

## Producción de astaxantina usando la biomasa de *Haematococcus pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 L

### Astaxanthin Production Using *Haematococcus pluvialis* Biomass Obtained in the BIOSTAT A PLUS 5-L Bioreactor

Laura Torres Cadavid<sup>ab</sup>, Jeimy Lizeth Ubaque Ramírez<sup>ac</sup>, Judith Elena Camacho Kurmen<sup>ad</sup>

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

<sup>b</sup> ltorresc@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-3060-9760>

<sup>c</sup> jubaque@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0003-0114-2556>

<sup>d</sup> jelenacamacho@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-8880-1501>

**Citation:** Torres Cadavid, L. Ubaque Ramírez, J. L., Camacho Kurmen, J. E. (2025). Producción de astaxantina usando la biomasa de *Haematococcus pluvialis* obtenida en el biorreactor BIOS-TAT A PLUS® de 5 L. *Mutis*, 15(1). 1- 21 <https://doi.org/10.21789/22561498.1826>

**Recibido:** 14 de abril de 2024  
**Aceptado:** 12 de noviembre de 2024

**Copyright:** © 2025 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### RESUMEN

La astaxantina es un carotenoide producido por la microalga *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1884) cuando es sometida a condiciones de estrés como alta irradiancia y salinidad. Es de gran interés en diferentes industrias por sus propiedades como pigmento y compuesto bioactivo. Por esto, el objetivo es determinar su producción usando la biomasa de *H. pluvialis* obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 L., bajo las condiciones de estrés acetato de sodio 0,375 mg/L y 0, 750 mg/L y una irradiancia de 360 luxes con led blanca en medios BBM y RM. Se determinó el crecimiento celular, el cambio morfológico, la concentración de clorofila y astaxantina.

El mayor crecimiento celular se presentó al utilizar medio RM y 0,375 mg/L de acetato de sodio,  $3.01 \times 10^8$  cel./mL. El ANOVA (95%) estableció que existen diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 3,54$ ;  $P=0,015$ ;  $gl= 5$ ) y según la prueba de Tukey HSD (95%) este tratamiento fue el mejor con una velocidad de crecimiento de 0,028/día y un ajuste al modelo logístico ( $R^2: 96,79\%$ ), encontrándose formas enquistadas, una concentración de astaxantina de 6,09 mg/L y una concentración de clorofila de 36,25 mg/L. El ANOVA (95%) estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para astaxantina y clorofila ( $P>0,05$ ).

Se concluye que la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOS-TAT A PLUS® de 5 litros utilizando los medios RM y BBM produce astaxantina al ser sometida a las condiciones de estrés, acetato de sodio (0,375 mg/L) y alta intensidad de luz.

**Palabras clave:** microalga; biomasa; biorreactor; carotenoide; estrés salino; alta irradiancia; ciencias naturales.

#### ABSTRACT

Astaxanthin is a carotenoid that is considered useful in various industries. It is also recognized for its potent anti-inflammatory, anti-cancer, and antioxidant prop-

erties. The microalgae *Haematococcus pluvialis* is considered the best natural producer of astaxanthin. Currently, the largest amount of astaxanthin is produced synthetically and is sold at high costs, which is why this compound is produced naturally.

The objective of this research was to determine the production of astaxanthin using the biomass of *H. pluvialis* obtained in the 5-liter BIOSTAT A PLUS Bioreactor, subjected to the stress conditions of sodium acetate 0.375 mg/L and 0.750 mg/L and an irradiance of 360 luxes with white LEDS, in BBM and RM media, pH 6.8, temperature 20 ° C, daily shaking and cell culture dishes. The morphological change, the concentration of chlorophyll and astaxanthin were determined. It was established that the treatment that used RM medium with 0.375 mg/L of sodium acetate produced 6.09 mg/L of astaxanthin. The Anova (95%) performed did not establish significant differences between treatments for the production of the carotenoid ( $F=1.38$ ;  $P=0.259$ ;  $gl=5$ ), but it did for cell growth ( $F= 3.54$ ;  $P=0.015$ ;  $gl= 5$ ), and according to the Tukey HSD test (95%) this treatment has significantly greater cell growth of  $3.01 \times 10^8$  cells/mL.

This research allowed us to conclude that the use of biomass obtained from *H. pluvialis* in the 5-litre BIOSTAT A PLUS Bioreactor, subjected to stress factors such as sodium acetate combined with high irradiance, allows the production of astaxanthin.

**Keywords:** Microalgae; Biomass; Bioreactor; Carotenoid; Salt stress; High irradiance; Natural sciences.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas en la actualidad tienen alto interés biotecnológico: se emplean para la obtención de diversos compuestos bioactivos útiles en la industria alimentaria, farmacéutica, nutracéutica, agrícola, piscícola, y reemplazan sustancias químicas de origen sintético como los colorantes, los cuales son considerados algunas veces como cancerígenos (Ramaraj, et al 2017; Li et al., 2020; Oslan et al., 2021). Algunos colorantes de origen natural que pueden emplearse para reemplazar estos productos sintéticos son los carotenoides, siendo uno de estos la astaxantina, considerada, además de pigmento, como un compuesto bioactivo por su efecto antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador y anticancerígeno. Se utiliza también como nutracéutico y como un complemento alimenticio en la alimentación acuícola y avícola, en la industria cosmética y en productos farmacéuticos (Li et al., 2020).

En forma sintética tiene un alto valor de 2500 USD/kg, razón por la cual se hace cada vez más necesario obtenerla de manera natural (Régnier et al., 2015; Shah et al., 2016; Li et al., 2020). La astaxantina química no está aprobada para uso directo en humanos, debido a las preocupaciones sobre los problemas de seguridad que surgen de las diferencias estructurales entre la astaxantina química y biológica (natural) y de posibles residuos de productos intermedios de síntesis química (Li et al., 2020).

Entre las alternativas de obtención natural de astaxantina se destaca la microalga *H. pluvialis*, pues produce la mejor calidad de este carotenoide (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021). De esta manera se han intentado optimizar las

condiciones de cultivo de esta microalga y la producción de astaxantina (Reis, et al., 2018; Zhang et al., 2018; Enrico et al., 2018; He et al., 2018; Shah et al., 2016), usando medios de cultivo como el Medio Rudic (RM) y Medio Basal Bold (BBM) (Niño et al., 2017; Enrico et al., 2018; Rodríguez, 2019; Li F et al., 2019; Jannel et al., 2020), uso de fotobiorreactores (Borowiak & Krzywonos, 2022), combinado con factores de estrés como la deficiencia de nutrientes (nitrógeno y fósforo) (Gómez et al., 2019; Miranda et al., 2019; Jannel et al., 2020; Oslan et al., 2021; Gutiérrez et al., 2021; De Moraes et al., 2024), la temperatura, pH, luz y alta irradiancia (Jannel et al., 2020; Pereira y Otero, 2020; Oslan et al., 2021; Zhao et al., 2022), las luces led de colores (Wang B et al., 2014; Pereira y Otero, 2020; Do et al., 2021) y sales como acetato de sodio y cloruro de sodio (Jannel et al., 2020; Wang et al., 2021; Oslan et al., 2021).

Para obtener mayor contenido de este carotenoide se ha usado el sistema de cultivo en dos etapas para la microalga *H. pluvialis*: en la etapa inicial se somete a la microalga a factores óptimos de crecimiento para lograr grandes cantidades de biomasa. Al terminar su crecimiento exponencial se inducen a factores de estrés para lograr mayor producción de astaxantina, y un ejemplo claro es donde inicialmente se cultiva en aguas residuales de Minkery y medio BBM. Al compararse se determina que el mejor tratamiento fue en aguas residuales de Minkery diluidas (1,5%) genera mayor cantidad de biomasa. En la siguiente etapa denominada de inducción, las células vegetativas se exponen a una alta intensidad de luz generando una producción de astaxantina de  $39,72 \pm 1,69$  mg/L. Se concluye, según los hallazgos, que la combinación óptima para la producción de astaxantina era acetato de sodio al 38,14 mM y NaCl al 0,58% (p / v), logrando como máxima concentración de astaxantina un  $67,95 \pm 3,93$  mg/L después de un periodo de inducción de 12 días (Liu Yu, et al., 2019).

