

Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L

Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* under Salt Stress Factors Using a 5L Laboratory Bioreactor

Ana Graciela Lancheros Díaz^{ac}, Luis Eduardo Díaz Barrera^b,
Judith Elena Camacho Kurmen^{ad}

^a Grupo de Investigación Bioprocesos y Control, Programa Bacteriología y Laboratorio, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia.

^b Grupo de Investigación en Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>

^c <https://orcid.org/0000-0002-5799-0282> | aglancheros@unicolmayor.edu.co

^d <https://orcid.org/0000-0002-8880-1501>

Fecha de recepción: 9 de febrero de 2021

Fecha de aceptación: 1 de junio de 2021

Sugerencia de citación: Lancheros-Díaz, A. G., Díaz-Barrera, L. E. y Camacho-Kurmen, J. E. (2021). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L. *Mutis*, 11(2), en prensa. <https://doi.org/10.21789/22561498.1780>

RESUMEN

Haematococcus pluvialis es una microalga que produce astaxantina, un betacaroteno y antioxidante ampliamente usado en la industria. Con el fin de obtener una mayor producción de astaxantina, se planteó como objetivo utilizar diferentes factores de estrés en un biorreactor de 5 litros a escala de laboratorio. Se cultivó la microalga en el medio RM con un pH de 6,8, temperatura 20 ± 2 °C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas 20 h luz/4 h oscuridad, irradiancia 75 luxes y el uso de diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio. Se determinó crecimiento celular, cambios morfológicos y cuantificación de astaxantina y clorofila por espectrofotometría. Además, se realizó un análisis estadístico a través de ANOVA (95 %). Utilizando 0,299 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular de $2,0 \times 10^4$ cel/mL y una concentración de astaxantina de 2,530 µg/mL, mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio el crecimiento celular fue de $3,5 \times 10^4$ cel/mL y la concentración de astaxantina de 1,9 µg/ml. El tratamiento que recibió 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio presentó la mayor producción de astaxantina (7,3 µg/ml). Por su parte, el tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L + cloruro de sodio 1,28 g/L presentó el mayor crecimiento celular ($1,64 \times 10^5$ células/ml). Esta investigación destaca la importancia de cultivar inicialmente la microalga utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros, para luego, una vez finalizada su fase exponencial, someterla a factores de estrés con acetato de sodio y cloruro de sodio, con lo cual se logra una mayor producción de astaxantina (7,325 µg/ml).

Palabras clave: microalga, crecimiento celular, biorreactor, acetato de sodio, astaxantina.

ABSTRACT

Haematococcus pluvialis is a type of microalgae that produces astaxanthin, a beta-carotene and antioxidant widely used for industrial purposes. Therefore, the objective of this research was to test different stress factors in a 5-liter laboratory-scale bioreactor in order to obtain a higher production of astaxanthin. The microalgae were cultivated in the RM medium, a pH of 6.8, temperature 20 ± 2 °C, filtered air, illumination with white lamps at a ratio of 20h light/4h darkness, irradiance 75 luxes, and different concentrations of sodium acetate and chloride of sodium. Cell growth, morphological changes, and the quantification of astaxanthin and chlorophyll were determined by spectrophotometry. Statistical analysis was performed through ANOVA (95%). A cell growth of 2.0×10^4 Cel/mL and an astaxanthin concentration of 2.530 µg/mL were obtained using 0.299 mg/L of sodium acetate. Using 1.6 mg/L of sodium acetate cell growth was 3.5×10^4 Cel/mL and astaxanthin concentration reached a value of 1.9 µg/mL. The treatment in which 1.6 g L of sodium acetate and 6.4 g/L of sodium chloride were added showed the highest astaxanthin production (7.3 µg/ml). In addition, the treatment with 0.320 g/L sodium acetate + 1.28 g/L sodium chloride showed the highest cell growth (1.64×10^5 cells/ml). This research highlights the importance of initially cultivating the microalgae using the 5-liter Tecferm bioreactor and —after its exponential phase— subjecting it to stress factors with sodium acetate and sodium chloride, which allows achieving a high production of astaxanthin, estimated at 7.325 µg/ml.

Keywords: Microalgae, cell growth, bioreactor, sodium acetate, astaxanthin.

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 la industria farmacéutica, cosmética y en la acuicultura. Además, las microalgas han sido consideradas como agentes efectivos en la prevención de diversas enfermedades debido a su capacidad antioxidante, inmunorreguladora, antiinflamatoria y anticancerígena (Shah *et al.*, 2016).

El cultivo de microalgas también tiene la capacidad de metabolizar los nutrientes del medio en donde habitan, por lo cual estas son utilizadas para la biorremediación de aguas residuales producto de la actividad industrial, doméstica y la explotación agropecuaria, que no deben ser vertidas directamente a los cuerpos de agua debido a los problemas sanitarios que puedan generar. En este contexto, la implementación de métodos microbiológicos podría dar un nuevo enfoque a las tecnologías de reducción utilizadas actualmente (Vásquez-Perea *et al.*, 2014).

El alga unicelular *H. pluvialis* ha sido estudiada exhaustivamente debido a su capacidad para acumular astaxantina y otros carotenoides relacionados. La acumulación de este carotenoide en la microalga se encuentra relacionada con la evolución de diferentes etapas de la célula vegetativa a la aplanospora en el ciclo de la microalga, aunque esta transición solo se da cuando esta ha sido sometida a diferentes condiciones de estrés (Shah *et al.*, 2016). Actualmente, se conocen diferentes condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes tales como el nitrógeno (Gómez *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018; Tocquin *et al.*, 2012), la intensidad de la luz (Lv *et al.*, 2016), colores de luz (Xi *et al.*, 2016), alta salinidad (Lababpour & Lee, 2006), pH y la presencia de nutrientes orgánicos como acetato de sodio o la combinación cloruro de sodio/acetato de sodio, aumentando el contenido total de carotenoides y el contenido total de astaxantina (Pan-utai *et al.*, 2017; Vidhyavathi *et al.*, 2009). El acetato de sodio ha demostrado ser una fuente importante de carbono para la microalga, mejorando su crecimiento y carotenogénesis, debido a que afecta la ruta de la fotosíntesis (He *et al.*, 2018) y aumenta la expresión del gen BKT, produciendo así mayor cantidad de astaxantina, como lo reportan Wan *et al.* (2014), quienes utilizaron para el cultivo de la microalga *H. pluvialis* y la producción de astaxantina un fotobiorreactor de 10 Litros con medio NIES-C, usando una concentración 10mM de acetato de sodio como fuente de carbono, luz continua con irradiancia de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25°C, CO₂ 4 % y pH 7,5, obteniendo una producción de astaxantina de 65,8 mg y una producción de biomasa de 3,7 mg durante 12 días de experimentación. Así mismo, Park *et al.* (2014) reportaron un aumento de la producción de astaxantina utilizando un cultivo mixotrófico combinando acetato de sodio y alta irradiancia, obteniendo una producción de astaxantina de 602 mg/L.

La realización de esta investigación 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. A partir de ello, una estrategia promisoría para mejorar la producción de astaxantina en *H. pluvialis* es el estudio de las rutas metabólicas y su regulación con el fin de optimizar las condiciones de crecimiento, desarrollo y producción, puesto que la utilización del *H. pluvialis* presenta ciertas dificultades durante la etapa de cultivo y la obtención del pigmento en cantidades de interés como resultado de su

complejo ciclo celular. Al respecto, uno de los principales inconvenientes es que se trata de un producto del metabolismo secundario, por lo que durante el crecimiento activo de la microalga no se produce síntesis de astaxantina, lo cual ocurre solo cuando cesa la división celular, se inicia su síntesis y este carotenoide se acumula en grandes cantidades.

El *H. pluvialis* también reporta tasas de crecimiento bajas, lo que debilita sus posibilidades de uso como fuente natural del pigmento, además de ser altamente 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, considerando que el uso de una adecuada tecnología de cultivo incrementa la producción de biomasa hasta niveles óptimos para la producción del pigmento. De igual forma, 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 este compuesto.

Por lo anterior, la presente investigación busca determinar un método adecuado y óptimo para la producción de astaxantina, puesto que actualmente esta se sintetiza químicamente y reporta un alto costo de producción, cercano a USD 2.500 por kilogramo (Richmond & Hu, 2013; Shah *et al.*, 2016; Sugawara & Maoka, 2021), además de haber sido prohibida en el mercado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, en inglés) como consecuencia de su baja biodisponibilidad y seguridad. Estas preocupaciones se deben principalmente a la estereoquímica diferente y el potencial arrastre de los intermedios de síntesis, lo cual hace que la astaxantina natural de *H. pluvialis* sea una opción viable y de buena calidad frente a la utilización de su forma química y de otros microorganismos capaces de producirla.

