



**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LA MICROALGA
Haematococcus pluvialis UTILIZANDO LOS MEDIOS DE CULTIVO
OHM Y KOBAYASHI EN EL BIORREACTOR TECFERM DE 5 LITROS.**



ANGELA MARIA HERNANDEZ CORTES

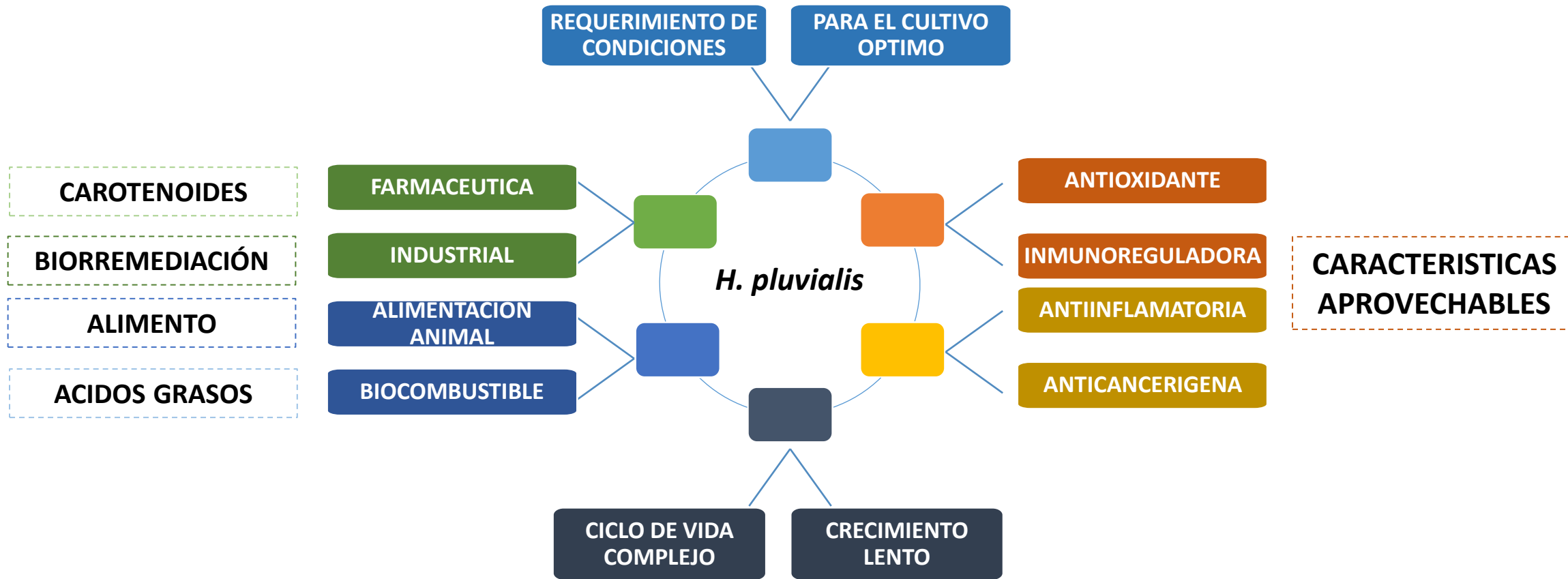
JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN Q. F. Esp. MSc. PhD.
ASESORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

CONTENIDO

- Introducción
- Objetivos
- Antecedentes
- Marco Teórico
- Diseño Metodológico
- Resultados y Discusión
- Conclusiones

INTRODUCCIÓN



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar las condiciones adecuadas para el crecimiento de *H. pluvialis*, utilizando los medios de cultivos OHM y Kobayashi en un biorreactor Tecferm de 5 litros.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi bajo las condiciones establecidas intensidad de luz, fotoperiodo, color de luz, pH, temperatura, agitación, aire filtrado y cambio morfológico durante el cultivo.

1

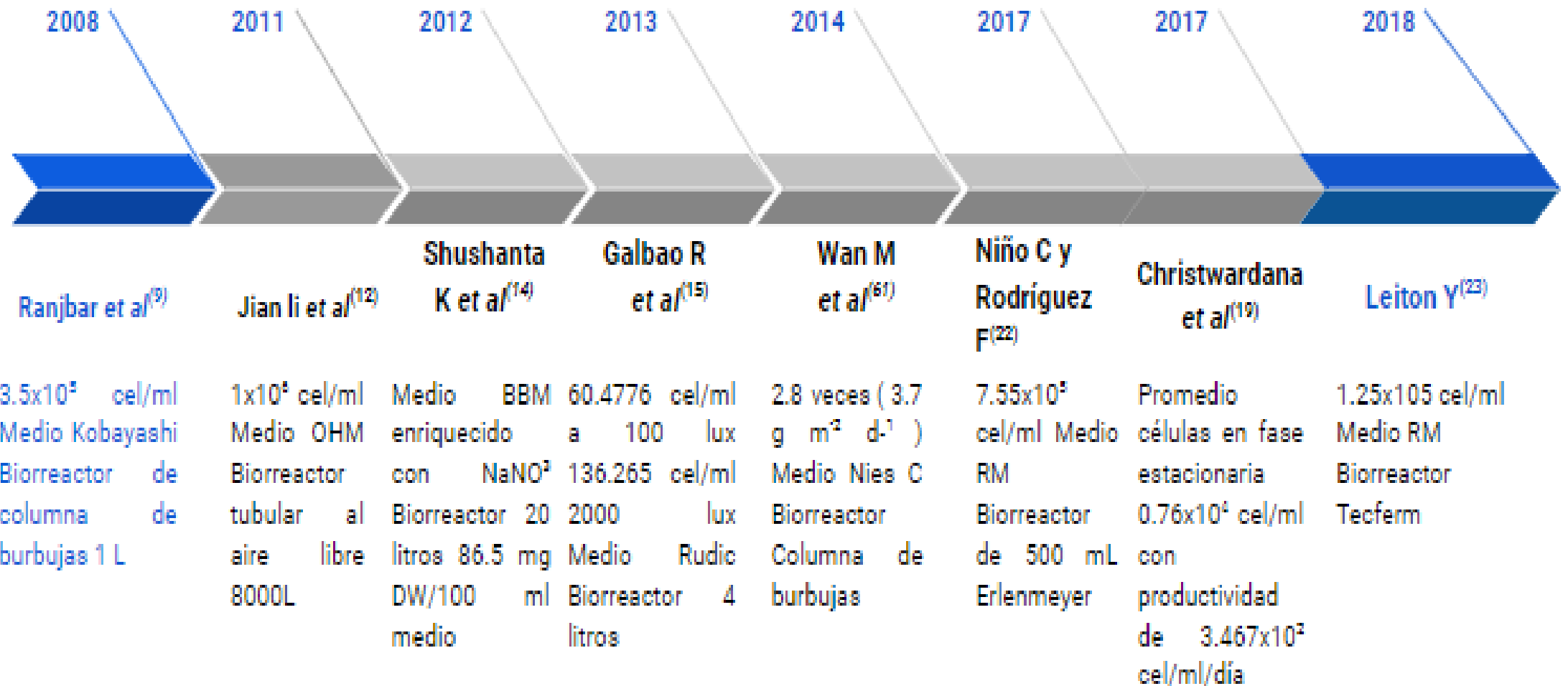
- Determinar la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.
- Evaluar el cambio morfológico del cultivo durante el estudio.

2

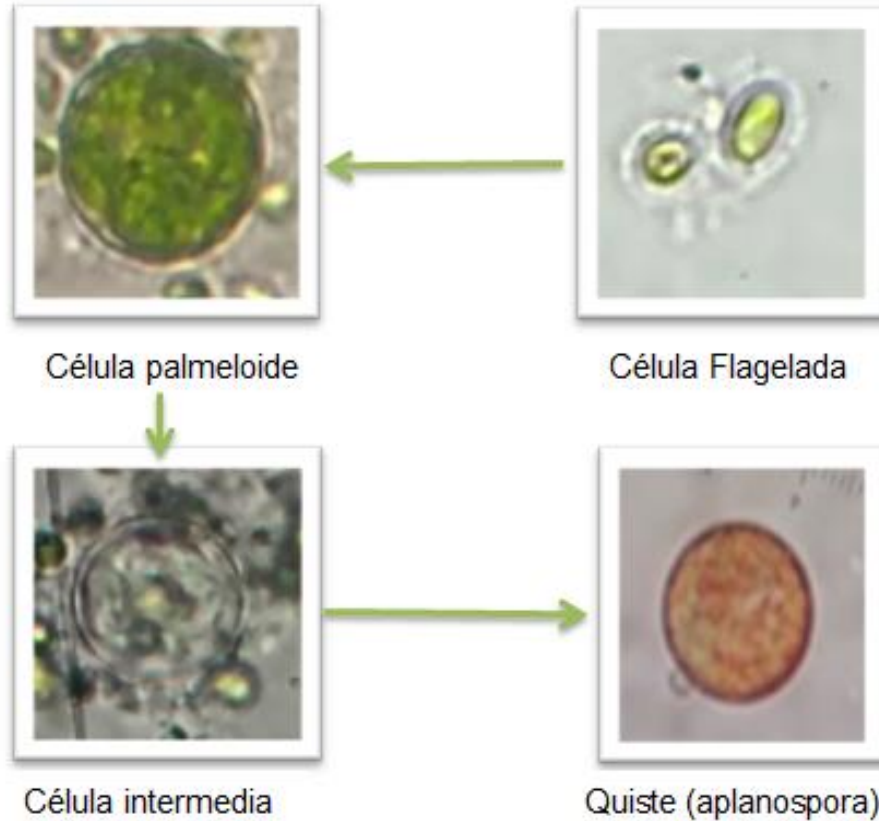
- Determinar los costos para cada medio de cultivo y así establecer el medio más rentable para el sostenimiento de la microalga.

3

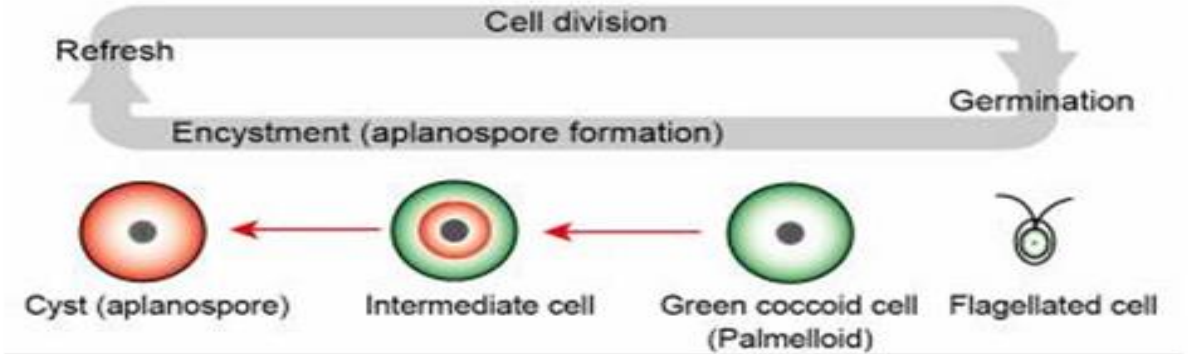
ANTECEDENTES



Haematococcus pluvialis



Ciclo celular *H. pluvialis*. Elaboración propia, 2018.