La microalga *H. pluvialis* se considera como la mejor alternativa para producir astaxantina de forma natural, pero presenta una baja productividad debido a factores como un crecimiento lento, baja concentración celular y alta susceptibilidad a daños hidrodinámicos, y, sobre todo su complejo ciclo de vida (Zhang L et al., 2017; Tokarz D, et al 2017; Oslan et al., 2021). Además, existe el riesgo de contaminación externa de los medios de cultivo si no se tienen las medidas adecuadas, factores que minimizan la posibilidad de su producción a gran escala y provocan que se opte por elaborar este carotenoide de manera sintética (Shah et al., 2016).

Es por esto por lo que en este estudio se busca establecer las condiciones óptimas de cultivo para obtener la biomasa de la microalga *H. pluvialis*, tales como el uso de biorreactores y el posterior uso de la biomasa obtenida para producir el carotenoide astaxantina empleando condiciones de estrés, como es la salinidad usando acetato de sodio combinado con una alta irradiancia usando luz blanca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

Se utilizó una cepa de referencia de la microalga *H. pluvialis* UTEX2505 (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, US). La cepa se mantuvo en medio sólido y líquido Mes-Volvox (por recomendación de la UTEX) a baja irradiancia y una temperatura entre 15 y 20 °C.

### Preparación del inóculo

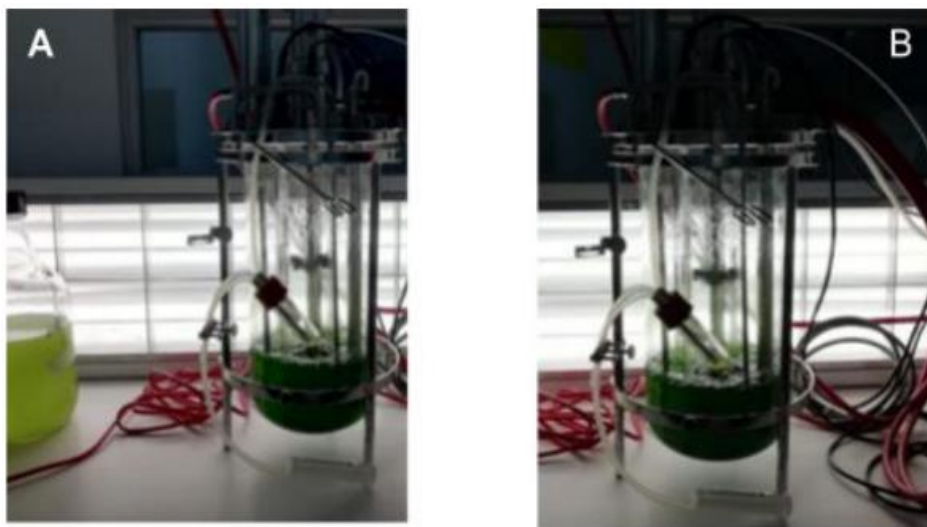
El cultivo se realizó en medio de cultivo Mes-Volvox, el cual consistía de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  11,8 g 100 mL<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4 g 100 mL<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{glicerofosfato} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05 g L<sup>-1</sup>, KCl 0,05g/L, MES 1,95 g L<sup>-1</sup>, solución de metales piv 6 ml L<sup>-1</sup>,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,026 g L<sup>-1</sup>, Vitamina B12 1ml L<sup>-1</sup>, HEPES y biotina 1 ml L<sup>-1</sup>, ajustado a pH 6,7, luz blanca provista por lámparas fluorescentes (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de 25 °C,  $\text{CO}_2$  al 5,0 % y agitación manual de 10 segundos al día. El cultivo se monitoreó por medio de microscopía en cámara de Neubauer para conteo y evaluación de parámetros como color (pigmento), morfología y viabilidad celular, cada tercer día.

### Efecto de salinidad sobre la producción de astaxantina. Preparación del cultivo

El cultivo de *H. pluvialis* se realizó en sistema Batch en el biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 L, utilizando las siguientes condiciones: Medio BBM, el cual consistía de  $\text{NaNO}_3$  250 mg/L,  $\text{CaCl}_2$  25mg/L,  $\text{MgSO}_4$  75 mg/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  175 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  75 mg/L, NaCl 25 mg/L, EDTA 50 g/L, KOH 3.1 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  11.42 mg/L,  $\text{ZnSO}_4$  8.82 g/L,  $\text{MnCl}_2$  1.44 g/L,  $\text{MoO}_3$  0.71 g/L,  $\text{CuSO}_4$  1.57 g/L,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  0.49 g/L y Medio RM, el cual consistía de  $\text{NaNO}_3$  300 mg/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  80 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  60 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  58,5 mg/L, EDTA 7,5 mg/L, NaCl 20 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,5 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 mg/L,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,3 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 mg/L,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,26 mg/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  17 mg/L, ajustados a un pH de 6.8 (Niño et al., 2017), con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ , iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) y led color blanca, azul y roja, irradiancia de 270 luxes, aire filtrado, velocidad de aire 1,7 L/min y agitación 100 rpm (Manrique y Marín, 2019).

La biomasa obtenida en el biorreactor de la microalga se distribuyó por triplicado en cajas de cultivo celular de 250 mL, adicionando 100 mL de cada biomasa obtenida. Se realizaron dos tratamientos: Tratamiento 1 del medio RM y medio BBM con la adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio y Tratamiento 2 del medio RM y BBM con la adición de 0,750 mg/L de acetato de sodio. Se tiene un control de cada medio de cultivo. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se realizaron en las cajas de cultivo celular que se colocaron horizontalmente para aumentar la superficie de intercambio de gases y optimizar la exposición a la luz en un período de 35 días bajo las condiciones de pH de 6.8 con un fotoperiodo de 20 horas de luz y 4 horas de oscuridad, temperatura de a  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ , iluminación con led blanca con una irradiancia de 360 luxes, aire filtrado y agitación manual una vez al día por 10 segundos.

**Figura 1.** Biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 L, medio RM (A) y BBM (B)



Fuente: Manrique y Marín (2019).

Se tomaron muestras de 10 mL de cada tratamiento por triplicado cada siete días para conteo celular, cuantificación de astaxantina y clorofila y la evaluación de cambios morfológicos usando cámara de Neubauer.

#### **Cambio morfológico**

Se evaluaron los cambios morfológicos usando cámara de Neubauer. Para el monitoreo de la microalga se utilizó un microscopio de luz marca OLYMPUS CX31 para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células, realizando registro fotográfico a 40x.

#### **Determinación de concentración de clorofila y astaxantina**

Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante (medio de cultivo). Al paquete celular se le adicionó 1.0 mL de metanol al 90 % y se calentó durante 10 min a 60 °C en baño serológico y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min (APHA, 2003).

#### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para todos los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, para establecer si existían diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) utilizando el programa de Excel 2020 para Windows y se realizó test de Tukey (95%).