Teniendo en cuenta la capacidad de *H. pluvialis* para producir y acumular gran cantidad de astaxantina, así como la necesidad de determinar las condiciones óptimas para aumentar su producción, el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto del estrés salino utilizando acetato de sodio y cloruro de sodio, combinado con alta irradiancia, con el fin de seleccionar condiciones de proceso. Para ello, se emplearon biorreactores de 500 mL y se realizó el escalamiento del cultivo en un biorreactor Tecferm de 5 litros, usando los factores de estrés acetato de sodio y alta irradiancia. Adicionalmente, se llevó a cabo la cuantificación del crecimiento celular, la caracterización morfológica y la cuantificación de astaxantina y de clorofila.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y cultivo

La microalga *H. pluvialis* fue obtenida de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas (UTEX 2505), siendo suministrada por la facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana. La cepa se mantuvo en medio sólido y líquido Mes-Volvox (sugerido por la UTEX) a baja irradiancia y una temperatura entre 15 y 20 °C (UTEX, 2019).

El cultivo se realizó en medio de cultivo Mes-Volvox, el cual consistía de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 11,8 g 100 mL⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g 100 mL⁻¹, $\text{Na}_2\text{glicerofosfato} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g L⁻¹, KCl 0,05g/L, MES 1,95 g L⁻¹, solución de metales PIV 6 ml L⁻¹, NH_4Cl 0,026 g L⁻¹, vitamina B12 1ml L⁻¹, HEPES

y biotina 1 ml L⁻¹, ajustado a pH de 6,7, luz blanca provista por lámparas fluorescentes (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 75 lux, fotoperíodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de 25 °C, aire filtrado y agitación manual de 10 segundos al día.

El cultivo se monitorea por medio de microscopía en cámara de Neubauer, donde cada tercer día se realizaba conteo y se evaluaban parámetros como color (pigmento), morfología y viabilidad celular.

Efecto de estrés salino sobre la producción de astaxantina

Preparación del cultivo

El cultivo de *H. pluvialis* se realizó en sistema *batch* por triplicado para cada tratamiento a ensayar utilizando el medio de cultivo RM, el cual consistió de NaNO₃ 300 mg L⁻¹, K₂HPO₄ 80 mg L⁻¹, KH₂PO₄ 60 mg L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 10 mg L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 58,5 mg L⁻¹, EDTA 7,5 mg L⁻¹, NaCl 20 mg L⁻¹, H₃BO₃ 0,3 mg L⁻¹, MnSO₄·H₂O 1,5 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0,1 mg L⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,3 mg L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0,08 mg L⁻¹, Co(NO₃)₂·6H₂O 0,26 mg L⁻¹, FeCl₃·6H₂O 17 mg L⁻¹, ajustado a un pH de 6,7 (Imamoglu *et al.*, 2007).

Los tratamientos a ensayar fueron medio RM utilizado como control del estudio (tratamiento 1), con adiciones de 0,18 g/L de acetato de sodio desde el inicio y 0,72 g/L de cloruro de sodio (tratamiento 2); 1,6 g/L de acetato de sodio desde el inicio y 6,4 g/L de cloruro de sodio (tratamiento 3) (la adición de cloruro de sodio en los tratamientos 2 y 3 se realizó en el día 15 del cultivo; 0,18 g/L de acetato de sodio y 0,72 g/L de cloruro de sodio (tratamiento 4); 1,6 g/L de acetato de sodio + 6,4 g/L de cloruro de sodio (tratamiento 5); y 0,320 g/L acetato de sodio + 1,28 g/L de cloruro de sodio (tratamiento 6). La adición de las sales en los tratamientos 4, 5 y 6, se realizó en el día 15 del cultivo. El medio estéril con el pH ajustado se adicionó en biorreactores de 500 ml hasta un volumen de 350 ml. Los biorreactores se sellaron para garantizar esterilidad (Rodríguez, 2019).

Se procedió a adicionar el inóculo de la microalga con una concentración de 1 x 10⁴ células mL⁻¹ a cada biorreactor. Se realizó el cultivo bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20:4 h, temperatura 20 °C, agitación continua, aire filtrado, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de 75 lux.

Se realizó también el cultivo de *H. pluvialis* en el biorreactor Tecferm a escala de laboratorio de 5 litros (figura 1) en sistema *batch* en el medio RM, utilizando 2 L del medio de cultivo RM, pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20:4 h, temperatura 20 °C, agitación 100 rpm, aire filtrado, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y una irradiancia de 75 lux. Los tratamientos realizados utilizaron una concentración de 0,299 mg/L de acetato de sodio en el medio RM, tomando como referencia un tratamiento previo donde se utilizaron 0,310 mg/L de acetato de sodio combinado con una irradiancia a 140 µE/m²s en medio RM, obteniendo 8,3 µg/ml de astaxantina (Giannelli *et al.*, 2015; Niño-Castillo & Rodríguez-Rivera, 2015) y 1,6 mg/L de acetato de sodio en el medio RM bajo las condiciones de trabajo previamente establecidas (García, 2018).

La toma de muestras se realizó cada tres días en forma aséptica. La conservación de las muestras se realizó en solución salina (1:9) en una proporción 1:1, tomando 1,0 mL para

realizar control del cultivo (conteo celular, viabilidad, morfología y registro fotográfico). El resto de la muestra se utilizó para medición de pH. Adicionalmente, se tomaron 10 mL para cuantificación de pigmentos. El tiempo de estudio fue de 36 días.

Figura 1. Biorreactor Tecferm



Fuente: tomado de García (2018).

Determinación de concentración de clorofila y astaxantina

Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante (medio de cultivo). Al paquete celular se le adicionó 1 mL de metanol al 90 % para luego ser calentado durante 10 min a 60 °C en baño serológico, tras lo cual fue centrifugado nuevamente a 12.000 rpm durante 5 minutos (APHA, 1992).

Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó la curva de calibración con patrones de referencia, llevando a cabo la lectura espectrofotométrica en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina. Las concentraciones se expresan en µg/ml.

Crecimiento de *H. pluvialis*

Se realizó conteo celular en cámara de Neubauer por triplicado. Se realizó curva de crecimiento a partir de los resultados. Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante transformación de los valores de Y, cuyo logaritmo fue calculado en base 10 para la obtención de log vs tiempo.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento ensayado. Se realizó un análisis de varianza ANOVA (95 %) para determinar diferencias significativas entre tratamientos, donde los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Excel 2016.

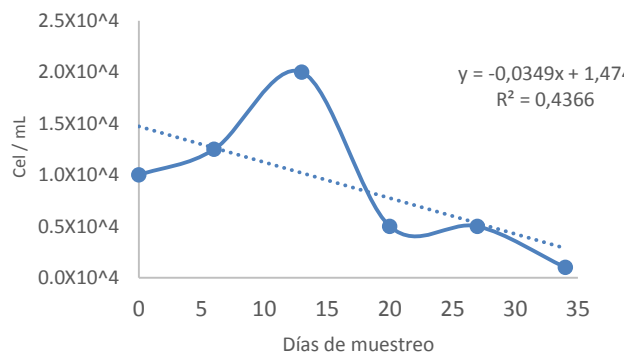
RESULTADOS

El tratamiento con 0,299 mg/L en el medio RM y el uso del biorreactor Tecferm de 5 litros permitió obtener un recuento de inicial de $1,0 \times 10^4$ cel/mL y un recuento final del 1×10^3 cel/mL durante los 34 días del estudio. El pH presentó fluctuaciones entre 6,7 y 7,5, siendo cercano a un nivel neutro.

El recuento celular obtenido con el tratamiento de 0,299 mg/L de acetato de sodio indica que la microalga presenta crecimiento exponencial hasta el día 13, con un recuento celular de $2,0 \times 10^4$ cel/mL hasta el día 20, cuando este empieza a disminuir hasta el día 34, en el que se reporta un recuento de 1×10^3 cel/mL (figuras 2 y 4).

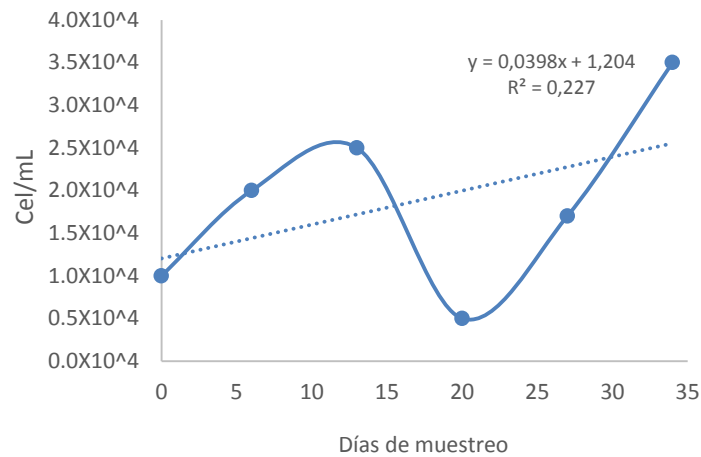
Con respecto al recuento celular obtenido con el tratamiento de 1,6 mg/L de acetato de sodio, se observó de nuevo que la microalga presenta un crecimiento exponencial hasta el día 13, alcanzando un recuento de $2,5 \times 10^4$ cel/mL, para luego iniciar una disminución que se prolonga hasta el día 20. Finalmente, el día 27 reporta un recuento de $1,7 \times 10^4$ cel/mL. En el día 34 se obtiene un aumento del recuento celular de $3,5 \times 10^4$ cel/mL, valor superior al registrado el día 13, momento en el que finaliza la fase exponencial de la microalga (figuras 3 y 4). El medio de cultivo con mayor velocidad específica de crecimiento fue el RM con concentración de acetato de sodio 0,299 mg/L, con una velocidad de crecimiento de 0,029 células/día (tabla 1).