Ciclo celular *H. pluvialis*²⁷

PHYLUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GÉNERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>pluvialis</i>

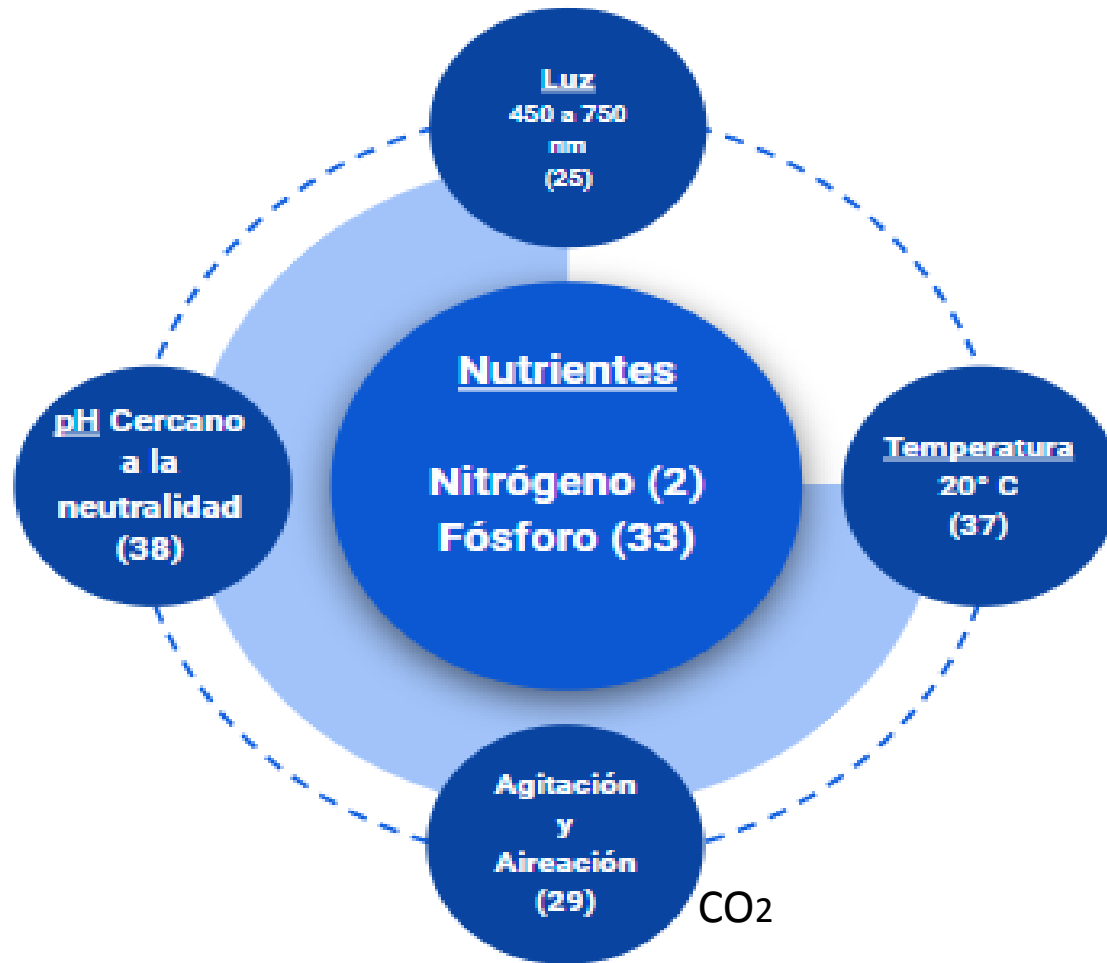
Clasificación taxonómica *H. pluvialis*⁴

CULTIVO DE *H. pluvialis*

Condición del cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fototrofía	Luz	Carbono inorgánico
Heterotrofia	Carbono orgánico	Carbono orgánico
Fotoheterotrofía	Luz	Carbono orgánico
Mixotrofía	Luz y carbono orgánico	Carbono inorgánico y orgánico

Características de las diferentes condiciones de cultivo. Tomado de Benavente J²⁵.

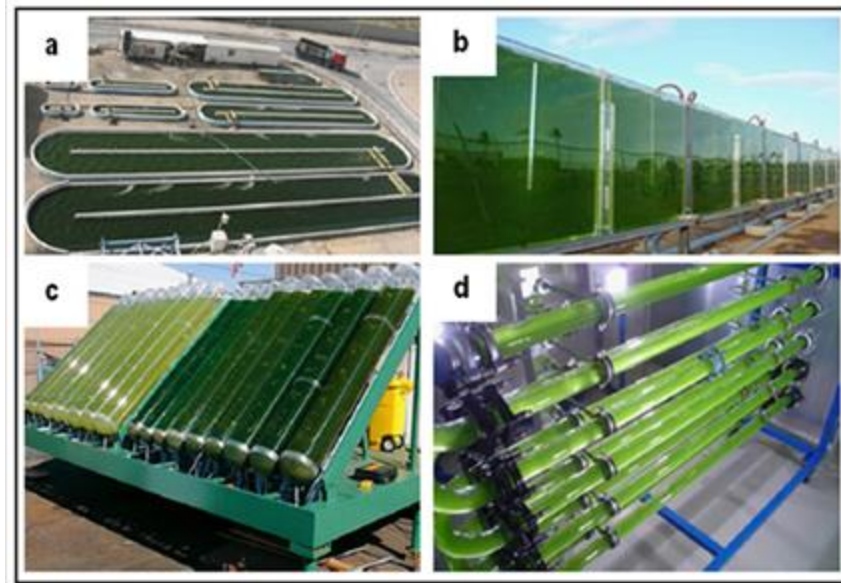
FACTORES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO DE *H. pluvialis*



Haematococcus pluvialis

SISTEMAS DE CULTIVO

SISTEMAS ABIERTOS



Fotobiorreactores utilizados en el cultivo de microalgas: (a) estanque abierto, (b) placa delgada, (c) tubular inclinado y (d) continuo horizontal. (55)

- ✓ Aprovechamiento luz solar
- ✓ Mayor cantidad del cultivo
- ✓ Variedad en el diseño de biorreactores.
- ✓ Bajo control de contaminación.

SISTEMAS CERRADOS

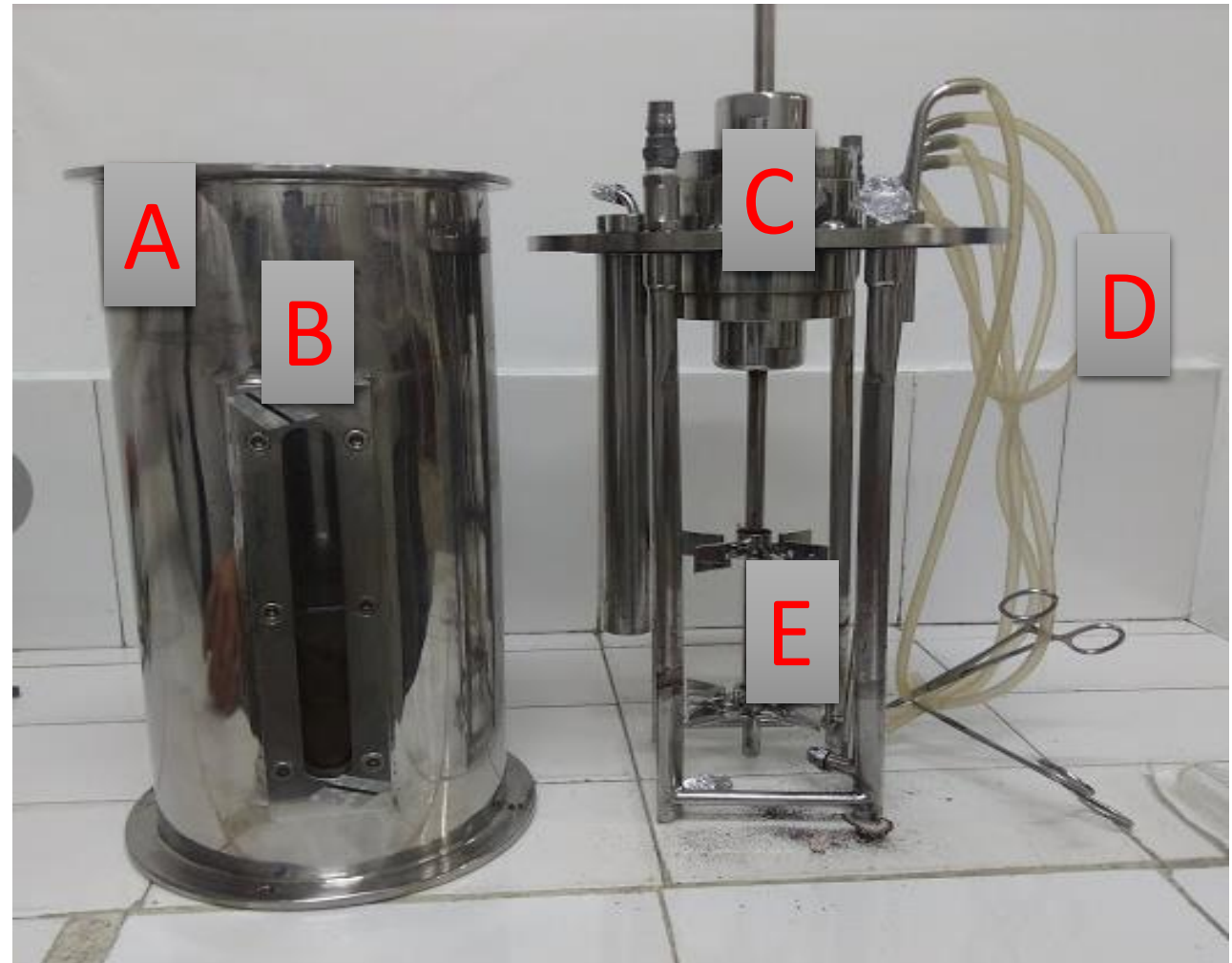


Fuente: Angela Hernandez, 2018,

- ✓ Fácil Cultivo de microalgas
- ✓ Menor contaminación del cultivo
- ✓ Control de las condiciones gracias al biorreactor
- ✓ Posibilidad de realizar escalamiento del cultivo.

