



Producción de astaxantina a partir de Haematococcus pluvialis en medio KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y led azul (450 nm)

Estudiantes

Natalia Lorena Torres Martinez

Mayra Tatiana Cuellar Bogota

Asesor

Judith Elena Camacho Kurmen

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.
TRABAJO DE GRADO
Bogota D.C - 2025



Producción de astaxantina a partir de Haematococcus pluvialis en medio KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y led azul (450 nm)

APROBADA: _____

JURADOS: _____

ASESOR: Judith Elena Camacho Kurmen

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.
TRABAJO DE GRADO
Bogotá D.C - 2025

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios, por permitirnos llegar hasta aquí y darnos la fuerza necesaria para culminar un proyecto tan significativo. Su guía ha sido luz y sostén en cada paso del camino.

A nuestros padres, por su amor incondicional y por enseñarnos el valor del esfuerzo, la constancia y el compromiso. Gracias por estar siempre ahí, por creer en nosotros y acompañarnos en cada etapa de este proceso.

A mi compañera, por su disposición y apoyo constante, por construir juntos este camino con respeto, buena comunicación y un espíritu colaborativo que hizo más enriquecedora esta experiencia.

Y a la vida, por regalarnos esta etapa de tantos aprendizajes, personas valiosas y momentos que nos han hecho crecer. Por demostrarnos que los sueños y las metas pueden alcanzarse cuando se camina con fe, entrega y perseverancia

AGRADECIMIENTOS

Damos gracias primeramente a Dios por darnos la sabiduría, entendimiento, destreza y fuerzas en cada paso de la carrera y ayudarnos hasta el final, por permitirnos culminar nuestra carrera con éxito y muchos aprendizajes y por habernos permitido terminar este hermoso proyecto.

Agradecemos inmensamente a la Doctora Judith Elena Camacho Kurmen quien fue una muy buena asesora por su gran apoyo incondicional, colaboración, ayuda y guía en la elaboración del proyecto, por la paciencia y comprensión que siempre nos tuvo, por confiar en nosotras, por brindarnos su gran conocimiento y entrega, sin ella no habría sido posible esta investigación. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca especialmente al semillero de Investigación Bioprocesos y Control por brindarnos los espacios, los insumos y herramientas para el desarrollo de la investigación, a cada profesor por su dedicación y entrega, por brindarnos sus conocimientos y experiencias con el fin de formar unos grandes profesionales.

Infinitas gracias a nuestros Padres por su dedicación, consejos, guía, amor y cariño, por ser ese apoyo incondicional, por darnos las fuerzas, valentía, los principios y valores, que hoy nos definen como personas y profesionales, sin su ayuda este sueño no hubiera sido posible. Gracias por estar en cada paso del camino, por brindarnos la seguridad y confianza, igualmente enseñarnos a nunca rendirnos y luchar por nuestras metas y sueños.

Tabla de contenido

Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
2.Objetivos.....	10
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. Estado del arte.....	11
4. Marco teórico.....	20
4.1 Factores que afectan el crecimiento.....	22
4.2 Nutrientes.....	24
4.3 Factores de estrés.....	25
5. Astaxantina.....	26
5.1 Ruta metabólica de producción de astaxantina.....	26
5.2 Usos y aplicaciones.....	27
6. Hipótesis.....	27
7. Diseño metodológico.....	27
7.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i>	28
7.2 Fase 2. Cambio morfológico.....	30
7.3 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.....	30
8. Resultados.....	31
8.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i>	31
8.2 Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>H. pluvialis</i>	32
8.3 Cambio morfológico.....	34
8.4 Producción de astaxantina y clorofila.....	36
8.5 Relación entre crecimiento y producción de pigmentos.....	37
8.6 pH.....	37
9. Discusión.....	39
10. Conclusiones.....	42
11. Recomendaciones.....	43
12. Participación en eventos.....	43
Bibliografía.....	44

Lista de tablas

Tabla 1. Componentes del medio volvox-mes.....	28
Tabla 2. Componentes del medio Kobayashi.....	29
Tabla 3. Componentes del medio BBM.....	29
Tabla 4. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.....	33
Tabla 5. Matriz de coeficientes del modelo Baranyi-Roberts ajustado para los diferentes medios de cultivo.....	34
Tabla 6. Cambio morfológico de <i>H. pluvialis</i> medio BBM y KM. Tamaño 40x.....	35
Tabla 7. Tabla resumen de los parámetros analizados y los tratamientos realizados..	38

Lista de figuras

Figura 1. Cambio morfológico <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Figura 2. Ruta metabólica de astaxantina.....	26
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>H. pluvialis</i> en los medios KM y BBM.....	32
Figura 4. Curva de crecimiento en escala logarítmica de <i>H. pluvialis</i> en los medios de KM y BBM con luz LED roja (650 nm) y luz azul (450 nm).....	32
Figura 5. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio KM.....	33
Figura 6. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio BBM.....	34
Figura 7. Curva de producción de clorofila.....	36
Figura 8. Curva de producción de astaxantina.....	37
Figura 9. Curva de medición de pH.....	37

Lista de anexos

Anexo 1. Curvas de calibración de Clorofila.....	50
Anexo 2. Curva de calibración de astaxantina.....	50
Anexo 3. Mediciones de crecimiento celular Medio KM y BBM.....	51
Anexo 4. Mediciones de absorbancias y concentración de clorofila.....	52
Anexo 5. Mediciones de absorbancias y concentración de astaxantina.....	53
Anexo 6. Mediciones de pH.....	53
Anexo 7. Resultados Tratamiento estadístico crecimiento celular.....	54
Anexo 8. Resultados Tratamiento estadístico producción de clorofila.....	54
Anexo 9. Resultados Tratamiento estadístico producción de astaxantina.....	55
Anexo 10. Resultados Tratamiento estadístico pH.....	56
Anexo 11. Cálculos de la velocidad de crecimiento en modelo logístico.....	56
Anexo 12. Resultados de Modelo Baranyi-Roberts en el medio KM.....	56
Anexo 13. Resultados de Modelo Baranyi-Roberts en el medio BBM.....	57



Producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* en medio KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y luz azul (450 nm)

Resumen

La microalga *Haematococcus pluvialis*, es considerada como la fuente natural de astaxantina, al ser sometida a condiciones de estrés. La astaxantina, es un producto natural que tiene gran interés por ser utilizada como pigmento en alimentos, fuente de vitaminas, colorante, conservante natural, aditivo alimentario, antioxidante, antienvjecimiento, agente anticancerígeno y un inmunomodulador.

El presente trabajo, tiene como objetivo determinar la producción de astaxantina en *H. pluvialis* usando medios de cultivo KM y BBM. En la etapa verde se usan condiciones favorables con una irradiancia de $130.65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (1700 luxes) con luz led roja (650 nm). En la etapa roja se aplicó estrés con luz led azul (450 nm) con una irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes). Se realizó el ANOVA (95%) para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

Se encontró que el medio de cultivo BBM bajo las condiciones trabajadas demostró ser mejor en el crecimiento de la microalga con $2,88 \times 10^6$ cel./mL con velocidad de crecimiento ($R^2=0,87$, modelo logístico) usando luz led roja (650 nm) por 25 días y luego luz led azul (450 nm) por 47 días observándose no hay diferencias significativas ($F:2.051$; $P:0.174$; $gl:1$). El tratamiento realizado en el medio KM produjo la mayor concentración de astaxantina $20,29 \mu\text{g}/\text{mL}$, presentando quistes inmaduros y maduros de tonalidad rojiza por acumulación de este pigmento, usando luz led roja. observándose diferencias significativas ($F:9.060$; $P:0.009$; $gl:1$). Se estableció que el uso de la luz led roja y luz led azul incrementaron el crecimiento de la microalga y la acumulación de astaxantina.

Palabras clave

Microalga, luz led, astaxantina, condiciones de estrés,

Estudiantes: Natalia Lorena Torres Martinez y Mayra Tatiana Cuellar Bogotá

Docente institución: Judith Elena Camacho Kurmen

Fecha: 25 de Abril del 2025

1. Introducción

La astaxantina es un pigmento y compuesto bioactivo que tiene aplicaciones en el área industrial, alimenticia, cosmética, nutracéutica, farmacéutica y acuicultura, obtenida de la microalga *H. pluvialis*, quien acumula altas concentraciones de este carotenoide posiblemente entre un 5 – 6 peso/peso por biomasa seca, cuando es sometida a condiciones de estrés como luz, color de luz, alta irradiancia, deficiencia de nutrientes, salinidad, temperatura y CO₂. Para la obtención de la astaxantina se busca el crecimiento apropiado de la microalga produciendo una biomasa en calidad y cantidad adecuada. Además de la disponibilidad de la biomasa adecuada de la microalga, el establecimiento de un proceso de producción repetible es indispensable para la aplicación industrial, donde el uso de biorreactores cerrados, proporcionan una operación más controlada y definida, con bajo riesgo de contaminación, una configuración de proceso altamente flexible, controlando de una manera precisa las variables de cultivo, como luz, fuentes de luz, color, irradiancia, fotoperiodos, pH, temperatura, agitación y mezclado.

Las propiedades de la fuente de luz, como la longitud de onda y la intensidad, son importantes para el crecimiento de microalgas fotoautótrofas como el *H. pluvialis* y el uso de la combinación de condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes y la alta intensidad de luz y el color usado incrementan la acumulación de astaxantina en esta microalga. Se han utilizado diferentes fuentes de luz para el crecimiento y estrés de la microalga, como la fuente de luz solar, el uso de lámparas fluorescentes blancas, lámparas incandescente y el uso de luces led de colores, siendo éstas últimas la fuente de luz más prometedora, ya que consumen menos energía eléctrica, producen más luz, no desperdician energía produciendo la longitud de onda necesaria y son de bajo costo.

Para el incremento de la obtención de astaxantina por la superposición de unas células sobre otras durante el crecimiento de la microalga, hace importante establecer la trayectoria de la luz adecuada, el fotoperiodo establecido, la fuente de luz, el color, la irradiancia o intensidad adecuada de luz, diseñando un sistema de luz que se adapte de tal manera que todas las células de la microalga reciban el mismo estrés y así incrementar la acumulación de este carotenoide. Es por lo que en este proyecto de investigación se busca establecer el efecto de los medios KM y BBM usando luz led roja y azul para la producción de astaxantina a partir de un cultivo de la microalga *H. pluvialis*.

La astaxantina es un producto natural, es uno de los antioxidantes naturales más potentes, además de que contiene otras moléculas como vitamina C, la cantaxantina, la luteína, el β -caroteno, es extraído de la microalga *H. pluvialis*, ya que es un gran productor de este compuesto, este pigmento presenta gran variedad de aplicaciones como lo es la nutrición humana, también en la salud, como en el tratamiento y prevención de enfermedades del sistema vascular y cardíaco, diabetes, antienvjecimiento, antiinflamatorios y cánceres.

La implementación de este pigmento en las industrias es importante para la sociedad puesto que contiene gran variedad de beneficios que contribuyen con el bienestar humano. Los colorantes químicos utilizados en el consumo y uso cotidiano contienen gran cantidad de efectos adversos siendo el más representativo la contaminación de los cuerpos acuáticos lo que conlleva a la inhibición de la fotosíntesis y el deterioro de la salud animal, además de ser tóxicos, cancerígenos y provocar mutaciones en el organismo como el cambio de la microbiota intestinal, a diferencia de los colorantes naturales que son considerados inocuos en tanto que no se han reportado efectos secundarios tras su uso, ni producen cambios en el organismo. Los beneficios que se esperan obtener con la implementación de este colorante natural en las industrias es evitar el impacto negativo que los colorantes químicos causan a nivel ambiental y salud, además la astaxantina de origen natural producida por esta microalga no presenta efectos secundarios como si lo hace la astaxantina de origen químico y es de mejor calidad que la producida por bacterias y levaduras.

Es por esto que una estrategia promisorio para mejorar la producción de astaxantina en el *H. pluvialis*, como microalga fotoautótrofa, el estudio de los factores que afectan su crecimiento como la luz. Con el objetivo de mejorar las condiciones de crecimiento, desarrollo y producción, es importante considerar que el cultivo de *H. pluvialis* presenta ciertas dificultades, especialmente en la obtención del pigmento en cantidades significativas, debido a su complejo ciclo celular, esto se debe a que el pigmento es un metabolito secundario. Siendo los diodos emisores de luz (led) las fuentes de luz preferidas debido a su variedad en colores blanco, azul y rojo con amplio espectro de estrecha banda con diversidad en tamaños desde el tamaño pequeño, son ligeros, duraderos y eficientes en términos de mayor vida útil, además la cantidad de luz que se desprende es mucho mayor en comparación con su consumo de energía. Por lo cual es importante definir las variables relacionadas con la luz como la trayectoria, el fotoperiodo y el color en el led para la obtención del pigmento astaxantina.

2.Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* en medio KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y led azul (450 nm)

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de *H. pluvialis* bajo las condiciones trabajadas.
2. Determinar las cinéticas de producción de clorofila y astaxantina bajo las condiciones trabajadas.
3. Relacionar parámetros cinéticos de crecimiento del *H. pluvialis* en un cultivo fotoautotrófico con la producción de clorofila y astaxantina.
4. Documentar los cambios morfológicos celulares en función de la fase de crecimiento bajo las condiciones trabajadas.

3. Estado del arte

Se han realizado diferentes trabajos donde se han utilizado diferentes medios de cultivos, condiciones de cultivo y uso de biorreactores o fotobiorreactores, usando diferentes fuentes de luz como la luz solar, lámpara fluorescente y led para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* y la producción de astaxantina, como los publicados por los siguientes autores:

Gao Z, et al. 2014, en este estudio se investigó más a fondo el impacto de la iluminación con luz azul de LED ($3500 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en el contenido de astaxantina, la expresión de ARNm y los perfiles de regulación de ocho genes carotenógenos relacionados con la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis*. Los resultados mostraron que el contenido de astaxantina aumentó a 3,03 mg/L en 18 días después de la inducción con luz azul. Se indicó que los genes de crtR-b, bkt2 y crtO podrían ser vitales para la producción de astaxantina en el tratamiento con luz azul para *H. pluvialis*. Este estudio sugirió que la iluminación con luz azul en *H. pluvialis* es un estimulador eficaz para inducir la producción de astaxantina (1).

Xi T, et al. 2016, investigaron los efectos de diferentes longitudes de onda con LED en *H. pluvialis*. Se utilizó LED rojos para el crecimiento de células y la luz LED azules para inducir la biosíntesis de astaxantina. El resultado mostró que la producción de astaxantina basada en un cambio de longitud de onda del rojo al azul aumentó significativamente, en comparación con aquellas con iluminación continúa utilizando LED rojos. El número de células se vio significativamente influenciado por la longitud de onda de la luz roja, la producción de astaxantina en *H. pluvialis* cultivado bajo LED azules es mayor que bajo LED rojos, Se observó un aumento de aproximadamente más del 50 % en la producción de astaxantina cuando se cultivó bajo luz azul, lo que demuestra ser uno de los diversos factores de inducción para la biosíntesis de astaxantina. Se logró un aumento adicional de astaxantina con la aplicación simultánea de carbón exógeno más luz azul. El enfoque basado en la manipulación adecuada de las longitudes de onda de los LED en las etapas de las células de *H. pluvialis* permitirá mejorar la biomasa y mejorar la producción de astaxantina (2).

Sun, H. et al. 2016, obtuvieron diferentes tendencias de las condiciones de cultivo y el peso celular seco. El peso celular seco aumentó rápidamente con mezcla de luces con el valor de $0,522 \pm 0,018 \text{ g/L}$, que aumentó un 14,4% con luz roja y un 41,8% con luz blanca, respectivamente. Además, el consumo de nitrato en esta etapa disminuyó significativamente con mezcla de luces, lo que sugiere que la mezcla de luz blanca y luz roja impulsó a las células a absorber nutrientes para construir nuevos tejidos, que podrían obtenerse a partir del peso celular seco. Sin embargo, los valores de consumo de fosfato mostraron resultados opuestos que mostraron cambios significativos en la concentración de fosfato en la luz blanca. La mezcla de luces luz roja y blanco fue la mejor luz en este experimento para inducir a *H. pluvialis* a transformarse en "forma activa" con la mayor eficiencia fotosintética y luego las respuestas fisiológicas se produjeron fácilmente con los sistemas enzimáticos. La selección de las luces en el cultivo de microalgas tuvo como

propósito maximizar la eficiencia fotosintética. En esta investigación, la mezcla de luces rojo y blanco fue la mejor, la más cercana a la luz óptima, para mejorar la biomasa celular (3).