Figura 2. Curva crecimiento celular con 0,299 mg/L de acetato de sodio



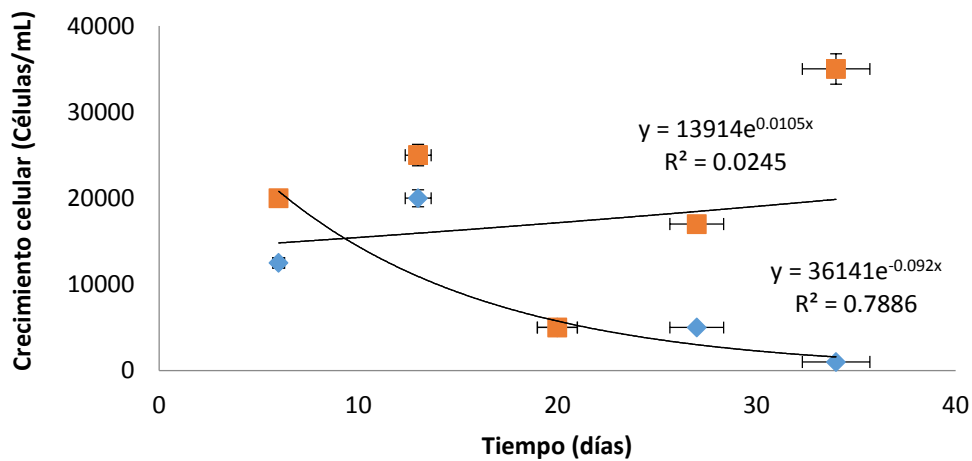
Fuente: García (2018).

Figura 3. Curva crecimiento celular con 1,6 mg/L de acetato de sodio



Fuente: García (2018).

Figura 4. Curva crecimiento celular con acetato de sodio



- ◆ RM7 0,299 mg/L de acetato de sodio Biorreactor 5L
- RM8 1,6 mg/L acetato de sodio Biorreactor 5 L.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes tratamientos

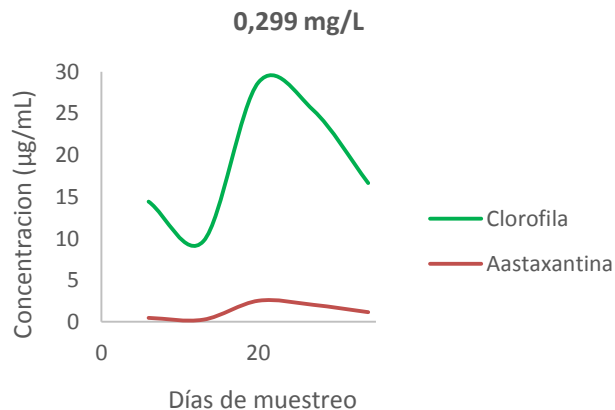
Medio de cultivo	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM y acetato 0,299 mg/L	6	4,204	4,300	0,029 cel/día	79
RM y acetato 1,6 mg/L	6	4,301	4,540	0,014 cel/día	49

Fuente: García (2018).

El ANOVA (95 %) estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($P = 0,795$; $gl = 1$; $F = 0,071$). Sin embargo, el tratamiento que brinda mejores resultados es aquel en el que se utilizaron 0,299 mg/L de acetato de sodio, puesto que con esta concentración se obtuvo un mayor crecimiento y mejor velocidad, mejorando así el crecimiento de la microalga y posiblemente generando una mayor acumulación de astaxantina. Esta concentración también presentó un mejor ajuste al modelo logístico de crecimiento.

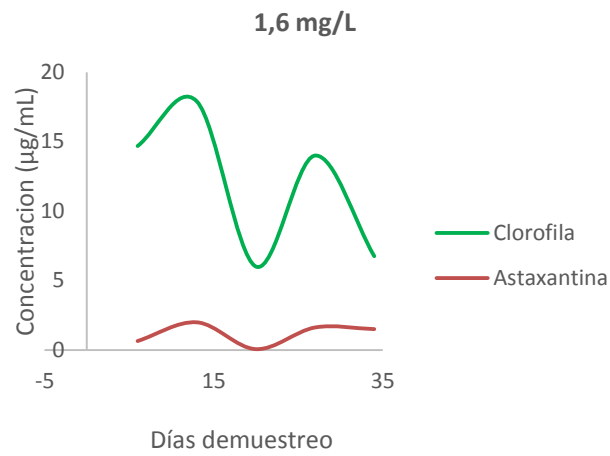
En cuanto a las concentraciones de astaxantina y clorofila (expresadas en $\mu\text{g/mL}$), el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio (figura 5 y 7a) presenta concentraciones de 28,706 $\mu\text{g/mL}$ de clorofila y 2,530 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular obtenido.

Figura 5. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 0,299 mg/L



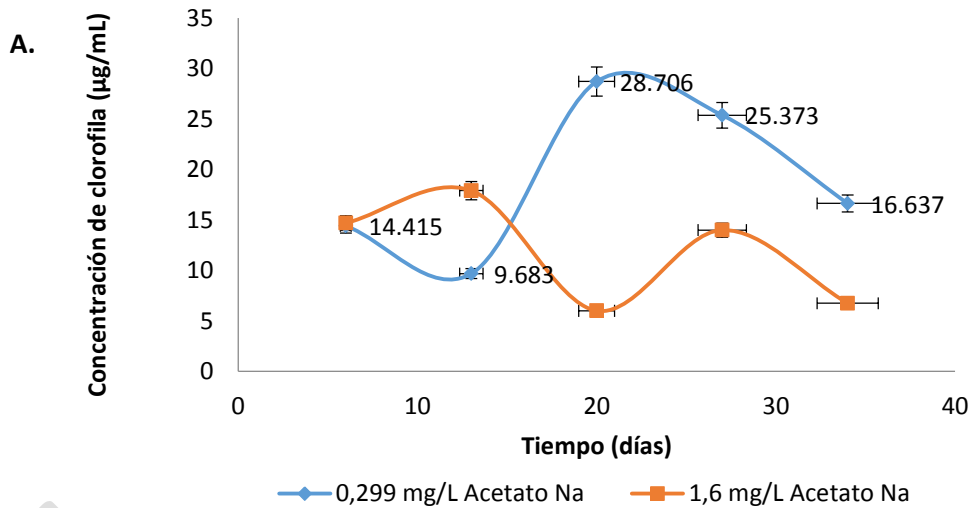
Fuente: García (2018).

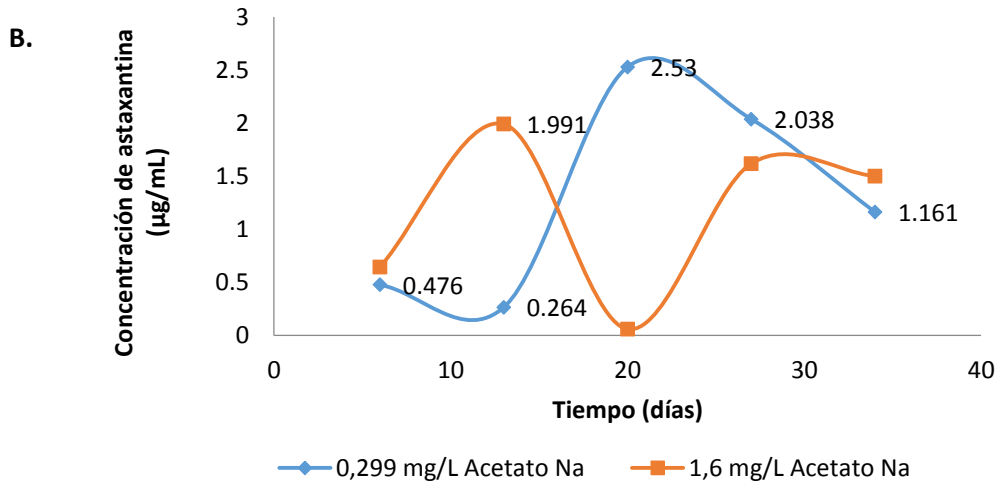
Figura 6. Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 1,6 mg/L



Fuente: García (2018).