BIORREACTOR TECFERM 5 L

- ✓ Capacidad 2,5,10 y 20 litros
- ✓ Capacidad de regulación de la escala de temperatura
- ✓ Cuenta con regulación del pH en escala de 0 a 14
- ✓ Tiene un intervalo de agitación de 0 a 800 rpm, se aconseja trabajarlo entre 0 a 300 rpm.
- ✓ El sistema puede trabajar de forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno incluso con suministro de aire filtrado
- ✓ Sistema para investigación y cultivo de hongos, bacterias y microalgas.



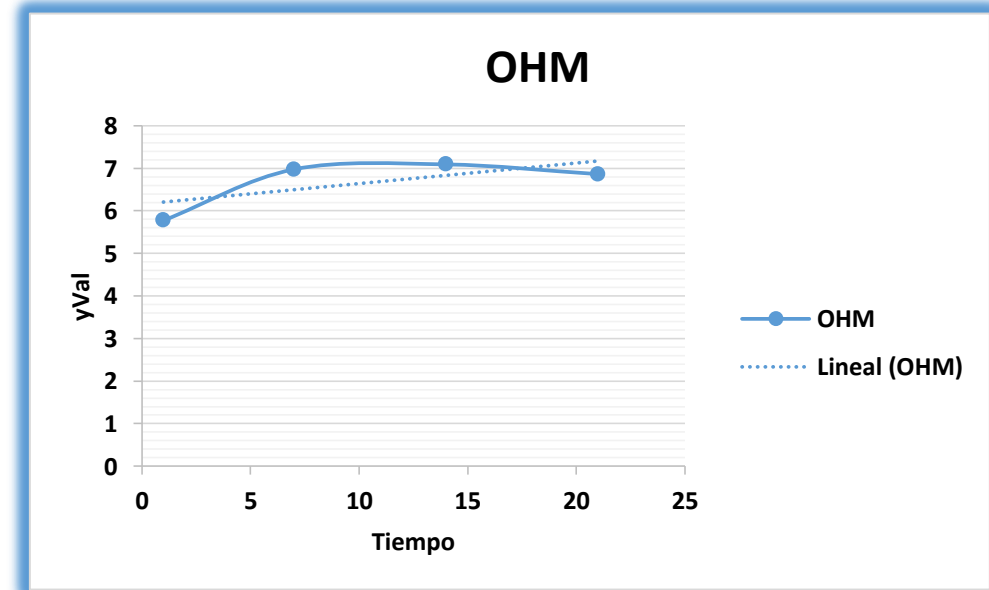
Biorreactor Tecferm 5L. Foto tomada en el laboratorio, elaborada por el autor, 2018.

MODELOS DE CRECIMIENTO

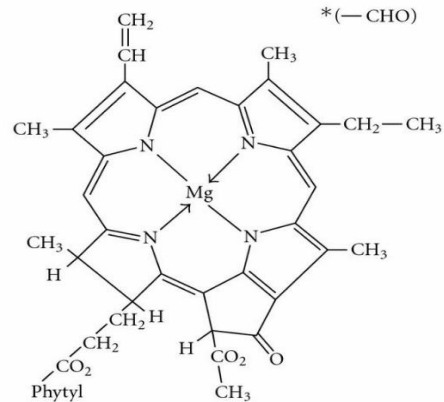
MODELO	ECUACIÓN
Modelo de Gompertz:	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$
Modelo de Baranyi:	$y = A + \mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0} \right) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} x + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\mu_{\max} x} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} x - h_0} \right)} - 1}{e^{(y_{\max} - A)}} \right)$
Modelo logístico:	$y = \frac{A}{\left\{ 1 + \exp \left[\frac{4\mu_{\max}}{A} (\lambda - t) + 2 \right] \right\}}$
Modelo de Huang	$y = A + y_{\max} - \ln \left(e^A + (e^{y_{\max}} - e^A) e^{-\mu_{\max} B(x)} \right)$ $B(x) = x + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{1 + e^{-\alpha(x-\lambda)}}{1 + e^{\alpha t}}$

Utilidad :

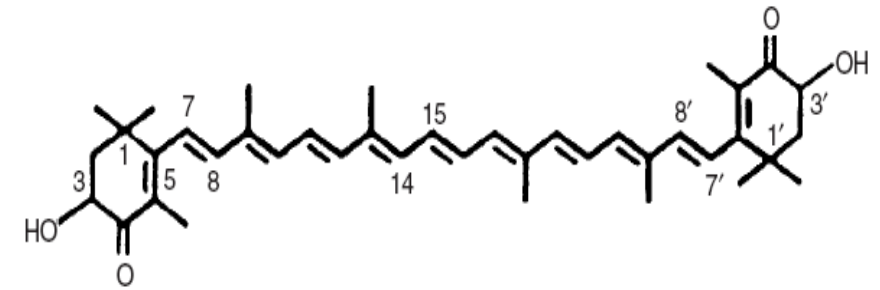
- Ajuste de resultados obtenidos durante el estudio.
 - Velocidad de crecimiento de la microalga.
 - Determinación de crecimiento máximo.
 - Tiempo de duplicación de la microalga.



CLOROFILA-ASTAXANTINA



Estructura molecular de la clorofila⁴³



Estructura bioquímica de la astaxantina²⁵

Pigmento fotosintético primario en todas las algas y única clorofila en cianobacterias y las rhodophyta.

En plantas se encuentra confinada en los cloroplastos.

Elemento básico para la transformación de energía del sol en el proceso de fotosíntesis.

Carotenoide de cadena polienica de once dobles enlaces conjugados, quienes brindan su intensa coloración rojiza.

Pigmento de color rojo perteneciente a la familia de los carotenoides.

Importante interés comercial

DISEÑO METODOLÓGICO

FASE 1

- Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm 5 L.

FASE 2

- Determinación de la concentración de clorofila, astaxantina, pH, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

FASE 3

- Evaluación del cambio morfológico del cultivo en el biorreactor Tecferm 5 L
- Determinación de los costos para cada medio de cultivo y así establecer el medio más rentable para el sostenimiento de la microalga

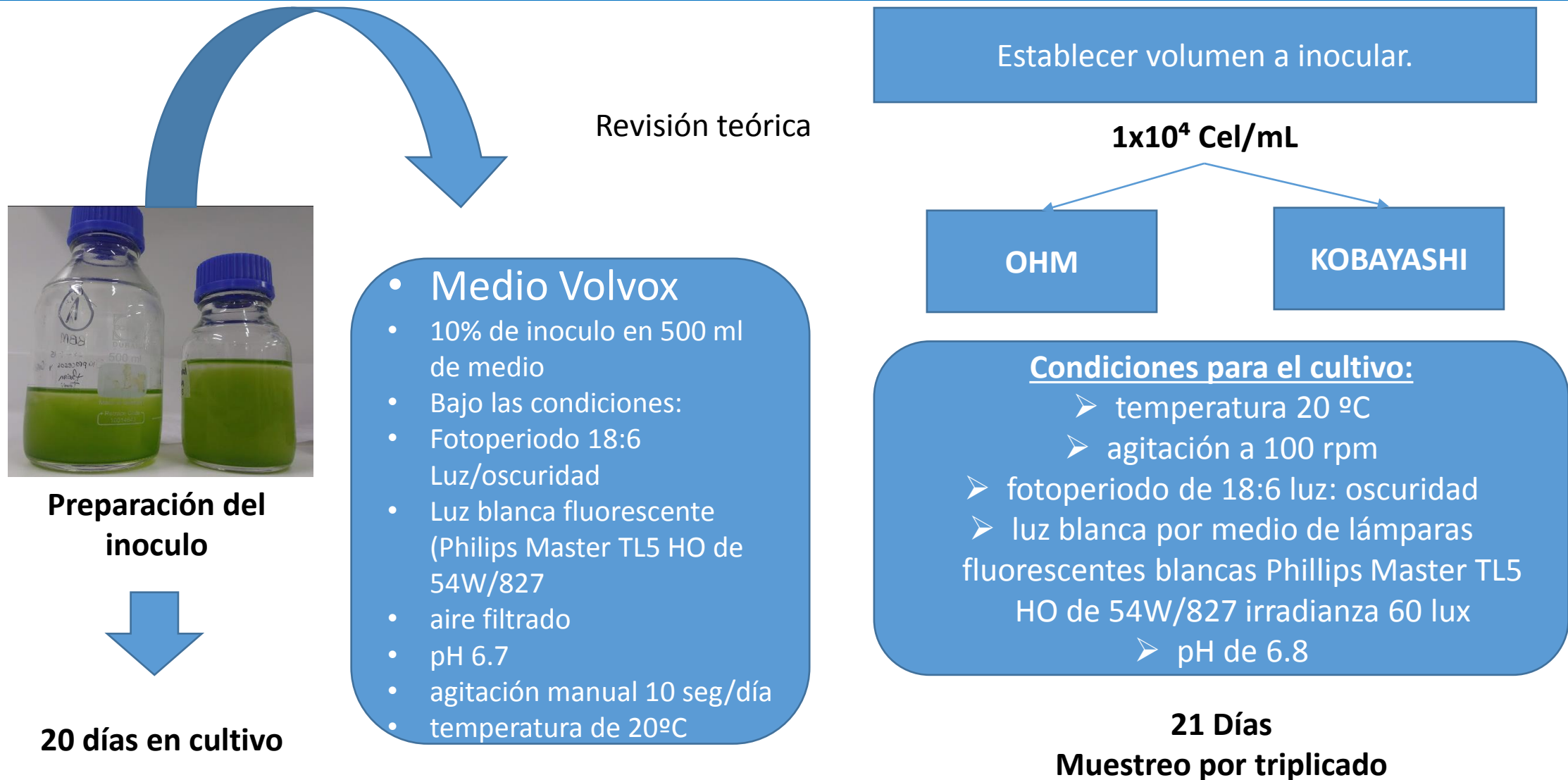
Análisis estadístico

- Se realiza un análisis estadístico de **Kruskal-Wallis** para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. (Software Prisma)

Ensayo por triplicado

Modelo de crecimiento logístico y Baranyi

FASE 1. Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm 5 L.



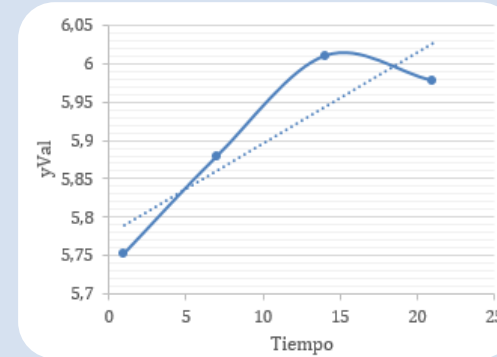
FASE 1. Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm 5 L.



Equipamiento científico.com



Foto: Ángela Hernández, 2018.



