

# PROCESOS BIOLÓGICOS EN MICROALGAS Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN  
ANA GRACIELA LANCHEROS DÍAZ  
LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA



UNIVERSIDAD COLEGIO  
MAYOR DE CUNDINAMARCA

SELLO EDITORIAL





PROCESOS BIOLÓGICOS  
EN MICROALGAS Y SU APLICACIÓN  
EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS

**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  
Líder Grupo Bioprocesos y Control

**ANA GRACIELA LANCHEROS**

Bacterióloga y laboratorista clínico  
Maestría en Enseñanza Problemática  
Docente investigadora  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Coinvestigadora en Bioprocesos y Control

**LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA**

Químico  
Ph. D.  
Profesor planta  
Facultad de Ingeniería  
Universidad de La Sabana  
Docente investigador  
Líder Grupo Procesos Agroindustriales (GIPA)

**JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN**

**ANA GRACIELA LANCHEROS DÍAZ**

**LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA**

**PROCESOS BIOLÓGICOS  
EN MICROALGAS Y SU APLICACIÓN  
EN LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS  
DE INTERÉS**



**UNIVERSIDAD COLEGIO  
MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**SELLO EDITORIAL**

*Catalogación en la publicación – Biblioteca Nacional de Colombia*

Camacho Kurmen, Elena, autora

Procesos biológicos en microalgas y su aplicación en la obtención de metabolitos de interés / Elena Camacho Kurmen, Ana Graciela Lancheros Díaz, Luis Eduardo Díaz Barrera. -- Bogotá: Sello Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2025.

144 páginas

Incluye referencias bibliográficas al final de cada capítulo.

ISBN 978-958-5198-37-1 -- 978-958-5198-38-8 (e-book)

1. Microalgas - Cultivos y medios de cultivo 2. Microalgas - Biotecnología I. Lancheros Díaz, Ana Graciela, autora II. Díaz, Luis Eduardo, autor

CDD: 579.8 ed. 23

CO-BoBN- a1155131

© JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

© ANA GRACIELA LANCHEROS DÍAZ

© LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA

© UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Sello Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Carrera 13 No. 38- 29, Edificio San Juan, noveno piso  
selloeditorial@unicolmayor.edu.co  
www.unicolmayor.edu.co

ISBN: 978-958-5198-37-1

ISBN e-book: 978-958-5198-38-8

Queda prohibida la reproducción parcial o total de este libro por cualquier proceso reprográfico o fónico, especialmente por fotocopia, microfilme, offset o mimeógrafo.

Ley 23 de 1982

Corrección de estilo: Delio David Arango Navarro

Diagramación electrónica: Yaneth Guarín A.

Diseño de portada: Vanessa Peña A.

Impresión: GRUPO EDITORIAL IBÁÑEZ

# CONTENIDO

PRÓLOGO.....	17
INTRODUCCIÓN.....	19

## CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE MICROALGAS

INTRODUCCIÓN .....	21
1. GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS .....	21
1.1. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS MICROALGAS.....	24
1.2. TAMAÑO Y FORMA.....	25
1.3. CARGA SUPERFICIAL .....	25
1.4. SEDIMENTACIÓN.....	25
2. CULTIVO DE MICROALGAS .....	25
2.1. LUZ.....	26
2.2. FOTOPERIODO.....	27
2.3. TEMPERATURA .....	27
2.4. FACTORES NUTRICIONALES.....	28
2.4.1. <i>NITRÓGENO</i> .....	28
2.4.2. <i>FÓSFORO</i> .....	28
2.4.3. <i>HIERRO</i> .....	30
2.4.4. <i>SILICIO</i> .....	31
2.4.5. <i>OLIGOELEMENTOS</i> .....	31
2.4.6. <i>VITAMINAS</i> .....	32
2.5. SALINIDAD .....	32
2.6. pH Y CO <sub>2</sub> .....	32

2.7. OXÍGENO DISUELTO.....	33
2.8. MEDIOS DE CULTIVO .....	33
2.8.1. <i>MEDIO DE CULTIVO AGUA RESIDUAL</i> .....	34
2.8.2. <i>BIORREACTORES Y FOTOBIORREACTORES</i> .....	35
2.8.3. <i>CULTIVO FOTOAUTOTRÓFICO</i> .....	38
2.8.4. <i>CULTIVO HETERÓTROFO</i> .....	40
2.8.5. <i>CULTIVO MIXÓTROFO</i> .....	40
2.8.6. <i>CULTIVO FOTOHETERÓTROFO</i> .....	42
3. APLICACIONES .....	43
3.1. PERSPECTIVAS.....	42
3.2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	43
3.3. BIOPRODUCTOS .....	43
REFERENCIAS.....	44

## CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

INTRODUCCIÓN .....	49
1. PIGMENTOS CAROTENOIDES Y FICOBILIPROTEÍNAS.....	49
2. CLOROFILA .....	53
3. BIOMASA.....	53
4. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	54
5. ALIMENTACIÓN Y SALUD HUMANA.....	56
6. ALIMENTACIÓN ANIMAL .....	56
7. BIOFERTILIZANTE.....	57
8. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS .....	57
9. ADITIVOS.....	57
10. APLICACIONES EN COSMÉTICA.....	58
11. CENTROS DE INVESTIGACIÓN DE MICROALGAS .....	58
11.1. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.....	58
11.2. UNIVERSIDAD EAFIT .....	61
REFERENCIAS.....	63

### CAPÍTULO 3

#### EFFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS PARA PRODUCIR COMPUESTOS BIOACTIVOS. CASO PRODUCCIÓN ASTAXANTINA

INTRODUCCIÓN.....	67
1. RUTA BIOSINTÉTICA DE ASTAXANTINA .....	68
CONCLUSIONES .....	80
REFERENCIAS.....	80

### CAPÍTULO 4

#### CONDICIONES DE ESTRÉS EN UN BIORREACTOR PARA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS

INTRODUCCIÓN .....	83
1. BIORREACTORES .....	84
2. DISEÑO DE UN FOTOBIORREACTOR (FBR).....	85
2.1. DISTRIBUCIÓN DE LA LUZ .....	85
2.2. MEZCLADO .....	86
2.3. INYECCIÓN DEL GAS.....	86
2.4. ESCALAMIENTO DE MICROALGAS .....	87
2.5. BIORREACTOR BIOSTAT® A PLUS.....	88
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
3.1. MICROORGANISMO .....	90
3.2. MONITOREO DE LAS CÉLULAS DEL H. PLUVIALIS DURANTE EL CULTIVO	91
3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	91
3.4. SISTEMA DE CULTIVO.....	91
3.5. CONDICIONES DE CULTIVO .....	91
4. RESULTADOS.....	92
4.1. CRECIMIENTO DE LA MICROALGA BAJO LAS CONDICIONES DE ESTRÉS EN EL BIORREACTOR BIOSTAT A PLUS DE 5 LITROS.....	92

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO DURANTE EL CULTIVO.	94
4.3. CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA Y CLOROFILA.....	94
4.4. MEDICIÓN DE ASTAXANTINA POR HPLC .....	94
4.5. MEDIO DE CULTIVO AGUA RESIDUAL .....	99
CONCLUSIONES .....	101
REFERENCIAS.....	101

## **CAPÍTULO 5. MORFOLOGÍA DE LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA**

INTRODUCCIÓN .....	107
1. METODOLOGÍA .....	109
1.1. MICROORGANISMO .....	109
1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	109
1.3. SISTEMA DE CULTIVO.....	110
1.4. CONDICIONES DE CULTIVO .....	110
1.5. DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA.....	110
1.6. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS CELULARES .....	111
1.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS .....	111
2. RESULTADOS.....	111
CONCLUSIONES .....	116
REFERENCIAS.....	117

## **CAPÍTULO 6**

### **IDENTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA PRODUCIDA POR LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

INTRODUCCIÓN.....	121
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	123
1.1. MICROORGANISMO .....	123

1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	123
1.3. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS.....	124
1.4. METODOLOGÍA HPLC .....	124
1.5. EQUIPO.....	126
1.6. REACTIVOS .....	126
1.7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	127
2. RESULTADOS .....	128
2.1. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD .....	129
2.2. LINEALIDAD.....	129
2.3. PRECISIÓN .....	131
2.4. MUESTRAS DE MICROALGAS .....	132
3. DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES.....	136
REFERENCIAS.....	136

## CONCLUSIONES

..... 141

## AGRADECIMIENTOS

..... 142



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Imagen microscópica</i> .....	22
<b>Figura 2.</b>	<i>Cultivo de microalgas</i> .....	24
<b>Figura 3.</b>	<i>Microalga Haematococcus pluvialis</i> .....	24
<b>Figura 4.</b>	<i>Cultivo de microalgas</i> .....	26
<b>Figura 5.</b>	<i>Crecimiento de la cepa UTEX 2505 de H. pluvialis en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5 %</i> .....	35
<b>Figura 6.</b>	<i>Cultivo fotoautótrofo</i> .....	39
<b>Figura 7.</b>	<i>Ruta metabólica fotoheterotrofica. La luz es la fuente de energía</i> ....	42
<b>Figura 8.</b>	<i>Ruta de biosíntesis del carotenoide astaxantina en Haematococcus pluvialis</i> .....	50
<b>Figura 9.</b>	<i>Estructura química de carotenoides presentes en H. pluvialis</i> .....	52
<b>Figura 10.</b>	<i>Estructura química de la clorofila</i> .....	53
<b>Figura 11.</b>	<i>Ruta de síntesis de ácidos grasos de acetyl-CoA vía ACCasa</i> .....	55
<b>Figura 12.</b>	<i>Laboratorio microalgas. Universidad de Antioquia</i> .....	58
<b>Figura 13.</b>	<i>SIU. Universidad de Antioquia</i> .....	60
<b>Figura 14.</b>	<i>Universidad Eafit</i> .....	61
<b>Figura 15.</b>	<i>Cambio morfológico de H. pluvialis. a) Forma vegetativa b) aplanospora c) Célula enquistada roja. Barra 20 µm</i> .....	68
<b>Figura 16.</b>	<i>Ruta de síntesis de carotenoides secundarios en H. pluvialis</i> .....	73
<b>Figura 17.</b>	<i>Factores de estrés que producen el máximo nivel de expresión de genes</i> .....	78
<b>Figura 18.</b>	<i>Expresión de genes</i> .....	79

<b>Figura 19.</b>	<i>Biorreactor Sartorius Stedim System GmbH (Sartorius, 2018) .....</i>	89
<b>Figura 20.</b>	<i>Biorreactor Tecferm de 5 L donde se observa a. mirilla lateral, b. aro de cierre, c. tapa tipo head plate y d. vaso inoxidable.....</i>	90
<b>Figura 21.</b>	<i>Biostat A Plus de 5 litros con cultivo de <i>H. pluvialis</i> en medio RM modificado y alta irradiancia .....</i>	92
<b>Figura 22.</b>	<i>Modelo logístico curva de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> .....</i>	93
<b>Figura 23.</b>	<i>Concentración de astaxantina y clorofila en ug/mL.....</i>	94
<b>Figura 24.</b>	<i>Cromatograma de HPLC del extracto de microalga <i>H. pluvialis</i> productora de astaxantina.....</i>	95
<b>Figura 25.</b>	<i>Crecimiento de la cepa UTEX 2505 de <i>H. pluvialis</i> en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5 % .....</i>	99
<b>Figura 26.</b>	<i>Imágenes microscópicas de células de <i>H. pluvialis</i>. (A) Célula móvil vegetativa verde (macrozoide). (B) Célula palmella vegetativa verde. (C) Acumulación de astaxantina por célula palmella en transición a aplanospora. (D) Astaxantina acumulada por célula aplanospora.....</i>	109
<b>Figura 27.</b>	<i>Cromatograma de estándar de astaxantina.....</i>	129
<b>Figura 28.</b>	<i>Curva de calibración astaxantina .....</i>	130
<b>Figura 29.</b>	<i>Cromatograma de HPLC del extracto de microalga <i>H. pluvialis</i> productora de astaxantina.....</i>	132

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	<i>Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas .....</i>	38
<b>Tabla 2.</b>	<i>Coeficientes del modelo logístico .....</i>	93
<b>Tabla 3.</b>	<i>Condiciones cromatográficas .....</i>	95
<b>Tabla 4.</b>	<i>Trabajos realizados en el Biostat A Plus de 5 litros .....</i>	97
<b>Tabla 5.</b>	<i>Astaxantina por HPLC .....</i>	100
<b>Tabla 6.</b>	<i>Resumen .....</i>	115
<b>Tabla 7.</b>	<i>Condiciones cromatografías .....</i>	128
<b>Tabla 8.</b>	<i>Datos curva de calibración de estándar de astaxantina .....</i>	130
<b>Tabla 9.</b>	<i>Evaluación de precisión del sistema .....</i>	131
<b>Tabla 10.</b>	<i>Muestras con deficiencia de fosfatos .....</i>	133
<b>Tabla 11.</b>	<i>Muestras usando medio de cultivo aguas residuales .....</i>	133
<b>Tabla 12.</b>	<i>Muestras de cultivo realizado en biorreactor Biostat A Plus de 5 Litros .....</i>	134



## PRÓLOGO

De acuerdo con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 1992, pp. 3-4), la biodiversidad se define como “la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”. Esta definición permite entender la biodiversidad como un sistema, territorialmente explícito, que se caracteriza no solo por tener estructura, composición (expresada en los diversos arreglos de los niveles de organización de la biodiversidad, desde los genes hasta los ecosistemas) y un funcionamiento entre estos niveles, sino que también tiene una relación estrecha e interdependiente con los sistemas humanos a través de un conjunto de procesos ecológicos que son percibidos como beneficios (servicios ecosistémicos) para el desarrollo de los diferentes sistemas culturales humanos en todas sus dimensiones (político, social, económico, tecnológico, simbólico, mítico y religioso).

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, nutracéutica, alimenticia y en la acuicultura. Además, se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunorreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena.

En este libro se abordan, en el capítulo 1 las generalidades del cultivo de microalgas; capítulo 2 la producción de compuestos bioactivos, el capítulo 3 se ocupa del efecto de factores de estrés para producir compuestos bioactivos, caso astaxantina; el capítulo 4 se refiere a las condiciones de estrés en un biorreactor para producción astaxantina a partir de *H. pluvialis*. En el capítulo 5 se presenta la morfología de la microalga y su relación con la producción de astaxantina y en el capítulo 6 se aplica la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para identificar la presencia de astaxantina.

El *H. pluvialis* es una microalga verde de gran interés para la industria basada en su capacidad para producir grandes cantidades de astaxantina, principalmente cuando es expuesta 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.

Esta investigación tiene impactos desde el punto de vista interinstitucional porque se dará paso a la investigación aplicada con participación de entidades externas para transferencia de conocimiento y ayuda técnica, fortaleciendo la interdisciplinaria, con la participación de diferentes profesionales expertos en microbiología, biotecnología, farmacia e ingeniería, pertenecientes al Grupo de investigación Bioprocesos y control de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y al grupo de investigación Procesos Agroindustriales (GIPA). El impacto interregional se dará por la asesoría en cooperación científica de otros centros de investigación, como la Universidad de La Sabana, Instituto Sinchi y el Grupo de investigación de microalgas de la Universidad de Antioquia, pensando en una futura alianza Universidad-Empresa-Estado para transferencia de este conocimiento, así como la participación en redes de ayuda tecnológica.

Se evalúan el crecimiento, la producción de pigmentos clorofila y astaxantina bajo condiciones de estrés, como intensidad de luz y deficiencia de nitrógeno, para establecer las condiciones de escalamiento del cultivo de esta microalga en el que permitan obtener mayor cantidad del pigmento.

Se agradece al evaluador por sus comentarios: el enfoque en microalgas, especialmente en *H. pluvialis* para la producción de astaxantina bajo condiciones de estrés, es un área de investigación activa debido a su relevancia en industrias como la farmacéutica, nutricional y cosmética. Este trabajo aborda el cultivo de microalgas, optimiza las condiciones para la producción de astaxantina y utiliza tecnologías como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de manera novedosa o mejorada respecto a estudios previos. La investigación promete contribuir al entendimiento de cómo las condiciones de estrés afectan la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, lo cual es relevante para la biotecnología y la ingeniería bioquímica. El éxito en el incremento de la producción de astaxantina tendría implicaciones significativas para su comercialización y aplicaciones industriales. Dada la creciente demanda de productos naturales y la búsqueda de procesos sostenibles para su producción, este documento es altamente relevante y de actualidad. La astaxantina es un antioxidante potente con múltiples aplicaciones, y mejorar su producción a través de microalgas es un tema de gran interés. Los resultados tienen el potencial de impactar positivamente en sectores industriales y científicos, promoviendo avances en la producción sostenible de compuestos bioactivos.

## INTRODUCCIÓN

La realización de esta investigación aprovechó 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 promisoriosa para mejorar la producción de metabolitos de interés se hace conociendo los procesos biológicos en microalgas y 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 de microalgas como *H. pluvialis* tiene sus dificultades en el momento del cultivo y para obtenerse el pigmento conocido como astaxantina 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.

Los carotenoides son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica reemplazando colorantes, en su mayoría importados, de origen químico, dañinos para la salud y con impacto en el medio ambiente incrementando tanto los costos de producción, como el costo final del producto.

Es por esto por lo 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, las microalgas son fuente de estos compuestos bioactivos, como es el caso de la microalga *H. pluvialis* que acumula en especial el carotenoide astaxantina cuando es sometida a condiciones de estrés.

El carotenoide astaxantina es el más importante desde el punto de vista biotecnológico por su uso en alimentación animal y humana, así como en las industrias farmacéutica, cosmética, nutracéutica y en la acuicultura. 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 de 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, colores de luz, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, sales y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel. Por lo tanto, es necesario establecer cuáles son las condiciones de estrés adecuadas para la producción de astaxantina durante el escalamiento del cultivo de la microalga usando biorreactores.

El *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, utilizando para ello biorreactores de forma tubular y de material de vidrio que facilita la entrada y distribución de luz y el control de las condiciones de cultivo, como mezclado, pH, distribución de gases como CO<sub>2</sub> y temperatura.

De igual forma, aprovechando 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.

La importancia de los resultados publicados son la reunión de los trabajos de grado y de investigación realizados para encontrar las condiciones de estrés adecuadas para producir astaxantina en la microalga *H. pluvialis*, para incluirla en diferentes formulaciones por sus actividades como compuesto bioactivo y pigmento para desarrollar una formulación útil en diferentes áreas como la farmacéutica, nutracéutica, cosmética, alimentaria, acuicultura y textil.

# CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE MICROALGAS

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas 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 las industrias farmacéutica, nutracéutica, 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, inmunorreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena.

Por ejemplo, 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 USD 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 de astaxantina a partir de microalgas como *H. phuvialis*, que acumula cantidades importantes (más del 4%/g de peso seco) y de mejor calidad que las obtenidas por otras fuentes como levaduras y plantas.

La acumulación del pigmento en *H. phuvialis* 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.

Es importante resaltar que esta microalga tiene sus dificultades en el momento del cultivo y para obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo. De igual forma, un mayor entendimiento de las bases moleculares de la relación –condiciones de estrés-inducción– acumulación de astaxantina en *H. phuvialis*, podría ser útil para aumentar la productividad de astaxantina.

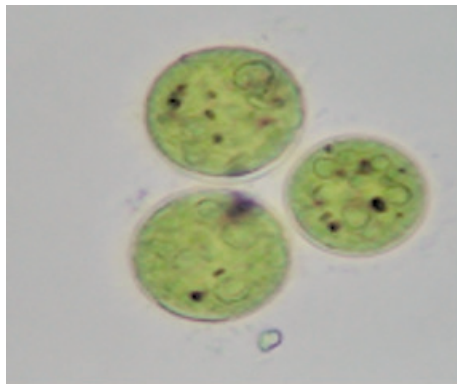
### 1. GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son un grupo grande y diverso de organismos unicelulares fotoautótrofos y organismos heterotróficos (**figura 1**), que han atraído mucha

atención mundial en los últimos años por los productos naturales valiosos que producen, su capacidad para remediar efluentes y su potencial como cultivos energéticos. Los métodos modernos de cultivo de microalgas deben sus orígenes a microbiólogos pioneros del siglo XIX, que primero desarrollaron métodos para el aislamiento y cultivo de especies de fitoplancton solo con soluciones de sal inorgánica.

Hoy en día, el cultivo de microalgas es un proceso clave en peces marinos y acuicultura de mariscos, proporcionando una fuente directa de nutrición para las fases larvares de crustáceos y moluscos bivalvos y como parte del zooplancton como alimento para larvas de peces marinos. Las microalgas también son cultivadas para la producción de extractos específicos, tales como b-caroteno de *Dunaliella salina*. Novedades en ingeniería de bioprocesos y mayor comprensión de iniciativas para el cultivo masivo de microalgas, las hace interesantes para las aplicaciones y obtención en diferentes industrias como bioenergía, piscicultura, nutracéutica, alimentario, cosmético e industrial.

**Figura 1.** *Imagen microscópica*



Las algas son un grupo diverso de organismos que pueden realizar eficientemente la fotosíntesis. Sobre las bases de la morfología y el tamaño, las algas pueden subdividirse y estar clasificadas en dos tipos de categorías: macroalgas y microalgas. Las macroalgas son varias células que están organizadas en estructuras similares a las raíces, tallos y hojas de plantas superiores. Las microalgas hacen parte de un grupo muy diverso que se encuentran presentes en la mayoría de los ecosistemas de la Tierra, desde los ambientes acuáticos, tanto en aguas marinas como en aguas dulces y aguas termales, hasta en ambientes desérticos, así como en la nieve y en el hielo. Bajo el nombre de nombre de microalgas se incluyen organismos con dos tipos de estructura celular:

1. Las microalgas que presentan una estructura celular procariota, se encuentran en la división *Cyanophyta* (cianobacterias) y *Prochlorophyta*;
2. Las microalgas que presentan una estructura celular eucariota representan la División *Chlorophyta*, *Euyglenophyta*, *Rhodophyta*, *Prymnesiophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chysophyceae*, *Xanthophyceae*, etc), *Cryptophyta* y *Dinophyta* de acuerdo con la clasificación de Hoek, Mann y Janhs (1995).

En consecuencia, existen cuatro grupos de algas que son: las algas verdes (*Chlorophytaceae*), las diatomeas (*Bacillariophyceae*), las algas verde-azules (*Cianoficeas*) y las algas doradas (*Chrysophyceae*). De acuerdo con la estimación reportada, existen entre 200.000 y 800.000 especies de las cuales solo alrededor de 35.000 especies han sido descritas.

Las microalgas contienen algunos materiales útiles como lípidos, pigmentos, polímeros, y fitonutrientes. La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (pigmentos, alimento, por ejemplo) y/o si el cultivo es para ficorremediación. Las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros biológicos. En un sistema cerrado se pueden lograr cultivos monoespecíficos aislados del medioambiente (**figura 2**).

Así mismo, se han identificado otros criterios morfológicos y citológicos, como la aparición de las células flageladas, la estructura de los flagelos, los procesos de formación del núcleo en la división celular, la presencia y caracterización de membranas del cloroplasto y la posible relación entre el retículo endoplasmático y la membrana nuclear. Además de los criterios anteriormente mencionados, las técnicas de biología molecular actuales se han utilizado para la clasificación de las microalgas.

Las microalgas en un cultivo para ficorremediación deben cumplir con 3 condiciones: alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto; y buena capacidad para formar agregados para una cosecha por simple gravedad.

Además, altos niveles de componentes celulares valiosos (por ejemplo, lípidos para generación de biodiesel) también podrían ser deseables. Algunas especies presentes en aguas contaminadas son utilizadas en tratamientos de aguas residuales por su elevada tolerancia. Además, varias de estas también son utilizadas para fines comerciales específicos.

**Figura 2.** *Cultivo de microalgas*

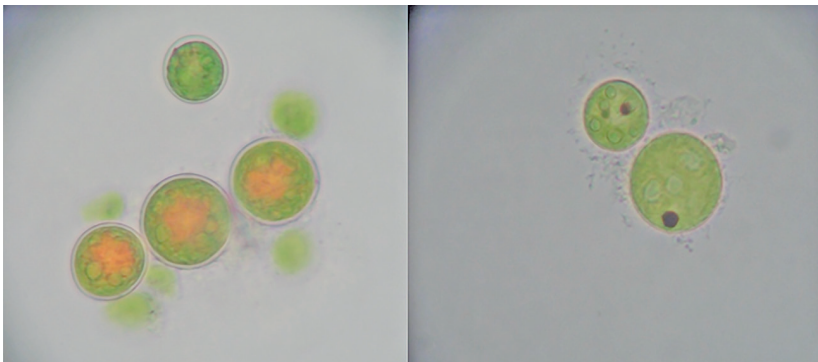


Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Haematococcus* y *Stigeoclonium* han sido registrados en aguas residuales desde distintas procedencias. Varias de estas son comercialmente interesantes para la alimentación humana y/o animal, la obtención de biocombustibles, aceites esenciales pigmentos, entre otros usos.

### 1.1. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS MICROALGAS

Las principales propiedades físicas que son útiles en el diseño de métodos para separar las células del agua son la diferencia de densidad, granulometría, propiedades de la superficie de la célula y cómo éstos pueden variar de acuerdo célula fisiológica estado y ciclo de vida etapa (p. ej. espinas, extracelulares polímeros).

**Figura 3.** *Microalga Haematococcus pluvialis*



## 1.2. TAMAÑO Y FORMA

Las microalgas tienen un tamaño desde ca 2 a 200  $\mu\text{m}$  para las células individuales, la forma incluye esferas, barras o filamentos. La densidad de microalgas varía de ser boyantes (e.g. cianobacterias) a unos  $1150 \text{ kg m}^{-3}$  para diatomeas.

## 1.3. CARGA SUPERFICIAL

En condiciones fisiológicas es típicamente negativa, con potencial zeta que va desde 25 hasta 240 mV. La alta carga negativa crea una fuerza repulsiva entre las células de microalgas en suspensión. La elusión de estas fuerzas es la base de la tecnología de floculación.

El control y la comprensión de las interacciones entre células de microalgas es importante en el diseño de reactores y la tecnología de la separación primaria y la manipulación de las características de la superficie de las células y el proceso de medio ambiente deben ser un objetivo importante de la investigación.

## 1.4. SEDIMENTACIÓN

Esta característica en las microalgas depende de las propiedades físicas de estos materiales; la velocidad de sedimentación (para arriba) en condiciones diluidas ideales (partículas no esféricas que obran recíprocamente) puede ser descrita por la siguiente ecuación (SVAROVSKY, 1990):

$$u_p = \left( \frac{d^2 (\rho_s - \rho) g}{18 \mu_c} \right)$$

Donde  $\mu_p$  es la velocidad de sedimentación de la partícula ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $d$  es el diámetro de la partícula ( $\text{m}$ ),  $\rho_s$  es densidad de la partícula ( $\text{kg m}^{-3}$ ),  $\rho$  es la densidad del fluido ( $\text{kg m}^{-3}$ ),  $g$  es la aceleración debido a la gravedad ( $\text{m s}^{-2}$ ) y  $\mu_c$  es la viscosidad de la suspensión ( $\text{Ns/m}^2$ ).

## 2. CULTIVO DE MICROALGAS

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.

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.

## 2.1. LUZ

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo. En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (**figura 4**).

**Figura 4.** *Cultivo de microalgas*



Los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las principales horas del día debido a la alta intensidad lumínica. Bajo ciertas condiciones, los cultivos con mayor densidad celular ( $> 3 \text{ g L}^{-1}$ ) son capaces de utilizar la luz incidente con mayor eficiencia en comparación con cultivos convencionales diluidos.

Esto se debe al autosombreado, donde las células más cercanas a la superficie dan sombra a las capas inferiores, con células más alejadas de la superficie. Un sistema de mezcla eficiente permitirá un acceso periódico de todas las células a la luz, de lo contrario, será perjudicial puesto que la intensidad lumínica decrece con el aumento de la turbidez. En sistemas HRAP (High Rate Algal Ponds), el mecanismo de paletas provee una eficiente mezcla vertical permitiendo una exposición intermitente de las células a la luz.

Los 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 y otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis disminuyen, mientras los carotenoides secundarios (zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, astaxantina) se incrementan, los cuales sirven como agentes fotoprotectores. Estos carotenoides a menudo se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglóbulos de plastidios o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, jugando roles en prevenir el exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética.

## 2.2. FOTOPERIODO

Las condiciones de luz afectan directamente el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas (duración e intensidad). Las microalgas necesitan un régimen de luz / oscuridad para llevar a cabo la fotosíntesis, necesitan la luz para la fase fotoquímica para producir Adenosín Trifosfato (ATP) y Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NADPH), mientras que en la oscuridad se necesita para llevar a cabo la fase bioquímica donde se sintetizan moléculas esenciales para el crecimiento.

## 2.3. TEMPERATURA

Una óptima temperatura para el crecimiento de la microalga es cuando la célula tiene el mínimo tamaño celular y el mínimo contenido celular de carbono

y nitrógeno, mientras en una temperatura baja o alta del nivel óptimo quizás se incrementa el volumen celular y el contenido bioquímico, lo cual quiere decir que se necesita más carbono y nutrientes para producir una célula a la misma tasa de crecimiento a una temperatura no óptima.

La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C.

En un sistema de cultivo cerrado, la temperatura se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, etc. Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es muy difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos transparentes.

## 2.4. FACTORES NUTRICIONALES

### 2.4.1. NITRÓGENO

El nitrógeno es, al lado de carbono, el nutriente más importante. Puede ser utilizado por las algas en forma orgánica (urea) o inorgánica (nitrito, nitrato, amoníaco). El nitrito ( $NO_2^-$ ) es tóxico cuando se usa en grandes cantidades (en mayores concentraciones) y por lo tanto no es recomendado usarlo. El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato ( $NO_3^-$ ) o como amonio ( $NH_4^+$ ). Este también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas.

Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20 %, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40% y también se ha observado el aumento en la acumulación de carotenoides usándose como factor de estrés para microalgas como *H. pluvialis*. Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, a menudo reduce la producción de algas, lo que sugiere que las 2 condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes.

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 este elemento. Cuando la microalga está

creciendo bajo condiciones limitadas de nitrógeno, el efecto más golpeado es la degradación específica y activa de ficobilisomas.

El nitrógeno tiene un marcado efecto positivo sobre el crecimiento, debido a que la microalga asimila varias fuentes de ese elemento, como sales de amonio, nitrato y urea. El nitrógeno es un esencial elemento para el desarrollo del crecimiento de la microalga, reproducción y otras actividades fisiológicas. El amonio no es la única fuente preferida de nitrógeno para la microalga, pero es la fuente más eficiente energéticamente.