Figura 7. Concentraciones de clorofila (A) y astaxantina (B)




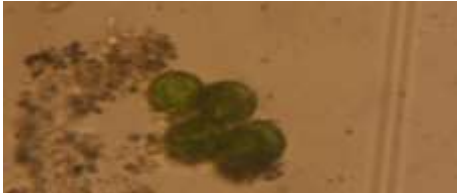




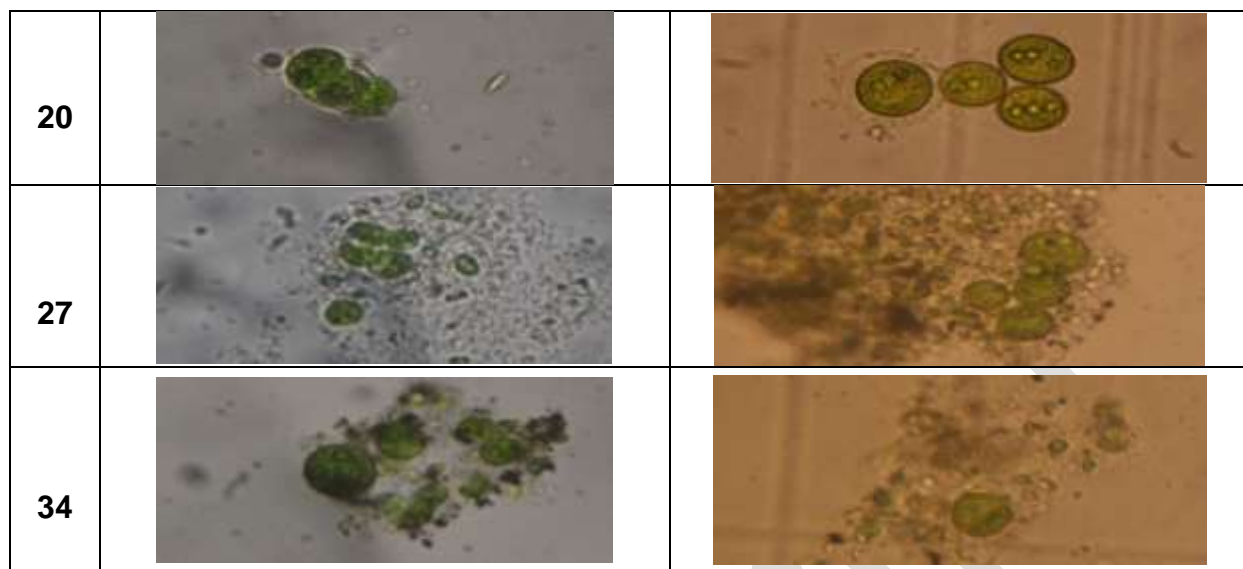
Fuente: elaboración propia.

De otro lado, en el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio (figuras 5 y 7A-B) se encontró mayor concentración de clorofila que de astaxantina, ambas presentando su pico máximo en el día 13, las cuales reportaron concentraciones de 17,902 µg/mL y 1,991 µg/mL, respectivamente, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular. El ANOVA (95 %) estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la concentración de clorofila ($P = 1$; $gl = 1$; $F = 0$) y astaxantina ($P = 0,820$; $gl = 1$; $F = 0,054$). Sin embargo, se observa que con la concentración de 0,299 mg/L de acetato de sodio se obtiene un incremento de 21 % en la cantidad de astaxantina, en comparación con el tratamiento con 1,6 mg/L.

Durante cada montaje se llevó un registro fotográfico microscópico con el fin de evaluar la morfología de la microalga desde sus formas vegetativas hasta sus formas enquistadas (tabla 2).

Tabla 2. Registro fotográfico microscópico

Día	0,299 mg/L Imagen	1,6 mg/L Imagen
6		
13		



Fuente: tomado de García (2018).

A partir del registro fotográfico de ambos tratamientos (0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato de sodio), se evidencia que estos presentaron formas celulares vegetativas, biflagelas y palmeloides sin acumulación de astaxantina. Lo anterior gracias a que —aunque sí se hallaron concentraciones de astaxantina— al momento de realizar el registro fotográfico no se pudieron observar formas quísticas con acumulación de astaxantina.

Entre los días 13 y 20 se observó una mayor cantidad de formas celulares vegetativas verdes sin flagelos debido a que el crecimiento exponencial de *H. pluvialis* ha terminado, e inicia su fase de descenso. En contraste, en los días finales de los tratamientos se observaron formas celulares quísticas debido a que los nutrientes se iban agotando, siendo las primeras un tipo de formas más resistentes (tabla 3) (Jeon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016).

Tabla 3. Tratamientos de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato sodio

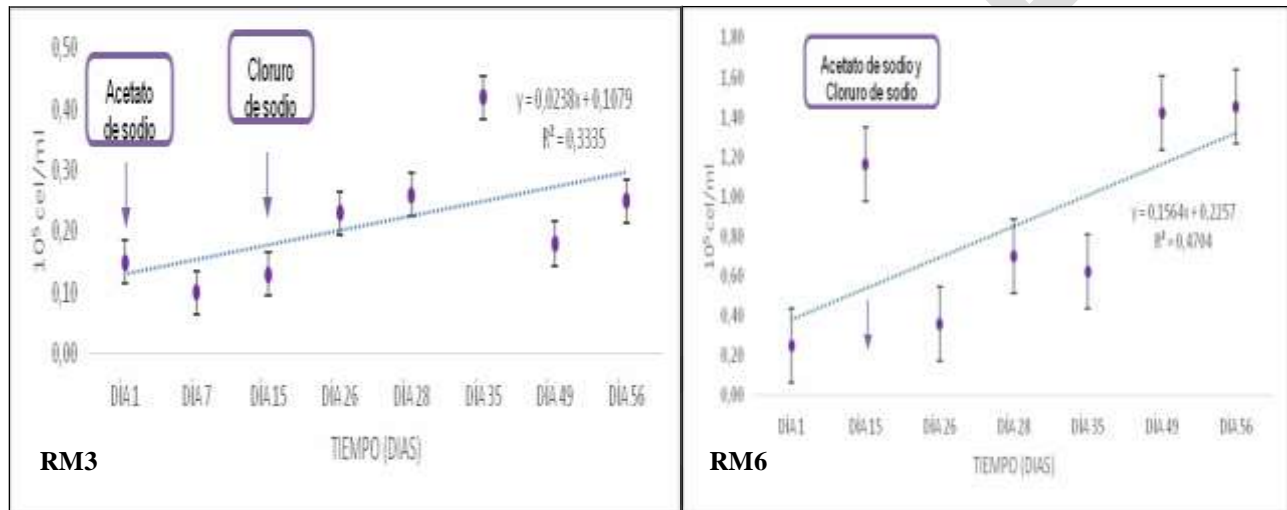
Concentración de acetato de sodio	Recuento celular (cel/mL)	pH	Concentración de astaxantina (µg/mL)	Concentración de clorofila (µg/mL)	Velocidad de crecimiento (cel/día)
0,299 mg/L	2,0 x 10 ⁴	7,5	2,530	28,706	0,029
	Día 20	Día 34	Día 20	Día 20	
1,6 mg/L	3,5 x 10 ⁴	8,6	1,991	17,902	0,014
	Día 34	Día 34	Día 13	Día 13	

Fuente: García (2018).

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los tratamientos donde se utilizaron biorreactores de 500 mL, encontrándose que con 0,320 g/L de acetato de sodio y 1,28 g/L de cloruro de sodio, adicionados desde el día 15 del estudio al medio RM (RM6),

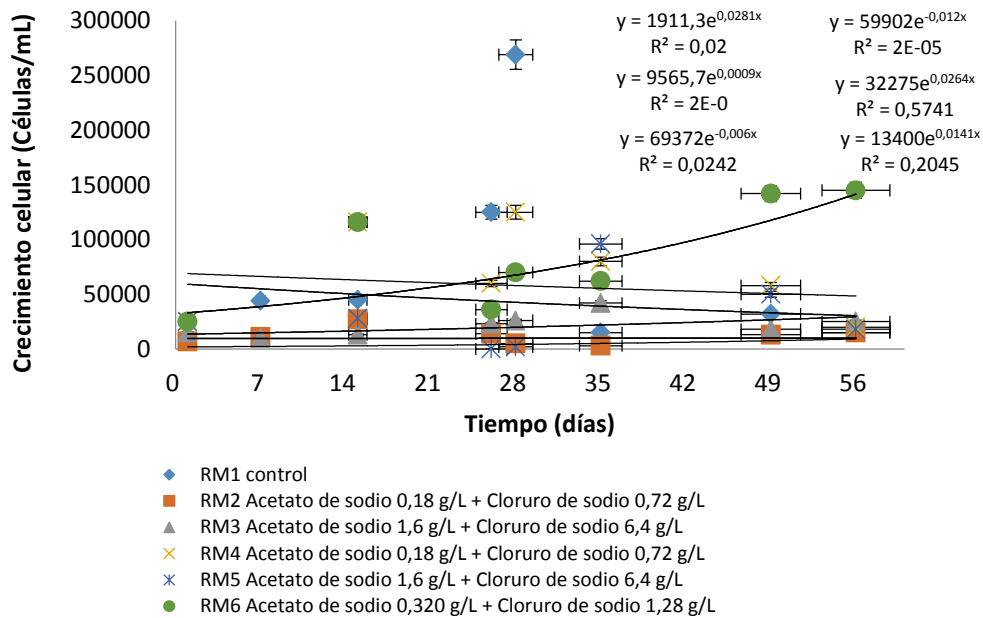
iluminación con lámparas blancas con 20 h luz/4 h oscuridad y 75 lux de irradiancia, se registró una velocidad de crecimiento de 1,018 cel/día. Este fue seguido por el tratamiento RM3, el cual contenía 1,6 g/L de acetato de sodio (añadido desde el inicio), 6,4 g/L de cloruro de sodio (agregado el día 15 del estudio) bajo las mismas condiciones de irradiancia y fotoperíodo, reportando una velocidad de crecimiento de 0,696 cel/día (figuras 8 y 9).

