

editorial
redipe

© 2020

Título original:

Escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina.

Grupo de investigación Bioprocesos y Control (GBYC)

Compiladores: Judith Elena Camacho Kurmen, Ana Graciela Lancheros Díaz,
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca,
Luis Eduardo Díaz Barrera, Grupo de investigación GIPA, Universidad de la Sabana

ISBN: 978-1-951198-66-4

Primera edición, Enero de 2021

SELLO Editorial

Editorial REDIPE (95857440), Nueva York – Cali

Red de Pedagogía S.A.S. NIT: 900460139-2

© de la ilustración de la cubierta

COEDITOR: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Serie Autores Iberoamericanos / Macroproyecto Iberoamericano de Educación

Comité Editorial

Valdir Heitor Barzotto, Universidad de Sao Paulo, Brasil

Carlos Arboleda A. PhD Investigador Southern Connecticut State University, Estados Unidos

Agustín de La Herrán Gascón, Ph D. Universidad Autónoma de Madrid, España

Mario Germán Gil Claros, Grupo de Investigación Redipe

Rodrigo Ruay Garcés, Chile. Coordinador Macroproyecto Investigativo Iberoamericano
EvaluaciónEducativa

Julio César Arboleda, Ph D. Dirección General Redipe. Grupo de investigación Educación y
Desarrollo humano, Universidad de San Buenaventura

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la ley, la reproducción (electrónica, química, mecánica, óptica, de grabación o de fotocopia), distribución, comunicación pública y transformación de cualquier parte de ésta publicación -incluido el diseño de la cubierta- sin la previa autorización escrita de los titulares de la propiedad intelectual y de la Editorial. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Los Editores no se pronuncian, ni expresan ni implícitamente, respecto a la exactitud de la información contenida en este libro, razón por la cual no puede asumir ningún tipo de responsabilidad en caso de error u omisión.

Red Iberoamericana de Pedagogía
editorial@rediberoamericanadepedagogia.com
www.redipe.org

50 EJEMPLARES
Impreso en Cali, Colombia
Printed in Cali, Colombia

Escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina

Grupo de investigación Bioprocesos y Control (GBYC)

Compiladores:

Judith Elena Camacho Kurmen,

Ana Graciela Lancheros Díaz,

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca,

Luis Eduardo Díaz Barrera,

Grupo de investigación GIPA, Universidad de la Sabana

Serie Autores Iberoamericanos / Macroproyecto Iberoamericano de Educación

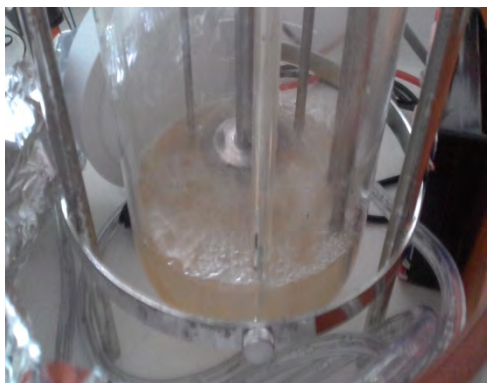
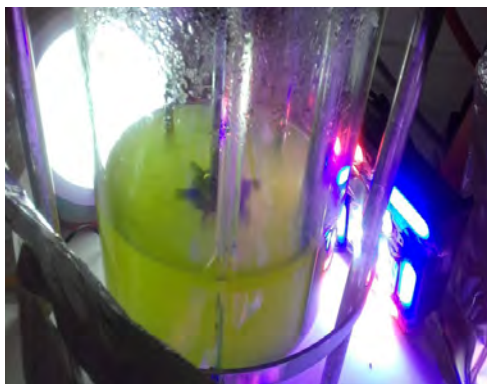


Foto tomada por Camacho K. J.E., 2019



JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

Química Farmacéutica

Especialista en administración de la calidad
Especialista en gerencia de producción y productividad
Maestría en Medio ambiente y Desarrollo
Doctor en Biociencias
Docente investigadora
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Lider Grupo Bioprocesos y control

ANA GRACIELA LANCHEROS DÍAZ

Bacterióloga y laboratorista Clínico

Maestría en enseñanza problémica
Docente investigadora
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Coinvestigadora en Bioprocesos y control

LUIS EDUARDO DIAZ BARRERA

Químico

PhD

Docente investigador
Universidad de la Sabana
Lider Grupo procesos agroindustriales (GIPA)



Estudiantes:

MÓNICA ALEJANDRA MANRIQUE PINZÓN

DAVID LEONARDO MARÍN CORREDOR

ANDREA YENI LEITON

ÁNGELA MARÍA HERNÁNDEZ CORTÉS

Proyecto de investigación institucional:

Evaluación de las condiciones de escalamiento
del cultivo de *Haematococcus pluvialis*
para la producción de astaxantina



TABLA DE CONTENIDO

	PAG.
Resumen	13-14
Introducción	15-17
<i>Haematococcus pluvialis</i>	17-18
<i>Astaxantina</i>	19
<i>Química de la astaxantina</i>	19-21
Ruta de biosíntesis de Astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i>	21-25
Clorofila.....	25
Condiciones de estrés ambiental.....	26-27
Escalamiento de cultivo de microalgas.....	27-29
Fotobiorreactores.....	29-32
Proceso de escalamiento.....	33-36
Cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i> en el BIORREACTOR TECFERM de 5 L.....	36-40
Cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i> y producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando el biorreactor Tecferm de 5 L	40-54
Cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i> en el BIORREACTOR BIOSTAT®A PLUS y producción de astaxantina.....	55-74
Conclusiones	91
Bibliografía	93-99
Agradecimientos	101



RESUMEN

El *Haematococcus pluvialis* es un alga verde que acumula carotenoides, principalmente astaxantina cuando es expuesto a condiciones de estrés. Esta microalga es caracterizada por su crecimiento bajo, susceptibilidad a contaminación y preferencia por la baja temperatura, características que hacen importante la utilización de sistemas cerrados para cultivos como los biorreactores, los cuales ofrecen ventajas como un mejor control del cultivo, la protección de la contaminación ambiental y la producción de gran cantidad de biomasa.

En este trabajo se destaca la utilidad del biorreactor a escala de laboratorio, para proyectarlas hacia condiciones de producción a nivel industrial y obtener este pigmento en mayor cantidad y poder diseñar una formulación. Se evaluó el crecimiento, la producción de pigmentos clorofila y astaxantina a condiciones estándar reportadas para establecer las condiciones de escalamiento del cultivo de esta microalga en el biorreactor a escala de laboratorio. Su crecimiento se determinó en función del tiempo hasta el establecimiento de la fase estacionaria (de estrés natural).

Se establecieron las condiciones a las cuales se obtiene una biomasa en calidad y cantidad adecuadas del *H. pluvialis* utilizando los biorreactores Biostat A plus de 5 Litros y el biorreactor Tecferm de 5 litros, usando medios de cultivo como BBM, RM, OHM y KM, usando las condiciones pH 6,8; temperatura 20 ± 2 °C; fotoperiodo 18 horas luz: 6 horas oscuridad en fase exponencial de crecimiento y en fase de estrés para la obtención de astaxantina se uso 20 horas luz: 4 horas oscuridad; luz blanca con lámparas fluorescentes y luz blanca, azul y roja con un panel de luces LED multicolor construido con el apoyo de SMM INGENIERIA

SAS; irradiancia 65 a 75 luxes en fase exponencial de crecimiento, 285 luxes en fase de estrés; aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min y agitación 100 rpm.

El uso de los biorreactores a escala de laboratorio de 5 litros bajo las condiciones trabajadas permitió obtener una biomasa adecuada de *H. pluvialis* en calidad y cantidad, por lo cual bajo las condiciones establecidas se pueden usar estos biorreactores para obtener productos de gran interés como la biomasa de esta microalga, la astaxantina y lípidos.

El grupo Bioprocesos y control viene trabajando desde el 2015 en el tema de determinar las condiciones adecuadas para producir la astaxantina a partir de *H. pluvialis* someténdolo a diferentes condiciones de estrés y utilizando diferentes medios de cultivo, evaluando el efecto de los factores de estrés sobre la expresión de genes, apoyado por el líder del grupo de investigación de procesos agroindustriales (GIPA) de la Universidad de la Sabana.



INTRODUCCIÓN

Este proyecto busca aprovechar metabolitos secundarios y primarios obtenidos de la biodiversidad, para obtener un producto de interés comercial como es el colorante astaxantina, amigable con el ambiente, realizando el escalamiento para evaluar las condiciones del proceso utilizando un biorreactor a escala de laboratorio de 5 litros, la cantidad de biomasa producida y su calidad. Dentro de la biodiversidad se encuentran las microalgas que son fuente de un gran número de compuestos bioactivos de interés industrial, como los carotenoides que se utilizan como colorantes naturales en alimentación animal y humana, así como en la industria farmacéutica, cosmética y en la acuicultura. Además, se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunoreguladora, anti-inflamatoria y anti-cancerígena.

El ketocarotenoide astaxantina es el más importante desde el punto de vista biotecnológico. Hoy la mayor cantidad de astaxantina es producida por síntesis química y es vendida a un precio de US \$2500/kg. El alto precio y el incremento en la demanda para este compuesto, especialmente de origen natural, en las diferentes industrias, hace que sea de interés la producción astaxantina a partir de microalgas como el *H. pluvialis*, que acumula cantidades importantes (más del 4% g/g de peso seco) y de mejor calidad que las obtenidas por otras fuentes como levaduras y plantas.

La acumulación del pigmento en *H. pluvialis* ocurre durante la transformación de la microalga desde el estado vegetativo (fase verde) a aplanospora (fase roja) cuando cesa su crecimiento en la fase estacionaria. Los tipos de estrés que inducen a la acumulación de astaxantina son temperatura, intensidad lumínica, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de

oxígeno, sales y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel.

La industria de alimentos, cosmética y farmacéutica utiliza materias primas en su mayoría de origen químico, dañinas para la salud, con impacto en el medio ambiente e importadas incrementando tanto los costos de producción, como el costo final del producto. Es por esto que se hace necesario buscar nuevas alternativas aprovechando la biodiversidad como fuente de compuestos bioactivos que sustituyan los existentes y que hacen parte de las formulaciones tradicionales.

Se pretende aprovechar los avances de la ciencia y la tecnología basados en la utilización de las propiedades de los organismos en particular en los niveles celular y subcelular, para generar y adaptar tecnologías que permitan obtener compuestos bioactivos a través de bioprocesos. Es por esto que una estrategia promisoría para mejorar la producción de astaxantina en el *H. pluvialis*, es el estudio de las rutas metabólicas y su regulación, con el fin de optimizar las condiciones de crecimiento, su desarrollo y producción, ya que la utilización del *H. pluvialis* tiene sus dificultades en el momento del cultivo y de obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo. Uno de los principales inconvenientes es que se trata de un producto del metabolismo secundario. Durante el crecimiento activo, no se produce síntesis de astaxantina, solo cuando cesa la división celular se inicia su síntesis y se acumula en grandes cantidades.

H. pluvialis tiene también unas tasas de crecimiento bajas lo que debilita sus posibilidades de uso como fuente natural del pigmento, además es susceptible a la contaminación. Estas características requieren cultivos en sistemas cerrados, los cuales ofrecen ventajas como mejor control del cultivo, protección de la contaminación ambiental y producción de gran cantidad de biomasa, así como el desarrollo de un medio de cultivo óptimo para su crecimiento ya que el uso de una adecuada tecnología de cultivo incrementa la producción de biomasa hasta niveles óptimos para la producción del pigmento. De igual forma, aprovechando el entendimiento de las bases moleculares de la relación -condiciones de estrés-inducción- acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* y los avances tecnológicos

utilizando biorreactores, podría ser útil para aumentar la productividad de astaxantina.

Haematococcus pluvialis

H. pluvialis es un alga verde de células individuales biflageladas (Figura 1), a menudo vista en reuniones densas. Esta microalga puede producir grandes cantidades de astaxantina, la cual tiene una variedad de funciones y es usada en numerosos productos farmacéuticos.

Esta especie de alga tiene una estructura asombrosa y características fisiológicas que no solo la hacen bella, sino que también se adiciona la importancia económica. El *Haematococcus* suministra una fuente natural de beta caroteno, luteína, vitamina E, y otros antioxidantes que proporcionan beneficios más efectivos y respuestas beneficiosas que las formas sintéticas. Algunos de estos beneficios incluyen la protección contra rayos UV, incremento en la fuerza del sistema inmune, y en el tratamiento de enfermedades como Alzheimer y Parkinson.

El *H. pluvialis* es una especie de la división Chlorophyta de la familia ***Haematococcaceae*** (Tabla 1). Esta especie es bien conocida por su alto contenido de antioxidantes fuertes como la astaxantina, que es importante en la producción de varios productos farmacéuticos y cosméticos (1).

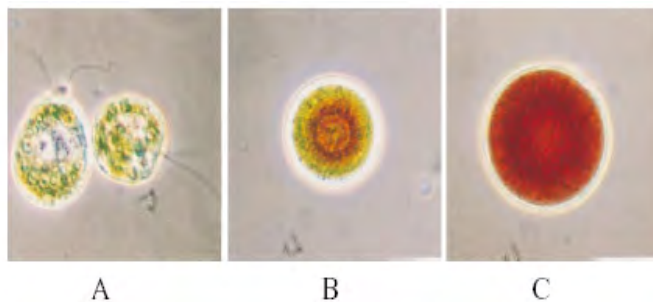


Figura 1. Secuencia de desarrollo de las células de *Haematococcus pluvialis*. (A) Célula verde (B) Célula con acumulación de carotenoides extraplásticos e incremento de tamaño (C) Aumento de tamaño con quistes-rojos. Fuente (2)

La gran cantidad de astaxantina está presente en las células maduras (muertas), la cual se produce y acumula rápidamente cuando las condiciones ambientales son desfavorables para el normal crecimiento celular. Ejemplos de tales condiciones son alta luz, alta salinidad y bajos nutrientes. (3). El *H. pluvialis* es usualmente encontrado en regiones templadas alrededor del mundo. Sus quistes maduros son a menudo responsables del color rojo sanguíneo visto en el fondo seco de rocas afuera de charcos y de baños de aves. Este color es causado por astaxantina la cual se cree protege los quistes maduros del detrimento de los efectos de los rayos UV- radiación, cuando están expuestos a los rayos solares directos (4). En el ciclo de vida del *H. pluvialis* se ha observado que las células verdes vegetativas con dos flagelos (ver figura 2) crecen autotróficamente en la luz y heterotróficamente en la oscuridad (5).

Imperio	<i>Eucariota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridaeplantae</i>
Phylum	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Volvocales</i>
Familia	<i>Haematococcaceae</i>
Género	<i>Haematococcus</i>

Tabla 1. Clasificación *Haematococcus pluvialis* (6)

El alga unicelular *H. pluvialis* es una de las mejores fuentes de carotenoides secundarios rojos como la astaxantina, en especial para producirla biotecnológicamente.

La demanda mundial para β -caroteno de origen natural está alrededor del 15 a 20%, una similar demanda para astaxantina de origen natural está emergiendo en el mercado nutracéutico que mueve billones de dólares (8). Además, la producción biotecnológica a partir de *H. pluvialis*, representa una ventaja sobre la síntesis química y la extracción a partir de crustáceos (7).

Astaxantina

La astaxantina es un pigmento rojo que se presenta naturalmente en una gran variedad de organismos vivos. El pigmento en sí mismo es encontrado en algunos alimentos y está listo para ser consumido como salmón, camarón, pescado crudo, cangrejo y langosta, los cuales son de tinte rojo por la acumulación de astaxantina. La astaxantina es un carotenoide que se encuentra naturalmente y que está relacionado estrechamente a la beta-caroteno y a la luteína.

La astaxantina natural producida por el *Haematococcus* tiene un nuevo potencial comercial y un avance tecnológico en su producción. Los métodos de cultivo se han desarrollado para producir *Haematococcus* que contengan entre el 1,5 – 3% de astaxantina por peso seco, lo cual es aprovechado en sus aplicaciones como fuente de pigmentos en alimentos y en el mercado nutracéutico mundial (8).

La astaxantina se ubica en la naturaleza especialmente en el ambiente marino y es la mejor conocida para elucidar el matiz rojo-rosado a la carne de salmón, como también a los camarones y langostas. Porque estos animales son incapaces de sintetizar astaxantina de nuevo y deben ser suplidas en su dieta. En el ambiente marino, la astaxantina es biosintetizada en la cadena alimenticia en las microalgas o fitoplancton, como el nivel de producción primario.

El mayor mercado para la astaxantina es como fuente de pigmentación en la acuicultura, primariamente en salmón y trucha. La astaxantina vende aproximadamente US\$2500/Kg con el mercado mundial de acuicultura estimado alrededor de US\$200 millones. Aunque el 95% de este mercado consume el derivado sintético de astaxantina, la demanda de consumo para productos naturales hace que los pigmentos sintéticos sean menos deseables y proveen una oportunidad para la producción de astaxantina natural por *Haematococcus* (8).

Química de la astaxantina

La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3' sobre los dos anillos bencénicos al final de la molécula. Diferentes enantiómeros de la molécula son resultantes de la unión de los grupos hidroxilo a los átomos de carbono, que son centros de asimetría (Figura 2).

Cuando los grupos hidroxilo se unen sobre el plano de la molécula se dice que están en la configuración R y cuando los grupos hidroxilo se unen bajo el plano de la molécula se dice que está en la configuración S. Así, los tres posibles enantiómeros son designados R, R'; S, S' y R, S'(meso). El *Haematococcus* primeramente contiene monoesteres de astaxantina.

La composición de los esterres de astaxantina en *Haematococcus* es similar a la de los crustáceos, fuente de dieta natural de los salmones. Siendo el contenido de astaxantina en quistes de *Haematococcus*, aproximadamente de 70% monoesteres, 25% diesteres y 5% libre. El alga *Haematococcus* incluidos como alimento en la acuicultura provee la configuración 3S, 3'S de astaxantina. Mientras la levadura *Phaffia* contiene 3R, 3'R astaxantina pura, y la astaxantina sintética es una mezcla de los tres isómeros (8).

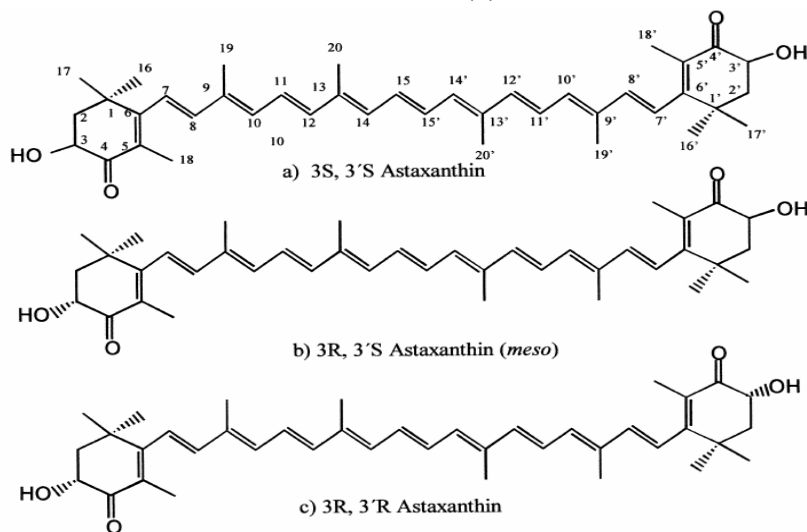


Figura 2. Isómeros configuracionales Astaxantina (3S, 3'S) astaxantina; (3R, 3'S) astaxantina; (3R, 3'R) astaxantina (8)

La astaxantina tiene tres estereoisómeros: 3S, 3'S, 3R, 3'S, o 3R, 3'R. La sintetizada y la forma extraída de la microalga *H. pluvialis* pueden diferenciarse por los estereoisómeros, la astaxantina sintética es producida como astaxantina libre (no esterificada) en una mezcla de estereoisómeros: los estereoisómeros (3R,3'R), (3R,3'S) y (3S,3'S) presentándose en un radio de 1:2:1, mientras la astaxantina natural, es usualmente esterificada y predominante en la

configuración (3S,3'S), presentándose como los 3S,3'S estereoisómeros y primariamente como monoésteres (>90%), con diésteres incluyendo ~8% y como molécula libre ~1% (8).

Ruta de biosíntesis de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis*

En la biosíntesis de carotenoides el primer paso es la condensación del geranylgeranyl difosfato (GGPP) a fitoeno, modificado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), como se observa en la figura 3.