Las condiciones del medio de cultivo son un importante factor en el rendimiento del alga. Una cantidad de nitrato disminuye sobre el día 15 teniendo un efecto directo sobre la disminución de clorofila en el medio de cultivo. Mientras el nitrato es preferido al amonio para crecimiento de una microalga como el *H. pluvialis*, la preferencia del nitrato en esta especie es controlada por la cepa, edad, inóculo y pH del medio.

La mejor fuente de nitrógeno para crecimiento y acumulación de carotenoides es el nitrato, ya que la carotenogénesis es ligeramente inhibida en los cultivos donde el crecimiento se realiza con amonio y urea. La gran disponibilidad de nutrientes para el alga, directamente se refleja en un tiempo alto de duplicación y rápida velocidad de crecimiento.

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*.

La tasa de crecimiento es generalmente la misma para cada fuente de nitrógeno. La mejor asimilación de nitrógeno se ha logrado usando la urea orgánica ( $(NH_2)_2CO$ ). El uso de fuentes inorgánicas como el amonio ( $NH_4^+$ ) es más recomendado que el nitrato ( $NO_3^-$ ). Sin embargo, las altas concentraciones de amoníaco ( $> 0,5$  a  $1,0 \mu\text{mol/L}$ ) inhiben la absorción de nitratos. La asimilación de nitrógeno inorgánico está altamente relacionada con el pH, ya que la absorción de nitrógeno cambia el pH. El amoníaco como fuente de nitrógeno puede disminuir a un bajo pH de 3,0. Las células solamente se ocupan de reducir el amoníaco ( $NH_4^+$ ) a nitritos ( $NO_2^-$ ) mediante enzimas antes de la incorporación.



#### 2.4.2. FÓSFORO

El fósforo es otro macronutriente que juega un importante rol en el proceso metabólico celular por la formación de algunos componentes estructurales y

funcionales requeridos para el crecimiento normal y desarrollo de la microalga. Los ortofosfatos son incorporados como componentes orgánicos a través de la fosforilación. El fosfato inorgánico se presenta en las células en forma de polifosfatos, acumulándose en gránulos. Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en el crecimiento celular normal bajo suficiente fosfato, pero desaparece en deficiencia de fosfato.

Las formas del fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  son las fuentes de fósforo inorgánicos más importantes para las algas. Sin embargo, las algas pueden obtener el fósforo a partir de compuestos orgánicos, que tiene que ser hidrolizado por fosfatasas extracelulares. Este proceso es comparativamente lento y el fósforo orgánico no está disponible todo el tiempo. La concentración ideal de fósforo en el medio de crecimiento varía entre las diferentes especies.

La concentración media (tolerancia) está en un rango de 50  $\mu\text{g/l}$  a 20  $\mu\text{g/l}$ . La tasa de absorción de fósforo es influenciada por factores tales como el pH y la concentración de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  y varios metales pesados. Similar a la inanición de nitrógeno, una deficiencia de fósforo aumenta la proporción de los lípidos producidos.

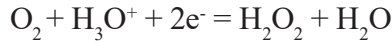
El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento y causante de estrés generando producción de carotenoides como en la microalga *H. pluvialis*. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HPO}_4^-$ .

### 2.4.3. HIERRO

El hierro juega un rol importante en la composición bioquímica celular por sus propiedades redox y su implicación en procesos fundamentales como la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno y síntesis de ADN. La deficiencia de hierro puede inducir varios cambios bioquímicos.

En las microalgas y cianobacterias se observó que contienen Fe en forma de ferredoxina, un componente de la cadena fotosintética de transporte de electrones, la cual se redujo notablemente mientras que el contenido de flavodoxina, un transportador de electrones que no contiene Fe, aumentó en las células durante los períodos de baja disponibilidad de hierro (Fe). El exceso de hierro en cultivos de algas, por el contrario, puede provocar un estrés oxidativo que conduce a una variedad de cambios fisiológicos. En el nivel celular,  $\text{Fe}^{+2}$  puede reaccionar con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que es producido por las células de microalgas, para generar radicales de hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) por la reacción de Fenton:

En este proceso se genera  $\text{H}_2\text{O}_2$  “in situ” a través de la siguiente reacción:



Y se regenera el  $\text{Fe}^{2+}$  a través de la reacción:



Se ha reportado que el acetato que induce la formación de la astaxantina en *H. pluvialis* fue notablemente mejorado por la adición de hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Sugirieron que el  $\text{Fe}^{+2}$  posiblemente podría funcionar como un generador  $\text{OH}^-$  a través de la reacción de Fenton catalizada por hierro, y que  $\text{OH}^-$  u otro oxígeno activo en especies ( $\text{O}_2$ ,  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o  $\text{AO}^{2-}$ ) puede desempeñar un papel esencial en el aumento de la carotenogénesis en el alga.

#### 2.4.4. SILICIO

Es necesario para el crecimiento de diatomeas (el silicio hace parte de la pared celular). Usualmente, el ácido ortosilísico ( $(\text{OH})_4$ ) es usado en medio artificial. La asimilación se lleva a cabo en la última fase de crecimiento celular (cuando son construidas las paredes de las células).

#### 2.4.5. OLIGOELEMENTOS

Son cantidades muy pequeñas (micro, nano, picogramos por medio litro) que necesitan de nutrientes traza para un crecimiento óptimo. Los elementos más importantes son manganeso, níquel, zinc, boro, vanadio, cobalto, cobre y molibdeno. Las propiedades de los elementos traza esenciales son los siguientes:

- Influir en el crecimiento de algas en un número representativo de las especies.
- Tener un efecto positivo en el crecimiento total.
- Mostrar un efecto fisiológico directo sobre el crecimiento de algas.
- No puede ser sustituido por otro elemento.
- Mostrar signos reversibles de la deficiencia en las culturas que carecen de este elemento.

#### 2.4.6. VITAMINAS

Algunas algas necesitan vitaminas adicionales para un crecimiento óptimo. Las más comunes son las vitaminas B12, tiamina y biotina. Las concentraciones pueden variar desde 1/10 a 1/100ng/L.

#### **Otros macro y micronutrientes, quelatos y agua**

Existen compuestos orgánicos que pueden ser utilizados en la nutrición de las algas distintos al C, N y P. También son importantes el S, K, Na, Fe, Mg, Ca y oligoelementos como el B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V y Se, tal como se refleja en la composición elemental de las algas.

#### 2.5. SALINIDAD

Algunas microalgas son capaces de acumular moléculas pequeñas de sustancias osmorreguladoras (osmotocantes) en respuesta a un incremento en la salinidad o presión osmótica del ambiente. Cantidades de osmotocantes encontrados en microalgas son polioles. Los más comunes polioles son: glicerol, manitol, galactitol, sorbitol, sucrosa y glicerol galactosidasa.

#### 2.6. pH y CO<sub>2</sub>

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO<sub>2</sub>. Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas. Por encima o debajo de este, presentan un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas.

El pH puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO<sub>2</sub>, o incluso, con adición de ácido o base permitiendo, además, suministrar CO<sub>2</sub> necesario para cultivos de alta productividad.

Las necesidades de CO<sub>2</sub> pueden ser considerables, por lo que los costos asociados pueden ser también elevados para un cultivo comercial, de ahí la importancia de buscar una forma económica de mitigar estos costos. Así, se han realizado variados estudios sobre las capacidades de diferentes microalgas para la fijación de CO<sub>2</sub> desde diversas fuentes gaseosas, considerándose altamente eficientes en este proceso.

De esta manera, se ha sugerido la creación de cultivos comerciales para trabajar en conjunto con fuentes generadoras de  $\text{CO}_2$ , como cogeneradores. También han sido utilizadas en la depuración de biogás a partir de digestión anaerobia, limpiando el gas resultante de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  y elevando su capacidad calorífica.

La adición de  $\text{CO}_2$  ha demostrado mejorar la productividad en polihidroxicarbohidratos a escala experimental en tratamiento de aguas residuales, aumentando la productividad incluso a más del doble. Se trata de hecho, de una práctica estándar en todos los sistemas para producción de algas comerciales.

En el cultivo de la microalga *H. pluvialis* se ha utilizado una cantidad de  $\text{CO}_2$  al 5 % para el cultivo de esta durante la obtención de biomasa y subproductos como los pigmentos clorofila y astaxantina.

## 2.7. OXÍGENO DISUELTO

La intensa fotosíntesis realizada durante el día en sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto a saturación  $> 200\%$ . Se cree que una elevada saturación podría afectar la productividad de algas. Se ha determinado que a una saturación del 200 % existe una reducción del 17 % en la productividad, mientras que a 300 % se reduce en un 25 %. Todavía se requiere más investigación para demostrar el efecto de altos niveles de oxígeno.

## 2.8. MEDIOS DE CULTIVO

Estos medios se caracterizan por incluir diversos micronutrientes y macronutrientes de origen inorgánico. Dentro de los micronutrientes se destacan sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cloro, azufre en concentraciones de 1-100 mg/L y dentro de los macro nutrientes se destacan carbono, hidrógeno, oxígeno y fósforo en concentraciones de 1-100 mg/L, además se encuentran elementos traza como manganeso, cobalto, níquel, vanadio, boro, cobre, zinc y molibdeno en concentraciones menores a 1 mg/L, y también se incluyen vitaminas, aminoácidos y otro tipo de compuestos como extracto de levadura.

Otra condición a tener en cuenta en el cultivo es el manejo de un pH que va de 6,3 a 6,8 (medio Kobayashi), hasta un pH 7,1 – 7,4 en medio BG-11, se maneja una temperatura promedio de 20 a 25° C y una intensidad luminosa de 3,8 a 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , con ciclos de luz: oscuridad en algunos casos 12 h (luz baja): 12h, durante un tiempo de 3 a 4 días, hasta obtener una densidad celular del orden de  $10^5$  células/mL.

Algunos cultivos se dejan sin aireación y con agitación manual una vez al día y otros se dejan con iluminación continua y aireación. Se manejan diversos

cultivos como el autotrófico, el cultivo foto autotrófico, el cultivo mixotrófico-fotoheterótrofo y cultivo heterotrófico.

La eficiencia de la incorporación de carbono inorgánico u orgánico a los cambios en biomasa durante el crecimiento fotosintético dependen de: la especie de microalga, intensidad de la luz, fuente de energía y carbono y la fase de crecimiento.

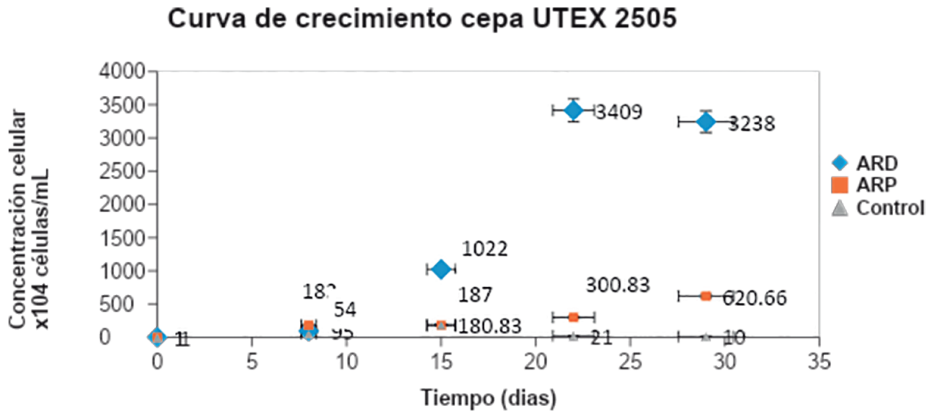
Los cultivos de algas están expuestos a una variedad de cambios en las condiciones ambientales como: ciclo luz/oscuridad, variación en luz, temperatura, pH, factores nutricionales (nitrógeno, fósforo, hierro), salinidad, fuentes de carbono. Es importante además tener en cuenta los efectos sinérgicos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

### 2.8.1. *MEDIO DE CULTIVO AGUA RESIDUAL*

Se debe tener en cuenta que realizar el cultivo de esta microalga para su consecuente producción de pigmento a escala industrial en medios convencionales basados en sistemas de cultivo abiertos y cerrados no es suficiente; es por ello que se plantea la opción del cultivo en un medio a partir de aguas residuales que son un recurso que incluye líquidos y sólidos acuáticos de uso doméstico o comercial, así como otras aguas que se han utilizado en actividades del hombre y cuya calidad ha sido degradada, pero que alberga un amplio valor nutricional necesario para el crecimiento y la producción de biomasa de *H. pluvialis*, caracterizándose por ser una alternativa eco- amigable.

Se determinó que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas a concentración de 12,5 % presentó mayor tasa de crecimiento celular con la cepa UTEX 2505, obteniendo una concentración celular de  $3,41 \times 10^7$  células/mL al día 22. En medio con agua residual porcina, la cepa UTEX 2505 alcanzó una concentración celular máxima de  $6,21 \times 10^7$  células/mL en el día 29, mientras que el control tuvo una concentración celular máxima de  $1,87 \times 10^6$  células/mL en el día 15 (ver **figura 5**).

**Figura 5.** Crecimiento de la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5 %



Nota. QUINTERO (2020).

Según el modelo logístico ajustado al crecimiento de la microalga, el medio de cultivo a partir de agua residual porcina con la cepa UTEX 2505 tuvo la mayor velocidad de crecimiento con 0,030 células/ hora (datos no mostrados).

### 2.8.2. BIORREACTORES Y FOTOBIORREACTORES

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 (LÓPEZ, 2010).

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 (LÓPEZ y ROJAS, 2010):

- **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 abiertos.

Las principales ventajas que ofrece el uso de biorreactores son:

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 (BENAVENTE *et al.*, 2012).

Los aspectos claves en el diseño son:

1. Distribución de la luz.
2. Mezclado.
3. Inyección de gas.
4. 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<sub>2</sub>, mantener temperatura y pH óptimos (GÓMEZ *et al.*, 2014).

Respecto a los fotobiorreactores, valga decir que son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas (SIPAUBA *et al.*, 2013), 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 (GÓMEZ *et al.*, 2014).

Los fotobiorreactores poseen dos tipos de diseños diferentes, fotobiorreactores abiertos, en los cuales el cultivo se encuentra en contacto con la atmósfera, 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<sub>2</sub> (GÓMEZ *et al.*, 2014).

- **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<sub>2</sub> y la eliminación de O<sub>2</sub> (KAEWPINTONG *et al.*, 2007).

- **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 (KAEWPINTONG *et al.*, 2007).

- **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 (KAEWPINTONG *et al.*, 2007).

El 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 (ver **figura 2**).

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. 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 CO<sub>2</sub> o nitrógeno (SARTORIUS, 2009).

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.

### 2.8.3. CULTIVO FOTOAUTOTRÓFICO

La eficiencia de la incorporación de una fuente de carbono inorgánico y orgánico para los cambios de biomasa durante el crecimiento fotosintético, dependen de: especie del alga, intensidad de la luz, fuente de energía y carbono (orgánico o inorgánico) y fase de crecimiento (**tabla 1**).

**Tabla 1.** Fuentes de energía y carbono en diferentes metabolismos encontrados en microalgas

Metabolismos	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fotoautótrofo	Luz	Inorgánico
Heterótrofo	Compuestos orgánicos	Inorgánico
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánico
Mixotrofo	Luz y compuestos orgánicos	Inorgánico y orgánico

Metabolismo	Ecuación estequiométrica
Fotoautótrofo	$\frac{H}{2} O + \frac{HCO}{3}^{-} \xrightarrow{h\nu} C(\text{biomasa}) + \frac{1}{2} O_2 + 3OH^{-}$ <p style="text-align: right;">Incremento del pH <math>\Rightarrow</math></p>
Heterótrofo	$(1+a) \frac{CH_2O}{2} + O_2 \xrightarrow{\text{del pH}} C(\text{biomasa}) + a \frac{CO_2}{2} + (1+a) \frac{H_2O}{2}$ <p style="text-align: right;">Disminución <math>\Rightarrow</math></p>
Mixotrófico	$b \frac{HCO_3^{-}}{3} \xrightarrow{h\nu} c \frac{CH_2O}{2} + (b + (c-a)) C(\text{biomasa}) + 3 OH^{-} + a \frac{CO_2}{2}$ <p style="text-align: right;">Los cambios de pH no son significantes <math>\Rightarrow</math></p>

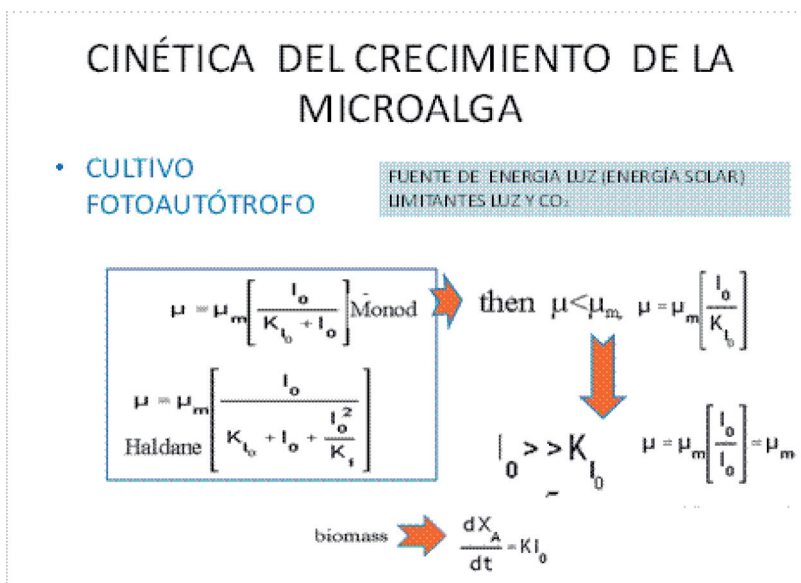
El cultivo intensivo de microalgas ha sido posible en gran medida debido al desarrollo de nuevos diseños de fotobiorreactores, en sistemas abiertos y cerrados. Dado a que la mayoría de los sistemas de producción industrial de biomasa de microalgas ha llegado a su límite, debido a la baja densidad celular, que incluye baja productividad, se han construido fotobiorreactores de vidrio transparente y policarbonato, con iluminación artificial (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2012). Entre las microalgas se reportan diferentes formas de metabolismo: fotoautótrofo,

heterótrofo, mixotrofo, amfitrofo, fotoheterótrofo y autótrofo. El metabolismo mixotrófico y heterotrófico en microalgas fue descubierto recientemente y se confirmó únicamente en algunas cepas, como *Spirulina* SP y *H. phuvialis*.

- **Cultivo fotoautótrofo**

Utiliza fuente de energía luz (energía solar) y tienen como limitantes la luz y el contenido de CO<sub>2</sub>, la cinética del crecimiento de la microalga se da por las ecuaciones de Monod y Haldane (**figura 6**).

**Figura 6.** Cultivo fotoautótrofo



Existen cepas de microalgas que simultáneamente pueden usar fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Esta flexibilidad de cambiar entre diferentes tipos de metabolismo refleja las capacidades de adaptación de cepas de microalgas mixotróficas y la posibilidad de ajustar a las condiciones ambientales (BECKER, 1994).

En el crecimiento de *Chlorobiaceae*, microalga que utiliza la luz como fuente de energía única para conducir la fotólisis, la energía producida en esta reacción se utiliza para la reducción de dióxido de carbono. Esto significa que se producen diferentes procesos metabólicos. En el metabolismo mixotrófico, ambos procesos: fotoautotrófico y heterótrofo ocurren simultáneamente dentro de una sola célula.

#### 2.8.4. CULTIVO HETERÓTROFO

Utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía para el cultivo de microalgas. Los compuestos orgánicos pueden ser glucosa, acetato, peptona. Las limitaciones de este cultivo son la existencia de una fase lag o de adaptación extremadamente larga y cambios de pH; como ventajas se tiene que se puede utilizar en cultivos a gran escala.

En condiciones heterotróficas, la energía necesaria para el crecimiento se suministra a través de la respiración con el uso de fuente de carbono orgánico como sustrato. En estos dos casos se utilizan diferentes fuentes de energía. Esto significa que se producen diferentes procesos metabólicos.

$$Y_{kJ} = \frac{1}{(-\Delta H_a) + (-\Delta H_o) / Y_{x/o}}$$

$$\Delta ATP_T = \Delta ATP_{Glu}$$

#### 2.8.5. CULTIVO MIXÓTROFO

Mixotrofia es un proceso doblemente limitado: el sustrato de carbono orgánico y la irradiación son los dos factores más importantes que afectan al crecimiento microbiano. El cultivo mixotrófico es limitado por la intensidad de luz baja o de alta y baja o alta concentración de sustrato de carbono orgánico.

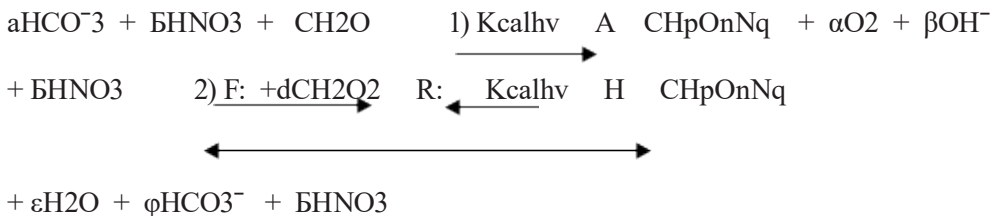
El metabolismo mixotrófico, incluye ambos procesos: fotoautótrofo y heterótrofo ocurren simultáneamente dentro de una sola célula. La mixotrofia y el metabolismo heterotrófico en microalgas fue descubierto recientemente y se confirmó únicamente en algunas cepas, como la *Spirulina* sp. Existen cepas de microalgas que simultáneamente pueden usar fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Esta flexibilidad de cambiar entre diferentes tipos de metabolismo refleja las capacidades de adaptación de las microalgas en su metabolismo mixotrófico y la posibilidad para ajustarse a las condiciones ambientales.

Desde la década de 1960 se ha demostrado que la microalga *Haematococcus* puede cultivarse mixotróficamente sobre acetato. El uso de metabolismo mixotrófico y crecimiento heterotrófico utilizan acetato de sodio como fuente de carbono orgánico.

Se ha encontrado tasas de crecimiento mejoradas con acetato y se han recomendado cultivos mixotróficos y sistema de cultivo heterotrófico para aplicaciones comerciales, también es cierto que algunos trabajos han reportado densidades bajas de células y crecimiento lento de células cuando el crecimiento es llevado a cabo por lotes, por el contrario, los suplementos de acetato inducen el aumento en el número de quistes utilizando un factor de 20 y 12 en los cultivos con acetato de 12 mM de aprox.  $35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $85 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

La suplementación de acetato aumenta el crecimiento vegetativo de las células verdes e induce la formación de quistes. Sin embargo, el enquistamiento se retarda cuando se añade acetato junto con una alta concentración de nitrato, lo cual sería una indicación de que el enquistamiento es accionado por una relación C/N alta y no solo por una concentración determinada de acetato. La fuente de energía es la fotosíntesis y los compuestos orgánicos y  $\text{CO}_2$  son esenciales.

- Hay un metabolismo fotolitógrafa heterótrofo.
- Las células mixotróficas adquieren la energía por catabolismo de compuestos orgánicos vía respiración y convierten la energía lumínica en energía química vía fotosíntesis.



F significa adelante y R las reacciones reversas.

Las fuentes de carbono pueden ser glucosa, peptona, arginina, ácido aspártico, leucina, prolina, ácidos orgánicos y no hay fotoinhibición.

$$\Delta\text{ATP}_T = \Delta\text{ATP}_{\text{hv}} + \Delta\text{ATP}_{\text{Glu}}$$

$$Y_{\text{kJ}} = \frac{\Delta X_M}{IAT + V(\Delta H_s) + (S_o - S)}$$

Puede haber dos metabolismos: autótrofo y heterótrofo. Las fuentes de carbono son compuestos orgánicos y CO<sub>2</sub> y la fuente de energía es la luz. Se mide la cinética de crecimiento, se evalúa la producción y consumo de oxígeno. Se puede emplear un solo sustrato.

### 2.8.6. CULTIVO FOTOHETERÓTROFO

En este cultivo el crecimiento depende la energía obtenida de la luz y las fuentes de carbono orgánico. Este cultivo tiene un fotometabolismo con fotoasimilación, utilizando la luz requerida para usar compuestos orgánicos como fuente de carbono. La fuente de energía es la luz.

$$\Delta ATP_T = \Delta ATP_{hv}$$

*Fuente:* DE CHOJNACKA & MÁRQUEZ ROCHA, 2004.

Tiene un metabolismo único, donde la luz es la fuente de energía y los compuestos orgánicos son la fuente de carbono, y el oxígeno es usado en la asimilación de compuestos orgánicos, requiriendo la presencia de los dos sustratos (**figura 7**).

**Figura 7.** Ruta metabólica fotoheterotrofica. La luz es la fuente de energía



- Contribución de la autotrófica y heterotrofía en el metabolismo mixotrófico.
- Fotoinhibición solo se observa en cultivos autotróficos.
- En los modelos matemáticos se ve que la influencia de parámetros de crecimiento se puede describir con múltiples aprovechamientos.
- La importancia de los modelos usados (Monod o Haldane) es que permiten identificar sustratos limitantes en el crecimiento e interacciones.
- La importancia del balance de masas para complementar la información de modelos matemáticos.

### 3. APLICACIONES

Las microalgas se pueden utilizar para diferentes procesos a nivel industrial, para tratamiento de aguas residuales por procesos de biorremediación y la obtención de metabolitos de interés como el biodiesel, lípidos y pigmentos en las áreas farmacéutica, nutracéutica, alimentaria, cosmética y acuicultura.

#### 3.1. PERSPECTIVAS

- Conocer las diferencias metabólicas y los requerimientos de energía y carbono para mejorar cultivos de microalgas.
- Producir productos de alto valor como pigmentos, antioxidantes, tocoferoles, enzimas, etc.
- Aplicación en diferentes industrias.

Los cultivos de microalgas son susceptibles al pastoreo por algunos grupos zooplantónicos, tales como cladóceros, rotíferos o nemátodos, sobre todo en sistemas abiertos (PARK *et al.*, 2011a).

La presión por predación es tal, que en pocos días pueden reducir la productividad entre un 90 a 99% (OSWALD, 1980, CAUCHIE *et al.*, 1995, en Park *et al.*, 2011a). Estas plagas se pueden tratar mediante medios físicos, tales como filtración, centrifugación, baja concentración de oxígeno disuelto (OD) / alta carga orgánica y tratamientos químicos, como aplicación de hormonas miméticas contra invertebrados, aumento de pH y concentración de amonio libre (PARK *et al.*, 2011a).

#### 3.2. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Las microalgas poseen una capacidad depuradora conocida como ficorremediación, definida como el uso de macroalgas y/o microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes presentes en aguas residuales. También sirven para bioadsorber metales pesados como plomo, cromo, cadmio, arsénico.

En el tratamiento de aguas residuales se busca eliminar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), los sólidos suspendidos, los nutrientes, los coliformes y la toxicidad.

La utilización de microalgas ha demostrado ser eficiente en la reducción de DBO y DQO aportando oxígeno a las bacterias aeróbicas que ayudan a la biotransformación, en estudios sobre utilización de microalgas en aguas residuales

urbanas, registraron valores moderados de remoción de DBO de 68,4% y una remoción de 67,4% en cultivos de *Scenedesmus* sp.

### 3.3. BIOPRODUCTOS

En América Latina se encuentran empresas productoras de biomasa, de microalga y de productos biotecnológicos derivados. Las especies más cultivadas son *Spirulina* sp, *Chlorella* sp, *Dunaliella* sp y *Haematococcus* sp. Los países productores en Latinoamérica incluyen a Chile, México, Ecuador, Cuba, Colombia, Brasil, líder en la región, y Perú (METICULOUS RESEARCH, 2023). En Perú se encuentra una empresa llamada Andexs Biotechnology, que produce suplementos alimenticios de astaxantina en cápsula y polvo a partir de *H. pluvialis* (ANGULO y MÉRIDA, 2017). En las universidades de estos países se han llevado a cabo estudios para producir metabolitos de interés biotecnológico, como los carotenoides y lípidos y aprovechar las aguas residuales de las industrias cárnicas en el cultivo de microalgas, lo que permite ahorrar costos de producción en regiones como la nuestra (HERRERA *et al.*, 2024).

En Colombia en el mercado se observa una alta demanda de carotenoides, lo que ha resultado en la importación de 150 toneladas al año de astaxantina desde Estados Unidos, Francia, Guatemala, Honduras, México y Panamá, por lo que se llevó a cabo un estudio para evaluar la viabilidad de la producción en cinco ciudades del país: Barranquilla, Cartagena, Santa Marta, Barrancabermeja y Cúcuta, y se determinó que Santa Marta sería la ciudad más adecuada, con un valor actual neto (VAN) de USD 5.970.986, un período de recuperación de la inversión (PP) de 1.9 años y una tasa interna de retorno (TIR) del 50% para la astaxantina, mediante un sistema híbrido utilizando un panel de luz plano y un estanque abierto FBR, con un precio de venta de USD 1659,87 Kg en concentración al 5 % (MORALES-CARVAJAL *et al.*, 2018).

### REFERENCIAS

- ANGULO, L. D. M. y MÉRIDA, L. G. R. (2017). Estado actual de las empresas productoras de microalgas destinadas a alimentos y suplementos alimenticios en América Latina. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(2), 130-147. <https://explore.openaire.eu/search/result?id=doajarticles::97ca7a36902ddf703224ae23c67c5bc4>
- BENAVENTE-VALDÉS, J. R., MONTAÑEZ, J. C., AGUILAR, C. N., MÉNDEZ-ZAVALA, A. y Valdivia, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 1-12.

[https://www.researchgate.net/publication/262560081\\_Tecnologia\\_de\\_Cultivo\\_de\\_Microalgas\\_en\\_Fotobiorreactores](https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores)

CAMACHO K., J., GONZÁLEZ, G. y KLOTZ, B. (2013). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009)

CHOJNACKA, K. and MARQUEZ-ROCHA, F J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*,3(1):21-34.

[https://www.researchgate.net/publication/45947178\\_Kinetic\\_and\\_Stoichiometric\\_Relationships\\_of\\_the\\_Energy\\_and\\_Carbon\\_Metabolism\\_in\\_the\\_Culture\\_of\\_Microalgae](https://www.researchgate.net/publication/45947178_Kinetic_and_Stoichiometric_Relationships_of_the_Energy_and_Carbon_Metabolism_in_the_Culture_of_Microalgae)

GAMBOA H., A., GUERRERO M., I. y CAMACHO, J. (2024). Revisión: efecto del factor estrés, color e intensidad de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. *Revista Mutis*, 14(2), 1-33.