Figura 8. Curva de crecimiento T. RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L (izquierda) y T. RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L (derecha)



Fuente: Rodríguez (2019).

Figura 9. Tratamientos con acetato de sodio y cloruro de sodio

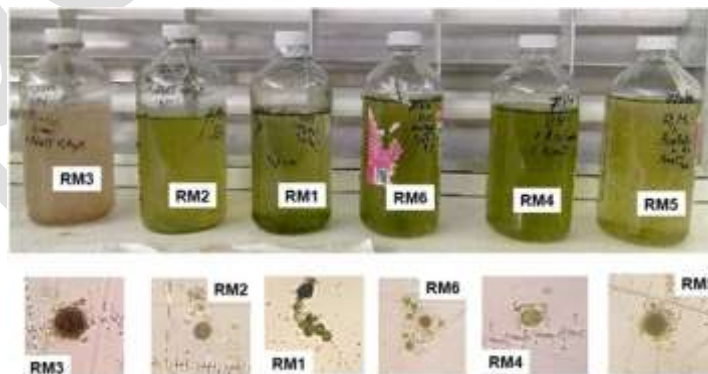


Fuente: elaboración propia.

El análisis de varianza ANOVA (95 %) estableció que existen diferencias significativas ($F = 22,47$; $p = 0,025$; $gl = 5$) entre los diferentes tratamientos con respecto al crecimiento celular. El tratamiento RM6 y RM4 fueron los que presentaron mayor crecimiento ($1,45 \times 10^5$ cel/ml y $1,25 \times 10^5$ cel/ml, respectivamente). Por su parte, el control (RM1) reportó un crecimiento de $2,69 \times 10^5$ cel/ml (figuras 8 y 9).

En el estudio se observaron las dos fases que experimenta la microalga *H. pluvialis* como consecuencia de la combinación de factores de estrés: fase vegetativa y fase roja. Se observan además formas de palmella y células enquistadas (RM3), así como aplanosporas (figura 10).

Figura 10. Tratamientos de *H. pluvialis* (día 35)

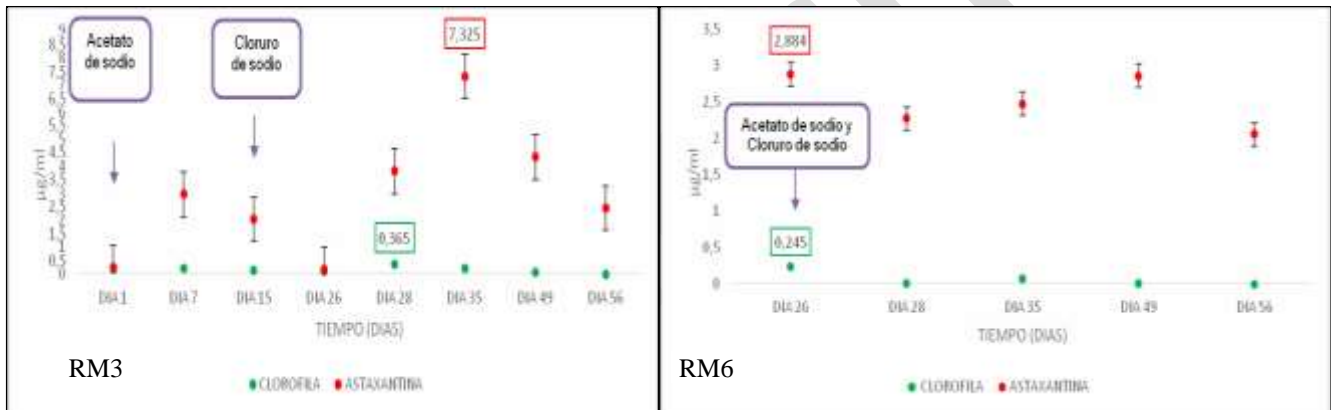


Fuente: Rodríguez (2019).

El tratamiento que presentó la mayor concentración de clorofila fue RM6 (0,245 microgramos/L), presentándose diferencias significativas entre tratamientos ($F = 4,307$; $p = 0,003$; $gl = 5$). La producción de clorofila se correlaciona con el crecimiento de la microalga puesto que al aumentar la biomasa incrementa también el contenido de clorofila.

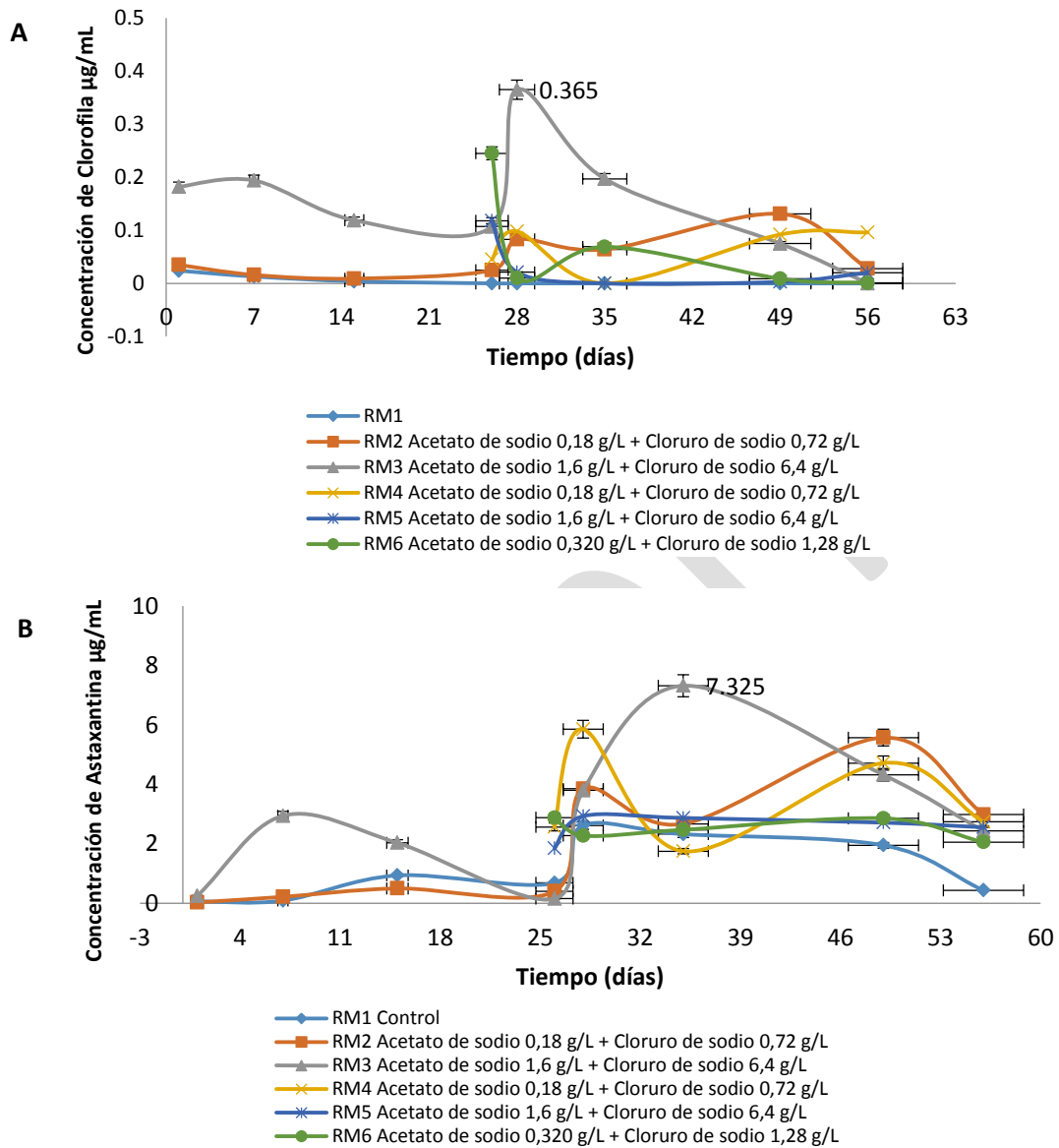
El tratamiento RM3 presentó la mayor concentración de astaxantina (7,325 $\mu\text{g/ml}$), utilizando una concentración de 1,6 g/L de acetato de sodio desde el inicio del estudio y 6,4 g/L de cloruro de sodio a partir del día 15 (figuras 11 y 12). Al analizar los tratamientos realizados, no se evidencian diferencias significativas entre estos con respecto a la producción de astaxantina ($F = 1,687$; $p = 0,165$; $gl = 5$). La tabla 4 presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada tratamiento.