Los siguientes pasos son llevados fuera de la membrana, localizando enzimas como fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno β -ciclase (LCY). Según estudios realizados la fitoeno desaturasa es regulada por los niveles del mRNA y se ha establecido que los carotenoides secundarios se acumulan fuera del cloroplasto, siendo transportados del sitio de biosíntesis (cloroplasto) al sitio de acumulación (vesículas localizadas en el citoplasma) (9) (10).

Las rutas metabólicas secundarias sirven para explorar nuevas estructuras químicas a mínimos costos, en especial a través de la identificación de enzimas que pueden actuar sobre diversos sustratos (11). Todas las enzimas de la ruta son reguladas por genes y son sintetizadas en el citoplasma de las células como precursores polipéptidos (12).

La biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus* sigue la ruta general de carotenos hacia la formación del β -caroteno (Ver figura 3). En estudios realizados in vitro e in vivo utilizando diferentes inhibidores en el análisis de la producción de astaxantina en *H. pluvialis* se han encontrado otras enzimas β -caroteno ketolasa (BKT), β -caroteno oxigenasa (CRTO) y β -caroteno hidroxilasa (CHY o CRTR-B), como se observa en la figura 4. El BKT convierte el β -caroteno a cantaxantina vía echinenona, siendo regulado por el CHY resultando en la formación de astaxantina. Los genes para ζ -caroteno desaturasa (ZDS) e Isomerasa carotenoide (CRTISO) no han sido reportados en *Haematococcus* (9) (13).

Aunque los pasos específicos de biosíntesis de astaxantina son llevados afuera del citoplasma, las enzimas de la ruta carotenoide parecen estar localizadas en los cloroplastos. (13) Los estudios usando varios inhibidores indican que la carotenogénesis en general y la inducción de carotenoides secundarios está regulada a nivel transcripcional y transduccional, lo cual como lo dicen algunos

de los estudios revisados no es muy claro, por lo cual este es un punto de interés a investigar para aclarar bien los genes involucrados, las proteínas y la actividad enzimática durante la inducción de acumulación de carotenoides secundarios, en especial astaxantina.

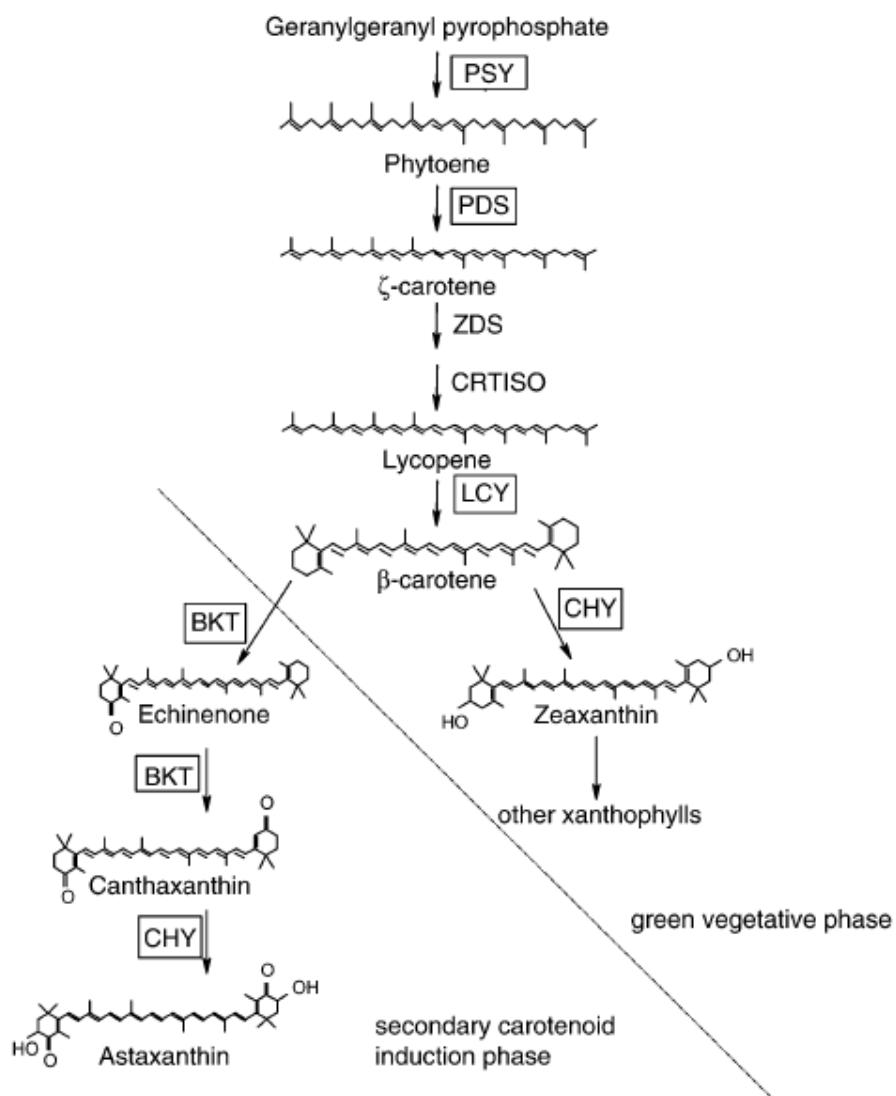


Figura 3. Ruta de síntesis de carotenoides secundarios en *Haematococcus pluvialis* (13)

La astaxantina tiene aplicaciones industriales (farmacéutico y cosmético), aplicaciones alimentarias y en la salud debido a sus efectos metabólicos y saludables, que han hecho que esté presente en nutracéuticos como antioxidante. La Astaxantina juega un papel importante en la protección de membranas celulares contra el ataque de radicales libres, ya que recientes estudios han indicado que la astaxantina es más poderosa que su primo el carotenoide beta-caroteno, para atrapar radicales libres de oxígeno (8) (2).

Comercialmente la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* es altamente rentable por su contenido. Algunas otras empresas comerciales para producción natural de astaxantina utilizan fermentación de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* o extracción de el pigmento de productos de crustáceos tales como la Antarctic krill (*Euphausia superba*). En adición a la producción a partir de fuentes naturales, la astaxantina puede ser sintetizada químicamente, y ésta es la mayor forma en que está siendo usada en alimento para pescado, siendo no adecuada para consumo humano, lo cual podría ser una ventaja para la obtenida a partir de la microalga.

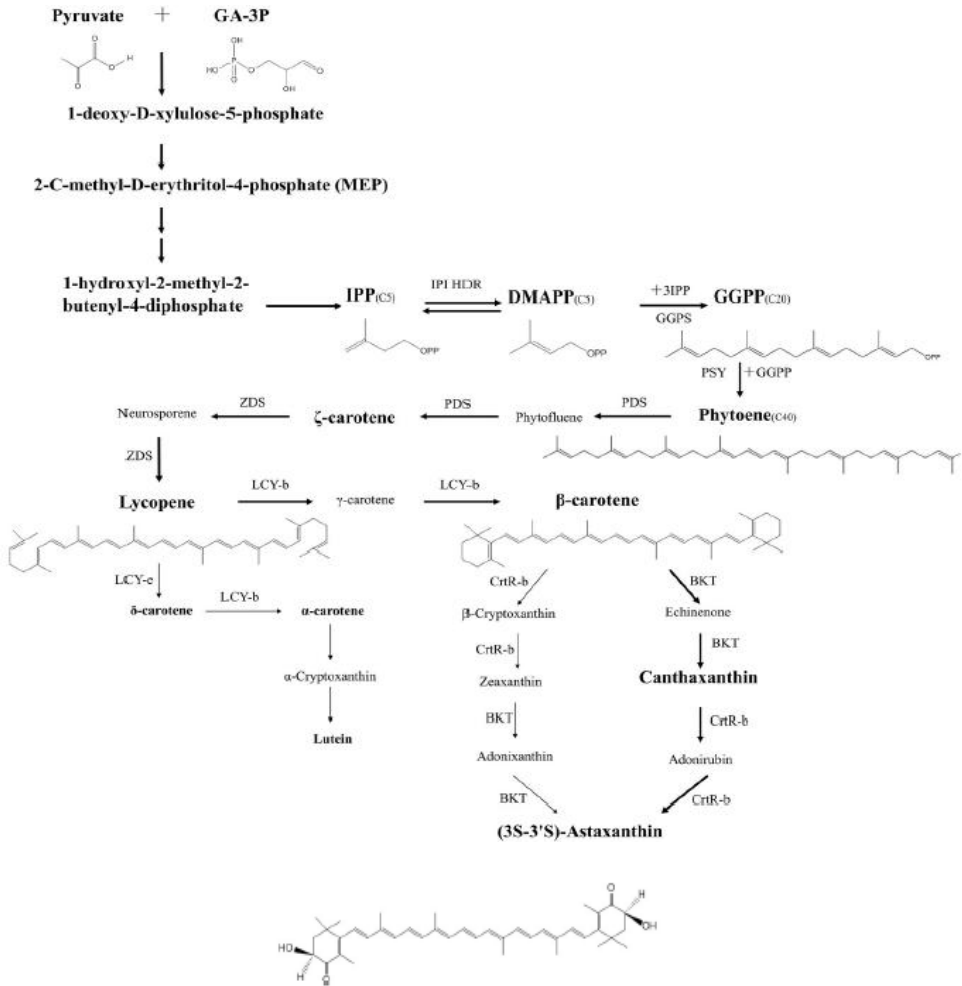


Figura 4. IPI, Isopentenilpirofosfato isomerasa; HDR, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enildifosfato reductasa; GGPS, geranilgeranilpirofosfosintasa; PSY, fitenosintasa;

PDS, fitenodesaturasa; ZDS, z-carotenesaturasa; LCY-b, licopeno b-ciclasa; LCY-e, licopeno +-ciclasa; BKT, b-carotenoketolasa; CrtR-b, b-caroteno3, 3'-hidroxilasa;

Intermediarios: fitoflueno, Neurosporeno, g-caroteno, b Cryptoxantina, Adonixantina, Echinonona, Adonirubina (63)

La astaxantina tiene uso farmacéutico, cosmético y como aditivo de pigmentación en la acuicultura (salmón) (14) (15) (10) (16) (17) y para yemas de huevo. (18) (19)

Recientemente ha llamado la atención como un suplemento nutricional, siendo inhibidor de la peroxidación de lípidos, reductor de la inflamación gástrica, disminuye el riesgo de arteriosclerosis y previene la carcinogénesis (19), además tiene potencial neuroprotector e inmunomodulador (36) y sirve como alimento nutracéutico por su alto poder antioxidante (15) (2) (17) (21).

Clorofila

La molécula de clorofila consiste de un anillo tetrapirrólico (cabeza polar, cromóforo) conteniendo un átomo de magnesio central, y una cadena larga de alcoholes terpenoides (excepto para la Chl *c*). Estas moléculas son enlazadas no covalentemente a apoproteínas. Estructuralmente los varios tipos de moléculas de clorofila designadas *a*, *b*, *c* y *d* difieren en sus sustitutos en un grupo en el anillo tetrapirrólico (Figura 5).

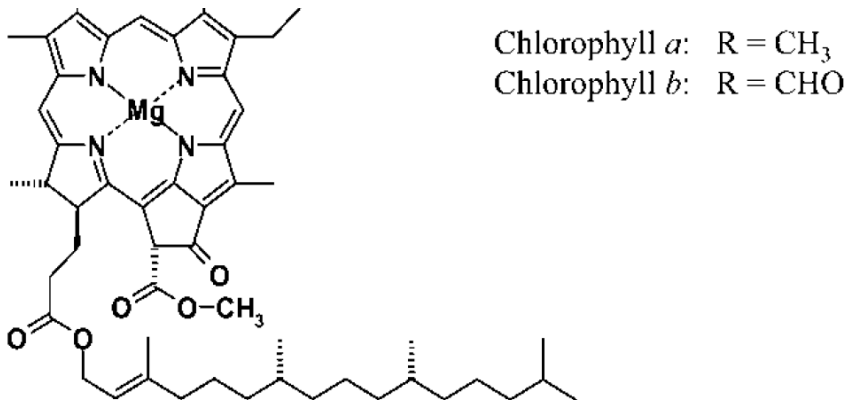


Figura 5. Estructura química de la clorofila (5)

Todas las clorofilas tienen su mayor banda de absorción: azul o verde-azul (450-475 nm) y rojo (630-675 nm). La clorofila *a* está presente en toda la foto autótrofos oxigénicos como parte del núcleo y centro de reacción de los complejos proteína-pigmento, y en los complejos antena está acompañada por la clorofila *b* o clorofila *c*. Los así llamados pigmentos accesorios (antena) clorofila *b*, *c* y *d* extienden el rango de absorción de la luz. (8)

Condiciones de estrés ambiental

Se ha descubierto la respuesta fisiológica del alga al estrés ambiental según diversos estudios. La respuesta a estímulos o cambios en el ambiente es una característica de cualquier organismo vivo. Cambios en las condiciones ambientales quizás está definida sobre la base de la respuesta que las células experimentan como resultado al cambio que sienten, a alguna limitación o a un factor de estrés. Se define un factor limitante como aquél que determina la velocidad de crecimiento o reacción bioquímica y que un cambio a este nivel podría ser considerado en un proceso de aclimatación.

El estrés se define como una condición ambiental que resulta en un desbalance metabólico que requiere ajustes bioquímicos y metabólicos antes de que su nuevo estado de crecimiento sea establecido.

Esquemáticamente la secuencia de eventos asociados con la respuesta de células vivas a un cambio ambiental puede ser descrito así:

Cambio ambiental → mecanismo sensación →

Repuesta mecanismo de adaptación → Nuevo estado uniforme

Los cultivos de algas están expuestos a una variedad de cambios en las condiciones ambientales como: ciclo luz/oscuridad, variación en luz, temperatura, pH, factores nutricionales (nitrógeno, fósforo, hierro), salinidad, fuentes de carbono. Es importante además tener en cuenta los efectos sinérgicos de la combinación de factores químicos y físicos sobre la composición celular. (8)

Las microalgas han desarrollado diversos mecanismos para sensibilizarse y aclimatarse a cambios en su ambiente. Respuestas de aclimatación observadas incluyen la alteración de la síntesis y degradación complejo luz-cultivo en respuesta a cambios en la calidad e intensidad de la luz.

Luz

Efectos de la luz en la composición bioquímica del alga fotosintética son controlados por un proceso llamado fotoaclimatación o fotoadaptación. En este proceso las células sufren cambios dinámicos en su composición con alteraciones en las propiedades ultraestructurales, biofísicas y fisiológicas para aumentar la fotosíntesis y crecimiento del alga. Una respuesta común a la disminución en

la intensidad de luz es el incremento de la clorofila a y otros pigmentos antena (tales como clorofila b, clorofila c, ficobiliproteínas y carotenoides primarios). En respuesta a la alta intensidad de luz la clorofila a y otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis disminuyen, mientras los carotenoides secundarios (zeaxantina, β -caroteno, astaxantina) se incrementan, lo cuales sirven como agentes fotoprotectores.

Estos carotenoides a menudo se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglobulos de plástidos o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, jugando roles en prevenir el exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética. (8)

Factor nutricional Nitrógeno

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

La acumulación de carotenoides es una característica de algunas algas cuando crecen bajo condiciones limitadas de nitrógeno, lo cual es acompañado por una disminución en el contenido de clorofila de las células. Se ha demostrado que la baja concentración de nitrógeno es el mayor factor en estimular la síntesis y acumulación de astaxantina y sus acilesteres en *H. pluvialis*. (8)

Escalamiento de cultivo para microalgas

En el escalamiento de un sistema de cultivo se debe tener en cuenta en el diseño en base a diversos criterios: la biología de la(s) especie(s) a cultivar, la forma del cultivo, los nutrientes, la luz, los factores de estrés, pH, oxígeno disuelto, la relación de la superficie iluminada/ volumen del reactor que determina la velocidad de crecimiento, orientación e inclinación, tipo de sistemas de mezcla y dispersión de gases, sistemas de limpieza y de regulación de la temperatura,

transparencia y durabilidad del material y capacidad de escalado. Son también importantes bajos costos de construcción y operación para fines comerciales. En la elección del tipo de sistema de cultivo se debe tener en cuenta el tipo y valor del producto final desarrollado a partir de la biomasa, además de la disponibilidad de recursos hídricos y/o suelo. (22)

Existen dos sistemas de cultivos para organismos fotoautótrofos, los cultivos abiertos en los que la microalga es expuesta a condiciones medioambientales y cultivos cerrados, generalmente denominados fotobiorreactores o biorreactores en los cuales la biomasa posee poco o ningún contacto con el medio externo (Figura 6) (22):

Sistemas abiertos: Son los sistemas de cultivo más comunes, compuestos por medios naturales como lagunas y estanques.

Sistemas cerrados: Estos sistemas permiten total control sobre los parámetros de cultivo, disminuyendo los diferentes problemas presentes en los sistemas cerrados.

Las principales ventajas que ofrece el uso de biorreactores es:

1. Facilidad para cultivar la biomasa.
2. Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
3. Mejor control de las condiciones de cultivo.
4. Menor inversión de capital en el biorreactor o fotobiorreactor.

Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microorganismos. Actualmente existen diversos tipos de biorreactores y fotobiorreactores disponibles, entre los cuales se encuentran las columnas de burbujeo, los reactores airlift y los tanques agitados, así como los de tipo tubular y cónico. Los biorreactores y fotobiorreactores son generalmente categorizados de acuerdo a su estructura y su producción de biomasa, de los cuales los tubulares, los de superficie plana (flat panel) y las columnas verticales son los más comunes. Los biorreactores o fotobiorreactores de tipo tubular son el diseño más sustentable para cultivos en sistemas cerrados, tienen un área de iluminación con una buena tasa de producción de biomasa (23).

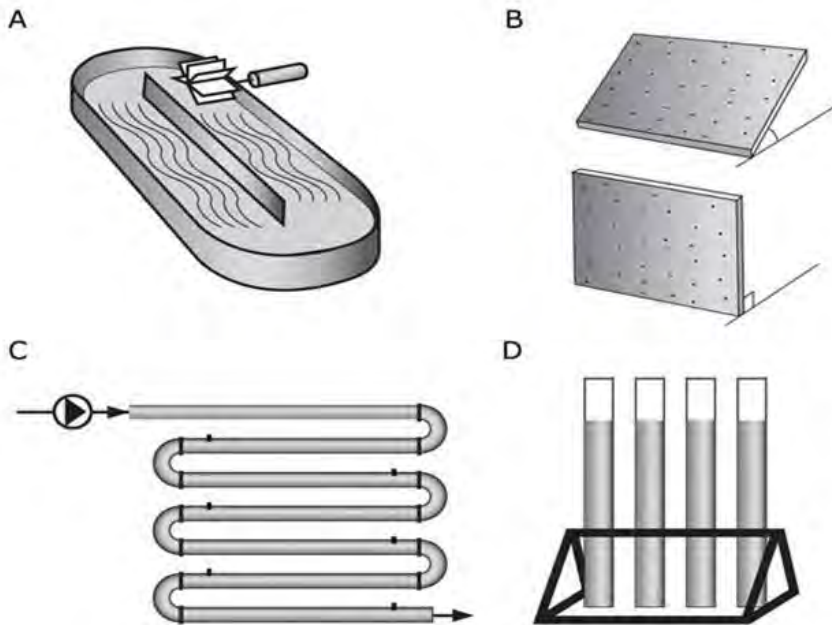


Figura 6. Diseños de sistemas de cultivo. A sistemas abiertos. B C Y D sistemas cerrados (23)

Los aspectos claves en el diseño son:

Distribución de la luz

Mezclado

Inyección de gas

Tener en cuenta recomendaciones como la trayectoria de la luz, la cual debe ser pequeña (no mayor a 2.5 cm), mantener una alta densidad celular (> 8 a 15 gramos de biomasa por litro de cultivo, un mezclado vigoroso para asegurar ciclos L/O de alta frecuencia, evitar inhibición del crecimiento por acumulación de O_2 , mantener temperatura y pH óptimos. (24)

Fotobiorreactores

Son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas (25), estos son biorreactores combinados con algún tipo de luz y están compuestos por varios

subsistemas como fuente de luz, sistema de manejo de aire, sistemas de filtración, sistemas eléctricos y sistemas de instrumentación. (24)

Los fotobiorreactores poseen dos tipos de diseños diferentes, fotobiorreactores abiertos, en los cuales el cultivo se encuentra en contacto con la atmosfera, al estar expuestos al medioambiente son susceptibles a la invasión de otros microorganismos por lo que este tipo de biorreactores es útil para el cultivo de microalgas robustas y de rápido crecimiento. Por otro lado, existen fotobiorreactores cerrados, estos mantienen el cultivo totalmente aislado del exterior, generalmente están equipados con sistemas de agitación, aireación, control de pH, adición de medio y CO_2 . (24)

Fotobiorreactores de columna

Fotobiorreactores cerrados que consisten en una sola columna de burbujeo de material transparente, con diferentes diámetros y alturas, estos son dispositivos sencillos ya que el burbujeo proporciona la mezcla del cultivo, proporción de CO_2 la eliminación de O_2 , (Figura 7). (26)

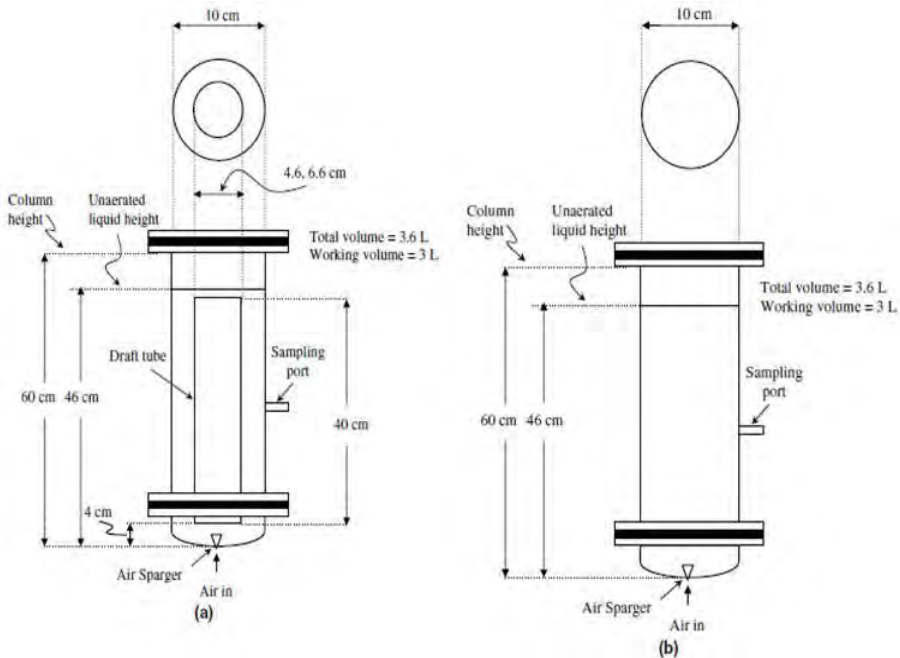


Figura 7. (a) Biorreactor airlift (b) biorreactor de Columna. (26)

Fotobiorreactores planos

Los reactores planos son similares a las columnas en su fundamento, estos incluyen agitación e intercambio de materia en el mismo espacio en el que se capta la luz, pero intentan resolver algunos de los problemas de las columnas como el paso óptico que se puede hacer tan delgado como se quiera. (26)

Fotobiorreactores tubulares

Son los más sofisticados y los más especializados, pero son también los más caros de construir. El diseño distingue dos partes: lazo y desgasificador:

Lazo: Parte en la que se lleva a cabo la captación de la energía solar.