## **RESULTADOS**

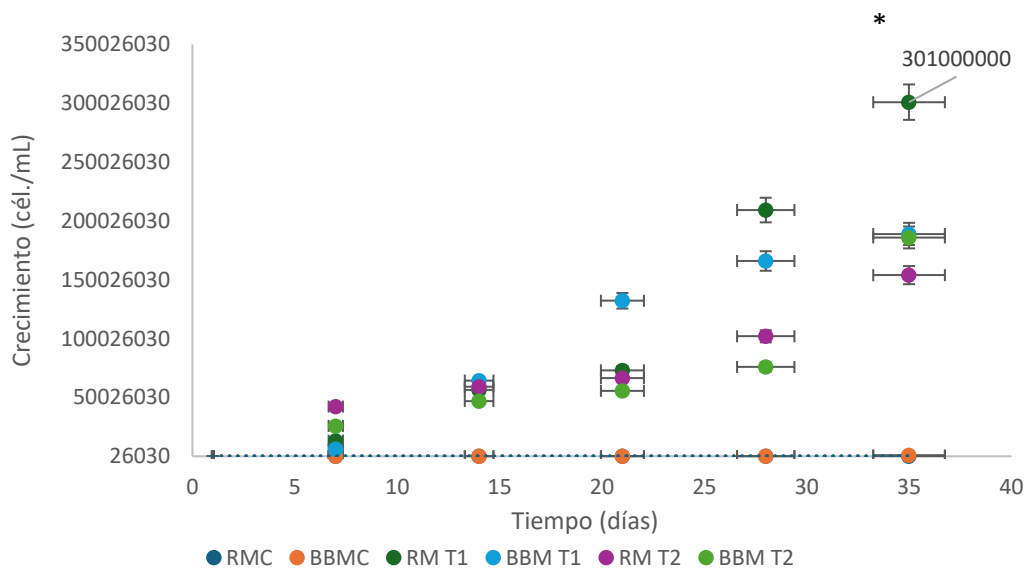
#### **Cultivo de la microalga *H. pluvialis***

El crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en el tratamiento control del medio BBM fue  $8,31 \times 10^5$  cel./mL y para el control del medio RM fué  $2,58 \times 10^5$

cel./mL (figura 2). En el día 35 de cultivo se presenta la mayor cantidad de biomasa, en especial para el control del medio BBM con un incremento en un 69 % frente al control del medio RM.

El tratamiento 1 de los medios RM y BBM donde se adicionó 0,375 mg/L de acetato de sodio y se aumentó la irradiancia a 360 luxes con led blanca luego de los 15 días iniciales del cultivo, presentaron al día 35 de cultivo un crecimiento en promedio de  $3,01 \times 10^8$  cel./mL y de  $1,89 \times 10^8$  cel./mL, respectivamente, incrementándose el crecimiento en 37.2% en el tratamiento 1 del medio RM en comparación del tratamiento 1 del medio BBM, siendo para ambos tratamientos el día en que se presenta el mayor crecimiento como se observa en la figura 2.

**Figura 2.** Curva de crecimiento RMC: control Medio RM; BBMC: control Medio BBM; RMT1: Medio RM con 0,375 mg/L de acetato de sodio e irradiancia de 360 luxes con led blanca; BBMT1: Medio BBM con 0,375 mg/L de acetato de sodio e irradiancia de 360 luxes con led blanca; RM T2: Medio RM con 0,750 mg/L de acetato de sodio e irradiancia de 360 luxes con led blanca; BBMT2: Medio BBM con 0,750 mg/L de acetato de sodio e irradiancia de 360 luxes con led blanca. El ANOVA (95%) estableció que se presentan diferencias significativas entre tratamientos (F= 3,54; P=0,015; gl= 5). Tukey (95%) RMT1 \*



Fuente: elaboración propia.

El tratamiento 2 de los medios RM y BBM en los cuales se le adiciona 0,750 mg/L de acetato de sodio y se aumentó la irradiancia a 360 luxes con led blanca, presentaron al día 35 de cultivo un crecimiento de  $1,54 \times 10^8$  cel./mL y de  $1,86 \times 10^8$  cel./mL, respectivamente, con un incremento de un 17% del tratamiento 2 del medio BBM, con respecto al tratamiento 2 del medio RM (Figura 2).

El ANOVA (95%) estableció que se presentan diferencias significativas entre tratamientos (F= 3,54; P=0,015; gl= 5). Al realizar la prueba de Tukey (95%) se pudo establecer que el mejor tratamiento para el crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis* es el tratamiento 1 del medio RM con 0,375 mg/L de acetato de sodio combinado con una irradiancia de 360 luxes de led blanca (Figura 2), con un recuento

celular de  $3.01 \times 10^8$  cel/mL en el día 35, seguido del tratamiento 1 del medio BBM con una concentración de 0.375 mg/L de acetato de sodio, con un recuento celular de  $1.89 \times 10^8$  cel/mL en el mismo tiempo (Figura 2).

Al realizar los ajustes al modelo logístico se pudo establecer que el tratamiento 1 del medio RM con 0,375 mg/L de acetato de sodio fue el que mejor se ajustó al modelo logístico con un 96,79% y el que menos se ajustó fue el tratamiento 2 del medio RM con 0,750 mg/L de acetato de sodio con un 54,89%. Los tratamientos en general tuvieron velocidades de crecimiento entre 0,016 y 0,028/ día (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Número de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento (día <sup>-1</sup> )	Coefficiente de determinación (%)
Medio RM	6	4	5	0,028	96,40
Medio RM con 0,375 mg/L acetato de sodio	6	7	8	0,028	96,79
Medio RM con 0,750 mg/L de acetato de sodio	6	4	8	0,016	54,89
Medio BBM	6	4	6	0,027	93,51
Medio BBM con 0,375 mg/L de acetato de sodio	6	7	8	0,024	85,43
Medio BBM con 0,750 mg/L de acetato de sodio	6	4	8	0,017	59,99

Fuente: Elaboración propia

### Cambio morfológico

La microalga *H. pluvialis* presentó formas vegetativas de color verde para los días 7 y 14 de cultivo (Figura 3), hasta su fase enquistada no móvil roja en el día 21 para los tratamientos 1 de los medios RM y BBM, que contenían 0,375 mg/L de acetato de sodio y aumento de irradiancia a 360 luxes con luz led blanca desde el día 15 del cultivo, indicando producción de astaxantina por el cambio de color de verde a color rojo enquistada, lo cual se correlaciona con la caracterización macroscópica realizada por efecto de los factores de estrés utilizados en forma combinada (Figura 4).

**Figura 3.** (a) Células vegetativas microalga *H. pluvialis*. (b) Caracterización macroscópica, día 7, 40X.



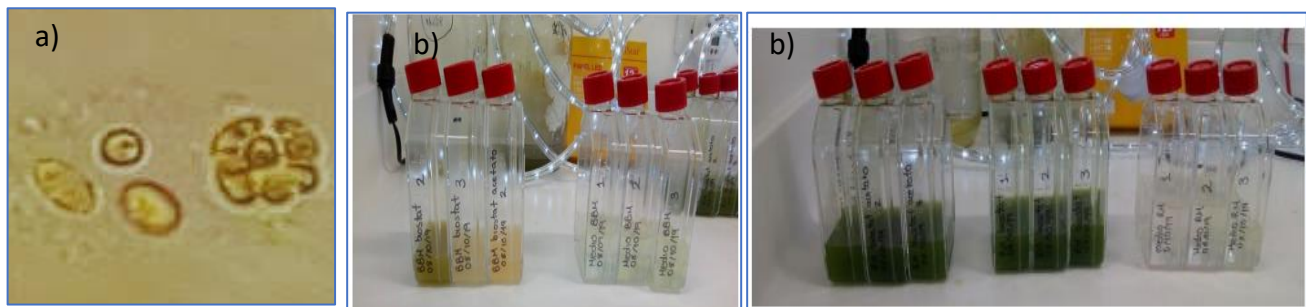
Fuente: Elaboración propia

**Figura 4.** (a) Célula de *H. pluvialis* en su fase quística. (b) Caracterización macroscópica. Tratamientos 1 de RM y de BBM con 0,375 mg/L de acetato de sodio, día 21, 40X.



Fuente: Elaboración propia

**Figura 5.** (a) Células de *H. pluvialis*. (b) Caracterización macroscópica. Tratamientos 2 de RM y BBM con concentraciones de 0,750 mg/L de acetato de sodio, día 35, tamaño 40X.



