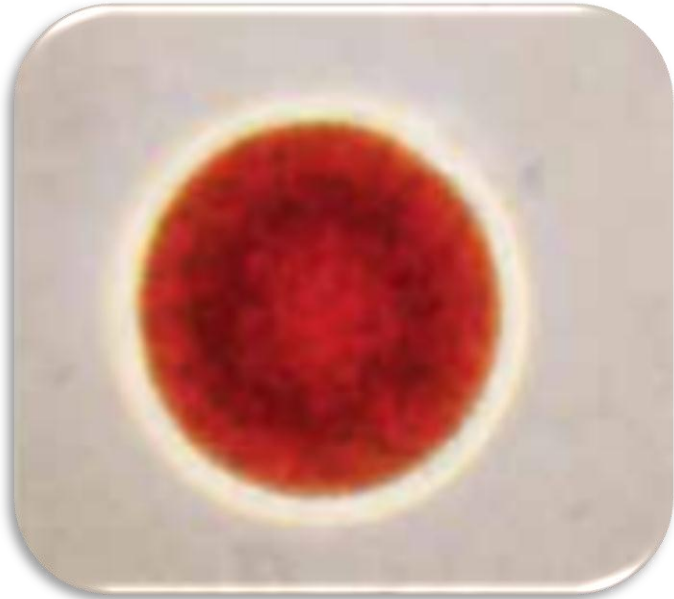
Filo	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Volvocales</i>
Familia	Haematococcaceae
Género	Haematococcus
Especie	<i>H. pluvialis</i>



Fuente: Autora (2017)

Fuente: Martínez A. (2010)

Astaxantina



Fuente: Kurmen (2013)

- Carotenoide Rojo
- Actividad antioxidante
- Microorganismos de agua dulce
- Protección en ambientes hostiles

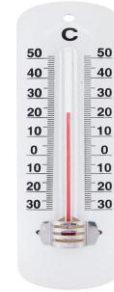
Acumulación en plásmidos y citoplasma

Factores de estrés

Favorece división celular
Act. Fotosintética y acumulación



Luz



Temperatura
28 a 35° C



pH
7.0 a 10



Agitación
Exposición uniforme



Fuente de carbono

Favorecen el crecimiento

- Orgánico*
- Inorgánico

Biorreactor TEC-FERM 5 L



- Sistema cerrado básico para investigación.
- Protege el cultivo de la contaminación.
- Control integral de las condiciones de cultivo.
- Posibilidad de escalamiento

Fuente: Autora (2017)

METODOLOGIA

- **Tipo de investigación:** Experimental , correlacional.
- **Población:** *H. pluvialis* cepa UTEX suministrada por U. de la sabana.
- **Muestra:** Inoculo de *H. pluvialis* en medio volvox.



Fuente: Autora (2017)

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 los cuales son señalados como factores que ayudan al aumento de la producción de astaxantina, según la bibliografía consultada



TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Preparación del inóculo

Medio Volvox

- pH
- Temperatura
- Agitación
- 18:6
- Muestras por triplicado cada tercer día

Medio de cultivo

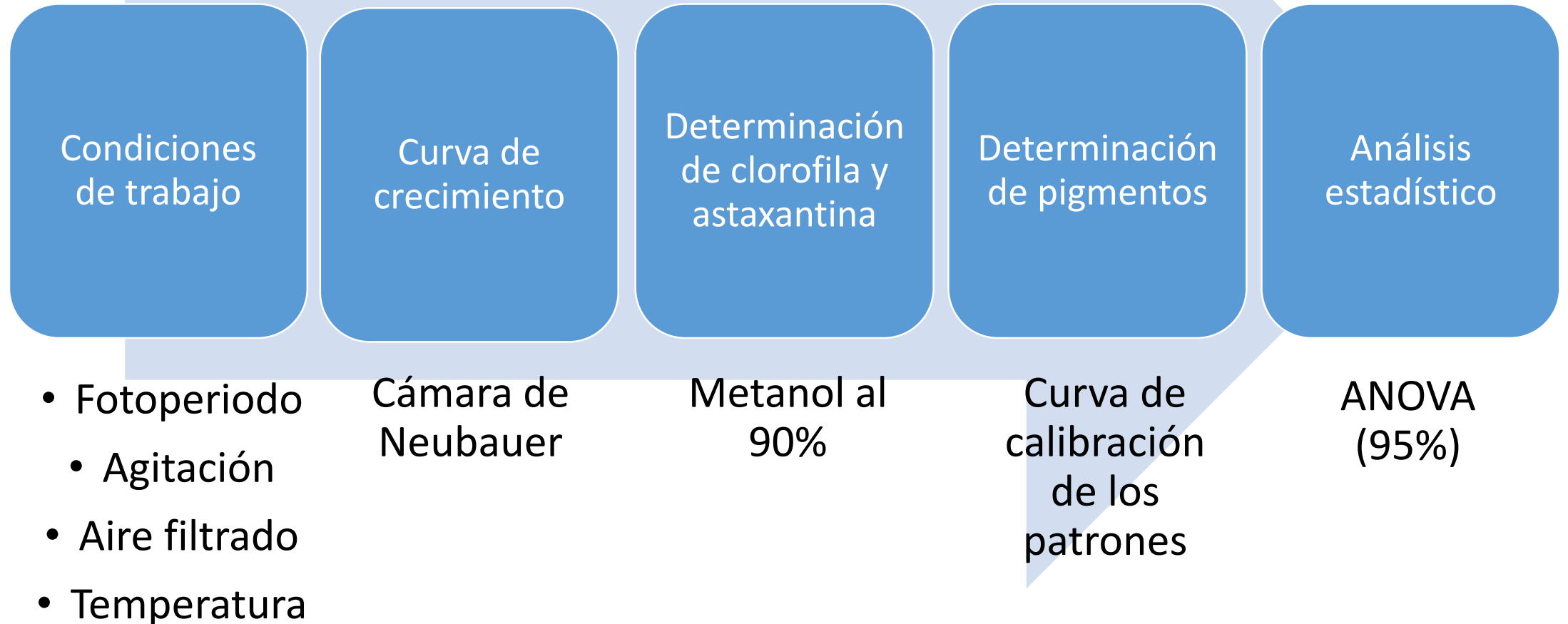
Medio RM

- pH
- Temperatura
- Agitación
- 20:4
- Acetato de sodio
- Muestras por triplicado cada séptimo día