Desgasificador: Parte en el que se lleva a cabo el intercambio de materia y temperatura. (26)

Biorreactor

Sistema básico de investigación para el cultivo de bacterias y hongos, para el cultivo de células animales o vegetales es necesario ajustar algunos parámetros, este es capaz de operar con vasos de 1, 2, 5, o 10 litros.

El biorreactor a utilizar tiene un vaso transparente de borosilicato tipo tanque de agitación, con capacidad total de 5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 3 litros, (Figura 8). El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm, sin embargo, se recomienda operarlo entre 50 y 300 rpm. El rango de temperatura usual es entre 0 y 80 grados. El equipo utiliza un sensor para pH, el cual se controla con soluciones buffer en un rango entre 0 y 14. También tiene un sensor antiespuma y un sensor para controlar el oxígeno disuelto. Este sistema puede operar en forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno. (27)

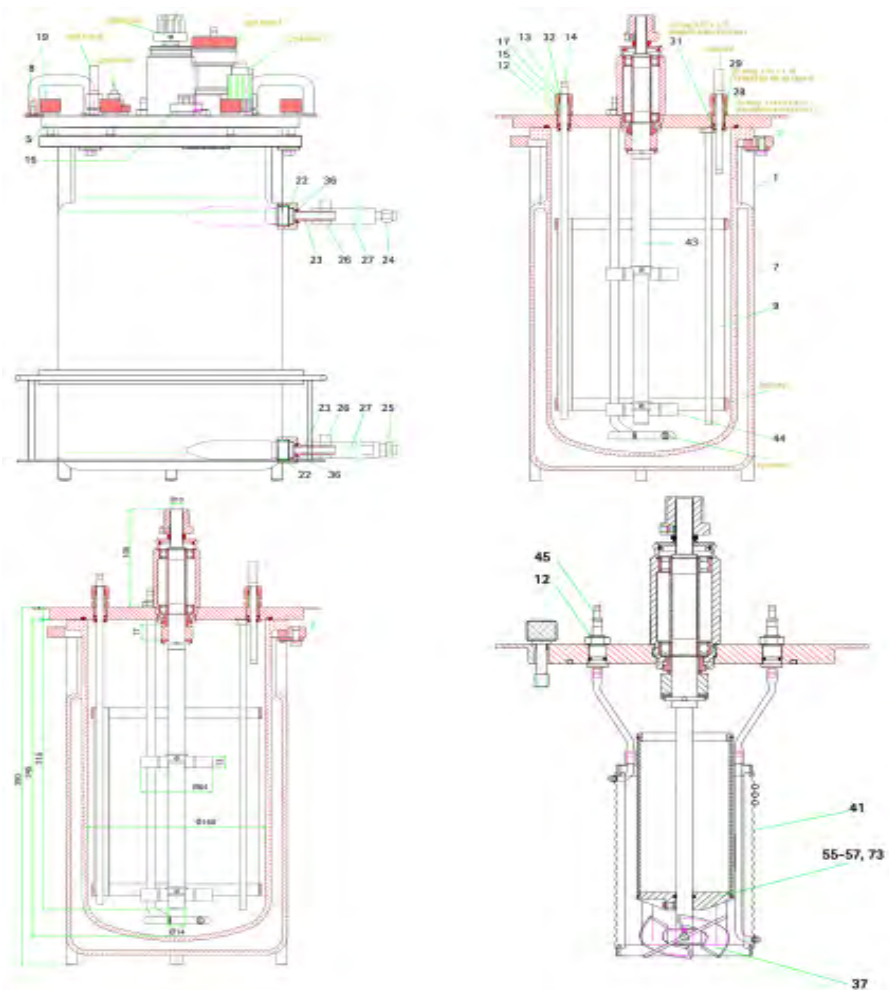


Figura 8. Equipo Biorreactor 5 L. Diseño, chaqueta, dimensiones y equipamiento. (27)

El biorreactor en el que se realiza el cultivo consta de un vaso de vidrio transparente con una chaqueta para calentamiento, así mismo consta de una tapa. (27) (28)

Proceso de escalamiento

Microorganismo

Haematococcus pluvialis UTEX2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA).

Mantenimiento de la cepa: medio sólido ó líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), a baja irradiancia, temperatura ambiente (15 – 20°C), se replica mensualmente o cada seis meses.

Activación de la cepa: en medio líquido Volvox-MES, a baja irradiancia y temperatura ambiente.

Monitoreo de las células del *H. pluvialis* durante el cultivo

Para control de calidad, ver pureza de la cepa y del cultivo, se tendrá en cuenta que se trabajará con una cepa de referencia de la UTEX, la cual se encuentra caracterizada previamente. Para ver pureza de la cepa y del cultivo se monitoreara utilizando un microscopio para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células y con un Cell Counter se determina el promedio de número de células y tamaño celular. Además se realizará control del pH.

Preparación del Inoculo

Para preparar el inoculo se tomará una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX y se transferirá asépticamente a un erlenmeyer de 500 ml que contiene 200 ml de medio Volvox-MES fresco y estéril bajo continua iluminación, aire filtrado, agitación continua a 25°C por 4 días. Para todos los experimentos un cultivo de 4 días es usado como el inoculo (en la fase exponencial de crecimiento).

Para establecer la cantidad de inoculo a utilizar se debe hacer un conteo celular y con esta información proceder a realizar los cálculos necesarios para saber el volumen a adicionar del inoculo a los reactores pequeños en sistema batch.

MEDIO VOLVOX-MES (UTEX)	
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	11,8 g/100 ml H ₂ O
MgSO ₄ .7H ₂ O	4 g/100 ml
Na ₂ glicerofosfato.5H ₂ O	0,05 g/L
KCl	0,05g/L
MES	1,95 g/L
PIV METAL SLN.	6 ml/L
NH ₄ Cl	0,026 G/l
Vitamina B12	1mL/L H ₂ O
HEPES buffer	
BIOTINA	1 mL/L
pH 6,7	

Fuente: 29

Sistema de cultivo

Realización de cultivo de *H. pluvialis* en el biorreactor a escala de laboratorio de 5 litros en sistema batch en el medio RM, BBM, KM y OHM (Figura 9 y Figura 21).

Condiciones de cultivo

Condiciones estándar: pH 6,8, ciclo luz/oscuridad 20h: 4h, temperatura 25°C, agitación continua 100 rpm, aire filtrado 1,7 L/minuto, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), 65 y 75 luxes. El proceso se desarrolló bajo condiciones normales del medio y ciclo luz/oscuridad 18h: 6h y condiciones de estrés: deficiencia de concentración de Nitrógeno y ciclo luz/oscuridad 20h: 4h. Panel de luces LED multicolor hasta 210 luxes y lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y 75 luxes, total 285 luxes.

Los medios RM, BBM, OHM y KM estériles con el pH ajustado se adicionan al biorreactor Tecferm y Marca Sartorius hasta un volumen de 3 Litros, ver Figura 9 y 21.

Se procede a adicionar el inoculo en 10% de la microalga (1×10^4 Células./mL).

Se realiza el montaje bajo las condiciones establecidas.

Toma de muestra cada tercer día en forma aséptica.

Conservación de las muestras en solución formosalina (1:9), en una proporción 1:1, se toman 500 µl y se realiza control del cultivo (conteo celular y morfología) y el resto de muestra se utiliza para medición de pH.

Se lleva control de temperatura, pH, agitación, CO₂ en aire, ciclo luz/oscuridad, medios.

Tiempo del estudio 20 – 30 días

Generación de las curvas de crecimiento

Se construyeron curvas de crecimiento a partir de al menos tres ensayos independientes. Se tomará una muestra cada tercer día para la determinación del número de células por ml por microscopia y con el equipo Cell Counter. El conteo celular se realiza en cámara de Neubauer.

Determinación de la producción de clorofila y astaxantina

Toma de muestras y conservación:

Las muestras se dividen de acuerdo a su color: verde, verde-café, café-rojo o rojo. Se tomaron la muestra en forma aséptica y se realiza la extracción con el solvente seleccionado metanol 90% cuando las células empiezan a verse incoloras y el extracto ya no presenta absorbancia. Las muestras se mantienen después de la extracción a 4 °C por 20 minutos, en la oscuridad.

Determinación de la producción de clorofila y astaxantina

Se determinó la concentración del pigmento por (1) La clorofila a se determina usando el procedimiento de la APHA, 1992. Se toman 5mL de muestra, se centrifuga y se lava a 12,000 r.p.m. durante 5 min Posteriormente al paquete celular se le agrega 5 mL de metanol al 90% y se calienta durante 10 min a 60°C. Se centrifuga y se lee la absorbancia a 665 nm y 750 nm en un espectrofotómetro.

Cálculo de la concentración de clorofila

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

Donde: U = volumen del metanol

V = volumen de la muestra

Los valores de clorofila son expresados con desviaciones estándar para tres determinaciones independientes.

Estándar de referencia (control): clorofila comercial

Manejo de las fracciones en la oscuridad. (8)

Determinación de la producción de astaxantina

Por (1) técnica colorimétrica se determina usando el procedimiento de la APHA, 1992. Se toman 5mL de muestra, se centrifuga y se lava a 12,000 r.p.m. durante 5 min Posteriormente al paquete celular se le agrega 5 mL de metanol al 90% y se calienta durante 10 min a 60°C. Se centrifuga y se lee la absorbancia a 474 nm en un espectrofotómetro.

Estándar de referencia: astaxantina comercial

Manejo de las fracciones en la oscuridad. (8)

Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmentos

Mediante el ajuste de modelos adecuados se determinarán los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmento.

Determinación de los cambios morfológicos celulares

Los cambios de morfología durante las diferentes fases de crecimiento de *H. pluvialis* se documentaron por microfotografía y análisis de imagen.

Diseño experimental y análisis de datos

Cada experimento se repitió tres veces con al menos tres replicas. Todas las observaciones y cálculos se harán separadamente para cada set de experimentos y se expresaron en promedio de 6SD. La significancia ($P < 0.05$) de las variables estudiadas se medirá por un análisis de varianza (ANOVA) y test de Kruskal-Wallis $p < 0.05$.

Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en el BIORREACTOR TECFERM de 5L.

Se utilizó el biorreactor Tecferm de 5 L, sistema básico de investigación para el cultivo de bacterias y hongos. Este biorreactor cuando se utiliza para el cultivo de células animales o vegetales se debe ajustar algunos parámetros. Opera con

contenidos de 2, 5, 10 o 20 litros. Consta con un reactor tipo tanque de agitación, con capacidad total de 5 L ó de 7.5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 3 litros y de 5 litros, respectivamente. El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm, sin embargo, se recomienda operarlo entre 50 y 300 rpm (Figura 9). (29)

El rango de temperatura usual es entre 30 y 40°C, el pH puede ser controlado automáticamente en un rango entre 0 y 14. Este sistema puede operar en forma aerobia con suministro de aire o en forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno. El biorreactor en el que se realiza el cultivo consta de un vaso de acero inoxidable con mirilla lateral, empaque y aro de cierre, así mismo consta de una tapa (tipo head plate). (30)

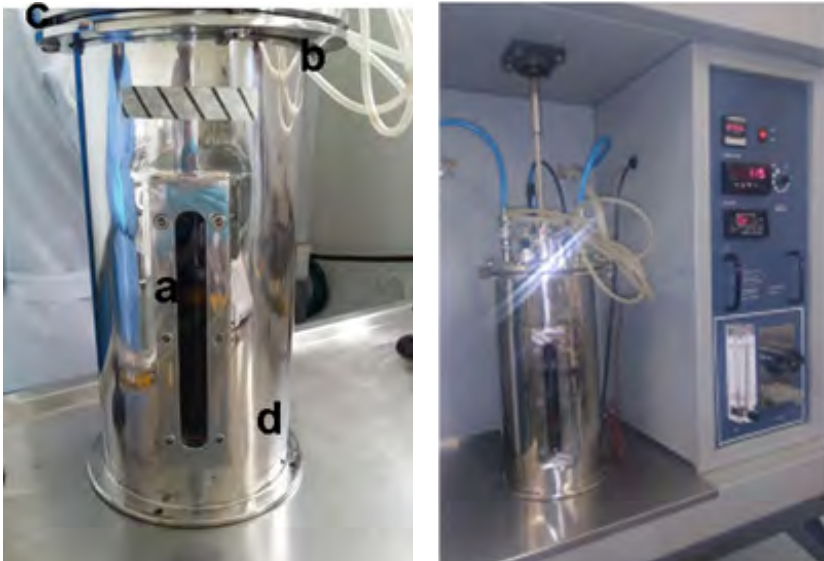


Figura 9. Biorreactor Tecferm de 5 L donde se observa a. mirilla lateral, b. Aro de cierre, c. tapa tipo head plate y d. vaso inoxidable. Foto: Leiton, 2018 (29)

El trabajo "Producción de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM (29), cuyo objetivo general fue determinar las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biomasa adecuados en cantidad y calidad de la microalga en este biorreactor estableció como condiciones de trabajo temperatura 20°C ± 1°C, fotoperiodo de 18:6 luz: oscuridad, luz blanca con lámparas (Marca: Phillips Máster TL5 HO de 54W/827), agitación 180 rpm, aire filtrado y pH entre 6.8- 7.1 por un periodo de 21 días. Se determinó

concentración celular, peso seco, contenido de clorofila, nitratos y fosfatos. Se realizó un análisis de costos y un ANOVA (95%) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

El medio de cultivo con mayor crecimiento fue RM con una concentración celular de 1.25×10^5 cel. /mL en comparación con el medio BBM (Figura 10). Se presentaron diferencias significativas para el contenido de fosfatos ($P < 0.05$), mientras que, para las variables de crecimiento celular, contenido de clorofila y nitratos en los dos medios ensayados no se presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$). Se determinó que en el biorreactor Tecferm 5L se obtuvo un buen crecimiento de *H. pluvialis* en especial con el medio RM en donde se encontró una velocidad de crecimiento de 0.040 cél/hora y las células se mantuvieron en estado vegetativo. Además, el análisis de costos determinó que este medio tiene un costo menor.

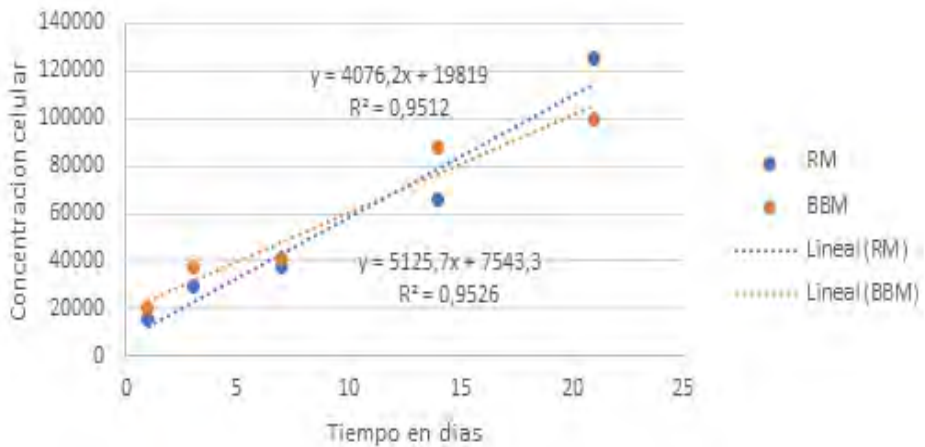


Figura 10. Curva de crecimiento *H. pluvialis* Medio RM y BBM.

Fuente: Leiton, 2018 (29)

En la tabla 2 se encuentra el registro fotográfico del cambio morfológico de la microalga durante el período de crecimiento en los diferentes medios correlacionados con el crecimiento celular en células/mL.







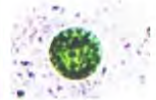

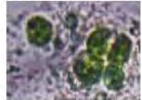

MEDIO	Crecimiento celular (Cel./mL)				
	1	3	7	14	21
RM	1.6×10^4	2.9×10^4	3.7×10^4	6.6×10^4	1.25×10^5
					
BBM	2.0×10^4	3.7×10^4	4.1×10^4	8.7×10^4	1.0×10^5
					

Tabla 2. Crecimiento celular de *H. pluvialis* y morfología en medio RM y BBM. Tamaño 40X. Fuente: Leiton, 2018 (29)

A continuación, se presenta el resumen de los parámetros de crecimiento celular, concentración de nitratos, fosfatos, clorofila, velocidad de crecimiento y costos de los tratamientos realizados con el medio RM y BBM para evaluar los tratamientos realizados (Tabla 3).

Parámetros	RM	BBM	ANOVA
Densidad celular (Cel./mL)	1.25X10 ⁵	1.0X10 ⁵	0.910
Fosfatos (mg/mL)	2.52 (56%)	1.20 (42%)	0.007
Nitratos (mg/mL)	9.28 (90%)	1.48 (88%)	0.230
Clorofila (µg/mL)	3.98	3.39	0.360
Crecimiento máximo (Cel./mL)	5.096	5	0.910
Velocidad de crecimiento (Cel./hora)	4,57	4,19	0.950
Análisis de costos	\$32.998/L	\$42.488/L	0.450

ANOVA (95%). Diferencias significativas entre tratamientos $p < 0.05$. Fuente: Leiton, 2018

Tabla 3. Parámetros trabajados durante el estudio.