Fuente: Elaboración propia

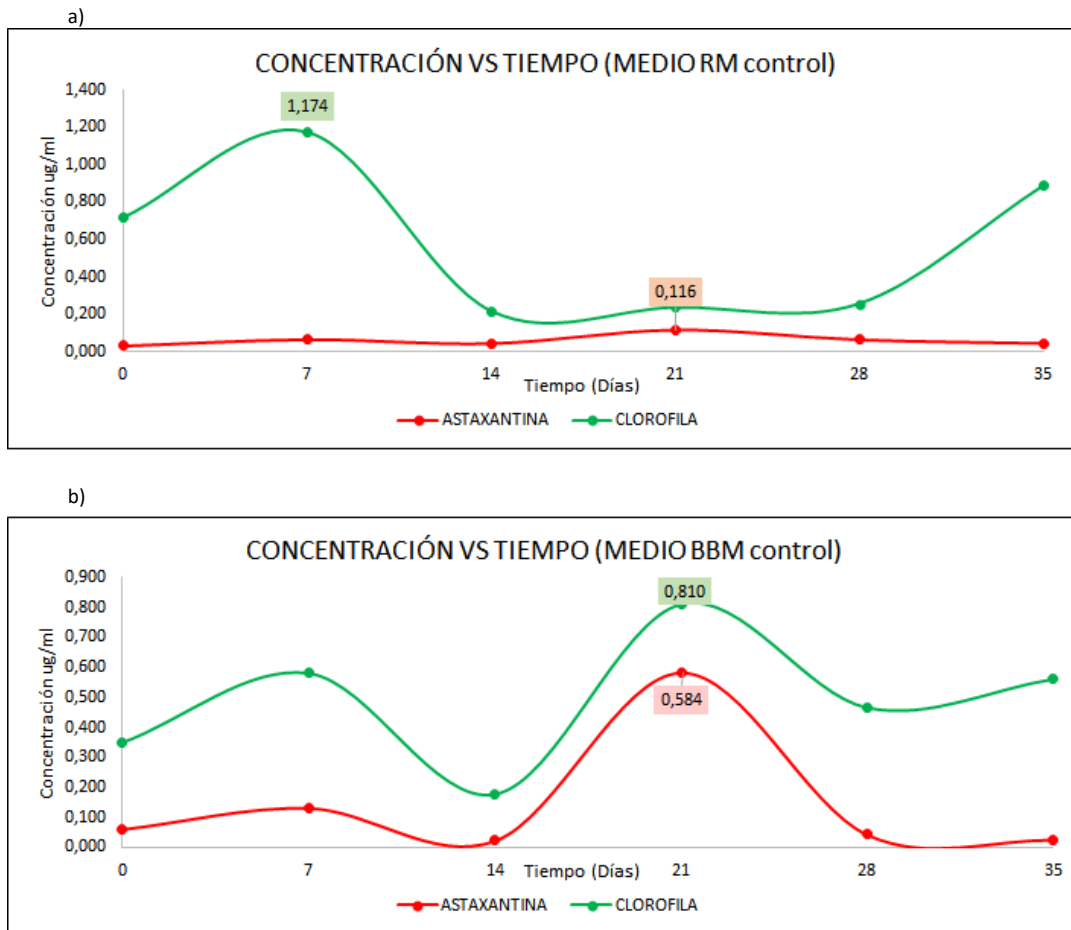
Se observa en la figura 6 que para el día 35 de cultivo las células de la microalga se encuentran células sin color, efecto que han reportado otros autores cuando se utiliza estrés salino con acetato de sodio.

#### Determinación de clorofila y astaxantina

En la evaluación de los tratamientos control se observó que el día 21 de cultivo se presentó la mayor concentración de astaxantina con valores de 0,12 mg/L, para el medio RM y el día 21 para el medio BBM con un valor de 0,58 mg/L. Con respecto a la clorofila el día de mayor concentración para el medio RM control fue el 7 día con 1,17 mg/L y para el medio BBM control el día 21 con un valor de 0,81 mg/L (ver figura 6).



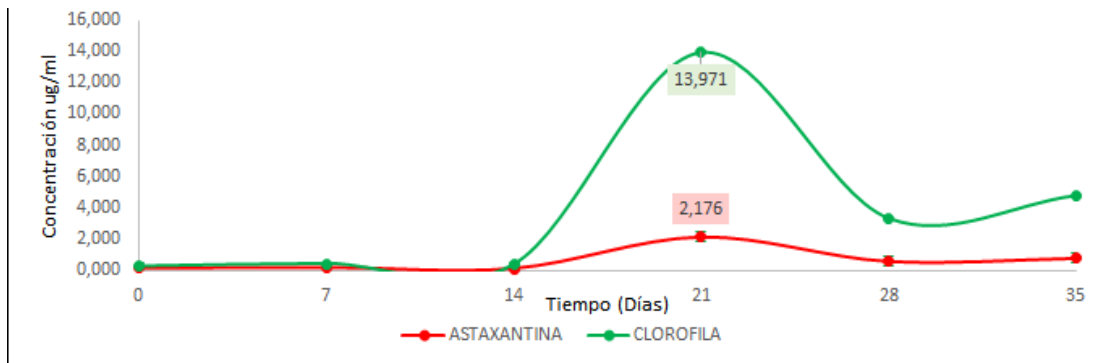
**Figura 6.** Concentración de astaxantina y clorofila para medios (a) RM control y (b) BBM control.



Fuente: Elaboración propia

El tratamiento 1 del medio BBM que contenía 0,375 mg/L de acetato de sodio y una irradiancia de 360 luxes con luces led blanca, en el día 21 fue el que presentó mayor concentración de astaxantina con un valor de 2,18 mg/L. La concentración de clorofila en el mismo tratamiento fue de 13,97 mg/L en el día 21 (ver figura 7); en este caso se puede destacar el aumento de la concentración de clorofila en el tiempo, lo cual puede deberse a que la concentración de acetato de sodio empleada en un principio desempeñó un rol fundamental en el crecimiento y así mismo en el aumento de clorofila.

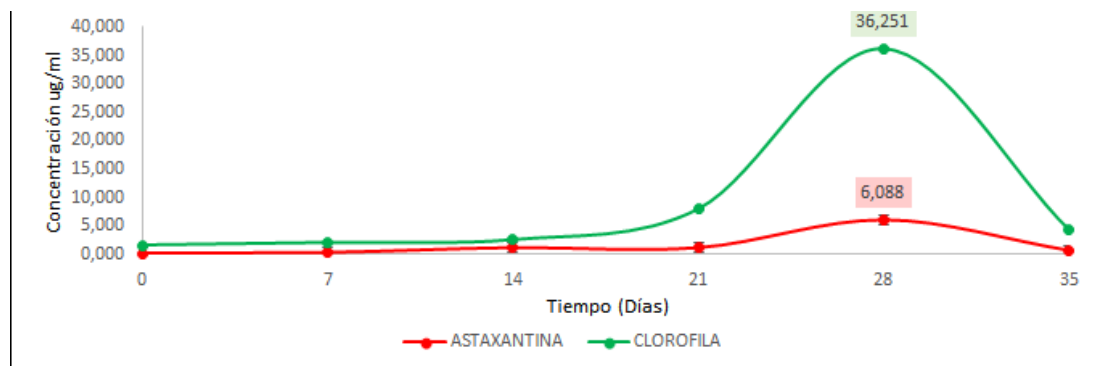
**Figura 7.** Concentración de astaxantina y clorofila para medio BBM T1: 0,375 mg/L de acetato de sodio, combinada con una irradiancia de 360 luxes desde día 15 de cultivo.



Fuente: Elaboración propia

Para el tratamiento 1 del medio RM que contenían 0,375 mg/L de acetato de sodio el día con mayor producción de astaxantina en este tratamiento fue el día 28, con una concentración de 6,09 mg/L. La concentración de clorofila obtenida fue de 36,25 mg/L (ver figura 8). Se observa que en este tratamiento se encontró un incremento del 64% de la concentración de astaxantina, respecto al tratamiento 1 del medio BBM; estos resultados destacan no solo la viabilidad del medio de cultivo RM, sino también el efecto de las condiciones de estrés utilizadas como la concentración de acetato de sodio de 0,375 mg/L combinada con alta irradiancia de 360 luces de led blanca.

**Figura 8.** Concentración de astaxantina y clorofila para medio RMT1: 0,375 mg/L de acetato de sodio combinada con una irradiancia de 360 luxes desde día 15 del cultivo.