Figura 11. Concentración de clorofila (verde) y astaxantina (rojo) T. RM3 (acetato de sodio 1,6 g/L + cloruro de sodio 6,4 g/L) y T. RM6 (acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L)



Fuente: Rodríguez (2019).

Figura 12. Concentración de clorofila (A) y astaxantina (B)



Fuente: elaboración propia.

Tabla 4. Resumen de los tratamientos realizados

	Crecimiento celular máximo ($\times 10^5$ cel/ml)	Día de máximo crecimiento celular	P < 0,05	Concentración máxima de astaxantina ($\mu\text{g/ml}$)	Día de máxima concentración de astaxantina	P < 0,05	Concentración máxima de clorofila ($\mu\text{g/ml}$)	P < 0,05
RM1 Control	2,69	28		2,623	28		0,024	
RM2	0,27	15		5,580	49		0,131	
RM3	0,42	35	0,025	7,325	35	0,165	0,365	0,003
RM4	1,25	28		5,862	28		0,098	
RM5	1,16	15		2,936	28		0,118	
RM6	1,45	56		2,884	26		0,245	

ANOVA (95 %). Diferencias significativas entre tratamientos $p < 0,05$.

Fuente: Rodríguez (2019).

Al comparar los resultados de los tratamientos realizados se observa que la combinación de acetato de sodio y cloruro de sodio incrementó la producción de astaxantina en 65 %, en comparación con el tratamiento realizado en el biorreactor, donde se trabajó solo con acetato de sodio en una cantidad de 0,299mg/L. Esto se debe a que inicialmente el acetato de sodio es tomado como fuente de carbono para incrementar el crecimiento celular y luego es influenciado por el factor de estrés de deficiencia de nutrientes y la salinidad suministrada por el cloruro de sodio, combinados con el aumento de la irradiancia.

DISCUSIÓN

El uso de biorreactores para el escalamiento con sistemas cerrados, como el utilizado en este estudio, proporciona mejores condiciones para el crecimiento de la mayoría de microalgas, puesto que estos protegen al cultivo de la contaminación y permiten controlar de manera integral las condiciones de cultivo (Giannelli *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013, Ramírez-Landínez, 2013), como se determinó en el cultivo realizado en el biorreactor Tecferm de 5 litros, obteniendo una biomasa adecuada de *H. pluvialis*. Además de esto, tomando como base los resultados reportados por Giannelli *et al.* (2015) y el trabajo de Niño-Castillo *et al.* (2017), se optó por utilizar el medio RM bajo las condiciones de estrés de acetato de sodio (0,299 mg/L y 1,6 mg/L), pH 6,8, temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 20 h luz blanca y 4 h oscuridad, aire filtrado y agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm con el fin de aumentar el crecimiento del inoculo inicial ($1,0 \times 10^4$ cel/mL), y con ello inducir la acumulación de astaxantina en su forma quística en la microalga, como se ha observado en los estudios de Cifuentes *et al.* (2003) y He *et al.* (2018), debido a que el acetato de sodio produce una afectación de la fotosíntesis de la microalga, incrementando la producción de este carotenoide.

Autores como Gómez *et al.* (2019), Pan-utai *et al.* (2017), Vidhyavathi *et al.* (2009) y Ma *et al.* (2018) han incorporado diferentes condiciones de estrés que ayudan a la adecuada acumulación de astaxantina —como tipo, color y nivel de intensidad de luz, agitación, deficiencia de nutrientes, pH, uso de acetato de sodio y cloruro de sodio—, reportando buenos resultados y estableciendo la importancia de combinar condiciones de estrés como la aplicación de acetato de sodio y una alta irradiancia, con lo cual se ha registrado una acumulación de astaxantina de 32,99 $\mu\text{g/mL}$ (Tocquin *et al.*, 2012). A partir de ello, el

presente estudio utiliza el acetato de sodio como factor de estrés en diferentes concentraciones, combinado con alta intensidad de luz blanca y un fotoperíodo de 20 horas luz y 4 horas oscuridad, con lo que se observó que la concentración de 0,299 mg/L es la más adecuada para su uso en el biorreactor, permitiendo obtener un incremento de 21 % en la producción de astaxantina, en comparación con la concentración de 1,6mg/L de acetato de sodio. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que la concentración de acetato de sodio debe ser controlada, ya que niveles inapropiados de este compuesto pueden generar la inhibición del crecimiento celular (Wan *et al.*, 2014), lo cual posiblemente fue lo que ocurrió en este tratamiento.

El acetato de sodio es un precursor del crecimiento celular (Cifuentes *et al.*, 2003; Giannelli *et al.*, 2015; Wan *et al.*, 2014), como se observa en el tratamiento con 0,299 mg/L, el cual reportó un crecimiento de $2,0 \times 10^4$ cel/mL y una velocidad de crecimiento de 0,029 cel/día, lo que contribuye a una mayor acumulación de astaxantina. Estos hallazgos son consecuentes con lo mencionado por Park *et al.* (2014), quienes desarrollaron sus tratamientos con un fotobiorreactor tipo APBR en sistema *batch* bajo las mismas condiciones del presente estudio.

Por otra parte, es posible afirmar que con las concentraciones de acetato de sodio analizadas (0,299 y 1,6 mg/L) se obtiene una mejor tasa de crecimiento, con recuentos de $2,0 \times 10^4$ cel/mL y $3,5 \times 10^4$ cel/mL, respectivamente. Al respecto, el trabajo de González *et al.* (2009) solo pudo obtener un incremento entre $1,0 \times 10^4$ y $1,8 \times 10^4$ cel/ml, lo que nos lleva a validar que la suplementación de medios con acetato de sodio contribuye a incrementar el crecimiento celular y a la conformación de formas celulares quísticas, ya que la microalga toma el acetato de sodio como una fuente de carbono (González *et al.*, 2009).

Aunque se obtuvo un mayor recuento celular que en otros estudios con suplementación con acetato de sodio (Shakhmatov *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2014), se observa que los recuentos celulares entre los días 15 y 20 estuvieron en un rango de $2,0 \times 10^4$ a 5×10^3 cel/mL para el tratamiento con 0,299 mg/L, mientras que el tratamiento con 1,6 mg/L reportó un rango entre $2,5 \times 10^4$ y 5×10^3 cel/mL, lo cual se puede explicar de dos formas diferentes. En primer lugar, se puede afirmar que el microorganismo simplemente siguió su ciclo natural de crecimiento de aproximadamente 15 días (Jeon *et al.*, 2006; Ranga *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016), como lo describe la literatura. De otro lado, de acuerdo con lo establecido por Woong *et al.* (2006), la concentración de acetato de sodio deberá ser controlada a niveles apropiados con el fin de evitar la inhibición del crecimiento celular por acción de este compuesto. Estos autores establecen que a través de concentraciones de acetato de sodio de 50 mM es posible obtener un rápido cambio morfológico de células vegetativas a forma quística, realizando el blanqueamiento total de las células quísticas (Wan *et al.*, 2014), lo que nos lleva a cuestionar si la adecuada concentración de acetato de sodio es 0,310 mg/L (Giannelli *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estas dos perspectivas, se estudiaron ambas concentraciones en el biorreactor Tecferm de 5 Litros a fin de establecer cuál de ellas es la más adecuada para la obtención de astaxantina (García, 2018).

Un factor a resaltar es que la mayoría de los estudios suplementados con acetato de sodio tienden a registrar una mayor producción de biomasa que de astaxantina, como se observó en el presente estudio. De esta manera, se puede hacer referencia a los autores que han descrito anteriormente que las células de *H. pluvialis* solo requieren carbono como principal

nutriente en la “etapa de crecimiento”, el cual puede ser suministrado diariamente por inyección de CO₂ o por aire filtrado (como en el presente estudio), y que una alta irradiación (fotoperíodos 20 h luz y 4 h oscuridad) proporciona mayor energía para la fijación fotosintética del carbono, lo que conduce a una mayor tasa de síntesis de astaxantina (Wang *et al.*, 2013). Con base en lo anterior, se puede deducir que en este experimento hubo una adecuada fijación fotosintética debido a que el biorreactor Tecferm presenta una forma tubular que hace que la luz se distribuya a todo el cultivo, lo cual, posiblemente, fue un factor determinante en la producción de biomasa adecuada de *H. pluvialis*.

Actualmente, compañías dedicadas a la producción comercial de astaxantina a partir de microalgas (Cyanotech y Aquasearch) recurren a un sistema compuesto por dos etapas. La primera de ellas, conocida como “etapa verde”, consiste en producir biomasa verde en condiciones óptimas de crecimiento. La segunda, denominada “etapa roja”, inicia cuando la microalga es expuesta a condiciones ambientales adversas para inducir la acumulación de astaxantina (Wang *et al.*, 2013). Es aquí donde la suplementación con acetato de sodio puede ser implementada desde el día 15, debido a que esto contribuye a un rendimiento adecuado en cuanto a la producción de biomasa y la formación de quistes, los cuales son la forma celular adecuada para la acumulación de astaxantina.