Teniendo en cuenta los parámetros utilizados para el monitoreo de los cultivos se observa que el medio RM es mejor para el cultivo de esta microalga bajo las condiciones establecidas y utilizadas porque se obtuvo más crecimiento celular, más clorofila, la mayor velocidad de crecimiento en células por día y el mayor consumo de nitratos con un 90% y fosfatos con un consumo del 56%, presentándose diferencias significativas estadísticamente frente a este parámetro ($P=0,007$). (29)

Cultivo de la microalga *H. pluvialis* y producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando el BIORREACTOR TECFERM DE 5 L

Los recipientes de este tipo son diseñados para llevar a cabo procesos en los cuales el material de estudio requiera condiciones de desarrollo y producción adecuados, el tamaño de este sistema puede variar entre 5L, 10L, 20L, 100L, y 200L de volumen, tiene aplicaciones microbianas o de cultivo celular, el volumen mínimo de trabajo es de 2 litros para lo cual se deben ajustar la altura de las aspas y el electrodo de pH. Cuenta con condiciones que se pueden controlar tales

como la agitación dada en rpm que van desde 0 a 800 esto ayuda a mantener homogéneo el medio y destruir formas no requeridas dentro del cultivo, la escala de temperatura puede regularse automáticamente de acuerdo a un termómetro incluido dentro del equipo, el pH puede ser controlado en un rango entre 0 y 14, algunos sistemas cuentan con la capacidad de trabajar de forma anaerobia con suministro de gases con CO₂ o nitrógeno incluso con suministro de aire filtrado (30). (Figura 11)



Figura 11. Fermentador Tecferm 5 litros. Fuente: Ángela Hernández, 2019. (31)

El biorreactor en el que se realiza el cultivo consta de un vaso de acero inoxidable (A) con mirilla lateral(B), empaque y aro de cierre(C), así mismo consta de una tapa (tipo head plate) y mangueras adaptadas a válvulas de muestreo(D) (30).

El Biorreactor consta de un vaso en acero inoxidable con mirilla lateral, empaque y aro de cierre y cuenta con una tapa (tipo Head plate) con los siguientes servicios:

Puerto de inoculación, puertos de adición (medio, ácido, base), puertos auxiliares, puerto de toma de muestras, puerto de cosecha, puerto para el filtro de salida (venteo), puerto de electrodo de pH, puerto de electrodo de oxígeno.

Inyección de aire/ gases con filtro de ingreso termopozo
intercambiador de calor (con ingreso y salida)

4 deflectores, baffles o contracorrientes

Sistema de agitación con eje y 2 aspas tipo Rushton de 6 paletas. (30)

En el biorreactor Tecferm de 5 Litros se realizó también la producción de biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando los medios de cultivo OHM y Kobayashi. (31)

El *H.pluvialis* es una microalga ampliamente reconocida por ser una fuente natural de astaxantina con amplio uso en la industria, sin embargo cuenta con un ciclo complejo de crecimiento. Es por esto que se propone determinar cuáles son las condiciones óptimas de cultivo para obtener una producción adecuada en cantidad y calidad de biomasa de la microalga utilizando el biorreactor a escala de laboratorio Tecferm de 5 litros.

El cultivo fue llevado a cabo en los medios OHM y Kobayashi (KM) bajo las condiciones de fotoperiodo 18:6 Luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827), 65 Lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado y temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 21 días. Se realizó la determinación de biomasa, morfología, contenido de clorofila, astaxantina, fosfatos y nitratos. Se realizó un análisis de costos y se efectuó un análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

El mayor crecimiento de la microalga se presentó en el medio OHM con 1.23×10^6 Cel./mL y el contenido de clorofila fue $11.87 \mu\text{g/mL}$ observándose diferencias significativas en los parámetros analizados como pH y nitratos.

El consumo de nitratos en el medio OHM fue 75%. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P= 0.0436$ KW=14.46).

El consumo de fosfatos en el medio OHM fue 80%, el medio KM no contenía este nutriente, por lo cual es el más económico para la producción de la microalga.

El cultivo en el biorreactor Tecferm 5L utilizando el medio OHM y KM bajo las condiciones trabajadas permitió obtener una biomasa adecuada de *H. pluvialis* en calidad y cantidad.

Las condiciones de trabajo establecidas en este estudio se dieron según la revisión teórica realizada que apoyan la selección de condiciones adecuadas para hacer un cultivo de la microalga *H. pluvialis* en el biorreactor, a escala de laboratorio de 5L Tecferm, entre ellas están pH, temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica, color de luz, concentración de micro y macro nutrientes, agitación y velocidad de suministro de aire ó CO₂. La consulta incluyó trabajos donde se han usado biorreactores y fotobiorreactores.

En los estudios se encontró el uso de fotobiorreactores con volúmenes de 22 litros, 60 litros y biorreactores con un volumen mínimo de 200 ml, a partir de los cuales las condiciones seleccionadas fueron fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips máster TL5 HO de 54W/827) con irradiancia de 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura 20° C ± 2 por un periodo de 21 días de cultivo.

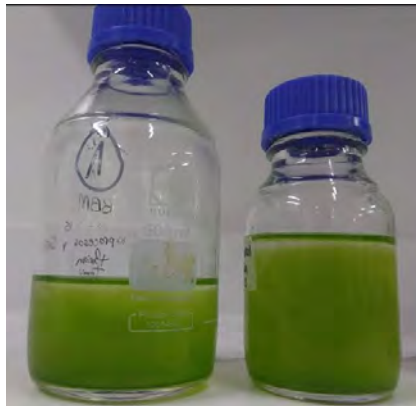


Figura 12. Inoculo de *H. pluvialis* UTEX en medio MES volvox estéril.

Foto: Ángela Hernández, 2019. (31)

El inoculo inicial es parte fundamental del estudio (Figura 12), es por esto que se evalúa su morfología y su densidad celular inicial como se muestra en la parte de metodología fase 1 para poder dar inicio al proceso en el biorreactor Tecferm 5L .



Figura 13. Biorreactor Tecferm 5L. Fuente: Ángela Hernández, 2019. (31)

El biorreactor Tecferm debe cumplir con estándares de inocuidad antes de iniciar su proceso de cultivo, es por esto que se esterilizó, incluyendo todas sus partes, para poder proceder a instalar el equipo.

Determinación de crecimiento celular y evaluación de la morfología durante el proceso.

Los datos obtenidos del crecimiento celular en los medios OHM y Kobayashi se encuentran en la tabla 4 y la figura 13. La densidad celular máxima fue de $1,23 \times 10^6$ Cel./mL y 1.0×10^5 Cel./mL en medio OHM y Kobayashi, respectivamente durante el tiempo empleado para el estudio. Se obtuvo un crecimiento celular mayor en el medio de cultivo OHM brindando una diferencia de crecimiento de 1.13×10^6 Cel./mL como queda evidenciado en la figura 13 la cual indica el comportamiento que se logró durante toda la fase experimental en los medios utilizados.

Con respecto a la morfología obtenida en el proceso del cultivo de la microalga presentó diversas formas entre las cuales podemos destacar células flageladas y células palmeloides. En el cultivo realizado en el medio Kobayashi se encontró una baja población de células enquistadas (Tabla 4). La fase exponencial de crecimiento de la microalga se ve reflejada entre los días 7 a 14 que es donde

logra aprovechar al máximo los nutrientes disponibles en el medio luego de esto experimenta una desaceleración del crecimiento al cabo del día 15 de cultivo para el medio OHM en cambio para el medio Kobayashi este descenso en el crecimiento no es tan drástico y mantiene relación con la lectura del día 14 y 21, esto podemos correlacionarlo con la figura 13 que nos muestra el comportamiento de *H. pluvialis* a lo largo del estudio.

Las condiciones del cultivo celular fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips máster TL5 HO de 54W/827) con irradiancia de 60 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura 20° C ± 2 demuestran ser las adecuadas de acuerdo a los resultados obtenidos durante el crecimiento de *H. pluvialis*.

Como se había mencionado previamente en el medio OHM se incrementó el crecimiento en un 0.30% log con respecto al medio Kobayashi, lo que hace que el medio OHM sea adecuado en torno al crecimiento de la microalga. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ no muestra diferencias significativas para los tratamientos realizados. (31)


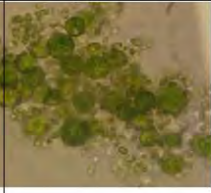
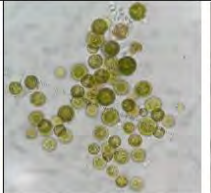
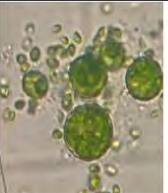


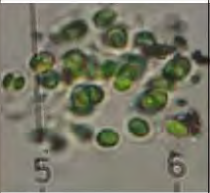

CRECIMIENTO CELULAR				
DÍAS	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21
Crecimiento	5.9 x10 ⁴ Cel./mL	9.4 x10 ⁵ Cel./mL	1.23 x10 ⁶ Cel./mL	7.3x10 ⁵ Cel./mL
MEDIO OHM				
	5.6 x10 ⁴ Cel./mL	7.5 x10 ⁴ Cel./mL	1.0 x10 ⁵ Cel./mL	9.5 x10 ⁴ Cel./mL
MEDIO KOBAYASHI				

Tabla 4. Morfología en medio OHM y Kobayashi *H. pluvialis*. Tamaño 40X.

Elaboración del autor, 2019 (31)

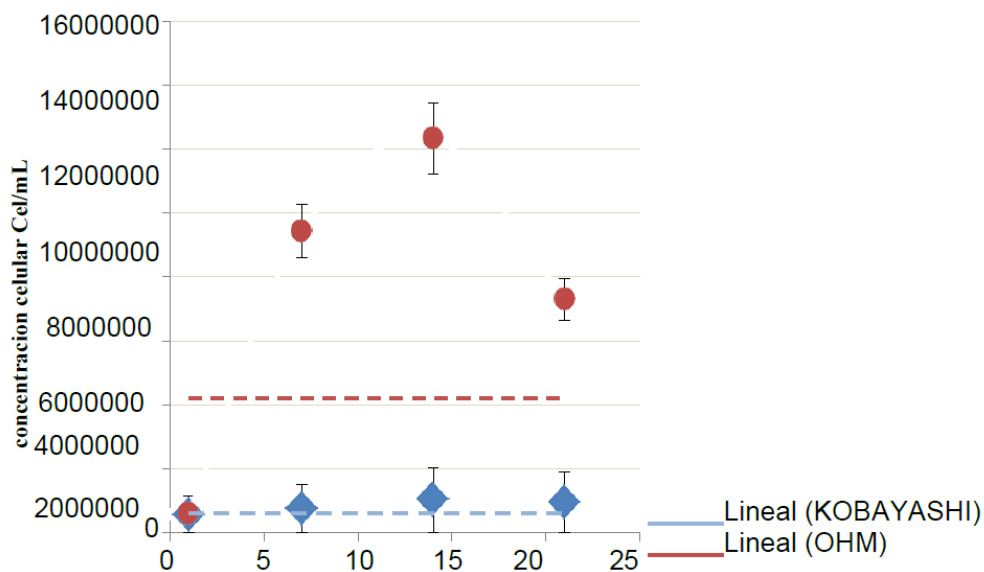


Figura 13. Crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis* en medios OHM y Kobayashi. Elaborado por el autor, 2019. (31)

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores en el eje y, de los cuales se calculó en logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. El medio de cultivo con mayor velocidad específica de crecimiento fue el Kobayashi con una velocidad específica de crecimiento de 3,71 Cel. /hora (Tabla 5). (31)

Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
OHM	4	5.774	6.863	2,24 Cel./hora	47%
Kobayashi	4	5.752	5.977	3,71 Cel./hora	78%

Tabla 5. Matriz de coeficientes del modelo de crecimiento logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo. Elaborado por el autor, 2019. (31)

Determinación de parámetros para la selección del medio de cultivo

DETERMINACIÓN DE pH

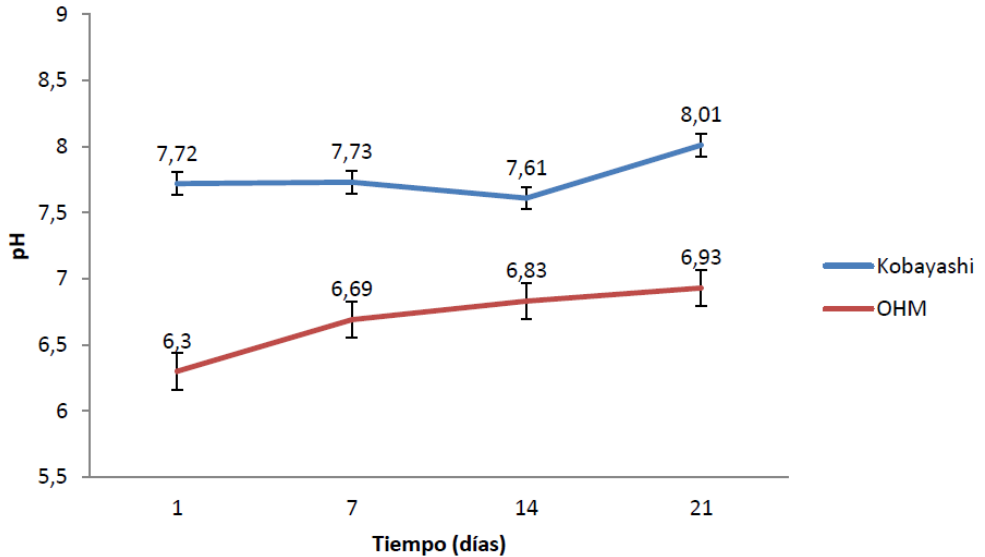


Figura 14. pH de los cultivos de la microalga *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2019.(31)

El pH general del estudio nos indica que durante el tiempo del ensayo fue posible controlar condiciones esenciales para la microalga como lo es este parámetro (Figura 14), las condiciones de trabajo en el biorreactor Tecferm 5L fueron las adecuadas y no se presentó contaminación; esto se confirmó por medio del conteo celular en cámara de Neubauer la cual permitía la visualización del estado microbiológico del cultivo. Según la literatura a pH superior de 7.0 ocurre sedimentación y lisis celular lo que sugiere que al manejar un rango superior a ese puede ser letal para la microalga y limita su desarrollo en el medio. En el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) se establece que hay diferencias significativas entre los tratamientos con $P = 0.0044$.(31)

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

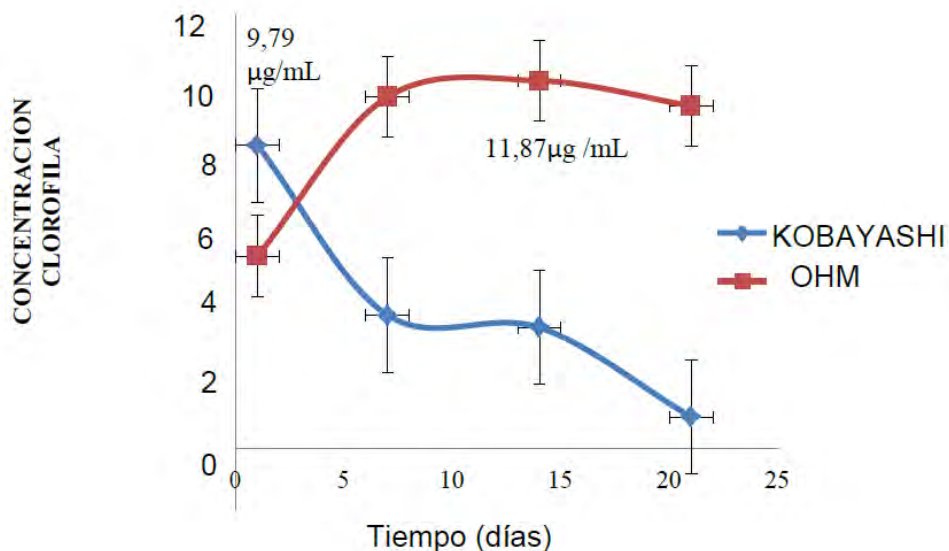


Figura 15. Clorofila obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2019. (31)

En el cultivo de *H. pluvialis* en medio OHM la clorofila final obtenida el día 21 fue de $11.87 \mu\text{g}/\text{mL}$ y en el medio de cultivo Kobayashi fue de $9.79 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 15). Según los datos que se obtuvieron se observó una mayor concentración de clorofila en un 21% frente a la concentración obtenida en el medio Kobayashi. Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos $P= 0.2404$. Correlacionando con las figura 15 que muestra la concentración de la clorofila durante los 21 días de cultivo, mostrando que para el medio Kobayashi el contenido de clorofila fue menor en un 17 %, lo cual se correlaciona con el porcentaje relacionado con el crecimiento celular; donde en este medio se obtuvo un valor menor de $1.0 \times 10^5 \text{ Cel. /mL}$ (ver figura No 13). (31)

DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA ($\mu\text{g/mL}$)

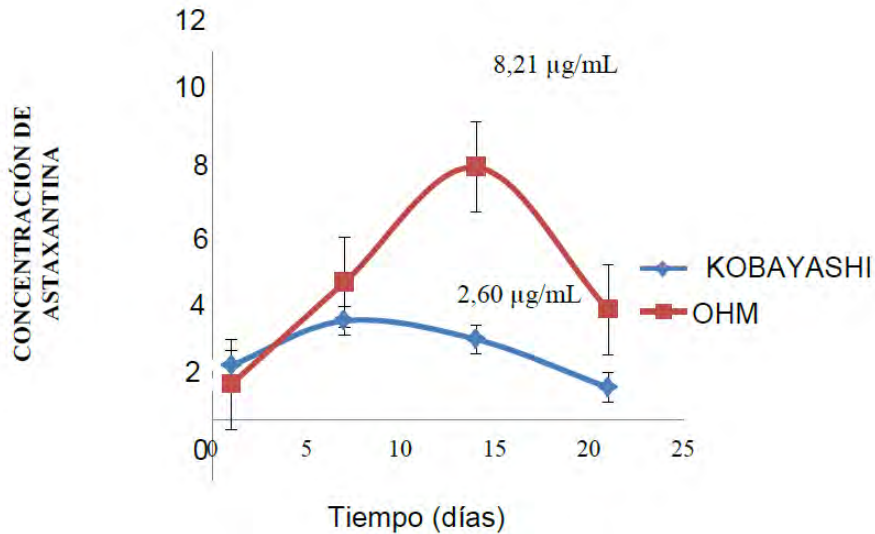


Figura 16. Astaxantina obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2019. (31)

Los resultados obtenidos en el estudio se encuentran evidenciados en la figura 16 la cual nos indica la producción de astaxantina en cada uno de los medios utilizados, para el medio de cultivo OHM se registró la mayor producción del pigmento de $8.21 \mu\text{g/mL}$ y para el medio Kobayashi de $3.20 \mu\text{g/mL}$. Según los datos obtenidos luego de la fase de cultivo se observó una mayor concentración de astaxantina de 61% en el medio OHM en comparación con el otro tratamiento.

Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos para la producción de astaxantina $P = 0.3929$; en los medios de cultivo empleados en este estudio, lo que se muestra en la figura 16 que muestra el comportamiento de la astaxantina durante los 21 días de cultivo, mostrando que para el medio OHM al cabo del día 15 se alcanzó un pico en la producción de astaxantina llegando a $8.21 \mu\text{g/mL}$ en comparación con el medio Kobayashi donde para ese día alcanzó una producción de $2.60 \mu\text{g/mL}$ (Figura 16).