Biorreactor TEC-FERM 5L

- Pre. Inóculo: 200 mL (10%)
- 1800 mL medio RM
- Sist. Cerrado

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS



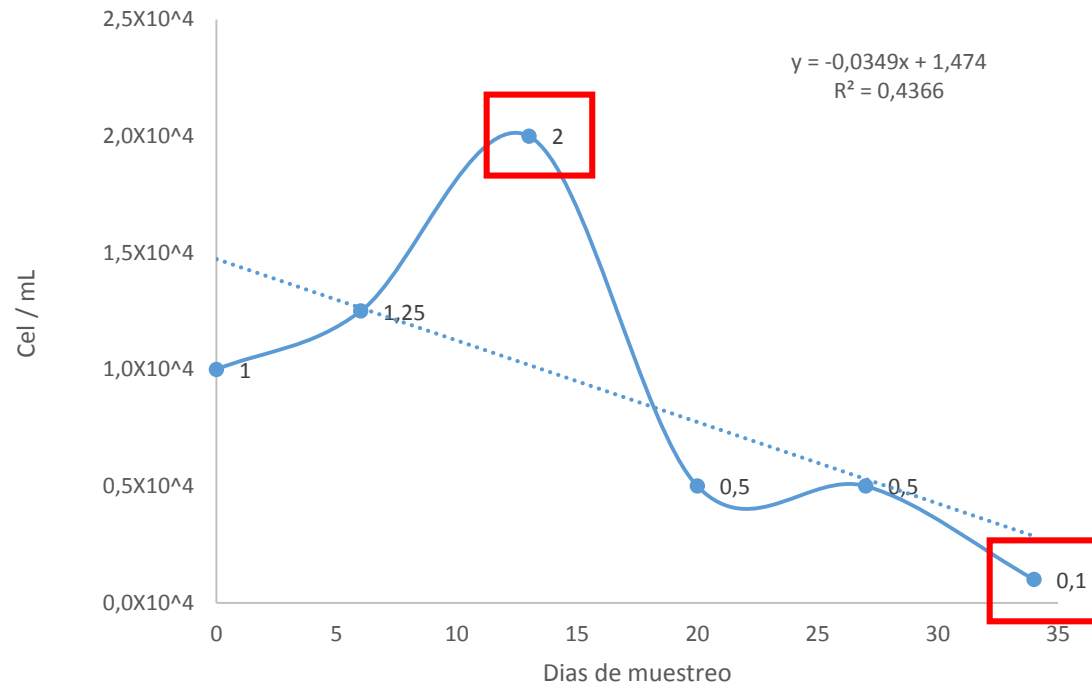
RESULTADOS

Curva de crecimiento celular

0,299 mg/L de acetato de sodio

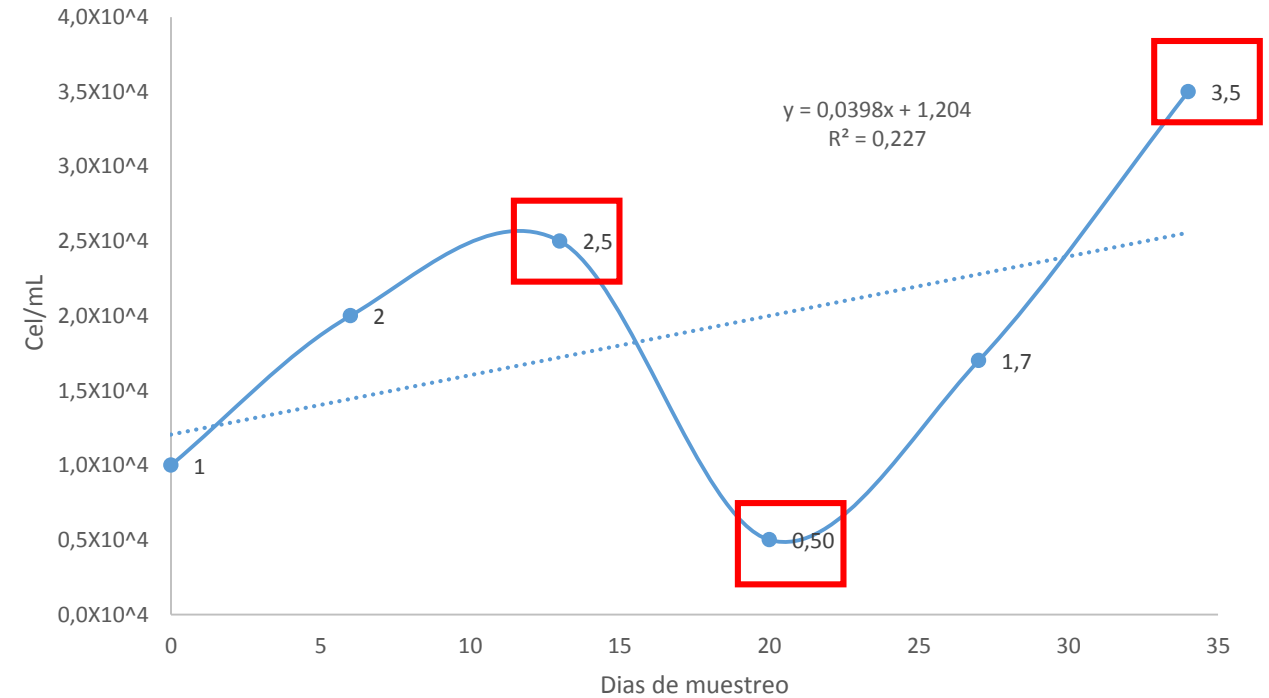
($P=0,795$; $g|1$; $F=0,071$).