En cuanto a la concentración de astaxantina, para el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el día 20, siendo igual a 2,530 µg/mL, posteriormente alcanzando una cifra de 1,161 µg/mL en el día 34. Por su parte, con el tratamiento con 1,6 mg/L se obtuvo una elevada concentración de astaxantina en el día 13, equivalente a 1,991 µg/mL, que para el día 34 llegó a 1,5 µg/mL. Estos resultados pueden ser correlacionados perfectamente con el recuento celular obtenido para esos días. Por otro lado, en cuanto a la concentración de clorofila sucedió algo similar, ya que el tratamiento de 0,299 mg/L registró una mayor concentración en el día 20, con 28,706 µg/mL, y en el día 34 alcanzó una cifra de 16,637 µg/mL. Finalmente, para el tratamiento con 1,6 mg/L se halló una mayor concentración en el día 13, con 17,402 µg/mL, resultado que llegó a 6,752 µg/mL en el día 34.

Aunque la concentración de clorofila fue disminuyendo a medida que se acercaba el final del estudio, la concentración de astaxantina iba en aumento, lo cual era lo realmente importante del proyecto. No obstante, se observó que durante todo el estudio en ambos tratamientos la clorofila y la astaxantina fueron inversamente proporcionales, lo que coincide con lo descrito por la mayoría de los autores consultados (Camacho-Kurmen *et al.*, 2013; Infant-Santhose *et al.*, 2014; & Wang *et al.*, 2013). Así, se reafirma que el estudio puede ser llevado en “etapa verde” hasta el día 20, ya que en este se obtiene una buena producción de biomasa. Después de este día se puede suministrar inyecciones directas de CO₂, acetato de sodio y alta irradiación con fotoperíodos de 20 h luz y 4 h oscuridad con el fin de generar el estrés indicado para la iniciación de la “etapa roja”. Con ello, las células dan inicio al verdadero estrés y la acumulación de astaxantina, por lo que a futuro se genera una buena obtención de esta.

Las inyecciones de CO₂ también pueden ser sustentadas gracias a que contribuyen a regular el pH, lo que es un claro ejemplo de lo observado en el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio, donde el aumento de pH fue una posible causa de que la velocidad de crecimiento celular fuera menor, en comparación al tratamiento con 0,299 mg/L, el cual presentó un pH

más neutral y una mejor velocidad de crecimiento celular. Por esta razón, se sugiere que la inyección directa de CO₂ o adición de bicarbonato de sodio se sume a las condiciones de trabajo para los estudios de escalamiento de *H. pluvialis*.

Todos los resultados obtenidos hasta el día 20 se deben a la etapa de crecimiento o “etapa verde”, que generalmente dura de 9 a 20 días, según la relación entre la biomasa celular y la actividad celular. Este hecho se pudo evidenciar en el estudio debido a que fue en este período en el que se obtuvo un mayor crecimiento celular. Posteriormente, llegando a la etapa de acumulación de astaxantina o “etapa roja”, la morfología de aplanospora cambia por la disminución de nutrientes. De esta manera, se deduce que para obtener mejores resultados se puede ensayar la aplicación de acetato de sodio a partir del día 15 o 20, y no desde el primer día, puesto que los estudios que han reportado mejores rendimientos han aplicado el estímulo desde el día 15, sin importar su fuente de carbono (Camacho-Kurmen *et al.*, 2013).

Con el uso de biorreactores de 500 mL, donde se trabajó con 5 tratamientos usando los factores de estrés acetato de sodio, cloruro de sodio y alta irradiancia y un control (RM1), se estableció en las curvas de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* que la fase exponencial se presentó en diferentes días del estudio. Se utilizó también el medio RM, el cual provee los nutrientes adecuados para el crecimiento de *H. pluvialis*, como lo han reportado Leiton-Arcos (2018), Imamoglu *et al.* (2007) y Niño-Castillo *et al.* (2017). En este estudio se observó que el mayor conteo celular fue de $2,69 \times 10^5$ cel/mL en medio RM1 (control), seguido por $1,45 \times 10^6$ cel/mL, correspondiente al tratamiento RM6, al cual se le adicionó 0,320 mg/L de acetato de sodio y 1,28 mg/L de cloruro de sodio en el día 15 del cultivo. Así, se concluye que estas concentraciones de sales no logran el estrés suficiente para inhibir el crecimiento celular. De otro lado, el análisis de varianza (ANOVA) de crecimiento celular para los cinco tratamientos y el control identificó diferencias significativas entre estos ($P < 0,05$), con una confianza del 95 %.

El estudio de Goksan *et al.* (2010), donde se utilizó acetato de sodio (1 g/l) para comparar si se debía añadir este compuesto junto con los nutrientes orgánicos al comienzo del cultivo, como en la mixotrofia tradicional (MT), o al final de la fase logarítmica en modo fotótrofo, como mixotrofia alternativa (MA), concluyó que el peso seco (DW), los pigmentos y el número de células, particularmente, fueron más altos en la mixotrofia alternativa que en la tradicional (Infant-Santhose *et al.*, 2014; Rodríguez, 2019).

Al respecto, en esta investigación el número de células en MA pasó de $2,17$ a $4,29 \times 10^5$ cel/mL durante 5 días de exposición a acetato de sodio (casi el doble), mientras que en MT este incremento fue de solo 1,2 veces. Esto indica que en próximos estudios podría ser más eficiente agregar el acetato de sodio de una forma mixotrófica alternativa (MA), es decir, al final de la fase exponencial, ya que así se puede minimizar el riesgo de contaminación debido a la menor exposición de las células a las fuentes de carbono orgánico; sobre todo si el objetivo es obtener el máximo recuento posible de la microalga. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la concentración de acetato de sodio adicionado, puesto que en el tratamiento donde se usó 1,6 mg/L de acetato de sodio desde el inicio del cultivo y la adición de cloruro de sodio a los 15 días mejoró la producción de astaxantina, lo que se debe a que el acetato de sodio fue utilizado como fuente de carbono, generando así una mayor producción de biomasa, que luego fue estresada con la combinación de cloruro de sodio y

luz blanca alta con fotoperíodo de 20 h luz:4 h oscuridad e irradiancia de 75 lux. En contraste, en el tratamiento donde se utilizó el estrés con acetato de sodio, cloruro de sodio y luz alta con el fotoperíodo mencionado no se logró una buena biomasa ni una buena producción de astaxantina, registrando una disminución de 71 % en su contenido. Lo anterior permite observar el impacto de la concentración de acetato de sodio de 1,6 mg/L sobre el crecimiento celular del *H. pluvialis*.

En los medios de cultivo macroscópicamente se observa un cambio de color rojizo en el medio RM3 desde el día 1 y en los medios RM2, RM5 y RM6 en el día 24, hallazgos congruentes con la observación microscópica realizada para analizar la evolución de la morfología de la microalga mediante su proceso de producción de astaxantina, observándose cambios morfológicos desde las formas vegetativas verdes hasta las aplanosporas y las formas enquistadas con color rojo. Estos resultados van en línea con lo reportado por Su *et al.* (2014), quienes tras someter a la microalga a condiciones de estrés con alta intensidad de luz y la aplicación de acetato de sodio lograron evidenciar que a los dos días las células se volvían ligeramente rojizas, indicando así la transición a aplanospora.

Con respecto a los resultados obtenidos para la producción de astaxantina, se logra evidenciar un aumento en el contenido de este pigmento, así como una disminución de la concentración de clorofila. Estos hallazgos soportan los resultados de Vidhyavathi *et al.* (2008), quienes tras 9 días de experimentación bajo condiciones de estrés reportan que el contenido total de clorofila en los tratamientos analizados fue 90 % menor que el contenido de células móviles verdes registrado al inicio de su investigación.

Por su parte, el estudio de Wayama *et al.* (2013) realizó una evaluación volumétrica cuyo resultado logró evidenciar cambios drásticos en la transición entre la etapa verde y la etapa roja. En la etapa verde, los cloroplastos representaron 41,7 % del volumen total de células, mientras que el volumen total de astaxantina fue de 0,2 %, observando cloroplastos altamente desarrollados en la periferia y pocos gránulos de astaxantina rodeando el núcleo. En la etapa roja, las gotas de aceite que contenían astaxantina predominaron, con un 52 %, y el volumen total de cloroplastos disminuyó a 9,7 %, observándose gotas de aceite grandes en toda la célula y cloroplastos altamente degenerados y localizados en el espacio intermedio entre las gotas de aceite, lo que les daba una apariencia de color rojo. Es importante aclarar que los cloroplastos no desaparecieron completamente, lo cual pudo deberse a que estos serían utilizados en una recuperación rápida cuando las condiciones ambientales se reestablecieran y la descomposición de clorofila fuera inducida por la deficiencia de nutrientes (Wayama *et al.*, 2013), lo cual también se observó en esta investigación (Rodríguez, 2019).