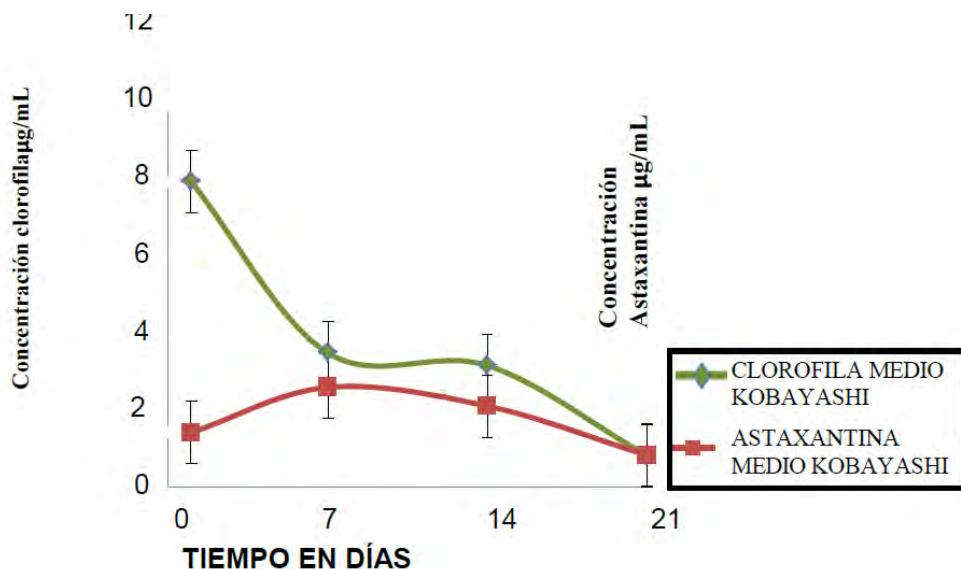


Figura 17. Concentración Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio Kobayashi. Elaboración del autor, 2019. (31)

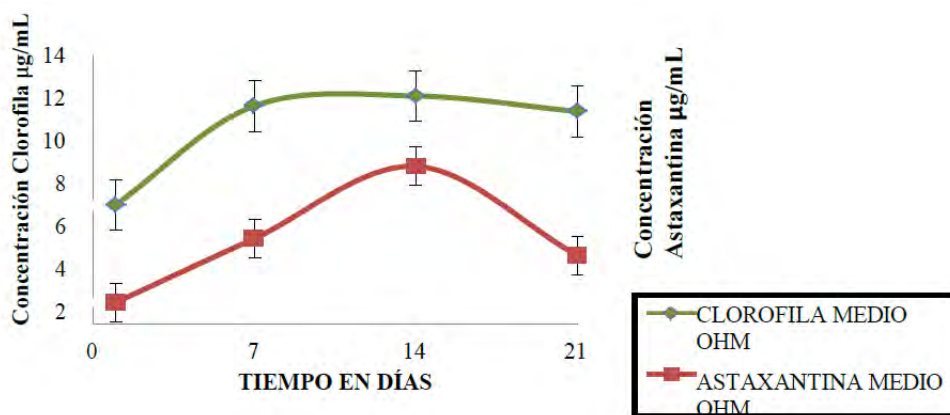


Figura 18. Concentración Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio OHM. Elaboración del autor, 2019. (31)

Cabe resaltar que para el medio Kobayashi durante la fase final del cultivo se presentaron condiciones del medio que indujeron a estrés a la microalga iniciando así su proceso en enquistamiento (aplanospora roja) que la protege del estrés oxidativo (98) producido en el medio, como se logra ver en la tabla 4 para el día 21, mostrando la tonalidad roja característica de este estado.

Al analizar la relación clorofila - astaxantina en los medios utilizados podemos observar que la producción del pigmento y la cantidad de clorofila son inversamente proporcionales como se puede evidenciar en la figura 17, observándose que a medida que aumenta la concentración de astaxantina disminuye la concentración de clorofila, esto quiere decir que se da una relación inversa como se observa en el cultivo realizado en el medio Kobayashi. Esta relación se da gracias a la respuesta fisiológica de la microalga como adaptación al estrés aplicado por el medio de cultivo generando así fotoprotección por medio del enquistamiento mudando a la fase roja de la célula.

En el caso de la figura 18 donde se observa un comportamiento diferente en la clorofila debido a que tiene una relación proporcional con la astaxantina se puede decir que pudo deberse a que la tasa de crecimiento en el medio OHM fue más alta ($1,23 \times 10^6$ Cel./mL) y que no ha terminado su fase exponencial de crecimiento y a medida que la microalga aumentaba su número de células vegetativas se incrementaba la concentración de clorofila, con respecto a la astaxantina pudo verse influenciado su aumento debido a la constante renovación de las células y su posterior estrés con algunas de las condiciones brindadas por el medio, como pudo ser la concentración de nitratos, la cual a medida que va siendo consumida por la microalga en el medio; aumenta la cantidad de astaxantina en *H. pluvialis*.
(31)

DETERMINACIÓN DE NITRATOS

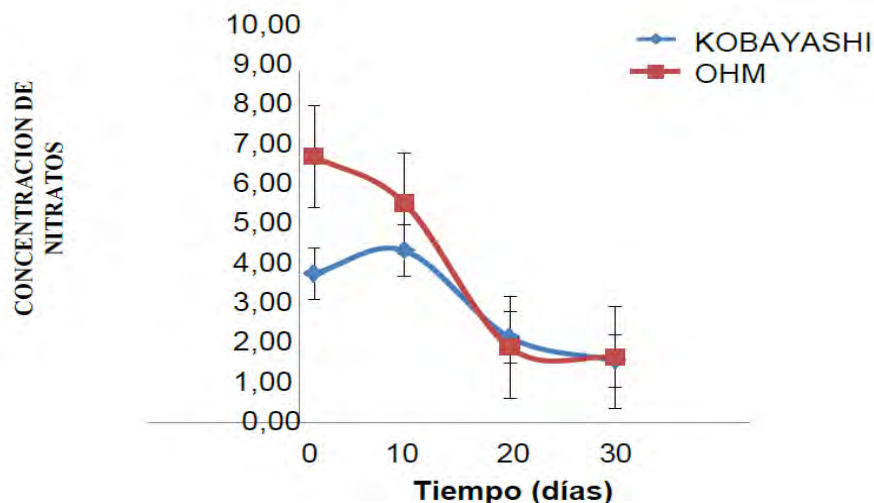


Figura 19. Concentración de nitratos durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios OHM y Kobayashi. Elaborada por el autor, 2019. (31)

El medio OHM presenta una concentración inicial de NaNO_3 de 7.57 mg/mL la cual al finalizar el tiempo de estudio terminó con un valor de 1.86 mg/mL en su concentración, si analizamos el consumo que se produjo tuvo un porcentaje de 75%, el medio Kobayashi tuvo una concentración inicial de 4.24 mg/mL y su concentración final de 1.76 mg/mL, la diferencia en su consumo tiene un porcentaje de 58% (Figura 19). El consumo de nitrato de sodio en el medio OHM se correlaciona con la tasa de crecimiento que presentó la microalga como lo evidencia la figura 13 dado que a mayor consumo de nitratos mayor es la tasa de división celular presentada en el medio teniendo en cuenta su velocidad de crecimiento que tuvo un valor de 2.24 Cel. /hora (Tabla 4).

Según el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) se presentaron diferencias significativas en los tratamientos $P = 0.0436$; Indicando que en ambos cultivos la microalga utiliza el NaNO_3 como nutriente para el crecimiento, siendo en el medio OHM en el cual la microalga tiene mayor capacidad de usar el nutriente hasta un 75% en los 21 días de estudio. En la figura 19 se encuentran consignados los datos obtenidos durante el cultivo de la microalga en cada tratamiento utilizado. (31)

DETERMINACIÓN DE FOSFATOS



Figura 20. Concentración de fosfatos durante el cultivo de *H. pluvialis* en el medio OHM. Elaborado por el autor, 2019. (31)

En la figura 20 se observa el consumo de fosfato de potasio (KH_2PO_4) para el medio OHM ya que era el único medio que presentaba este componente, la concentración inicial fue de 7.92 mg/mL y su concentración final fue de 1.57 mg/mL presentando una disminución del sustrato del 80%. No se lleva a cabo el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) ya que no se realizó este ensayo para el otro medio debido a que en su composición no hay fosfatos.

Si realizamos un análisis entre el consumo de fosfatos y nitratos por parte de la microalga en su etapa de cultivo para el medio OHM podemos evidenciar que el porcentaje de consumo se encuentra estrechamente relacionados debido a que contaban con cantidades similares iniciales y finales lo que nos puede indicar que, en este medio es importante contar con las cantidades adecuadas de cada componente para asegurar que el desarrollo de la microalga va a ser el adecuado, lo cual se evidenció ya que estos dos nutrientes incrementan el crecimiento de esta microalga en un 30 % log frente al cultivo donde se usa medio Kobayashi que solo posee nitrato de sodio en una menor cantidad.

A continuación se presenta una tabla resumen (Tabla 6) de los parámetros determinados por los cultivos realizados en los medios OHM y Kobayashi para el *H. pluvialis* incluyendo los costos de preparación para un litro de medio.(31)

Medios	Kobayashi	OHM	Kruskal-Wallis (P < 0.05)
Densidad celular (Cel./mL)	1.0×10^5	1.23×10^6	
pH	7.7 a 8.0	6.3 a 6.9	P= 0.0044 KW=20.59
Consumo de fosfatos %	<i>No incluye el medio</i>	80%	-
Consumo de nitratos %	58%	75%	P= 0.0436 KW=14.46
Clorofila (µg/ml)	9.79	11.87	P= 0.2404 KW=9.173
Astaxantina mayor producción de pigmento (ug/ml)	3.20	8.21	P= 0.3929 KW=6.277
Crecimiento máximo (Cel./mL)	5.977	6.863	-
Velocidad de crecimiento Cel./hora	3,71	2.24	-
Análisis de costos	1.596 pesos	11.357 pesos	-

Análisis estadístico Kruskal-Wallis. Diferencias significativas entre tratamientos $P < 0.05$ (31)

Tabla 6. Parámetros trabajados durante el cultivo, elaborada por el autor, 2019.
(31)

Al comparar los resultados se puede observar que el medio para continuar el proceso de cultivo de la microalga y la obtención de productos como la astaxantina y clorofila utilizando el biorreactor Tecferm 5L es el medio OHM; por tener la

mayor obtención de pigmentos, astaxantina y carotenoides como la clorofila; así como costos de producción no tan altos a pesar de utilizar vitaminas. (31)

Cultivo de la microalga *H. pluvialis* en el BIORREACTOR BIOSTAT® A PLUS y producción de astaxantina

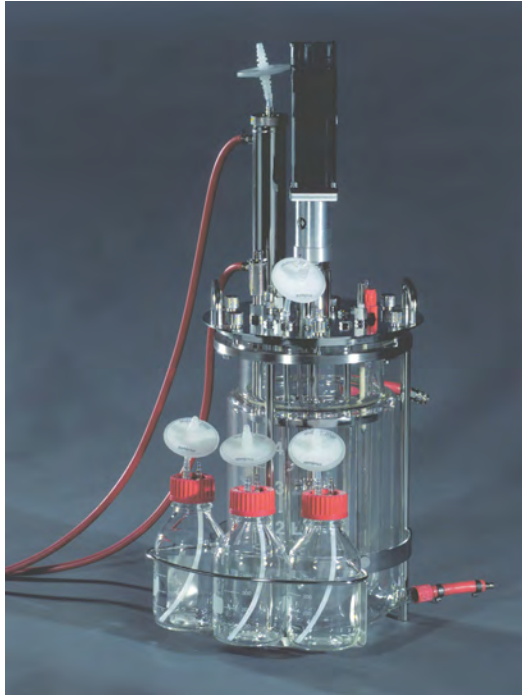


Figura 21. Biorreactor Sartorius Stedim System GmbH (27).

El biorreactor BIOSTAT A PLUS presenta las siguientes características:

Vasos de vidrio de pared doble con compartimento medio interno con sección inferior cóncava y cubierta exterior con conectores para ciclo de termostato o recipientes de vidrio de pared simple para calentar mediante el uso de una manta de calefacción eléctrica (Figura 21)

Tapa de acero inoxidable con asas, equipada con cierres ciegos para todos los puertos de la tapa Stand Soporte de acero inoxidable con bandeja extraíble para botellas de almacenamiento.

Materiales:

- piezas de vidrio de vidrio de borosilicato
- piezas de acero en contacto con medio de acero inoxidable 1
- Sellos, juntas tóricas hechas de EPDM (aprobadas por la FDA))

2 filtros de membrana para aireación y escape estériles

Tubo de cosecha, altura ajustable

Puerto de adición / inoculación con tabique

Puerto de adición de 4 vías (adaptador para conexión de hasta 4 suministros externos)

Refrigerador de escape

Electrodos / sensores: Sensor de temperatura Pt 100, Electrodo de pH, Electrodo pO₂, Sonda antiespumante, Sonda de nivel, Botellas de almacenamiento para agente ácido, alcalino y antiespumante de 250 ml o 500 ml.

Tubo de gasificación con burbujeador de anillo (recipientes MO) o microescurridor (recipientes CC). (27)

Se realizó la evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS en medios de cultivo RM y BBM. (33)

A partir de la cepa pura de referencia (UTEX 2505), se realizó el inóculo de la microalga en medio MES Volvox, con el fin de obtener una densidad celular de mínimo 1×10^4 Cel. /mL. En este cultivo, el inóculo permaneció 12 días con las siguientes condiciones: fotoperiodo luz-oscuridad de 18 horas luz y 6 oscuridad con lámparas fluorescentes de luz blanca marca Phillips de irradiancia 65 lux, temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, aire filtrado, pH 6.8 y agitación manual diaria durante 10 segundos. Se realizó la medición del crecimiento celular obteniendo a los 12 días del cultivo $2,38 \times 10^6$ Cel. /mL (Figura 22 y Figura 23)

Luego se procedió a tomar el inóculo en una proporción del 10% para el cultivo en los medios BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS. En el inóculo se observaron formas vegetativas biflageladas de color verde correspondientes a la morfología característica de la microalga *H. pluvialis* (Figura 24), también es importante resaltar que en ningún momento del experimento se llegó a observar contaminación de algún tipo (Tabla 8).

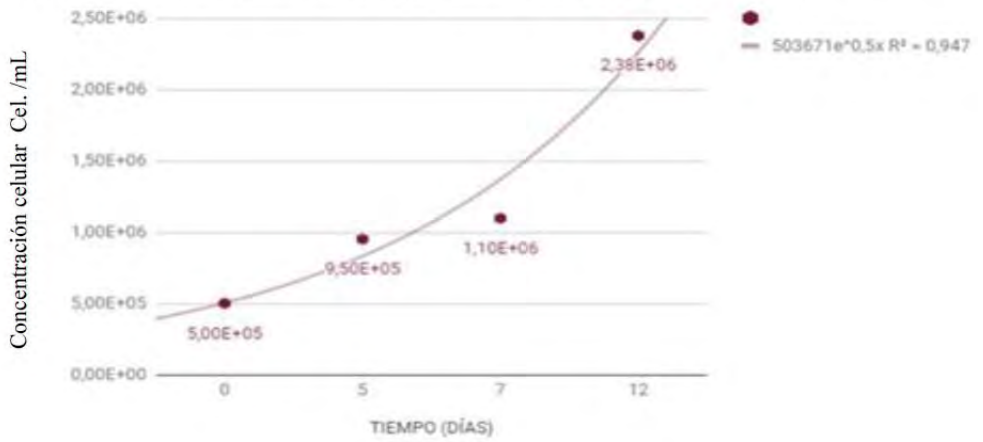


Figura 22. Crecimiento de *H. pluvialis* en medio MES Volvox. Elaborada por los autores, 2019. (33)



Figura 23. Inoculo de *H. pluvialis* en medio MES volvox. Tomada por los autores, 2019. (33)

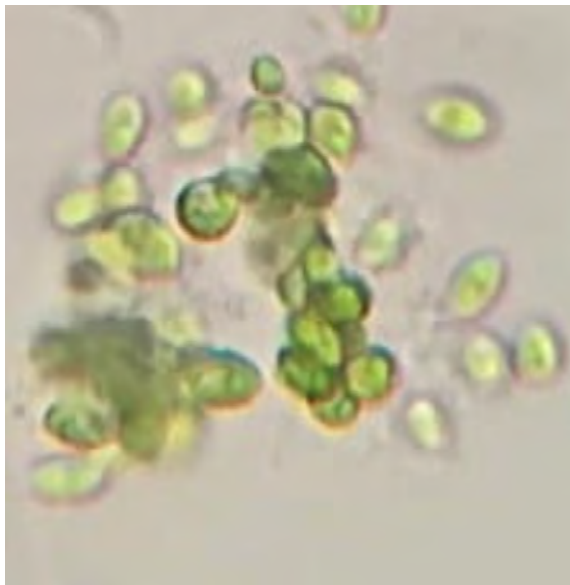


Figura 24 Formas vegetativas biflageladas de *H. pluvialis* en medio MES Volvox. Tomada por los autores, 2019. Tamaño 10X. (33)

Los cultivos realizados en los medios BBM y RM en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS se describen en la metodología; en ellos se pudo evidenciar un incremento en la biomasa de la microalga por el cambio colorimétrico producido en cada cultivo, donde inicialmente presentaba un tenue color verde y a medida que el cultivo transcurría, éste se intensificaba hasta llegar a una coloración verde oscura (Tabla 8). Lo anterior se confirmó con los conteos realizados en la cámara de Neubauer cuyos resultados arrojaron los datos que se pueden ver relacionados en los anexos 1 y 2. (33)

El crecimiento celular del cultivo realizado durante 36 días de *H. pluvialis* en los medios BBM y RM se observa en la figura 25.

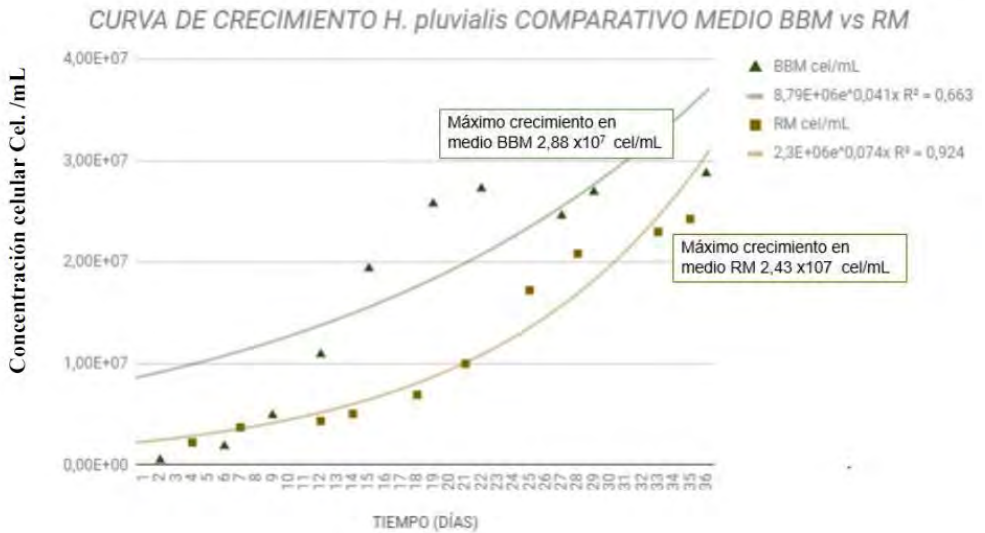


Figura 25. Crecimiento celular de *H. pluvialis* en los medios BBM vs. RM. Elaborada por los autores, 2019. (33)

Se evidenció que en el medio RM, se obtuvo un crecimiento microalgal de $2,43 \times 10^7$ Cel./mL a los 36 días del cultivo, mientras que en el medio BBM la población celular para el día 36 de cultivo fue de $2,88 \times 10^7$ Cel./mL, lo cual representa un aumento en la densidad celular de un 15,62 % en el medio BBM en comparación con el medio RM.(33)

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) del factor “crecimiento celular” (anexo 8), se estableció con un porcentaje de confianza del 95% que no existen diferencias significativas entre el uso del medio de cultivo BBM y el uso del medio de cultivo RM empleados en el experimento (F: 1,38; Valor p: 0,25; gl: 1). Esto nos indica que el uso de cualquiera de los dos medios de cultivo ya sea el BBM o el RM resulta muy efectivo para la producción de biomasa de *H. pluvialis* en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS y como característica importante se puede apreciar que el uso del biorreactor proporcionó una preservación de la morfología de la microalga durante todo el tiempo de cultivo resultando favorable en este estudio y no se presentó contaminación.(33)

pH

En relación a las mediciones de pH se debe tener en cuenta que los medios de cultivo BBM y RM inicialmente se ajustaron a un pH de 6,8 (día 0) pero como se puede apreciar en la figura 26 dichos niveles disminuyen a 5,6 y 5,4 respectivamente a los dos días de cultivo, lo cual equivale a un porcentaje de disminución inicial para el medio BBM de 16,4 % y para el medio RM de 19,4% esto debido probablemente a un consumo acelerado de nutrientes por parte de la microalga *H. pluvialis* en los primeros días como mecanismo de adaptación al entorno que la rodea.(33)

A medida que avanzaron los estudios se evidenció un aumento progresivo y similar entre los dos cultivos en el nivel de pH llegando hasta una medición de 9,7 para el cultivo en el medio BBM y a 9,5 para el cultivo en el medio RM a los 36 días, equivalente a un porcentaje de aumento al final de los estudios de 44,7% y de 41,7% respectivamente, lo cual es normal por la oxidación de compuestos en los medios de cultivo y por el proceso de fotosíntesis que realiza la microalga.