Zhen Z. et al. 2016, en este estudio, las células de *H. pluvialis* cultivadas por heterotrofia no utilizaron el carbono inorgánico de manera eficiente, incluyendo tanto el carbonato como el CO₂ como única fuente de carbono para la biosíntesis de astaxantina. Las capacidades en la utilización de carbonos inorgánicos no se pueden restaurar mediante la aclimatación de las células bajo luz moderada y con N o sin N añadido. Esta conclusión difiere de los hallazgos previos de que las células de *H. pluvialis* prefieren asimilar CO₂ para la biomasa y la biosíntesis de astaxantina. La diferencia puede surgir de la composición genética distinguida entre las diferentes cepas de *H. pluvialis*, pero también probablemente debido a un cambio metabólico causado por las condiciones de cultivo. En el cultivo heterotrófico, las células de algas utilizan el acetato de sodio como fuente de carbono y energía, en el que el ATP y el NADPH son proporcionados por el ciclo del TCA. Como tal, la fotofosforilación y el ciclo de Calvin ya no son obligatorios, y las maquinarias celulares involucradas pueden estar dismanteladas o no completamente desarrolladas. La aclimatación de las células bajo luz y nitrógeno pareció tener poco efecto en la regeneración de los componentes celulares involucrados en la asimilación de carbono inorgánico (4).

Sun H, et al. 2017, estudiaron diferentes formas de aumentar la biomasa verde de la microalga *H. pluvialis*, añadiendo nutrientes de forma continua al medio de cultivo (lote alimentado) y también reemplazando el medio después de dejarlo un tiempo. También analizaron otra condición para el medio como los efectos de la luz, donde utilizaron luz roja-blanca en diferentes proporciones e intensidades. Los resultados demostraron que la combinación de luz roja-blanca tuvo la mejor tasa de crecimiento en comparación con el uso de solo luz blanca. La mejor proporción fue de 2:1(rojo:blanco), con una concentración de biomasa de 0,161 g/L en 48 horas y una tasa de 0,669 d⁻¹ y en cuanto a la intensidad de luz no hubo diferencias significativas (5).

Pham, K. T., et al. 2018, determinaron parámetros como el tamaño del inóculo, la concentración de CO₂ y la longitud de luz, para obtener una mejor densidad celular, biomasa y contenido de astaxantina de la microalga *H. pluvialis*. Encontraron que el rango de temperatura óptimo es de 18 a 27°C, con una tasa de crecimiento de 0,18μ por día a 25°C y 28°C el crecimiento disminuye y a 30°C, las células mueren. En cuanto al inóculo se encontró la mayor densidad celular, demuestra que no es bueno una mayor cantidad de biomasa inicial. La luz roja tiene un mejor rendimiento en la densidad celular pero no es eficiente para la acumulación de astaxantina. La luz azul no promovió significativamente el crecimiento celular, pero en cambio sí hubo aumento de quistes y mayor acumulación de astaxantina con 2,36μg x en 16 días. La concentración de CO₂ a 5% y luz roja promueve el crecimiento con una densidad en fase logarítmica y disminuyo un poco en fase estacionaria, en cambio con iluminación azul y con

concentraciones de CO_2 a 5% y 7,5% se obtuvieron el mayor contenido de astaxantina con $2,81 \pm 0,26 \mu\text{g}$.y $2,93 \pm 0,41 \mu\text{g}$. respectivamente (6).

Lee et al. 2018, estudiaron la comparación del transcriptoma de *H. pluvialis*, con respecto a la biosíntesis de astaxantina, bajo la irradiación monocromática de luz LED rojo (660 nm) o azul (450 nm) para examinar las regulaciones diferenciales de genes asociados con vías particulares. En respuesta a la irradiación azul y roja, se seleccionaron genes que mostraron más del doble de cambios en su expresión en comparación con el control de luz blanca. En respuesta a la longitud de onda roja, se identificó que la iluminación de longitud de onda azul, pero no la iluminación de longitud de onda roja, podría estimular ampliamente la transcripción de genes, regulando así diversas fisiologías celulares posteriores (7).

Ma R, et al. 2018, Investigaron cómo influye las diferentes longitudes de luz, a la germinación, proceso en el cual los hematocisto (quiste) pasan a macrozooides de *H. pluvialis*, ya que en esta etapa, las paredes celulares son más delgadas, generando una extracción más eficiente de astaxantina, asimismo evaluaron el contenido y capacidad de extracción del pigmento, también estudiaron los niveles de expresión del gen phot (regula la biosíntesis de carotenoides) con las diferentes longitudes de luz. Los resultados mostraron, que la luz azul genera una mayor germinación, con una eficiencia de 28%, seguido de la luz blanca y roja. La luz azul produjo el mayor contenido de astaxantina con 37.24mg en el día 4, demostrando que retiene más el pigmento, que con la luz roja y blanca, con respecto a la extracción, también fue mucho mejor con la luz azul (95,7% el día 5), correlacionando que a mayor germinación mejor extracción. Acerca del gen phot y otros genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, se confirmó su influencia en la síntesis de astaxantina. En relación con su expresión, se observó que la luz azul, regula positivamente estos genes, se obtuvo el mayor contenido del pigmento bajo esta longitud de luz (8).

Ota, S.,et al. 2018, en su investigación, observaron que la astaxantina en células de quistes verdes-rojas se localizó en la parte central de la célula (periferia nuclear) en condiciones de luz normales ($<45 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Tiempo: 0 min). Las imágenes de lapso de tiempo obtenidas durante 15 min a intervalos de 15s mostraron que la astaxantina en el centro celular se difundió rápidamente a la parte periférica de la célula en 10 min. En una célula en la que la astaxantina se transfirió completamente a la periferia, una capa delgada de astaxantina era visible inmediatamente debajo de la pared celular (Tiempo 10 min). Cuando las células difundidas con astaxantina se colocaron en la oscuridad, la astaxantina se redistribuyó al centro de la célula (alrededor de la periferia del núcleo). Sin embargo, una capa de astaxantina en forma de anillo permaneció cerca de la pared celular (Tiempo 25 min). La primera se produjo en 10 min, pero la segunda requirió más del doble de ese tiempo para agregarse completamente en el centro de la célula (9).

Zhang W, et al. 2018, observaron que las curvas de crecimiento de *H. pluvialis* se generaron cultivos bajo diferentes intensidades de luz de 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ con privación de nitrógeno y control. El peso seco de la biomasa aumentó drásticamente con la creciente intensidad de la luz y casi no mostró fase

de retraso. El peso seco aumentó a $2,19 \pm 0,08$ y $3,43 \pm 0,06$ g/l bajo privación de nitrógeno y control a la intensidad de luz de $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2 / \text{s}$, que fue 1,39 veces y 2,00 veces mayor que a $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 / \text{s}$. Los resultados indicaron que diferentes intensidades de luz aparentemente mejoraron la biomasa de las células de algas, lo que está implícito en los informes de microalgas, y el aumento del peso seco depende de manera importante de la producción fotosintética neta. Aunque la falta de nitrógeno puede inhibir la biomasa de *H. pluvialis* en comparación con las condiciones de nitrógeno suficiente, aún se pudo lograr un alto crecimiento de algas bajo deficiencia de nitrógeno a altas intensidades de luz de 200, $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2 / \text{s}$, que fueron $2,01 \pm 0,06$ y $2,19 \pm 0,08$ g/l, respectivamente. Los resultados sugirieron que la intensidad de la luz fue de gran importancia para el crecimiento de las algas y de hecho aumentó el peso seco de la biomasa independientemente de la falta de nitrógeno (10).

Christian D, et al. 2018, investigaron el efecto de la iluminación con luz LED roja y azul en la producción de astaxantina y clorofila, así como en el crecimiento de biomasa de *H. pluvialis* cultivada en medios KM y BBM. Los cultivos fueron sometidos a condiciones específicas de luz y de concentración de CO_2 , con intensidades lumínicas de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (baja) y $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (alta) y niveles de CO_2 de 0.04%, 5% y 15%. Los resultados mostraron que la exposición a luz LED roja y alta intensidad de CO_2 incrementó la acumulación de astaxantina, alcanzando una concentración de 36 mg/g en condiciones de alta intensidad de luz y 15% de CO_2 , mientras que la luz LED azul, en condiciones de baja intensidad de luz y CO_2 al 5%, favoreció el crecimiento de biomasa, incrementando en un 3.5X la masa seca en comparación con la iluminación estática. La combinación de estos parámetros mostró un balance entre la producción de pigmentos y el crecimiento de biomasa, destacando el potencial de estas condiciones de iluminación y CO_2 en sistemas de producción de astaxantina a nivel industrial (11).

Mazumdar N, et al. 2019, investigaron el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento vegetativo de *H. alpinus* en biorreactores de transporte aéreo para lograr una alta densidad celular sostenible. Se investigó la concentración en la mezcla aire-gas, la temperatura, las intensidades de la luz y las longitudes de onda para lograr cultivos sostenibles de alta densidad celular. Las clorofilas absorben principalmente luz azul y roja y no absorben la parte verde del espectro, lo que hace que los tejidos que contienen clorofila parezcan de color verde. Los resultados muestran que una mezcla de LED rojos y azules fue más efectiva para promover el crecimiento celular, Los LED rojos produjeron densidades celulares más bajas en comparación con la mezcla de los LED azules. La combinación de LED rojo y azul en una proporción de 1:3 mejoró el crecimiento vegetativo. Según los resultados, se puede sugerir que, dado que la luz azul por sí sola obstaculiza el crecimiento celular, podría usarse para inducir la síntesis de astaxantina en las células vegetativas no móviles (12).

Pang N, et al. 2019, Investigaron la efectividad de los cultivos mixotróficos los cuales utilizan factores como la luz y la adición de carbono orgánico al medio, con el fin de medir y analizar el crecimiento de la biomasa de la microalga y la síntesis de

bioproductos como la astaxantina. Los resultados demostraron que el uso de la luz blanco-rojo y con ribosa logró una mayor cantidad biomasa (1,93 g/L) que la luz blanco-azul en la etapa verde, e igualmente en la etapa roja la luz blanco- roja mostró un mejor crecimiento llegando 4,6 g/L (17 días). En cuanto a la síntesis de astaxantina, se observó la mayor acumulación con luz blanco-azul, especialmente con el uso de gluconato como carbono orgánico, donde se encontró 3,3 % de contenido de astaxantina en las células de *H. pluvialis* (13).

Pereira S, Otero A. 2020, investigaron el uso potencial de luces monocromáticas para la producción de etapas tanto verdes como rojas de *H. pluvialis* en condiciones óptimas, se compara el crecimiento y la acumulación de pigmentos bajo luz rojo, azul, o una mezcla de ambas longitudes de onda, y se estudió en el laboratorio el efecto de la irradiancia sobre la acumulación de pigmentos. Los cultivos mantenidos bajo luz roja alcanzaron la densidad celular más alta en la fase exponencial tardía, alcanzando alrededor de $7,0 \times 10^6$ células/mL. Los cultivos mantenidos bajo luz azul alcanzaron $5,0 \times 10^6$ células/mL por el mismo día. Los cultivos mantenidos con luz mixta alcanzaron un valor intermedio alrededor de $6,0 \times 10^6$ células/mL, evidenciándose que la luz roja parece ser la longitud de onda óptima para la acumulación de biomasa (14).

Liyanarachchi et al., 2020, evaluaron el efecto de la luz en la producción de astaxantina, otros carotenoides y el crecimiento de biomasa en *H. pluvialis*. Para ello, se utilizó un régimen de iluminación continua a 5000 lx y un régimen escalonado con incrementos de 2000 a 5000 lx, empleando fotoperíodos de 12:12 horas en la fase verde y luz continua en la fase roja, así como luz LED roja y azul. La exposición a iluminación continua a 5000 lx incrementó significativamente la acumulación de astaxantina, alcanzando un contenido de 32 mg/g de biomasa, aunque redujo la productividad de biomasa a 0.05 g/L. En contraste, el régimen escalonado mantuvo la productividad de biomasa en 0.12 g/L y alcanzó 25 mg/g de astaxantina, lo cual optimiza el balance entre biomasa y producción de pigmentos. Además, bajo condiciones de luz continua (CS) y estresante (SS) con 5000 lx y limitación de nutrientes, la concentración de astaxantina aumentó hasta 27 mg/L, mientras que las concentraciones de biomasa alcanzaron un máximo de 0.56 ± 0.14 g/L en cultivos con fosfato 1x en SS y de 0.47 ± 0.01 g/L en cultivos 2x en CS al cabo de 42 días. En cuanto a la clorofila, ambos regímenes de iluminación promovieron su degradación, especialmente en CS, lo que facilitó la transición de la fase verde a la fase roja con una mayor acumulación de astaxantina al final del proceso. Estos hallazgos sugieren que la iluminación continua, junto con una limitación de nutrientes, es óptima para maximizar la acumulación de carotenoides y reducir la clorofila, obteniendo una biomasa rica para la extracción de astaxantina (15).

Li K, et al. 2020, este estudio analizó la influencia en diferentes proporciones de luz azul y roja, en crecimiento de la biomasa y producción de pigmentos fotosintéticos de *H. pluvialis*. Se demostró que el mejor crecimiento de la microalga fue con la proporción 2:1 de luz roja/azul, con un peso seco de la biomasa y la tasa máxima de crecimiento específico de 0,82 g/L y 0,75/día, igualmente la producción

de clorofila y carotenoides fue mayor a esta proporción con una producción de 33,6 mg/L y 8,5 mg/L respectivamente. Estos resultados fueron dados porque se cree que las enzimas implicadas en la fotosíntesis, podrían estar reguladas con la luz azul. Se concluye que el uso de luz mixta (roja y azul) genera un mayor rendimiento fotosintético (16).

DO, Thanh-Tri, et al. 2021, estudiaron con el fin de reducir costos del cultivo de *H. pluvialis* en escala piloto en fotobiorreactores. El inicio temprano de la iluminación led azul-roja (el día 2) después de la inmovilización de las algas en biopelículas resultó en la mayor acumulación de astaxantina en la biomasa seca, que alcanzó un máximo de 1,3%. (p/p) después de 10 días de cultivo (17).

Wang, et al. 2021, realizaron el análisis del transcriptoma de *H. pluvialis* bajo estrés de acetato de sodio ligero durante 1,5 h, con el objetivo de descubrir los factores de transcripción y la regulación de la síntesis de astaxantina. Los resultados indicaron que mejorar el nivel de transcripción de los genes relacionados con la síntesis de astaxantina conduce a un aumento significativo de los productos de astaxantina cuando se tratan con muchos tipos de estrés. La transcripción de genes clave para la síntesis de astaxantina, como *bkt* y *crtR-B* se pudo observar después del estrés durante 0,5 h y aumentó notablemente después de 2,5 h, detectándose acumulación de astaxantina a las 4 h (18).

Do et al. 2021, evaluaron el efecto del espectro de luz de los LED (LED rojo, LED azul y LED azul-rojo) sobre el crecimiento de biomasa y la acumulación de astaxantina de *H. pluvialis* en el fotobiorreactor de sustrato poroso de capa (TL-PSBR) en ángulo con el fin de seleccionar el tipo de luz LED más adecuada para cultivar *H. pluvialis* para producir astaxantina. Se obtuvieron resultados del efecto de la luz monocromática sobre el crecimiento de *H. pluvialis* donde la biomasa seca para los tres tratamientos aumentó, el contenido de astaxantina en la biomasa fue mayor con LED de luz azul y luego disminuyó hasta el día 8, Bajo iluminación LED roja, la acumulación de astaxantina fue máxima en el día 6 y luego disminuyó gradualmente. Por lo tanto, La combinación de LED azules y rojos con una intensidad de 100-120 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en el cultivo de *H. pluvialis* inmovilizado dio como resultado la mayor biomasa seca y acumulación de astaxantina en comparación con el uso solo de LED azules o rojos (19).

Hazwani, et al. 2021, en esta revisión se resumen los trabajos más recientes sobre el cultivo de *H. pluvialis*, que incluye estrategias para las etapas verde y roja del método de cultivo donde las estrategias cubren diferentes tipos de *H. pluvialis* con diferentes condiciones de crecimiento y mejora de procesos sometidos a condiciones de estrés, con la intención de incrementar la producción de astaxantina. Las condiciones de cultivo con baja intensidad de luz, con una fuente de luz blanca con un fotoperíodo de 12:12 h, ciclo de luz/oscuridad junto con urea como fuente de nitrógeno, es la mejor combinación para el crecimiento de las células. En comparación con la etapa roja, la condición óptima para inducir la producción de astaxantina es mediante la aplicación de estrés como la deficiencia de nitrógeno, el efecto de la salinidad, la intensidad de la iluminación, el efecto de la temperatura y la aplicación de la concentración de iones metálicos (20).