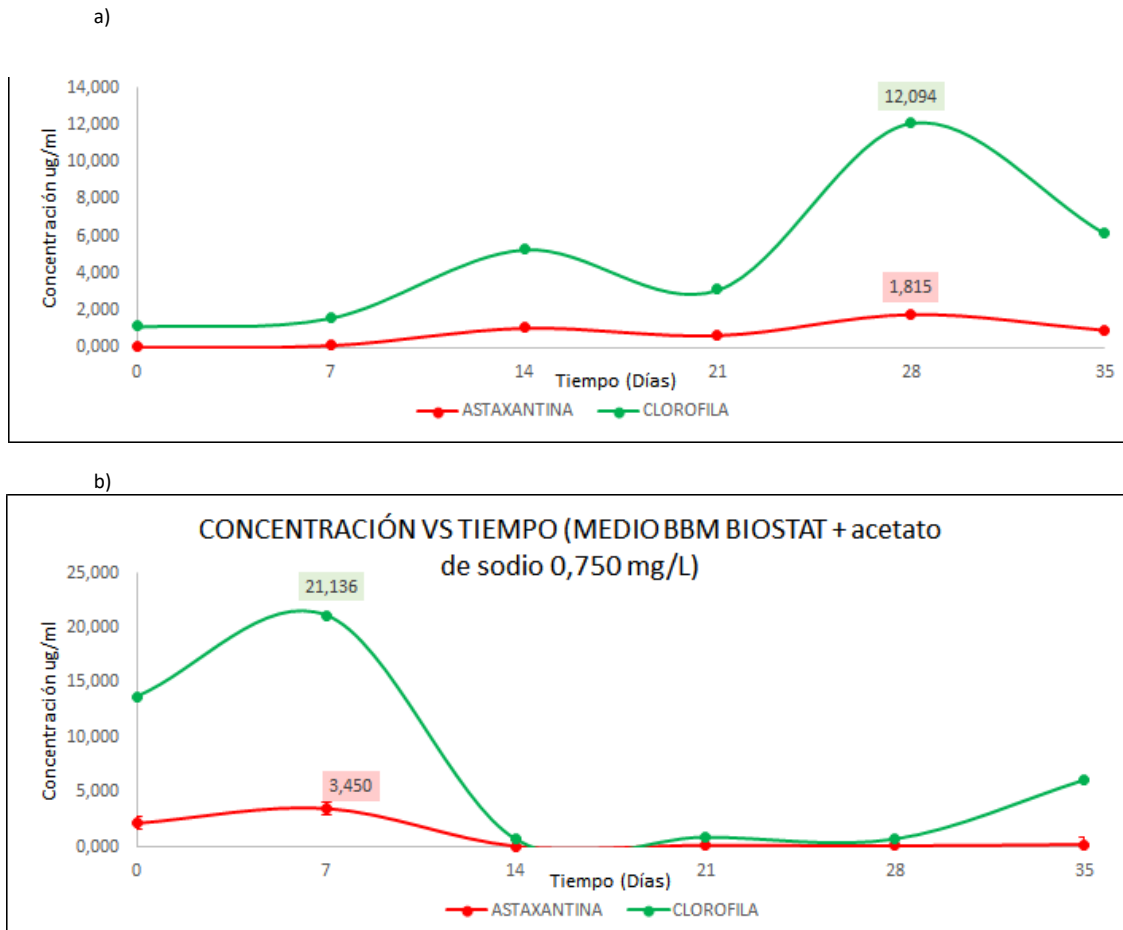


Fuente: Elaboración propia

El tratamiento 2 del medio RM donde utilizaron concentraciones de 0,750 mg/L de acetato de sodio y alta irradiancia de 360 luxes con luces led blanca, se obtuvieron concentraciones de astaxantina de 1,81 mg/L correspondiente a los 28 días del cultivo. En cuanto a la clorofila se obtuvieron 12,09 mg/L, lo cual se correlaciona con el crecimiento celular observado. Para el tratamiento 2 del medio BBM con 0,750 mg/L de acetato de sodio fueron de 3,45 mg/L (día 7) y 0,22 mg/L (día 35), observándose que la adición de acetato de sodio en esta concentración afecta el crecimiento de la microalga y, por lo

tanto, la acumulación de astaxantina, (figura 9a). Las concentraciones de clorofila para este tratamiento fueron de 21,14 mg/L (día 7) y de 6,16 mg/L (día 35), con una disminución de 14,98 mg/L de la producción de clorofila en el tiempo del cultivo realizado (ver figura 9b, 10b).

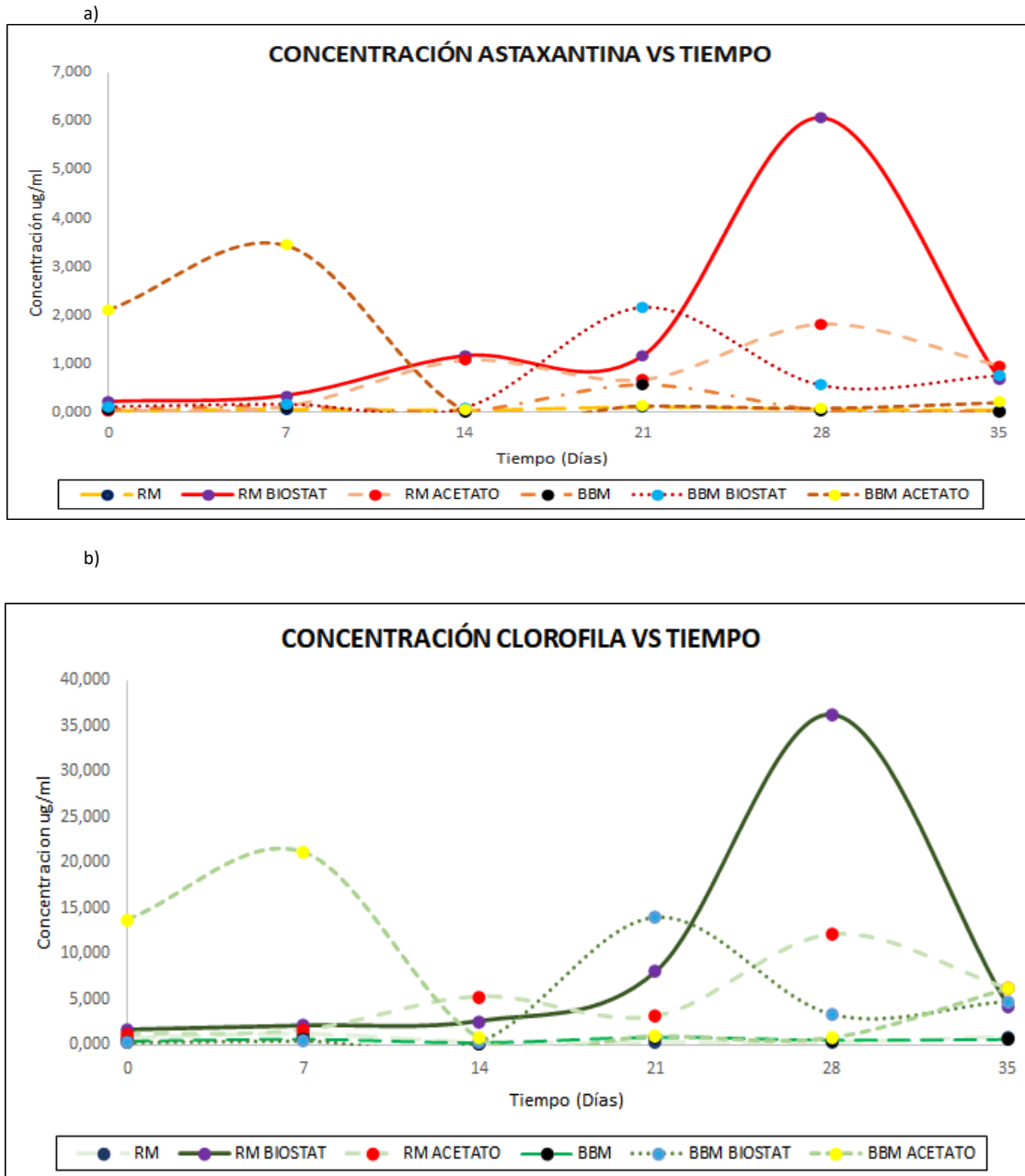
**Figura 9.** Concentración de astaxantina y clorofila para medios (a) RM T2 y (b) BBM T2: 0,750 mg/L de acetato de sodio combinada con una irradiancia de 360 luxes desde día 15 del cultivo.