Recuento en
cámara de
Neubauer (15)

Muestreo
triplicado
y
Monitoreo de
morfología
celular

Curvas de
crecimiento
para cada
medio de
cultivo en
células/mL en
21 días.

- **Modelo logístico**
- **Tratamiento estadístico**

FASE 2.

- Determinación de la concentración de clorofila, astaxantina, pH, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

Determinación de CLOROFILA (Método APHA, 1992)

1 mL de muestra

4000 rpm x 15 min

1 mL de metanol al 90%

Incubar a 60°C x 10 min

Lectura en espectrofotómetro a 667 nm

Curva de calibración

Determinación de ASTAXANTINA (Método APHA, 1992)

1 mL de muestra

3000 rpm x 5 min

Sobrenadante con 1 mL de metanol al 90%

Incubar a 60°C x 10 min

Lectura en espectrofotómetro a 475 nm

Tratamiento estadístico

Curva de calibración

FASE 2.

- Determinación de la concentración de clorofila, astaxantina, pH, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

Determinación de NITRATOS

Método colorimétrico de ácido salicílico (50)

20 ul de medio

Incubar con ácido salicílico al 2.5 % y H₂SO₄ al 98% x 20 min

Neutralizar con 500 ul de NaOH 3.8 M

Lectura en espectrofotómetro a 405 nm ug/ml

Curva de calibración

Determinación de FOSFATOS

Reacción con ácido ascórbico (50)

50 ul de medio con 50 ul de solución

Ácido ascórbico al 2%

- Molibdato de amonio 0.5%
- Ácido sulfúrico al 0.6M

Lectura en espectrofotómetro a 750 nm ug/mL

Curva de calibración

Medición de pH

Lectura con potenciómetro marca Hanna instruments

Tomar 10 mL de muestra

Tratamiento estadístico

Fase III. Determinación de los costos para cada medio de cultivo

- Revisión y consulta en diversos distribuidores de productos químicos.



RESULTADO Y DISCUSIÓN

FASE 1. Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm 5 L.

Revisión teórica


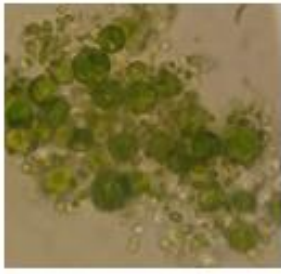
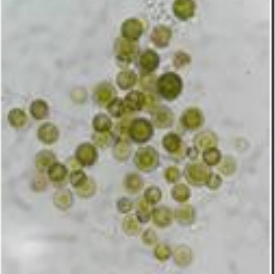
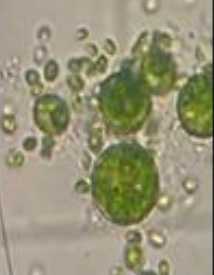

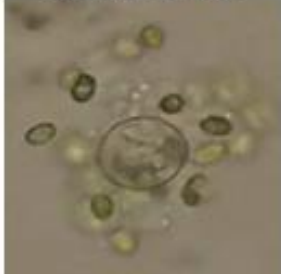
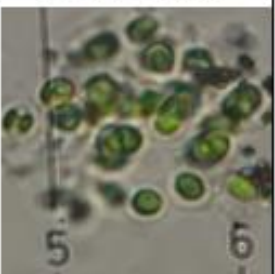

FERMENTADOR	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES	BIOMASA OBTENIDA	REF
Fotobiorreactor de Columna de burbujas 1litro	Nies-C con acetato de sodio 10 mM como fuente de carbono orgánico	Iluminación continua 25 μ mol m ⁻² s ⁻¹ 25 °C, luz continua, pH 7.5	20 g m ⁻²	59
FBR de columna cilíndrica de 200 ml diámetro interior 3,6 cm	C- Medium para el precultivo y para el cultivo final Medio modificado estandar.	Luz continua, 20° a 30.5 °C pH 7.5 Rociada con 100 ml min 1 de aire enriquecido con CO2 al 5% v / v.	-1.7x10 ⁶ cel/ml -6.0x10 ³ cel/ml	53
Frascos de Erlenmeyer utilizados como FBR de 250 ml	OHM	50 μ mol m ⁻² s ⁻¹ de luz roja con longitud de onda (630-665 nm), y luz azul (λ max 430-465 nm) LED. 25 \pm 0,5 °C	LED roja: 3,5x10 ⁴ cel/ml	57
		Ciclo de iluminación oscura de 20h/ Luz nocturna. Inyección aire filtrado 100 ml min pH 7.5	LED Azul: 2,3x10 ⁴ cel/ml	54
FBR acrílico de 60 litros	Medio OHM	Inyección aire filtrado 100 ml min	0.4x10 ⁴ células / ml	19
		Sin adición de CO ² Ciclo 12horas luz/ 12 horas oscuridad	Productividad diaria 3.467 x 10 ² cels/mL/día.	10

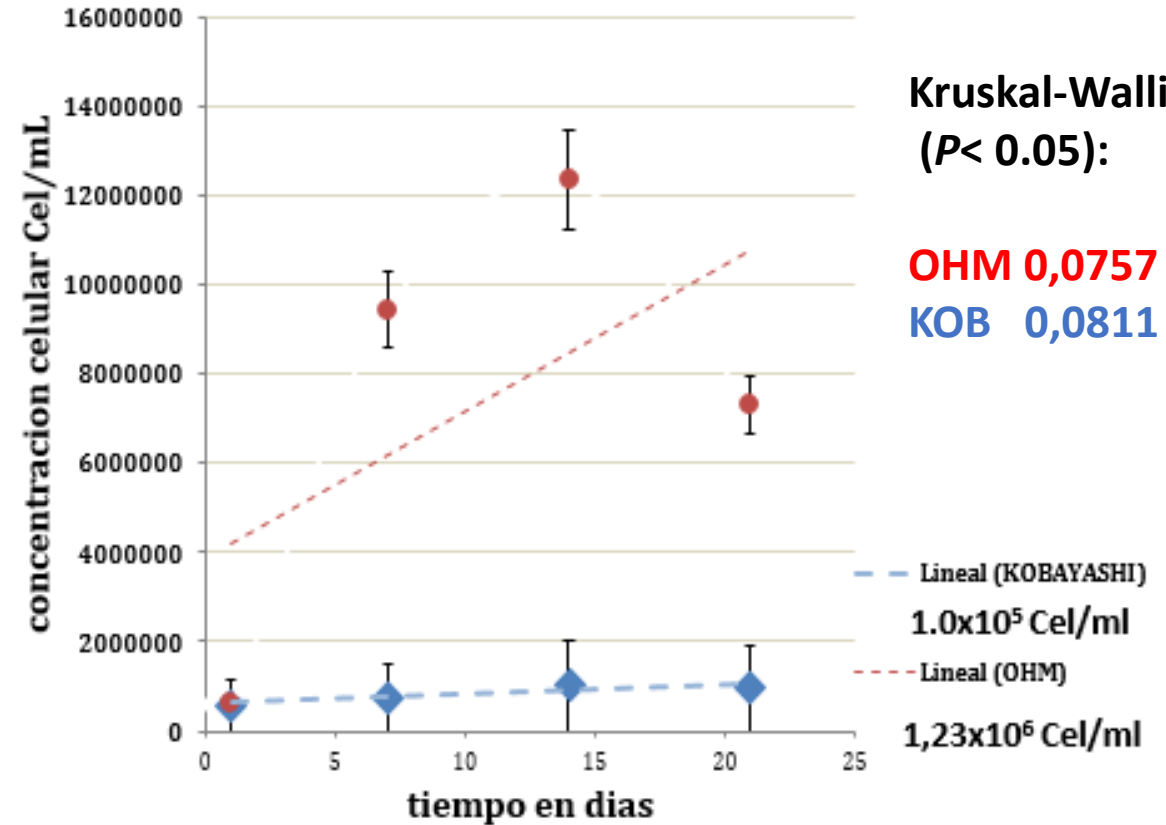
Biorreactor Tecferm 5L	Medio BBM y RM	temperatura 20 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 luz:oscuridad, utilizando luz blanca por medio de lámparas de luz fluorescentes blancas (Phillips Master TL5 HO de 54W/827) y pH DE 7.1.	densidad celular máxima de 1.25x10 ³ cel/ml y 1.0x10 ⁵ cel/ml en medio RM y BBM	23
Columnas de vidrio	Medio BG11	20 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹ (4,3 W m ²)T ^o 20-25 ° C Luz Continua, 1.5% CO ₂ , v / v, pH 8.	mayor productividad 17,1 mg L ⁻¹ día ⁻¹	60
Columna de vidrio con membrana de filtro.1 L	Medio NIES-C con acetato de sodio 10 mM como fuente de carbono orgánico.	25 μ mol m ² s ⁻¹ (5,4 W m ⁻²), 25 °C, Luz Continua, CO ² 4%, pH 7.5,	mayor productividad 65.8 mg m ⁻² día ⁻¹	61
matraces Erlenmeyer de 500 ml	medio líquido Bold basal (BBM)	24 μ mol / m ² s (5,2 W m ⁻²), 24 ° C, para 16 h / 8 h luz / oscuridad ciclo, CO ₂ 5%, pH 7.5	El contenido de clorofila a en la fase verde, La fase amarilla y la fase roja fueron 17.3 mg /	18

FASE 1.

Evaluación del crecimiento de *H. pluvialis*, en los medios de cultivo OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm 5 L.