Wei Z, et al. 2022, estudiaron el efecto de los factores de estrés sobre la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis*, analizando la expresión de genes con las diferentes tipos de luz, como la luz blanca y la luz azul y adición de ácido salicílico (AS) al medio(BBM). Se midió la cantidad de astaxantina, en donde se demostró que la mayor acumulación se obtuvo del tratamiento con luz azul más AS, seguida de la luz blanca y la luz azul con menor contenido de astaxantina. También estudiaron los patrones de cuatro genes (*bkt*, *crtZ*, *lyc*, y *psy*) implicados en la síntesis directa del carotenoide, se observó entonces que la luz blanca genera una regulación positiva significativa en todos los genes, pero esto no ayudó a que se tuviera mayor cantidad de astaxantina (21).

Santos, B, et al. 2022, evaluaron el efecto de la luz azul y roja en baja irradiancia ($20 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sobre la producción de pigmentos y el crecimiento de biomasa en *H. pluvialis*. Los resultados indicaron que la luz azul fue la más efectiva para incrementar la producción de astaxantina, alcanzando concentraciones de $13 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$ tras 96 horas, mientras que bajo luz roja se obtuvo una producción de astaxantina de $6 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ al final del cultivo. La luz roja también promovió un aumento en la concentración de clorofila, llegando a $7 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila a y $2 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila b después de 120 horas, mientras que la luz azul mostró oscilaciones menores en los niveles de clorofila. En cuanto al crecimiento celular, se observó que la densidad de células bajo luz roja alcanzó $44,5 \pm 3,5 \times 10^4 \text{ células mL}^{-1}$, siendo esta condición favorable para el crecimiento de biomasa en comparación con la luz azul y blanca (22).

Cheirsilp B, et al. 2022, estudiaron los efectos de las diferentes bandas estrechas específicas de diodos emisores de luz (LED) y sus intensidades para mejorar la producción de astaxantina y productos biológicos por la microalga *Haematococcus sp.* la iluminación con luz LED de dos etapas que involucra LED rojo durante 5 días y luego LED azul durante los siguientes 5 días, con una intensidad de luz continua de $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, demostró ser el más eficiente para mejorar el rendimiento de *Haematococcus sp.* Estas condiciones llevaron a la mayor producción de astaxantina, de 2,55 mg/L, que fue de 1,22 a 2,07 veces mayor que la del cultivo de una etapa, sin un efecto significativo en los pigmentos (clorofilas y carotenoides) y la producción de lípidos. *Haematococcus sp.* creció bien en el efluente secundario de una planta de procesamiento de mariscos, dando 1,33 g/L de biomasa, con 3,39 mg/L de astaxantina, 14,3 mg/L de clorofilas, 6,22 mg/L de carotenoides y 0,41 g/L de lípidos (23).

Do et al. 2023, en este estudio, se aumentó el tiempo de iluminación con LED rojos y azules combinados para aumentar la biomasa y estimular la acumulación de astaxantina de *H. pluvialis* en TL-PSBR en ángulo a escala piloto. Esto resultó en cantidades relativamente bajas de astaxantina en la biopelícula cuando se aplica un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h en comparación con la iluminación con lámparas de sodio de alta presión, Sin embargo, aumentar el tiempo de iluminación por día con un LED aumentó efectivamente la biomasa de algas y la cantidad de astaxantina obtenida, esto ayuda a acortar el tiempo de cultivo y, por tanto, reduce el riesgo de contaminación. La luz LED con un tiempo de exposición más largo

resultó en productividades de biomasa y astaxantina significativamente mayores por mol de fotones en comparación con la luz de sodio de alta presión con un ciclo de luz/oscuridad más corto, esto explica por qué los costes de producción de astaxantina cuando se utilizan fuentes de luz LED son más bajos que con otras fuentes de luz artificiales (24).

Mourya, J, et al. 2023, estudiaron las células que irradiaron a diferentes tensiones lumínicas utilizando luces LED blancas (WL) como control y luces de amplio espectro (BL) como prueba durante un período de 32 días. Se observó que el inóculo ($70 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$ células) de células del alga *H. pluvialis* aumentó casi 30 y 40 veces en WL y BL, respectivamente, en el día 32 de manera coherente con su productividad de biomasa. El contenido de clorofila 'a' fue 2,6 veces mayor en BL ($3,46 \mu\text{g mL}^{-1}$) en comparación con el de WL ($1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$). El rendimiento del pigmento rojo 'Astaxantina' fue aproximadamente un 27% mayor en BL que en el WL (25).

Khadija, A, et al. 2023, investigaron cuatro experimentos de inanición repentina con diferentes concentraciones iniciales de biomasa. $Cx0$ de 0,21, 0,52, 1,39 y 2,21 kg m^{-3} , expuestos todos a una densidad de flujo de fotones incidentes (PFD) incidente de $250 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para evaluar la influencia del estrés lumínico, cuantificado por la tasa de absorción de luz representada por la tasa media de absorción de fotones (MRPA) en la tasa de producción de astaxantina para *H. pluvialis*. Los resultados demostraron la existencia de una relación directa entre el MRPA y la productividad diaria de astaxantina de los cultivos de *H. pluvialis*. También indicaron que la síntesis de astaxantina en el fotobiorreactor (FBR) estaba físicamente limitada por el MRPA. Se obtuvo una productividad máxima de astaxantina por área de $0,29 \pm 0,05 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, correspondiente a un MRPA igual a $7000 \pm 100 \mu\text{mol hv kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Además, se encontró una relación crítica inicial MRPA. También se requirió un exceso de $7000 \pm 500 \mu\text{mol hv kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para provocar una gran acumulación de astaxantina en las células de *H. pluvialis* durante la privación de nitrógeno hasta 3,21 % DW (26).

Casula M, F, et al. 2023, en este trabajo investigaron el uso potencial de CO_2 para mejorar la biosíntesis de los ésteres de ácidos grasos de hidroxiácidos grasos (FAHFA) por *H. pluvialis*. A través de una plataforma LC-QTOF-MS pudimos caracterizar diferentes familias de FAHFAs. Por otro lado, los niveles de estos compuestos se midieron con un sistema LC-MS/MS. Observamos que los niveles de estos compuestos se regulan positivamente fuertemente cuando *H. pluvialis* se cultivaba en una atmósfera de CO_2 con un aumento de los niveles de hasta 50 veces en comparación con las condiciones de crecimiento estándar. Dado que *H. pluvialis* no se consume directamente como fuente de alimento, su extracto cultivado en CO_2 , que es abundante en los ésteres de ácidos grasos de hidroxiácidos grasos (FAHFA) y astaxantina, se puede utilizar como un suplemento dietético por sus posibles ventajas para la salud y antioxidantes (27).

Do TT, et al. 2023, en este estudio observaron que al aumentar el tiempo de iluminación por día con un LED aumentó efectivamente la biomasa de algas y la cantidad de astaxantina obtenida, como se muestra en este estudio. Esto ayuda a

acortar el tiempo de cultivo y, por lo tanto, reduce el riesgo de contaminación de la biopelícula en los Fotobiorreactor en ángulo (TL-PSBR). La iluminación continua puede inducir estrés oxidativo e iniciar la acumulación de astaxantina, que se mejora aún más por la limitación de nutrientes en cultivos en suspensión. En el cultivo inmovilizado, el contenido total más alto de astaxantina también se obtuvo en el ciclo de luz/oscuridad de 22/2 h o en luz continua a pesar de la diferencia del sistema de cultivo en comparación con los cultivos en suspensión (28).

Jin, C., et al. 2024, quisieron evaluar el impacto de la luz roja y azul, y sus combinaciones, sobre el crecimiento de biomasa y la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. Tras 24 días de cultivo, se observó que la luz monocromática combinada, especialmente en la proporción tres partes de luz roja y cuatro de azul (3R4B), favoreció significativamente la acumulación de astaxantina, alcanzando un máximo de 15,28 mg/L, lo que representa un incremento de 2,2 veces en comparación con la luz blanca (W). Esta combinación también impulsó el peso seco de la biomasa, obteniendo un valor máximo de 1007,70 mg/L en la condición cinco partes de luz roja y dos de azul (5R2B), superando los valores observados en luz blanca y en otras combinaciones de luz monocromática. La mayor producción de clorofila a (Chl-a) se registró bajo luz blanca, mientras que en condiciones de luz monocromática (7R y 7B) y en combinaciones, los niveles fueron menores. Otro hallazgo importante es que la mayor proporción de luz azul en la condición 2R5B maximizó la producción de astaxantina, con un contenido de hasta 1,58 % de la biomasa, superando en 2,1 veces el rendimiento bajo luz blanca. Esta condición también optimizó la biomasa gracias a una mayor eficiencia en la transferencia de electrones en el sistema fotosintético y una mayor actividad en el PSI y PSII. A diferencia, la luz roja (7R) donde se vio un retraso en la maduración celular y una menor acumulación de astaxantina. La combinación de luz roja y azul mostró ser efectiva para maximizar la producción de biomasa y astaxantina (29).

Como conclusión, y en concordancia con los estudios recopilados, la astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis* se puede sintetizar de forma química o natural; se ha demostrado que al realizar la extracción de la astaxantina por el método químico, esta tiende a generar complicaciones para la salud, puesto que en su proceso de elaboración pueden quedar restos de químicos, necesarios para su fabricación, asimismo se deben tener en cuenta los elevados costos que este proceso conlleva; se han implementado una nueva estrategia y es la obtención de este pigmento de forma natural utilizando, una de las fuentes más ricas como lo es la microalga *H. pluvialis*. La cual, al brindarle las condiciones óptimas para su crecimiento y factores de estrés, para producir el enquistamiento y con este la producción y acumulación del carotenoide. Entre las condiciones más estudiadas encontramos la temperatura, pH, longitud e intensidad de luz, cantidad de nutrientes principalmente el nitrógeno, fósforo y acetato de sodio. Es importante resaltar la facultad que tiene esta microalga de acumular grandes cantidades de astaxantina bajo dos parámetros importantes de estrés como lo es mucha luz y la concentración de sales. Varios estudios sobre la producción del pigmento con la microalga presentan una estrategia de cultivo de dos etapas que juega un papel importante en

la síntesis de la astaxantina, una de ellas, conocida como etapa verde, la cual consiste en promover la biomasa verde en condiciones óptimas de crecimiento, la segunda denominada etapa roja, la microalga es expuesta a condiciones ambientales adversas, con el fin de inducir la acumulación de astaxantina.

El uso de iluminación LED azules (450 nm) y LED rojos (660 nm) brindan un aporte muy significativo en el crecimiento celular y asimismo en la producción y acumulación de astaxantina, en algunos de estos estudios mezclan las dos longitudes de onda para hacer una comparación e identificar, cuál método es más efectivo para la producción del pigmento. Se encontró que la luz led roja promueve el crecimiento e incrementa el número de células de la microalga, mejorando la división celular en la etapa vegetativa. Por otro lado, tenemos la luz led azul, que contribuye a la fase roja, generando el aumento en la producción de pigmentos, dado que proporciona condiciones de estrés necesarias para que la célula sintetice astaxantina, ocasionando cambios morfológicos, como el tamaño, y enquistamiento fomentando así el crecimiento y adquisición en gran capacidad de la acumulación de pigmento. La fuente lumínica utilizada es la luz LED considerada la más óptima y viable reemplazando las fuentes lumínicas tradicionales que consumen mucha energía emitiendo elevadas temperaturas lo que puede dañar y afectar la microalga, la luz LED por sus cualidades físicas son adecuadas en la implementación de fotobiorreactores para el cultivo y la producción de microalgas, su uso proporciona mejores condiciones para el crecimiento logrando proteger al cultivo de la contaminación permitiendo controlar de manera integral las condiciones propias del cultivo.

4. Marco teórico

Haematococcus pluvialis, es una microalga verde unicelular de agua dulce, perteneciente a Chlorophyceae que acumula un alto contenido de astaxantina en condiciones de estrés como alta salinidad, deficiencia de nutrientes como el nitrógeno, la intensidad de la luz, alta salinidad, temperatura, pH y la presencia de nutrientes orgánicos como acetato de sodio (7, 30, 31, 32). Es considerada como la fuente natural con mayor capacidad de producción de astaxantina entre varias fuentes naturales. Astaxantina está clasificado como un pigmento cetocarotenoide rojo y tiene una actividad antioxidante superior en comparación con otros carotenoides, además, muestra múltiples características beneficiosas, como su potencial neuroprotector e inmunológico (7). *H. pluvialis* es común en pequeños cuerpos de agua dulce y está ampliamente distribuido en muchos hábitats en todo el mundo como estanques de lluvia efímera, estanques artificiales, estanques naturales y artificiales y bebederos para pájaros. También se ha encontrado en diversas condiciones ambientales y climáticas: en agua salobre, en las rocas, a la orilla del mar. sobrevive en condiciones rápidas y extremas de luz, temperatura y concentración de sal que son perjudiciales para muchas otras microalgas, debido a su capacidad para enquistarse de manera rápida (33).

El ciclo de vida de *H. pluvialis* consta de cuatro tipos de morfologías celulares distinguibles: macrozooides (zoosporas), microzooides, palmella y hematocistos

(aplanosporas). Los estadios de macrozooides (zoosporas), microzooides y palmella generalmente se denominan “fase vegetativa verde”. Los hematocistos (aplanosporas) se denominan “fase enquistada acumulada de astaxantina roja inmóvil” (31, 33, 34). Este ciclo está influenciado por factores inductivos que causan la acumulación de astaxantina y factores no inductivos necesarios para mantener el crecimiento celular durante la fase verde, la síntesis de astaxantina en las células de la microalga se produce en la fase roja. Para entrar en esta fase deben darse condiciones ambientales desfavorables, como reducción de nitrógeno, alta intensidad lumínica, salinidad, cambio de pH o temperaturas extremas (35).

H. pluvialis es una célula oleaginosa unicelular, esférica, biflagelada de color verde con un diámetro de ~ 30 μm . Según su ciclo de vida, morfología y fisiología, *H. pluvialis* puede existir como células vegetativas verdes — capaces de nadar debido a sus dos flagelos, estrechamente relacionados con la etapa verde y la acumulación de biomasa —o como quistes rojos, que acumulan astaxantina en respuesta a condiciones ambientales estresantes. La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) pertenece al grupo de carotenoides que se encuentran naturalmente en organismos como microalgas, crustáceos, peces y algunas aves (35). Ver Figura 1.

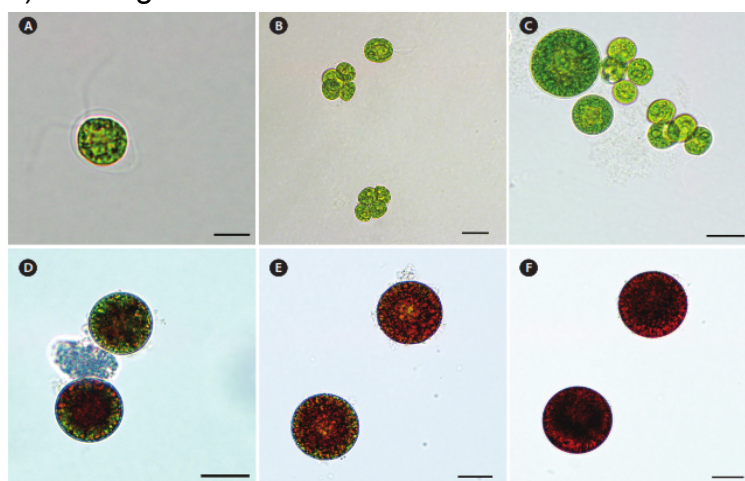


Figura 1. Cambio morfológico *Haematococcus pluvialis*

(A) Célula móvil con flagelos. (B) Tetrasporofito en período de rápida división. (C) Células no móviles en la última etapa de crecimiento verde. (D) Las células en etapa temprana en condiciones inducidas. (E) Las células en etapa intermedia en condiciones inducidas. (F) Aplanospora, células en etapa posterior en condiciones inducidas. Las barras de escala representan: A, 10 μm ; BF, 20 μm (36).