Según los resultados obtenidos, el medio RM3, al cual se le adicionó 1,6 mg/L de acetato de sodio desde el inicio del cultivo y una adición de 6,4 mg/L de cloruro de sodio el día 15, presentó la mayor producción de astaxantina, con una concentración de 7,3 µg/L, que es congruente con los resultados obtenidos por Domínguez-Bocanegra *et al.* (2004), quienes utilizaron 1 g/L de acetato de sodio junto con iluminación continua, obteniendo una producción máxima de astaxantina de 98 mg/g de biomasa. Así mismo, estos hallazgos son equiparables con los resultados de Cifuentes *et al.* (2003), quienes buscaron establecer condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina al someter a la microalga a condiciones mixotróficas (acetato de sodio con concentraciones de 4, 8 y 12 mM, alta

irradiancia de luz y cloruro de sodio al 0,8 %), con lo que obtuvieron un contenido de astaxantina por peso seco de 10,3 mg g⁻¹ (1 % p/p), identificando además que la adición simultánea de acetato de sodio/NaCl en una concentración de 4,4/17,1 mM aumenta la producción de astaxantina.

Según el análisis de expresión de genes relacionados con la producción de carotenoides durante la inducción de estrés realizado por Vidhyavathi *et al.* (2009), la adición de acetato de sodio y cloruro de sodio produce una transcripción temprana y una regulación máxima positiva de genes como BKT (β -caroteno cetolasa), el cual se encarga de la transformación de zeaxantina a adonixantina y de adonixantina a astaxantina, desde tres días de estrés hasta tres meses después (Vidhyavathi *et al.*, 2008). Esto explicaría los resultados obtenidos en esta investigación, donde se observa una mayor producción de astaxantina al someter la microalga a estrés salino, ya que, como se mencionó previamente, la combinación de estos dos factores de estrés con la alta irradiancia con luz blanca (Tlt 20w/54RS marca Philips) y fotoperíodo de 4 horas oscuridad y no 6 horas oscuridad, aumenta la producción de este compuesto, considerando que estos carotenoides se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglóbulos de plástidos o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, jugando un papel importante en la prevención del exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética (Richmond & Hu, 2013; Rodríguez, 2019).

Esta investigación destaca la importancia del uso del biorreactor Tecferm de 5 litros para producir biomasa de la microalga, ya que bajo las condiciones trabajadas se obtuvo una biomasa adecuada, la cual, una vez finalizada su fase exponencial, puede ser sometida a factores de estrés con acetato de sodio y cloruro de sodio combinados con alta irradiancia, con lo que se puede obtener una mayor producción de astaxantina.

CONCLUSIONES

Los biorreactores de sistemas cerrados, como el utilizado en este estudio (biorreactor Tecferm de 5 Litros), proporcionan condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* debido a que protegen el cultivo de la contaminación y controlan las condiciones de cultivo, permitiendo obtener una concentración de astaxantina de 2,530 $\mu\text{g/mL}$ a través del uso de 0,299 mg/L de acetato de sodio. La mayor productividad de astaxantina (7,325 $\mu\text{g/mL}$) fue obtenida con la combinación de 1,6 mg/L de acetato de sodio desde el inicio del cultivo y la adición de cloruro de sodio (6,4 mg/L) a los 15 días del cultivo, con un incremento de 65 % mediante el uso de biorreactores de 500 mL. A partir de estos resultados, se establece la factibilidad tecnológica de cultivar inicialmente la microalga utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros, para luego de su fase exponencial someterla a factores de estrés combinando el uso de acetato de sodio, cloruro de sodio y luz de alta intensidad.

AGRADECIMIENTOS

A Laura M. García y Laura Johanna Rodríguez R., a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el apoyo en la realización de este proyecto, y a la Universidad de La Sabana, Grupo de Investigación en Procesos Agroindustriales (GIPA).

REFERENCIAS

- American Public Health Association [APHA]. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (18th Edition). American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Pollution Control Federation (WPCF).
- Camacho-Kurmen, J. E., González, G., & Klotz, B. (2013). Astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* under different stress conditions. *Nova*, 11(19), 94-104. <https://doi.org/10.22490/24629448.1022>
- Cifuentes, A., González, M., Vargas, S., Hoeneisen, M., & González N. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res.*, 36, 343-357. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
- Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., & Jeronimo, F. M. (2004). Campocosio AT. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92(2), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
- García, M. L. (2018). *Producción biotecnológica de astaxantina a partir Haematococcus pluvialis*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., & Yamaji, H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 345-350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.002>
- Goksan T, Ak, I., & Gokpinar, S. (2010). An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 1276-1282. <https://doi.org/10.4014/jmb.0909.09005>
- Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., Rodríguez, J., & 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. *Mutis*, 9(2), 7-24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>
- González, M. A, Cifuentes, A. S, & Gómez, P. I. (2009). Growth and total carotenoid content in four Chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. *Gayana. Botanica*, 66(1), 58-70. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432009000100006>
- He, B., Hou, L., Dong, M., Shi, J., Huang, X., Ding, Y., Cong, X., Zhang, F., Zhang, X., & Zang, X. (2018). Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin induction by high light with acetate and Fe²⁺. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 175. <https://doi.org/10.3390/ijms19010175>

- Imamoglu, E., Vardan-Sukan, F., & Conk-Dalay, M. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3), 5-9. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0058-9>
- Infant-Santhose, B., Elumalai, S., & Rajesh-Kanna, G. (2014). Airlift photobioreactor cultivation of a new strain of *Haematococcus pluvialis* collected from high altitude regions of Himalayas. *International Journal of Science and Research*, 3(10), 2289-2292.
- Jeon, Y. C, Cho, C. W., Yun, Y. S. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.021>
- Lababpour, A., & Lee, C. G. (2006). Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first-order derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 104-110. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.104>
- Leiton-Arcos, Y. A. (2018). *Producción de Haematococcus pluvialis en el biorreactor Tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Lv, H., Xia, F., Liu, M., Cui, X., Wahid, F., & Jia, S. (2016). Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 20, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.019>
- Ma, R., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., Alsenani, F., Eltanahy, E., Netzel, M. E., Netzel, G., Lu, Y., & Schenk, P. M. (2018). Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions. *Bioresource Technology*, 250, 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.094>
- Niño-Castillo, C. M., & Rodríguez-Rivera F. C. (2015). *Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Niño-Castillo, C. M., Rodríguez-Rivera, F. C., Díaz, L. E., & Lancheros-Díaz, A. G. (2017). Evaluation of cell growth conditions for the astaxanthin production as of *Haematococcus pluvialis*. *Microalgae Nova*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>
- Pan-utai, W., Parakulsuksatid, P., & Phomkaivon, N. (2017). Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.004>

- Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(10), 2039-2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- Ramírez-Landínez, D. M. (2013). *Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift* (tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia). Repositorio UN.
- Ranga, R., Sarada, A., Baskaran, V., & Ravishankar, G. (2009). Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties. *J Microbiol Biotechnol.*, 19, 1333-1341
- Richmond, A., & Hu, Q. (eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- Rodríguez, R. L. J. (2019). *Producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio combinadas con alta intensidad de luz*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Sugawara, T., & Maoka, T. (2021). *Marine carotenoids*. MDPI.
- 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. *Front Plant Sci.*, 28(7), 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Shakhmatov, A. S., Pavlovskiy, E. V., & Paukov, A. G. (2018). Desmid algae (Charophyta: Conjugatophyceae) of Ekaterinburg, Middle Urals, Russia. *Folia Cryptogamica Estonica*, 55, 7-15. <https://doi.org/10.12697/fce.2018.55.02>
- Su, Y., Wang, J., Shi, M., Niu, X., Yu, X., Gao, L., Zhang, X., Chen, L., & Zhang, W. (2014). Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Bioresource Technology*, 170, 522-529. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.018>
- The University of Texas at Austin (UTEX). (2019, septiembre 20). *Algae culturing medium*. <https://utex.org/products/volvox-medium>
- Tocquin, P., Fratamico, A., & Franck, F. (2012). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 365-373. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>
- Vásquez-Perea, Y., Villamil-Poveda, J., Sánchez-Leal, L., & Lancheros-Díaz, A. (2014). Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *g*, 12(21), 57-66. <https://doi.org/10.22490/24629448.996>

- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (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://doi.org/10.1093/jxb/ern048>
- Vidhyavathi, R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2009). Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.005>
- Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 167, 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>
- Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M. R., Lu, C., & Hu, Q. (2013). 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://doi.org/10.1007/s10811-012-9859-4>
- Wang, N., Guan, B., Kong, Q., Sun, H., Geng, Z., & Duan L. (2016). Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* mutants by three-stage mutagenesis breeding. *Journal of Biotechnology*, 236, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.009>
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., & Kawano, S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PloS One*, 8(1), e53618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053618>
- Woong, C., Jeon, Y., & Sang, Y. (2006). Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Rev Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.021>
- Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J. S., & Choi, Y. E. (2016). Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6231-6238. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7301-6>