Fuente: Elaboración propia

Según el ANOVA (95%) realizado no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la obtención de astaxantina ( $F=1,38$ ;  $P=0,259$ ;  $gl=5$ ), ni para la producción de clorofila ( $F=1,39$ ;  $P=0,253$ ;  $gl=5$ ). Sin embargo, al igual que en el crecimiento celular el tratamiento con mayor producción de astaxantina y clorofila fue el tratamiento 1 del medio RM (Figura 8), donde se utiliza como factores de estrés 0,375 mg/L de acetato de sodio combinada con alta irradiancia de led blanca (360 luxes), llegando a una concentración máxima de astaxantina de 6,09 mg/L y de clorofila una concentración máxima de 36,25 mg/L a los 28 días de cultivo. El segundo tratamiento con mayor producción de astaxantina y clorofila fue el tratamiento 1 del medio BBM (figura 7) en donde se utiliza como factores de estrés acetato de sodio al 0,375 mg/L combinada con alta irradiancia de led blanca (360 luxes), con una concentración máxima de astaxantina de 2,18 mg/L y una concentración máxima de clorofila de 13,97 mg/L a los 21 días de cultivo (Figura 10a y 10b).

**Figura 10a.** Concentración de astaxantina y b. clorofila. Tratamientos: RM control; BBMcontrol; RM T1: 0,375 mg/L de acetato de sodio, BBM T1: 0,375 mg/L de acetato de sodio, RM T2: 0,750 mg/L de acetato de sodio y BBM T2: 0,750 mg/L de acetato de sodio. Combinados con irradiancia de 360 luxes desde el día 15 de cultivo.



Fuente: Elaboración propia

A continuación, se presenta un resumen general de los resultados obtenidos para los tratamientos realizados para los parámetros crecimiento celular, velocidad de crecimiento, concentración de astaxantina y de clorofila.

**Tabla 2.** Resumen de tratamientos realizados con sus respectivos resultados.

Tratamiento	Resultados						
	crecimiento celular / (Cel./mL/día)	velocidad de crecimiento (/día)	Análisis estadístico	[ ] de astaxantina (mg/L/ día)	Análisis estadístico	[ ] de clorofila (mg /L/ día)	Análisis estadístico
RM	2,58 x 10 <sup>5</sup> 35 días	0,028	ANOVA (95%) (F=3,55; P=0,015; gl=5)	0,116 21 días	ANOVA (95%) (F= 1,38; P=0,26; gl=5)	1,174 7 días	ANOVA (95%) (F =1,39; P=0,25; gl=5)
RM + 0,375 mg/L	3,01 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,028		6,088 28 días		36,251 28 días	
RM + 0,750 mg/L	1,54 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,016		1,815 28 días		12,094 28 días	
BBM	8,31 x 10 <sup>5</sup> 35 días	0,027		0,584 21 días		0,944 35 días	
BBM + 0,375 mg/L	1,89 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,024		2,176 21 días		13,971 21 días	
BBM + 0,750 mg/L	1,86 x 10 <sup>8</sup> 35 días	0,017		3,450 7 días		21,136 7 días	

Fuente: Elaboración propia

El mejor tratamiento para producir astaxantina es el 1, en el que se utiliza medio RM con 0,375 mg/L de acetato de sodio combinada con una irradiancia de 360 luxes usando led de color blanco en cajas de cultivo celular colocadas horizontalmente aumentando la superficie de intercambio de gases y optimizando la exposición a la luz. El crecimiento de la microalga *H. pluvialis* fue de 3,01 x 10<sup>8</sup> cél./mL en 35 días de cultivo, con una producción de clorofila de 36,25 mg/L y de astaxantina de 6,09 mg/L, con un incremento en su producción de un 70%, con respecto a los demás tratamientos utilizados.

## DISCUSIÓN

La microalga *H. pluvialis* se destaca por su capacidad para acumular pigmentos carotenoides de importancia comercial, entre ellos la astaxantina. Derivado de su gran demanda en el mercado se han llevado a cabo diferentes estudios, cuyos objetivos van encaminados a optimizar la producción industrial de astaxantina a través de la mejora del cultivo de esta microalga usando biorreactores y fotobiorreactores para producción de su biomasa. De esta manera, se han evaluado condiciones de cultivo, que van desde determinar qué medio ofrece los mejores nutrientes, que se ajusten a los requerimientos de crecimiento de la microalga, así como aspectos relacionados a factores de estrés que favorezcan el desarrollo celular a su

fase enquistada no móvil roja y posteriormente se dé una acumulación intracelular de astaxantina.

Cuando se trabaja con esta microalga, es importante conocer qué ocurre a nivel intracelular cuando esta es sometida a diferentes factores de estrés, y seleccionar las condiciones más adecuadas para el cultivo y la obtención de astaxantina usando condiciones de estrés sin causar daño celular. Cuando las células de la microalga *H. pluvialis* se cultivan en condiciones favorables, las células móviles pasan a convertirse en palmelas, siendo estas capaces de hacer frente al estrés ambiental en diferentes grados. Las células son capaces de sobrevivir al fotodaño dependiendo de su capacidad para modificar su membrana y ajustar su nivel de desaturación de lípidos. Por lo tanto, la productividad de la biomasa y los bioproductos se ve comprometida debido a la susceptibilidad de las células móviles al estrés. En el estudio realizado fue imprescindible tener en cuenta hasta qué punto se priorizaría el crecimiento celular, y a partir de qué momento se intensificarían los factores de estrés, con la finalidad de contar con una gran cantidad de biomasa, que pudiese ser viable para producir astaxantina (Wang et al., 2014; Oslan 2021).

En esta investigación se utilizó para la producción de biomasa de la microalga *H. pluvialis* el biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 litros cuya forma tubular y material transparente favorece el crecimiento de la microalga por la distribución de luz similar a lo realizado por Ramírez (2013), quien utilizó un fotobiorreactor tipo airlift de 1,8 litros, al que se le fueron modificando tiempos de mezclado, coeficientes de oxígeno, de dióxido de carbono, entre otras condiciones, encontrando una velocidad de crecimiento celular óptima. El estudio se llevó a cabo empleando como metodología estrés celular con irradiación y estrés por alta salinidad en el medio de cultivo, lo cual indica que la producción de biomasa de *H. pluvialis* puede llevarse a cabo de forma ideal en un biorreactor, ya que se pueden controlar las condiciones del cultivo como pH, temperatura, agitación y evitar contaminación, para posteriormente utilizar la biomasa producida distribuyéndola en cajas de cultivo celular, las cuales ofrecen un microambiente que favorece la acumulación de gas y que es útil a la hora de generar un factor de estrés adicional para la célula, sin mencionar que permite una mejor distribución de luz (Tocquin et al., 2012).

El uso de cajas de cultivo celular para incrementar la producción de astaxantina se propone en esta investigación porque el uso de biorreactores para el cultivo de la microalga no es el más adecuado en cuanto al suministro de luz, pues incluso el empleo de iluminaciones internas no es suficiente para la entrega de energía de la luz porque la penetración de esta disminuye significativamente con el crecimiento celular y se ha establecido que la luz es el factor más importante que afecta la biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*, cultivando esta microalga en un biorreactor, ya que pequeñas células verdes predominan bajo menor intensidad de luz, mientras que las células grandes rojizas se presentan bajo la alta intensidad de luz. En este sentido, los datos sugirieron que debería ser necesario considerar el ciclo de *H. pluvialis* cuidadosamente para futuras aplicaciones (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021; Zhao et al., 2022).