CRECIMIENTO CELULAR

DÍAS	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21
Crecimiento	5.9 x10 ⁴ Cel/ml	9.4 x10 ⁵ Cel/ml	1.23 x10 ⁶ Cel/ml	7.3x10 ⁵ Cel/ml
MEDIO OHM				
	5.6 x10 ⁴ Cel/ml	7.5 x10 ⁴ Cel/ml	1.0 x10 ⁵ Cel/ml	9.5 x10 ⁴ Cel/ml
MEDIO KOBAYASHI				

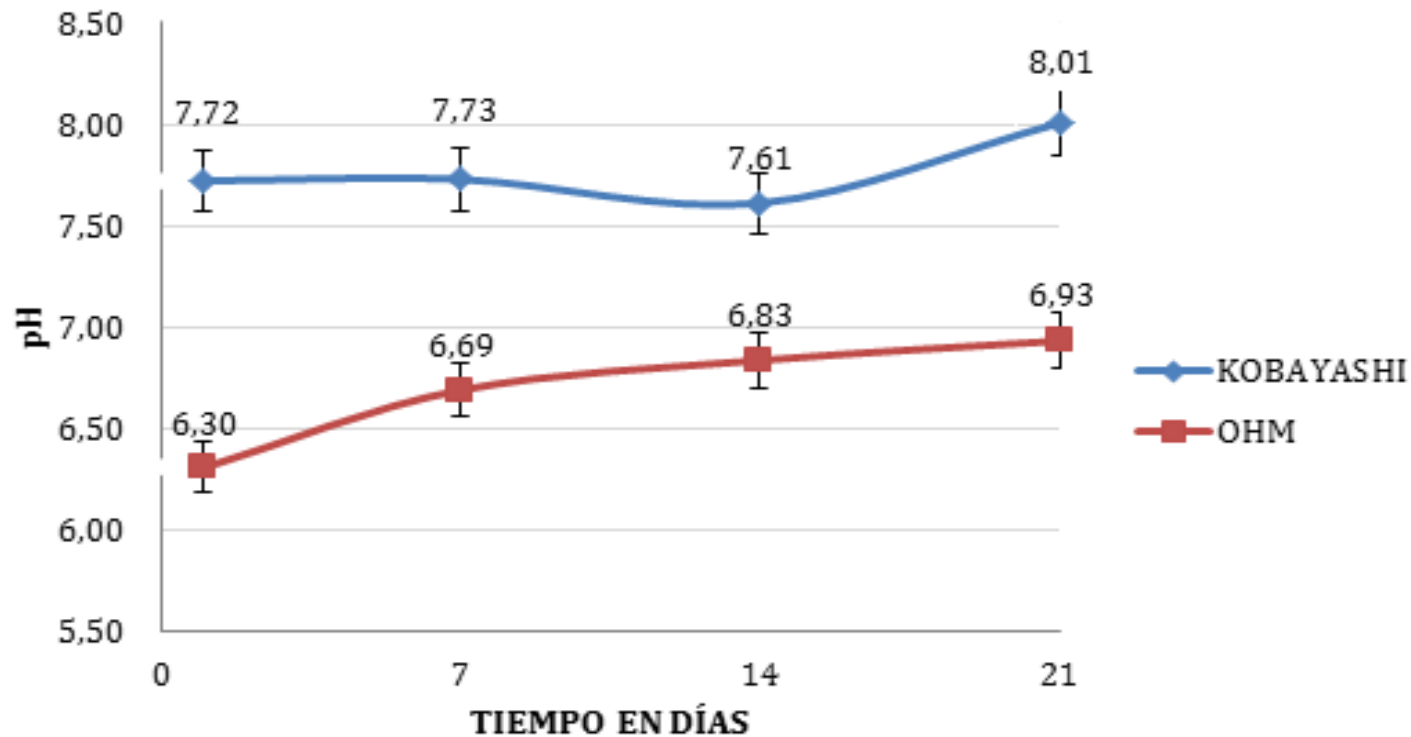


Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
OHM	4	5.774	6.863	0.037 cel/ml	78%
Kobayashi	4	5.752	5.977	0.022 cel/ml	47%

- ✓ Jian li *et al* 2011 1x10⁶ cel/ml Medio OHM (12)
- ✓ Ranjbar *et al* 2006 Kobayashi 3,5x10⁶ (9)
- ✓ Leiton Y 2018 Morfología. (23)
- ✓ García *et al* 2006 Morfología (7)

FASE 2. Determinación de la concentración de clorofila, astaxantina, pH, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

pH



7.7 a 8.0 pH Kobayashi

6.3 a 6.9 pH OHM

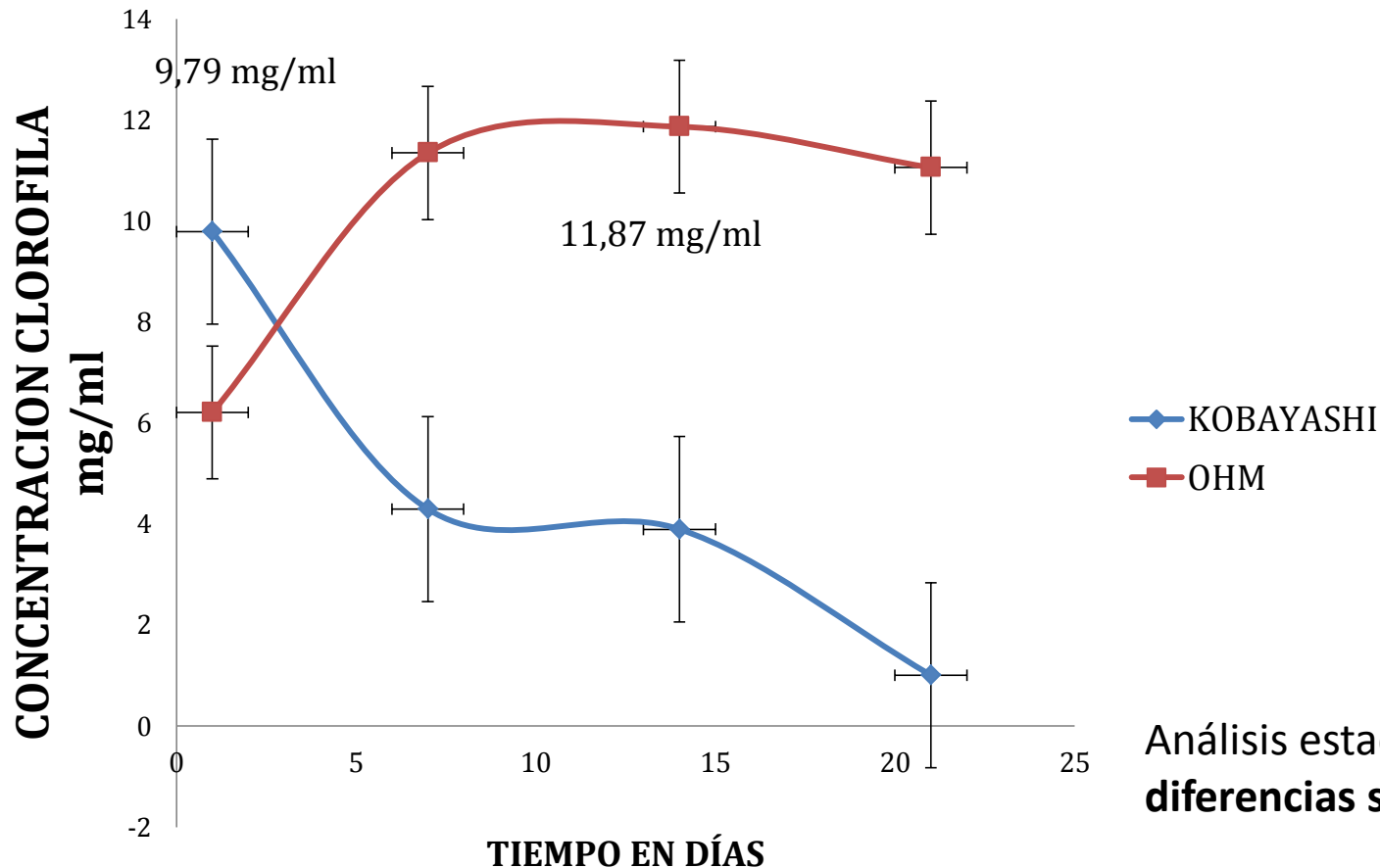
- ✓ Jian Li *et al* 2011 pH 7.5 (12)
- ✓ Leiton Y 2018 pH 6.3-6,9 (23)
- ✓ Wan M *et al* 2014 pH neutro (16)

Análisis estadístico de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$): Sí hay diferencias significativas. $P = 0.0044$ $KW = 20.59$

FASE 2.

- Determinación de la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

Determinación de clorofila

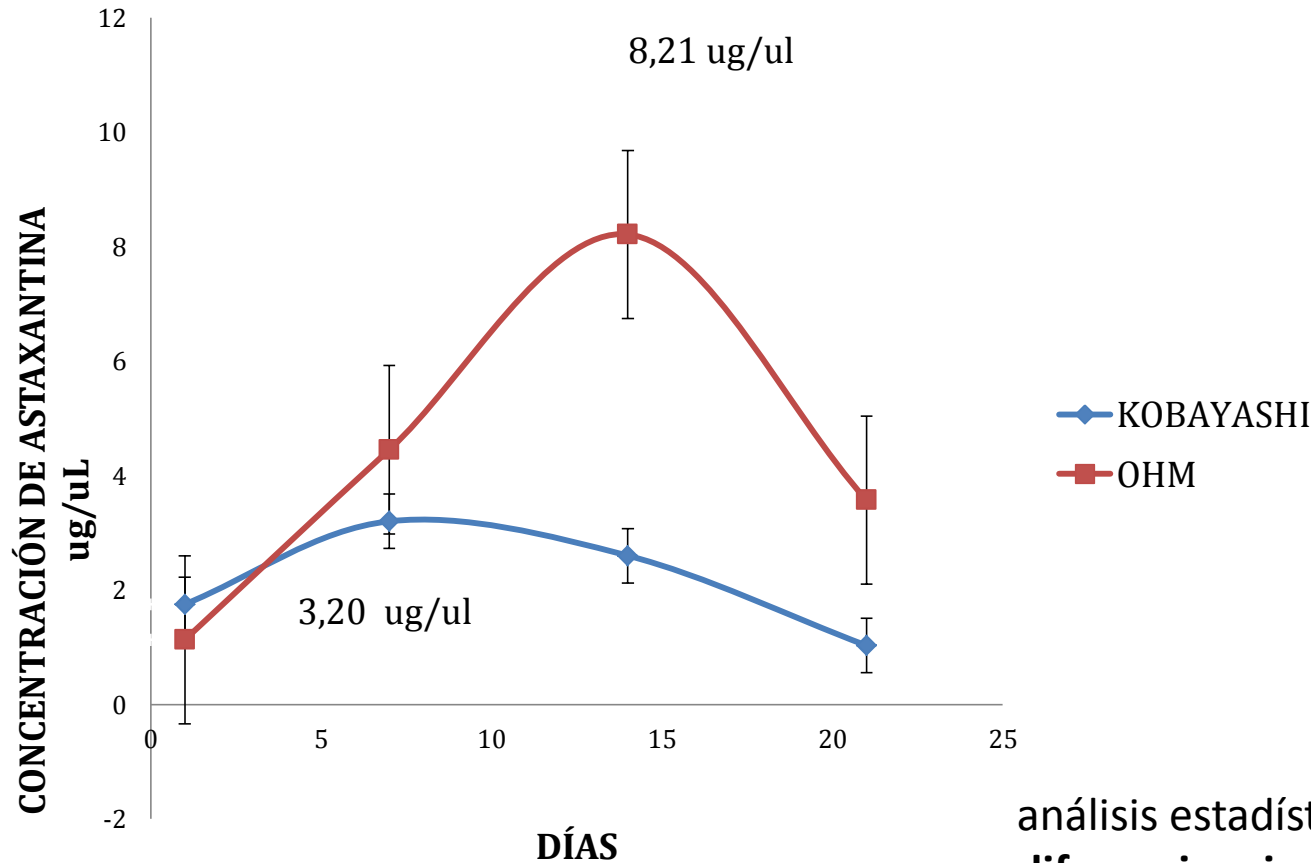


✓ T. Xi *et al* 2016 Luz azul y roja (57)

Análisis estadístico de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$): No hay diferencias significativas. $P = 0.2404$ $KW = 9.173$

FASE 2.