<https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/revision-efecto-factor-estres-haematococcus-pluvialis>

GÓMEZ-TORRES, L. M., MORENO-GÓMEZ, B., VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E., AGUIRRE-MANCILLA, C. and AGUADO-SANTACRUZ, G. A. (2014). Plant cell photoautotrophic suspension cultures. Establishment and application perspectives. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 37(2), 165-179.

[https://www.researchgate.net/publication/287244960\\_Plant\\_cell\\_photoautotrophic\\_suspension\\_cultures\\_establishment\\_and\\_application\\_perspectives](https://www.researchgate.net/publication/287244960_Plant_cell_photoautotrophic_suspension_cultures_establishment_and_application_perspectives)

GONZÁLEZ-DELGADO, A., BARAJAS-SOLANO, A., BARAJAS, C., MORALES, J. y VILLABONA, R. (2018). Technical-economic prefeasibility study of staxanthin production system from *H. pluvialis* microalgae in Colombia. *Indian Journal of Science and Technology*, 11(34), 1-8.

<https://repositorio.ufps.edu.co/handle/ufps/667>

Haematococcus pluvialis Markets. (2023). Meticulous Research.

<https://www.meticulousresearch.com/product/haematococcus-pluvialis-market-5142/toc>

HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M., & DANQUAH, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037-1047.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032109002664>

- HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. y LABBÉ, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.  
<https://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- HO, S-H, CHEN, C-Y & CHANG, J-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852411017445>
- KAEPWINTONG, K., SHOTIPRUK, A., POWTONGSOOK, S. and PAVASANT, P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 98(2): 288-295.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16516464/>
- KOLLER, A. P., Wolf, L., BRÜCK, T. & WEUSTER-BOTZ, D. (2018). Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 213-220.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29119322/>
- LI, Y., SOMMERFELD, M., CHEN, F. and HU, Q. (2009). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 253-263.  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2946551/>
- LIANG, M-H., WANG, L., WANG, Q., ZHU, J. and JIANG, J-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423-2441. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29676930/>
- LIU, S. (2020). *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/C2019-0-02589-7>
- LÓPEZ, F. y ROJAS, R. (2010). *Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas* [Trabajo de grado]. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- MENDOZA, H., DE LA JARA, A. y PORTILLO, E. (2011). *Planta piloto de cultivo de microalgas. Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias*. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.  
<https://www.cienciacanaria.es/files/Planta-piloto-de-cultivo-de-microalgas.pdf>

- NIÑO-CASTILLO, C., RODRÍGUEZ-RIVERA, F., DÍAZ, L. and LANCHEROS-DÍAZ, A. (2017). Evaluation of cell growth conditions for the astaxanthin production as of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Nova* [on line], 15(28), 19-31.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1794-24702017000200019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702017000200019)
- PARK, J. B., CRAGGS, R. and SHILTON, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *BioresourceTechnology*, 102(1), 35-42.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410011636>
- QUINTERO CORREDOR, E. (2020) *Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el crecimiento de Haematococcus pluvialis y la producción del pigmento astaxantina* [Trabajo de pregrado]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia.  
<https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/260>
- QUINTERO GÓMEZ, E. J. (2020). *Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de Haematococcus pluvialis y la producción del pigmento astaxantina* [Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia].  
<https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/260>
- RICHMOND, A. and HU, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- RICHMOND, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science.  
<https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- SCIBILIA, L., GIROLOMONI, L., BERTEOTTI, S., ALBORESI, A. and BALLOTTARI, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- SIPAÚBA-TAVARES, L., MILLAN, R. N. & BERCHIELLI-MORAIS, F. A. (2013). Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 585-591. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212699/>
- VIDHYAVATHI, R., VENKATACHALAM, L., KAMATH, B. S., SARADA, R. and RAVISHANKAR, G. A. (2007). Differential expression of carotenogenic genes and associated changes in pigment profile during regeneration of *Haematococcus pluvialis* cysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 879-887. doi: 10.1007/s00253-007-0876-1

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17318532/>

VIDHYAVATHI R, VENKATACHALAM L, SARADA, R. and RAVISHANKAR, G. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1409-1418. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18343887/>

WANG, J., SOMMERFELD, M., LU, C. and HU, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202.

<https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2696>

WANG, B., ZARCA, A., TREBS, A. and BOUSSIBA, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyciae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Physiology*, 39(6), 1116-1124.

[https://www.researchgate.net/publication/227630392\\_Astaxanthin\\_Accumulation\\_in\\_Haematococcus\\_pluvialis\\_Chlorophyceae\\_AS\\_An\\_active\\_photoprotective\\_process\\_under\\_high\\_Irradiance](https://www.researchgate.net/publication/227630392_Astaxanthin_Accumulation_in_Haematococcus_pluvialis_Chlorophyceae_AS_An_active_photoprotective_process_under_high_Irradiance)

## CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

### INTRODUCCIÓN

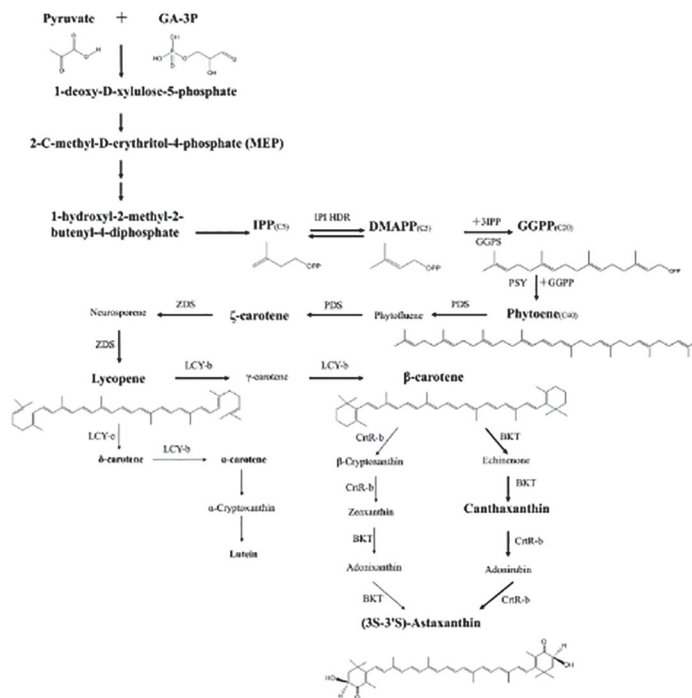
Las microalgas son fuente de un gran número de compuestos bioactivos de interés industrial, como los carotenoides que se utilizan como colorantes naturales en alimentación animal y humana, así como en las industrias farmacéutica, cosmética y en la acuicultura. Se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunorreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena.

#### 1. PIGMENTOS CAROTENOIDES Y FICOBILIPROTEÍNAS

Los carotenoides son un grupo de pigmentos encontrados en la naturaleza en plantas, y a nivel microbiano. Tienen un rol funcional en el desarrollo, fotosíntesis y estabilidad de la membrana, dan protección al daño fotodinámico. Se han caracterizado al menos 700 carotenoides. Son precursores de fitohormonas y proveen adaptación ambiental. Los carotenoides ejercen una función protectora por su alto poder antioxidante y también son importantes ingredientes de la dieta humana; algunos estudios sugieren que previenen algunas enfermedades crónicas y ciertos cánceres.

Se ha analizado la ruta biosintética de carotenoides, conociéndose dos rutas. Además, se han identificado 25 genes carotenogénicos, quienes producen diferentes funciones catalíticas en las síntesis de carotenos y algunos de estos genes han sido clonados y expresados funcionalmente en *E. coli*.

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 8**.

**Figura 8.** Ruta de biosíntesis del carotenoide astaxantina en *Haematococcus pluvialis*

*Nota.* SHAH *et al.* (2016).

Los siguientes pasos son llevados fuera de la membrana, localizando enzimas como fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno  $\beta$ -ciclaza (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).

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. Todas las enzimas de la ruta son reguladas por genes y son sintetizadas en el citoplasma de las células como precursores polipéptidos.

La biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus* sigue la ruta general de carotenos hacia la formación del  $\beta$ -caroteno. 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  $\beta$ -caroteno ketolasa

(BKT),  $\beta$ -caroteno oxigenasa (CRTO) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CHY o CRTR-B), como se observa en la Figura 6. El BKT convierte el  $\beta$ -caroteno a cantaxantina vía echinenona, siendo regulado por el CHY resultando en la formación de astaxantina. Los genes para  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) e isomerasa carotenoide (CRTISO) no han sido reportados en *Haematococcus*.

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. 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.

La astaxantina tiene aplicaciones industriales (farmacéutica y cosmética), 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 betacaroteno, para atrapar radicales libres de oxígeno.

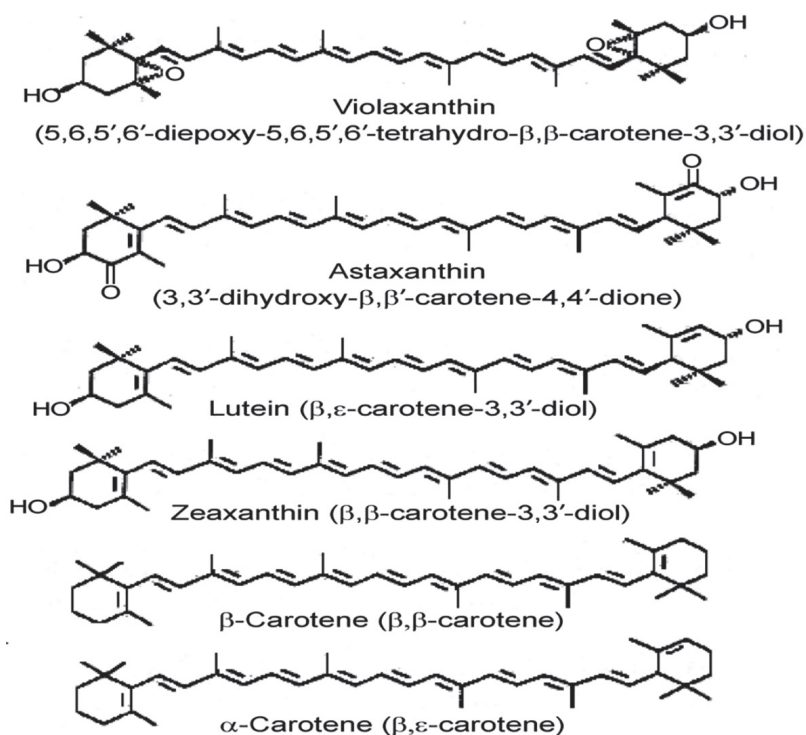
Comercialmente la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* es altamente rentable por su contenido. Algunas otras empresas comerciales para producción natural de astaxantina utilizan fermentación de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* o extracción del pigmento de productos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

La astaxantina tiene usos farmacéuticos, cosméticos y como aditivo de pigmentación en la acuicultura (salmón) y para yemas de huevo. Recientemente ha llamado la atención como un suplemento nutricional, es un inhibidor de la peroxidación de lípidos, reduce la inflamación gástrica, disminuye el riesgo de arteriosclerosis y previene la carcinogénesis, además, tiene potencial neuroprotector e inmunomodulador y sirve como alimento nutracéutico por su alto poder antioxidante.

El *H. pluvialis* suministra una fuente natural de betacaroteno, luteína, vitamina E, y otros antioxidantes que proporcionan beneficios más efectivos y respuestas beneficiosas que las formas sintéticas (Figura 9). Algunos de estos beneficios

nosotros los derivamos de miembros de estas especies en formas medicinales, incluyendo la protección contra rayos UV, incremento en la fuerza del sistema inmune y en el tratamiento de enfermedades como Alzheimer y Parkinson.

**Figura 9.** Estructura química de carotenoides presentes en *H. pluvialis*.



*Nota.* RICHMOND y HU (2013); RANGA *et al.* (2009).

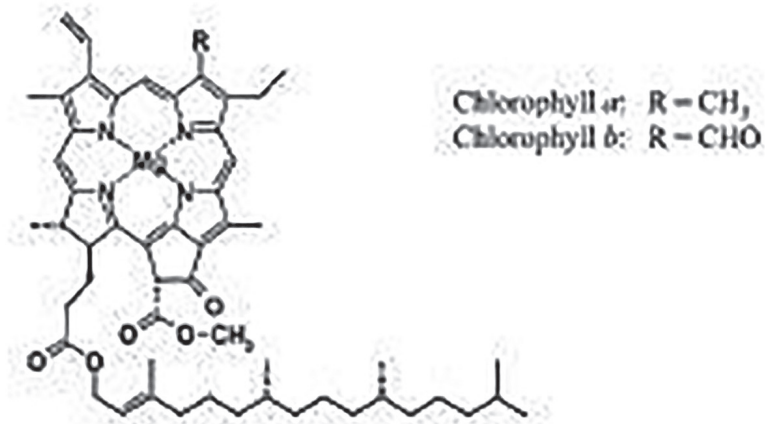
De los más de 400 tipos de los pigmentos carotenoides, solo unos pocos son comercializados:  $\beta$ -caroteno, astaxantina y, en menor importancia, luteína, zeaxantina y bixina. El uso más importante de estos es como colorante natural para alimentos y como aditivo para animales y en cosmética. La relevancia nutricional y terapéutica de algunos carotenoides radica en su capacidad de actuar como provitamina A, convirtiéndose en vitamina A.

Además, poseen propiedades antiinflamatorias y se les han atribuido propiedades anticancerígenas, aunque esto último aún está en investigación. Los mayores productores comerciales de ficobiliproteínas (ficoeritrina y ficocianina) son las cianobacterias *Arthospira* y la *Rhodospira rubra*.

## 2. CLOROFILA

La molécula de clorofila consiste en un anillo tetrapirrólico (cabeza polar, cromóforo), que contiene 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 (ver **figura 10**).

**Figura 10.** Estructura química de la clorofila



*Nota.* LOHR *et al.* (2005).

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 todos los fotoautótrofos 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.

## 3. BIOMASA

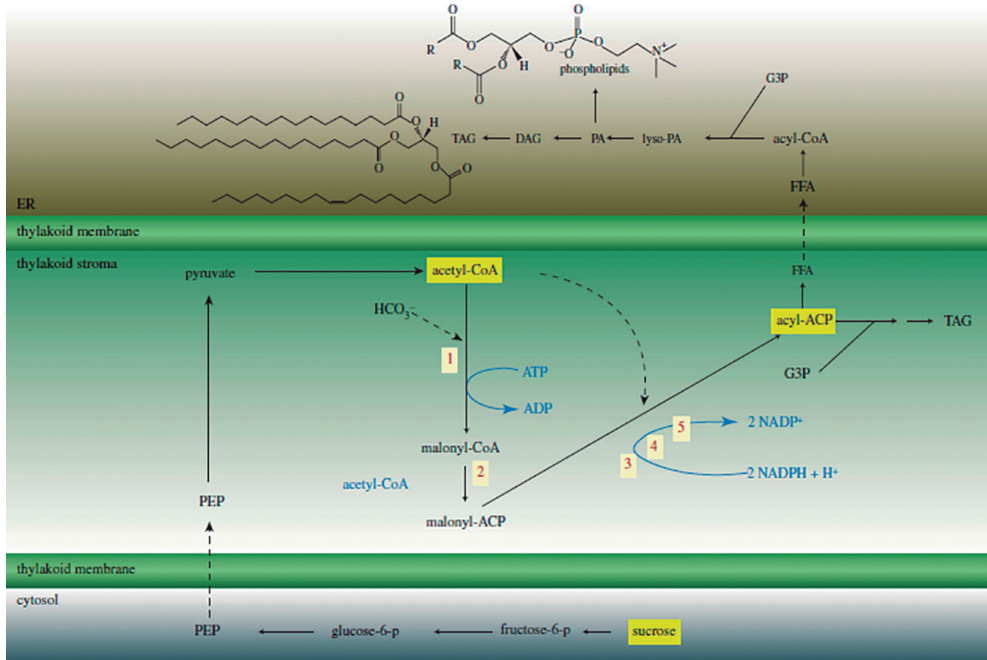
La biomasa algal tiene una amplia utilización que va desde biofertilizante a producción de biocombustibles, también para alimentación animal y humana, y para la obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética.

Los beneficios de los cultivos de microalgas son:

- a) El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa.
- b) La composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo.
- c) ‘Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros’. El potencial de las microalgas es considerable, sobre todo si consideramos que existen varios millones de especies de algas y microalgas, en comparación con alrededor de 250.000 especies de plantas terrestres.

#### 4. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Las principales ventajas de las microalgas para la producción de biocombustible son las tasas de crecimiento altas y cortos tiempos de generación; requisitos mínimos de tierra (en comparación con otros sistemas de cultivo para producción de biocombustibles); alto contenido de lípidos y ácidos grasos; el uso de agua residual como fuente de nutrientes y/o captura de CO<sub>2</sub> desde fuentes contaminantes (**figura 11**)

**Figura 11.** Ruta de síntesis de ácidos grasos de acetil-CoA vía ACCasa

Nota. GREENWELL *et al.* (2010).

Además, las productividades de microalgas son significativamente mayores que en plantas superiores con proyecciones de alrededor 70 t ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> (peso de cenizas) en comparación a cultivos terrestres con 3 t ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> para la soja, 9 t ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> para el maíz y 10-13 t ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> de álamos híbridos. También, el cultivo de microalgas no requiere de tierra cultivable y agua dulce, sino que puede llevarse a cabo en estanques poco profundos en suelos de capa dura, con agua salina o salobre.

Así, la producción de biodiésel desde microalgas podría alcanzar hasta 58.700 L aceite ha<sup>-1</sup>, que es una o dos magnitudes mayores que la de cualquier otro cultivo energético. La generación de biodiésel desde microalgas, a partir de sus aceites, se presenta como una solución eficiente ante los problemas medioambientales de la actualidad y la probable escasez de petróleo en un futuro cercano, debido a sus altas tasas de crecimiento y de producción de lípidos transesterificables.

En comparación con el diésel de petróleo, el diésel de microalgas tiene una reducción de hasta un 78 % en emisión de CO<sub>2</sub>. Además, es económica y tecnológicamente mejor que la producción de biodiésel a partir de muchas especies vegetales terrestres, por requerir menor superficie terrestre para obtener mayor biomasa.

## 5. ALIMENTACIÓN Y SALUD HUMANA

El consumo humano de microalgas se limita a pocas especies debido al estricto control sobre seguridad alimentaria, factores comerciales, demanda del mercado y preparación específica. Los tres géneros más destacados son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*, que se comercializan como suplementos alimentarios.

También algunas especies se comercializan por su valor medicinal, como *Chlorella* sp que protege contra la insuficiencia renal y promoción del crecimiento de *Lactobacillus intestinales* y favorece la disminución en concentraciones de colesterol sanguíneo.

La *Dunaliella* sp. se comercializa por su contenido de  $\beta$ -caroteno. Se ha logrado determinar que una dieta con *Chlorella* sp. aumenta el nivel de antioxidantes en fumadores, siendo considerada como un suplemento que favorece la salud. Por otro lado, los poli y monosacáridos de *C. pyrenoidosa* son una fuente altamente potencial para la creación de fármacos contra tumores. Incluidos en una dieta (10 %) se ha logrado determinar que disminuye la asimilación y previene la acumulación de dioxinas.

La astaxantina obtenida del *H. pluvialis* tiene aplicaciones industriales (farmacéutica y cosmética), 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.

## 6. ALIMENTACIÓN ANIMAL

El 30 % de la producción mundial de microalgas está destinada al consumo animal y, de hecho, el 50 % de la producción de *Arthrospira* sp. es con este fin. Algunas especies de algas, tales como los géneros *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Spirulina* sp., tienen aspectos beneficiosos para los animales, mejoran la respuesta inmune, la infertilidad, el control de peso, producen una piel más sana y un pelo brillante.

Se utilizan en la alimentación de gatos, perros, peces de acuario, aves ornamentales, caballos, vacas y toros reproductores. En acuicultura, las microalgas son la principal fuente de alimentación de moluscos filtradores y estados larvarios de peces y crustáceos, dándoles por ejemplo su coloración por la astaxantina producida por el *H. pluvialis*.

Los géneros más comunes para alimentación son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*, que son consumidas principalmente vivas.

#### 7. BIOFERTILIZANTE

Otra aplicación es la de biofertilizante. Algunas técnicas de conversión (especialmente pirólisis) producen carbón vegetal, llamado biochar o biocarbón, que posee un alto potencial como fertilizante en la agricultura.

#### 8. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Los ácidos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés) son esenciales en el desarrollo y fisiología humana, además de tener un rol importante en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Actualmente, las fuentes más importantes de estos compuestos son los peces, pero la utilización de sus aceites es limitada debido al riesgo de acumulación de toxinas en el pez, olor y sabor a pescado, pobre estabilidad oxidativa y mezcla entre diferentes tipos de ácidos grasos. Es destacable que, de hecho, los PUFA se encuentran en los peces debido a la alimentación de microalgas como el *H. pluvialis*, por lo que es lógico considerar a las microalgas como potenciales fuentes de estos componentes esenciales. Las microalgas son una fuente importante de estos ácidos, aunque actualmente el ácido docosahexaenoico (DHA) es el único disponible comercialmente.

#### 9. ADITIVOS

Se definen como nuevos materiales y combinaciones, emulsificantes, sustancias grasas, derivados químicos de productos naturales, etc., que la industria pone al servicio de la farmacia, la cosmética y la industria alimentaria.

Presentan las siguientes características:

- Compatibles
- Estables
- Inertes biológicamente
- Promotores de la biodisponibilidad
- Fácil empleo
- No contaminan

Se pueden obtener de células vegetales y cultivos de tejidos, microorganismos como las microalgas, tecnología enzimática y tecnología de manipulación genética.

## 10. APLICACIONES EN COSMÉTICA

Algunas especies de microalgas son utilizadas en la industria de la cosmética para el cuidado de la piel, tales como *Arthrospira* sp. y *Chlorella* sp. (por ejemplo, cremas antiedad, productos refrescantes o regenerantes de la piel, emolientes y antiirritantes). Extractos ricos en proteínas de *Arthrospira* reparan los signos prematuros de envejecimiento de la piel, ejercen un efecto tensor y previenen la formación de estrías.

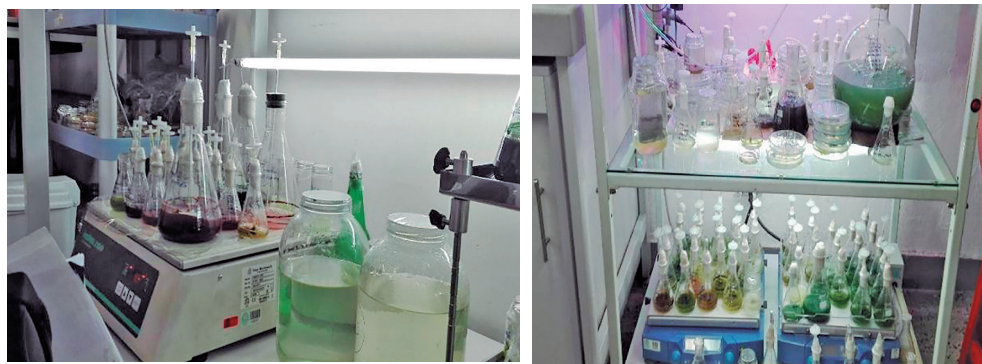
Extractos de *C. vulgaris* estimulan la síntesis de colágeno, apoyando la regeneración de tejidos y la reducción de arrugas, mientras que *Nannochloropsis oculata* posee excelentes propiedades para el estiramiento de la piel.

## 11. CENTROS DE INVESTIGACIÓN DE MICROALGAS

Los centros de investigación visitados fueron el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Antioquia (**figura 12**), la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia (**figura 13**), el Laboratorio de Bioprocesos y Bioproductos de la Universidad Eafit y el edificio Argos ubicado en esta universidad (**figura 14**), donde se realiza el cultivo y escalamiento de microalgas.

### 11.1. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

**Figura 12.** Laboratorio microalgas. Universidad de Antioquia





Las microalgas han sido estudiadas por el grupo de biotecnología de la Universidad de Antioquia que desarrolla procesos, productos y servicios dentro del contexto de biodiversidad, biotecnología y bioindustria; además ha enfocado su trabajo en la biorrefinería de cultivos celulares de plantas, hongos y cultivos celulares de algas. Durante la visita al banco de cepas con la doctora Esther Julia Naranjo G., M.Sc del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, se conoció el proceso de mantenimiento y condiciones de cultivo de diferentes cepas de microalgas incluyendo el *H. pluvialis*.

Se enfatizó en que el trabajo desarrollado con las microalgas se debe realizar bajo cámara de flujo laminar para evitar contaminación con otros microorganismos. Las cepas se mantienen en criopreservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los repiques se realizan en tubos con medio de cultivo inclinado bajo temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16h luz:8h oscuridad, se recomienda mantener la microalga con luz blanca con leds en medio MES Volvox o Medio BG-11, pH 6 -8. Cuando se repica se hace por estrías, para aislamiento y facilitar la purificación de la microalga si se ha contaminado. Los cultivos se pueden hacer en medio líquido y sólido. Los cultivos líquidos se agitan en forma manual diariamente.

Las microalgas respiran a través de la fotosíntesis que efectúan, para lo cual el  $\text{CO}_2$  se recomienda suplementar en medio sólido con  $100\text{ }\mu\text{l}$  por cada  $100\text{ ml}$  de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 8 % previamente esterilizada o adicionar  $1\text{ g}$  de agar/ $100\text{ mL}$  medio. El medio líquido funciona con  $\text{CO}_2$  o con el  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono. Las microalgas se agitan a  $110\text{ rpm}$  por 24 horas con el fotoperiodo mencionado previamente. Además del *H. pluvialis*, también se encuentran microalgas como *Chlorella* sp, *Spirulina* sp. y la *Dunaliella* sp.

Para el cultivo y mantenimiento de la microalga se recomienda sembrar en el mismo medio en el que se encuentra la microalga. Todas las microalgas presentes en este laboratorio son de la Universidad de Texas (UTEX), también

se encuentran microalgas nativas, las cuales se han ido purificando, para lo cual sugieren pasarlas de medios líquidos a sólidos. Se siembra una asada y se monitorea su crecimiento a una temperatura de 20 ° C, trabajando bajo cámara de flujo laminar y las condiciones previamente mencionadas. En el medio inicial se deja un mes y se replica al medio deseado evitando contaminación.

En el SIU de la Universidad de Antioquía se realizan los trabajos de investigación y procesos de escalado, así como el uso de biorreactores y fotobiorreactores y métodos de extracción de metabolitos de interés.

En el SIU observamos el escalado de microalgas en diferentes biorreactores y fotobiorreactores y conocimos los equipos utilizados para suministrar luz de diferentes colores a las microalgas y la disposición de estos leds para aprovechar al máximo su irradiancia. Los biorreactores utilizados van desde 3 L, 5 L hasta 10 L y de tipo industrial.

**Figura 13.** *SIU. Universidad de Antioquia*



Se recomienda que la relación de la luz y la cantidad de cultivo utilizado en un biorreactor no bloquee el camino óptico por la biomasa presente, ya que microalgas como el *H. pluvialis* son autótrofas y realizan un proceso fotosintético donde la luz juega un papel importante en la cascada de las xantofilas o de los carotenoides, por lo cual se debe colocar más luz para lograr un mejor estrés del cultivo y también adecuar la concentración de nitrógeno utilizada para estresar mejor la microalga y obtener el carotenoide astaxantina.

Para evitar la evaporación del medio durante el cultivo, adicionar agua destilada estéril y ajustar la cantidad de medio adicionado inicialmente. No se recomienda adicionar más medio porque puede haber toxicidad. También se propone disminuir la cantidad de aire suministrada al cultivo bajándola a 0,5 L/minuto de aire o la mezcla de gases utilizada. No es necesario adicionar solo  $\text{CO}_2$ , también se puede aire o mezcla de gases. El pH aconsejado para este cultivo es hasta 8. Se observó que los biorreactores presentaban diseños cerrados con leds de diferentes colores que envolvían los biorreactores.

- **Inóculo**

El inóculo utilizado para iniciar un cultivo es dado en peso y se calcula centrifugando el cultivo y desecándolo para dar un dato en peso seco. No se recomienda colocar el inóculo estresado. Al finalizar el cultivo de microalgas se puede determinar la biomasa, el contenido de nitratos y fosfatos (utilizar el sobrenadante) y, según el estudio, determinar en el sedimento lípidos, proteínas, carbohidratos, cenizas, carbono orgánico total (COT), carotenoides, clorofila y enzimas.

También se observó que se trabaja en estos biorreactores hongos como el *Pleorotus ostreatus* (orellana) utilizando como sustrato bagazo de caña y cáscara de maíz. Se observó el uso de luz led roja para el cultivo de hongos.

## 11.2. UNIVERSIDAD EAFIT

**Figura 14.** *Universidad Eafit*





En el edificio Argos se encuentran biorreactores para la captura de  $\text{CO}_2$  con microalgas, proyecto que se encuentran realizando con la Universidad Eafit (**figura 14**). Se tienen instalaciones ecológicas como el uso de materiales amigables con el medioambiente, como el concreto avanzado que permite reducir las secciones de los elementos haciéndolos más livianos, pero altamente resistentes a esfuerzos mecánicos y a agentes agresivos externos, también el concreto, para absorber agua, como el utilizado en los parqueaderos. Se utiliza cemento gráfico y liviano para evitar colocar más materiales como baldosas y así disminuir costos.

En este edificio se visitó el laboratorio para mantenimiento y cultivo de cepas donde se encontraba la *Spirulina* sp, el *H. pluvialis* y otras microalgas adquiridas de la UTEX, utilizando fotoperiodo 12h luz: 12h oscuridad, luz blanca con leds y para el estrés de la microalga se utiliza menos de 200 mL para un Erlenmeyer de 500 mL. Se agita manualmente diariamente. Con la adición de  $\text{CO}_2$  se complementa la agitación. También tenían criopreservadas 70 cepas nativas, pero que por la legislación nacional de la ANLA no se están utilizando en los proyectos de investigación que se desarrollan con la empresa Argos.

Se sugiere monitorear continuamente los cultivos para evitar la contaminación con rotíferos, principales enemigos de las microalgas. El medio preparado para alimentar los biorreactores es el Bristol. La biomasa se calcula por peso utilizando balanzas de humedad; para iniciar un cultivo se recomienda 0,2 g/Litro.

En la azotea de edificio, que corresponde al piso sexto, se tienen los biorreactores para captura de  $\text{CO}_2$  por parte de las microalgas, de los 48 biorreactores que se tenían se llevaron 18 para la planta de Argos en Cartagena, para transformar la biomasa en biocrudo y la refinación de este para la obtención de un diésel renovable.