La recuperación de astaxantina de *H. pluvialis* consta principalmente de las siguientes etapas: (I) rotura celular, (II) tratamiento alcalino, (III) extracción con solvente, (IV) eliminación de solvente, (V) purificación, (VI) resuspensión en aceite y (VII) extracción alcalina en un solo paso. Debido a la gruesa pared celular, las microalgas requieren la alteración mecánica de las células antes de aplicar el disolvente. Los métodos mecánicos que consisten en triturar, comprimir o prensar a

alta presión son los más eficaces. Para obtener la mayor durabilidad, es necesario secar el pigmento o toda la biomasa (35).

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β' -caroteno-4,4'-diona) es un producto natural de algas que recientemente ha recibido un interés creciente debido a su aplicación en la nutrición humana y animal con grandes beneficios para la salud (37), así como su uso como pigmento preferido en alimentos para peces de piscifactoría y otros animales marinos, sirve como fuente de vitaminas, colorante, conservante natural y aditivo alimentario en la industria alimentaria, un antioxidante superior a la vitamina E y al β -caroteno en la industria cosmética, un reactivo antienviejecimiento como precursor de la vitamina A, un agente anticancerígeno mediante la extinción del oxígeno singlete y un inmunomodulador en la industria farmacéutica (38, 39, 40). Es utilizado como fuente de pigmento en los piensos para salmón, trucha y camarón. El consumo de astaxantina natural puede prevenir o reducir el riesgo de diversos trastornos en humanos y animales (30, 41). La astaxantina tiene un valor de mercado muy alto debido a sus aplicaciones en nutrición humana y animal. Con más de una docena de declaraciones de beneficios para la salud, la astaxantina se comercializa actualmente como complemento alimenticio, pero por el momento la aplicación principal de la astaxantina sigue siendo la alimentación para la acuicultura. La astaxantina se puede producir por síntesis química o por biosíntesis mediante cultivo de microalgas, levaduras, bacterias y plantas. se ha descubierto que la astaxantina biológica es superior a la astaxantina química en términos de efectos colorantes y actividades antioxidantes, y además de las diferencias estructurales y funcionales con la astaxantina natural, la astaxantina derivada químicamente también plantea preocupaciones en la salud humana y el medio ambiente (31, 42).

4.1 Factores que afectan el crecimiento

pH: Es un factor clave en el rendimiento y productividad de la microalga, puesto que puede afectar significativamente el crecimiento celular y la síntesis de clorofila y carotenoides. A un pH muy alto las células no logran absorber efectivamente los nutrientes esenciales del medio limitando el crecimiento celular y a un pH bajo las células en cultivo pueden morir. Las microalgas requieren un pH óptimo entre 7,00 a 9,00 para desarrollarse de manera óptima y contribuir a la biomasa y producción de astaxantina, por lo general el pH se mantiene ideal en los cultivos gracias a la presencia de CO_2 en el medio, por lo que a medida que va avanzando el tiempo en los cultivos este tiende a variar por la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes. (33, 43, 44, 45).

Temperatura: Se recomienda el uso de altas temperaturas que favorece y aumenta la tasa de acumulación de la astaxantina (14). Los cultivos de *Haematococcus* son bastante sensibles a los cambios de temperatura, la acumulación de astaxantina se puede generar en niveles máximos intracelulares de estrés oxidativo cuando se exponen temperaturas óptimas, siendo la temperatura máxima viable para dicha carotenogénesis de 30°C, y cualquier temperatura superior a 35-40°C inducirá la lisis celular en *H. pluvialis* (20). Es de suma

importancia, puesto que los cambios pueden alterar las rutas metabólicas influyendo en la biosíntesis de los carotenoides, alterando el equilibrio iónico del medio, el pH y la solubilidad del O₂ y del CO₂. Se demostró que el estrés por calor de 30 a 36 °C inhibe la fotosíntesis en *H. pluvialis*, en el que la astaxantina intracelular está inversamente relacionada con la actividad fotosintética celular (20, 45). Según la mayoría de los estudios, la temperatura adecuada para el crecimiento y acumulación de astaxantina de *H. pluvialis* tiene entre 20 y 28°C, Sin embargo, la temperatura por encima de 30°C induce una transición de la etapa vegetativa verde a la etapa roja y se puede observar la formación de quistes rojos en 2 días. Esta transición se combina con una desaceleración significativa del crecimiento, mientras que la acumulación de astaxantina es de 2 a 3 veces mayor que a los 20°C (33, 46, 47).

Luz: Es el factor más importante, puesto que la tasa de crecimiento depende de la intensidad de la luz, así mismo mejora la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. La alta intensidad de la luz conduce a una mayor expresión de la transcripción de carotenoide hidroxilasa (7), a su vez es esencial tanto para la carotenogénesis como para el ciclo de vida (especialmente el enquistamiento y la germinación) de la microalga (8). La luz es uno de los factores más influyentes en la etapa verde y en el proceso de enquistamiento de *H. pluvialis*, en condiciones de baja intensidad lumínica sintetizan pigmentos como la clorofila, y altas intensidades lumínicas produce la acumulación de carotenoides como la astaxantina (24, 46).

Luz led roja: Aumenta y promueve el crecimiento celular en *H. pluvialis* mejorando la división celular (7, 2). Incrementa la biomasa algal en los primeros días de cultivo (19).

Luz led azul: El uso de luz azul puede potencialmente aumentar el pigmento. Contenido en *H. pluvialis* (14). Causa condiciones de estrés en *H. pluvialis* dado que la producción de astaxantina es mayor en comparación con la luz led roja, además es uno de los diversos factores de inducción para la biosíntesis de astaxantina (2). Esta condición de luz promueve cambios morfológicos de células vegetativas verdes a células quísticas rojas, así como aumento en el tamaño (2, 33).

Irradiancia: La alta irradiancia bien distribuida favorece la síntesis de la astaxantina (14), también es eficiente para la germinación del hematocisto (8). La iluminación también es un factor importante para mejorar la productividad de la biomasa para *H. pluvialis* en cultivo mixotrófico. La energía de la radiación en el ciclo de vida de *H. pluvialis* Contribuye a la conversión de pigmentos de antena en energía química en forma de ATP y NADPH a través de una cadena de transporte de electrones fotosintética. Las microalgas almacenarán la energía química en almidón fijando CO₂ a través del ciclo de Calvin (20). La irradiación típica para *H. pluvialis* el cultivo oscila entre 40 y 50μfotones moles m⁻²s⁻¹. El aumento gradual de la intensidad de la luz puede resultar en una transformación gradual de las células en quistes y también puede contribuir a una mejor acumulación de astaxantina, porque las células son capaces de hacer frente a niveles cada vez mayores de estrés (33).

Fotoperíodo: La irradiación óptima para lograr altas tasas de crecimiento tiende a ser mayor, concretamente 70, 80, 90, o incluso hasta 177 μ ftones moles $m^{-2}s^{-1}$. Se suelen utilizar los ciclos regulares de alternancia de luz y oscuridad de 12:12 o 16:8 h, pero los cultivos de mayor densidad se logran con iluminación continua (33).

4.2 Nutrientes

Nitrógeno: La falta de nutrientes, y especialmente la limitación de nitratos, son esenciales para desencadenar, sostener y mejorar la síntesis masiva de astaxantina (14, 48). El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales que afecta el crecimiento celular y la actividad enzimática. Impulsa la producción de astaxantina. Las microalgas son bien conocidas por su absorción de nitrato, amoníaco y urea como fuentes de nitrógeno. La urea contiene un 46% de nitrógeno, otra fuente de nitrógeno inorgánico utilizada frecuentemente en la preparación de medios de acuicultura, es decir, el nitrato (sal de sodio o potasio) sólo proporciona el 16,5% de nitrógeno. La fuente de nitrógeno podría aumentar la acumulación de biomasa incluso en las diferentes condiciones tróficas de las microalgas (20). En la etapa roja, la condición óptima para inducir la producción de astaxantina es mediante el agotamiento de nitrógeno (20, 33). Se descubrió que el nitrato de sodio es la fuente de nitrógeno inorgánico más óptima. La limitación de nitrógeno produce aproximadamente el doble de producción de astaxantina que la limitación de fósforo (33, 48).

Fosfatos: produce la mayor densidad celular y la tasa de crecimiento aumenta hasta el 86%. Este resultado demuestra que el fosfato es el componente más influyente en la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* (20).

Acetato de sodio: Ayuda al crecimiento, mejora la densidad celular y contribuye a la acumulación de astaxantina bajo luz intensa (18). El uso de acetato de sodio como fuente de carbono orgánico es posible y eficaz para aumentar la tasa de crecimiento (20). Mejora su crecimiento y carotenogénesis, debido a que afecta la ruta de la fotosíntesis y aumenta la expresión del gen BKT, produciendo así mayor cantidad de astaxantina (49).

Salinidad: Tiene un complejo efecto de estrés sobre la productividad neta de lípidos de las microalgas. Las adiciones de NaCl se utilizan frecuentemente para inhibir el crecimiento celular y estimular la síntesis de astaxantina, en *H. pluvialis*. Se observó una reducción del crecimiento celular y un aumento del contenido de carotenoides por célula bajo estrés salino (20).

Los micronutrientes: El selenio y el cromo dan como resultado un aumento de la biomasa y la producción de astaxantina (33). La adición de $Fe\ 0,45\ mm^{2+}$ en forma de sulfato ferroso puede aumentar significativamente la biosíntesis de carotenoides en los quistes debido a la formación de radicales hidroxilo (33).

Medio BBM: Es uno de los medios más utilizados para el cultivo de *H. pluvialis* (33). Los ingredientes de BBM inicialmente incluyen iones de amonio, que son favorables para el crecimiento autótrofo de *H. pluvialis*. La formulación contiene nitrógeno inorgánico, fósforo y oligoelementos esenciales y se ajusta a la necesidad de un medio de cultivo de uso general (20). Estudios han demostrado que el medio

BBM es adecuado para el cultivo de microalgas verdes, comenzando con una biomasa inicial de 0,4 a 0,5 g L⁻¹ (20).

Medio KM (Kobayashi): Es uno de los medios más utilizados para el cultivo de *H. pluvialis*, empleado para el crecimiento vegetativo (33).

CO₂: Es la fuente de carbono más utilizada en los cultivos de las microalgas, la biodisponibilidad de carbono, en forma de CO₂ para una producción fotoautótrofa mejora la síntesis de astaxantina, las microalgas son resistentes a altas concentraciones de CO₂, mejora su productividad, tienen una facilidad para captar el CO₂, es un factor que afecta significativamente el crecimiento y el contenido de astaxantina (14, 24, 44, 46).

4.3 Factores de estrés

Luz led roja y azul: la luz led es el factor más importante que mejora el crecimiento, producción y acumulación del pigmento aumentando así la biosíntesis de la astaxantina, la led roja estimula el crecimiento, incrementa el número de células y mejora la división celular, esta presenta un papel fundamental en la fase verde de la microalga haciendo que las células se preparen para el estrés al cual van a hacer sometidas en la fase roja. En cambio, la luz azul actúa como un factor que le provoca condiciones de estrés a la microalga estimulando la producción y acumulación de astaxantina haciendo que se sintetice el pigmento, también causa un cambio morfológico celular, cambio de tamaño lo que facilita que el quiste que se forma en esta etapa se agrande y pueda acumular más cantidad de astaxantina (2, 7, 33). Se descubrió que el uso de luz mixta led roja y led azul es la fuente de luz más efectiva para el crecimiento, biomasa y acumulación de astaxantina, además, estas fuentes de energía son de bajo costo para el cultivo de microalgas (39). Los diodos emisores de luz (LED) tienen espectros de emisión de luz estrechos, alta eficiencia de conversión y baja emisión de calor (40).

Deficiencia de nutrientes: El agotamiento de nitrógeno, es óptimo en la fase roja el cual induce la producción de astaxantina, pero estudios demostraron que aunque la deficiencia de este es un factor crítico, debe actuar con otros factores como la intensidad de luz para obtener buenos resultados en cuanto a la producción del carotenoide (50, 51).

La falta de este nutriente genera un estado de estrés nutricional en las células de *H. pluvialis*, produciendo una disminución de la biomasa celular y llevándolas a enquistarse, para poderse adaptar y sobrevivir, esto, conlleva que se produzca, un cambio en su metabolismo, dando como resultado la producción de compuestos secundarios como la astaxantina (51).

Una de las consecuencias de la falta de nitrógeno es la reducción de la concentración de clorofila en las células, lo que modifica en gran medida la absorción de luz de los microorganismos, afectando así su capacidad para acumular astaxantina. Las células degradan su clorofila para sustentar la división celular y, por lo tanto, mantienen el crecimiento en condiciones de privación de nitrógeno (52).

Los resultados mostraron que la tasa de crecimiento porcentual de las células no móviles en condiciones de deficiencia de fósforo aumentó en un promedio de

aproximadamente 4,5% por día, que fue 6,7 veces mayor que en condiciones normales, lo que indica que La deficiencia de fósforo puede promover significativamente la formación de células inmóviles de *H. pluvialis* (53).

5. Astaxantina

5.1 Ruta metabólica de producción de astaxantina

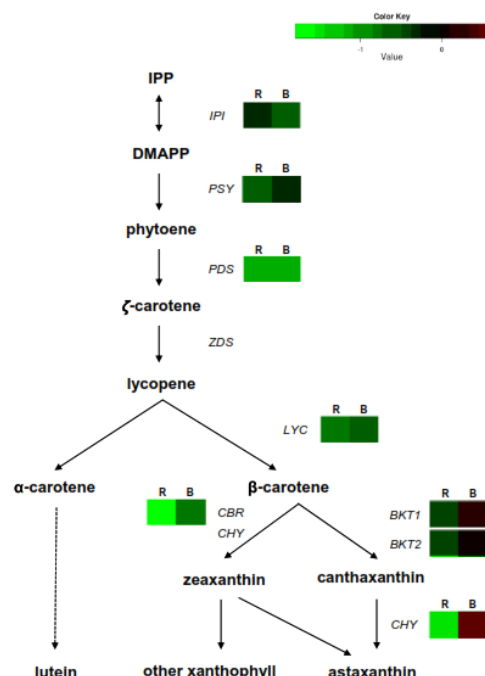


Figura 2. Ruta metabólica de astaxantina

Comparación de las expresiones génicas de biosíntesis de carotenoides de *H. pluvialis* en longitudes de onda blancas, azules y rojas.(7)

La síntesis de la astaxantina se da a partir de la expresión de aproximadamente 25 genes en los que la longitud de onda azul induce un alto valor logarítmico, entre ellos se puede encontrar fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), licopeno ciclasa (LCY), β-caroteno Ketolasa (BKT) y β-caroteno hidroxilasa (CHY), funcionan de manera eficiente al ser sometidos a condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes, temperatura, alta intensidad de luz y el uso de cloruro de sodio. Esta comienza con geranilgeranil pirofosfato (GGP), el cual se condensa y da lugar al fitoeno gracias a la acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY). Estas reacciones son reguladas a nivel transcripcional y traduccional. posteriormente se producen reacción de denaturación fuera de la membrana y se da lugar a la síntesis de enzimas como fitoeno desaturasa (PDS) (este es regulada por los niveles del mRNA) generando licopeno, posteriormente la enzima licopeno β-ciclasa cataliza la reacción que resulta en la formación de β-caroteno, transformado seguidamente a equinenona y cantaxantina por acción de la β-caroteno ketolasa (BKT) y finalmente por la β-caroteno hidroxilasa conduce a la producción de astaxantina (7, 45).

5.2 Usos y aplicaciones

La astaxantina, se usa en la acuicultura, para la pigmentación de peces, especialmente de mariscos, camarones y langostas, al ser de color rojo, le concede ese color a su carne, se les suministra por medio del alimento, ya que estos animales no tienen la capacidad de sintetizar este carotenoide por ellos mismos. También se usa en la industria avícola para la pigmentación de los huevos (50,54,55).

Estudios han demostrado que la astaxantina natural, es un potente antioxidante, lo que le concede cualidades para retardar el envejecimiento y las enfermedades regenerativas, ya que protege las membranas celulares contra el ataque de los radicales libres. Además de tener aplicaciones en diferentes industrias, como la farmacéutica y cosmética, aportando funciones como protector de la piel, previniendo el daño causado por los rayos UV, aumenta la actividad inmunológica y también es un muy buen antiinflamatorio (54,55, 56).

6. Hipótesis

El uso de las condiciones combinadas de estrés, deficiencia de nutrientes y luces led roja (650 nm) y luz led azul (450 nm) incrementa la producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* en los medios BBM y KM, bajo las irradiancias trabajadas.