La biomasa de la microalga *H. pluvialis* producida en los medios RM y BBM usando el biorreactor BIOSTAT® se utilizó para producir astaxantina, transfiriéndola a cajas de cultivo celular y aplicando en una segunda etapa los factores estrés combinados de acetato de sodio, alta irradiancia, 360 luxes, y luz led blanca con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 horas oscuridad, determinándose que el tratamiento 1, donde se usó el medio RM con adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio presentó una concentración máxima de clorofila de 36,25 mg/L y de astaxantina de 6,09 mg/L, incrementándose en un 70% la acumulación de este carotenoide, con respecto al tratamiento 1 en el que se usó el medio BBM con 0,375 mg/L de acetato de sodio y los demás factores estrés previamente mencionados obteniéndose una concentración de 2,18 mg/L y una concentración máxima de clorofila de 13,97 mg/L. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0,05$ ) con respecto a la producción de astaxantina y clorofila.

Otros estudios realizados en biorreactores son los relacionados con la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* en donde se prioriza la importancia del comportamiento fotosintético de *H. pluvialis* durante la transformación celular y la posterior acumulación de astaxantina; esto a través del uso de fotobiorreactores tubulares cerrados o abiertos (Shah et al., 2016; Jannel et al., 2020; Oslan et al., 2021; Borowiak y Krzywonos, 2022). En estos procesos el desequilibrio entre la absorción y la utilización de la luz por la microalga, serían el punto clave en la producción de astaxantina. Es así como en el estudio realizado por Zhang et al. (2016) se obtuvo astaxantina usando fotobiorreactores tubulares al aire libre, donde su acumulación comenzó a partir de los 3 días de cultivo, y se consideró significativa a los 5 días con una cantidad de 0,47 mg/mL incrementándose a 12,89 mg/mL durante 9 días de cultivo. Si se comparan dichos resultados con los de este estudio, la astaxantina comenzó a acumularse a partir del día 7 de cultivo, en cantidad de 0,35 mg/L, y alcanzó un nivel significativo hasta el día 21 de cultivo con una acumulación de 6,09 mg/L. Todo esto sugiere que hay muchos factores para tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un cultivo de la microalga *H. pluvialis* con la finalidad de producir astaxantina; no solo se trata de escoger el medio de cultivo y los factores de estrés ideales, sino también de conocer y tener en cuenta el comportamiento de la microalga a nivel intracelular y su respuesta al ambiente externo.

Entre los resultados obtenidos en el estudio puede destacarse que el medio de cultivo con mejor tasa de crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis* fue el medio RM, similar a lo reportado por Niño et al. (2017), quienes cultivaron la microalga en 3 diferentes medios de cultivo RM, BBM y OHM bajo condiciones de pH 6,7, fotoperiodo de 18h luz – 6 oscuridad, 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  de irradiancia con lámparas de luz fluorescentes blanca,  $T^\circ 25^\circ\text{C}$  y agitación manual diaria, estableciendo un recuento celular de  $7,55 \times 10^5$  cél./mL, en comparación al logrado en esta investigación para el mismo medio sin ninguna adición de acetato de sodio de  $2,58 \times 10^5$  cél./mL. Sin embargo, lograr un crecimiento celular favorable de la microalga es solo el paso inicial; seguido, deben estudiarse los factores de estrés más viables para la producción de astaxantina (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021).

En la microalga *H. pluvialis* se ha utilizado una estrategia de cultivo en dos etapas, ampliamente utilizado en el cultivo a gran escala de

*H. pluvialis* para producir astaxantina. El cultivo de dos etapas incluye una etapa verde y una etapa roja. En el verde se proporcionan condiciones de cultivo favorables para que las células de *H. pluvialis* mantengan un estado móvil y se dividan rápidamente. En la etapa roja, las condiciones de estrés como la luz alta, deficiencia de nitrógeno, alta salinidad, etc., se aplican para inducir a las células a acumular astaxantina, que eventualmente se convierten en aplanosporas rojas inmóviles (Zhao et al., 2022).

El proceso de dos etapas se realiza aprovechando el metabolismo de la microalga para la producción de astaxantina teniendo en cuenta su ciclo de vida, una fase exponencial y una fase estacionaria. Durante la primera etapa se producen células vegetativas "verdes" utilizando el biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 litros que luego se convierten en células enquistadas que acumulan astaxantina en una segunda etapa debido al efecto de los factores de estrés acetato de sodio, luz led blanca y alta irradiancia usando cajas de cultivo celular. Similar proceso realizaron Liu et al. (2019), quienes en la primera etapa cultivaron la microalga en aguas residuales y en el medio basal de Bold (BBM) convencional, creciendo mejor en aguas residuales diluidas (1,5%), lo que arrojó una producción de biomasa de  $906,3 \pm 34,0 \text{ mg L}^{-1}$ . En la siguiente etapa, que denominaron inducción, las células vegetativas se expusieron a una alta intensidad de luz para la producción de astaxantina, y la producción resultante fue de  $39,72 \pm 1,69 \text{ mg L}^{-1}$ . También en este estudio se utilizó en la etapa de inducción agua residual diluida en un cultivo mixotrófico usando diferentes concentraciones de acetato de sodio. Los hallazgos indicaron que la combinación óptima para la producción de astaxantina era acetato de sodio al 38,14 mM y NaCl al 0,58% (p / v), obteniendo una concentración de astaxantina de  $67,95 \pm 3,93 \text{ mg/L}$  después de un periodo de inducción de 12 días.

Es importante resaltar que la iluminación continua en los medios de cultivo es un parámetro imprescindible a la hora de favorecer la acumulación de astaxantina, como lo señalan Gómez et al., (2019), quienes trabajaron un ciclo de luz/oscuridad de 20h/4h (mismas condiciones con las que se llevó a cabo esta investigación a partir del día 15 de cultivo de la microalga *H. pluvialis*), obteniendo una síntesis favorable de astaxantina. En el proyecto de Gómez et al. (2019) se emplearon como factores de estrés la alta irradiancia y la deficiencia de nitrógeno, mientras que en el presente proyecto se utilizó en forma combinada los factores de estrés de alta irradiancia y acetato de sodio, condiciones con las que se obtuvo una concentración de astaxantina de 6,09 mg/L.

El otro factor de estrés estudiado en esta investigación son las concentraciones de acetato de sodio, que son consideradas como fuente de carbono en las concentraciones indicadas, lo que favorece el crecimiento celular de la microalga (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021; Wang et al., 2021). Este nutriente a altas concentraciones puede llegar a inhibir el crecimiento celular (Ramírez, 2013). En este estudio se obtuvieron resultados favorables empleando concentraciones de 0,375 mg/L de acetato de sodio, combinada con la alta irradiancia, lográndose un sinergismo que produjo una concentración de astaxantina de 6,09 mg/L, lo cual concuerda con lo expuesto por He et al., (2018), donde se reporta que el acetato de sodio contribuye a la acumulación de astaxantina en condiciones de luz, ya que



tiene la capacidad de inducir la producción de ARNm, como resultado del estrés al que se somete a la microalga y, por ende, puede generar un flujo metabólico precursor de la biosíntesis de los carotenoides (Jin et al., 2006). Investigaciones previas mostraron que *H. pluvialis* acumula astaxantina bajo las condiciones de luz y acetato de sodio, con el aumento de la expresión de genes *bkt*, *crtR-B* relacionados con la biosíntesis de astaxantina (Wang et al., 2021).

Además del acetato de sodio como factor de estrés, se ha estudiado también el uso de acetato de potasio, acetato de magnesio y bicarbonato de sodio. Pan-utai et al. (2017) emplearon todos estos factores de estrés para definir cuál de estos tratamientos ofrecía mejores resultados en cuanto a la cantidad de astaxantina obtenida. Se utilizaron concentraciones de 100 mM de acetato de potasio y 10 mM de acetato de magnesio y bicarbonato de sodio. Como resultado, se obtuvo que, con el uso de acetato de sodio, se logró una concentración de astaxantina en el rango de 20 a 22 mg/L, con acetato de potasio de 25 a 43 mg/L, para el acetato de magnesio de 19 a 33 mg/L y, finalmente, para el bicarbonato de sodio un resultado en el rango de 25 a 35 mg/L. Concluyeron así que el tratamiento que ofreció una mayor cantidad de astaxantina fue con el factor de estrés de acetato de potasio a 100 mM, seguido del bicarbonato de sodio, acetato de magnesio y finalmente, acetato de sodio.