El objetivo de este proyecto es mitigar el impacto ambiental, especialmente en lo referente a las emisiones de  $\text{CO}_2$ , para aprovechar la actividad fotosintética

de las microalgas donde se usa este como fuente de carbono. Las microalgas realizan la captura y purificación de grandes cantidades de CO<sub>2</sub> en poco tiempo mediante el uso de estos biorreactores. Se utiliza un equipo diseñado que tiene un filtro en la parte inferior de los biorreactores para suministrar mezclas de gases que simula gases de chimenea con contenido de azufre (SO<sub>x</sub>), nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de gases se ajustan en un computador que está directamente conectado en la oficina, evaluando el proceso, de este se tiene una patente. Los biorreactores están diseñados en material acrílico por su resistencia a las condiciones ambientales.

En los biorreactores donde se observaba que estaban con un menor volumen con respecto al volumen original, se levantaba la tapa de acrílico y se adicionaba el medio de cultivo Bristol hasta completar el volumen original. Se observaron biorreactores vacíos y otros con gran cantidad de biomasa de microalgas con colores verdes oscuros. Se destaca el aprovechamiento de la luz natural para el desarrollo de estos cultivos por la ubicación en el último piso de este edificio. Los centros de investigación visitados permitieron conocer los diferentes métodos utilizados para cultivo, conservación, mantenimiento y escalado de microalgas.

## REFERENCIAS

- BENAVENTE-VALDÉS, J. R., MONTAÑEZ, J. C., AGUILAR, C. N., MÉNDEZ-ZAVALA, A. y VALDIVIA, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 1-12.  
[https://www.researchgate.net/publication/262560081\\_Tecnologia\\_de\\_Cultivo\\_de\\_Microalgas\\_en\\_Fotobiorreactores](https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores)
- CAMACHO K., J., GONZÁLEZ, G. y KLOTZ, B. (2013). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009)
- CASTILLO, O. S., TORRES-BADAJÓZ, S. G., NÚÑEZ-COLÍN, C. A., PEÑA-CABALLERO, V., HERRERA MÉNDEZ, C. H. y RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.  
<https://www.redalyc.org/pdf/578/57854568006.pdf>
- GÓMEZ-TORRES, L. M., MORENO-GÓMEZ, B., VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E., AGUIRRE-MANCILLA, C. & AGUADO-SANTACRUZ, G. A. (2014). Plant cell photoautotrophic suspension cultures. Establishment and application perspectives. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 37(2), 165-179.

- [https://www.researchgate.net/publication/287244960\\_Plant\\_cell\\_photoautotrophic\\_suspension\\_cultures\\_establishment\\_and\\_application\\_perspectives](https://www.researchgate.net/publication/287244960_Plant_cell_photoautotrophic_suspension_cultures_establishment_and_application_perspectives)
- GREENWELL, H. C., LAURENS, L. M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W. & FLYNN, K. J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(46), 703-726.
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20031983/>
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. and DANQUAH, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037-1047.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032109002664>
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. y LABBÉ, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.
- <https://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- HO, S-H, CHEN, C-Y. and CHANG, J-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852411017445>
- HUANG, Q., JIANG, F., WANG, L. & YANG, C. (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*, 3(3), 318-329.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809917304241>
- KOLLER, A. P., WOLF, L., BRÜCK, T. & WEUSTER-BOTZ, D. (2018). Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 213-220.
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29119322/>
- LI, Y., SOMMERFELD, M., CHEN, F. and HU, Q. (2009). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 253-263.
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2946551/>
- LIANG, M-H., WANG, L., WANG, Q., ZHU, J. & JIANG, J-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423-2441. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29676930/>
- LIU, S. (2020). *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-02589-7>

- LÓPEZ, F. y ROJAS, R. (2010). *Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas* [Trabajo de grado]. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- MENDOZA, H., DE LA JARA, A. y PORTILLO, E. (2011). *Planta piloto de cultivo de microalgas. Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias*. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- <https://www.cienciacanaria.es/files/Planta-piloto-de-cultivo-de-microalgas.pdf>
- NIÑO-CASTILLO, C., RODRÍGUEZ-RIVERA, F., DÍAZ, L. & LANCHEROS-DÍAZ, A. (2017). Evaluation of cell growth conditions for the astaxanthin production as of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Nova* [on line], 15(28), 19-31.
- [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1794-24702017000200019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702017000200019)
- PARK, J. B., CRAGGS, R. and SHILTON, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410011636>
- RICHMOND, A. and HU, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- RICHMOND, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. <https://algatex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- SHAH, M. M. R., LIANG, Y., CHENG, J. J. and DAROCH, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.00531/full>
- SCIBILIA, L., GIROLOMONI, L., BERTEOTTI, S., ALBORESI, A. and BALLOTTARI, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926415300527>
- WANG, J., SOMMERFELD, M., LU, C. & HU, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202.

<https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2696>

WANG, B., ZARCA, A., TREBS, A. and BOUSSIBA, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyciae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Physiology*, 39(6), 1116-1124.

[https://www.researchgate.net/publication/227630392\\_Astaxanthin\\_Accumulation\\_in\\_Haematococcus\\_pluvialis\\_Chlorophyceae\\_AS\\_An\\_active\\_photoprotective\\_process\\_under\\_high\\_Irradiance](https://www.researchgate.net/publication/227630392_Astaxanthin_Accumulation_in_Haematococcus_pluvialis_Chlorophyceae_AS_An_active_photoprotective_process_under_high_Irradiance).

# CAPÍTULO 3. EFECTO DE FACTORES DE ESTRÉS PARA PRODUCIR COMPUESTOS BIOACTIVOS. CASO PRODUCCIÓN ASTAXANTINA

## INTRODUCCIÓN

Las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica utilizan materias primas en su mayoría de origen químico, dañinas para la salud, con impacto en el medio ambiente e importadas, lo que incrementa 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.

La realización de este estudio 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 promisorio 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 para obtenerse 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, sin embargo, el desarrollo de un medio de cultivo óptimo para su crecimiento, así como una adecuada tecnología de cultivo incrementa la producción de biomasa hasta niveles óptimos para la producción del pigmento. De igual forma, un mayor entendimiento de las bases moleculares de la relación –condiciones de estrés-inducción– acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, podría ser útil para aumentar la productividad de astaxantina.

## 1. RUTA BIOSINTÉTICA DE ASTAXANTINA

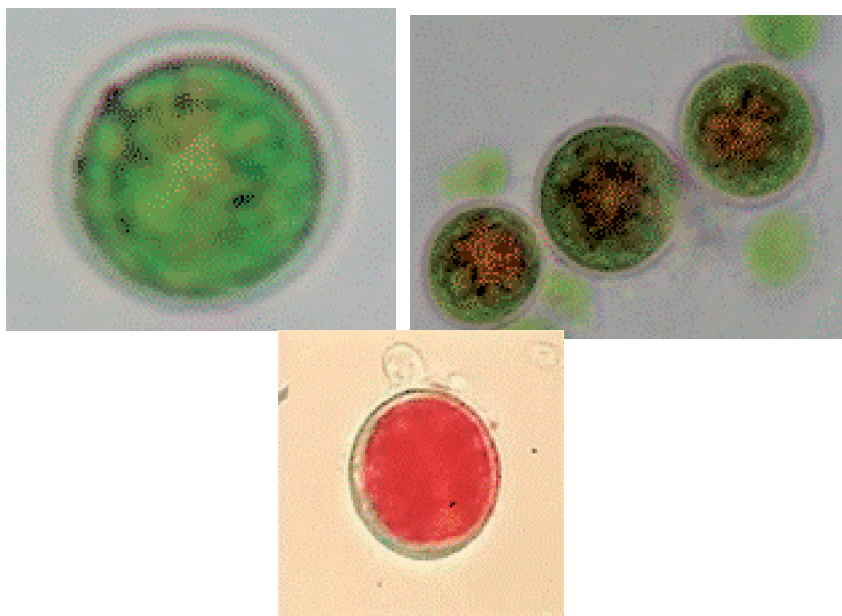
Los carotenoides son un grupo de pigmentos encontrados en la naturaleza en plantas y a nivel microbiano. Tienen un rol funcional en el desarrollo, fotosíntesis y estabilidad de la membrana, dan protección al daño fotodinámico (SHAH *et al.*, 2016). Se han caracterizado al menos 700 carotenoides (RICHMOND y HU, 2013), que son precursores de fitohormonas y proveen adaptación ambiental.

Los carotenoides ejercen una función protectora por su alto poder antioxidante y también son importantes ingredientes de la dieta humana; algunos estudios sugieren que previenen algunas enfermedades crónicas y ciertos cánceres.

Se ha analizado la ruta biosintética de carotenoides, conociéndose dos rutas. Además, se han identificado 25 genes carotenogénicos, quienes producen diferentes funciones catalíticas en las síntesis de carotenos y algunos de estos genes han sido clonados y expresados funcionalmente en *E. coli*. Estos son componentes esenciales de todas las células eucariotas fotosintéticas.

El alga unicelular *H. pluvialis* es una de las mejores fuentes de carotenoides secundarios rojos como la astaxantina, **figura 15**, en especial para producirla biotecnológicamente. La astaxantina tiene usos farmacéutico, cosmético y como aditivo de pigmentación en la acuicultura (salmón) y para yemas de huevo.

**Figura 15.** Cambio morfológico de *H. pluvialis*. a) Forma vegetativa b) aplanospora c) Célula enquistada roja. Barra 20  $\mu\text{m}$



Recientemente ha llamado la atención como un suplemento nutricional, es inhibidor de la peroxidación de lípidos, reductor de la inflamación gástrica, disminuye el riesgo de arteriosclerosis y previene la carcinogénesis, además tiene potencial neuroprotector e inmunomodulador y sirve como alimento nutracéutico por su alto poder antioxidante.

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

Se han identificado los cambios en el perfil y la expresión de los genes caroteno génicos en diversas condiciones de estrés y su implicación en la producción del pigmento. Los genes implicados son fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasa (LCY), b-caroteno cetolasa (BKT), y b-caroteno hidroxilasa (CHY) y fueron estudiados bajo diversas condiciones de estrés, como agotamiento de nutrientes combinada con una alta intensidad de luz y adición de cloruro de sodio. Se detectaron las transcripciones de *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y los genes *chy* en todas las etapas de inducción al estrés, además de estar en niveles máximos de transcripción respecto al control.

La exposición al estrés de nutrientes y la luz alta dio lugar a la transcripción de *psy*, *pds* y *lcy* que alcanzaron un máximo en el segundo día de la inducción de estrés, a medida que el ensayo progresaba los niveles de transcripción de estos genes, en especial aumento de transcripción en *psy* y *pds* en el noveno día, además aquellas microalgas sometidas al tratamiento con cloruro de sodio, retrasaron la regulación de *psy*, *pds* y *lcy*, pero los niveles de transcripción fueron similares o superiores en comparación con otros tipos de estrés.

Se llevó a cabo un estudio para evaluar los métodos que permiten alcanzar la máxima velocidad de regeneración de los quistes y estudiar los cambios en carotenogénesis durante la regeneración. Por ejemplo, la temperatura es eficiente para la regeneración de las células quiste indicando que las microalgas sometidas a temperaturas de 4 °C pueden soportar esa temperatura sin perder la viabilidad y generar una regeneración completa, por el contrario, temperaturas de 0° C o por debajo causan un falso blanqueamiento ya que se generan cristales de hielo interno en ausencia de crioprecipitados afectando así la capacidad de regeneración de las células.

Además, la disponibilidad de nutrientes fue un factor principal desencadenante de la degradación de astaxantina, mientras que la intensidad de luz no tiene ningún efecto sobre la pérdida del carotenoide durante la germinación. Asimismo sugieren que a medida que el crecimiento progresa, las transcripciones de los genes carotenogénicos *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt*, y *chy* se redujeron y sus niveles

alcanzaron el nivel de expresión basal en el estado móvil celular, igualmente, aunque se detectaron las transcripciones de *bkt* en células móviles verdes, la disminución de la astaxantina durante la regeneración podría ser debido a la reducción de niveles transcripcionales de *bkt*, que podrían tener una cantidad necesaria por debajo del de umbral para la biosíntesis de astaxantina.

Comparan los cambios obtenidos del perfil de pigmento (astaxantina) y el perfil de genes caroteno génicos en *H. pluvialis* al ser sometido a agotamiento de nutrientes, combinado con una alta intensidad de luz, acetato de sodio (SA 4.4 mM) y cloruro de sodio (NaCl 17.1 mM). Los genes para la biosíntesis de astaxantina, *bkt* y *chy* se encontraron expresados incluso en las células vegetativas flageladas, expresadas durante el estrés y encontrándose otros genes caroteno génicos, *psy*, *pds* y *lcy*. La adición de NaCl de 17.1 mM individualmente reduce el contenido total de carotenoides y astaxantina, además retrasa la expresión de los genes carotenogénicos.

Sin embargo, la adición de SA / NaCl en una concentración de 4.4 mM /17.1 mM conjuntamente, mejoraron el contenido de astaxantina y muestran la máxima expresión de los genes carotenogénicos. La biomasa de las algas se estimó después de secar a 60° C, el pigmento se analizó recogiendo una alícuota del cultivo y se secó por congelación. El crecimiento se midió contando el número de células utilizando cámara de Neubauer. Se extrajo el RNA y se analizó por PCR.

Se ha estudiado el desarrollo de la función fisiológica de la astaxantina en *H. pluvialis* en respuesta a los diferentes factores de estrés, se evaluó el crecimiento y la viabilidad celular sometidas a diferentes densidades de flujo de fotones, los cultivos inicialmente se mantuvieron bajo fotones de 20- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 22 ° C durante 4 días, a partir del quinto día fueron sometidas a una iluminación continua en diferentes niveles, es decir 50, 125, 300 y 600 mol fotones/ $\text{m}^2\text{s}$  determinando así que cuando se exponen a una iluminación alta se produce una mortalidad significativa en los cultivos, después de cinco días respecto al recuento inicial se perdió una población celular de 40 %, 62 %, 74 % y 82 % respectivamente en una cepa de *H. pluvialis*, es decir, cuanto más alta es la irradiancia, mayor es la muerte celular.

Además, este estudio reveló varios aspectos nuevos en la expresión de genes asociados a la caroteno génesis, *ipi*, *psy*, *pds*, *crto* y *crtr-b* fueron estudiados bajo las condiciones de estrés y en especial el *crtr-b*, quien demostró una relación lineal entre las transcripciones de ARNm máximas y concentraciones de astaxantina alta lo que indica que la biosíntesis de la astaxantina está principalmente bajo el control de CRTR-b, además los genes IPI y PDS están asociados a la regulación traduccional o post-traduccional, y de igual manera involucrados en el control de la transcripción. Por lo tanto, varios mecanismos de regulación de la transcripción, la traducción y los niveles posteriores a la traducción coexiste entre estos genes que controlan el proceso general del caroteno génesis en *H. pluvialis*.

Se ha reportado que la síntesis de astaxantina está regulada por la expresión transcripcional de ocho genes (*ipi -1*, *ipi -2*, *psy*, *pds*, *lyc*, *crt rb*, *bkt* y *cr to*) bajo condiciones de estrés. Evaluaron la de astaxantina y su relación con la expresión de genes carotenoides, usando PCR en tiempo real y microscopia espectrofotométrica. Esta acumulación exógena de Epirasinolida (ERB) aumenta la capacidad de resistencia al estrés mediante la estimulación de producción de astaxantina de manera eficiente de acuerdo a su concentración, ERB50 (50 mg/L) fue más eficaz para inducir astaxantina que ERB25 (25 mg/L), sin embargo el primero dio lugar a más células muertas y albinas, además, a mayor exposición se observan efectos secundarios significativos como el detenimiento del crecimiento celular y pérdida de pigmento, por lo que se sugiere la cosecha de las algas en el momento adecuado.

También se determinó que IPI-1 y PSY regulan la biosíntesis de astaxantina en el nivel postranscripcional ya que se expresaron en el momento de la acumulación inicial y *pds*, *lyc*, *crt rb*, *bkt* y *cr to* actúan a nivel transcripcional, conjuntamente se sugirió que IPI-2 controla la síntesis de astaxantina en los niveles transcripcional y postranscripcional. Las fitohormonas relacionadas con el estrés pueden inducir la acumulación de astaxantina eficiente, sin embargo, los perfiles de regulación son diferentes.

Se clonaron los principales genes de síntesis de ácidos grasos (FA) en *H. pluvialis*; BC: carboxilasa de biotina; ACP: la proteína portadora de acilo; MCTK: malonil-CoA: transacilasa ACP; KAS: 3-ketoacyl- ACP sintasa; FATA: Acil-ACP tioesterasa; SAD: estearoil-ACP desaturasa; FAD:  $\omega$ -3 desaturasa de ácido graso. Se exploraron sus patrones de expresión en diferentes tratamientos que inducían estrés, como la alta salinidad, aumento /disminución de temperatura y agotamiento de nitrógeno, utilizando RT-PCR. El contenido de FA y la composición se analizó mediante GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas). Su estudio tuvo la finalidad de “identificar el gen clave de síntesis y acumulación de ácidos grasos, para así evaluarlos como candidatos para la ingeniería metabólica aumentando la producción y mejorando la calidad del biocombustible” (Lei, et al., 2012). Los genes clave que se ven involucrados en la síntesis de FA en *H. pluvialis* pueden incluir ACP, KAS, y FATA.

Se han investigado en *H. pluvialis* los patrones de expresión de genes carotenogénicos y la acumulación de astaxantina inducida por un tratamiento con ácido jasmónico (JA); reconocen esta sustancia como un regulador eficaz para estimular la producción de astaxantina, fundamentándolo con la existencia de regiones que contienen ácido jasmónico en algunos genes clave implicados en la biosíntesis de astaxantina; es además una molécula de rápida señalización en plantas en momentos de estrés, desencadenando respuestas de defensa.

El tratamiento se hizo con  $1,25 \times 10^5$  células en dos grupos, el primero se trató con 25 mg/L de JA y el segundo con 50 mg/L de JA, cosechándose las células

en un transcurso de 18 días. El número de células se contó microscópicamente utilizando un hematocitómetro, por medio de microscopía óptica se analizó morfología, color, biomasa y pigmento de *H. pluvialis*, se aisló el ARN y se analizó por medio de RT-PCR. Los resultados mostraron que la inducción de JA 25 mg/L tuvo un mayor efecto en la expresión transcripcional de *pds*, *crt rb* y *lyc* (> 10 veces que sin JA) que en *ipi -1*, *ipi -2*, *psy*, *bkt 2* y *cr to*. En los tratamientos con JA 50 mg/L hubo un mayor impacto en la expresión transcripcional del *ipi 1*, *ipi 2*, *psy*, *crt rb* y *cr to* que, en *pds*, *lyc* y *bkt 2*. Confirmando en primer lugar que los genes carotenogénicos exhiben diferentes perfiles de expresión cuando se exponen a ácido jasmónico y, en segundo lugar, que la acumulación de astaxantina se indujo eficazmente por ácido jasmónico, lo más probable: que sea debido a la regulación de los genes carotenogénicos.

Se evaluó la acumulación de astaxantina, el cambio morfológico y su relación con la expresión de genes carotenoides, (*ipi -1*, *ipi -2*, *psy*, *pds*, *lyc*, *crt r-b*, *bkt* y *cr to*) bajo condiciones exógenas de Epirasinolida. En la observación microscópica se reportó que las células de algas se quedaron inmóviles después de 6 horas de aplicación del EBR. En el día 6, el albinismo de las células se produjo con porcentaje de 5,4 % y 11,6 % en los tratamientos EBR25 (25 mg/L), y EBR50 (50 mg/L), respectivamente. En el día 15, estos valores aumentaron a un 25,5 % y 56,8 %, pero el resto de las células se caracterizaron por adquirir un pigmento más rojo. En el día 22, más de 55,2 % de las células perdieron pigmento y se observaban blanqueadas, 35,3 % de las células cambiaron a rojo en el tratamiento EBR 25, y casi 81,1 % de las células se mostraron blanqueadas y el resto completamente rojas en el tratamiento EBR 50.

El tiempo de duplicación y la disminución posterior de células se asociaron directamente con la alta irradiancia ( $13\text{-L} = 94.7\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  y  $250\text{-L} = 184.8\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ), esta biomasa celular óptima se obtiene en un medio alcalino que tiene un pH que oscila entre 6.0 y 8.7, de lo contrario en un medio ácido disminuye la densidad celular. La productividad de las células vegetativas es una función de la irradiancia y a su sensibilidad a los cambios en las condiciones de cultivo; por lo tanto, la irradiancia ideal está alrededor de 40 a 50 mol/m<sup>2</sup>s. En este estudio las tasas de la densidad celular son  $1.1 \cdot 0.17 \times 10^5\text{ cel./ mL}$ .

Además, es importante el valor de biotina, tiamina y B12 ya que tienen efecto significativo sobre la tasa de crecimiento y el peso seco final, se encontró que la densidad celular del *H. pluvialis* aumentó aproximadamente 55 % con la concentración de la vitamina B (0,01 g/L), en comparación con el crecimiento celular en el medio sin adición de vitamina. Su presencia mejora el crecimiento de *H. pluvialis*. La adición de vitaminas del complejo B es de rutina en el laboratorio y los resultados mostraron su influencia en la mejora del crecimiento.

Los resultados de las mediciones de astaxantina revelaron que la acumulación de esta comenzó rápidamente en el tercer día, y el valor subió rápidamente de

forma continua y alcanzó su máximo nivel (1,98 mg/mL) en el día noveno en el tratamiento con EBR 50 y el día 12 (2,26 mg/mL) en el tratamiento EBR 25.

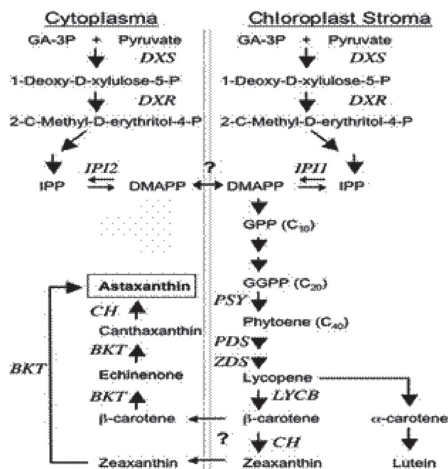
También, se determinó que tanto *IPI-1* y *PSY* regulan la biosíntesis de astaxantina en el nivel postranscripcional ya que se expresaron en el momento en el que se da la acumulación de astaxantina inicial y *pds*, *lyc*, *crt rb*, *bkt* y *cr to* actúan a nivel transcripcional, conjuntamente se sugirió que *IPI-2* controla la síntesis de astaxantina tanto a nivel transcripcional y postranscripcional. Las fitohormonas relacionadas con el estrés pueden inducir la acumulación de astaxantina eficiente, sin embargo, los perfiles de regulación son diferentes.

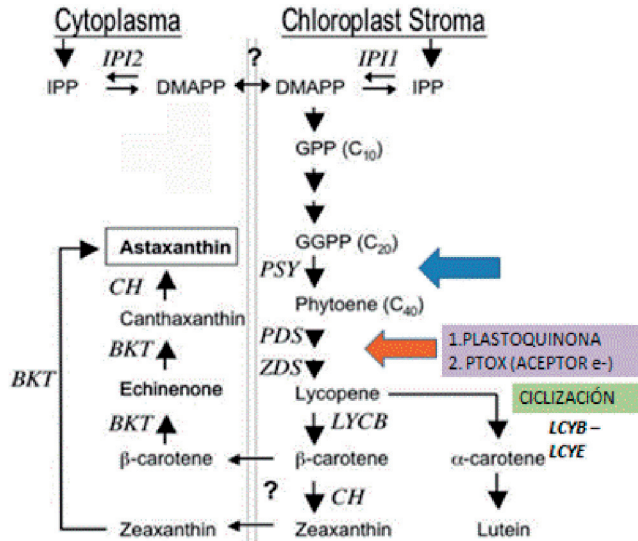
La biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus* sigue la ruta general de carotenos hacia la formación del  $\beta$ -caroteno, en la biosíntesis de carotenoides el primer paso es la condensación del geranyl-geranyl difosfato (GGPP) a fitoeno, modificado por la enzima fitoeno sintasa (PSY). En estudios 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  $\beta$ -caroteno ketolasa (BKT),  $\beta$ -caroteno oxigenasa (CRTO) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CHY o CRTR-B), como se observa en la **figura 16**.

El BKT convierte el  $\beta$ -caroteno a cantaxantina vía echinenona, regulado por el CHY resultando en la formación de astaxantina. Los genes para  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) e isomerasa carotenoide (CRTISO) no han sido reportados en *Haematococcus*.

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.

**Figura 16.** Ruta de síntesis de carotenoides secundarios en *H. pluvialis*





*Nota.* RICHMOND Y HU (2013).

Otra de las rutas en la biosíntesis de astaxantina en esta microalga propuesta hace referencia al posible rol de PTOX en respuesta del *H. pluvialis* al oxidativo estrés. En la **figura 16** las enzimas son indicadas por su símbolo asignado del gen.

Se ha reportado que la ruta de biosíntesis de astaxantina consume alrededor del 10 % de oxígeno molecular envuelto en la fotosíntesis, bajo estrés, al menos en dos rutas: (1) proceso dependiente de oxígeno para la formación de astaxantina y (2) conversión de oxígeno molecular en agua usando electrones. Existen pasos intermedios en la síntesis de astaxantina, en los cuales se consumen electrones y se reducen los equivalentes generados en la cadena transportadora fotosintética de electrones, es así como se protege el *Haematococcus* del estrés fotooxidativo (RICHMOND, 2017).

La reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por reducción de oxígeno molecular subcelular hacia la biosíntesis de astaxantina representa un novedoso mecanismo de protección al estrés oxidativo. La reoxidación de la plastoquinona por PTOX, reduce el transporte de electrones fotosintéticos e induce la formación de ROS (RICHMOND, 2017).

La capacidad de acumulación de grandes cantidades de astaxantina en *H. pluvialis* involucra otro mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera un sistema de defensa enzimático antioxidante, el cual implica un proceso de transporte de carotenoides del cloroplasto, a los cuerpos citosólicos lipídicos (GRUNEWALD, *et al.*, 2000).

La ciclación del licopeno representa un importante punto en la ruta de biosíntesis del carotenoide. Licopeno  $\beta$ -ciclase (LCY-b) cataliza dos reacciones de  $\beta$ -ciclación al final de la molécula de licopeno produciendo  $\beta$ -caroteno, el cual es esencial para la síntesis de varios carotenoides en el cloroplasto. El  $\beta$ -caroteno ketolasa/oxigenasa (BKT) adiciona un grupo cetona a la posición 4 de uno o ambos anillos del  $\beta$ -caroteno.

Ensayos *in vitro* de BKT y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) confirman que la síntesis de astaxantina preferiblemente procede de la adición de grupos cetona en el proceso de hidroxilación en *H. pluvialis* y así producir astaxantina por la hidroxilación de cantaxantina catalizada por CrtR-b, gen expresado en respuesta a varias condiciones de estrés (**figura 15**) (RICHMOND, 2017; SHAH et al., 2016).

Existen disponibles varios estudios de la influencia de diferentes condiciones de estrés sobre la expresión de genes carotenogénicos en *H. pluvialis*, pero probados en varios casos en forma individual o en grupos de condiciones de estrés, lo cual nos permite establecer que información de estudios sobre la influencia de otros estreses o de todos aplicados en forma combinada es limitada, así como estudios que relacionen estas condiciones con la expresión de genes carotenogénicos durante la producción de astaxantina.

La dilucidación de las rutas sintéticas de carotenoides y el enorme progreso en la clonación de genes, estableciendo los genes, las enzimas implicadas y conociendo cómo es el proceso y su regulación, han aportado las herramientas necesarias para realizar ingeniería genética y así incrementar la síntesis de carotenoides y aumentar la tolerancia a condiciones de estrés.

La mayoría de las manipulaciones va dirigida a aumentar el contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno, aprovechando la sobreexpresión de la fitoeno desaturasa (*pds*) y fitoeno sintasa (*psy*). Además, se evidencia la existencia de una sobrerregulación de un múltiple mecanismo de defensa antioxidante, espacialmente y temporalmente, para proteger las células del *H. pluvialis* en contra del estrés oxidativo.

Los autores proponen que existen pasos intermedios en la síntesis de astaxantina, en los cuales se consumen excesos de electrones y reduce los equivalentes generados en la cadena transportadora de electrones fotosintética, así como protege el *Haematococcus* del estrés fotooxidativo.

La expresión de genes carotenogénicos, fitoeno sintasa (*psy*), fitoeno desaturasa (*pds*), licopeno ciclase (*lcy*),  $\beta$ -caroteno Ketolasa (*bkt*) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (*chy*), se aumenta bajo las condiciones de estrés de nutrientes y alta intensidad de luz en combinación con cloruro de sodio/acetato de sodio.

El estrés de nutrientes y la alta intensidad de luz inducen la expresión de los genes biosintéticos de astaxantina, *bkt* y *chy*, transitoriamente. El aumento de

la expresión de estos genes se observó con acetato de sodio y cloruro de sodio/acetato de sodio, mientras la expresión fue demorada con cloruro de sodio.

La ingeniería genética es una opción para mejorar la ruta biosintética de los carotenoides, para producir astaxantina en *H. pluvialis*, modificando el gen de la fitoeno desaturasa (*pds*) o usando los genes carotenogénicos en *Saccharomyces cerevisiae*, como fitoeno desaturasa (*crtl*) y la bifuncional fitoeno sintasa/licopeno ciclase (*crtYB*).

En la fitoeno desaturasa (*pds*) se ha estudiado también la duplicación de genes a *pds<sub>1</sub>* y *pds<sub>2</sub>*, lo cual no ha sido reportado en *H. pluvialis*. Se han observado acciones biofuncionales para la actividad separada de  $\beta$ -caroteno hidroxilasa y ketolasa regulada por dos genes separados, uno de los cuales (*crtS*) se ha clonado en otros organismos.

Además, se sugiere que se puede involucrar otra enzima en el proceso de síntesis de astaxantina, por ser este un carotenoide, como la plastido terminal oxidasa (PTOX), la cual se ha expresado bajo condiciones de estrés para mejorar la producción de carotenoides. A pesar de que algunos genes reguladores para enzimas de la ruta biosintética de carotenoides han sido identificados en varias especies, incluyendo algas, aún no se conoce bien la regulación de la carotenogénesis en vivo.

La dilucidación de las rutas sintéticas de carotenoides y el enorme progreso en la clonación de genes, estableciendo los genes, las enzimas implicadas y conociendo como es el proceso y su regulación, han aportado las herramientas necesarias para realizar ingeniería genética y así incrementar la síntesis de carotenoides y aumentar la tolerancia a condiciones de estrés.

La mayoría de las modificaciones va dirigida a aumentar el contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno, aprovechando la sobreexpresión de la fitoeno desaturasa (*pds*) y fitoeno sintasa (*psy*).