7. Diseño metodológico

Tipo de Investigación mixta (cualitativa y cuantitativa) de alcance experimental que busca fundamentalmente establecer las condiciones para la producción de astaxantina empleando como condiciones de estrés y luz led roja (650 nm) irradiancia 1700 luxes y luz led azul (450 nm) con irradiancia de 8000 luxes y deficiencia de nutrientes

- Universo: Microalgas
- Población: Microalgas productoras de carotenoides.
- Muestra: Biomasa de *H. pluvialis* UTEX 2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA).

Variables dependientes

- Producción de astaxantina y clorofila, cambio morfológico
- Indicadores: ug/mL astaxantina, ug/ mL Clorofila
- Morfología: vegetativa, palmella, aplanospora

Variables independientes

Condiciones de estrés, deficiencia de nutrientes y luz led roja (660 nm) irradiancia 130.65 $\mu\text{molm}^2/\text{s}$ (1700 luxes) y luz led azul (470 nm) con irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (8000 luxes). Utilizando la microalga *H. pluvialis* y los medios KM y BBM.

Indicadores

Luz: iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), intensidad lumínica de 75 luxes por 15 días. Período de estrés, iluminación,

luz led roja 130.65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (660 nm) irradiancia y luz led azul (470 nm) con irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes) y deficiencia de nutrientes.

7.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga *H. pluvialis*

Microorganismo

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

Tabla 1. Componentes del medio volvox-mes.

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

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia (57).

Condiciones de cultivo

Preparación del Inóculo

En la preparación del inóculo se tomó una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX 2505 y se transfirió asépticamente a un Erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de medio Volvox-MES fresco y estéril, se mantuvo en agitación a 100 rpm, irradiancia 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, temperatura de 20 ± 2°C, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), aire filtrado, fotoperíodo de 18 horas luz y 6 horas de oscuridad por 15 días. Cada tres días se hizo conteo celular y revisión microscópica del cultivo. Para establecer la

cantidad de inóculo a utilizar se realizó un conteo celular y con esta información se hicieron los cálculos necesarios para saber el volumen a adicionar del inóculo a los reactores pequeños en sistema batch utilizando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$.

Sistema de cultivo

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

Medios

MEDIO KOBAYASHI

Tabla 2. Componentes del medio Kobayashi

MEDIO KOBAYASHI	
Componente	Cantidad
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g/L
Acetato de sodio	1,2 g/L
L-asparagina	0,4 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/L
pH	6,8

Fuente: Elaboración Propia con base en la referencia (et al.,1993).

MEDIO BBM (mg/L)

Tabla 3. Componentes del medio BBM

MEDIO BBM	
Componente	Cantidad
NaNO ₃	4,200 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	23.5 mg/L
KH ₂ PO ₄	1,800 mg/L
K ₂ HPO ₄	0.055 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.2 mg/L
NaCl	25.1 mg/L
EDTA	6.0 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 mg/L

H ₃ BO ₃	11.5 mg/L
--------------------------------	-----------

Fuente: Elaboración Propia con base en la referencia (58, 59, 60).

Condiciones de cultivo

Condiciones estándar:

- Cada medio estéril con el pH ajustado se adicionó en biorreactores de 500 mL hasta un volumen de 400 mL. Se sellaron para garantizar la esterilidad.
- Se adiciona el inoculó de la microalga (1×10^4 Cél./ml).
- Se realizo el montaje de cada medio por triplicado en forma aleatoria, bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, temperatura 20 °C, agitación continua, aire filtrado, iluminación continua con luz led roja (650 nm) irradiancia $130.65 \mu\text{molm}^2/\text{s}$ (1700 luxes) por 15 días.
- Toma de muestra cada siete días en forma aséptica.
- Conservación de las muestras en solución formalina (1:9), en una proporción 1:1, se toman 500 μl y se realiza control del cultivo (conteo celular y ver morfología) y el resto de muestra se utiliza para medición de pH. El conteo celular se realiza en cámara de Neubauer
- Se llevo control de Temperatura, agitación, iluminación, medios.

Condiciones de estrés

deficiencia de nutrientes, iluminación continua con luz led azul (450 nm) con irradiancia de $924.42 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (8000 luxes).

7.2 Fase 2. Cambio morfológico

Se evaluaron los cambios morfológicos usando la 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 (17).

7.3 Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.

Se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo, los cuales se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante (medio de cultivo); al paquete celular se le adiciono 1 mL de metanol al 90% y se calentó durante 10 min. a 60 °C en baño serológico y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Para la cuantificación de clorofila y astaxantina se realizó una curva de calibración (absorbancia en función de la concentración expresada en $\mu\text{g/mL}$) con patrones de referencia, la lectura espectrofotométrica se hizo en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila y 477 nm para astaxantina, con el fin de encontrar las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$. Cada tratamiento se realizó por triplicado. APHA, 2005 (61).

Determinación del pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro marca Hanna Instruments tomando 15 mL de muestra. El potenciómetro se calibró antes de la medición

insertando el electrodo en solución amortiguadora de 7.0 y posterior a lavado en solución de pH 4.0, al finalizar la calibración del potenciómetro, el electrodo se lavó con agua destilada y se procedió a la lectura de la muestra. (62)

Generación de las curvas de crecimiento

Se construyeron curvas de crecimiento a partir de al menos tres ensayos independientes. Se tomó una muestra cada siete días para la determinación del número de células por mL por microscopía. Las tendencias de crecimiento se modelaron utilizando al modelo logístico aplicando una transformación a los valores de Y mediante el cálculo de su logaritmo en base 10, esto permitió representar el crecimiento celular en un gráfico de logaritmo frente al tiempo. Se utilizará el Software Dmfit 2.0 para determinación de parámetros cinéticos, según modelo Baranyi- Roberts.

Diseño experimental y análisis de datos

Cada experimento se repitió tres veces con al menos tres replicaciones. Todas las observaciones y cálculos se hicieron separadamente para cada set de experimentos y se expresaron en promedio de 6SD. La significancia ($P < 0.05$) de las variables estudiadas se media por un análisis de varianza (ANOVA) y test de Duncan.

8. Resultados

8.1 Fase 1. Crecimiento de la microalga *H. pluvialis*

Se presenta el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* utilizando los medios de cultivo kobayashi (KM) y BBM en la figura 1, bajo las condiciones de uso de led roja (650 nm) con una irradiancia de 130.65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (1700 luxes) y factor de estrés uso de luz led azul (450 nm), con una irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes). Se observa en el medio KM, bajo iluminación de luz led roja, un pico máximo de crecimiento para la microalga de $1,6 \times 10^6$ células/ mL al día 22, evidenciando que las condiciones de luz led roja favorece más el crecimiento en un 62,5% en este medio que en el BBM, ya que solo se alcanzó un valor de $0,6 \times 10^6$ células/ mL al día 22.

En el medio BBM, bajo iluminación combinada led roja (650 nm) y led azul (450 nm), se alcanzó una concentración máxima de $2,88 \times 10^6$ células/ mL al día 65, lo que indica que las condiciones de uso de led roja y azul favorecen el crecimiento en el medio BBM. En consecuencia, el ANOVA (95%) (Anexo 7) realizado indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($F:2.051$; $P:0.174$; $gl:1$), lo que indica que se pueden utilizar los dos medios de cultivo bajo las condiciones de crecimiento y de estrés trabajadas para el crecimiento de la microalga, sin embargo el mejor medio para crecimiento es el BBM usando luz led azul (450 nm). Se observa que la luz led roja incrementa el crecimiento en los dos tratamientos, pero cuando se hace cambio a luz led azul se frena este crecimiento (Figura 3 y Figura 4).

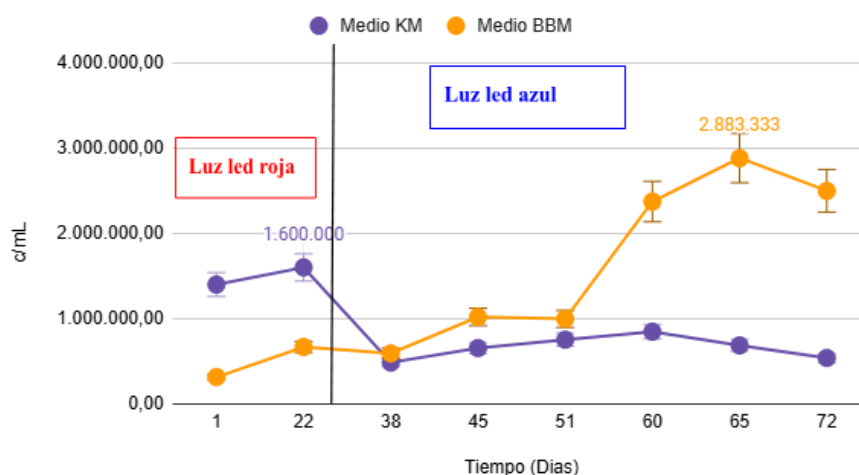


Figura 3. Curva de crecimiento de *H. pluvialis* en los medios KM y BBM

Crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en los medios KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y luz led azul (450 nm). ANOVA (95%) realizado no indica diferencias significativas entre los tratamientos ($F:2.051$; $P:0.174$; $gl:1$).

Fuente: Elaboración propia

8.2 Parámetros cinéticos del crecimiento de *H. pluvialis*.

El ajuste de las tendencias de crecimiento al modelo logístico, el medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue el medio BBM con 0,023/día ($R^2 = 0,87$) (Ver Tabla 4). En cuanto a biomasa, el medio KM presentó una menor velocidad de crecimiento de -0,012/día ($R^2 = 0,50$) (Ver Figura 4, tabla 4 y Anexo 11). Lo cual indica mejor adaptación de la microalga a los componentes del medio BBM, destacando los micronutrientes, oligoelementos y nitrógeno inorgánico presente en su composición, por el mayor contenido de nitrato de sodio. Este modelo explica el comportamiento de la microalga en el medio BBM bajo las condiciones de luz led roja (650 nm) y luz led azul (450 nm) ($R^2 \sim 1$).

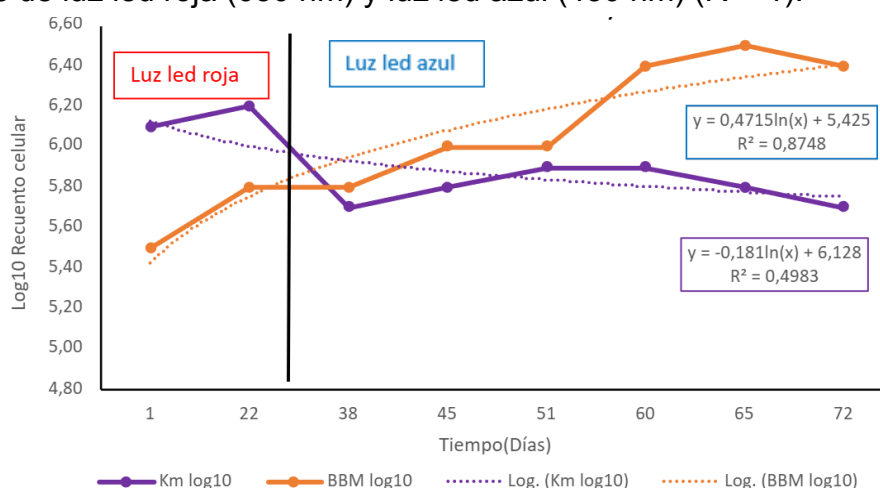


Figura 4. Curva de crecimiento en escala logarítmica de *H. pluvialis* en los medios de KM y BBM con luz LED roja (650 nm) y luz azul (450 nm).

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Nº Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento (día ⁻¹)	Coefficiente de determinación (R ²)
KM	9	5,7	6,2	-0,012	0,50
BBM	9	5,5	6,5	0,023	0,87

Fuente: Elaboración propia

Nota: Con luz led azul (450 nm) y alta irradiancia 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes).

Los resultados del Modelo Baranyi-Roberts, se presentan a continuación bajo las condiciones de estrés trabajadas, estableciéndose que el medio que favorece el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* es el medio BBM combinado con estrés de alta irradiancia 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes) y luz led azul, ya que representa la velocidad de crecimiento de 0,027 /día ($R^2 = 0,62$) (Ver Tabla 5), en el modelo Baranyi-Roberts y por lo tanto el mayor crecimiento de 2.8×10^6 células/mL (Ver figura 3). Este modelo no se ajustó bien a los datos del medio KM, ya que la tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) resultó en un valor negativo (-12.63), y el coeficiente R^2 es prácticamente cero, a los coeficientes de correlación obtenidos para los modelos aplicados logístico y Baranyi-Roberts (1994), el modelo que más se ajusta al crecimiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas es el modelo logístico ($R^2 = 0,87$), con un R^2 más cercano a 1, utilizando como medio de cultivo el BBM combinado con estrés de alta irradiancia 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes) y luz led azul.

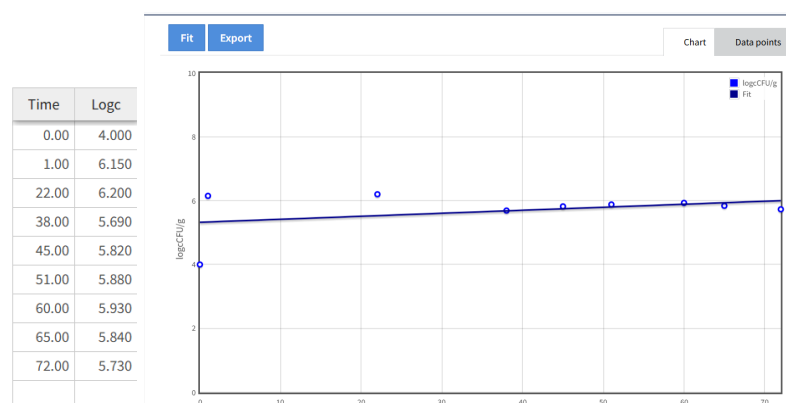


Figura 5. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio KM

Fuente: Elaboración propia en DMFit

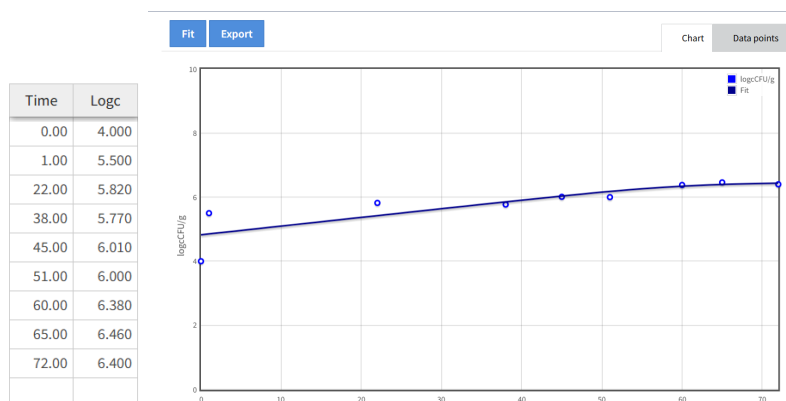


Figura 6. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio BBM

Fuente: Elaboración propia en DMFit

Tabla 5. Matriz de coeficientes del modelo Baranyi-Roberts ajustado para los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Nº Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento (día -1)	Coefficiente de determinación (R ²)
KM *	9	4	6,2	-12,63	0.02
BBM *	9	4	6,5	0.027	0.62

Fuente: Elaboración propia

Nota: Con luz led azul (450 nm) y alta irradiancia 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes).

Según los resultados observados se puede establecer que el modelo logístico es el que más se ajusta a las condiciones del crecimiento y de estrés establecidas en este trabajo para la microalga *H. pluvialis* cuando usa el medio BBM combinado con estrés luz led azul y alta irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes), presentando una velocidad de crecimiento de 0,0231 /día ($R^2=0,87$), valor más cercano a 1, lo que sugieren que este modelo explica matemáticamente el comportamiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas (Ver Tabla 4). Por lo observado en el tratamiento realizado en el medio KM con una velocidad de crecimiento negativa, observamos que el efecto de la luz led azul detiene el crecimiento de la microalga.

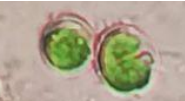
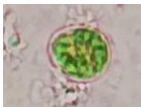
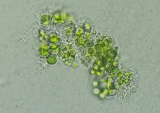
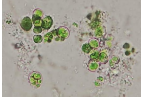
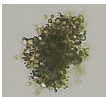
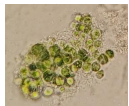
8.3 Cambio morfológico

Se observaron las cuatro fases de crecimiento de la microalga en los 72 días de cultivo, las primeras dos fases hacen parte del crecimiento vegetativo tales como células verde biflageladas y palmeloide bajo luz led roja a una irradiancia de 130.65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 650 nm (1700 luxes). El cambio a luz led azul (450 nm) irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes), se observa un aumento del tamaño de la microalga con una disminución del crecimiento llegando a él enquistamiento presentado un quiste inmaduro y quiste maduro (aplanospora). Los cambios morfológicos presentados en la tabla 6, muestran el paso por todas las fases del

ciclo celular de *H. pluvialis* hasta llegar a aplanospora, en los dos medios de cultivo bajo la condición de estrés de uso de luz led azul.