Curva de crecimiento 0,299 mg/L



1,6 mg/L de acetato de sodio

Curva de crecimiento 1,6 mg/dL



Velocidad de crecimiento de los tratamientos utilizados

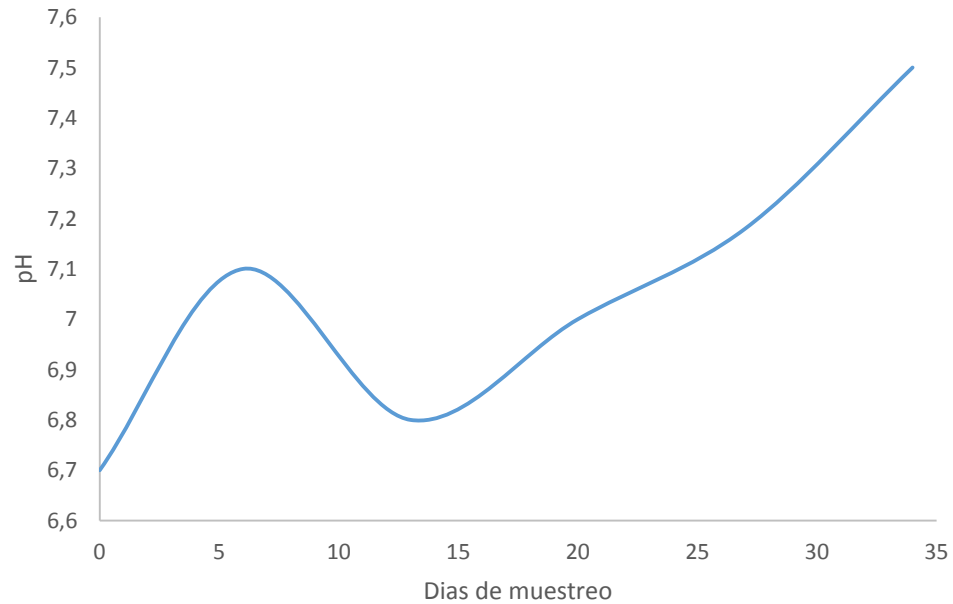
Medio de cultivo	Numero de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM y acetato 0,299 mg/L	6	4.204	4,300	0,029 Cel/día	79%
RM y acetato 1,6 mg/L	6	4.301	4,540	0,014 Cel/día	49%