Se evidencia la existencia de una sobrerregulación de un múltiple mecanismo de defensa antioxidante, espacialmente y temporalmente, para proteger las células del *H. pluvialis* en contra del estrés oxidativo.

La expresión de genes caroteno génicos, fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclase (LCY),  $\beta$ -caroteno Ketolasa (BKT) y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CHY), se aumenta bajo las condiciones de estrés de nutrientes, alta intensidad de luz en combinación con cloruro de sodio/acetato de sodio.

El estrés de nutrientes y la alta intensidad de luz inducen la expresión de los genes biosintéticos de astaxantina, *bkt* y *chy*, transitoriamente. El aumento de la expresión de estos genes se observó con acetato de sodio y cloruro de sodio/acetato de sodio, mientras la expresión fue demorada con cloruro de sodio.

Diferentes expresiones de genes carotenoides durante la carotenogénesis indican su probable regulación en los diferentes estados de acumulación del carotenoide. En un estudio realizado por Steinbremer J. y Linden H (2001), se reportó un alto nivel de expresión para genes *psy* y *chy*, cuando las células estuvieron expuestas a alta intensidad de luz y cloruro de sodio. En la familia de genes PSY se han identificado los genes *psy1*, *psy2* y *psy3*, en condiciones de estrés ambiental como sequía y presencia de sal, estableciendo que el gen *psy3* es importante en el flujo de la regulación de carotenoides en respuesta a condiciones de estrés, lo cual no ha sido reportado en *H. pluvialis*.

El primer estudio que presenta la regulación de carotenogénesis general y específica para astaxantina bajo la influencia de nutrientes y otras condiciones de estrés, se realizó por VIDHYAVATHI et al. (2008), estudiando el nivel de expresión y de metabolismo usando inhibidores transcripcionales y transduccionales.

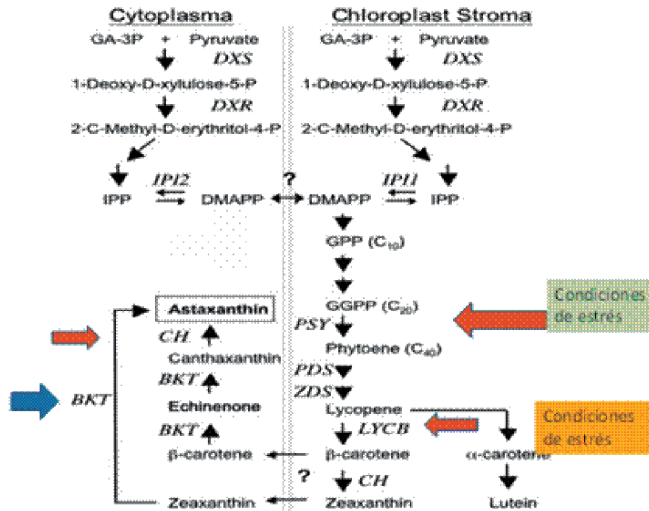
En la **tabla 2** se encuentra una relación de algunos estudios que permite correlacionar condiciones de estrés- expresión genética, teniendo en cuenta las determinaciones realizadas y las instituciones involucradas (grupos de investigación).

Ensayos *in vitro* de *bkt* y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) confirman que la síntesis de astaxantina preferiblemente procede con la adición por adición de grupos cetona a los pasos de hidroxilación en *H. pluvialis* y así formar primariamente astaxantina de la hidroxilación de cantaxantina catalizada por CrtR-b, el cual fue expresado en respuesta a varias condiciones de estrés.

En general, algunos genes son expresados al nivel mRNA en respuesta al estrés oxidativo. Los factores de estrés que afectan el nivel máximo de expresión de Los factores de estrés que producen el máximo nivel de expresión de genes, relacionados con el incremento de la síntesis de carotenoides (**figura 17**), se encuentran en el siguiente orden:

Luz baja < luz baja + sulfato ferroso < luz baja + acetato de sodio < luz alta + sulfato ferroso/acetato de sodio < luz alta + sulfato ferroso + acetato de sodio. Múltiples factores de estrés (luz alta + sales que producen estrés + estrés por hierro) son aplicados a *H. pluvialis*, los transcritos de los genes son bajos durante un estado temprano de estrés y el máximo nivel de expresión se produce por un factor de estrés como la luz alta.

**Figura 17.** Factores de estrés que producen el máximo nivel de expresión de genes



*Nota.* RICHMOND y HU (2013).

Tres diferentes genes han sido aislados del *H. pluvialis*, incluyendo BKT1, BKT2 y BKT3. La existencia de múltiples genes BKT y su expresión bajo condiciones de estrés ha sido propuesto como el responsable de la acumulación de astaxantina. En *H. pluvialis* el BKT está localizado en el cloroplasto y en los cuerpos lipídicos citoplasmáticos. El PDS está localizado en el cloroplasto. El transporte de los intermediarios de la carotenogénesis del cloroplasto a los cuerpos lipídicos, para la producción y almacenamiento de astaxantina es necesario.

La expresión de genes carotenogénicos, fitoeno sintasa (*psy*), fitoeno desaturasa (*pds*), licopeno ciclasa (*lcy*), β-caroteno Ketolasa (*bkt*) y β-caroteno hidroxilasa (*chy*), se aumentan bajo las condiciones de estrés de nutrientes y alta intensidad de luz en combinación con cloruro de sodio/acetato de sodio (VIDHYAVATHI *et al.*, 2008; SCIBILIA *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2021).

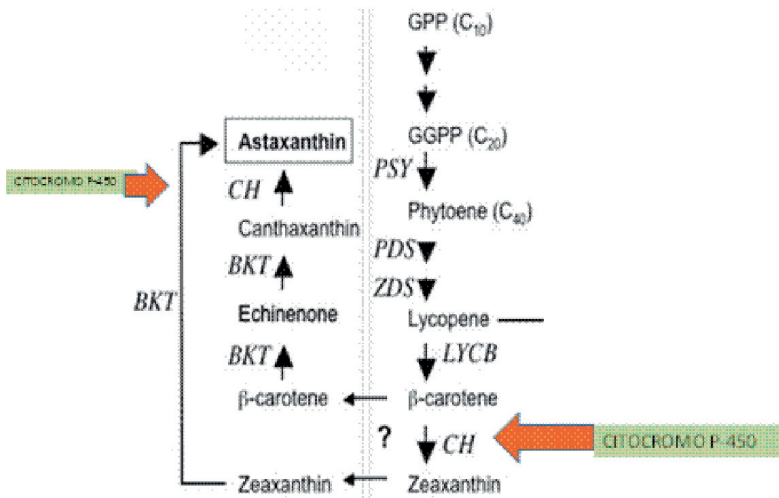
El estrés de nutrientes y la alta intensidad de luz inducen la expresión de los genes biosintéticos de astaxantina, *bkt* y *chy*, transitoriamente. El aumento de la expresión de estos genes se observó con acetato de sodio y cloruro de sodio/acetato de sodio, mientras la expresión fue demorada con cloruro de sodio (VIDHYAVATHI *et al.*, 2008).

Los estudios que usan 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.

La evaluación del crecimiento y la producción de astaxantina en condiciones de estrés por concentraciones bajas de nitrógeno (nitrógeno 4.0 % y 5.0 %) y alta irradiancia  $170 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  en medio RM, permitió evaluar la expresión de genes mediante el análisis en biorreactores teniendo como referencia un control del crecimiento con nitrógeno en concentraciones normales, durante 36 días; tras la cuantificación se determinó que no se presentan diferencias significativas entre los factores de estrés de nitrógeno al 4.0 % y al 5.0 % ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, con el contenido de nitrógeno al 4.0 %, la producción de astaxantina se incrementó en un 40 % ( $3,52 \times 10^6 \mu\text{g}/\text{cel} \times \text{mL}$ ), con respecto a los tratamientos donde se trabajaron con concentraciones de nitrógeno al 5 %. Los genes expresados fueron *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y *chy* (figura 18) (GÓMEZ *et al.*, 2019).

Figura 18. Expresión de genes



Nota. RICHMOND y HU (2013).

La regulación de la expresión genética a la sobreexposición de condiciones de estrés está ligada al estado redox del pool de plastoquinonas. Todos los genes investigados están sobrerregulados a nivel de mRNA en respuesta a estrés. Es necesario conocer más los factores intracelulares (nivel molecular) relacionados

con la alta acumulación de carotenoides secundarios y los efectos de la adición de inhibidores transcripcionales y traslacionales.

La expresión de genes observada y la producción de astaxantina, se debe a que la baja concentración de nitrógeno es suficiente para aumentar los sistemas de defensa enzimática celular y así enfrentar el estrés generado por la alta intensidad de luz (Wet *al.*, 2013). Como resultado, las células pueden alcanzar un cierto grado de crecimiento y/o producción de biomasa sintetizando una gran cantidad de astaxantina, como fue evidenciado con la menor concentración de nitrógeno (4 %), actuando como mecanismo de defensa para proteger las células del estrés causado por la deficiencia de nitrógeno y la alta irradiancia.

## CONCLUSIONES

La revisión realizada permitió conocer la influencia de diferentes condiciones de estrés sobre la expresión de genes carotenogénicos en *H. pluvialis*, ensayados en forma individual o combinada, evidenciando que la influencia de factores de estrés aplicados en forma combinada es limitada, así como estudios que relacionen estas condiciones con la expresión de genes carotenogénicos, durante la producción de astaxantina. Se evaluaron condiciones de estrés como la deficiencia de nitrógeno correlacionado con la expresión de genes, encontrando que con el contenido de nitrógeno al 4.0 % en medio RM, la producción de astaxantina se incrementó en un 40 % ( $3,52 \times 10^6$  µg/cel x mL), con respecto a los tratamientos donde se trabajaron con concentraciones de nitrógeno al 5 %. Los genes expresados fueron *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y *chy*.

## REFERENCIAS

DU, F., HU, Ch., SUN, X., ZHANG, L. & XU, N. (2021). Transcriptome analysis reveals the promoting effect of trisodium citrate on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light condition. *Aquaculture*, 543, 736978.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848621006414>

Eonseon, J., Lee, Ch. and Polle J. (2006). Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation and biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16(6), 821–883. <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?uid=1918&vmd=Full>

GAO, Z., MENG, Ch., ZHANG, X., XU, D., ZHAO, Y., WANG, Y., LV, H., YANG, L. CHEN, L. and YE, N. (2012). Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features

- induced by JA in *H. pluvialis*. *PLoS One*, 7(8), e42243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22870309/>
- GAO, Z., MENG, Ch., GAO, H., ZHANG, X., XU, D., SU, Y. WANG, Y., ZHAO, Y. and YE, N. (2013). Analysis of mRNA expression profiles of carotenogenesis and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under exogenous 2, 4-epibrassinolide (EBR). *Biological Research*, 46(2), 201-206. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23959019/>
- GRÜNEWALD, K., ECKERT, M., HIRSCHBERG, J. and HAGEN, C. (2000). Phytoene desaturase is localized exclusively in the Chloroplast and up-regulated and the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyciae). *Plant Physiology*, 122(4), 1261-1268. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10759523/>
- LEI, A., CHEN, H., SHEN, G., HU, Z., CHEN, L. and WANG, J. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448811/>
- LI, Y., SOMMERFELD, M., CHEN, F. and HU, Q. (2009). Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 253-263. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2946551/>
- LI, F., VALLABHANENI, R. and WURTZEL, E. (2008). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*, 146(3), 1333–1345. <https://academic.oup.com/plphys/article/146/3/1333/6107240>
- MENG, Ch., TENG, Ch., JIANG, P., QIN, P., and TSENG Ch. (2005). Cloning and Characterization of  $\beta$ -Carotene Ketolase Gene Promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(4), 270-275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15806294/>
- QUIROGA, C., DÍAZ, J., HUÉRFANO, J., DÍAZ, L., RODRÍGUEZ, J. y CAMACHO, J. (2019). Producción de astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24. <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1532>
- RICHMOND, A. and HU, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- RICHMOND, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>

- SCIBILIA, L., GIROLOMONI, L., BERTEOTTI, S., ALBORESI, A. and BALLOTTARI, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- SIPAÚBA-TAVARES, L., MILLAN, R. N. and BERCHIELLI-MORAIS, F. A. (2013). Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 585-591. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212699/>
- STEINBRENNER, J. and SANDMANN, G. (2006). Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7477-7484. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17012596/>
- STEINBREMER, J. and LINDEN, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 125(2), 810-817. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11161038/>
- VIDHYAVATHI, R., VENKATACHALAM, L., KAMATH, B. S., SARADA, R. and RAVISHANKAR, G. A. (2007). Differential expression of carotenogenic genes and associated changes in pigment profile during regeneration of *Haematococcus pluvialis* cysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 879-887. doi: 10.1007/s00253-007-0876-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17318532/>
- WANG, J., SOMMERFELD, M., LU, C. and HU, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202. <https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2696>
- WANG, B., ZARCA, A., TREBS, A. and BOUSSIBA, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyciae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Physiology*, 39(6), 1116-1124. [https://www.researchgate.net/publication/227630392\\_Astaxanthin\\_Accumulation\\_in\\_Haematococcus\\_pluvialis\\_Chlorophyceae\\_AS\\_An\\_active\\_photoprotective\\_process\\_under\\_high\\_Irradiance](https://www.researchgate.net/publication/227630392_Astaxanthin_Accumulation_in_Haematococcus_pluvialis_Chlorophyceae_AS_An_active_photoprotective_process_under_high_Irradiance)
- WELSCH, R., WÜST, F., BÄR, C., AL-BABILI, S. and BEYER P. (2008). 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*, 147(1), 367-380. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18326788/>

## **CAPÍTULO 4. CONDICIONES DE ESTRÉS EN UN BIORREACTOR PARA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

### INTRODUCCIÓN

El carotenoide astaxantina es el más importante desde el punto de vista biotecnológico por su uso en alimentación animal y humana, así como en las industrias farmacéutica, cosmética, nutracéutica y en la acuicultura. La mayor cantidad de astaxantina es producida por síntesis química y es vendida a un precio de USD 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, colores de luz, ciclos de luz/oscuridad, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, sales y presencia de inhibidores de procesos metabólicos a diferente nivel. Por lo tanto, es necesario establecer cuáles son las condiciones de estrés adecuadas para la producción de astaxantina durante el escalamiento del cultivo de la microalga en el biorreactor Biostat® a plus.

El *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, utilizando para ello biorreactores como el Biostat® a plus de forma tubular y de material de vidrio que facilita la

entrada y distribución de luz y el control de las condiciones de cultivo como el mezclado, pH y distribución de gases como CO<sub>2</sub> y temperatura.

De igual forma, aprovechando 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.

La realización de esta investigación aprovechó 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 promisoriosa 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.

Los carotenoides son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica reemplazando colorantes importados en su mayoría de origen químico, dañino para la salud, con impacto en el medio ambiente, lo que incrementa tanto los costos de producción, como el costo final del producto. Es por esto que se hace necesario buscar nuevas alternativas para aprovechar la biodiversidad, como fuente de compuestos bioactivos que sustituyan los existentes y que hacen parte de las formulaciones tradicionales.

## 1. BIORREACTORES

Los reactores y biorreactores son sistemas en los cuales se realiza una conversión biológica y están diseñados para favorecer las rutas metabólicas de diferentes cultivos. Son generalmente hechos de acero inoxidable, actualmente hay de vidrio y acero inoxidable. Tienen un sistema de control y medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Poseen un sistema de agitación con el cual se logra una mezcla homogénea del contenido para transferencia de oxígeno requerida. (HERNÁNDEZ-PÉREZ y LABBÉ, 2014)

El diseño del biorreactor asegura esterilidad, garantiza la ausencia de contaminación y permite un alto grado de control sobre el proceso. Los biorreactores poseen sensores que monitorean durante todo el proceso los parámetros críticos, como son la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto,

para ajustar los valores, ya que los cambios en estos parámetros afectan significativamente el rendimiento del proceso y la estabilidad del producto final. La agitación en el sistema previene la acumulación de metabolitos tóxicos.

Existen dos sistemas básicos para el cultivo de microorganismos fotoautotróficos, los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados birreactores y fotobiorreactores (FBR), en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera. Sin embargo, el perfeccionamiento de la tecnología de los sistemas abiertos hace tiempo llegó a su límite, restringiendo así el desarrollo de la biotecnología de microalgas. (HERNÁNDEZ-PÉREZ y LABBÉ, 2014)

## 2. DISEÑO DE UN FOTOBIORREACTOR (FBR)

El diseño de un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas debe tener las siguientes consideraciones (BENAVENTE-VALDÉS et al., 2012).

### 2.1. DISTRIBUCIÓN DE LA LUZ

En cultivos de microorganismos fotoautótrofos la disponibilidad de luz determina la velocidad específica a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determina también la tasa específica de crecimiento. Sin embargo, en todos los sistemas de cultivo las células más cercanas a la superficie iluminada impiden la penetración de la luz hacia el seno del medio de cultivo y producen un efecto de sombreado sobre las células más alejadas de la superficie.

En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 cm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10 – 30 %) del volumen total del cultivo. Debido a que el medio de cultivo está en constante movimiento, las células solo son expuestas por breves instantes a la luz en ciclos que pueden durar desde milisegundos a unas cuantas décimas de segundo. En condiciones reales el factor que determina la actividad fotosintética es la cantidad de energía disponible para cada célula individual, más que la cantidad de energía luminosa incidente.

Los parámetros que pueden considerarse básicos para describir la disponibilidad de energía bajo una iluminación intermitente son dos, la relación de los periodos luz/oscuridad (L/O) y la frecuencia de los ciclos L/O. Estos establecen en gran medida el régimen de iluminación, el cual es un indicador de la disponibilidad de luz para una célula individual.

La trayectoria de la luz es la distancia transversal que debe recorrer un fotón para pasar a través de un fotobiorreactor. Su magnitud es determinada por dife-

rentes medidas en los diferentes tipos de reactores. Así, la trayectoria de la luz es determinada por la profundidad de líquido en un reactor de tipo carrusel, por la separación entre las placas en un reactor de placas (horizontal o vertical) o por el diámetro del tubo en un reactor tubular. Las rutas luminosas que mejores resultados han dado en diferentes fotobiorreactores están entre 2.6 y 3.0 cm, sin embargo, en cultivos de alta densidad celular, una trayectoria de la luz de 1 cm aumenta la probabilidad de que las células en promedio estén expuestas a un régimen de iluminación óptimo. En virtud de lo anterior, actualmente no es recomendable utilizar rutas luminosas de más de 10 cm en ningún tipo de fotobiorreactor.

## 2.2. MEZCLADO

El mezclado en fotobiorreactores es conocido como un factor de mejoramiento de la producción de biomasa. El mezclado juega un rol importante en el aseguramiento de la distribución de la intensidad de luz, en una suficiente transferencia gaseosa de  $\text{CO}_2$  y en el mantenimiento uniforme de pH.

Un correcto mezclado favorece el intercambio gaseoso, evita la sedimentación celular, la formación de gradientes de las condiciones ambientales y de la concentración de nutrimentos; pero su función principal es permitir que todas las células puedan acceder a las zonas iluminadas en un fotobiorreactor.

El mezclado puede inducirse de muy diversas formas; sin embargo, los FBR del tipo airlift se usan comúnmente por su sencillez y porque pueden diseñarse para inducir un esfuerzo de corte pequeño que no cause daño mecánico a las células. La fragilidad celular es con frecuencia un factor que limita la intensidad de mezclado que puede aplicarse a un cultivo. En virtud de que la fragilidad celular y las características fotosintéticas, entre otros factores, pueden variar de cepa a cepa, los niveles óptimos de mezclado dependerán de cada cepa cultivada.

## 2.3. INYECCIÓN DEL GAS

La introducción de  $\text{CO}_2$  por medio del burbujeo dentro del FBR deber ser considerada dentro del diseño. La inyección de dióxido de carbono refiere al proceso mediante el cual este gas es suministrado artificialmente al FBR. Varios estudios han demostrado que una aireación rica en  $\text{CO}_2$  provee este gas en mayor cantidad a las microalgas, lo que desoxigena el medio y evita la fotooxidación. Sin embargo, desde un punto de vista económico, una velocidad de aireación mayor conlleva mayores costos de producción, por lo cual hace más caro el escalamiento.

Por otra parte, se ha estudiado la concentración óptima de  $\text{CO}_2$  para la producción de microalgas en fotobiorreactores, mostrando que el uso de aire enriquecido con 5 o 10 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  a una velocidad de 0.025 vvm (volumen de aire por

volumen de trabajo por tiempo) es efectivo para el cultivo de biomasa. En reactores de superficie plana (flat panel), una velocidad de aireación de 0.05 vvm ha resultado suficiente para el mejoramiento del mezclado y la transferencia gaseosa.

Para el diseño de un fotobiorreactor en el que se desee una óptima producción de biomasa es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- La trayectoria de la luz 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 oxígeno.
- Mantener temperatura y pH óptimos (GÓMEZ *et al.*, 2014).

En el caso del cultivo de microalgas se debe tener en cuenta el acoplamiento de la hidrodinámica, las condiciones de luz, la transferencia de masa dentro del reactor, y el crecimiento de la célula tiene que ser considerado cuidadosamente en el diseño del fotobiorreactor. Porque la penetración de la luz dentro de un reactor juega un papel decisivo en el cultivo de microalgas, los fotobiorreactores se caracterizan por tener una capa fina. Por lo tanto, la escala de los FBR se basa en semejanzas geométricas manteniendo la relación constante entre superficie –volumen. (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2012; LÓPEZ y ROJAS, 2010).

#### 2.4. ESCALAMIENTO DE MICROALGAS

La productividad de una biomasa algal es fuertemente dependiente de las características genéticas, tecnologías de cultivo y el rendimiento del fotobiorreactor. Específicamente, el diseño de un fotobiorreactor tiene un decisivo efecto en la mezcla, que está estrechamente relacionada con la actividad celular y con la utilización de dióxido de carbono.

El régimen de luz dentro de un fotobiorreactor puede dividirse en una zona fótica cerca de la superficie iluminada y una zona oscura en el interior del reactor. La zona oscura, que se forma debido a la absorción de la luz y el efecto de sombreado por las células en crecimiento, puede ser ampliada por la mayor densidad celular y así llevará eventualmente a la inactivación de las células.

Si la mezcla se realiza perfectamente en el reactor, que depende principalmente del tamaño del diseño y el gas del reactor, se procura que las células se mantengan en un ir y venir constante entre la zona fótica y oscura del reactor a una frecuencia constante. De lo contrario, los nutrientes esenciales como minerales y metales

no serían suministrados suficientemente a las células durante los cultivos fotoautotróficos, y el crecimiento de la célula se puede inhibir o cesar. Además, una concentración demasiado alta de oxígeno y dióxido de carbono podría conducir a la apoptosis. ((BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2012; LÓPEZ Y ROJAS, 2010; KOLLER *et al.*, 2018)

Para resolver estos problemas en el diseño de un reactor se han optimizado los principales factores, como la pendiente de una parte inferior en forma de V de un fotobiorreactor, el caudal volumétrico (vvm) de aire, la relación altura/diámetro (H/D) y el diámetro de un distribuidor de aire para cultivos fototróficos de *H. pluvialis*, por ejemplo. Estos cuatro factores están estrechamente relacionados con el efecto de mezcla en el reactor, que está relacionado con la reproducción de la célula a través del metabolismo (VÁSQUEZ *et al.*, 2013)

Los componentes de un fotobiorreactor tipo fotobiorreactor en bolsa están integrados por diversas partes, como un filtro de aire para prevenir la contaminación, un medidor de flujo de aire, un sparger de aire y una línea de muestreo. Para la selección del sparger, el efecto de varias formas (esfera, hexaedro y forma cilíndrica), diámetros (1, 1.3 y 1.6 cm), y diversos materiales (vidrio, plástico y metal), la mezcla en el biorreactor se analiza midiendo el cambio en densidad celular.

El crecimiento de las microalgas es afectado por la luz (los cultivos de microalgas están limitados por la luz, ya que es fácilmente absorbida y dispersada por las células de microalgas), el oxígeno disuelto, el contenido de dióxido de carbono, el pH, la temperatura, los nutrientes (N y P), elementos traza y el carbono.

Sin embargo, la utilización y comportamiento de los cultivos están fuertemente influenciadas por varios parámetros, tales como la concentración de células, la trayectoria de la luz, velocidad de la mezcla y la geometría del recipiente de cultivo. Estas características requieren un cultivo en sistemas cerrados que ofrecen un número de ventajas, entre ellas, mejor control del ambiente de cultivo, protección de la contaminación del medio ambiente y la producción de alta densidad celular. Los sistemas de cultivo por lote (batch) se aplican extensamente debido a su simplicidad y flexibilidad, permitiendo cambiar de especie y rápidamente corregir defectos en el sistema. (GÓMEZ *et al.*, 2014; HARUN *et al.*, 2014, SIPAUBA *et al.*, 2013).

## 2.5. BIORREACTOR BIostat® A PLUS

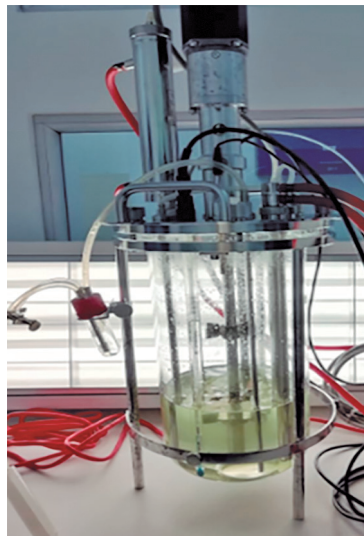
El biorreactor incluye vasos de vidrio de pared doble con compartimento medio interno, con sección inferior cóncava y cubierta exterior con conectores para ciclo de termostato o recipientes de vidrio de pared simple, para calentar mediante el uso de una manta de calefacción eléctrica (ver Figura 19).

También incluye en su diseño una 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.

El biorreactor tiene materiales como 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 para toma de muestra del cultivo, 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.

Se utilizan electrodos/sensores, para controlar y monitorear el cultivo, como el sensor de temperatura Pt 100, el electrodo de pH, el electrodo  $pO_2$ , la sonda antiespumante, la 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) (Sartorius, 2018).

**Figura 19.** *Biorreactor Sartorius Stedim System GmbH (Sartorius, 2018)*



Los biorreactores, como el Tecferm que se observa en la figura 20, son un sistema básico de investigación para el cultivo de bacterias y hongos, para el cultivo de células animales o vegetales, para lo cual es necesario ajustar algunos parámetros, este es capaz de operar con vasos de 2, 5, 10 o 20 litros. Consta con un reactor tipo tanque de agitación, con capacidad total de 7.5 L y un volumen útil de trabajo máximo de 5 litros. El rango de agitación está entre 0 y 800 rpm, sin embargo, se recomienda operarlo entre 50 y 300 rpm.

**Figura 20.** Biorreactor Tecferm de 5 L donde se observa a. mirilla lateral, b. aro de cierre, c. tapa tipo head plate y d. vaso inoxidable



El rango de temperatura usual para este biorreactor es entre 30 y 40 grados, 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 CO<sub>2</sub> 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) (ZULUAGA, 2006).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MICROORGANISMO

*Haematococcus pluvialis* UTEX2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA). Mantenimiento de la cepa: medio sólido o 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.

#### 3.2. 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 UTEX2505, la cual se

encuentra caracterizada previamente. Para ver pureza de la cepa y del cultivo se monitoreará 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.

### 3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para preparar el inóculo se tomó una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX2505 y se transfirió asépticamente a un Erlenmeyer de 500 ml que contiene 200 ml de medio Volvox-MES fresco y estéril bajo continua iluminación, CO<sub>2</sub> 5 % en aire, agitación continua a 25 °C por 4 días. Para todos los experimentos un cultivo de 4 días fue usado como el inóculo (en la fase exponencial de crecimiento).

Para establecer la cantidad de inóculo a utilizar se decidió hacer un conteo celular y con esta información se procedió a realizar los cálculos necesarios para saber el volumen a adicionar del inoculo al biorreactor *Biostat A Plus* de 5 L. en sistema batch.

### 3.4. SISTEMA DE CULTIVO

Realización de cultivo de *H. pluvialis* en batch utilizando un biorreactor de 5 litros *Biostat® a plus* marca Sartorius, en el medio RM y BBM bajo condiciones de estrés establecidas en forma individual y combinada y controladas, en un cultivo fotoautotrófico. Se dejaron condiciones fijas y las definidas previamente.

### 3.5. CONDICIONES DE CULTIVO

Condiciones estándar: pH 7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25 °C, agitación continua, CO<sub>2</sub> 5 % en aire, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips). Cultivo 2 litros, inóculo 10 %.

Condiciones de estrés: deficiencia de concentración de nitrógeno en mg/L en un 5 %. Luz blanca y panel led color rojo, azul y blanco 285 luxes.

- El medio estéril con el pH ajustado se adiciona en el biorreactor.
- Se procede a adicionar el inóculo de la microalga ( $1 \times 10^4$  células/ml).
- Se realiza el montaje bajo las condiciones establecidas.
- Toma de muestras por triplicado cada tercer día en forma aséptica.

- Conservación de las muestras en solución formosalina (1:9), en una proporción 1:1, se toman 500  $\mu\text{l}$  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, agitación,  $\text{CO}_2$  en aire, ciclo luz/oscuridad, medios.
- Tiempo del estudio 20 – 30 días.

Su crecimiento se determinó en función del tiempo hasta el establecimiento de la fase estacionaria (estrés inducido). Se realizó conteo celular, se determinó la concentración de pigmentos, clorofila y astaxantina, por técnica colorimétrica (método APHA 2005, clorofila *a* y *astaxantina*) y HPLC (astaxantina : método de Britton,1985, modificado) y se determinó la respuesta morfológica por microscopía (medida, número y color de las células) (RICHMOND, 2017).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. CRECIMIENTO DE LA MICROALGA BAJO LAS CONDICIONES DE ESTRÉS EN EL BIORREACTOR BIOSTAT A PLUS DE 5 LITROS

En el crecimiento celular del *H. pluvialis* en el medio RM con deficiencia de nitratos al 5 %, deficiencia de fosfatos al 10 %, irradiancia de 70 luxes con lámparas fluorescentes de luz blanca, fotoperiodo 18h luz: 6h oscuridad, pH 6,8, temperatura de 20 °C, aire filtrado a 1,7 litros/minuto y agitación 100 rpm, se observó un crecimiento que llegó a  $8,62 \times 10^9$  células/mL al día 79 del cultivo (ver **figura 21**).