- Determinación de la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

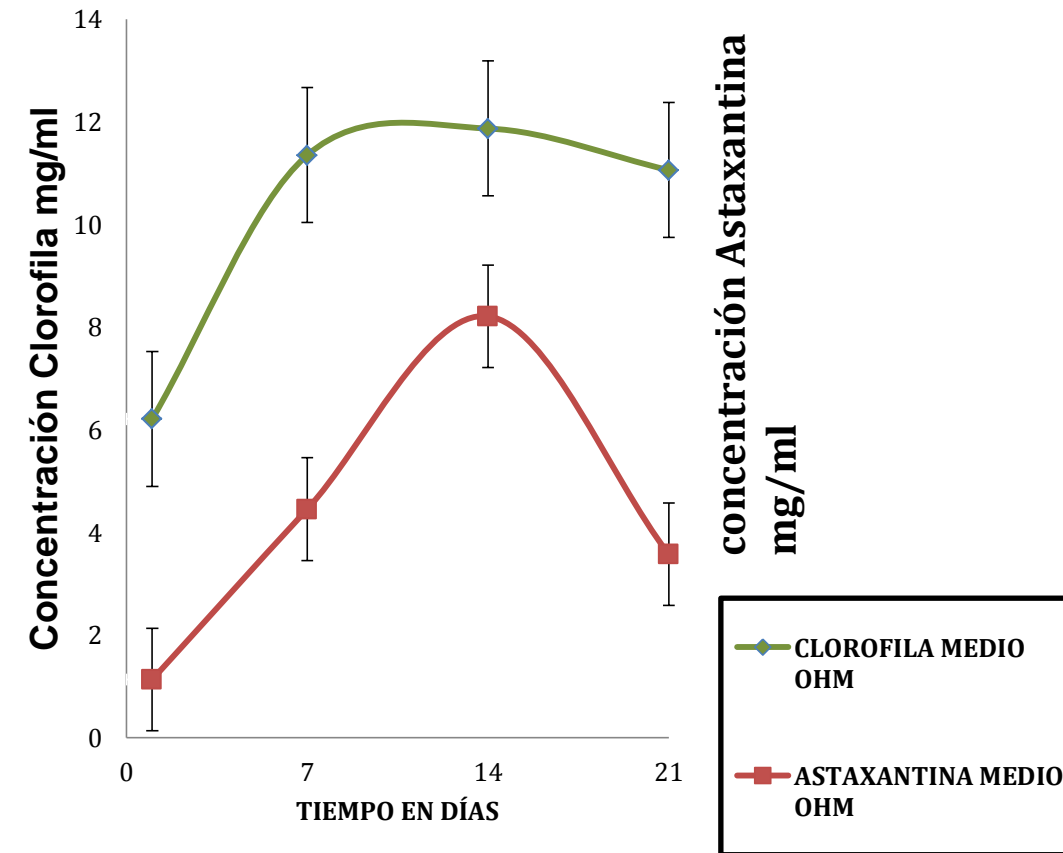
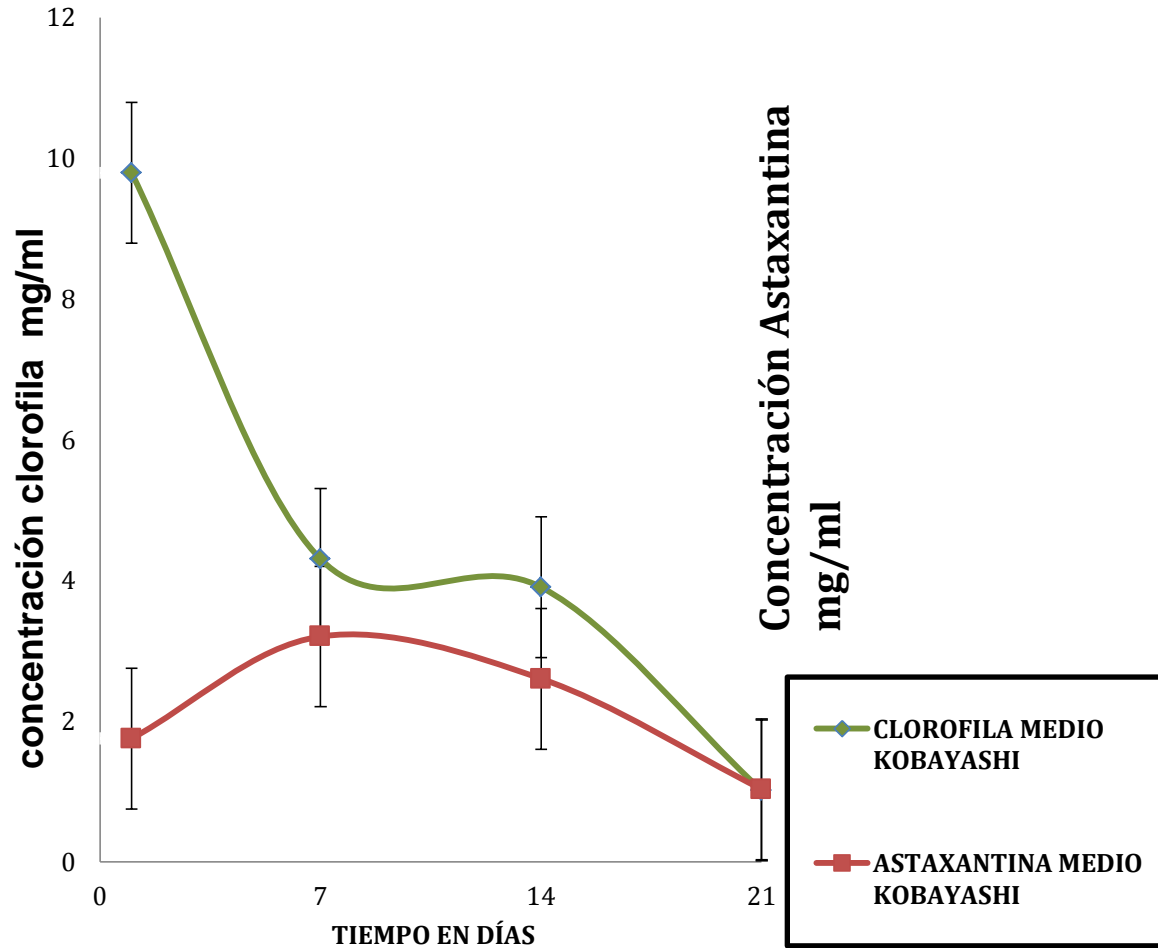


✓ T. Xi *et al* 2016 Utilidad en los colores mejora la concentración (57)

análisis estadístico de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$): No hay diferencias significativas. $P = 0.3929$ $KW = 6.277$

FASE 2.

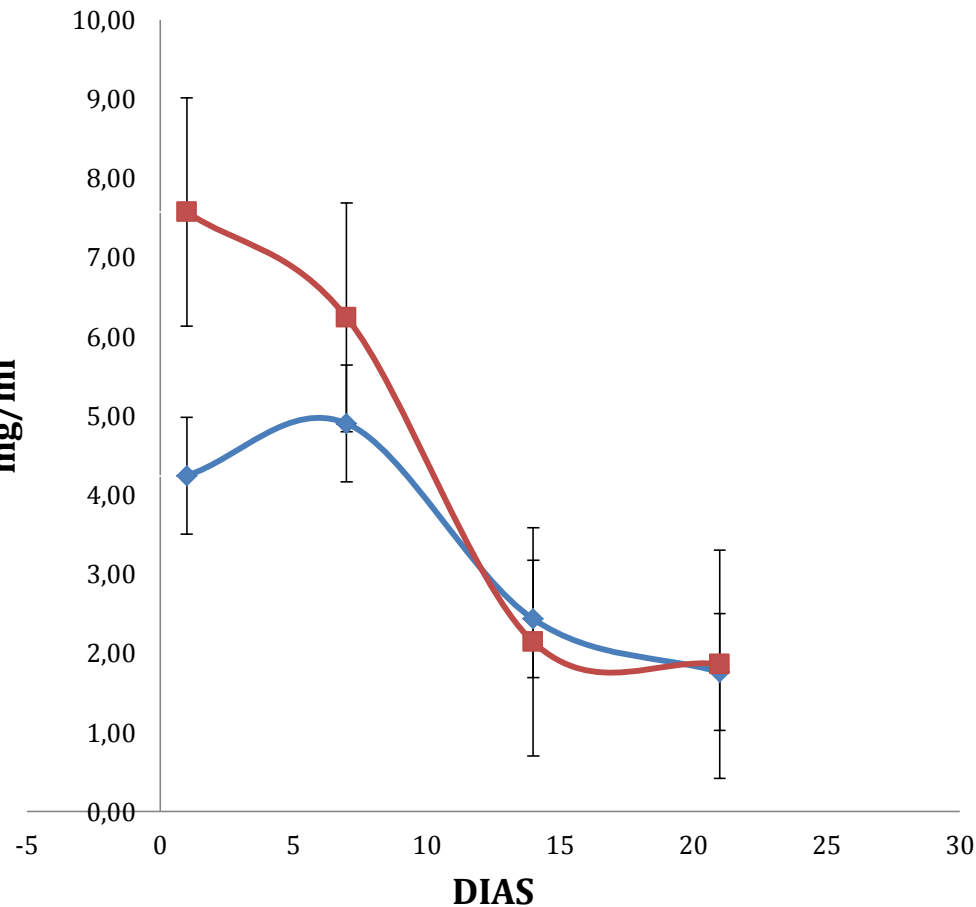
- Determinación de la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.



FASE 2.