pH

0,299 mg/L de acetato de sodio

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

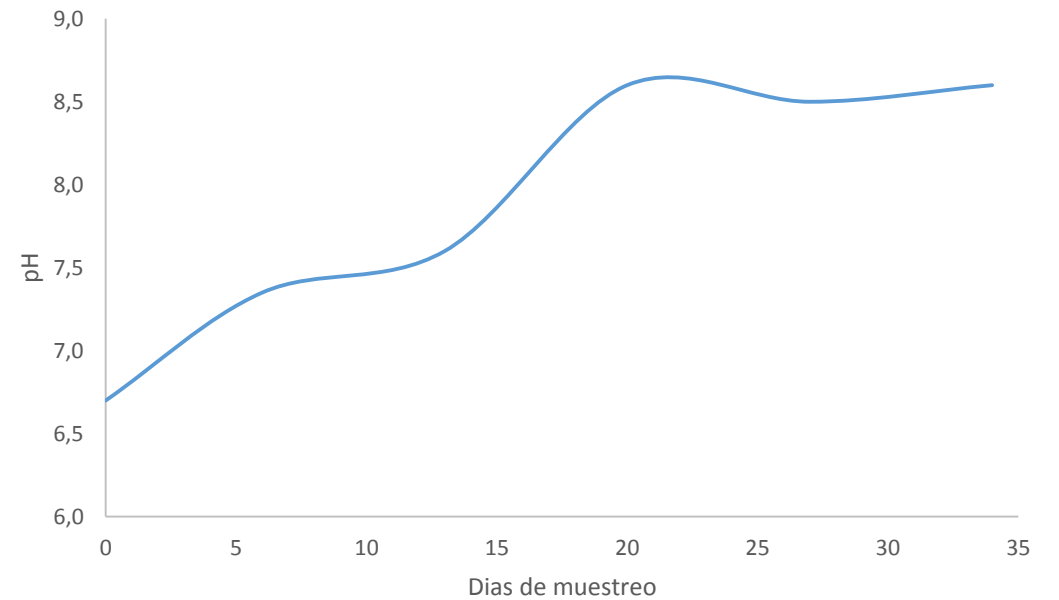
pH de 0,299 mg/L



1,6 mg/L de acetato de sodio

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

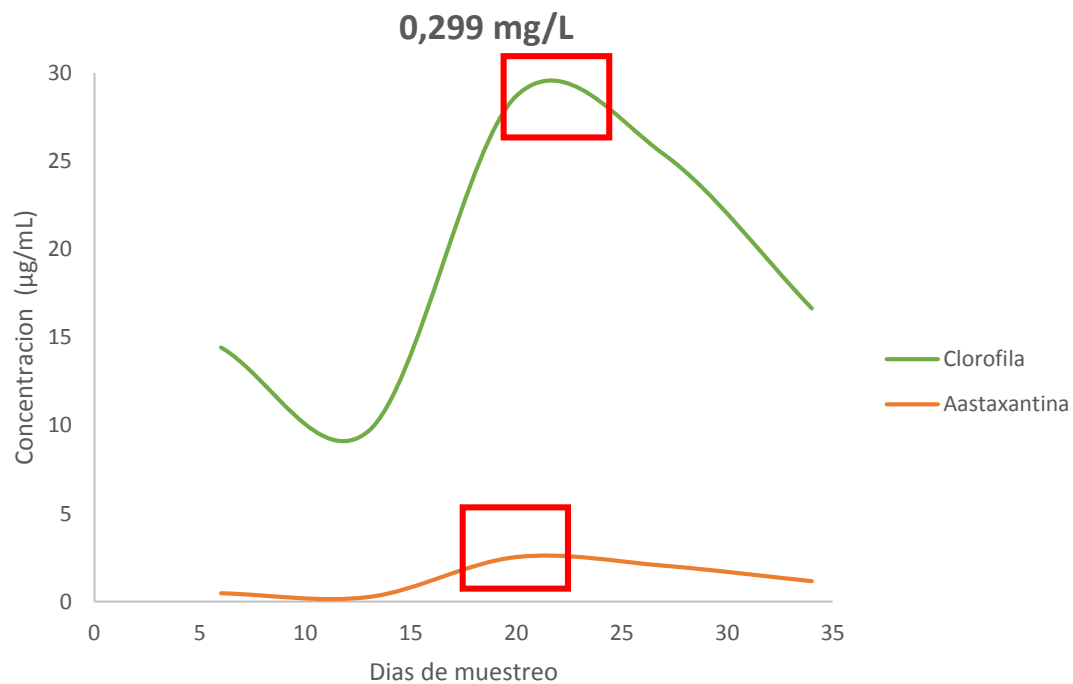
pH de 1,6 mg/L



Concentración de astaxantina y clorofila

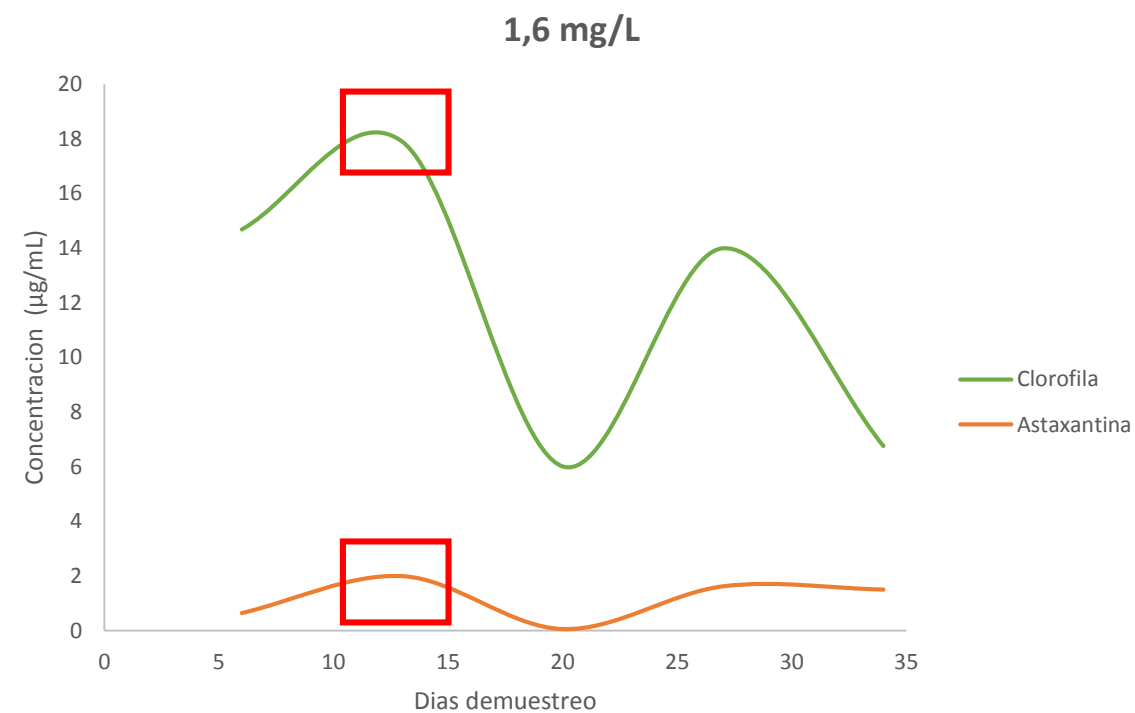
0,299 mg/L de acetato de sodio

CLOROFILA		ASTAXANTINA
DIAS	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)