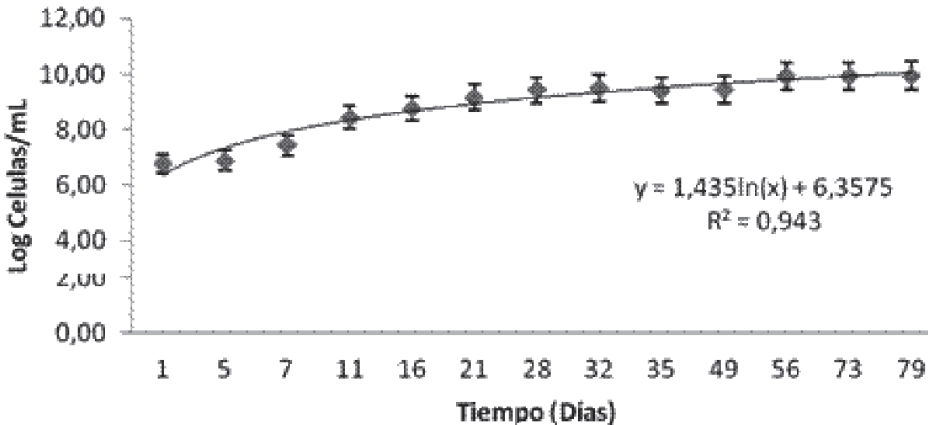
**Figura 21.** *Biostat A Plus de 5 litros con cultivo de H. pluvialis en medio RM modificado y alta irradiancia*



Durante el cultivo de la microalga se observó la fase exponencial de crecimiento en los 21 días de cultivo, tiempo en el cual se empieza el estrés de la microalga por el aumento de la irradiancia de 75 luxes a 285 luxes combinadas con la deficiencia de nitrógeno al 5 % y deficiencia de fosfatos al 10 %, observándose que siguió aumentando su biomasa hasta el día 79 (ver **figura 22**).

A continuación, se observa el ajuste con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) del 94 % del crecimiento de la microalga al modelo logístico, como se observa en la **figura 22**. La velocidad de crecimiento del *H. pluvialis* en el medio de cultivo RM modificado bajo las condiciones establecidas para el cultivo fue de 1,435 hora (ver **tabla 2**).

**Figura 22.** Modelo logístico curva de crecimiento de *H. pluvialis*



*Nota.* BARRETO y ORTIZ (2020).

**Tabla 2.** Coeficientes del modelo logístico

Medio de cultivo	No. Datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento / hora)	Coeficiente de correlación
RM	13	6,35	9,94	1,435	94

*Nota.* BARRETO y ORTIZ (2020).

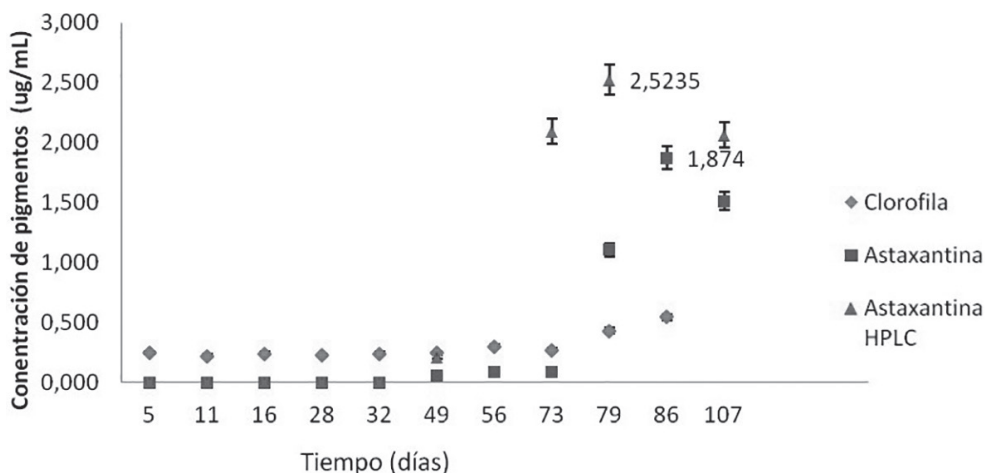
#### 4.2. CARACTERIZACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO DURANTE EL CULTIVO

Los mayores cambios se vieron reflejados en los días 16, 32, 49, 79, 86, 93, 100 y 107, cambiando de un color verde a un color rojizo, por el efecto de los factores de estrés al que fue sometida la microalga, deficiencia de nutrientes (fosfatos 10 % y nitratos 5 %) combinada con alta irradiancia de 280 luxes producida por un panel de luces led multicolor (azul, rojo y blanco) y lámparas fluorescentes blancas.

#### 4.3. CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA Y CLOROFILA

Se presentó un aumento progresivo de astaxantina hasta obtener una concentración final de 1,513  $\mu\text{g/mL}$  y 0,480  $\mu\text{g/mL}$  para clorofila, mientras que los días que presentaron una mayor producción de los carotenoides fue el día 79 con 1,874  $\mu\text{g/mL}$  para astaxantina y 0,545  $\mu\text{g/mL}$  para clorofila (ver **figura 23**).

**Figura 23.** Concentración de astaxantina y clorofila en  $\mu\text{g/mL}$



*Nota.* BARRETO y ORTIZ (2020).

Los coeficientes de variación (C.V.) determinados para los datos obtenidos para clorofila y astaxantina, son en general menores o iguales al 80 %, lo que significa que la media aritmética es representativa del conjunto de datos, por ende el conjunto de datos es “homogéneo”.

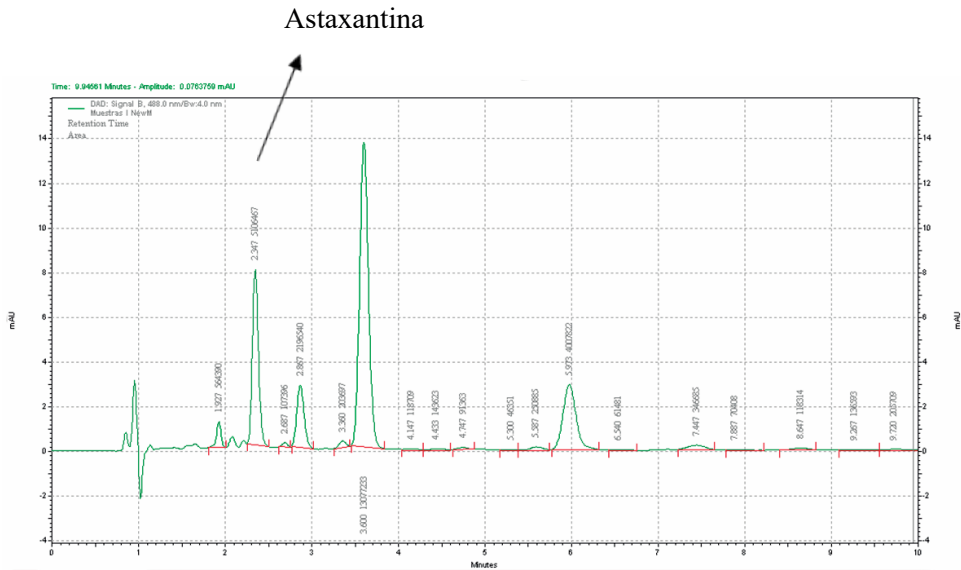
#### 4.4. MEDICIÓN DE ASTAXANTINA POR HPLC

Se emplearon las condiciones cromatográficas que se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** *Condiciones cromatográficas*

Columna ZORBAX 5 µm C18 (4.6 x 100mm)	
Fase móvil	Metanol:agua:hexano (95:4:1 v/v)
Flujo	1mL/min
Temperatura	30°C
Volumen de Inyección	10 µL
Espectro de absorción	488 nm
Tiempo de corrida	39 min

La corrida cromatográfica para la determinación de astaxantina en alícuotas de muestras microalgas tiene un total de 39 minutos, debido a la complejidad de la muestra, pues presenta entre 8 y 17 componentes. La **figura 24** muestra un acercamiento del cromatograma, incluyendo los 10 primeros minutos de corrida.

**Figura 24.** *Cromatograma de HPLC del extracto de microalga H. pluvialis productora de astaxantina*

A partir de la metodología desarrollada el tiempo de retención que presenta la astaxantina es en promedio de 2,22min, este corto tiempo de salida, luego del frente de solvente, se da debido posiblemente al largo de la columna empleada, ya que es más corta 100 mm, que las utilizadas en estudios similares de 150 mm.

Comparando los resultados con los obtenidos en los estudios de YUN y CHEN entre 1999 y 2000, se podría indicar que luego del proceso de saponificación,

en el cromatograma el pico numero 1 corresponde a trans-astaxantina y luego en orden de retención estarían luteína, 3,9- cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, cantaxantina, clorofila y finalmente esteres de astaxantina. Sin embargo, durante el proceso estos componentes no pudieron ser confirmados.

Estos resultados indican que el proceso de saponificación realizado con hidróxido de sodio permitió identificar la astaxantina sugiriendo que los mejores resultados de desesterificación se logran durante períodos más largos de tiempo, como se realizó en este proyecto. Es importante tener en cuenta que las pérdidas de carotenoides durante la saponificación dependen de condiciones de desesterificación como la temperatura, el tiempo de hidrólisis y el uso de hidróxido de potasio y de hidróxido de sodio (GALARZA *et al.*, 2019).

Los resultados observados establecen que el *H. pluvialis* sometido a las condiciones de estrés por deficiencia de fosfatos al 10 %, nitratos al 5 % y alta intensidad de luz utilizando el biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros, permitió obtener hasta 2,524 ug/ml de astaxantina en el día 79, determinado por HPLC. Como ya se había anotado antes se muestra la desviación estándar de las réplicas, el promedio y el coeficiente de variación, destacando que, en ninguno de los casos, este último sobrepasa el 10 %, indicando repetibilidad de los datos obtenidos.

Otros estudios que se realizaron en el biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros fueron los realizados por MANRIQUE y MARÍN (2019), quienes usaron medios de cultivo como el BBM y RM, pH 6,8; temperatura 20 + 2 ° C; fotoperiodo 18 horas luz: 6 horas oscuridad; luz blanca, azul y roja con leds; irradiancia 180 hasta 210 lux; aire filtrado a una velocidad de 1,7 l/min y agitación 100 rpm.

En el estudio realizado con el medio de cultivo BBM se observó una producción de biomasa de  $2,88 \times 10^7$  cel./mL a los 36 días de crecimiento; concentración de clorofila de 28,3 µg/mL y una concentración de astaxantina de 3,1 µg/mL. El medio RM presentó una biomasa de  $2,43 \times 10^7$  cel./mL; concentración de clorofila de 21,8 µg/mL y una concentración de astaxantina de 2,9 µg/mL a los 36 días de crecimiento. Se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $F: 1,38$ ;  $Valor p: 0,253$ ;  $gl: 1$ ).

El uso del biorreactor 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 (MANRIQUE y MARÍN, 2019).

En otro estudio realizado en el biorreactor, con el fin de determinar las condiciones de cultivo óptimas para la microalga *H. pluvialis* en el medio RM con deficiencia de nitrógeno de 5 % y 4 %, se usó un control con el medio RM sin modificar, con fotoperiodos de 20 horas luz 4 horas oscuridad, pH de 5,7 a 6,3 y agitación constante en un biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros. Los resultados demostraron que el mayor rendimiento en producción de astaxantina y clorofila

se obtuvo en el cultivo que tenía medio RM con una concentración de nitrógeno de 5 %, logrando una producción de 1,1µg/ml de astaxantina y 13,5µg/ml de clorofila (PÉREZ y AYALA, 2019).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos se pudo concluir que la deficiencia de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo tiene un papel importante para la creación de condiciones de estrés, que desencadenan la formación de células en forma de quiste productoras de astaxantina y el aumento en la fotosíntesis que se ve representado en la producción de clorofila (Wang *et al.*, 2013a; PÉREZ y AYALA, 2019; GÓMEZ *et al.*, 2019)

A continuación, se presenta el resumen de los trabajos realizados en el biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros, bajo las condiciones de temperatura  $20 \pm 2$  °C, pH 6,8, aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min y agitación 100 rpm, teniendo en cuenta las condiciones trabajadas, biomasa obtenida en células/mL y astaxantina producida (**tabla 4**).

**Tabla 4.** Trabajos realizados en el *Biostat A Plus* de 5 litros

Condiciones de cultivo	Biomasa células/mL	Astaxantina µg/mL	Productividad Yp/Yx	Autores
Medio RM con deficiencia de nitrógeno al 5 % y 4 %, con fotoperiodos de 20 horas luz 4 horas oscuridad, luz blanca irradiancia 75 luxes, pH de 5,7 a 6, 3.	RM con nitrógeno al 5 %: $3,19 \times 10^5$ cel./mL 13,5µg/mL de clorofila.	RM con nitrógeno al 5 %: 1,1µg/mL.	$3,45 \times 10^{-6}$	PÉREZ y AYALA (2019)
Medios de cultivo BBM y RM, pH 6,8; fotoperiodo 18 horas luz: 6 horas oscuridad en condiciones de estrés 20 horas luz:4 horas oscuridad; panel led de luz blanca, azul y roja, irradiancia 180 hasta 210 luxes.	BBM: 2,88 $\times 10^7$ cel./mL y clorofila de 28,3 µg/mL. El RM: 2,43 $\times 10^7$ cel./mL y clorofila 21,8 µg/mL a los 36 días de crecimiento.	BBM: 3,1 µg/mL. RM: 2,9 µg/mL en 36 días de cultivo.	BBM: $1,08 \times 10^{-7}$ RM: $1,19 \times 10^{-7}$	MANRIQUE y MARÍN (2019)

---

Medio RM con deficiencia de nitratos al 5 %, deficiencia de fosfatos al 10 %, irradiancia de 70 luxes con lámparas fluorescentes de luz blanca, fotoperiodo 18h luz: 6h oscuridad, en condiciones de estrés 20 horas luz: 4 horas oscuridad, irradiancia 285 luxes con panel led multicolor.	8,62x10 <sup>9</sup> células/mL al día 79 y 0,545 ug/mL de clorofila.	1,874 ug/mL y por HPLC: 2,524 ug/mL.	2,93 x 10 <sup>-10</sup>	BARRETO y ORTIZ (2020)
--	---	--	--------------------------	---------------------------

---

Se puede establecer que el biorreactor bajo las condiciones trabajadas permitió obtener biomasa adecuada de la microalga en cantidad y calidad y la obtención de astaxantina, la cual se puede incrementar en producción mejorando la distribución de la luz, porque la productividad de astaxantina se puede aumentar por la alta biomasa obtenida, lo cual puede hacerse en dos pasos, primero el cultivo de la microalga en el biorreactor y luego el sometimiento de la biomasa a estrés, como lo realizan CHOI *et al.*, (2011) quienes obtuvieron en su estudio que aunque usando una alta intensidad de iluminación se mostró el mejor rendimiento para la producción de astaxantina celular, hubo una reducción significativa de la productividad volumétrica debido a la inhibición de la luz por la producción de biomasa.

En consecuencia, los datos apoyan que debería ser necesario dividir las etapas óptimas de crecimiento y producción de astaxantina inductiva para el cultivo de *H. pluvialis*, lo cual también se puede realizar para continuar esta investigación.

Es importante determinar cuál es la irradiancia adecuada para producir mayor cantidad de astaxantina combinándola con la deficiencia de nutrientes, como son el nitrógeno y fósforo, ya que si se aumenta demasiado la irradiancia se presenta muerte celular (WANG *et al.*, 2013b), además el contenido de astaxantina obtenido de este estudio fue bajo con respecto a la biomasa producida de la microalga, es por esto que es importante determinar las condiciones de estrés adecuadas para aumentar la producción del carotenoide.

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, y donde concluyeron que características como

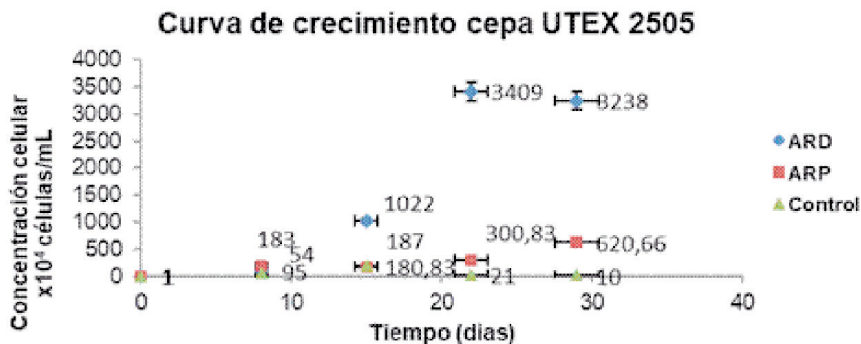
la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos extracelulares son factores que limitan el crecimiento de la microalga, y que crear un cultivo de tipo fed- batch, con un suministro de luz mixta blanca-roja y con cambio del medio de cultivo aumenta 1.16 veces la producción normal de biomasa (SUN *et al.*, 2017).

#### 4.5. MEDIO DE CULTIVO AGUA RESIDUAL

Se debe tener en cuenta que realizar el cultivo de esta microalga para su consecuente producción de pigmento a escala industrial en medios convencionales basados en sistemas de cultivo abiertos y cerrados no es suficiente; es por ello que se plantea la opción del cultivo en un medio a partir de aguas residuales que son un recurso que incluye líquidos y sólidos acuáticos de uso doméstico o comercial, así como otras aguas que se han utilizado en actividades del hombre y cuya calidad ha sido degradada, pero que alberga un amplio valor nutricional necesario para el crecimiento y la producción de biomasa de *H. pluvialis*, y que se caracteriza por ser una alternativa eco- amigable.

Se determinó que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas a concentración de 12,5 % presentó mayor tasa de crecimiento celular con la cepa UTEX 2505, obteniendo una concentración celular de  $3,41 \times 10^7$  células/mL al día 22. En medio con agua residual porcina, la cepa UTEX 2505 alcanzó una concentración celular máxima de  $6,21 \times 10^7$  células/mL en el día 29, mientras que el control tuvo una concentración celular máxima de  $1,87 \times 10^6$  células/mL en el día 15 (ver **figura 25**).

**Figura 25.** Crecimiento de la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5 %



QUINTERO E. (2020).

El medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas no generó crecimiento significativo con la cepa UA de *H. pluvialis*. Se evidenció que la cepa obtuvo una concentración celular máxima de  $3,21 \times 10^6$  células/mL en medio con agua residual doméstica en el día 22, y el control demostró un crecimiento máximo de  $2,46 \times 10^5$  células/mL en el día 22. Según el modelo logístico ajustado al crecimiento de la microalga, el medio de cultivo a partir de agua residual porcina con la cepa UTEX 2505 tuvo la mayor velocidad de crecimiento con 0,030 células/ hora (datos no mostrados).

En este estudio se realizó un análisis de varianza (Anova) de dos factores (medios de cultivo y cepas de *H. pluvialis*) con varias muestras por grupo para el crecimiento de *H. pluvialis*. Se demostró que para una confianza del 95 % existen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre las medias de crecimiento de las cepas de *H. pluvialis*., pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo evaluados ( $P > 0,05$ ). En la **tabla 5** se evidencian los resultados de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), realizada para cada medio de cultivo al final del ensayo.

**Tabla 5.** *Astaxantina por HPLC*

Medio de cultivo y cepa	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
A.R.D UTEX 2505	5,401
A.R.D. UA	27,091
A.R.P UTEX 2505	5,386
A.R.P UA	17,056

*Nota.* QUINTERO (2020).

A partir de los datos de la **tabla 5** se infiere que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas con la cepa UA presentó mayor concentración de astaxantina comparado con la cepa UTEX 2505. Comparado con el medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas, la cepa UTEX 2505 demostró menor concentración de astaxantina que la cepa UA.

La concentración final de astaxantina fue mayor con la cepa UA de *H. pluvialis* en el medio de cultivo de aguas residuales domésticas obtenidas mediante la técnica espectrofotométrica y de cromatografía líquida de alta resolución, siendo  $4,9 \mu\text{g/mL}$  y  $27,091 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. Estos resultados demuestran la obtención de astaxantina mediante el uso de aguas residuales.

Aunque existen muchos métodos y reactores para el cultivo de microalgas, una de las principales limitaciones para la implementación a gran escala de esta tecnología es el suministro sostenible y rentable de nutrientes. El uso de

los nutrientes contenidos en las aguas residuales puede ser una solución a este problema, contribuyendo al mismo tiempo a la biorremediación y limpieza final de aguas residuales (DE MENDONÇA *et al.*, 2018; GALVÃO, 2016).

Cada vez se pone más de 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 (Yoo *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2017) 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.

## CONCLUSIONES

La combinación de factores de estrés usando medio RM modificado y alta irradiancia, presenta efectos muy favorables en cuanto a la alta producción de biomasa y posterior acumulación de astaxantina 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 75 lux finalizada la fase exponencial de crecimiento de la microalga, también se ajustó el pH a 6,8, una temperatura de  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , 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 un combinación con un panel de luces led multicolor que constaba de luz blanca, azul y roja con emisión total de 285 lux con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 oscuridad para la combinación de estrés y así estimular la acumulación de astaxantina, en el biorreactor *Biostat*® *A Plus*. Se pueden utilizar aguas residuales domésticas como medio de cultivo para escalamiento.

## REFERENCIAS

APHA. American Public Health Association (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater (21st Edition). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1870039>

- BARRETO B., P. A. y ORTIZ BASANTE, T. (2020). *Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno al 5%, fosfatos al 10% 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\**].
- BENAVENTE-VALDÉS, J. R., MONTAÑEZ, J. C., AGUILAR, C. N., Méndez-Zavala, A. y VALDIVIA, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 1-12. [https://www.researchgate.net/publication/262560081\\_Tecnologia\\_de\\_Cultivo\\_de\\_Microalgas\\_en\\_Fotobiorreactores](https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores)
- CHOI, Y-E., YUN, Y-S., PARK, J. M. & YANG, J-W. (2011). Multistage operation of airlift photobioreactor for increased production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 21(10), 1081-1087. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031035/>
- DE MENDONÇA, H. V., OMETTO, J. P. H. B., OTENIO, M. H., RAMOS M., I. P. & DOS REIS, A. J. (2018). Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, 633, 1-11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29571041/>
- GALARZA, J. I., ARREDONDO V., B. VILLÓN, J. & HENRÍQUEZ, V. (2019). Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress. *Biotechnology Reports*, 23, e00351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31312607/>
- MACHADO GALVÃO, R. (2011). *Modelagem da produção de biomassa da Haematococcus pluvialis*. Universidade Federal da Bahia, Brasil. <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/18727/1/Dissertacao%20Rosana%20Galvao.pdf>
- GÓMEZ-TORRES, L. M., MORENO-GÓMEZ, B., VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E., AGUIRRE-MANCILLA, C. and AGUADO-SANTACRUZ, G. A. (2014). Plant cell photoautotrophic suspension cultures. Establishment and application perspectives. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 165-179. [https://www.researchgate.net/publication/287244960\\_Plant\\_cell\\_photoautotrophic\\_suspension\\_cultures\\_establishment\\_and\\_application\\_perspectives](https://www.researchgate.net/publication/287244960_Plant_cell_photoautotrophic_suspension_cultures_establishment_and_application_perspectives)
- GÓMEZ, L., OROZCO, M. I., QUIROGA, C., DÍAZ, J. C., HUÉRFANO, J., DÍAZ, L. E., RODRÍGUEZ, J. Y CAMACHO, J. E. (2019). Producción de astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia.

- Revista Mutis*, 9(2), 7-24. <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1532>
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. and DANQUAH, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037-1047. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032109002664>
- HUANG, Q., JIANG, F., WANG, L. and YANG, C. (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*, 3(3), 318-329. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809917304241>
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. y LABBÉ, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- KOLLER, A. P., WOLF, L., BRÜCK, T. and WEUSTER-BOTZ, D. (2018). Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 213-220. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29119322/>
- LEITON, Y.A. (2018). *Producción de Haematococcus pluvialis en un biorreactor Tecferm de 5 litros en medios de cultivo RM y BBM* [Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3701>
- LÓPEZ AYALA, F. A., y ROJAS PRADA, R. C. (2010). *Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas* [Trabajo de pregrado, Universidad Industrial de Santander]. <https://es.slideshare.net/slideshow/diceno-y-construccion-de-un-fotobiorreactor-251281852/251281852>
- MANRIQUE PINZÓN, M. A. y MARÍN CORREDOR, D. L. (2019). *Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiación 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]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3689>
- PÉREZ ZAMBRANO, E. y AYALA AGUDELO, Y. (2018). *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]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/2735>
- QUINTERO CORREDOR, E. (2020). *Evaluación de un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el*

- crecimiento de Haematococcus pluvialis y la producción del pigmento astaxantina* [Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/260>
- RICHMOND, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- Sartorius Stedim Systems GmbH. (2018). Manual equipo biorreactor [Archivo pdf]. <http://www.sartorius-stedim.com>.
- SIPAÚBA-TAVARES, L., MILLAN, R. N. and BERCHIELLI-MORAIS, F. A. (2013). Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 585-591. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212699/>
- SUN, H., LIU, B., LU, X., CHENG, K. and 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>
- VÁSQUEZ-VILLALOBOS, V., ARTEAGA GUTIÉRREZ, P., CHANAMÉ ACEVEDO, K. y Esquivel Torres, A. E. (2013). Modelamiento matemático y por redes neuronales artificiales del crecimiento de *Spirulina* sp. en fotobiorreactor con fuente de luz fluorescente e iluminación en estado sólido. *Scientia Agropecuaria*, 4(3), 199-209. <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633706006.pdf>
- WANG, J., HAN, D., SOMMERFELD, M., LU, C., & HU, Q. (2013a). Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 253-260. [https://www.researchgate.net/publication/257577083\\_Effect\\_of\\_initial\\_biomass\\_density\\_on\\_growth\\_and\\_astaxanthin\\_production\\_of\\_Haematococcus\\_pluvialis\\_in\\_an\\_outdoor\\_photobioreactor](https://www.researchgate.net/publication/257577083_Effect_of_initial_biomass_density_on_growth_and_astaxanthin_production_of_Haematococcus_pluvialis_in_an_outdoor_photobioreactor)
- WANG, J., SOMMERFELD, M., LU, C. and HU, Q. (2013b). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae*, 28(2), 193-202. <https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2696>
- YOO, J. J., CHOI, S. P., KIM, B. W. and SIM, S. J. (2012). Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 309–315. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909667/>

- YUAN J. P. and CHEN F. (1999). Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47(1), 31-35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10563844/>
- YUAN J. P. and CHEN F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814699002198>



## **CAPÍTULO 5. MORFOLOGÍA DE LA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA**

### INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares primarios que se encuentran en todos los sistemas acuáticos, incluyendo aguas dulces y de mar, lagos con grandes cantidades de sal, desiertos y ecosistemas árticos. Estos organismos pueden ser eucariotas o procariotas, diferenciándose en que para el primer caso tendrán organelos definidos como núcleo, mitocondrias, cloroplastos, etc., sin embargo, en el caso de las microalgas procariotas, también llamadas cianobacterias o algas verde-azules, estas poseen una estructura primaria similar al de las bacterias. Adicionalmente, estos organismos poseen la capacidad de convertir la energía lumínica y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en biomasa, es por esto que crecen rápidamente en presencia de CO<sub>2</sub>, inclusive más que las plantas, haciendo que puedan crecer en el agua en donde les llega la luz solar.

Por otro lado, las microalgas pueden crecer en condiciones fototróficas o autótrofas, es decir, realizando un proceso de fotosíntesis en el cual utilizan la luz solar o artificial como fuente de carbono; pero también pueden crecer en condiciones heterótrofas, dependiendo principalmente de la glucosa u otras fuentes de carbono, sin embargo, existen microalgas que pueden crecer en condiciones mixotróficas, en donde combinan estos dos metabolismos.

*Haematococcus pluvialis* es una microalga verde perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia Haematococceae, que se caracteriza por ser un microorganismo unicelular, de agua dulce, biflagelado y se encuentra distribuido en diferentes hábitats del mundo. La microalga fue descrita por primera vez en 1844 por J. Von Flotow y posteriormente su biología fue expuesta por Tracy Elliot Hazen en 1899. Su aislamiento se ha dado principalmente en cuerpos de agua temporales, como lo son aquellos producidos a partir de lluvias efímeras, piscinas artificiales y estanques naturales o artificiales. De igual manera, se ha aislado en lugares con diferentes condiciones climáticas y ambientales, como lo son aguas salobres en rocas a la orilla del mar, la cuenca de agua dulce de rocas llenas de nieve en Noruega, estanques de peces en Rumania, en lagos

de Chile, entre muchos otros. Además, *H. pluviialis* sobrevive en condiciones extremas de estrés como el aumento de luz, de temperatura y de la concentración de sal, más que muchas otras microalgas, esto es debido a que tiene la capacidad de enquistarse de manera rápida (SHAH *et al.*, 2016, RICHMOND, 2017).

El ciclo de vida de *H. pluviialis* consiste en cuatro tipos de morfología celular: macrozoides o también llamados zoosporas, microzoides, palmella (estos tres últimos estadios llamados “fase vegetativa verde”) y los hematoquistes o aplanosporas. La Figura 26 muestra algunos de estos estadios (SHAH *et al.*, 2016; LIYANAARACHCHI *et al.*, 2020).

Por su parte las células macrozoides o zoosporas pueden ser de forma esférica, elipsoidal o células en forma de pera con dos flagelos que emergen del extremo anterior, y un cloroplasto con numerosos pirenoides; tiene una longitud de 8-20  $\mu\text{m}$  con una característica matriz extracelular gelatinosa, y posee una gran cantidad de vacuolas cerca del protoplasto de la célula (SHAH *et al.*, 2016).

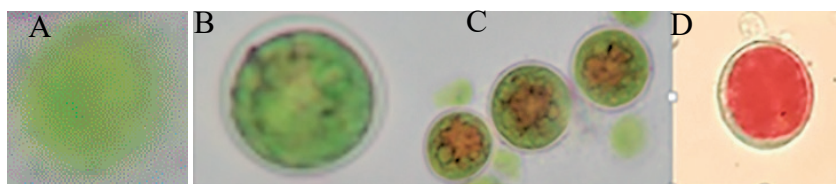
Cuando las condiciones ambientales o de cultivo son desfavorables, los macrozoides pierden sus flagelos, aumentan su tamaño y empiezan a formar una estructura amorfa de múltiples capas en las regiones internas de la matriz extracelular o la pared celular primaria, a medida que se convierten en células palmella no móviles, son células que se pueden llegar a dividir en 3-32 células hijas a través de la mitosis (SHAH *et al.*, 2016).