Determinación de la concentración de clorofila, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

CONCENTRACION DE NITRATOS mg/ml



◆ KOBAYASHI
■ OHM

✓ Salazar M *et al* 2012
1,25 g/L NaNO₃ (55)

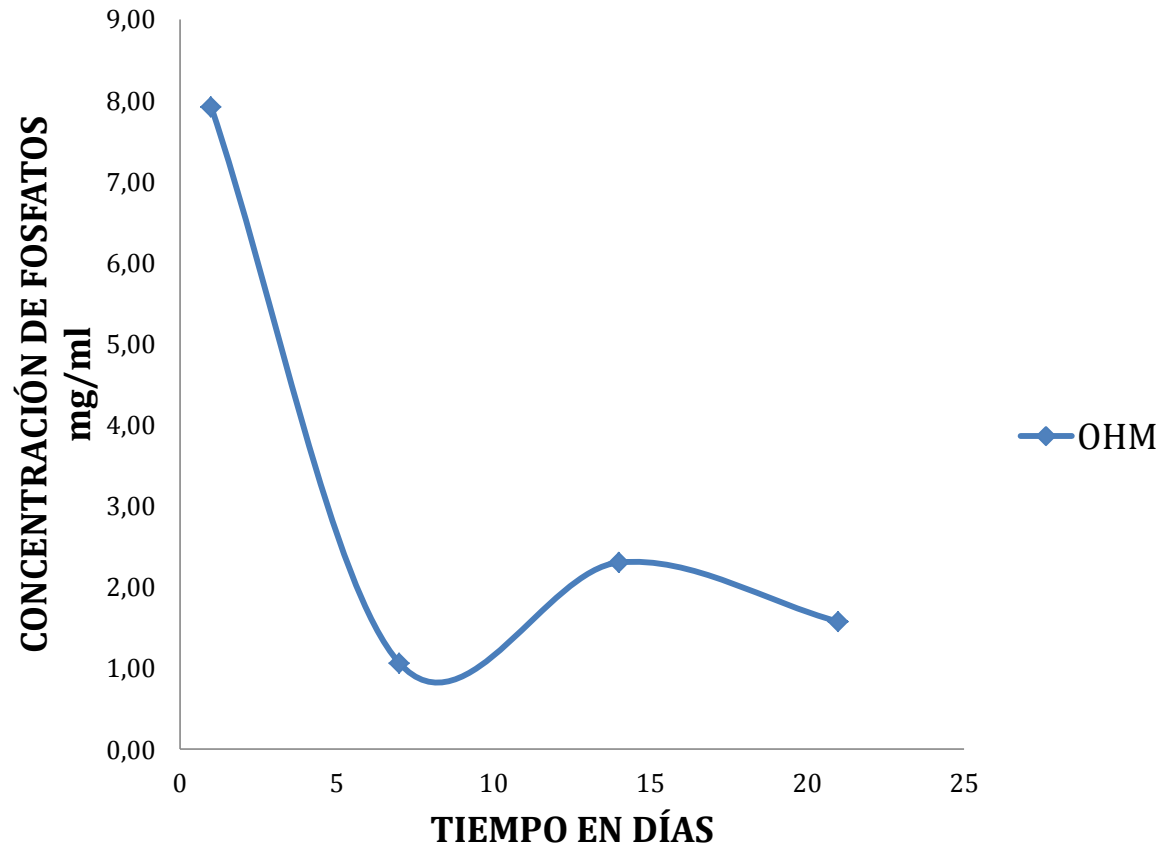
Concentración inicial: 7.57 mg/ml
Concentración final: 1.86 mg/ml
58%

Concentración inicial: 4.24 mg/ml
Concentración final: 1.76 mg/ml
75%

Análisis estadístico de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$): Si hay diferencias significativas. $P = 0.0436$ KW=14.46

FASE 2.

Determinación de la concentración de clorofila, astaxantina, fosfatos y nitratos durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.



NO se llevo a cabo análisis estadístico

Concentración inicial: 7.92 mg/ml
Concentración final: 1.57 mg/ml

DISMINUCIÓN DEL 80%

✓ Ramirez *et al* 2013
3.4 mM Aumenta capacidad replicativa (34)

FASE 2.

Determinación de los costos para cada medio de cultivo y así establecer el medio más rentable para el sostenimiento de la microalga .

MEDIO OHM			MEDIO KOBAYASHI		
REACTIVOS	mg/L	Precio (pesos)	REACTIVOS	g/L	Precio(pesos)
KNO ₃	0.41 g/L	0.41	Acetato de sodio	1.2	29.2
Na ₂ HPO ₄	0.03 g/L	0.03	L-asparagina	0.4	47.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.246 g/L	42.32	Extracto de levadura	2.0	558
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.11 g/L	21.0	MgCl ₂ 6H ₂ O	0.2	961
Fe(III)citrato H ₂ O	2.62	644.0	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01	0.76
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.011	0.97	CaClE 2H ₂ O	0.02	0.055
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.012	1.27	-	-	-
Cr ₂ O ₃	0.075	2.325	-	-	-
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.98	702.66	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.12	648.0	-	--	--
SeO ₂	0.005	0.045	-	-	-
TIAMINA	15 ug/L	750.0	-	-	-
BIOTINA	17.5 ug/L	1.750	-	-	-
VITAMINA B12	0.026 g/L	4.472	-	-	-
TOTAL		11.357 PESOS	TOTAL		1.596 PESOS

TABLA RESUMEN

Medios	Kobayashi	OHM	Kruskal-Wallis (P < 0.05)
Densidad celular (cel/ml)	1.0×10^5 cel/ml	1.23×10^6 cel/ml	
pH	7.7 a 8.0 pH	6.3 a 6.9 pH	P= 0.0044 KW=20.59
Consumo de fosfatos %	No incluye el medio	80%	-
Consumo de nitratos %	58%	75%	P= 0.0436 KW=14.46
Clorofila (mg/ml)	9.79	11.87	P= 0.2404 KW=9.173
Astaxantina mayor producción de pigmento (ug/ul)	3.20 ug/ul	8.21 ug/ul	P= 0.3929 KW=6.277
Crecimiento máximo (cel/ml)	5.977	6.863	-
Velocidad de crecimiento Cel/dia	0.022	0,037	-
Análisis de costos	1.596 pesos	11.357 pesos	-

- Condiciones para el cultivo:
- temperatura 20 °C
 - agitación a 100 rpm
 - fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad
 - luz blanca por medio de lámparas fluorescentes blancas Phillips Master TL5 HO de 54W/827 irradianza 60 lux
 - pH de 6.8

Análisis estadístico Kruskal-Wallis. Diferencias significativas entre tratamientos $P < 0.05$

CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo en el biorreactor Tecferm 5L, fotoperiodo 18:6 Luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) irradianza 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado y temperatura $22^{\circ} \text{C} \pm 2$ por un periodo de 21 días brindan a la microalga *H. pluvialis* la capacidad de sobrevivir y replicarse en un ambiente óptimo como lo es un medio de cultivo

-La morfología celular observada fueron como células vegetativas flageladas, palmeloides en los dos medios utilizados.

La concentración de clorofila fue 11,87 mg/ml y 9,79 mg/ml, la de astaxantina 8,21 ug/ul y 3,20 ug/ul, el pH entre 6,3-6,9 y 7,7-8,0, fosfatos disminuyeron en 80% y los nitratos disminuyeron en 75% y 58% durante el cultivo bajo las condiciones establecidas en los medios de cultivo OHM y Kobayashi.

El cultivo de *H. pluvialis* llegó a obtener en los medios OHM y Kobayashi un crecimiento celular de 1.23×10^6 cel/ml y 1.0×10^5 cel / ml respectivamente, bajo las condiciones mencionadas previamente además se encontró diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,005$)

El análisis de costos permite establecer que la producción de 1 litro de medio OHM tiene un valor de \$11.357, siendo más costoso que el valor obtenido para obtener 1 litro de medio Kobayashi, el cual es \$1.596 pesos.

El mejor medio es OHM de acuerdo a los atributos que mostro durante todo el cultivo.

RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta la trayectoria de la luz en el biorreactor Tecferm para que la incidencia de la luz sobre la microalga pueda ejercer efecto sobre la fotosíntesis *H. pluvialis*, esta no debe ser mayor de 2-5 cm.

1



- Continuar utilizando el biorreactor Tecferm 5L en estudios posteriores ya que al contar con un diseño de tipo tubular es más sustentable para el cultivo de *H. pluvialis* ya que cuentan con un área amplia de iluminación con una buena tasa de producción de biomasa.

2



AGRADECIMIENTOS

Agradecida con Dios por poner en mi camino esta profesión tan linda y llena de retos, por brindarme excelentes personas durante mi proceso y hacerme ver que en esta vida todo tiene una razón de ser.

A la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca por hacer que cada día quiera dejar en alto el nombre de la institución y por todo el apoyo en mi investigación.

Un agradecimiento a la profesora Judith Elena Camacho Kurmen por su compañía durante este proceso y la paciencia puesta en cada tropiezo, quedo infinitamente agradecida por ayudarme a cumplir con esta gran meta.

Al grupo de investigación Bioprocesos y control por dar los recursos para realizar el proyecto.

A todos los que me brindaron su compañía y apoyo durante toda mi carrera, siempre tendrán un espacio en mi corazón

BIBLIOGRAFIA

1. P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101(1):87–96.
2. A. Hernández-Pérez, J. I. Labbé. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2014; 49:157–173
3. Lorenz T. A technical review of Haematococcus Algae. Cyanotech Corporation. 1999.
4. Fábregas J, Otero A, Maseda A, Domínguez A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *J Biotechnol*. 2001; 89(1):65–71.
5. Cifuentes A, Gonzales M, Vargas S, Hoeneisen M. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res* 2011; 36: pp. 343-357.
6. Lopez Garcia M C, Del Rio E, Casas J, Fernández F, Fernández J, Rivas J, *et al*. Comparative analysis of the outdoor culture of Haematococcus pluvialis in tubular and bubble column photobioreactors 2006; 123(3):329-342.
7. García-Malea, M. C., Ación, F. G., Fernández, J. M., Cerón, M. C., & Molina, E. *Continuous production of green cells of Haematococcus pluvialis: Modeling of the irradiance effect*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 981–989.
8. Grewe C, Griehl C. Time-and media-dependent secondary carotenoid accumulation in Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Journal* [Internet] 2008;3 :1232-44.
9. Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2006; 39:575-580.
10. Bao Yu Z, Ya Hong G, Zhong K, Hong Jun H, Ye Guang Li. Production of astaxanthin from Haematococcus in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*. 2009; 295: 275–281
11. Tocquin P, Fratamico A, Franck F Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol*. 2012; 24:365–373.
12. Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis . *Biotechnology Advances*. 2011; 29(6), 568–574.
13. Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, Sim SJ. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of Haematococcus pluvialis. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012;35(1-2):309-15
14. Saha S, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga Haematococcus pluvialis. *Bioresour Tecnology*. 2013; 128:118-124.
15. Galvao R, Santana T, Fontes C, Sales E. Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Research*. 2013, 4:50-56
16. Wan M, Hou D, Li Y, Fan J, Huang J, Liang S *et al*. The effective photoinduction of Haematococcus pluvialis for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Tecnology*. 2014; 163:26-32.
17. Sipauba L, Berchielli F, Scardoeli B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*. 2015; 75(4): pp 796-803
18. Hexin Lv, Feng X, Miao L, Xianggan C, Fazli W, Shiru Jia. Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in Haematococcus pluvialis. *Algal Research*. 2016; 20:35–43.
19. Christwardana M, Hadiyanto H. The Effects of Audible Sound for Enhancing the Growth Rate of Microalgae Haematococcus pluvialis in Vegetative Stage. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2017; 24(3):149-155.
20. Cai. W, Dunford N.T, Wang. S, Zhu. H. Audible sound treatment of the microalgae Picochlorum oklahomensis for enhancing biomass productivity. *Bioresour Technol*, 202 (2016), pp 226-230
21. Larsen P, Gilbert J. Microbial Bebop: Creating Music from Complex Dynamics in Microbial Ecology. *PLoS ONE*.2013; 8(3):e58119.
22. Niño Castillo C, Rodríguez Rivera F, Díaz L, Lancheros Díaz A. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis. *NOVA-SciELO.org.co*. 2017; 15 (28): 19-31