Niveles de pH para los medios BBM y RM

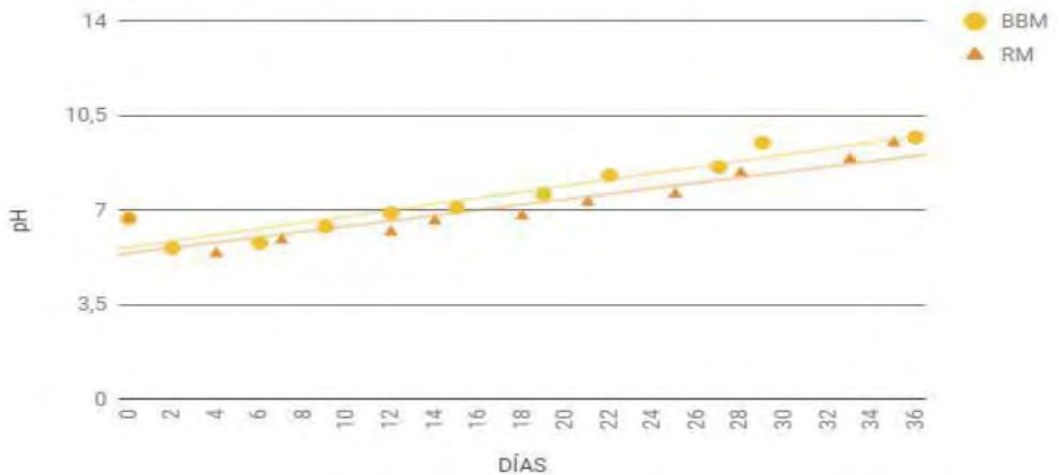


Figura 26. pH para los medios BBM y RM durante el estudio. Elaborada por los autores, 2019. (33)

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante la transformación de los valores de Y (densidad celular) a los cuales se les calculó el Logaritmo en base 10 para obtener Log vs Tiempo del crecimiento celular. Se realizó el ajuste con el fin de determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los medios probados (Tabla 7).

El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM con un aumento de 2,56 células/hora, incrementándose en un 20,7% frente al crecimiento en el BBM por día, pero a pesar de esto también fue el medio RM el que tuvo una menor densidad celular de $2,43 \times 10^7$ Cel. /mL al final del cultivo, equivalente al 15,62% menos en relación al medio BBM que presentó una densidad celular de $2,88 \times 10^7$ Cel./mL.(33)

Medio de Cultivo	Número de Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad De crecimiento	Coeficiente de determinación
BBM	10	5,7	7,5	2,03	73%
RM	10	6,3	7,4	2,56	92%

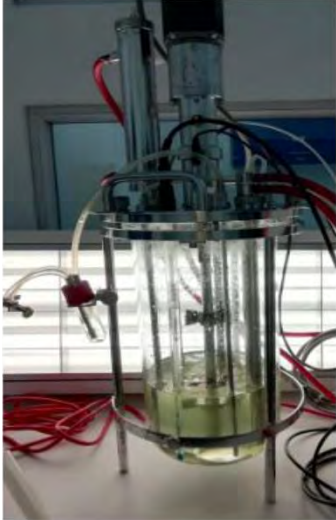
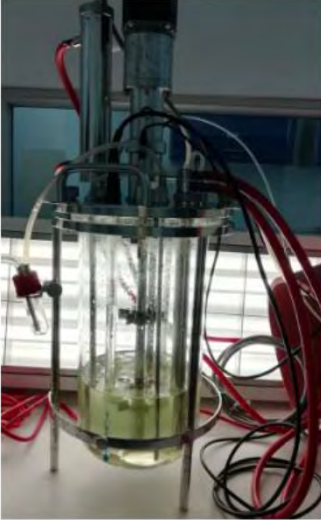


Tabla 7. Determinación de parámetros cinéticos del cultivo de *H. pluvialis* en el medio BBM y RM. Elaborada por los autores, 2019 (33)

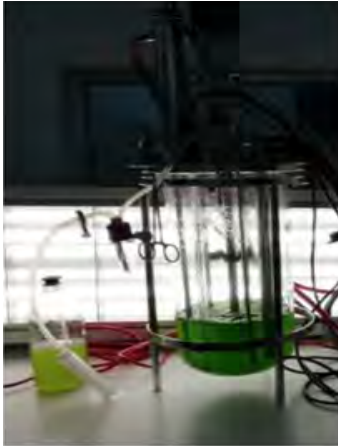
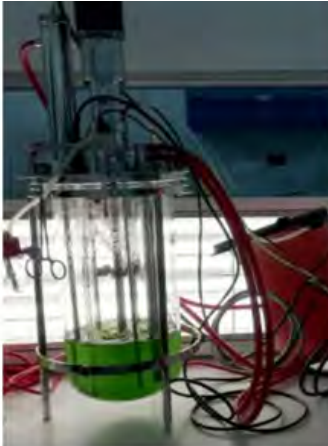



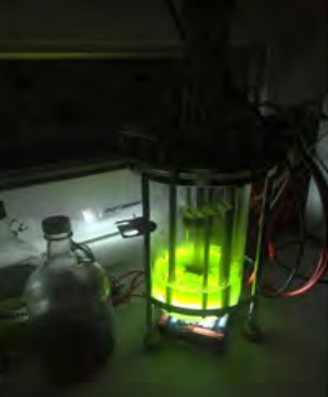
Caracterización macroscópica y microscópica de *H. pluvialis* en medio BBM y RM

El periodo de estudio fue de 36 días para cada tratamiento en medios BBM y RM por cultivos no simultáneos realizados en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, bajo las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de irradiancia 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, agitación de 100 rpm, provisión de aire filtrado a 1,7 L/min. Luego a partir de ahí los siguientes días del cultivo se

complemento la iluminación con un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux, diseñado con apoyo de SMM INGENIERIA SAS con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad para iniciar su fase de estrés y así estimular la acumulación de astaxantina con una irradiancia total de 285 luxes, con esto se evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* en los dos medios realizando el conteo de las células microalgales como se mencionó en la metodología y realizando las curvas de crecimiento observadas en la figura 25.(33)

El registro fotográfico realizado se puede apreciar en la tabla 8 para los cambios macroscópicos y en la tabla 9 para los cambios microscópicos conforme avanzaba el tiempo, los cuáles fueron muy similares en los dos medios de cultivo. (33)

DÍA DE CULTIVO	MEDIO BBM	MEDIO RM
1		
9		

12	 A photograph of a laboratory reactor setup. The reactor is a cylindrical glass vessel mounted on a metal stand. It contains a green liquid. Various tubes and wires are connected to the reactor. The background is a laboratory setting with a window.	 A photograph of the same laboratory reactor setup, showing a different angle. The green liquid is visible inside the reactor. The setup includes various tubes and wires connected to the reactor.
15	 A photograph of the laboratory reactor setup, showing the green liquid inside. The reactor is mounted on a stand, and various tubes and wires are connected to it.	 A photograph of the laboratory reactor setup, showing the green liquid inside. The reactor is mounted on a stand, and various tubes and wires are connected to it.
22	 A photograph of the laboratory reactor setup, showing the green liquid inside. The reactor is mounted on a stand, and various tubes and wires are connected to it. A bright light source is visible at the bottom of the reactor.	 A photograph of the laboratory reactor setup, showing the green liquid inside. The reactor is mounted on a stand, and various tubes and wires are connected to it. The scene is dimly lit, with the green liquid glowing.









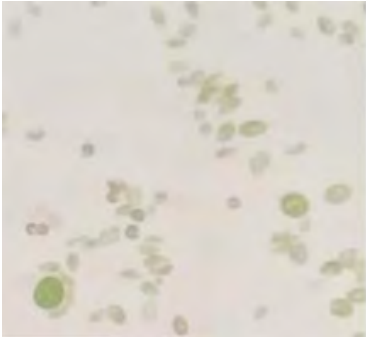
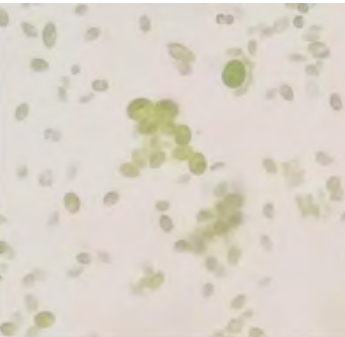
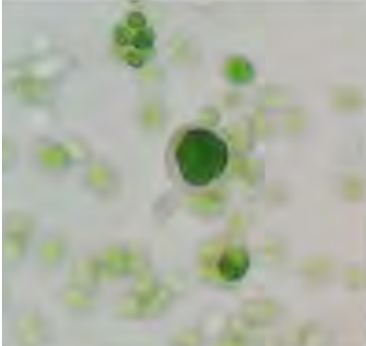
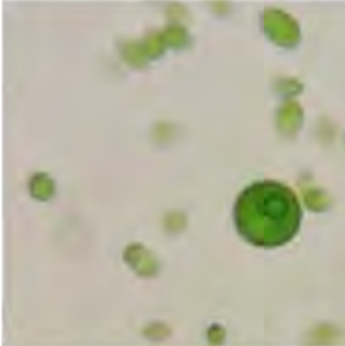
29		
33		
36		

Tabla 8. Morfología de *H. pluvialis* en los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2019. (33)

A medida que transcurría el tiempo de estudio para los dos cultivos en los medios BBM y RM se observó una intensidad en el color verde del cultivo debido al incremento en la densidad celular de un verde claro al inicio de cada cultivo a un verde oscuro en sus etapas finales debido al incremento de la biomasa microalgal (Tabla 8), lo cual fue confirmado por conteo celular en cámara de Neubauer.

En adición a la observación macroscópica, microscópicamente se apreciaron cambios morfológicos en las células microalgales, en el medio de cultivo BBM como RM se observó la presencia en la primera mitad del cultivo de células vegetativas ovaladas, verdes, flageladas y con matriz extracelular capaces de reproducirse por división celular y así aumentar la población, luego además de las células vegetativas también se pudieron ver y algunas células que aumentaron su concentración de clorofila, se tornaron redondas y perdieron los flagelos denominadas palmellas y finalmente hacia la etapa final de los cultivos se pudieron observar esporádicamente aplanosporas que corresponden a las formas de resistencia caracterizada por la presencia de una membrana rígida con pérdida de la concentración de clorofila en su interior por cambio gradual en la acumulación de astaxantina (Tabla 9).(33)

DÍA DE CULTIVO	MEDIO BBM	MEDIO RM
5		
12		
15		

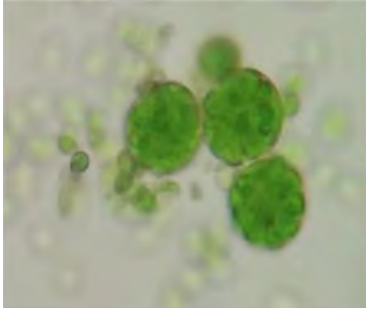
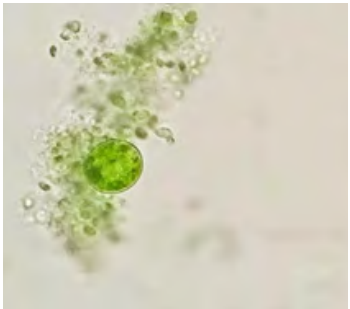





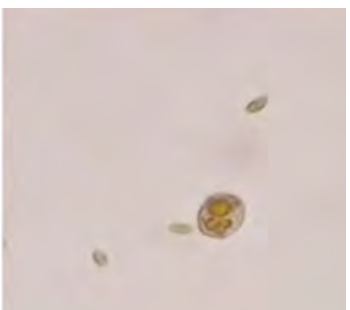
22		
29		
33		
36		

Tabla 9. Morfología de la microalga *H. pluvialis* en medios BBM y RM. Tamaño 40X. Elaborada por los autores, 2019. (33)

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

En la figura 27 se puede observar la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de clorofila vs los días de cultivo tanto para el medio BBM como para el RM y en la figura 29 la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina vs los días de cultivo para los mismos medios.



Figura 27. Concentración de clorofila en $\mu\text{g/mL}$ para los medios BBM y RM.

Elaborada por los autores, 2019. (33)

En cuanto a la producción y acumulación de clorofila, como era de esperarse a medida que avanzan los días del cultivo en medio BBM y en medio RM esta va aumentando su concentración hacia la mitad del tiempo de estudio y luego decrece progresivamente hasta el día 36. El mejor resultado se obtuvo en el medio BBM (Figura 27), en el cual hacia el día 19 se llega hasta una acumulación de $28,3 \mu\text{g/mL}$ y como se había mencionado previamente por este tiempo la microalga se encuentra aún en su fase exponencial de crecimiento como se observa en la figura 25 , por otra parte en el medio RM se observa la mayor producción de clorofila de $21,8 \mu\text{g/mL}$ para el día 25 porque posiblemente aún sigue latente una fase de crecimiento debido a múltiples factores del cultivo que pueden llegar a prolongar dicho estado, esta mejora en la producción de clorofila en el medio BBM representa un aumento del 22,96% en relación al medio RM.

Los resultados obtenidos a la hora de realizar el ANOVA del factor “concentración de clorofila” para los medios BBM y RM permiten evidenciar con un porcentaje de confianza del 95% que no existe una diferencia significativa entre el uso de los dos medios de cultivo ($F: 0,008$; $Valor\ p: 0,92$; $gl: 1$). Previamente se estableció una diferencia entre el medio BBM y el medio RM en cuanto a la concentración de clorofila determinando que el medio BBM tiene una leve mejora en esta característica y resultado mejor para el cultivo de la microalga, pero como no es una diferencia drástica en relación al uso del medio RM se puede concluir que emplear cualquiera de los dos genera los efectos positivos deseados, lo cual se correlaciona con el crecimiento obtenido para esta microalga en el biorreactor.

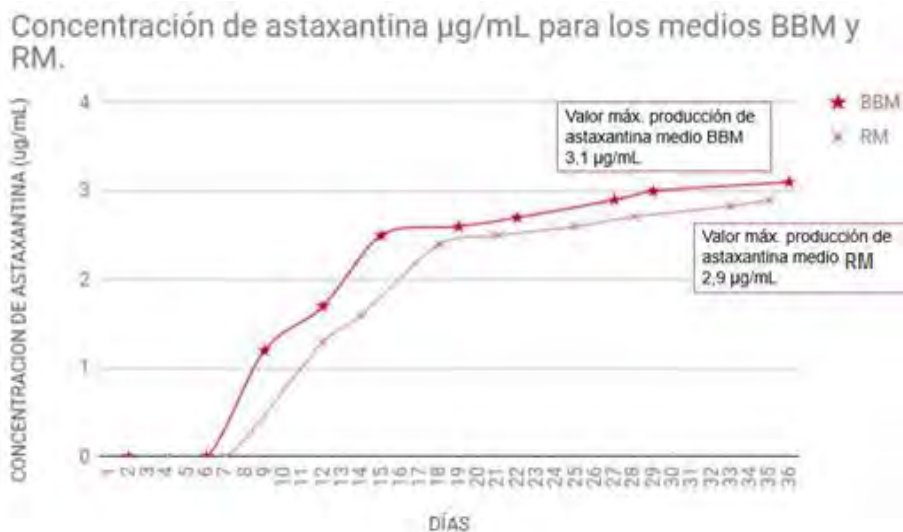


Figura 28. Concentración de astaxantina µg/mL para los medios BBM y RM.
Elaborada por los autores, 2019. (33)

Con respecto a la producción y bioacumulación de astaxantina en las células microalgales, en ambos medios se obtuvieron resultados de acumulación muy similares y crecientes a medida que pasaban los días del cultivo (Figura 28); con una leve diferencia en cuanto a la efectividad del medio BBM para promover la síntesis y acumulación del caroteno por parte de la microalga, llegando hasta un valor de 3,1 µg/mL para el medio BBM e incrementándose solamente en un 6,4% frente al medio RM que alcanzó un valor de 2,9 µg/mL hacia el último día del cultivo donde se puede apreciar el aumento continuo del metabolito.

En relación con las fotos de la tabla 9 de la caracterización microscópica se puede apreciar la presencia de aplanosporas enquistadas hacia la fase final del tiempo de estudio tanto para el medio BBM como para el medio RM como resultado de un ambiente estresante para la microalga generado por la deficiencia de nutrientes como la disminución de nitrógeno y también causado por factores como el aumento de la irradiancia y el cambio a luces de colores a partir del día 15 en que se pasó del uso de una lámpara blanca fluorescente marca Philips de irradiancia ≈ 65 luxes a un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 luxes combinada con una lámpara lámpara blanca fluorescente marca Philips de irradiancia 75 lux, para un total de 285 luxes y por la variación del fotoperiodo en el mismo tiempo de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a 20 horas luz - 4 horas oscuridad . Se puede deducir que a medida que avanza el tiempo de los cultivos aumenta la acumulación del carotenoide mientras disminuye la concentración intracelular de clorofila, lo cual es un indicativo muy bueno de la eficiencia de los cultivos en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS.

Con el resultado que arrojó el ANOVA, tomando como variable la “producción y acumulación de astaxantina”, se logra concluir con un porcentaje de confianza del 95% que no existen diferencias significativas de la producción de astaxantina por *H. pluvialis* entre el medio BBM y RM ($F: 0,027$; $Valor p: 0,86$; $gl: 1$). Como ya se había mencionado el uso de cualquiera de los dos medios de cultivo ya sea BBM o RM resultan muy favorables porque se comportan según lo esperado acumulando el caroteno en mayor medida conforme pasan los días de cultivo y evidenciando al final una tendencia a seguir incrementándose. (33)

Determinación de la concentración de nitrógeno

En la figura 29 se puede observar la concentración de nitratos en $\mu\text{g}/20 \text{ mL}$ vs los días de cultivo tanto para el medio BBM como para el RM.



Figura 29. Concentración de nitratos en µg/20mL para los medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2019. (33)

La concentración de nitratos para el doceavo día en el medio BBM fue de 80,32 µg/20 mL y para el medio RM fue de 50,82 µg/20mL, para la fase final del cultivo las concentraciones de nitratos disminuyeron en los dos medios hasta un valor de 6,51 µg/20 mL y de 16,66 µg/20 mL respectivamente para cada medio. En el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de 91,89% y en el medio RM fue de 67,21%. El medio BBM presentó un mayor consumo de los nitratos presentes debido probablemente a el tiempo del cultivo ya que este medio contenía menos cantidad de este nutriente y a que las microalgas lo utilizan como fuente de nitrógeno necesaria para su crecimiento y fue el mismo medio que logró generar una mayor producción de biomasa de *H. pluvialis* durante el tiempo de estudio, pero en general los dos medios presentaron un descenso esperado en la disponibilidad del nitrógeno presente en cada uno por el proceso de consumo de nutrientes que realiza la microalga.

El ANOVA realizado para la “concentración de nitratos en los medios BBM y RM” con un porcentaje de confianza del 95% que el consumo de nitrógeno no presenta una diferencia significativa en el empleo del medio BBM relacionado al medio RM ($F: 0,88; Valor p: 0,36; gl: 1$). Este resultado relacionado con la producción de biomasa en los medios BBM y RM, el comportamiento de la concentración de clorofila y la acumulación de astaxantina revela la existencia de

un efecto de estrés favorable generado en el entorno de la microalga *H. pluvialis* por factores como la disponibilidad de nutrientes, provocando un aumento en la biomasa microalgal que consume el nitrógeno presente en cada medio y que causa un cambio intracelular entre la acumulación de clorofila que decrece por una acumulación de astaxantina que aumenta constantemente a medida que avanza el tiempo de estudio, lo cual se puede observar desde el día 27 del cultivo.

Los resultados obtenidos con los análisis de varianza ANOVA sugieren que para una buena producción de astaxantina a nivel de laboratorio en un biorreactor BIOSTAT® A PLUS se puede emplear tanto el medio BBM como el RM, ya que si bien el BBM fue el medio que durante todo el experimento presentó un mejor aumento en la tasa de biomasa, una mayor concentración de clorofila, una efectiva acumulación de astaxantina y un mejor consumo de nitrógeno, no presenta diferencias significativas con respecto al uso del medio RM y por ello cualquiera de los dos medios resulta óptimo al momento de generar condiciones muy favorables en el cultivo y producción de astaxantina (metabolito de interés biotecnológico) por parte de la microalga *H. pluvialis*. A continuación se presenta una tabla resumen de los parámetros determinados para este estudio (Tabla 10).

(33)

Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en los cultivos de la microalga *H. pluvialis* en medios BBM y RM. Elaborada por los autores, 2019. (33)

Característica	Resultados obtenidos en medio BBM	Resultados obtenidos en medio RM
Crecimiento celular	2,88 x10 ⁷ Cel./mL	2,43 x10 ⁷ Cel./mL
Velocidad De crecimiento	2,03 Cel./hora	2,56 Cel./hora
Valor Máximo de Concentración de clorofila	28,3 µg/mL	21,8 µg/mL
Valor Máximo de Concentración de astaxantina	3,1 µg/mL	2,9 µg/mL
Porcentaje De consumo De nitrógeno	91,89%	67,21%,

El biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros permitió obtener bajo las condiciones trabajadas una biomasa de *H. pluvialis* en cantidad y calidad adecuadas, lo cual indica que se puede seguir utilizando para escalar la producción de esta microalga y así obtener productos derivados de interés como es la misma biomasa o los colorantes como la clorofila y la astaxantina.