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



1,6 mg/L de acetato de sodio

CLOROFILA		ASTAXANTINA
DIAS	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)
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




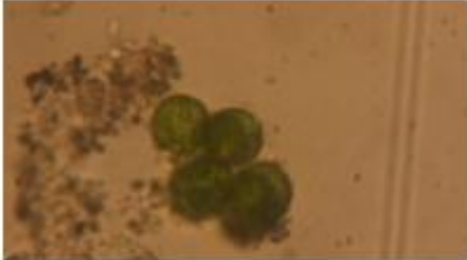
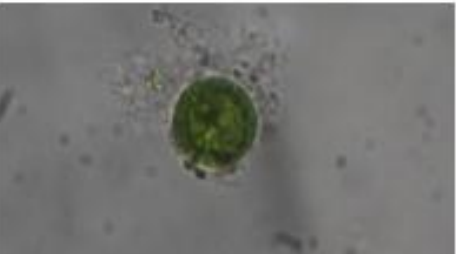

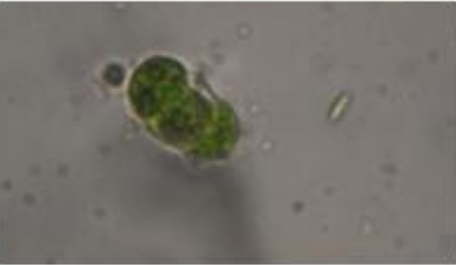

Cuadro comparativo entre el tratamiento de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato sodio