Si continúan las condiciones de estrés y cesa la división celular, la célula palmella se transforma en aplanospora asexual. En este último las células contienen una funda trilaminar gruesa y rígida y una pared celular secundaria de material resistente; estas dos estructuras hacen que la célula pueda resistir las condiciones de estrés a las que está sometida. Las aplanosporas hacen referencia a la fase enquistada con acumulación de astaxantina en el ciclo de vida de *H. pluviialis*; esto debido a que es capaz de acumular carotenoides como la astaxantina en forma de lípidos depositados en el citoplasma, haciendo que tenga un color rojo brillante característico de estas células (SHAH *et al.*, 2016). Las aplanosporas son células fotosintéticamente competentes, sin embargo, no tienen una alta actividad fotosintética causada por la ausencia del citocromo *fy*, generando a su vez que el flujo lineal electrones no se dé desde el fotosistema PS II al PS I. Todo esto causado por las condiciones de estrés a las que está sometida (ABALDE *et al.*, 1999).

Una vez hayan cesado las condiciones desfavorables, las aplanosporas germinan para formar células palmellas, las cuales se dividen y forman macrozoides flagelados y de esta forma se inicia un nuevo ciclo de vida (RICHMOND y HU, 2013). La **figura 26** contiene el ciclo de vida de esta microalga.

En algunas ocasiones las aplanosporas pueden hacer gametogénesis cuando se enfrentan a condiciones desfavorables extremas y luego vuelven a las condiciones favorables. Durante este proceso la célula puede producir 64 gametos conocidos como microzoides. Esta última célula posee un tamaño menor de 10  $\mu\text{m}$  y una gran movilidad. Sin embargo, esta reproducción sexual pocas veces ocurre en *H. pluvialis*.

**Figura 26.** Imágenes microscópicas de células de *H. pluvialis*. (A) Célula móvil vegetativa verde (macrozoide). (B) Célula palmella vegetativa verde. (C) Acumulación de astaxantina por célula palmella en transición a aplanospora. (D) Astaxantina acumulada por célula aplanospora



Como objetivos se propuso determinar el cambio morfológico de la microalga *H. pluvialis* sometida a diferentes factores de estrés, determinar la concentración de astaxantina producida bajo las condiciones de estrés aplicadas, correlacionar el cambio morfológico observado con la producción de astaxantina y establecer las condiciones de estrés que más influyen sobre el cambio morfológico y la producción de astaxantina.

## 1. METODOLOGÍA

### 1.1. MICROORGANISMO

*Haematococcus pluvialis* UTEX2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA). La cepa se mantiene en medio sólido y líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), a baja irradiancia y temperatura ambiente (15-20 °C).

### 1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para preparar el inóculo se tomó una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX2505 y se transfirió asépticamente a un Erlenmeyer de 500 mL que contiene 200 ml de medio Volvox-MES fresco y estéril bajo continua iluminación, CO<sub>2</sub> 5 % en aire, agitación continua a 25 °C por 4 días.

Para todos los experimentos un cultivo de 4 días es usado como el inóculo (en la fase exponencial de crecimiento).

Para establecer la cantidad de inóculo 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 inóculo a los reactores pequeños en sistema batch.

### 1.3. SISTEMA DE CULTIVO

Realización de cultivo de *H. pluvialis* en reactores pequeños en sistema batch, por triplicado para cada medio a ensayar, medio RM, medio BBM, medio OHM.

### 1.4. CONDICIONES DE CULTIVO

#### (1) Condiciones estándar:

- Cada medio estéril con el pH ajustado se adicionó en Erlenmeyers de 500 mL hasta un volumen de 400 mL. Se sellan para garantizar esterilidad.
- Se procedió a adicionar el inóculo de la microalga ( $1 \times 10^4$  cél. /mL).
- Se realizó el montaje de cada medio por triplicado en forma aleatoria, bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25 °C, agitación continua, CO<sub>2</sub> 5 % en aire, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips).
- Se tomó la muestra cada dos días 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 ver morfología) y el resto de muestra se utiliza para medición de pH. El conteo celular se realiza en cámara de Neubauer y en el equipo Cell Counter (Beckman Coulter, Z1 Coulter® particle counter )
- Se llevó control de temperatura, agitación, CO<sub>2</sub> en aire, ciclo luz/oscuridad, medios.

(2) Condiciones de estrés: deficiencia de nitrógeno, para lo cual se trabajará con concentraciones menores en un 4 % y 5 % de la concentración de nitrógeno presente en el medio original, deficiencia de fosfatos, acetato de sodio, color de luz blanca, roja y azul con alta irradiancia.

### 1.5. DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA

Se realiza el procedimiento APHA, 2005. Se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo, los cuales se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, posteriormente

se retiró el sobrenadante (medio de cultivo); al paquete celular se le adiciono 1 mL de metanol al 90 % y se calentó durante 10 minutos a 60 °C en baño serológico y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó una curva de calibración (absorbancia en función de la concentración expresada en ug/mL) con patrones de referencia, la lectura espectrofotométrica se hizo en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina, con el fin de encontrar las concentraciones en ug/ml. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

#### 1.6. 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.

#### 1.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS

Cada experimento se repitió tres veces con al menos tres replicaciones. Todas las observaciones y cálculos se hicieron separadamente para cada set de experimento. Se realizó un análisis multicriterio de los medios reportados en la literatura y de condiciones fotoautotróficas: pH, temperatura, CO<sub>2</sub>, aireación, luz, ciclos luz/oscuridad, agitación, deficiencia de nitrógeno, acetato de sodio.

### 2. RESULTADOS

Se realizó la revisión de trabajos realizados bajo diferentes condiciones de estrés por el grupo Bioprocesos y Control desde el año 2015 al 2020, como el de Niño *et al.* 2017, quienes evaluaron tres medios de cultivo para determinar cuál de estos estaba implicado con una mayor producción de astaxantina por *H. pluvialis*, así como determinaron condiciones óptimas para la producción del carotenoide. Para esto, evaluaron factores como el pH, aireación CO<sub>2</sub>, agitación e iluminación, y usaron medios de cultivo como BBM, RM y OHM. En el estudio se usaron biorreactores de 500 ml con 350 ml de medio, un inóculo en fase exponencial con  $1 \times 10^4$  cel./mL, cuyas condiciones de cultivo fueron CO<sub>2</sub> al 5 %, un pH de 6.7 a 7, un periodo de luz de 16 horas, y 8 horas de oscuridad e irradiancia de  $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  y como estrés un fotoperiodo de 20 horas luz con 4 horas de oscuridad y  $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  de irradiancia. Al final del estudio se concluyó que el medio de cultivo que obtuvo una mayor producción celular fue el RM, con un recuento celular de  $7,5 \times 10^5$  cel./mL en el día 36, y una mayor producción de astaxantina con un valor de  $8.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

En cuanto a los cambios microscópicos que presentó el cultivo con mayor producción de astaxantina, es decir, el medio RM, se pudo evidenciar que las células pasaron de ser células flageladas móviles, a células palmellas verdes que iban empezando a acumular el carotenoide en el interior de su citoplasma, hasta convertirse para el día 24 en células aplanosporas, estas últimas multiplicando su cantidad ya para el día 36 de cultivo.

Se puede evidenciar macroscópicamente que los cultivos entre el día en que se inocularon y el día 24 incrementaron su coloración verdosa debida a la biomasa de células palmellas, sin embargo, para el día 36 los medios adquirieron una coloración rojiza debida a la acumulación del pigmento por parte de las células aplanosporas.

Por su parte, GÓMEZ *et al.* 2019, evaluaron si la deficiencia de nitrógeno en los medios de cultivo, provocaban una mayor acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Para esto, realizaron un cultivo en medio RM con nitrógeno al 4.0 % y 5.0 %, utilizando las condiciones de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25° C, agitación continua, CO<sub>2</sub> 5 %, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia alta de 140 μE. Como control se utilizó el crecimiento en el medio con nitrógeno en concentraciones normales, bajo las mismas condiciones durante 36 días. El muestreo se realizó cada tercer día para cuantificación de astaxantina y clorofila y la determinación de expresión de genes.

Se obtuvo que la producción de astaxantina fue de  $3,52 \times 10^{-6}$  μg/cel x mL con una concentración de nitrógeno al 4.0 % y una irradiancia alta de 140 μE, incrementándose en un 40 % frente a la obtenida con nitrógeno al 5.0 % de  $2,08 \times 10^{-6}$  ug/cel x mL. Los genes *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt* y *chy*, se expresaron con nitrógeno al 4.0 %, mientras con nitrógeno al 5.0 % solo se expresaron *psy*, *pds* y *chy*.

En los cambios microscópicos que presentó el cultivo con nitrógeno al 4.0 %, es decir, el que obtiene mayor producción de astaxantina, se pudo observar cómo a través del tiempo el cultivo que inicialmente es incoloro adquiere una tonalidad verdosa por el aumento del metabolismo de células palmellas verdes, aunque para el día 15 los biorreactores adquieren un color rojo, debido a la producción de células aplanosporas que acumulan la astaxantina. Para el día 27 de cultivo, todos los biorreactores tenían esta coloración debido a las condiciones de estrés a las que estaba sometido el cultivo.

Además, RÍOS *et al.* (2016), trabajaron con una cepa control de *H. pluvialis* UTEX 2505 y una cepa aislada del Río San Francisco. Los cultivos de *H. pluvialis* se llevaron a cabo en el medio Basal Bold (BBM) con deficiencia de nitrógeno, en una concentración de 4 % y 5 %, fotoperiodo 20/4 luz/oscuridad con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura 21 °C, humedad relativa de 45 % y agitación manual una vez al día durante 10 minutos. Se evaluaron dos sistemas de cultivo. Método 1: biorreactores con tapa; método 2: biorreactores con entrada de aire filtrado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El mayor crecimiento fue reportado con el método 1, medio BBM con una deficiencia de nitrógeno al 4 %, en el día 21 de cultivo con  $1,12 \times 10^6$  cel/ml, así como la mayor producción de astaxantina, con una concentración de 0,102 ug/ml a 3,058 ug/ml. La mayor concentración de ácidos grasos se encontró en la cepa aislada del Río San Francisco en el BBM con deficiencia de nitrógeno al 5 % con 0.071g.

La producción de astaxantina y ácidos grasos se incrementó con los factores de estrés ensayados, deficiencia de nitrógeno 4 % y alta intensidad de luz con un fotoperiodo de 20 horas luz 4 de oscuridad utilizando lámparas blancas.

En el día 24 se observaron la mayor cantidad de células aplanosporas, lo que se relaciona con la acumulación del pigmento rojo en los biorreactores para el día 21 de cultivo. Cabe resaltar que esta morfología corresponde al método 1, es decir medio BBM con nitrógeno al 4.0 %, que en las condiciones de estrés mencionadas fue el que acumuló mayor concentración del carotenoide (0,102 ug/mL a 3,058 ug/mL).

Del mismo modo, ÁVILA *et al.* (2019), expusieron los cultivos de *H. pluvialis* a tratamientos con variación del color de luz y limitación de nitrógeno al 4.0 %, cada fase se desarrolló en un periodo de 30 días, de los cuales 15 días fueron de crecimiento y 15 días de estrés (luz roja, luz azul); se llevó a cabo en los medios de cultivo RM y BBM, los muestreos se realizaron cada tercer día para cuantificación de clorofila y astaxantina (observar morfología y realizar análisis moleculares para evidenciar expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de astaxantina). En la determinación de expresión de genes se obtuvo un 87,5 % el gen fitoeno sintasa (*psy*) y en un 62,5 % el gen  $\beta$ -caroteno Hidroxilasa (*chy*) presente en el total de las muestras analizadas. Se concluyó que el tratamiento óptimo para mejorar la producción del pigmento fue con una deficiencia de nitrógeno al 4.0 %, agregando una variación del color de luz roja en el medio BBM, alcanzando una producción de  $7.24 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/cel.}$  de astaxantina.

Esta concentración de astaxantina es comparable con la cantidad de células aplanosporas observadas en el medio, así como el cambio macroscópico observado en los biorreactores, esto debido a las condiciones de estrés a las que fue sometido el cultivo.

Por su parte, CUERO *et al.* (2019), realizaron el cultivo de *H. pluvialis* en medios RM y BBM, suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5 %, agitación con burbujeo, temperatura  $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ , fotoperiodo 20:4 luz / oscuridad y pH 6.8. Posteriormente, realizaron el recuento de biomasa y la evaluación morfológica en hemocitómetro. La cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó por espectrofotometría.

Se obtuvo una mayor concentración de astaxantina en el medio de cultivo RM (5.06 µg/mL) significativamente más eficiente para la producción ( $F=52.74$ ;  $P=<0.0001$ ;  $GL=1$ ), en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiación 150/ µE m<sup>2</sup> s como factores de estrés.

En cuanto la clorofila, se obtuvieron 29.45 µg/mL al utilizar luz azul, alta irradiación y 0.310 mg/mL de acetato de sodio en medio RM. La morfología observada fue vegetativa, palmella y aplanóspora. Se concluyó que la luz azul, el acetato de sodio a 0.372 mg/mL y una alta irradiación ayudan a inducir una mayor síntesis de astaxantina por *H. pluvialis*.

Utilizando diferentes factores de estrés para obtener una mayor producción de astaxantina en *H. pluvialis*, se realizó su cultivo en medio RM bajo un pH de 6,8, temperatura 20±2°C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiación 70 µE/m<sup>2</sup>s con diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos, durante 56 días (RODRÍGUEZ, 2019). Se determinó el crecimiento celular, el análisis de los cambios morfológicos y la cuantificación de astaxantina y clorofila por el método de espectrofotometría. Como resultados se obtuvo que el tratamiento con 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio obtuvo la mayor producción de astaxantina, en un 20 %, superando los demás tratamientos con 7,3 µg/mL.

El tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L y cloruro de sodio 1,28 g/L presentó el mayor crecimiento celular de 1,64x10<sup>5</sup> células/mL, presentándose diferencias significativas entre tratamientos, lo cual también se observó para la concentración de clorofila, obteniéndose para este tratamiento 0,245 µg/mL. La mayor producción de astaxantina se logró utilizando acetato de sodio desde el inicio del cultivo, seguido por la adición de cloruro de sodio al finalizar su fase exponencial.

Así mismo, un estudio realizado por RODRÍGUEZ en el 2020 demostró que una limitación de fosfatos en el cultivo de *H. pluvialis*, también puede incrementar la producción de astaxantina. Se utilizaron biorreactores inoculados con *H. pluvialis*, los cuales contenían medio RM y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L, además de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5 % de nitrógeno y un medio control. Se utilizó un pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiación de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ±1° C. Se utilizó además de espectrofotometría, metodología de HPLC para cuantificar la concentración de astaxantina.

Los cambios morfológicos observados demostraron mayor acumulación de células aplanosporas para 20 mg/L y 30 mg/L de fosfatos. El tratamiento con 30 mg/L obtuvo la mayor concentración de astaxantina con 5.772 µg/mL, sin diferencias significativas entre tratamientos. Se obtuvo mayor crecimiento celular con 40 mg/L de fosfatos (9.69 x 10<sup>5</sup> cel./mL), así como la mayor concentración de

clorofila con 26.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; de igual forma este tratamiento obtuvo mayor consumo de fosfatos (62.5 %); con diferencias significativas entre tratamientos.

Se estableció que la deficiencia de fosfatos combinada con alta intensidad de luz, aumentan la producción de astaxantina.

**Tabla 6. Resumen**

Referencia	Condiciones de estrés de cultivo	Morfología observada	Tiempo de estudio	Tiempo de enquistamiento	Tiempo de observación células aplanosporas	Producción de astaxantina	Biomasa
Niño <i>et al.</i> 2017	CO <sub>2</sub> al 5%, un pH de 6.7 a 7, un periodo de luz de 16:8 e irradiancia de 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ; fase de estrés con fotoperiodo de 20:4 y 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia.	-Célula flagelada móvil -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	36 días	18 días	24 días	1.11x10 <sup>-5</sup> $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.5 x10 <sup>5</sup> cel./mL
GÓMEZ <i>et al.</i> 2019	Medio RM con nitrógeno al 4.0%, de pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, agitación continua, CO <sub>2</sub> 5%, iluminación con lámparas fluorescentes blancas y una irradiancia de 140 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ .	-Célula flagelada móvil -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	36 días	12 días	24 días	3.52x10 <sup>-6</sup> $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 7.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.10x10 <sup>6</sup> cel./mL
Rios <i>et al.</i> 2016	Medio BBM con deficiencia de nitrógeno al 4%, fotoperiodo 20:4 con lámparas fluorescentes blancas, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 minutos.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	24 días	15 días	18 días	2.73x10 <sup>-6</sup> $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 3.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.12x10 <sup>6</sup> cel./mL
Ávila <i>et al.</i> 2019	Deficiencia de nitrógeno al 4.0%, agregando una variación del color de luz roja en el medio BBM.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	30 días	18 días	21 días	7.24 x10 <sup>-5</sup> $\mu\text{g}/\text{cel.}$	- *

Cuero <i>et al.</i> 2019.	Medio RM usando 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiancia 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , $\text{CO}_2$ al 5%, agitación con burbujeo, fotoperiodo 20:4 y pH 6.8.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	30 días	27 días	30 días	3.26x10 <sup>-5</sup> $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 5.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.55x10 <sup>5</sup> cel./mL
Rodríguez. 2018	Medio RM, pH de 6,8, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio y adición de cloruro de sodio 6,4 g/L, a los 15 días.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	56 días	28 días	35 días	1.738 $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 7.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.2x10 <sup>4</sup> cel./mL
Rodríguez. 2020	Medio RM, fosfatos de 30 mg/L, pH de 6.8, fotoperiodo de 10:4 irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca.	-Célula flagelada móvil. -Célula palmella. -Célula intermedia. -Célula aplanospora.	62 días	28 días	46 días	6,12 $\mu\text{g}/\text{cel.}$ 5.772 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.43x10 <sup>5</sup> cel./mL

\*Sin datos

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo en el cual se evidenció una mayor acumulación de astaxantina por parte de *H. pluvialis*, fue el medio RM, debido a su disponibilidad de nutrientes y a la forma en que se encuentran estos en el medio.

Se observó que altas irradiancia de luz blanca son capaces de incrementar la astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en mayor medida con la combinación de otras condiciones de estrés que la limitación de nutrientes y que el estrés añadido por sales o por variaciones de color en la luz.

Se observaron las cuatro formas del ciclo de vida de *H. pluvialis*, es decir, célula flagelada móvil, célula palmella, célula intermedia y célula aplanospora, bien definidas y relacionadas con la producción de astaxantina.

La relación entre la biomasa obtenida y la astaxantina acumulada varía de acuerdo con las condiciones de estrés.

## REFERENCIAS

- ABALDE, J., OROSA GARCÍA, M., TORRES, E. y CID, A. (1999). *La microalga Haematococcus como fuente de astaxantina*. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/10777>
- APHA. American Public Health Association (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1870039>
- ÁVILA, K. R., RICO, E. D. y RIVERO, C. A. (2019). *Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno, sobre la expresión de genes y producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis* [Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3548>
- CUERO, K., DOMÍNGUEZ, J., ESPITIA, K. y FUENTES, L. (2019). *Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradiancia y color de luz para la producción de astaxantina en H. pluvialis* [Trabajo de pregrado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3654>
- GALVAO, R., SANTANA, T., FONTES, C. & SALES, E. (2013). Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Mathematics*, 4(08), 50-56. [https://www.researchgate.net/publication/271295977\\_Modeling\\_of\\_Biomass\\_Production\\_of\\_Haematococcus\\_pluvialis](https://www.researchgate.net/publication/271295977_Modeling_of_Biomass_Production_of_Haematococcus_pluvialis)
- GÓMEZ, L., OROZCO, M. I., QUIROGA, C., DÍAZ, J. C., HUÉRFANO, J., DÍAZ, L. E., RODRÍGUEZ, J. y CAMACHO, J. E. (2019). Producción de astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24. <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1532>
- HE, P., DUNCAN, J. and BARBER, J. (2007). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(4), 447-451. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
- IMAMOGLU, E., VARDAR S., F. & CONK, M. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 1(3), 5-9 <https://ijnes.org/index.php/ijnes/article/view/375/346>

- QUIROGA, C., DÍAZ, J., HUÉRFANO, J., DÍAZ, L., RODRÍGUEZ, J. y CAMACHO, J. (2019). Producción de astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24. <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1532>
- LIYANAARACHCHI, V., NISHSHANKA, G., PREMARATNE, R., ARIYADASA, T., NIMARSHANA, P. and MALIK, A. (2020). Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports*, 28, e00538. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33294401/>
- NIÑO-CASTILLO, C., RODRÍGUEZ-RIVERA, F., DÍAZ, L. and LANCHEROS-DÍAZ, A. (2017). Evaluation of cell growth conditions for the astaxanthin production as of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Nova* [on line], 15(28), 19-31. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1794-24702017000200019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702017000200019)
- PARK, J. H., YOON, J. J., PARK, H. D., KIM, Y. J., LIM, D. J. and KIM, S. H. (2011). Feasibility of biohydrogen production from *Gelidium amansii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13997-14003. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319911008342>
- RAJA, R., SHANMUGAM, H., GANESAN, V. and CARVALHO, I. (2014). Biomass from microalgae: an overview. *Journal of Oceanography and Marine Research*, 2(1), 1-7. <https://www.longdom.org/open-access-pdfs/biomass-from-microalgae-an-overview-2332-2632-2-118.pdf>
- RICHMOND, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- RICHMOND, A. (1992). Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4, 281-286. <https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/4zdYOGw9/>
- RICHMOND, A. and HU, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology* (2da ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- RÍOS, S. L. y VARGAS, M. E. (2016). *Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en Haematococcus pluvialis usando medio BBM*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia].

- RODRÍGUEZ, L. J. (2018). *Producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio*. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca].
- RODRÍGUEZ, N. R. y CAMACHO J. E. (2020). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz. [Trabajo de grado para optar por título de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. *Revista Ion*, 37(2). <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/14827>
- SHAH, M. M. R., LIANG, Y., CHENG, J. J. & DAROCH, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- SLOCOMBE, S. and BENEMANN, J. (Eds.). (2017). *Microalgal production for biomass and high-value products*. CRC Press.



# **CAPÍTULO 6. IDENTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA PRODUCIDA POR LA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

## **INTRODUCCIÓN**

Los organismos fotosintéticos, como las microalgas, son de interés biotecnológico, ya que se han utilizado para distintos fines, como producir biodiesel, acumular metabolitos de interés como ácidos grasos, se han aprovechado sus capacidades para biorremediar aguas residuales, producir bioproteínas para la alimentación humana y animal, y además, se han utilizado sus propiedades para la acumulación de pigmentos carotenoides. Por lo tanto, las microalgas como *Haematococcus pluvialis*, disponen de una gran cantidad de aplicaciones haciendo que posean un alto interés comercial.

Actualmente la astaxantina es un pigmento utilizado en diferentes campos como las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica, además, en áreas como la ornitología y la acuicultura. Estas aplicaciones se deben principalmente a su capacidad como colorante, a sus propiedades antioxidantes (inclusive en mayor proporción que el R-caroteno, alfa-caroteno, betacaroteno y la luteína), además de ayudar a incrementar la respuesta inmune, inhibir radicales libres, tener un efecto preventivo contra el cáncer, entre muchas otras. Por lo que su uso ha mejorado la calidad de vida de diferentes seres vivos, encontrados en los campos y áreas mencionados.

Es importante recalcar que *H. pluvialis* produce astaxantina de alta calidad, por lo que la producción de la misma por esta microalga posee un valor agregado para los consumidores, que no lo tiene la astaxantina producida sintéticamente. La molécula de astaxantina en *H. pluvialis* contiene un 70 % de mono ésteres y un 25 % de diésteres

La astaxantina es producida por la microalga *H. pluvialis* de manera natural, acumulando hasta un 3 % de astaxantina en peso seco, siguiendo la ruta biosintética de los carotenoides. Sin embargo, la microalga tiene un crecimiento lento y debido a un ciclo celular complejo se dificulta la acumulación de

astaxantina. El pigmento es producido bajo condiciones de estrés, siendo estas principalmente el exceso de luz, limitaciones de nutrientes, cambios en pH y el estrés causado por diferentes concentraciones de sal.

Por su parte, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una metodología con un amplio espectro de aplicaciones, excelente para el análisis de trazas, rápida y de fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. Esta metodología ha sido aplicada para el análisis de carotenoides utilizando fases móviles isocráticas o gradientes en fase normal o en fase inversa. De igual forma, distintos laboratorios han utilizado un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) debido a su disponibilidad y a su capacidad de proporcionar un espectro UV para la identificación y cuantificación de los carotenoides (HUE *et al.*, 2008).

YUAN *et al.* (1999) desarrollaron un método de purificación de trans-astaxantina extraída de una cepa de *H. pluvialis*. La metodología consistía en establecer el proceso de extracción, saponificación y separación de la trans-astaxantina, en donde se utilizó una baja temperatura (5 °C) para minimizar la degradación del carotenoide durante la saponificación. Esta metodología permitió obtener 32.2 mg de trans-astaxantina de 1 gr de biomasa de la microalga. Además, se utilizó HPLC en fase inversa para el análisis de astaxantina libre y de ésteres de astaxantina en los extractos de pigmentos no saponificados y saponificados.

RAO *et al.* (2005) aislaron y caracterizaron algunas impurezas menores de astaxantina utilizando en la HPLC con una columna de gel de sílice con *n*-hexano/acetona/tetrahidrofurano como fase móvil, las impurezas se identificaron por espectrofotometría de masas (EMS) y espectrofotometría de resonancia magnética nuclear (NMR). Así como Lin *et al.* (2005) desarrollaron una HPLC en fase reversa para analizar los carotenoides que tienen las conchas de los camarones. Para separar los carotenoides de los materiales biológicos, utilizaron eluyentes como metanol, acetonitrilo y agua.

Por su parte, LU *et al.* (2010) realizaron HPLC como metodología para el análisis de astaxantina y otros carotenoides precursores de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. La cromatografía se realizó utilizando una columna C18 junto con una fase móvil que contenía metanol/agua/acetonitrilo/diclorometano. La astaxantina se identificó a una longitud de onda de 480 nm, mientras que los carotenoides precursores se identificaron con ionización química a presión atmosférica (LC-APCI-MS) y espectros de absorción UV.

RAO *et al.* (2014) utilizaron en *H. pluvialis*, etanol y aceite de girasol como co-disolvente para lograr la extracción de astaxantina en las células enquistadas. Lograron recuperar entre un 80 a 90 % del carotenoide, la absorbancia del extracto se midió a 476-480 nm para estimar el contenido de astaxantina. Posteriormente se realizó una cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión, y se identificó con espectrofotometría de masas.

De igual forma, SINGH *et al.* (2019) utilizaron HPLC para analizar los carotenoides producidos en un cultivo de *Asterarcys quadricellulare*. Gracias a esta metodología lograron identificar cuatro carotenoides:  $\beta$ - caroteno, luteína, astaxantina y cantaxantina. Estos carotenoides se separaron y purificaron mediante cromatografía ultrarrápida, y las concentraciones de los mismos se cuantificaron por medio de HPLC.

GALARZA *et al.* (2019) evaluaron el efecto de los procesos de desesterificación de enzimólisis y saponificación de astaxantina y sus precursores carotenoides bajo condiciones de estrés de alta irradiancia y privación de nitrógeno, en *H. pluvialis*. Los extractos fueron analizados por medio de HPLC con una bomba de inyección automática (Agilent Technology HPLC 1260) y un detector de matriz de diodos (modelo G4212B) en columnas de 5mm (ZORBAX SB-C8, 4.6 cm X 150 mm). Como solventes se utilizaron metanol y acetato de amonio. Se evidenció que la enzima colesterol esterasa facilitó la desesterificación de la astaxantina, mientras que la saponificación afectó positivamente a la zeaxantina.

El objetivo de este estudio fue comparar la producción de astaxantina con base en las diferentes condiciones de cultivo para *H. pluvialis*, utilizando como metodología principal la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. MICROORGANISMO

Se utilizó una cepa de referencia de la microalga *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505 (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA).

### 1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se realizó el inóculo a partir de la cepa de referencia transferida a dos Erlenmeyer con dos litros y medio de medio de cultivo RM estériles ajustado a pH a 6.8, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ , iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), intensidad lumínica de 65 luxes, aire filtrado y agitación manual de 10 segundos al día por 21 días.

Se evaluó el crecimiento del inóculo por medio de microscopía en cámara de Neubauer, donde se observaron los siguientes parámetros: color, morfología y viabilidad celular (GUAJARDO *et al.*, 2018).

### 1.3. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS

- **Deficiencia de fosfatos**

Se evaluaron la deficiencia de fosfatos como condición de estrés, utilizaron medio RM con concentraciones de 20 mg/L (RM1), 30 mg/L (RM2), y 40 mg/L (RM3) de fosfatos en forma de sales  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ , además, se utilizó un tratamiento con concentración de 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 % en forma de  $NaNO_3$  (RM4). Se tuvo un tratamiento control, con medio RM sin modificar (RM5), que se trabajó bajo las mismas condiciones. Los tratamientos y el control se trabajaron a un pH de 6.8, con fotoperiodo de 16 h luz y 8h oscuridad por 19 días, lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia de 65 luxes, temperatura de  $20 \pm 1$  °C, agitación manual una vez al día por 10 segundos y aire filtrado. Posterior a los 19 días, se aplicaron factores de estrés utilizando un fotoperiodo de 20h luz y 4h de oscuridad, con un aumento de la irradiancia a 75 luxes, hasta completar 65 días de cultivo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

- **Aguas residuales**

- Se analizaron muestras en las cuales se utilizaron como medio de cultivo las aguas residuales. Se trabajó con un pH 6.8, una temperatura de 20° C, agitación 10 segundos al día, aire filtrado estéril; luz blanca, fotoperiodo 20h luz y 4h de oscuridad, e irradiancia de 280 luxes con el uso de led de color blanco combinadas con lámparas fluorescentes (QUINTERO, 2020).

#### **Biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros**

Se analizaron muestras de cultivo tomadas en biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros en el medio RM con deficiencia de fosfatos al 10 %, deficiencia de nitratos al 5 %, pH 6,8, temperatura 20 °C, agitación 100 rpm; velocidad de aire 1,7 L/min; aire filtrado estéril; luz blanca, fotoperiodo 20h luz y 4h de oscuridad, e irradiancia de 280 luxes con el uso de led de colores azul, rojo y blanco combinadas con lámparas fluorescentes (BARRETO y ORTIZ, 2020).