DISCUSIÓN

El establecimiento de las condiciones de escalamiento para el crecimiento, la producción de biomasa, clorofila y astaxantina de un cultivo fotoautotrófico en batch de *H. pluvialis* bajo parámetros reportados utilizando el biorreactor a escala de laboratorio de 5L, se realizó teniendo en cuenta una revisión teórica inicial para establecer las condiciones de trabajo de la microalga en un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L.

Las condiciones establecidas según la revisión teórica se relacionaron con los sensores y aditamentos que tienen los biorreactores que se encuentran en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, los cuales se utilizaron en este proyecto de investigación como son el biorreactor Tecferm de 5 Litros (30) y el BIOSTAT A PLUS de 5L (27), los cuales se usaron utilizando las condiciones de esterilidad inicial de los recipientes y sus aditamentos como mangueras y sensores, para evitar contaminación del cultivo de la microalga, Luego de la esterilización se adicionaron los medios de cultivo esteriles con pH ajustado a 6,8 a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

En el caso del biorreactor Tecferm de 5 litros, se observa que su diseño es tubular y se sella evitando la contaminación, posee una ventana a través de la cual se colocó la fuente de luz suministrada por lámparas fluorescentes de luz blanca con una irradiancia que va desde 65 a 75 luxes. Lo ideal es utilizar una capacidad de 3 Litros y adicionar el inoculo en un 10%. También se dispone de un sensor de pH y aditamentos para ajustar pH durante el proceso usando soluciones amortiguadoras como NaOH 0,1 N y ácido sulfúrico 0,1 N. También consta de un sistema de toma de muestra en la parte superior e inferior del cultivo, la cual garantiza la esterilidad del cultivo. Se tiene un sistema de agitación con paletas de acero inoxidable, las cuales se pueden programar en rpm. Se puede

conectar gases, en este caso se uso aire filtrado, no se tiene sistema para medir velocidad.

El biorreactor BIOSTAT A PLUS 5 de Litros, consta de un vaso de vidrio transparente, con diseño tubular, lo ideal es utilizar una capacidad de 3 Litros y adicionar el inoculo en un 10%. Antes de su uso se esterilizan todas sus partes, y se procede a adicionar el medio de cultivo en condiciones de esterilidad a un pH 6,8 y temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, se ajusta la tapa del biorreactor y todos sus sensores de pH, de oxígeno disuelto, antiespumante, sistema de agitación y sistema de toma de muestra. Cuando todo esta ajustado se procede a ajustar las condiciones de trabajo a través de un software que se conecta al equipo a través de un computador, como son pH, oxígeno disuelto y velocidad en litros/ minuto, suministrado por una bomba adaptada al biorreactor con filtros estériles, agitación suministrada también a través de paletas en acero inoxidable dada en revoluciones por minuto (rpm), también en el software se van monitoreando estas condiciones durante el cultivo y se puede ajustar el pH para que se conserve adicionando soluciones amortiguadoras de base y ácido, lo cual también se ajusta usando el software. La luz se suministro a través de lámparas fluorescentes de color blanco con irradiancia de 65 a 75 luxes y se diseño un panel LED de colores rojos, azules y blancas con 210 luxes, conectado a un timer para los manejos de los fotoperiodos.

Al utilizar los biorreactores a escala de laboratorio como el Tecferm de 5 litros, se debe tener en cuenta que el crecimiento de la microalga se caracteriza por ser bastante lento mientras produce cambios en aspectos bioquímicos y morfológicos en respuesta a su adaptación al medio en el cual se encuentre liberada, es por ello que la realización de trabajos como este servirá para futuras investigaciones en cultivos de esta microalga y producir una biomasa que sea tanto en cantidad como en calidad adecuadas para los procesos que se requieran.

Según los resultados del presente estudio, encontramos un gran número de variables con respecto a la microalga, como la morfología; quien nos brinda información acerca del estado actual de crecimiento y además datos clave de su composición bioquímica, para que la microalga atravesase por sus diferentes estadios se le proporcionaron condiciones establecidas según la revisión teórica realizada, las cuales fueron fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio

de lámparas fluorescentes (Phillips máster TL5 HO de 54W/827) con irradiancia de 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0.01 vvm (31) y temperatura $20^{\circ} \text{C} \pm 2$, usando el biorreactor Tecferm 5L a escala de laboratorio, ya que como se describe en su protocolo es un biorreactor utilizado para el cultivo de microorganismos, hecho de acero inoxidable, sellado que brinda esterilidad al cultivo realizado, así como da la inclusión en su manejo de sensores de temperatura, pH y continua agitación, apagado/encendido y dos puntos de toma de muestra que aseguran que no haya contaminación.

El biorreactor posee la forma tubular ya que le ayuda a una mejor distribución de la luz en el cultivo, otros autores (34) (35) (36) han utilizado fotobiorreactores y biorreactores con capacidades que varían desde los 22 litros, 60 litros hasta 200 ml, ya que poseen una ventana por la cual pasa la luz al cultivo. La microalga realizó un cambio de formas vegetativas en ambos medios y avanzando a fase de enquistamiento en uno de ellos (Kobayashi) debido a un cambio en su ambiente acuoso generando estrés oxidativo y haciendo que la microalga optara por enquistarse para protegerse así misma. Las formas que más tuvieron lugar en el cultivo fue la célula vegetativa flagelada, célula vegetativa palmeloide y la presencia de células con aspecto albino quienes nos guían presuntivamente a corroborar que las condiciones del medio eran adecuadas para el crecimiento de la microalga y que a lo largo de los 21 días fue posible tener un desarrollo exitoso de *H. pluvialis* según la literatura. (8) (32)

Los hallazgos respecto a morfología comparados con Leiton (29) quien en el año 2018 empleó el biorreactor Tecferm 5L con medio BBM y RM en condiciones de cultivo similares a este estudio donde el método de caracterización microscópico brindó un estimado de biomasa obtenida y cualidades de las células descritas, en este estudio se presentó una frecuencia de células vegetativas flageladas verdes que tuvieron predominio durante su observación en el cultivo sin llegar a estadios de enquistamiento a diferencia del presente cultivo que logró alcanzar esta fase debido a condiciones del medio que generaron estrés en la microalga, la experimentación se llevó a cabo en el biorreactor Tecferm de 5L lo que hace comparable estos dos estudios debido a que comparten grandes características durante su proceso.

Otro estudio con el que se llevó a cabo una comparación respecto al tipo de estructuras morfológicas presentadas durante el cultivo fue el que realizó García et. al. (32) donde muestra que llevó a cabo el crecimiento de la microalga en un biorreactor tubular de $0,22\text{m}^3$ implementado con extremos blancos para aumentar la irradiancia de la luz sobre las células y luego proporcionarle condiciones de crecimiento tales como temperatura, pH, luz blanca y la adición de nitrato como fuente de nutrientes, aquí se logró realizar la caracterización de las células obtenidas por medio de imágenes digitales que brindaba un microscopio invertido el cual contaba con la articulación con el programa Image-pro plus 4.5.1 de Media Cybernetics, donde proporcionaba información sobre la población celular, diámetro celular y homogeneidad de las células, confirmando que la población más recurrente en el estudio era las células en estado vegetativo palmeloide y las células flageladas; la baja variabilidad entre el estudio de García y el presente trabajo indican que las condiciones trabajadas y mencionadas anteriormente en el biorreactor Tecferm 5L son las adecuadas y permiten la obtención de biomasa de alta cantidad y calidad.

Jian Li et. al. (37) reporta en su estudio haber obtenido una concentración celular máxima de 1×10^6 Cel. / mL en un medio que contenía acetato de sodio, nitrato de potasio, elementos principales, oligoelementos y vitaminas cultivado en un bioreactor tubular tipo airlift, esta concentración concuerda con la obtenida en este estudio para el medio OHM que fue de $1,23 \times 10^6$ Cel./mL quien se acerca al valor del estudio en comparación, los dos medios comparten similitudes en sus componentes además las condiciones de cultivo tienen puntos de convergencia que pueden dar razón a la poca variabilidad de los resultados en la densidad celular obtenida.

Con respecto al medio Kobayashi se encontró el artículo de Ranjbar et. al. (38) donde se emplea un biorreactor de columna de burbujas en vidrio donde en condiciones similares a las del presente estudio tales como fase luz/oscuridad, diversidad de nutrientes; entre ellos nitratos y fosfatos y ajuste de pH 7-8 se llevó a cabo el cultivo de la microalga, el medio utilizado como fase inicial del crecimiento fue Kobayashi y para la fase de mantenimiento y desarrollo a largo plazo se utilizó el medio inorgánico estándar quien comparte atributos principales del medio Kobayashi además de contar con vitaminas B1 y B12.

En este estudio la concentración celular obtenida fue superior a $3,5 \times 10^6$ Cel./mL sin generar cambio morfológico hacia la fase de enquistamiento, este valor puede ser comparado con el obtenido en el medio Kobayashi del presente estudio donde la concentración máxima fue de 1.0×10^5 Cel./mL dado a que la cantidad de medio utilizada en el primer estudio es mucho más grande y el tiempo de estudio sobrepasa el de esta investigación se hace una comparación a escala, brindando así similitudes en los dos hallazgos y logrando correlacionar el funcionamiento correcto de las condiciones de cultivo sobre la microalga.

La microalga requiere condiciones que aseguren su crecimiento, es por esto que es importante elegir el medio con las características adecuadas, tipo de biorreactor a utilizar y cualidades óptimas para el desarrollo del ciclo de vida de las células, entre ellas cabe resaltar el pH, temperatura, aire filtrado, fotoperíodo luz/oscuridad y color de luz que se le brinde al cultivo. En el estudio de Li et. al. (37) muestra que para obtener un crecimiento óptimo el pH fue mantenido en 7.5, lo cual se corrobora con el crecimiento obtenido en el estudio realizado ya que se mantuvo en un intervalo de 6.9 a 7.7 en los dos medios lo que permitió el desarrollo y crecimiento de la microalga, por otro lado para futuros cultivos es importante conocer que la disminución del pH está directamente relacionada con la liberación de protones en el medio debido al proceso de fotosíntesis incrementando porcentualmente la acidez del medio y afectando el desarrollo normal de la microalga, es por esto que se convierte en una parte fundamental asegurar esta condición cercana a la neutralidad (32).

En este estudio se contó con dos medios de cultivo, OHM quien posee la adición de concentraciones de nitrato de sodio (NaNO_3) y fosfato de potasio (KH_2PO_4), por otro lado el medio Kobayashi quien solo dispone de concentraciones de nitrato de sodio (NaNO_3), la implementación de estos nutrientes en el medio según la literatura (32) confiere la capacidad a la microalga de alcanzar una mayor división celular, así como mayor tasa de acumulación de pigmentos en la población microalgal.

Según Salazar et. al. (39) en el año 2012 medios que contengan una cantidad de 1.25 g/L de NaNO_3 tienen mayor capacidad de mejorar la densidad celular a obtener; tal como lo podemos relacionar con el tratamiento realizado con OHM y Kobayashi en el biorreactor Tecferm donde haciendo una comparación entre

las magnitudes de medio manejadas en el artículo de Salazar y el presente estudio se pueden establecer valores de confianza al manejar estas cantidades de nutriente a escala de laboratorio, por otro lado según Ramírez et al. en 2018 (40) dice que una cantidad de 3,4 mM de KH_2PO_4 muestran un efecto positivo en el crecimiento de *H. pluvialis* valor con el cual se puede hacer una comparación entre la escala utilizada para el estudio de Ramírez et al y el estudio actual dando como resultado que al comparar la cantidad de medio utilizado, si se manejaron concentraciones relevantes para cumplir con la finalidad del nutriente ya que este aumenta la capacidad replicativa de la célula y promueve su desarrollo óptimo.

La diferencia en el diseño del biorreactor, la cantidad de luz y cantidad total de carotenoides y pigmentos presentes influyen directamente en el contenido de clorofila y astaxantina que la microalga pueda alcanzar. En este estudio el diseño del biorreactor y la adición de nutrientes explican el por qué el contenido de biomasa de calidad y buena cantidad varía tanto, el equipo Tecferm de 5L cuenta con una mirilla delgada por donde la microalga aprovecha la irradiancia de luz brindada al medio de cultivo, al contar con una longitud corta puede impedir el aprovechamiento de la luz y ser insuficiente para la totalidad del cultivo pero es allí donde el biorreactor brinda la posibilidad de contar con agitación controlada en rpm haciendo que el medio se mantenga en agitación constante y la totalidad del medio pueda aprovechar las cualidades que le confiere la luz sobre sus células haciendo este diseño comparable con el diseño del estudio de Yoo JJ et al donde se implementó un biorreactor en forma de letra V para poder lograr una agitación continua y más profunda del medio logrando una favorable distribución de la luz en todo el medio. (41)

Como se mencionó anteriormente en el biorreactor Tecferm se cuenta con la presencia de una mirilla delgada que permite el paso de la luz para que la microalga pueda aprovechar la irradiancia de esta y así poder entrar en etapa fotosintética; para este estudio se empleó fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips máster TL5 HO de 54W/827) con irradiancia de 65 lux, la variación entre la fase oscura y la fase fotica del cultivo cumple con la función de fotosíntesis y la fase de respiración respectivamente; con respecto a el color de la luz este influye directamente sobre la absorción de los fotones debido a que las moléculas de los pigmentos de las plantas tienen la capacidad

de aprovechar diferentes longitudes de onda que van desde 700nm a 400nm donde se genera el radio de activación fotosintética. (42)

La microalga tiene presencia de clorofila a y b quienes se ven estimuladas en su concentración al utilizar luz de color azules y rojas como en el estudio de T. Xi et al en 2016 (35) donde fueron empleados estos colores para generar un aumento en la biosíntesis de clorofila y astaxantina de la microalga; en el biorreactor Tecferm se utilizó luz blanca a fin de establecer si esta longitud de onda ejercía el mismo efecto sobre la microalga dando un resultado positivo para el OHM donde se registró un alto contenido de clorofila en *H. pluvialis* de 11,87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparado con el estudio de T. Xi donde se registró un aumento del 50% en la concentración de astaxantina y clorofila en fotobiorreactores de 250 ml diseñados.

El diseño del biorreactor es una característica importante del estudio ya que se encuentra con varios tipos de diseño, entre los más utilizados están los de sistema abierto donde utilizan directamente la luz solar pero que debido a su prolongada exposición al ambiente logran contaminarse con facilidad y tienen pérdida de medio por evaporación; encontramos también los de sistema cerrado como los de columna airlift donde maneja bajo consumo de energía y baja cantidad de estrés, manejo de la temperatura, mezclado óptimo del medio y amplio radio de iluminación, fotobiorreactor en bolsa plástica donde debido a su diseño tiene costos de producción bastante bajos, airlift de panel plano donde su diseño brinda características como bajo poder de consumo de energía, amplio rango de aprovechamiento de luz, control de temperatura y bajo capital de operación; todos ellos comparten cualidades muy atractivas a la hora de realizar un estudio pero al realizar un análisis de sus desventajas tienen un alto costo de adquisición del fotobiorreactor, limitaciones en la obtención de la luz como en el caso de la bolsa plástica y en la mayor parte de los casos tienen un alto costo de limpieza del equipo.

El biorreactor Tecferm al tener un diseño tubular cuenta con cualidades óptimas para la realización de trabajos a escala de laboratorio, brindando ventajas como diseño simple, gran área de iluminación, mezclado por medio de aspas y sistema cerrado para evitar contaminación del medio con fuentes externas que puedan dañar el desarrollo óptimo de la microalga, esta comparación se logra gracias al estudio de Huang et al en 2017 (43) donde describe las diferencias entre cada

biorreactor y la influencia que cada uno tiene sobre los parámetros analizados en este estudio como pH, aireación, periodo luz/oscuridad, rpm y tipo de luz que recibe el medio a través del fotobiorreactor brindando como resultado que emplear este modelo de biorreactor brinda un valor agregado al cultivo e implementa formas diversas y a bajo costo para la producción de biomasa de *H.pluvialis*.

En el proceso de uso de birreactores a escala de laboratorio de 5 Litros se realizó también el cultivo de esta microalga en el biorreactor BIostat A PLUS 5 Litros, destacándose que esta microalga en el campo industrial el interés que despierta la generación de cultivos de microalgas a gran escala es cada vez mayor, porque como ya se ha mencionado dichos microorganismos tienen la capacidad de aumentar en gran medida la producción de biomasa para fines de alimentación animal y humana y para fines de biorremediación, también pueden producir metabolitos secundarios como los carotenoides, ácidos grasos polisacáridos, compuestos bioactivos, antioxidantes y la producción de biocombustibles. (44) (45)

La principal problemática que enfrentan estos cultivos es que no siempre el nivel de productividad llega a los valores esperados para que sea rentable en términos económicos es por esto que muchos estudios se han concentrado en las mejoras a nivel del suministro de nutrientes, el uso de biorreactores, la modificación de factores físicos que intervienen como lo son el pH, la disponibilidad de luz, el porcentaje de aireación, la velocidad de agitación y la temperatura, con la esperanza de generar el ambiente más propicio según la finalidad comercial del cultivo. (46) (47)

En cuanto al uso de los medios de cultivo muchos investigadores se han enfocado en analizar varios que difieren en sus composiciones y en relación a la concentración de Cel./mL que pueden alcanzar. En este caso se analizó la producción de biomasa en Cel./mL para dos medios de cultivo, el BBM y el RM durante 36 días obteniendo una producción final de 2.88×10^7 Cel./mL y de $2,43 \times 10^7$ Cel./mL respectivamente, lo cual en relación con lo reportado en varios estudios como por ejemplo uno realizado por Castillo *et al* (2017) donde los medios BBM y RM habían alcanzado producciones de 3.8×10^5 Cel./mL y de 7.55×10^5 Cel./mL respectivamente (48), lo evidenciado en otros dos estudios separados donde el medio BBM llegó a una producción de 3.5×10^5 Cel./mL (49)

y a una producción de 2×10^4 Cel./mL y con lo demostrado en otro estudio donde el medio RM pudo alcanzar un nivel de 9.50×10^5 Cel./mL (64), representa un aumento para la concentración celular en los dos medios analizados en este estudio.

Lo anterior resulta muy favorable ya que la alta tasa de producción de biomasa de la microalga *H. pluvialis* es un factor necesario e importante en la productividad de un cultivo, esta notoria diferencia puede deberse a que en este estudio se empleó el biorreactor BIOSTAT® A PLUS que garantiza proporcionarle al cultivo una disponibilidad más amplia de luz por ser de un material de borosilicato transparente y tener forma tubular, además de poder controlar según los requerimientos la agitación, el suministro de aire, de dióxido de carbono, el pH y la temperatura. Esto representa ser un factor determinante en muchos estudios donde se emplearon biorreactores de diversos tipos y donde también se manipulan otros factores además del medio de cultivo empleado como lo son el pH, la disponibilidad de la luz, la aireación suministrada, la temperatura proporcionada, la agitación, entre otros (40) (50) (51) (52), en los cuales dicha característica principal influye positivamente en el aumento de la densidad celular y en la prolongación de una fase exponencial de crecimiento pasando los 15 días iniciales como lo vimos reflejado en este estudio.

En comparación con un estudio realizado por Ramírez en el 2013 donde se evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina en un fotobiorreactor tipo airlift, estableciendo en primera instancia las mejores condiciones para su crecimiento y luego una fase con mecanismos estresantes como lo fueron la variación de medios de cultivo en los cuales no se evidenció diferencia significativa y por lo tanto se aconsejó el uso de BBM por su bajo costo y el continuo uso de fotobiorreactores por generar un mejor control de las condiciones del cultivo, los resultados fueron similares con este estudio donde también el biorreactor representó ser un factor favorable en los cultivos y el medio BBM resultó ser más eficiente con una productividad de $2,88 \times 10^7$ Cel./mL. (40)

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio donde *H. pluvialis* en medio RM llegó a un recuento celular de $2,43 \times 10^7$ Cel./mL, concentraciones de clorofila de 21,8 µg/ml y de astaxantina de 2,9 µg/ml, con disminución de 67,21% en el contenido de nitrógeno, bajo valores de pH entre 5,4 a 9,5, bajo las siguientes

condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de irradiancia ≈ 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, agitación de 100 rpm y aire filtrado a 1,7 L/min, luego, a partir de ese momento, los siguientes días del cultivo se realizó una adición del panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 lux, con luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de irradiancia 75 lux para un total de 285 luxes con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad y observando células en estado vegetativo, palmella y aplanosporas enquistadas, con el estudio realizado por Pérez y Ayala (2018) (53) donde también realizaron un cultivo de *H. pluvialis* utilizando el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, obteniendo la mayor biomasa en el medio RM con una concentración de 5% de nitrógeno, cuyo recuento celular fue de $3,19 \times 10^5$ cel/ml, concentraciones de clorofila de 13,15 $\mu\text{g/ml}$ y de astaxantina de 1,1 $\mu\text{g/ml}$, en el cual las condiciones de pH se mantuvieron entre 5,6 y 7,0 durante los 28 días de tratamiento, donde se produjo una disminución del contenido de nitrógeno en un 40% de 2,18 mg/dL a 1,3 mg/dL, fotoperiodo luz 20 h y 4 h de oscuridad este estudio se utilizó luz blanca utilizando lámparas fluorescentes con irradiancia de 110 lux, pH 6,8, temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, aire filtrado a 1,7 L/minuto y agitación 100 rpm.