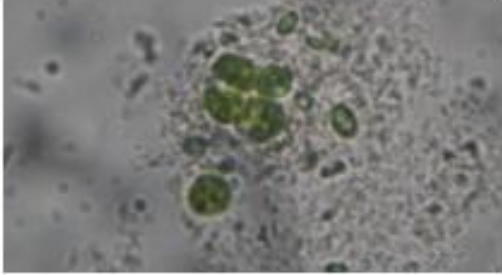
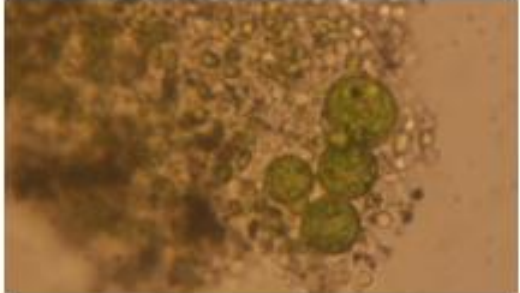
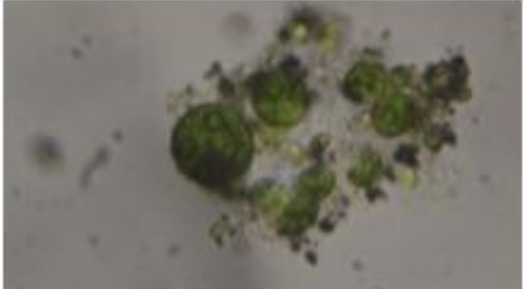
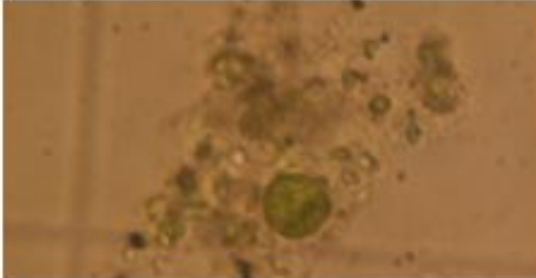
[] ACETATO DE SODIO	RECuento CELULAR Cel/mL	PH	[] DE ASTAXANTINA µg/mL	[] DE CLOROFILA µg/mL	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Cel/día
0,299 mg/L	2,0 x10 ⁴ Día 20	7,5 Día 34	2,530 Día 20	28,706 Día 20	0,029
1,6 mg/L	3,5 x10 ⁴ Día 34	8,6 Día 34	1,991 Día 13	17,902 Día 13	0,014

ANOVA (95%)

- Concentración de astaxantina: (P=0,820; gl=1; F=0,054).
- Concentración de clorofila: (P=1; gl=1; F=0)

Registro fotográfico microscópico

	0,299 mg/L	1,6 mg/L
DÍA	IMAGEN	IMAGEN
6		
13		
20		

	0,299 mg/L	1,6 mg/L
DÍA	IMAGEN	IMAGEN
27		
34		

Fuente: Autora (2017)

DISCUSIÓN

Niño, 2015

Cifuentes,
2003

De 1.0×10^4

A 7.55×10^4

- Sistema batch

De 1.0×10^4

A 1.8×10^4

- Biorreactor sistema cerrado

- Utilización del medio RM
- Aumento del crecimiento celular
- ¿ Cual es la concentración adecuada de acetato de sodio?
- Suplementación de con acetato de sodio, ayuda a la formación de células quísticas

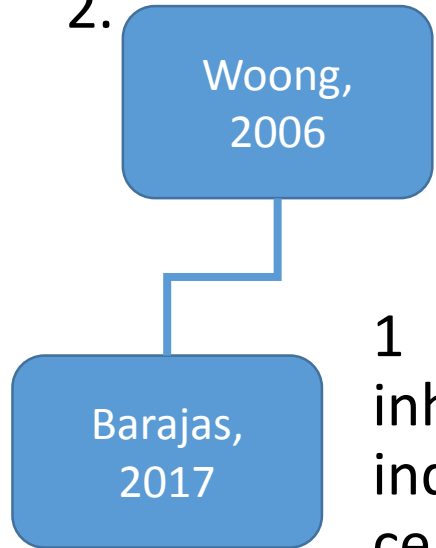
[] ACETATO DE SODIO	RECuento CELULAR	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO
0,299 mg/L	2,0 x10 4	0,029
	Día 20	
1,6 mg/L	3,5 x104	0,014
	Día 34	

2 veces mejor tasa de crecimiento con el tratamiento 0,299 mg/L

Curva de crecimiento 0,299 mg/L	
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

Curva de crecimiento 1,6 mg/L	
Días	Cél / 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	$3,5 \times 10^4$

1. Ciclo natural de crecimiento aprox 15 días
2. [] de acetato de sodio controlada con el fin de inhibición del crecimiento



1 g/L de acetato de sodio inhibe el crecimiento celular e induce al blanqueamiento celular.