Finalmente, en esta investigación se logró establecer que al usar la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 litros, y someterla a factores de estrés como el acetato de sodio combinada con alta irradiancia, se obtiene astaxantina entre 21 y 28 días del cultivo. Además, desde las células vegetativas verdes en los días iniciales del cultivo 7 y 14 días en todos los tratamientos realizados, se observó en los días 21, 28 la presencia de células enquistadas palmella de color rojo, correlacionadas con la cantidad de astaxantina presente en los tratamientos que contienen 0,375 mg/L de acetato de sodio combinado con alta irradiancia de 360 luxes con led blancas. Al aumentar el contenido de acetato de sodio de 0,750 mg/L de acetato de sodio y más tiempo de exposición se observa que las células empiezan a volverse claras o albinas y puede haber un cambio conformacional de la célula.

## CONCLUSIONES

El mayor crecimiento celular de la microalga *H. pluvialis* se presentó en el tratamiento RM donde se utilizó 0,375 mg/L de acetato de sodio, presentando un crecimiento celular de  $3.01 \times 10^8$  cel./mL correspondiente al día de cultivo 35. El ANOVA (95%) realizado estableció que sí existen diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 3,54$ ;  $P=0,015$ ;  $gl= 5$ ) y según el test de Tukey HSD (95%) realizado se estableció que este tratamiento fue el mejor para crecimiento celular, con una velocidad de crecimiento de 0,028/día y con un ajuste al modelo logístico con un coeficiente de determinación del 96,79%. El tratamiento en el que se obtuvieron más formas enquistadas y aplanospora fue en el tratamiento 1 del medio RM con adición de 0,375 mg/L de acetato de sodio y una irradiancia de 360 luxes de luces led blancas, llegando a una concentración máxima de astaxantina de 6,09 mg/L a los 28 días del cultivo y una concentración de clorofila de

36,25 mg/L. El ANOVA (95%) realizado estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la obtención de astaxantina ( $F=1,38$ ;  $P=0,259$ ;  $gl=5$ ) y de clorofila ( $F=1,40$ ;  $P=0,254$ ;  $gl=5$ ).

Se concluye que la biomasa obtenida de *H. pluvialis* en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS® de 5 litros, utilizando los medios RM y BBM puede ser utilizada para producir astaxantina al ser sometida a las condiciones de estrés, acetato de sodio en concentración de 0,375 mg/L y alta intensidad de luz, obteniendo 6,09 mg/L de astaxantina en cajas de cultivo celular.

## REFERENCIAS

Borowiak, D. & Krzywonos, M. (2022). Bioenergy, biofuels, lipids and pigments—Research trends in the use of microalgae grown in photobioreactors. *Energies*, 15(15), 5357. <https://doi.org/10.3390/en15155357>

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*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(10), 1081-1087. <https://doi.org/10.4014/jmb.1103.03041>

Do, T. T., Tran-Thi, B. H., Ong, B. N., Le, T. L., Nguyen, T. C., Quan, Q. D., ... & Tran, H. D. (2021). Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 63(2), 81-88. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.63\(2\).81-88](https://doi.org/10.31276/VJSTE.63(2).81-88)

De Moraes, L. B. S., Mota, G. C. P., dos Santos, E. P., Campos, C. V. F. D. S., da Silva, B. A. B., Olivera Gálvez, A., & de Souza Bezerra, R. (2024). *Haematococcus pluvialis* cultivation and astaxanthin production using different nitrogen sources with pulse feeding strategy. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(14), 16231-16243. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03824-7>

Enrico, D. (2018) Influence of Light Stress on the Accumulation of Xantho-phylls and Lipids in *Haematococcus Pluvialis* CCALA 1081 Grown under Auto-trophic or Mixotrophic Conditions. *J Marine Biol Aquacult*, 4(1), 30- 35.

Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., 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>

Gutierrez, B. S. H., Miranda, A., Meneses, D., Vargas, G., & Sáez, A. (2021). The Effect of Different Concentrations of Nitrogen and Phosphorous on the Production of Lipid Metabolites in *Haematococcus Pluvialis* UTEX 25051. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-262577/v1>

He, B., Hou, L., Dong, M., Shi, J., Huang, X. & Ding, Y. (2018) Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe 2. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 175. <https://doi.org/10.3390/ijms19010175>

Imamoglu E. (2007). Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *Int J Nat Eng Sci*, 1(3), 5-9.

Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., & Petit, T. (2020). Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 789. <https://doi.org/10.3390/jmse8100789>

Jin, E., Lee, C.G. & Polle, J.E.W. (2006) Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, p. 821–31.

Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J. & Ke H, (2019). Differences between Motile and Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis* in the Production of Astaxanthin at Different Light Intensities. *Marine Drugs*, 17(1), 39. <https://doi.org/10.3390/md17010039>

Liu, Y. y Yildiz, I. (2019). Biorremediación de aguas residuales de minería y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Global Warming*, 19.

Li, X., Wang, X., Duan, C., Yi, S., Gao, Z., Xiao, C., ... & Li, J. (2020). Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 43, 107602. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>

Manrique Pinzón, M.A. y Marín Corredor, D. L. (2019). *Producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo el efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia en el biorreactor BIOSTAT® a plus* [Trabajo de grado. Uicolmayor].

Niño Castillo, C.M., Rodríguez Rivera, F.C., Díaz, L.E. y Lancheros Díaz, A.G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ... & Mohamed, M. S. (2021). A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>

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>

Pereira, S. & Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, 51, 102027.

Ramaraj, S., Radhakrishnan, R. & Hashem, A. (2017). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(20), 709–22

Ramírez Landínez, D. M. (2013). *Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por Haematococcus pluvialis en un fotobiorreactor tipo airlift* (tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia). <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/20559/300061.2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Régnier, P., Bastias, J., Rodríguez-Ruiz, V., Caballero-Casero, N., Caballo, C. & Sicilia, D. (2015). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. *Marine Drugs*, 13(5), 2857-2874. <https://doi.org/10.3390/md13052857>

Reis, D.F., Machado Junior, F. R., Ores, J.D.C., Lemes, A.C., Burkert, C.A.V. & Burkert, J.F. (2019). Influência do CO2 no Crescimento de *Haematococcus Pluvialis* e na Produção de Carotenoides. *Uniciências*, 22(3Esp), 25. <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2018v22n3Esp25-29>

Rodríguez L. (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.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3709/RODRIGUEZ%20ROMERO%20LAURA%20JOHANNA-.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

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>

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. *J Appl Phycol*, 24(3), 365–73. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>

Tokarz, D., Cisek, R., El-Ansari, O., Espie, G.S., Fekl, U. & Barzda, V. (2014). Organization of astaxanthin within oil bodies of *Haematococcus pluvialis* studied with polarization-dependent harmonic generation microscopy. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107804>

Wang, B., Zhang, Z., Hu, Q., Sommerfeld, M., Lu, Y. & Han, D. (2014). Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing Lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PloS one*, 9(9), e106679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>

Wang, C., Wang, K., Ning, J., Luo, Q., Yang, Y., Huang, D., & Li, H. (2021). Transcription factors from *Haematococcus pluvialis* involved in the regulation of astaxanthin biosynthesis under high light-sodium acetate stress. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 650178. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650178>

Zhang, C., Zhang, L. & Liu, J. (2018). Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage. *J Appl Phycol*, 31(2), 1001–8. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1622-z>

Zhang, L., Su, F., Zhang, C., Gong, F. & Liu, J. (2016). Changes of Photosynthetic Behaviors and Photoprotection during Cell Transformation and Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* Grown Outdoors in Tubular Photobioreactors. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.3390/ijms18010033>

Zhao, K., Li, Y., Yan, H., Hu, Q., & Han, D. (2022). Regulation of light spectra on cell division of the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*: insights from physiological and lipidomic analysis. *Cells*, 11(12), 1956. <https://doi.org/10.3390/cells11121956>