Tabla 6. Cambio morfológico de *H. pluvialis* medio BBM y KM. Tamaño 40x

Fecha	Día	BBM	KM
02-10-2023	1		
24-10-2023	22		
09-11-2023	38		
16-11-2023	45		
22-11-2023	51		
30-11-2023	60		
05-12-2023	65		
12-12-2023	72		

Fuente: Elaboración propia.

Las imágenes muestran el desarrollo de la microalga *H. pluvialis* en sus diferentes fases durante el tiempo del estudio. En la etapa inicial, se observan las células móviles(zoosporas) con un tamaño pequeño, con forma esférica y dos flagelos, características de la fase vegetativa verde. A medida que avanzaba el

tiempo, las células aumentaban en tamaño y se observaban en mayor cantidad (entre los días 1 al 60). Sin embargo, a partir del día 65 se evidencia la fase roja en ambos medios de cultivo, caracterizada por la formación de quistes o aplanosporas con una capa externa gruesa que le proporciona resistencia a las condiciones adversas. En esta fase se acumula la astaxantina, el carotenoide rojo que le da el color característico de esta fase.

8.4 Producción de astaxantina y clorofila

Al observar la producción de clorofila (Figura 7), para los dos medios KM y BBM se correlaciona con el crecimiento celular (Figura 3), ya que en el medio KM, el pico máximo fue de 0,40 µg/mL bajo luz led roja (irradiancia 130.65 µmol/m² /s, 650 nm) en el día 22 y para el medio BBM se presentó la mayor producción el día 60 del cultivo con un valor de 0,4681 µg/mL bajo el uso de luz led azul y alta irradiancia 924.42 µmol/m² /s (8000 luxes), como factor de estrés.

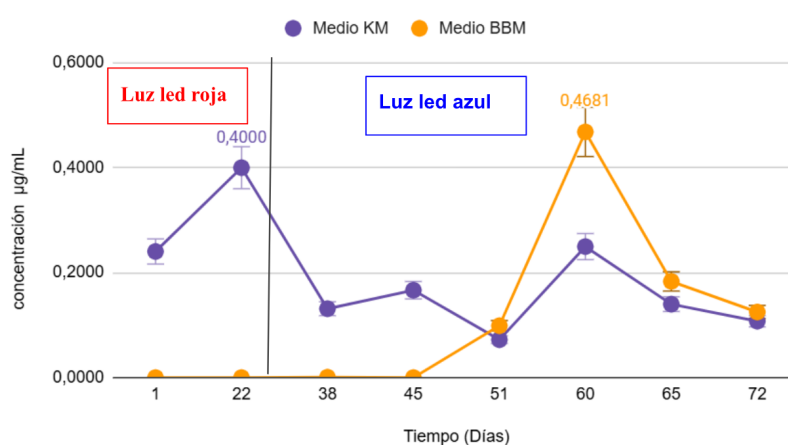


Figura 7. Curva de producción de clorofila

Producción de clorofila en la microalga *H. pluvialis* en los medios KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y Luz led azul (450 nm) ANOVA (95%) realizado no reporta diferencias significativas entre los tratamientos (**F**:1.343; **P**:0.266; **gl**:1).

Fuente: Elaboración propia.

El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos con respecto a la concentración de clorofila de la microalga *H. pluvialis* (**F**:1.343; **P**:0.266; **gl**:1) (Ver Anexo 8).

Con respecto a la producción de astaxantina, se observa en la figura 8 la mayor acumulación en el medio KM bajo luz led roja (irradiancia 130.65 µmol/m² /s, 650 nm), con una concentración máxima de 20,29 µg/mL, para el día 22 con una productividad de 1,27x10⁻⁵ µg/Cel. En el medio BBM, la producción de astaxantina alcanzó 16,28 µg/mL bajo la iluminación led azul (450 nm) con una irradiancia de 924.42 µmol/m² /s (8000 luxes) para el día 60 con una productividad de 5,81 x 10⁻⁶ µg/Cel. (Anexo 5)

El ANOVA (95%) realizado indica que si hay diferencias significativas entre tratamientos para la concentración de astaxantina de la microalga *H. pluvialis* (**F**:9.060; **P**:0.009; **gl**:1), en consecuencia el medio que obtuvo una mejor

producción de astaxantina bajo las condiciones trabajadas fue el medio KM ($t=3,01$; $P=0.005$; t critico=1.77)(Ver Anexo 9).

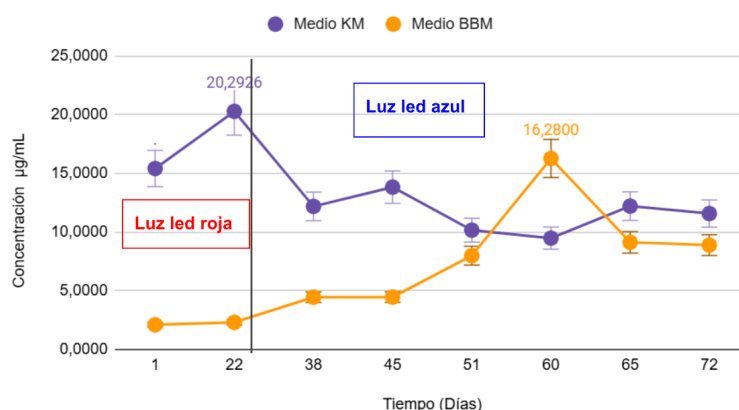


Figura 8. Curva de producción de astaxantina.

Producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* en los medios KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y luz led azul (450 nm). ANOVA (95%) realizado si reporta diferencias significativas entre los tratamientos ($F:9.060$; $P:0.009$; $gl:1$), siendo el mejor medio KM ($t=3,01$; $P=0.005$; t critico=1.77).

Fuente: Elaboración propia.

8.5 Relación entre crecimiento y producción de pigmentos

Con los resultados obtenidos, sugiere que el medio BBM es más eficiente en la acumulación de biomasa y clorofila, mientras que en medio KM favorece la síntesis de astaxantina, ($t=3,01$; $P=0.005$)(Ver Anexo 9), especialmente bajo condiciones de estrés usando led azul (450 nm) con una irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con una productividad de $1,27 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{Cel}$ y para el medio BBM se presentó una productividad de astaxantina de $5,81 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{Cel}$.

8.6 pH

Se realizó la medición del pH durante el cultivo de la microalga en los medios KM y BBM, usando luz led roja (650 nm) y luz led azul (440 nm), como factor de estrés.

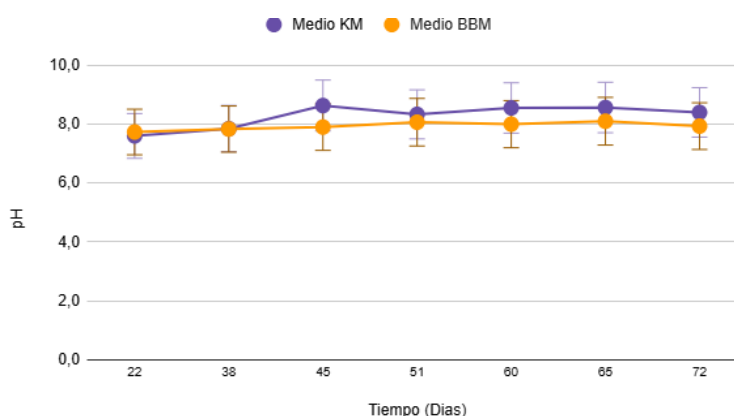


Figura 9. Curva de medición de pH

Medición de pH durante el cultivo de la microalga *H. pluvialis* en los medios KM y BBM usando luz led roja (650 nm) y luz led azul (440 nm). ANOVA (95%) realizado si reporta

diferencias significativas entre los tratamientos (**F**:7.850; **P**:0.014; **gl**:1), medio KM ($t=2,80$; $P=0.010$; $t_{\text{critico}}=1.83$).

Se observa en la figura 7 en el medio KM un pH inicial de 7,6 al día 22 bajo luz led roja, (irradiancia $130.65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 650 nm) seguido de luz led azul irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con un máximo de 8,6 al día 65. En el Medio BBM: se registraron valores entre 7,7 y 8,1 manteniendo relativamente estable hasta el final del cultivo. Estos cambios en el pH. También se obtuvo un descenso inicial del pH, iniciando en 7,9 a 7,7 al día 22 bajo luz led roja ($130.65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 650 nm), mientras que con la luz azul se tuvo un pH máximo de 8,1 (Anexo 6). En general, el pH para los dos medios de cultivo bajo las condiciones trabajadas se encontró entre 7,6 y 8,7, valores que se encuentran dentro de lo recomendado para el cultivo de esta microalga, pH 5,0 a 9,0. (43, 44, 45)

El ANOVA (95%) realizado para el pH estableció que si hay diferencias significativas entre tratamientos para los valores de pH de los cultivos realizados para la microalga *H. pluvialis* (**F**:7.850; **P**:0.014; **gl**:1), indicando que el pH obtenido para el cultivo de la microalga bajo las condiciones trabajadas en el KM es significativamente diferente ($t=2,80$; $P=0.010$; $t_{\text{critico}}=1.83$) (Ver Anexo 10).

A continuación se presenta una tabla resumen de los tratamientos realizados:

Tabla 7. Tabla resumen de los parámetros analizados y los tratamientos realizados.

Parámetro	Medio KM *	Medio BBM *
Crecimiento celular (cél/mL)	Max: $1,6 \times 10^6$ células/mL	Max: $2,8 \times 10^6$ células /mL
Velocidad de crecimiento ($\mu\text{máx}$) Modelo Logístico y coeficiente de correlación	velocidad de crecimiento: -0,012/día $R^2: 0,50$	velocidad de crecimiento: 0,023/día $R^2: 0,87$
Velocidad de crecimiento ($\mu\text{max.}$) Modelo Baranyi-Roberts y coeficiente de correlación	velocidad de crecimiento: -12,63/día $R^2: 0,022$	velocidad de crecimiento: 0,027 $R^2: 0,62$
Rango pH	7,6 - 8,7	7,7 - 8,1
Clorofila ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	max: 0,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	max: 0,46 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Astaxantina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	max: 20,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$	max: 16,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Productividad de astaxantina	$1,27 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{Cel}$	$5,81 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{Cel}$

Fuente: Elaboración propia.

Nota: luz led azul (450 nm) con alta irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes).

En este estudio se demostró que el medio KM y el uso de las condiciones de estrés con luces LEDS mixtos Rojo-Azul fueron las mejores condiciones para la obtención del pigmento astaxantina con 20,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 22.

9. Discusión

El uso de luces LED para la producción de astaxantina, brinda mejores alternativas tanto económicas como de calidad y cantidad, puesto que al utilizar luz LED roja y azul brinda superiores condiciones de estrés que favorecen el crecimiento, la división celular, la acumulación y la producción de astaxantina aumentando la biosíntesis del pigmento, así mismo el cambio morfológico, el cambio de tamaño celular lo que facilita que el quiste que se forma en la etapa roja se agrande y pueda acumular grandes cantidades de astaxantina. La obtención del pigmento de forma natural evita las complicaciones en la salud humana y el medio ambiente, al ser utilizada en las grandes industrias como la alimentaria, cosmética, farmacéutica es una gran alternativa que asegura que el producto ofrecido es confiable y seguro (42).

En este estudio se utilizaron luz led roja (650 nm) y led azul (450 nm) en medio KM y BBM los cuales brindan las condiciones, factores y nutrientes necesarios para su desarrollo y acumulación. La luz LED tiene muchas ventajas sobre las fuentes de luz convencionales, como su tamaño compacto, su fácil manipulación de longitudes de onda específicas, bajo consumo de energía, son adecuadas para el cultivo en fotobiorreactores, su gran aporte en la fase verde y roja de la microalga favoreciendo el crecimiento celular y acumulación del pigmento en *H. pluvialis* la fuente natural más rica (7).

El cultivo de *H. pluvialis* en medio BBM y KM se inició con la iluminación LED roja (650 nm) evidenciándose un crecimiento celular exponencial desde el día 0 hasta el día 25 en los dos medios lo que demuestra el gran aporte que tiene la luz roja en la fase verde, la cual, consiste en producir biomasa verde en condiciones óptimas de crecimiento, al hacer el cambio a luz led azul (450 nm) se demuestra un descenso en el crecimiento celular en ambos medios, significativo en el medio KM. Los resultados permiten analizar que la luz led roja (650 nm) es un factor favorable para el crecimiento de la biomasa de *H. pluvialis*, como se observa en la figura 3. En ambos medios de cultivo analizados, se evidenció un buen crecimiento bajo la iluminación roja, mientras que al hacer el cambio a la luz azul se produjo un descenso en la biomasa. Este comportamiento coincide con los hallazgos de Xi et al. (2016), quienes indicaron que la luz roja promueve la división celular y, por ende, el aumento de la densidad celular(2). Además, Pereira y Otero (2020) también reportaron que la luz azul, aunque puede inducir a la acumulación de astaxantina, no favorece el crecimiento celular, lo que sugiere que la transición a la luz azul puede generar condiciones de estrés que afectan negativamente la proliferación de las células.(14)

Por otro lado, los resultados indicaron que el medio BBM presentó un mayor crecimiento celular bajo la combinación mixta de luz LED roja y azul en comparación con KM (figura 3). Esto puede deberse a la composición del medio BBM, que contiene mayores concentraciones de nutrientes esenciales para el crecimiento de la microalga como mayor contenido de nitrógeno inorgánico, como los nitratos, este componente lo absorbe la microalga impulsando el crecimiento celular y la actividad enzimática, mientras que el medio KM presenta menor concentración de nutrientes

como la falta de nitrato limitando el crecimiento, se han reportado resultados similares en estudios previos (62, 63, 64, 65, 66). En un estudio realizado por de Zhang et al., 2018 se demostró que la deficiencia de nitrógeno inhibe el crecimiento celular, presentando una reducción de entre el 26% y el 37 % en cultivos que no fueron privados de este nutriente (10). Así mismo, el fosfato, al producir la mayor densidad celular, la tasa de crecimiento aumenta hasta un 86% demostrando que este factor es el componente más influyente en la acumulación de astaxantina (20, 67). Además, la relación entre nitrógeno y fósforo es crucial para la división celular, esta relación en otros estudios se ha asociado con un crecimiento óptimo (68, 69). Igualmente, otros factores que influyen conjuntamente, como la intensidad de la luz y el ambiente de CO_2 que se le brinde al medio.

Teniendo en cuenta lo anterior, la microalga se empieza a enquistar, por la condición de estrés del ambiente, lo que reduce la división celular e induce a la acumulación de pigmentos. Los resultados muestran que una mezcla de leds rojos y azules en el medio BBM fue más efectiva para promover el crecimiento celular de esta microalga, con un valor de $2,88 \times 10^6$ células/ mL al día 65 (figura 8). Este crecimiento se debe tanto a las condiciones de luz como a la adecuada disponibilidad de nutrientes en el medio. Estos hallazgos se correlacionan con investigaciones realizadas como la de Tran HL et al. (2015), donde usaron iluminación con LEDs rojo-azul, un sistema de luz mixto, obteniendo una gran mejoría en la biomasa de 3,28 g/L (39), reflejándose que este tipo de iluminación es la fuente de luz más efectiva para el crecimiento celular de la microalga.

El crecimiento celular es sustentado matemáticamente por el modelo logístico, que se ajusta de manera efectiva a las condiciones de crecimiento y estrés establecidas en este estudio. En particular, se ha determinado que *H. pluvialis*, cultivada en medio BBM bajo estrés de luz LED azul y una alta irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (equivalente a 8000 luxes), presenta una velocidad de crecimiento de $0,0231$ /día, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,874. Este valor, cercano a 1, sugiere que el modelo logístico describe adecuadamente el comportamiento de la microalga bajo las condiciones experimentales analizadas, proporcionando una base sólida para entender su dinámica de crecimiento en respuesta a factores ambientales.(70, 71). Mientras que en el tratamiento realizado en el medio KM presenta una disminución en el crecimiento como se observa en los valores negativos obtenidos de las velocidades de crecimiento por efecto de la luz led azul.