### 1.4. METODOLOGÍA HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una metodología con un amplio espectro de aplicaciones, excelente para el análisis de trazas, rápida y de fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. Se estandarizó la técnica

de cromatografía para el análisis de astaxantina, calculando los parámetros estadísticos necesarios para esto: precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación; logrando valores aceptables de estas medidas, indicando que la técnica muestra concordancia entre análisis. Se emplearon muestras de microalgas *H. pluvialis*, bajo condiciones de estrés, las cuales fueron analizadas después que la técnica estuvo estandarizada y que la astaxantina fue extraída y saponificada de la microalga, obteniendo rangos entre 0,074 y 42,99 µg/mL

Para la cuantificación de astaxantina se usó la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) como técnica analítica. Las características de desempeño que se evaluaron durante el desarrollo de un método son:

**Selectividad:** capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de otros componentes en la muestra.

**Linealidad:** procedimiento analítico es la habilidad, dentro de un rango dado, de obtener unos resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.

**Precisión:** procedimiento analítico que expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple, de la misma muestra homogénea en determinadas condiciones.

La capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí se puede evaluar a nivel laboratorio en cuanto a:

**Repetibilidad:** evalúa la precisión del método (precisión intraensayo).

**Precisión intermedia:** evalúa la precisión frente a variaciones de analista equipo y día (precisión intralaboratorio o precisión interensayo).

**Reproducibilidad:** evalúa la precisión entre laboratorios (precisión interlaboratorios).

**Exactitud:** expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente.

**Límite de cuantificación y límite de detección:** el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas y el límite de detección (LOD), es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como una cuantificación exacta.

**Estabilidad:** se refiere a la verificación de que la integridad química del analito en la matriz, manteniéndose bajo condiciones específicas por un tiempo determinado.

Para lograr realizar la HPLC de estas muestras, se utilizó:

### 1.5. EQUIPO

Se empleó un Cromatógrafo Agilent® Technologies 1260 Infinity, equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD). La columna cromatográfica empleada fue una Zorbax Eclipse plus C18 4,6 x 100mm, 3,5 µm de tamaño de partícula.

### 1.6. REACTIVOS

Astaxantina estándar (99 %) Sigma Aldrich, metanol 98 % reactivo analítico, metanol grado HPLC (Scharlau), hexano grado HPCL y acetonitrilo grado HPLC (ABCLaboratorios).

### MATERIAL BIOLÓGICO

El presente trabajo involucró muestra de microalgas *H. pluvialis*, sometidas a condiciones de estrés, como largos fotoperiodos, modificación en las concentraciones de nutrientes, entre otros.

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para evaluar las características de desempeño en la validación del sistema se preparó una solución madre de astaxantina (por duplicado) de la siguiente manera: 1 mg de astaxantina / 50 mL de acetona (100%) = 20 µg/mL. A partir de estas soluciones se hicieron las diluciones para trabajar de 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,8 µg/mL y 1 µg/mL.

La concentración de astaxantina se determinó según YUAN y CHEN (17) modificado, en donde se cambió el metanol por acetona al 100 %, el procedimiento se desarrolló de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 5 ml de la suspensión de células de microalga y se centrifugó a 9000 r.p.m durante 10 min para concentrar la biomasa. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de acetona y se mezcló con 0,40 g de partículas esféricas (tamaño de partícula = 0,2-1 mm), se mezcló vigorosamente en vórtex durante 15 minutos y nuevamente se centrifugó a 9000 r.p.m durante 10 min. Finalmente el sobrenadante se mezcló

con 0,1 ml de una solución de NaOH en metanol (5 mM) y se mantuvo durante la noche en oscuridad a 70 °C en estufa de secado con aire recirculante para saponificar los enlaces de astaxantina.

## 1.7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas como longitud de onda de máxima absorción para la lectura, temperatura de columna y la composición de la fase móvil, se ajustaron con pruebas de modificación a partir de estudios similares (YUAN y CHEN, 1998; LU *et al.*, 2010; CÓRDOBA *et al.*, 2015).

Se establecieron las siguientes condiciones: columna cromatográfica C18, de 4,6 x 100 mm y 5 µm de tamaño de partícula, se evaluó una temperatura isocrática entre 25 y 30 °C, utilizando como fase móvil metanol:agua:hexano (95%/4%/1%), flujo entre 0,5 y 1 mL/min, volumen de inyección entre 10 y 20 µL y longitud de onda entre 480 y 488 nm.

### LINEALIDAD

La linealidad del sistema y del método se verificaron mediante la realización de la curva de calibración con seis concentraciones diferentes de analito, las cuales fueron preparadas por duplicado, en un rango de 0,1 a 1,0 µg/mL. La evaluación de la linealidad se hizo a través del análisis de varianza (Anova) para la regresión. El estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto, asumiendo una confianza del 95 % (GUIDELINE, 2005).

### PRECISIÓN

La precisión fue determinada a través de la evaluación de la repetibilidad (intradía) y de la precisión intermedia (interdías). La repetibilidad se estimó mediante análisis por triplicado de tres niveles de concentración (0,2, 0,4 y 1,0 µg/mL) en el mismo día, con el mismo analista y con el mismo equipo. La precisión intermedia se determinó en tres o cinco días, utilizando las mismas concentraciones del analito.

La **repetibilidad** se evaluó a través del coeficiente de variación, el valor de aceptación para el método en cada nivel debe tener  $C.V \leq 15\%$  (21). La precisión intermedia se evaluó mediante un ANOVA empleando una confianza del 95 %.

### EXACTITUD

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal. Como

criterio de aceptación para este parámetro se fijó un porcentaje de recuperación (%R) entre 95 % a 105 %, considerando la complejidad de la matriz de la muestra (GUIDELINE, 2005).

## LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas en el estudio de linealidad, empleando cuatro niveles de concentración (0.02, 0.04, 0.06 y 0.08  $\mu\text{g/mL}$ ), con cinco réplicas a cada nivel.

El límite de detección (Ecuación 1) y límite de cuantificación (Ecuación 2) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de una curva de calibración a bajas concentraciones.

$$\text{Ecuación 1. } LOD = \frac{|a| + 3Sa}{b * \sqrt{n}}$$

$$\text{Ecuación 2. } LOQ = \frac{|a| + 10Sa}{b * \sqrt{n}}$$

Donde Sa = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones y b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones.

## 2. RESULTADOS

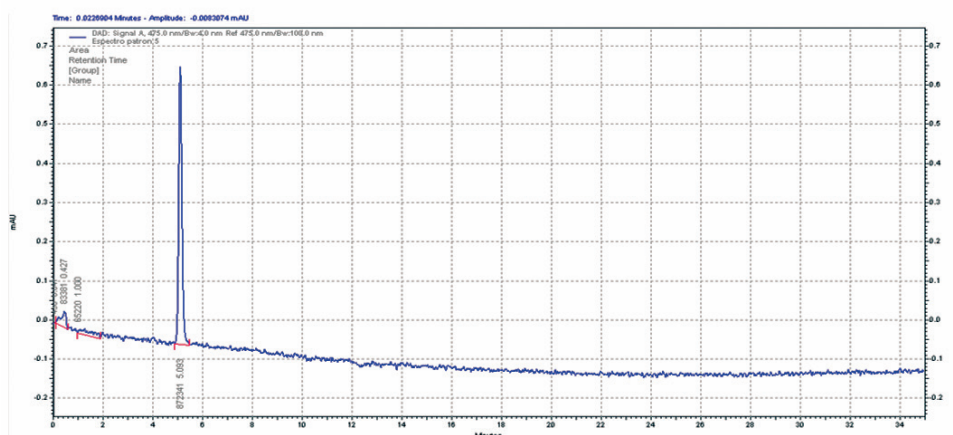
El desarrollo del método cromatográfico se basó en estudios similares reportados en la literatura para la cuantificación de Astaxantina (YUAN y CHEN, 1998; LU *et al.*, 2010); de tal forma se emplearon las condiciones cromatográficas que se describen en la **tabla 7**:

**Tabla 7.** *Condiciones cromatográficas*

Columna ZORBAX 5 $\mu\text{m}$ C18 (4.6 x 100mm)	
Fase móvil	Metanol:agua:hexano (95:4:1 v/v)
Flujo	1mL/min
Temperatura	30 °C
Volumen de Inyección	10 $\mu\text{L}$
Espectro de absorción	488 nm
Tiempo de corrida	39 min

En la **figura 27** se observa el pico de estándar de astaxantina a 0,1 $\mu$ g/mL , demostrando que con la metodología cromatográfica empleada se logró la elución rápida del analito.

**Figura 27.** Cromatograma de estándar de astaxantina

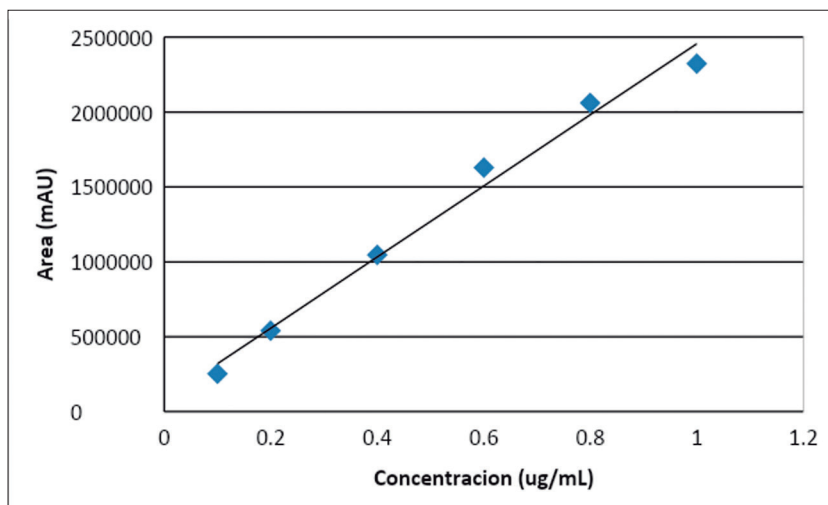


## 2.1. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

Para evaluar la selectividad del método se compararon los resultados cromatográficos de las réplicas de los diferentes solventes de la fase móvil, determinando que no presentan interferentes en el tiempo de retención del analito. Luego se compararon los cromatogramas obtenidos de las muestras de microalgas y de muestras enriquecidas con estándar de astaxantina, mostrándose en el segundo caso un aumento en el área del pico.

## 2.2. LINEALIDAD

La linealidad se estudió para seis niveles de concentración (entre 0.1 y 1,0  $\mu$ g/mL), realizando cinco réplicas de cada una. En la **figura 28** se presenta la curva de calibración (relación de áreas vs concentración), en la cual se puede observar un coeficiente de correlación de 0.987 indicando un alto grado de relación entre la variable X (concentración), y la variable Y (respuesta).

**Figura 28.** Curva de calibración astaxantina

La **tabla 8** muestra los datos a partir de los cuales se determinó la curva de calibración, se muestra las respectivas áreas (mAU) por replica de inyección, según concentración de estándar de astaxantina. Además, se muestra la desviación estándar de las réplicas, el promedio y el coeficiente de variación, destacando que en ninguno de los casos este último sobrepasa el 10 %.

**Tabla 8.** Datos curva de calibración de estándar de astaxantina

Concentración	0,1µg/mL	0,2µg/mL	0,4µg/mL	0,6µg/mL	0,8µg/mL	1,0µg/mL
Replica 1	248665	542218	1038900	1716963	2077800	2319981
Replica 2	271109	572321	1019778	1468292	2065463	2297048
Replica 3	237481	539871	1076739	1690014	2039556	2378420
Replica 4	259725	519450	1058428	1671972	2099874	2334444
Replica 5	228505	527791	1039993	1596271	2019812	2283975
DesvEst <sup>*1</sup>	252453,333	540330,2	1046767,6	1628702,4	2060501	2323471,75
Promedio	17289,189	20127,0976	21624,5381	100255,419	31497,6099	42418,189
CV(%)* <sup>2</sup>	6,84	3,72	2,06	6,15	1,52	1,82

\*<sup>1</sup> Desviación estándar\*<sup>2</sup> Coeficiente de variación

### 2.3. PRECISIÓN

- **Repetibilidad**

Para evaluar la precisión intradía se tomaron muestras preparadas por triplicado a tres niveles de concentración: bajo de 0,1 µg/mL, medio de 0,4 µg/mL y alto de 1,0µg/mL. Los RSDP fueron considerablemente inferiores al valor máximo permitido, del 15 %, lo que brinda un nivel de precisión confiable sobre las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. Los resultados se muestran en la **tabla 9**.

**Tabla 9.** *Evaluación de precisión del sistema*

<i>Concentración (µg/mL)</i>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,0</b>
<i>Promedio</i>	244290	1042514,67	2333657,33
<i>Desviación Estandar</i>	11836,2229	24018,6691	47956,5246
<i>C.V (%)</i>	4,84515245	2,30391666	2,05499428
<i>RSDp</i>	<b>3,06</b>		

RSDp: coeficiente de variación promedio ponderado.

La precisión intermedia no se logró evaluar, ya que no se contaba con otro analista para realizar el proceso de determinación de las muestras.

- **Exactitud**

Por medio de la comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, se evaluó todo el rango lineal, obteniendo un 97.7 % de porcentaje de recuperación; por lo cual se estableció que la exactitud del método es correcta.

- **Límite de detección y cuantificación**

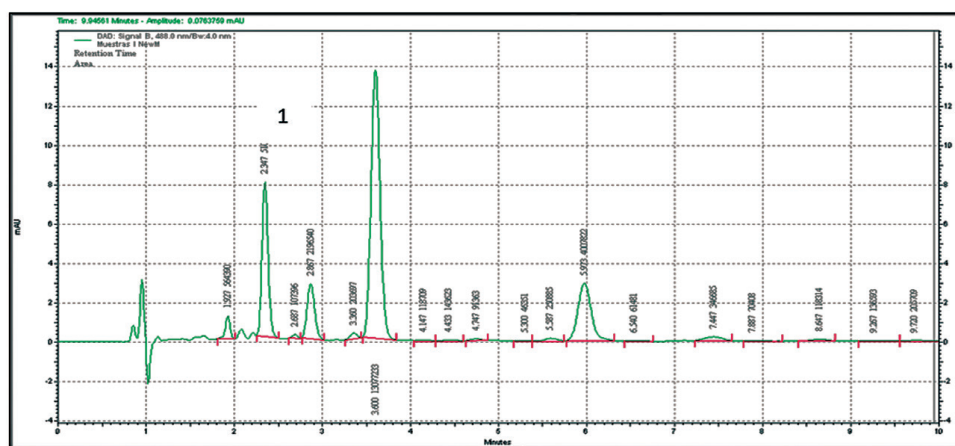
Estos parámetros se calcularon utilizando las curvas de calibración para sistema y método y unas segundas curvas de concentraciones bajas 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 µg/mL.

Para determinar estos parámetros se procedió a comprobar la linealidad, precisión y exactitud a bajas concentraciones, obteniendo la ecuación  $y = 3 \times 10^6 + 1748$  con un  $R^2 = 0,984$  y  $n=20$ . Estos resultados fueron utilizados para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación, cuyos valores fueron **0,884** y **1,919 ng/mL**, respectivamente.

## 2.4. MUESTRAS DE MICROALGAS

La corrida cromatográfica para la determinación de astaxantina en alícuotas de muestras microalgas tiene un total de 39 minutos, debido a la complejidad de la muestra, pues presenta entre 8 y 17 componentes. La **figura 29** muestra un acercamiento del cromatograma, incluyendo los 10 primeros minutos de corrida.

**Figura 29.** Cromatograma de HPLC del extracto de microalga *H. pluvialis* productora de astaxantina



A partir de la metodología desarrollada el tiempo de retención que presenta la astaxantina es en promedio de 2,22 minutos, este corto tiempo de salida, luego del frente de solvente, se da debido posiblemente al largo de la columna empleada, ya que es más corta 100 mm, que las utilizadas en estudios similares de 150 mm.

Comparando los resultados con los obtenidos en los estudios de Yun y Chen entre 1998 y 2000, se podría indicar que luego del proceso de saponificación, en el cromatograma el pico numero 1 corresponde a trans-astaxantina y luego en orden de retención estarían luteína, 3,9- cis-astaxantina, 13-cis-astaxantina, cantaxantina, clorofila y finalmente ésteres de astaxantina. Sin embargo, durante el proceso estos componentes no pudieron ser confirmados. En las siguientes tablas se encuentran los resultados de las muestras de microalgas, con duplicado de análisis:

**Tabla 10.** *Muestras con deficiencia de fosfatos*

Nombre	Código	Tiempo de retención	Área (mAU)	Concentración	FD	Resultado (µg/mL)
RM3 23/ Oct/19	M5J	2,273	298848	0,108	10	1,083
		2,26	277836	0,098	10	0,978
RM5 28/ Sep/11	M6J	3,26	289258	0,104	10	1,035
		2,27	293875	0,106	10	1,058
RM5 28/ Sep/19	M7J	3,28	261750	0,090	10	0,898
		3,28	272743	0,095	10	0,953
RM5 14/11/19	M8J	2,273	104302	0,011	10	0,111
		2,22	107000	0,012	10	0,124
RM5 18/09/19	M13J	2,12	24638	0,008	10	0,077
		2,12	23799	0,007	10	0,074
RM5 14/11/19	M10J	2,287	144786	0,031	10	0,313
		2,28	160312	0,039	10	0,391
RM3 23/10	M12J	3,28	347318	0,133	10	1,326
		3,27	338327	0,128	10	1,281

FD. Factor de dilución

Las muestras RM2 28/Sep/19 y RM3 28/Sep/19 no presentan astaxantina bajo análisis cromatográfico. La muestra RM5 23/10 luego de saponificación presenta un volumen pequeño para poder realizar la inyección en el cromatógrafo.

**Tabla 11.** *Muestras usando medio de cultivo aguas residuales*

Nombre	Código	Tiempo de retención	Área (mAU)	Concentración	FD	Resultado (µg/mL)
P10	1G	2,147	200401	0,059	10	0,591
		2,15	199703	0,059	10	0,588
D6	M2G	2,24	3796496	1,857	10	18,572

		2,237	3910152	1,914	10	19,140
D5	M4G	2,28	7297839	3,608	10	36,078
		2,278	6997421	3,458	10	34,576
P11	M5G	2,273	8680990	4,299	10	42,994
		2,3	8498764	4,208	10	42,083
P9	M6G	2,273	386692	0,152	10	1,523
		2,3	394713	0,156	10	1,563
P12	M7G	2,28	1703447	0,811	10	8,106
		2,3	1913743	0,916	10	9,158
P7	M8G	2,23	2327073	1,122	10	11,224
		2,24	2460962	1,189	10	11,894
C14	M9G	2,23	2094345	1,006	10	10,061
		2,24	2208455	1,063	10	10,631
P8	M10G	2,23	676847	0,297	10	2,973
		2,23	709890	0,314	10	3,139
D3	M11G	2,24	790091	0,354	10	3,540
		2,24	814086	0,366	10	3,660
D2	M12G	2,24	1572129	0,745	10	7,450
		2,237	1473214	0,696	10	6,955

Todas las muestras tienen fecha 12/12/19.

Las muestras D4 y D1 presentan muy poco volumen para inyección.

**Tabla 12.** Muestras de cultivo realizado en biorreactor Biostat A Plus de 5 Litros

Nombre	Codificación	Tiempo de Retención	Área (mAU)	Concentración	FD	Resultado (µg/mL)
M2-11	M2-11A	2,2	498044	0,208	10	2,079
	M2-11B	2,2	491697	0,205	10	2,048
M9-10	M9-10	2,227	511930	0,215	10	2,149
	9-10A	2,227	488929	0,203	10	2,034
M12-10	12-10A	2,227	126363	0,022	10	0,221
	12-10B	2,287	123843	0,021	10	0,208
M19-11	19-11A	2,15	37787	0,012	10	0,121
	19-11B	2,16	39891	0,013	10	0,128

<b>M28-9</b>	<b>28-9A</b>	<b>2,247</b>	<b>594003</b>	<b>0,256</b>	<b>10</b>	<b>2,559</b>
	<b>28-9b</b>	<b>2,24</b>	<b>579782</b>	<b>0,249</b>	<b>10</b>	<b>2,488</b>
<b>M9-11</b>	<b>9-11C</b>	<b>2,253</b>	<b>181148</b>	<b>0,049</b>	<b>10</b>	<b>0,495</b>
	<b>9-11B</b>	<b>2,24</b>	<b>191013</b>	<b>0,054</b>	<b>10</b>	<b>0,544</b>

El método de HPLC realizado permitió identificar y cuantificar la presencia de astaxantina producida por la microalga *H. pluvialis*.

### 3. DISCUSIÓN

Como lo manifiesta HERNÁNDEZ *et al.* (2015) el método espectrofotométrico, muy utilizado para la cuantificación de carotenoides como la astaxantina, a pesar de ser rápido, carece de selectividad ya que en la longitud de onda (477 nm para astaxantina), pueden estarse cuantificando otros compuestos similares que no necesariamente corresponden al carotenoide. Por lo que la HPLC es una metodología más exacta y se sugiere para la detección de astaxantina, ya que estudios como el de CRUZ (2017) la prefieren para la cuantificación de carotenoides como astaxantina, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno y clorofila  $\alpha$ . La HPLC requiere un proceso de saponificación en donde se busca remover clorofilas y lípidos indeseables e hidrolizar hidroxicarotenoides esterificados con ácidos grasos, liberando los carotenoides, en este caso la astaxantina (LU *et al.*, 2010).

La técnica de HPLC es una metodología muy utilizada por diferentes autores para la separación cromatográfica de los carotenoides, en donde en la mayoría de los métodos se utiliza HPLC de fase inversa con columna C18, esto debido a que las interacciones son suaves y de esta forma se garantiza que los carotenoides no se degraden durante la cromatografía. Así mismo este método requiere el uso de una fase móvil entre las cuales se encuentran: acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, cloroformo, etc. Esta última se requiere para lograr una separación más completa de los carotenoides (LU *et al.*, 2010). De tal forma que en el presente estudio se logró una exactitud del 97.7 %, un límite de detección de 0.884 ng/ml, un límite de cuantificación de 1.919 ng/mL, un RSD<sub>p</sub> de 3.06, valores que encajan en los valores permitidos para esta metodología. Por lo que se puede considerar como un método confiable para la determinación y cuantificación de astaxantina.

En cuanto a las muestras analizadas, es evidente un incremento considerable de la astaxantina en las muestras obtenidas a partir de agua residual como medio de cultivo. En este caso se trabajó con un pH 6.8, una temperatura de 20 °C, agitación 10 segundos al día, aire filtrado estéril; luz blanca, fotoperiodo 20h luz y 4h de oscuridad, e irradiancia de 280 luxes con el uso de led de color blanco combinadas con lámparas fluorescentes. El valor máximo de astaxantina obtenido en este último fue de 42,994 ug/ml, mientras que los demás ensayos obtuvieron sus concentraciones más altas de 1,326 y 2,559 ug/mL.

Es importante tener en cuenta que diferentes estudios han utilizado el cultivo de *H. phuvialis* para evaluar las propiedades que tiene esta microalga para depurar aguas residuales, debido a que el agua residual contiene todos los elementos necesarios para su crecimiento. Por el contrario, los demás ensayos contenían en primer lugar deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz (Slocombe *et al.*, 2017), y en segundo, el cultivo se realizó en el biorreactor *Biostat A Plus* de 5 litros en el medio RM con deficiencia de fosfatos al 10 %, deficiencia de nitratos al 5 % y alta intensidad de luz.

Cabe mencionar que el único factor en común entre los estudios analizados es la alta intensidad de luz. El trabajo con mayor producción de astaxantina, es decir, donde se utilizaron aguas residuales como medio de cultivo, utilizó 280 luxes y luz blanca. La luz juega un papel fundamental en cultivos fotoautótrofos de *H. phuvialis*, debido a que regula el ciclo celular y provoca la fotosíntesis. Sin embargo, una alta intensidad de luz induce la acumulación de astaxantina, ya que los carotenoides tienen un efecto fotoprotector en la célula. El crecimiento celular depende de la intensidad de flujo de fotones, la calidad y cantidad de este, y el fotoperiodo al cual se expone la microalga (ASTROC *et al.*, 2015; Slocombe *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia es una metodología más exacta y se sugiere para la detección y cuantificación de carotenoides como astaxantina, ya que esta requiere un proceso de saponificación en el que se purifica la astaxantina estructuralmente, y en el cual se realiza la lectura espectrofotométrica en un tiempo de retención propio del carotenoide.

El trabajo en el cual se utilizaron aguas residuales y alta intensidad de luz como medio de cultivo obtuvo mayores valores de astaxantina, y fue el más alto (42,994 ug/mL).

En el presente estudio se logró para la metodología de HPLC, una exactitud de 97.7 %, un límite de detección de 0.884 ng/ml, un límite de cuantificación de 1.919 ng/mL, un RSDp de 3.06, valores que encajan en el rango permitido para este método.

## REFERENCIAS

- AMBATI, R. R., SIEW MOI, P., RAVI, S. & ASWATHANARAYANA, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3917265/>

- AGUILAR, J. J. y JIMÉNEZ, J. A. S. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21, 73-82.
- BARRETO B., P. A. y ORTIZ BASANTE, T. (2020) *Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno al 5%, fosfatos al 10% 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].
- CAMACHO K., J., GONZÁLEZ, G. y KLOTZ, B. (2013). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93-104. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009)
- CASTILLO, O. S., TORRES-BADAJOS, S. G., NÚÑEZ-COLÍN, C. A., PEÑACABALLERO, V., HERRERA MÉNDEZ, C. H. y RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352. <https://www.redalyc.org/pdf/578/57854568006.pdf>
- GALARZA, J. I., ARREDONDO, B. O. A., VILLÓN, J. & HENRÍQUEZ, V. (2019). Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress. *Biotechnology Reports*, 23, e00351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31312607/>
- GUIDELINE, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, 1(20), 05. <https://somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>
- GUAJARDO-BARBOSA, C. (2018). Cultivo de *Haematococcus pluvialis* y el efecto de la captación de amoniaco mediante el uso de un extracto de *Yucca shidigera*. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina* (ISSN: 2448-8380), 22-22. <https://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/139>
- HERNÁNDEZ MORALES, K. J., PÉREZ MORALES, M. E., JÁUREGUI ROMO, C., ALCÁNTARA JURADO, L. A. y HURTADO AYALA, L. A. (2015). Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(1), 7-16. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v46n1/1870-0195-rmcf-46-01-00007.pdf>
- HOANG THI HUE, A., NGUYEN QUYET, C., LE LAN, A., & TRAN THI THU, T. (2008). Determination of astaxanthin and other carotenoids in Vietnamese crustaceans by HPLC. *Journal of Science and Technology*, 46(3). [https://www.researchgate.net/profile/Hue-An-Hoang/publication/304579525\\_Determination\\_of\\_Astaxanthin\\_and\\_other\\_Carotenoids\\_in\\_Vietnamese](https://www.researchgate.net/profile/Hue-An-Hoang/publication/304579525_Determination_of_Astaxanthin_and_other_Carotenoids_in_Vietnamese)

Crustaceans\_by\_HPLC/links/5773ea0808aead7ba06e5b04/Determination-of-Astaxanthin-and-other-Carotenoids-in-Vietnamese-Crustaceans-by-HPLC.pdf

- LIN, W. C., CHIEN, J. T. & CHEN, B. H. (2005). Determination of carotenoids in spear shrimp shells (*Parapenaeopsis hardwickii*) by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5144-5149. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf050664y>
- LU, M., ZHANG, Y., ZHAO, C., ZHOU, P. & YU, L. (2010). Analysis and identification of astaxanthin and its carotenoid precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by high-performance liquid chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung C J Biosci*, 65(7-8), 489-494. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20737919/>
- NIÑO-CASTILLO, C., RODRÍGUEZ-RIVERA, F., DÍAZ, L. & LANCHEROS-DÍAZ, A. (2017). Evaluation of cell growth conditions for the astaxanthin production as of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Nova* [on line], 15(28), 19-31. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1794-24702017000200019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702017000200019)
- QUINTERO GÓMEZ, E. J. (2020). *Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de Haematococcus pluvialis y la producción del pigmento astaxantina* [Trabajo de pregrado]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/260>
- RAO, R. N., ALVI, S. N., RAO, B. N. and HPLC Group. (2005). Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1076(1-2), 189-192. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15974087/>
- RODRÍGUEZ ROMERO, L. J. (2019). *Producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio* [Trabajo de grado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. <https://repositorio.universidadmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3709>
- SHAH, M. M. R., LIANG, Y., CHENG, J. J. & DAROCH, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- SINGH, D. P., KHATTAR, J. S., RAJPUT, A., CHAUDHARY, R. and SINGH, R. (2019). High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1. 1 under optimized culture conditions. *PloS One*, 14(9), e0221930. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0221930>

- SLOCOMBE, S. P. & BENEMANN, J. R. (Eds.). (2017). *Microalgal production for biomass and high-value products*. CRC Press.
- YUAN, J. P. and CHEN, F. (1998). Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3371-3375. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf980039b>
- YUAN, J. P. and CHEN, F. (1999). Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 31-35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10563844/>
- YUAN, J. P. and CHEN, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a highyielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(4), 443-448. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814699002198>



## CONCLUSIONES

Esta investigación resalta el aprovechamiento de los metabolitos secundarios y primarios obtenidos de la biodiversidad, para obtener un producto de interés comercial como es el colorante astaxantina, aprovechando la ruta metabólica, los factores nutricionales y de estrés en los procesos biológicos en microalgas como *H. pluvialis* y su aplicación en la obtención de metabolitos de interés con uso en diferentes industrias.

El documento describe de manera detallada las técnicas y procedimientos utilizados, lo que indica un enfoque metódico. Esto incluye el cultivo de microalgas, la inducción de estrés para la producción de metabolitos y el uso de HPLC para su análisis.

Los hallazgos presentados amplían la comprensión actual de la biología de las microalgas y su potencial para la producción de metabolitos de interés, como la astaxantina.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a sus directivas por el apoyo recibido en la realización de estas investigaciones.

A los estudiantes del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico pertenecientes al semillero Bioprocesos y Control.

Esta obra  
se terminó de imprimir  
el 20 de septiembre de 2025,  
en los talleres gráficos de  
GRUPO EDITORIAL IBÁÑEZ,  
Cra. 69 Bis No. 36-20 Sur  
Tels.: 2300731 - 2386035  
Bogotá D.C. - Colombia

De acuerdo con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 1992, pp. 3-4), la biodiversidad se define como “la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”.

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, nutracéutica, alimenticia y en la acuicultura. Además, se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunorreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena.

En este libro se abordan, en el capítulo 1 las generalidades del cultivo de microalgas; en el capítulo 2 la producción de compuestos bioactivos; el capítulo 3 se ocupa del efecto de factores de estrés para producir compuestos bioactivos, caso astaxantina; el capítulo 4 se refiere a las condiciones de estrés en un biorreactor para producción astaxantina a partir de *H. pluvialis*. En el capítulo 5 se presenta la morfología de la microalga y su relación con la producción de astaxantina y en el capítulo 6 se aplica la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para identificar la presencia de astaxantina.