[] de astaxantina

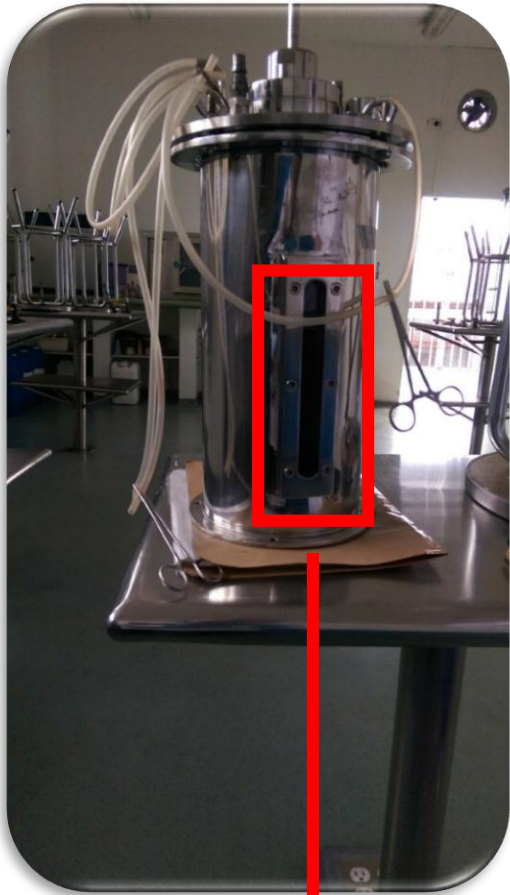
	0,299 mg/L	1,6 mg/L
DÍAS	CONCENTRACION (µg/mL)	CONCENTRACION (µg/mL)
6	0,476	0,643
13	0,264	1,991
20	2,53	0,058
27	2,038	1,619
34	1,161	1,5

[] de clorofila

	0,299 mg/L	1,6 mg/L
DIAS	CONCENTRACION (µg/mL)	CONCENTRACION (µg/mL)
6	14,415	14,683
13	9,683	17,902
20	28,706	6,005
27	25,373	13,994
34	16,637	6,752

- En el primer día no hay acumulación de astaxantina, debido al día de inicio del estímulo los valores del día sexto

Comportamiento inversamente proporcional
Correlacional al crecimiento celular



- Adecuado para los escalamientos de cultivos de *H. pluvialis*

Poon, 2015

Mejores rendimientos que los obtenidos con el Sistema batch

Biomasa > astaxantina, en estudios con acetato de sodio

- Fuente de carbono en la etapa de crecimiento
- CO₂ Por inyección o aire filtrado
 - Ayuda a la regulación del pH

Ayuda a mayor acumulación de astaxantina por fijación fotosintética

CONCLUSIONES

- El tratamiento con 0,299 mg/L presento una velocidad de crecimiento celular 2 veces mayor al tratamiento con 1,6 mg/L.
- Concentración de astaxantina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenida en el estudio se puede decir que en el tratamiento de 0,299 mg/L la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el día 20 con 2,530 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Mientras que el tratamiento con 1,6 mg/L obtuvo una elevada concentración de astaxantina en el día 13 con 1,991 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Concentración de clorofila 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$; mientras que para el montaje con 1,6 mg/ L se halló una mayor concentración en el día 13 con 17,402 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Los biorreactores son nuevas tecnologías que nos brindan diferentes alternativas para poder realizar el escalamiento de los cultivos de microorganismos y microalgas para los estudios, ayudando a mantener ciertas características bajo nuestro control absoluto.



SUGERENCIAS

- Realizar el suministro de CO₂ por inyección directa .
- Continuar con el escalamiento de cultivos para *H. pluvialis* en el biorreactor TEC-FERM de 5 L de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

BIBLIOGRAFIA

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>

AGRADECIMIENTOS

- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Grupo de investigación Bioprocesos y Control
- Ana Graciela Lancheros Díaz
- Judith Elena Camacho Kurmen