BIBLIOGRAFIA

23. Leiton Y.A. Producción de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor tecferm de 5 l en medios de cultivo RM y BBM. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca. 2018
24. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010; 14(2):557-577.
25. Benavente J. R.1, Montañez J. C., Aguilar C. N, Méndez A, Valdivia B. Tecnología de cultivo en microalgas en fotobiorreactores, AQM 2009 revista de divulgación científica. Publicación de la coordinación de estudios de postgrado e investigación y la facultad de ciencias químicas. Universidad Autonoma de Coahuila. 04-2011-101709565500-102v
26. Gu W, Xie X, Gao S, Zhou W, Pan G, Wang G. Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e67028.
27. Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7(531).
28. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*. 2000;108(2):111-117.
29. Jaramillo R. Producción de Astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus Pluvialis*. Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. UDLA. 2015. 66 p.
30. Instituto tecnológico de Sodorá, Mc Gahey L, Uzziel A. Produccion de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* 2017.
31. Ba F, Ursu A, Laroche C, Djelveh G. *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. *Bioresource Technology*. 2016; 200:147-152.
32. Andex Biothechnology, Franklin Street 567, Manhattan, New York, USA.
33. Richmond A, Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture*. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 2013.
34. Ramirez D.. Evaluacion del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Universidad Nacional de Colombia [Tesis Master] 2013.
35. Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah M. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2010;11.
36. Gómez Luna L. MICROALGAS: ASPECTOS ECOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS. *Revista Cubana de Química [Internet]*. 2018; XIX, (2): 3-20.
37. Gonzalez C. Alicia. ¿Qué Son Las Microalgas? Interés Y Uso [Internet]. *Grupocooperativocajamar.es*. 2018
38. Granada P, Granada R. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. 2015.
39. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991;71(5):335-339.
40. Cultivo de microalgas: sistemas abiertos vs sistemas cerrados | CO2ALGAEFIX. *Co2algaefix.es*. 2012.
41. Sartorius Stedim Systems GmbH. <http://www.sartorius-stedim.com>. 2018.
42. Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Universidad de Almería.
- 43) Contreras C, Peña Castro J, Flores Cotera L, Cañizares Villanueva R, Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas *Interciencia*, 2003;28(8): 450-456

BIBLIOGRAFIA

44. [Internet]. Legislación vigente en los organismos genéticamente modificados. Catarina.udlap.mx. 2012.
45. Trinidad bello a. modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste. mat.izt.uam.mx. 2014.
46. Casas GA, Rodríguez D, Afanador G. Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. Rev Colomb Cienc Pecu. 2010; 23:349-358.
47. Garre Pérez A, Egea Larrosa, J, Fernández Escámez P. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. Anuario de Jóvenes Investigadores. 2016;9.
48. Cayré M, Vignolo G, Garro O. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y Brochothrix thermosphacta sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. Información tecnológica. 2007;18(3).
49. M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae Dunaliella tertiolecta. Asian Journal of Plant Biology 2014; 2 (1): pp. 01-06
50. Tocquin P, Fraticco A, Franck F. Screening for a low-cost Haematococcus pluvialis medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. Journal of Applied Phycology. 2011; 24(3):365-373.
51. Universidad Autónoma de Tamaulipas, tutorial de análisis de agua. México. Bacteriología y potabilidad del agua. 2012 - Educational innovations
52. Hernandez K, Perez M, Jauregui Carmen, Alcantara L, Hurtado Lilia. Condiciones de producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis: Revisión bibliográfica 2003-2013. Rev. mex. Cienc. Farm. [revista de internet] 2015 46(1):7-16
53. García-Malea, M. C., Acíen, F. G., Fernández, J. M., Cerón, M. C., & Molina, E. *Continuous production of green cells of Haematococcus pluvialis: Modeling of the irradiance effect. Enzyme and Microbial Technology, 38(7), 981–989.*
54. Fernandez M, Diseno, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga Chlorella sorokiniana, Universidad EAFIT Departamento de Ingeniería de Procesos Medellín Colombia 11-2013.
55. Salazar M, Monroy O, Beristain R, Cuevas F, Mendoza C. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de Haematococcus pluvialis. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México; 2012.
56. OpenStax, The Light-Dependent Reactions of Photosynthesis. OpenStax CNX. 9 de octubre de 2013.
57. Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J.-S., & Choi, Y.-E. Enhancement of astaxanthin production using Haematococcus pluvialis with novel LED wavelength shift strategy. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016; 100(14), 6231–6238.
58. Huang Q, Jiang F, Wang L, Yang C. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms green chemical engineering-review. 2017;3(3):318-329.
59. Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., & Yamaji, H. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga Haematococcus pluvialis. Journal of Bioscience and Bioengineering, 119(3), 345–350. (2015).
60. Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M. R., Lu, C., & Hu, Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of Haematococcus pluvialis in an outdoor photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. 2013 25(1), 253-260.
61. [Wan M](#), [Hou D](#), [Li Y](#), [Fan J](#), [Huang J](#), [Liang S](#), [Wang W](#), [Pan R](#), [Wang J Li S](#). The effective photoinduction of Haematococcus pluvialis for accumulating astaxanthin with attached cultivation. [Bioresour Technol](#). 2014;163:26-32.

BIBLIOGRAFIA

62. Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). *The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of Haematococcus pluvialis during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource Technology, 167, 276–283.*
63. [Damiani MC](#), [Popovich CA](#), [Constenla D](#), [Leonardi PI](#). Lipid analysis in Haematococcuspluvialis to assess its potential use as a biodiesel feedstock. [Bioresour Technol.](#) 2010 Jun;101(11):3801-7.
64. Cordoba N, Acero N, Duque L, Jimenez L, Serna J. Obtencion y caracterización de astaxantina de la microalga Haematococcus pluvialis UGCiencia.2015; 21: 73-82.
65. Wang J, Han D, Sommerfeld M, Lu C, Hu Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor Journal of Applied Phycology. 2013; 25(1) 253-260
66. Bedoya J, Hoyos R, efecto de la realcion agitacion-aireacion sobre el crecimiento celuar y la produccion de azadiractina en cultivos celulares de azadirachta indica a. juss,Rev.Fac.Nac.Agron. Medellin. 2010; 1(63): 5293-5305, ISSN, electronico 2248-7026 ISSN impreso 0304-2847,
67. Rendon castrillon L, Ramirez Carmona M, Velez Salazar Y. Microalgas para la industria alimenticia. 1st ed. Medellin: Editorial Universidad Pontificia Bolivariana; 2015.
68. Mendiola J.A. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos J. of Supercritical Fluids 43 (2008) 484–489
69. Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. G. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs.* 2014; 12, 128–152.
70. Shah, Md. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J. & Daroch, M. Astaxanthin-Producing Green Microalga Haematococcus pluvialis: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science.* 2016; 7.
71. Collins, A. M. Carotenoid distribution in living cells of haematococcus pluvialis (chlorophyceae). *PLoS ONE.* 2011; 6
72. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis. *Bioresource Technology.* 2005; 96(3), 373–378.
73. Domínguez A. R., Guerrer I., Martinez, F.Tomasini A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Bioresource Technology.*2004;92:(2), 209–214.
74. Imamoglu, E., Sukan, F. V., & Dalay, M. C.Effect of different culture media and light intensities on growth of Haematococcus pluvialis. *International Journal of Natural and Engineering Sciences.* 2007 1(3), 5–9.
75. Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H., & Sim, S. J. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2005;68(2): 237–241
76. Han, D., Li, Y., & Hu, Q. Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications. *Algae.* 2013
77. Kang, C. D., An, J. Y., Park, T. H., & Sim, S. J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga Haematococcus pluvialis in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*2006; 31(3): 234–238.
78. Del Río, E., Ación, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E., & Guerrero, M. G. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga Haematococcus pluvialis in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering.*2005;91(7): 808–815.
79. Kathiresan, S., & Sarada, R. Towards genetic improvement of commercially important microalga Haematococcus pluvialis for biotech applications. *Journal of Applied Phycology.*2009; 21(5): 553–558.
80. Han, D., Li, Y., & Hu, Q. Biology and Commercial Aspects of Haematococcus pluvialis. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology.* 2013:388–405

BIBLIOGRAFIA

81. Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., & Pavasant, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*.2007; 98(2): 288–295.
82. Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., & Tanaka, H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*. 2001; 13(5): 395–402.
83. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and Bioproducts Processing*. 2016; 99:1–11.
84. Sun, H., Guan, B., Kong, Q., Geng, Z., & Wang, N. Repeated cultivation: Non-cell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*. 2016; 6.
85. Kim, Z. H., Kim, S. H., Lee, H. S., & Lee, C. G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006;39(3): 414–419.
86. Göksan, T., Ak, İ., & Kihç, C. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2011;11: 377–383.
87. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs*.2014; 12(8): 4504–4520.
88. Issarapayup, K., Powtongsook, S., & Pavasant, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*.2009; 142(3–4), 227–232.
89. Hanan, N. A., Al-Shorgani, N. K., Shukor, H., Abd. Rahman, N., & Kalil, M. S. Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluvialis* Growth. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*.2016; 3(2): 168.
90. Yilmaz, C., & Gökmen, V. Chlorophyll. In *Encyclopedia of Food and Health* 2015; 37–41.
91. Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*.2001; 92(2), 113–131.
92. Quinn, J., de Winter, L., & Bradley, T. Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource Technology*. 2011;102(8): 5083–5092
93. Sierra, E., Ación, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C., & Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*.2008; 138(1–3), 136–147.
94. Tang, H., Chen, M., Simon Ng, K. Y., & Salley, S. O. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012; 109(10): 2468–2474
95. Liao, Q., Li, L., Chen, R., & Zhu, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. *Bioresource Technology*. 2014; 161, 186–191.
96. Zijffers, J. W. F., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. Design process of an area-efficient photobioreactor. *Marine Biotechnology*, 2008;10(4), 404–415.
97. Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Morosinotto, T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE*.2012 7(6).
98. Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*.2001; 92(2), 113–131
99. Suh, I. S., & Lee, C. G. Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. 2003

GRACIAS ...