En la morfología de la microalga, estuvieron presentes las cuatro fases de crecimiento de la microalga en los 72 días de cultivo (tablas 6), las primeras dos fases hacen parte del crecimiento vegetativo tales como células verde biflageladas y palmeloide bajo luz led roja a una irradiancia de $130.65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 650 nm (1700 luxes). El cambio a luz led azul (450 nm) irradiancia de $924.42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (8000 luxes), se observa un aumento del tamaño de la microalga con una disminución del crecimiento llegando a él enquistamiento presentado un quiste inmaduro y quiste maduro (aplanospora). Este cambio morfológico se puede vincular con la expresión de los genes *bkt* y *chy*, que forman parte de la sección posterior de la vía biosintética de la astaxantina, ya que estudios demostraron que estos genes fueron

significativamente regulados al alza por la irradiación led azul en comparación con su expresión bajo irradiación blanca bajo control (1, 7, 8), relacionándolo con el cambio morfológico y la producción de astaxantina, como se puede observar en la tabla 6 a partir del día 65 se empieza a reflejar la morfología enquistada roja de la microalga, al tener la exposición a condiciones de estrés los genes se regulan positivamente, inducen a la acumulación de la astaxantina en el quiste donde se puede evidenciar el color característico rojo (1, 7, 8, 72).

La producción de astaxantina, fue significativamente mayor en el medio KM ($t=3,01$; $P=0.005$) bajo luz Led roja (650 nm), alcanzando una concentración máxima de 20,29 $\mu\text{g/mL}$ para el día 22. En contraste, en el medio BBM, la producción del carotenoide fue de 16,28 $\mu\text{g/mL}$ bajo iluminación combinada led roja (650 nm) a una irradiancia de 130.65 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, (1700 luxes). El cambio a luz led azul (450 nm) irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (8000 luxes) para el día 60, lo que refleja el gran aporte de las condiciones de estrés bajo luces led roja-azul dando como producto una buena cantidad de astaxantina. Estos hallazgos son consistentes con los reportes de Gao et al. (2014), quienes también observaron que la iluminación con LED azul (450 nm) y rojo (650 nm) influye en la biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*, sugiriendo que la luz roja favorece el crecimiento celular, mientras que la luz azul induce la acumulación del pigmento (1). En nuestro estudio, el medio KM, que presenta una limitación de nutrientes, genera un estrés que promueve la producción de astaxantina de manera más rápida, como se ha documentado en investigaciones previas que destacan la importancia del estrés nutricional en la inducción de la biosíntesis de carotenoides (2, 73). Por otro lado, el medio BBM, que proporciona un entorno más favorable para el crecimiento celular, no induce el mismo nivel de estrés, lo que traduce en una menor acumulación de astaxantina en comparación con el medio KM. Estos hallazgos se alinean con los de Lee et al. (2018), quienes concluyeron que la manipulación de las condiciones de luz y nutrientes es crucial para maximizar la producción de astaxantina en la microalga. Esto también es consistente con otras investigaciones (74, 75, 76, 77).

Otro punto a considerar, con respecto a que pudo afectar la producción de astaxantina en el medio BBM, es la cantidad de biomasa del medio. En los resultados podemos observar que la mayor producción de astaxantina para este medio se dio el día 60; sin embargo, para el día 65 (figura 8), se registró un descenso en la producción del pigmento, lo cual puede atribuirse a un aumento significativo en la biomasa (figura 3). Este fenómeno se alinea con los hallazgos de Samhat et al.(2023), quienes indican que una alta concentración de células en cultivos de *H. pluvialis* puede generar condiciones de atenuación de luz que limitan la eficiencia fotosintética y, por ende, la acumulación de astaxantina. En su investigación, establece que un mínimo de 7000 $\mu\text{mol hv kg}^{-1} \text{s}^{-1}$ de tasa media de absorción de fotones (MRPA) es necesario para que se desencadene esta producción del carotenoide, lo anterior sugiere que la optimización de la densidad celular es crucial para maximizar la producción de este. (26). El estudio de Wang et al. (2013) destacó que la densidad inicial de biomasa (IBD) es factor determinante en la producción del carotenoide, señalando que una IBD óptima de 0.8 g/L resultó

en la mayor productividad de astaxantina ($17.1 \text{ mgmg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$), y llegando a la misma conclusión de que un IBD muy alto puede limitar la luz disponible para las células, y así reduciendo la producción del pigmento(78). Otros estudios también respaldan estos hallazgos (51, 79). Por lo tanto, el tener un balance adecuado en cuanto a la biomasa, también es crucial para la producción del pigmento.

En esta investigación se utilizó el análisis estadístico ANOVA el cual permite diferenciar si hay diferencias significativas entre los medios KM y BBM con las condiciones de estrés luminosas trabajadas led roja (650 nm) y luz led azul (450 nm), donde se evidencio que el crecimiento celular y la producción de clorofila no presentaron diferencias significativas, esto nos indica que el uso de cualquiera de los dos medios de cultivo son muy efectivos para la producción de biomasa y la producción de clorofila, por el contrario, se presentó una diferencia significativa en el pH y producción de astaxantina evidenciándose que el mejor medio es el KM que aumentó su producción en un 20%. Los niveles de pH son fundamentales en la biomasa de la microalga, puesto que al no mantener un pH ideal puede conllevar la inhibición del crecimiento celular, como se observa en el periodo en el que se cultivó la microalga el pH varió en los dos medios, en el medio BBM de 7,5 a 8 y en el medio KM de 7.5 a 8.7, cercano a la neutralidad, siendo más significativa la diferencia en este último ($t= 2,80$; $P= 0.010$), manteniéndose dentro del rango normal, esta variación es dada por la acumulación de minerales y la oxidación de compuestos y por el proceso fotosintético de la microalga el pH tiende a aumentar (43, 44, 45), Es por esto que es indispensable en el cultivo para de esta manera poder obtener buenos resultados como se lograron en la presente investigación. Se obtuvo una excelente producción de astaxantina de $20,29 \mu\text{g/mL}$ en el día 22 lo cual como se ha mencionado anteriormente esto puede ser debido al crecimiento que favoreció la entrada de luz a todas las células y a la composición del medio, la temperatura, el pH, la deficiencia de nutrientes y las condiciones de estrés trabajadas lo que nos ayuda de deducir y dar soporte a los resultados obtenidos bajo las condiciones trabajadas.

10. Conclusiones

El presente estudio ha demostrado que el uso de luces LED, específicamente en longitudes de onda roja (650 nm) y azul (450 nm), representa una estrategia efectiva para optimizar la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis*. Los resultados obtenidos evidencian que la iluminación LED roja favorece el crecimiento celular, mejora la división celular y la acumulación de biomasa, presentando un papel fundamental en la fase verde de la microalga, permitiendo que las células se preparen para el estrés que van a recibir en la fase roja, mientras que la luz azul, aunque induce condiciones de estrés que promueven la biosíntesis, producción y acumulación de astaxantina, no favorece el crecimiento celular en las condiciones experimentales analizadas, sino que frena el crecimiento.

Se observa que el medio BBM, con una composición nutricional más rica, permitió un crecimiento celular mayor en un 62,5% la combinación de luces LED roja y azul, alcanzando una densidad celular máxima de $2,88 \times 10^6$ células/mL. Sin embargo, el medio KM demostró ser más efectivo para la producción de

astaxantina, alcanzando concentraciones de 20,29 $\mu\text{g/mL}$ en el día 22, lo que sugiere que las condiciones de estrés nutricional pueden ser un factor clave en la inducción de la biosíntesis del carotenoide y el uso mixto de luces led roja (650 nm) y led azul (450 nm), bajo las irradiancias trabajadas 130.65 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, (1700 luxes) y una irradiancia de 924.42 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (8000 luxes), respectivamente. Son las fuentes de luz más efectivas que proporcionan mejores resultados que favorecen en gran medida el crecimiento de la microalga y la acumulación de astaxantina.

En conclusión, la manipulación de las condiciones de luz y nutrientes optimiza la producción de astaxantina. Hallazgos que abren nuevas oportunidades para la investigación y el desarrollo de métodos más eficientes en la producción del pigmento, contribuyendo a una mejor sostenibilidad de su obtención usando luces led que son más económicas, no consumen tanta energía y se adaptan fácilmente a los biorreactores, al ofrecer una alternativa natural, de buena calidad y segura para su uso en diversas industrias.

11. Recomendaciones

- Continuar con el método de iluminación leds rojo-azul mixta en el medio KM dado que esta ha sido una buena estrategia, por lo que fue donde se obtuvo la mayor cantidad de astaxantina con la microalga *H. pluvialis* en los trabajos realizados en la universidad colegio mayor de Cundinamarca.
- Implementar el uso de la mezcla al tiempo de LED rojo y LED azul con el uso de biorreactores, ya que esta podría brindar mejores condiciones para acumulación de la astaxantina,
- Estudiar la expresión y activación de los genes de astaxantina bajo las condiciones trabajadas.

12. Participación en eventos



Bibliografía

1. Gao Z, Meng C, Li Y, Liu L, Deng S, Shen Y, et al. Impact of blue light from LED on astaxanthin accumulation and transcription of key carotenogenetics in *Haematococcus pluvialis*. 2014 October; 8(5).
2. Xi T, Geun Kim D, Woon Roh , Choi JS, Choi YE. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Microbiología Aplicada y Biotecnología*. 2016 Febrero; 100(6231–6238).doi:10.1007/s00253-016-7301-6
3. Sun, H. et al. Cultivo repetido: extracción de astaxantina sin disrupción celular para *Haematococcus pluvialis* . *Sci. Rep.* 6 , 20578; doi: 10.1038/srep20578 (2016).
4. Zhang Z, Wang B, Hu Q, Sommerfeld M, Li Y, Han D. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016 Mar 28;113(10):2088–99.
5. Sun H, Liu B, Lu X, Cheng KW, Chen F. Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*. 2017 Jun 1;233:326–31.doi:10.1016/j.biortech.2017.03.011
6. Pham KT, Nguyen TC, Luong TH, Dang PH, Vu DC, Do TN, et al. Influence of inoculum size, CO2 concentration and LEDs on the growth of green microalgae *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*. 2018 Dec 30;60(4):59–65.
7. Lee , Ahn , Kim J, Young Kim , Choi Y. Comparative transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* on astaxanthin biosynthesis in response to irradiation with red or blue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018 Junio; 34(96).DOI: 10.1007/s11274-018-2459-y
8. Ma R, Thomas-Hall SR, Chua ET, Eltanahy E, Netzel ME, Netzel G, et al. Blue light enhances astaxanthin biosynthesis metabolism and extraction efficiency in *Haematococcus pluvialis* by inducing haematocyst germination. *Algal Research*. 2018 Nov;35:215–22.<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.023>
9. Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S. et al. Dinámica de carotenoides y gotas lipídicas que contienen astaxantina en respuesta a la luz en el alga verde *Haematococcus pluvialis* . *Sci Rep* 8 , 5617 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23854-w>
10. Zhang W, Zhou X, Zhang Y, Cheng P, Ma R, Cheng W, et al. Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018 Dec 28;28(12):2019–28.
11. Christian D, Zhang J, Sawdon AJ, Peng CA. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresour Technol.* 548-551. (2018) doi:10.1016/j.biortech.2018.02.074
12. Mazumdar N, Novis , Visnovsky G, Gostomski P. effect of culturing parameters on the vegetative growth of *haematococcus alpinus* (strain lcr-cc-261f) and modeling of its growth kinetics. *Phycological Society of America*. 2019 agosto; 55(1071-1081).
13. Pang N, Fu X, Martinez JS, Chen S. Multilevel heuristic LED regime for stimulating lipid and bioproducts biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*. 2019;288(121525). <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121525>
14. Pereira S, Otero A. *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic. *Algal Research*. 2020 July; 51(102027) p. 2-5.
15. Liyanaarachchi VC, Nishshanka GKSH, Premaratne RGMM, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Malik A. Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnol Rep (Amst)*. 28:e00538. 2020. doi:10.1016/j.btre.2020.e00538.

16. Li K, Ye Q, Li Q, Xia R, Guo W, Cheng J. Effects of the spatial and spectral distribution of red and blue light on *Haematococcus pluvialis* growth. *Algal Res* . 2020;51(102045):102045. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.102045>
17. DO, Thanh-Tri, et al. 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*, 2021, vol. 63, no 2, p. 81-88.
18. Wang , Wang , Ning , Luo Q, Yang , Huang , et al. Transcription Factors From *Haematococcus pluvialis* Involved in the Regulation of Astaxanthin Biosynthesis Under High Light-Sodium Acetate Stress. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021 Octubre ; 9(2021).
19. Do TT, Tran-Thi BH, Ong BN, Le TL, Nguyen TC, Quan QD, et al. Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. *Life Sciences | Biotechnology*. 2021 Marzo; 2020(3,5).
20. Hazwani , Shoparwe , Yusoff , Rahim , Chang S, Tan , et al. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *biomoléculas*. 2021 febrero; 11(256).
21. Wei Z, Sun F, Meng C, Xing W, Zhu X, Wang C, et al. Transcriptome Analysis of the Accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* Treated with White and Blue Lights as well as Salicylic Acid. *BioMed Research International*. 2022;(4827595.).<http://dx.doi.org/10.1155/2022/4827595>
22. Santos, B., da Conceição, D.P., Corrêa, D.O. *et al.* Changes in gene expression and biochemical composition of *Haematococcus pluvialis* grown under different light colors. *J Appl Phycol* 34, 729–743 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02696-0>
23. Cheirsilp B, Wantip K, Chai-issarapap N, Maneechote W, Pekkoh J, Duangjan K, et al. Enhanced production of astaxanthin and co-bioproducts from microalga *Haematococcus* sp. integrated with valorization of industrial wastewater under two-stage LED light illumination strategy. *Environmental Technology & Innovation*. 2022 november; 28(102620).
24. Do TT, Quach-Van TE, Nguyen TC, Loke Show P, Nguyen TML, Huynh DH, et al. Effect of LED Illumination Cycle and Carbon Sources on Biofilms of *Haematococcus pluvialis* in Pilot-Scale Angled. *bioengineering*. 2023 Mayo; 10(596).
25. Mourya , J. Khan M., Sirotiya , Ahirwar , Schoefs , Marchand , et al. Mejora del crecimiento bioquímico de *Haematococcus pluvialis* mediante la mitigación del estrés lumínico de amplio espectro en cultivos de aguas residuales. *Avances de RSC*. 2023 febrero; 1(26).
26. Khadija Samhat, Kazbar A, Hosni Takache, Ismail A, Pruvost J. Influence of light absorption rate on the astaxanthin production by the microalga *Haematococcus pluvialis* during nitrogen starvation. *Bioresources and Bioprocessing*. 2023 Nov 9;10(1). DOI:10.1186/s40643-023-00700-0
27. Casula M, Fais G, Manis C, Scano P, Alessandro Concas, Cao G, et al. The production of FAHFA is enhanced when *Haematococcus pluvialis* is grown in CO₂. *Food Chemistry*. 2024 Aug 1;449:139165–5.
28. Do TT, Quach-Van TE, Nguyen TC, Show PL, Nguyen TM, Huynh DH, Tran DL, Melkonian M, Tran HD. Effect of LED Illumination Cycle and Carbon Sources on Biofilms of *Haematococcus pluvialis* in Pilot-Scale Angled Twin-Layer Porous Substrate Photobioreactors. *Bioengineering (Basel)*. 2023 May 16;10(5):596. doi: 10.3390/bioengineering10050596. PMID: 37237666; PMCID: PMC10215367.
29. Jin, C., Zhou, Z., Zhu, Y. et al. Photosynthetic activity and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* regulated by manipulated light quality. *Aquacult Int* 32, 3617–3635 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01341-y>