La morfología que se presentó fueron formas vegetativas, palmella, aplanospora y formas enquistadas con mayor tamaño; se puede concluir y evidenciar que las condiciones propuestas en este estudio para el cultivo de *H. pluvialis* resultaron ser mejores en cuanto a productividad en el medio RM donde se logró obtener una biomasa mayor con mejor concentración de clorofila y acumulación de astaxantina que lo presentado en este estudio, debido a que no se usó el medio RM original, sino se disminuyó la concentración de nitrógeno al 5%,

El diseño del fotobiorreactor también resulta ser un factor importante en el cultivo y obtención de biomasa de la microalga en comparación con lo evidenciado por Yoo *et al*, en 2012 (54) en un estudio donde cultivaron *H. pluvialis* en un fotobiorreactor tubular con fondo ovalado en posición diagonal con una pendiente de 60° , ellos demostraron la producción muy eficiente de células de microalgas y astaxantina en altas cantidades de 2.62 g/L y 78.37 mg/L, respectivamente, debido probablemente a que la inclinación proporciona una mejor distribución

lumínica y con lo observado en este estudio en el que también se empleó un biorreactor tubular con fondo ovalado pero en posición vertical, con el panel de luces LED colocado en la parte inferior con lo cual posiblemente no se tuvo una eficiente distribución lumínica obteniendo concentraciones de astaxantina para los medios BBM y RM de 28,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 21,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo cual la sugerencia para mejorar el proceso realizado es rodear el biorreactor con luces para un mejor efecto penetrante de la luz tanto en el crecimiento de la microalga, como en el uso de ésta como factor de estrés para aumentar la acumulación de astaxantina.

En cuanto a la disponibilidad lumínica se suministró durante los primeros 15 días un fotoperiodo de 18 horas luz - 6 horas oscuridad de luz blanca con una lámpara puesta de manera paralela al biorreactor de 65 lux de irradiancia siendo según la literatura el tiempo final de la fase exponencial de crecimiento de la microalga (40) (55) (56) y a partir de ahí los siguientes días del cultivo se adicionó un panel de luces LED multicolor colocada debajo del biorreactor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión de 180 a 210 luxes a luz blanca con una lámpara con 75 lux para un total de 285 luxes y un cambio a un fotoperiodo de 20 horas luz - 4 horas oscuridad, con la finalidad de iniciar su fase de estrés causada por el aumento de irradiancia, la variación de los fotoperiodos y los cambios a luces de colores y así estimular la acumulación de astaxantina (57) (51) (58) (59).

Como lo demostrado por Sun *et. al.* en el año 2017, cuando realizaron un estudio donde propusieron un método de cultivo de *H. pluvialis* por etapas en un biorreactor de tipo fed- batch, cultivaron las células a 22°C, con ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, luz mixta blanca-roja a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante los primeros 5 días, luego filtraron el medio a través de una membrana de 5 μm y las células obtenidas las sembraron nuevamente manteniendo las condiciones anteriores pero les aumentaron la intensidad lumínica a 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el día 9 el medio fue ajustado a la misma concentración de nutrientes que el medio de cultivo fresco y el pH se ajustó a 7.5, finalmente se concluyó que las características como la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos extracelulares son factores que limitan el crecimiento de la microalga y que crear un cultivo de tipo fed- batch, con un suministro de luz mixta blanca-roja y con cambio del medio de cultivo aumenta 1.16 veces la producción normal de biomasa. (52)

El hecho de que existiera una alta biomasa y de que la luz estuviera en una dirección de abajo hacia arriba pudo ser una causa probable de que las células interfirieran unas con otras y no lograran captar eficazmente la emisión lumínica además de requerirse luces con mayor irradiancia, llevando a una etapa de estrés eficiente que se pudo apreciar visualmente en los cambios microscópicos expuestos en la tabla 9 al final del cultivo por la presencia de aplanosporas enquistadas y se determinó cuantitativamente como se observa en la figura 29 y una acumulación de astaxantina al final de los cultivos y también se dedujo que existió una mayor producción en el medio BBM frente al medio RM, sin embargo no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$).

Al observar los resultados expuestos para la determinación de la concentración de clorofila y astaxantina para los dos medios y las figuras 28 y 29 donde se comparan los valores del medio BBM vs los del medio RM, se puede observar que a medida que el cultivo se realiza la clorofila en ambos casos llega a un pico máximo de acumulación pero después comienza a descender y por el contrario la concentración de astaxantina va aumentando progresivamente, esto es de gran importancia porque pone en manifiesto la efectividad que tuvieron los factores de estrés generados en los cultivos a la hora de estimular la acumulación del carotenoide en estudio, tal vez al aumentar el tiempo de estudio y mejorar otras condiciones de cultivo como el uso de lámparas que proporcionen una mayor irradiancia se genere un ambiente estresante más efectivo que lleve a una mayor acumulación del metabolito.

Analizando otros estudios donde se utilizaron también biorreactores y en los que se estudió la producción de biomasa, concentración de clorofila y producción de astaxantina como en el realizado por Leiton (2018) (29) quien realizó el cultivo de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5L, utilizando las condiciones de temperatura 20 ± 2 °C, agitación a 180 rpm, aire filtrado, fotoperiodo de 18:6 (luz: oscuridad), lámparas fluorescentes de luz blanca (Phillips Máster TL5 HO de 54W/827) y pH de 6.8- 7.1, donde el crecimiento celular obtenido fue de 1.25×10^5 Cel./mL y 1.0×10^5 Cel./mL en medio RM y BBM durante 21 días y una concentración de clorofila de 3.98 µg/mL y de 3.39 µg/mL respectivamente el medio BBM o como en el realizado por García (2018) (61), quien estudió un cultivo de *H. pluvialis* utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros utilizando dos

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 $20 \pm 2^\circ \text{C}$, aire filtrado y agitación a 100 rpm.

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ambos estudios resultan tener bajas producciones de los parámetros analizados comparados con el realizado en este trabajo donde en el medio BBM se llegó a una producción de biomasa de $2,88 \times 10^7$ Cel./mL y en el medio RM de $2,43 \times 10^7$ Cel./mL, con una acumulación de clorofila de 28,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 21,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de astaxantina de 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Durante el tiempo de estudio en los dos medios de cultivo se observó un aumento en los niveles de pH al final de los estudios de 5,6 a 9,7 para el medio BBM y de 5,4 a 9,5 para el medio RM lo cual es normal por la acumulación de minerales y la oxidación de compuestos debido al proceso fotosintético de la microalga. En la literatura se describe que la manera más efectiva de controlar adecuadamente este aumento progresivo es suministrar aireación con CO_2 para así provocar una disminución del mismo y que también puede ser controlado con la adición de soluciones ácidas o básicas (60) (62), en este estudio el CO_2 se adicionó en el aire a una velocidad de 1,7 L/min por lo cual los niveles de pH fluctuaron entre valores de 5,4 a 9,7 que es un rango ideal para el crecimiento microalgal. (8)

La disponibilidad de los nutrientes como el nitrógeno resulta ser otro factor clave en los cultivos de microalgas, los medios destinados para esta finalidad normalmente presentan altos contenidos de nitratos con el fin de incentivar el crecimiento celular. Como era de esperarse en este estudio la concentración de los nitratos disminuyó conforme pasaban los días de estudio en los dos medios utilizados, para el medio BBM el porcentaje de consumo de nitratos fue de 91,89% disminuyendo de una concentración de 80,32 $\mu\text{g}/20\text{mL}$ hasta 6,51 $\mu\text{g}/20\text{mL}$ y para el medio RM un porcentaje de consumo de 67,21% disminuyendo de 50,82

$\mu\text{g}/20\text{mL}$ a $16,66 \mu\text{g}/20\text{mL}$, y llegando hasta una producción de astaxantina de $28,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ y de $21,3 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Similar a lo evidenciado en un estudio donde se cultivó la microalga en cuatro medios diferentes de esta manera: medio RM sin nitrógeno (sin N), medio RM sin fosfatos (P-free), medio exento de nitrógeno y fosfato (NPfree) y también solo agua destilada con la adición continua de CO_2 en el que llegaron a la conclusión que el contenido de astaxantina era mucho más rápida en agua destilada (29.62 mg g^{-1}) con la adición de CO_2 y en medio libre de nitrógeno (30.07 mg g^{-1}) (3), lo cual resulta favorable en sentido de que las células van consumiendo los nutrientes del medio requeridos para su crecimiento y una vez los consumen en su totalidad el ambiente se va convirtiendo en un medio cada vez más estresante que estimula la bioacumulación intracelular de astaxantina.

Cada vez se pone más en manifiesto el efecto favorable del empleo de un biorreactor en el cultivo de microalgas cuando la finalidad es obtener una biomasa considerablemente buena en cantidad y calidad, ya que además de todo el biorreactor propicia las condiciones óptimas para evitar el daño celular (54) (43) como se evidenció en la observación microscópica de los cultivos de *H. pluvialis* en los medios BBM y RM, donde se pudo apreciar la morfología característica de la microalga, y se pudo establecer que el cultivo realizado en el biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, dio muy buenos resultados para el cultivo de la microalga obteniendo mayor cantidad de biomasa que otros biorreactores como el Tecferm de 5 litros y también el uso de los medios con todos sus componentes completos logró aumentar la biomasa, ya que como se mencionó previamente la deficiencia de nitrógeno afecta el crecimiento celular de esta microalga.

En general los dos medios de cultivo presentan efectos muy favorables en cuanto a la alta producción de biomasa, producción de clorofila y posterior acumulación de astaxantina bajo condiciones las siguientes condiciones de crecimiento: fotoperiodos por los primeros 15 días de 18 horas luz - 6 horas oscuridad a luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de 65 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de $25^\circ \text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, agitación de 100 rpm y aire filtrado a 1,7 L/min y luego a partir de ahí los siguientes días del cultivo se realizó una adición de un panel de luces LED multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión

de 180 a 210 lux a una luz blanca con lámpara fluorescente marca Philips de 75 lux con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad para iniciar su fase de estrés aumentando la irradiancia a 285 luxes y así estimular la acumulación de astaxantina, en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS.

Los ensayos realizados en los biorreactores de 5 litros estableció la factibilidad tecnológica de su uso para el cultivo del *H. pluvialis*, definiendo condiciones a tener en cuenta en el escalamiento de la microalga al usar estos biorreactores, ya que se estableció buen crecimiento de la microalga obteniendo una biomasa en cantidad y calidad adecuada para ser utilizada para obtener diferentes metabolitos de interés como los carotenoides como la astaxantina.



CONCLUSIONES

En esta investigación se estableció la factibilidad tecnológica del uso de los biorreactores de 5 litros utilizados en esta investigación, definiendo condiciones para tener en cuenta en el escalamiento de la microalga como esterilidad, inóculo al 10%, 3 litros para el cultivo, punto de toma de muestra, pH 6,8, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, agitación (100 rpm), velocidad del aire o gases en L/minuto (1,7 Litros/minuto), gases filtrados, oxígeno disuelto, luz alrededor del biorreactor, vaso transparente, fotoperiodos definidos para crecimiento hasta fase exponencial y fase de estrés.

Se realizó un registro fotográfico de los cambios en los dos medios de cultivo para los cuales macroscópicamente se pudo apreciar una variación gradual en el color del medio desde un verde muy claro hasta un verde oscuro intenso por la alta producción de biomasa y microscópicamente se observó la presencia de células en fase vegetativa y en fase de palmella, algunas aplanosporas enquistadas en los cultivos realizados.

El uso del biorreactor a escala de laboratorio de 5 litros bajo las condiciones trabajadas permitió obtener una biomasa en calidad y cantidad adecuadas de la microalga, la cual puede ser utilizada para obtener productos derivados de gran interés

La distribución lumínica usada al compararse con otros estudios sugiere el uso del Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, por ser transparente colocando el biorreactor inclinado o cubrir el biorreactor con luces alrededor más potentes induce un mejor efecto penetrante de la luz para así lograr más crecimiento de la microalga y aumentar su acumulación de astaxantina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Damiani MC, Leonardi PI, Pieroni OI, Cáceres EJ. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia*. 2006 Nov 1; 45(6):616-23.
2. Pentecost A. Order Volvocales. In: The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds. Cambridge: Cambridge University Press. 2002
3. HuH, J. Wei Y X. The Freshwater Algae of China: Systematics, Taxonomy and Ecology. 2006.,1-1023 pp. China: www.sciencep.com.
4. Meng CX, Teng CY, Jiang P, Qin S, TSENG CK. Cloning and Characterization of β -Carotene Ketolase Gene Promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005 Apr 1; 37(4):270-5.
5. Lohr M, Im CS, Grossman AR. Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2005 May 1; 138(1):490-515.
6. Ku B, Jeong JC, Mijts BN, Schmidt-Dannert C, Dordick JS. Preparation, characterization, and optimization of an in vitro C30 carotenoid pathway. *Applied and environmental microbiology*. 2005 Nov 1; 71(11):6578-83.
7. Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*. 2008 Mar 1;146(3):1333-45.
8. Richmond A. Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. 2004:125-77

9. Jin ES, Lee CG, Polle JE. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 16(6):821-31.
10. Grünewald K, Eckert M, Hirschberg J, Hagen C. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiology*. 2000 Apr 1; 122(4):1261-8.
11. Tran NP, Park JK, Kim ZH, Lee CG. Influence of sodium orthovanadate on the production of astaxanthin from green algae *Haematococcus lacustris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009 Jun 1; 14(3):322.
12. Suh IS, Joo HN, Lee CG. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology*. 2006 Oct 1; 125(4):540-6.
13. Vidhyavathi R, Venkatachalam L. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008; 59:1409-1418
14. Gao Z, Meng C, Zhang X, Xu D, Zhao Y, Wang Y, Lv H, Yang L, Chen L, Ye N. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*. *PLoS One*. 2012 Aug 1; 7(8):e42243.
15. Gao Z, Meng C, Gao H, Li Y, Zhang X, Xu D, Zhou S, Liu B, Su Y, Ye N. Carotenoid genes transcriptional regulation for astaxanthin accumulation in fresh water unicellular alga *Haematococcus pluvialis* by gibberellin A3 (GA 3).
16. Sarada R, Vidhyavathi R, Usha D, Ravishankar GA. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006 Oct 4;54(20):7585-8.
17. Welsch R, Wüst F, Bär C, Salim Ai, Beyer P. A Third Phytoene Synthase Is Devoted to Abiotic Stress-Induced Abscisic Acid Formation in Rice and Defines Functional Diversification of Phytoene Synthase Genes. *Plant Physiology*. 2008; 147:367–380

18. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006 Nov 1; 102(5):442-6
19. Römer S, Fraser PD. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*. 2005 Jun 1; 221(3):305-8.
20. Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007 Apr 1; 74(5):987-94.
21. Yasuhiro N, Kyoko A, Hiroaki K, Yoshikazu S, Kazutoshi S, Akiyoshi S, Sadao K, Wataru M, Norihiko M. Elucidation of a Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster Encoding a Novel Enzyme, 2,2-Hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. Strain SD212 and Combinatorial Biosynthesis of New or Rare Xanthophylls. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71: 4286–4296
22. Lopez F, Rojas R. Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas. 2010 [consultado 30 abril de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6563/2/133250.pdf>
23. Benavente-Valdés JR, Montañez JC, Aguilar CN, Méndez-Zavala A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2012 Jun; 7(4):1-2.
24. Gómez I, Moreno B, Velásquez M, Aguirre C, Aguado G. cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión. establecimiento y perspectivas de aplicación. 2014; 37(2): pp 166,167.
25. Lei A, Chen H, Shen G, Hu Z, Chen L, Wang J. Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*. 2012 Dec; 5(1):18.
26. Kaewpintong K, Shotipruk A, Powtongsook S, Pavasant P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*. 2007 Jan 1;98(2):288-95.

27. Sartorius. Manual equipo Biorreactor. Rev. 09 -09. 2009.144p.
28. Sartorius Stedim Systems GmbH. <http://www.sartorius-stedim.com>. 2018.
29. Leiton Y.A. Producción de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor tecferm de 5 litros en medios de cultivo RM y BBM. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca. 2018. 70p.
30. Manual Tecferm 5 Litros. Bogotá.2006.
31. Hernández Cortes Ángela María .Producción de biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando los medios de cultivo OHM y kobayashi en el biorreactor tecferm de 5 litros. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2019. 94 p
32. García-Malea, M. C., *et al.* Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: modeling of the irradiance effect. *Enzyme and microbial technology*, 2006, vol. 38, no 7, p. 981-989.
33. Manrique Pinzón Mónica Alejandra y Marín Corredor David Leonardo. Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT ® A PLUS. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2019. 70p.
34. 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.
35. Xi T, Kim DG, Roh SW, Choi JS, Choi YE. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016 Jul 1; 100(14):6231-8.
36. 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).

37. Li, Jian, et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no 6, p. 568-574.
38. Ranbjar R, Inoue R, Katsuda T, Yamaji H, Katoh S. High efficiency production of Astaxanthin in an airlift photobioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008; 106:204-207
39. 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
40. Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Universidad Nacional de Colombia [Tesis Máster] 2013
41. Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, Sim SJ. Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012;35(1-2):309-15.
42. OpenStax, The Light-Dependent Reactions of Photosynthesis. OpenStax CNX. 9 de octubre de 2013.
43. 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
44. Rodríguez H. Producción de Compuestos de Interés Industrial por Microalgas y Cianobacterias. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Retrieved from <https://www.ibvf.us-csic.es/producción-de-compuestos-de-interés-industrial-por-microalgas-y-cianobacterias>
45. Bolaños ER. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*. 2008 Jan; 14(1):309-17.
46. Gallardo T, Cobelas MÁ. Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas. *Botánica complutensis*. 1989 Jan 1; 15:9.

47. Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. 2014 Aug; 49(2):157-73.

48. Castillo CM, Rivera FC, Díaz LE, Díaz AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*. 2017 Nov. 2; 15(28):19-31.

49. Domínguez-Bocanegra AR, Ponce-Noyola T, Torres-Muñoz JA. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007 Jun 1; 75(4):783-91.

50. Wan M, Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y, Huang J, Wang J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource technology*. 2014 Sep 1; 167:276-83.

51. Park JC, Choi SP, Hong ME, Sim SJ. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2014 Oct 1; 37(10):2039-47.

52. Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 233, 326–331. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.011>

53. Pérez Zambrano Erika Tatiana y Ayala Agudelo Yazmin. Producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor BIOSTAT® A PLUS de 5 litros. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2018. 70 p.

54. Yoo JJ, Choi SP, Kim JY, Chang WS, Sim SJ. Development of thin-film photo-bioreactor and its application to outdoor culture of microalgae. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2013 Jun; 36(6):729-36.

55. Hagen C, Siegmund S, Braune W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*. 2002 Apr 29; 37(2):217-26.
56. Domínguez A, Fábregas J, Otero A. Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Algas*. 2006; 35:4-9.
57. Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of applied phycology*. 2010 Jun. 1; 22(3):253-63.
58. Granda Jara GP. *Producción de Astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2015.).
59. Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New biotechnology*. 2009 Oct. 31; 26(3-4):199-204.
60. Benavente-Valdés JR, Montañez JC, Aguilar CN, Méndez-Zavala A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Acta Química Mexicana*. 2012 Jun; 4(7):1-2.
61. García Martín Laura. Producción biotecnológica de astaxantina a partir *H. pluvialis*. Trabajo de grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2018. 70 p.
62. Martínez García L. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas.
63. Shah, Md, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science* 2016. Vol. 7. 531.
64. Imamoglu E, Sukan FV, Dalay MC. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*. 2007 Sep 1; 1(3).



AGRADECIMIENTOS

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
por el apoyo en la realización de este
proyecto de investigación.

A Oscar Cubillos,
auxiliar del Laboratorio Central.

A SMM INGENIERÍA SAS,
ingeniero Ricardo Alfonso