30. Rao Ambati R, Siew Moi , Ravi S, Gokare Aswathanarayana. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *marige drugs*. 2014 enero; 12(1).
31. Mota GCP, Moraes LBS de, Oliveira CYB, Oliveira DWS, Abreu JL de, Dantas DMM, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. *Prep Biochem Biotechnol* . 2022;52(5):598–609. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>
32. Lancheros A, Díaz L, camacho J. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L. *MUTIS*. 2021 Junio ; 11(2). DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1780>
33. R. Shah , Mei Liang Y, Cheng , Daroch. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. 2016 Abril; 7(2016).
34. Khoo KS, Lee SY, Ooi CW, Fu X, Miao X, Ling TC, et al. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. 2019;288(121606):121606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
35. Mularczyk , Michalak I, Marycz. Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Mar Drugs*. 2020 Septiembre; 18(9)(459).ç
36. HE, Bangxiang, et al. Ultrastructural changes of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in process of astaxanthin accumulation and cell damage under condition of high light with acetate. *Algae*, 2020, vol. 35, no 3, p. 253-262.
37. Li X, Wang X, Duan , Yi S, Gao Z, Xiao C, et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*. 2020 November; 43(107602). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107602
38. CG Lee. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *Microbiology and Biotechnology*. 2001 Enero; 11(6).
39. Tran HL, Lee KH, Hong CH. Efectos de la irradiación con LED en el crecimiento y la producción de astaxantina de *Haematococcus lacustris*. *Biosci Biotech Res Asia* 2015;12(2)
40. Katsuda T, Lababpur , Shimahara , Katoh S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. 2004 july; 35(1). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107602
41. Ren Y, Deng J, Huang J, Wu Z, Yi L, Bi Y, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresource Technology*. 2021 Nov;340:125736. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125736>
42. Li X, Wang X, Duan , Yi S, Gao Z, Xiao C, et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*. 2020 Noviembre; 43(107602).ç
43. Benavente, J., Montañez, J., Aguilar, C., Mendez, A., & Valdivia, B. (2012). Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7).
44. García, L. M. (2012). eliminación de co2 con microalgas autóctonas. <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ONMART%25CDNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>
45. Manrique Pinzon M y Marin Corredor D. Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y la alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor BIOSTAT ® A PLUS. 2019. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3689>
46. Cuero Amú K, Domínguez Castillo J, Espitia Sánchez K, Fuentes Cañón L. Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradiancia y color de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. 2019. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3654>

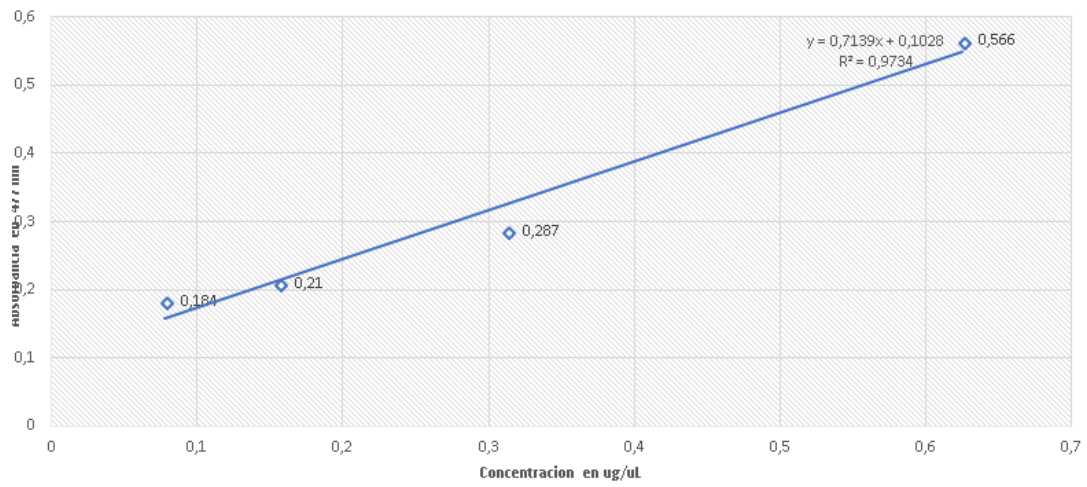
47. Wan M, Zhang J, Hou D, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol.* 2014;167:276-283. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.030
48. Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, et al. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules.* 2021 Feb 10;11(2):256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
49. Lancheros Diaz A, Díaz Barrera L, Camacho Kurmen. Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* under Salt Stress Factors Using a 5L Laboratory Bioreactor. *MUTIS.* 2021 Julio; 11(2).
50. Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research.* 2003;36(3-4). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
51. Wang J, Sommerfeld MR, Lu C, Hu Q. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *ALGAE.* 2013 Jun 15;28(2):193–202. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.193>
52. Samhat K, Kazbar A, Takache H, Ismail A, Pruvost J. Influence of light absorption rate on the astaxanthin production by the microalga *Haematococcus pluvialis* during nitrogen starvation. *Bioresour Bioprocess.* 2023; 10(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-023-00700-0>
53. Li F, Zhang N, Zhang Y, Lian Q, Qin C, Qian Z, et al. NaCl promotes the efficient formation of *Haematococcus pluvialis* nonmotile cells under phosphorus deficiency. *Mar Drugs.* 2021;19(6):337. <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/6/337>
54. Gomez L, Orozco MI, Quiroga C, Díaz JC, Huérfano J. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Mutis.* 2019;9(2):7–24.
55. Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs.* 2020 Sep 7;18(9):459. <https://doi.org/10.3390/md18090459>
56. Domínguez AR, Guerrero Legarreta I, Martínez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology.* 2004 Apr;92(2):209–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
57. Leiton Arcos, Y. Producción de *Haematococcus Pluvialis* en un biorreactor Tecferm de 5 l en medios de cultivo Rm y Bbm. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/3701>
58. Silva DL, de Moraes LBS, Oliveira CYB, da Silva Campos CVF, de Souza Bezerra R, Gálvez AO. Influence of culture medium on growth and protein production by *Haematococcus pluvialis*. *Acta Scientiarum. Technology.* 2022;44:e59590. doi:10.4025/actascitechnol.v44i1.59590. Doi: 10.4025/actascitechnol.v44i1.59590
59. Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2019). Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering,* 1-3. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02064-8>
60. Oncel, S.S., Imamoglu, E., Gunerken, E., & Vardar Sukan, F. (2011). Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology,* 86(4), 414-420. <https://doi.org/10.1002/jctb.2532>
61. APHA. American Public Health Association (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. Stand Methods Exam Water Waste Water. 2005

62. Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z, Tekinay T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(8):1947-1957. doi:10.1002/bit.24474.
63. Borowitzka, M.A., Huisman, J.M. & Osborn, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *J Appl Phycol* 3, 295–304 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00026091>
64. Mazumdar N, Novis PM, Visnovsky G, Gostomski PA. Effect of nutrients on the growth of a new alpine strain of *Haematococcus* (Chlorophyceae) from New Zealand: Effect of nutrients on *Haematococcus*. *Phycological Res*. 2019;67(1):21–7. <http://dx.doi.org/10.1111/pre.12344>
65. Dong HP, Williams E, Wang DZ, et al. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiol*. 2013;162(2):1110-1126. doi:10.1104/pp.113.214320.
66. Hockin NL, Mock T, Mulholland F, Kopriva S, Malin G. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol*. 2012;158(1):299-312. doi:10.1104/pp.111.184333.
67. Camacho Kurmen JE, Rodriguez Rodriguez N. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz. *Rev ION*. 2024;37(2):49–64. doi:10.18273/revion.v37n2-2024004.
68. Marinho, Y.F., Malafaia, C.B., de Araújo, K.S. et al. Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquacult Int* 29, 757–778 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00655-z>
69. Tocquin P, Fratamico A, Franck F. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol*. 2012;24(3):365–73. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>
70. Mazumdar N, Novis PM, Visnovsky G, Gostomski P. Effect of culturing parameters on the vegetative growth of *Haematococcus alpinus* (strain LCR-CC-261F) and modeling of its growth kinetics. *J Phycol*. 2019;55(5):1071-1081. doi:10.1111/jpy.12889.
71. Ortiz-Moreno ML, Cárdenas-Poblador J, Agredo J, Solarte-Murillo LV. Modeling the effects of light wavelength on the growth of *Nostoc ellipsosporum*. *Universitas Scientiarum*. 2020 May 6 ;25(1):113-48. doi: 10.11144/Javeriana.SC25-1.mteo
72. Camacho Kurmen J, Lancheros Díaz A, Guzmán Luna C. Modelo matemáticos y parámetros cinéticos de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis*. 2023. <https://www.researchgate.net/publication/379953170>
73. Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin-Goldberg I, Zarka A, Cohen Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J Phycol*. 2002;38. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01107.x>
74. Kiperstok AC, Sebestyén P, Podola B, Melkonian M. Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. *Algal Res*. 2017;21:213-222. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.025>
75. Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Res*. 2015;12:170-181. doi:10.1016/j.algal.2015.08.024.
76. Li Y, Sommerfeld M, Chen F, Hu Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol*. 2010;22(3):253-263. doi:10.1007/s10811-009-9453-6
77. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol Plant*. 2000;108:111-117.
78. Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M.R. et al. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor

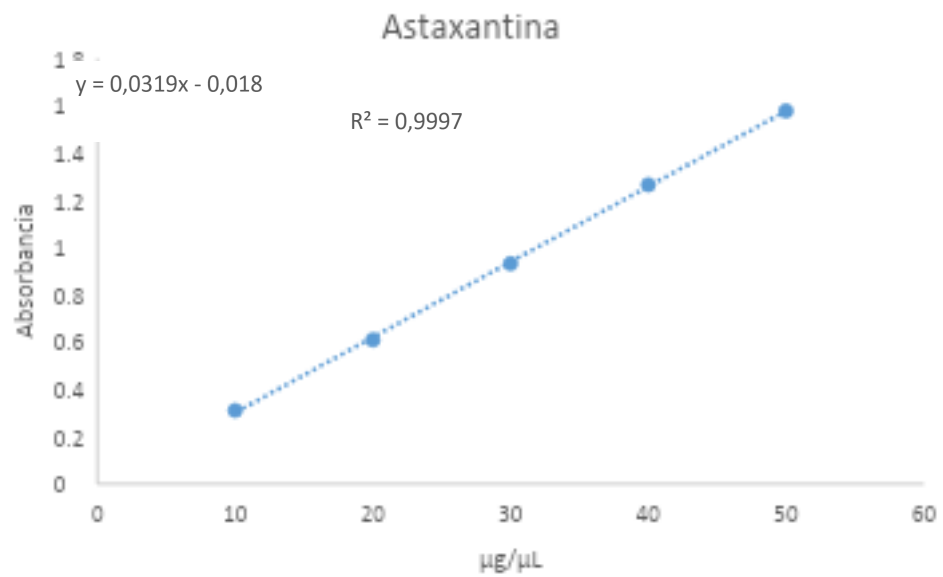
- photobioreactor. *J Appl Phycol* 25, 253–260 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9859-4>
79. Li F, Cai M, Lin M, Huang X, Wang J, Ke H, Wang C, Zheng X, Chen D, Yang S. Enhanced biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* by a cell transformation strategy with optimized initial biomass density. *Mar Drugs*. 2020;18(7):341. doi:10.3390/md18070341.
 80. Nemani, N., Dehnavi, S.M. & Pazuki, G. Extraction and separation of astaxanthin with the help of pre-treatment of *Haematococcus pluvialis* microalgae biomass using aqueous two-phase systems based on deep eutectic solvents. *Sci Rep* 14, 5420 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55630-4>
 81. Rodríguez-Amaya DB, Esquivel P, Meléndez-Martínez AJ. Actualización integral sobre colorantes carotenoides provenientes de plantas y microalgas: Retos y avances desde los laboratorios de investigación hasta la industria. *Alimentos*. 2023; 12(22):4080. <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/22/4080>
 82. Mourya, M., Khan, M. J., Sirotiya, V., Ahirwar, A., Schoefs, B., Marchand, J., Varjani, S., & Vinayak, V. . Enhancing the biochemical growth of *Haematococcus pluvialis* by mitigation of broad-spectrum light stress in wastewater cultures. *RSC Advances*. (2023); 13(26), 17611–17620. <https://doi.org/10.1039/d3ra01530k>
 83. Hu, Q., Hu, Z., Yan, X., Lu, J., & Wang, C. Extracellular vesicles involved in growth regulation and metabolic modulation in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, (2024). 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02462-z>
 84. Algaebank. Medio Basal de Bold (BBM Bold's Basal Medium). Algaebank. . <https://algaebank.com.mx/wp-content/uploads/2022/07/BBM-new-3.pdf>
 85. Busakorn Wilawan, Chan SS, Ling TC, Show PL, Ng EP, Woranart Jonglertjunya, et al. Advancement of Carotenogenesis of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Recent Insight and Way Forward. *Molecular Biotechnology*. 2023 Jun 3;66(3):402–23. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00768-1>
 86. Zhang L, Su F, Zhang C, Gong F, Liu J. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Int J Mol Sci*. 2016;18(1):33. doi:10.3390/ijms18010033.
 87. Hernández Morales , Pérez Morales M, Romo , Alcántara Jurado L, Hurtado Ayala L. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2015 Marzo; 46(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952015000100007&script=sci_arttext
 88. Landínez DMR. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. 2013. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/20559/300061.2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 89. Jara GPG. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. 2015. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
 90. Miranda A, Ossa E, Vargas G, Sáez A. Efecto de las bajas concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. 2019 Febrero; 30(1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000100023>
 91. Camacho Kurmen J, Lancheros A, Huérffano Torres M. Expresión de genes en la ruta biosintética. 2020 abril. <https://www.researchgate.net/publication/343843265>
 92. Niño CM, Rodríguez FC, Díaz LE, Lancheros AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Rev Nova Publ Cient Biomed*. 2017;15(28):19-31. doi:10.22490/24629448.2073.
 93. Lancheros-Díaz AG, Camacho-Kurmen JE, Díaz Barrera LE. Producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L. *Rev Nova Publ Cient Biomed*. 2021;19(37):99-119. doi:10.22490/24629448.5498.

Anexos

Anexo 1. Curvas de calibración de Clorofila



Anexo 2. Curva de calibración de astaxantina.



Anexo 3. Mediciones de crecimiento celular Medio KM y BBM

Biomasa de <i>H. pluvialis</i>					
Día	#	Medio KM		Medio BBM	
		Conteo medio KM	cantidad final promedio Medio KM c/mL	conteo medio BBM	cantidad final promedio $\mu\text{g/mL}$
1	T1	1000000	1.400.000,00	238000	312.333,33
	T2	1800000		323000	
	T3	1400000		376000	
22	T1	1500000	1.600.000,00	900000	666.666,67
	T2	1600000		200000	
	T3	1700000		900000	
38	T1	410000	466.666,67	430000	593.333,33
	T2	460000		650000	
	T3	590000		700000	
45	T1	870000	653.333,33	1010000	1.046.666,67
	T2	610000		1080000	
	T3	480000		1050000	
51	T1	770000	753.333,33	1110000	996.666,67
	T2	650000		970000	
	T3	840000		910000	
60	T1	890000	846.666,67	2330000	2.373.333,33
	T2	930000		2250000	
	T3	720000		2540000	
65	T1	670000	666.666,67	3120000	2.833.333,33
	T2	750000		2570000	
	T3	640000		2810000	
72	T1	470000	536.666,67	2400000	2.500.000,00
	T2	610000		2200000	
	T3	530000		2900000	

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 4. Mediciones de absorbancias y concentración de clorofila

Cantidad de Clorofila							
Día	#	Medio KM			Medio BBM		
		Absorbancia medio Km	$X=(y-b)/m$ $\mu\text{g/mL}$	cantidad final promedio $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia	$X=(y-b)/m$ $\mu\text{g/mL}$	cantidad final promedio $\mu\text{g/mL}$
1	T1	0,384	0,3939	0,2403	0,033	-0,098	-0,0894
	T2	0,226	0,1726		0,058	-0,0628	
	T3	0,213	0,1544		0,026	-0,1076	
22	T1	0,517	0,5802	0,4000	0,042	-0,0852	-0,0847
	T2	0,323	0,3084		0,054	-0,0684	
	T3	0,325	0,3112		0,031	-0,1006	
38	T1			0,1313	0,044	-0,0824	0,0007
	T2	0,174	0,0997		0,208	0,1474	
	T3	0,219	0,1628		0,058	-0,0628	
45	T1	0,16	0,0801	0,1665	0,097	-0,0081	-0,0156
	T2	0,343	0,3365		0,074	-0,0403	
	T3	0,162	0,0829		0,104	0,0017	
51	T1	0,115	0,0171	0,0722	0,135	0,0451	0,0988
	T2	0,2	0,1362		0,151	0,0675	
	T3	0,148	0,0833		0,234	0,1838	
60	T1	0,179	0,1067	0,2496	1,021	1,2862	0,4681
	T2	0,383	0,3925		0,118	0,0213	
	T3				0,172	0,0969	
65	T1	0,277	0,2440	0,1399	0,366	0,3687	0,1833
	T2	0,13	0,0381		0,143	0,0563	
	T3	0,201	0,1376		0,192	0,1249	
72	T1	0,146	0,0605	0,1074	0,122	0,0269	0,1249
	T2	0,213	0,1544		0,274	0,2398	
	T3				0,18	0,1081	

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 5. Mediciones de absorbancias y concentración de astaxantina

Cantidad de Astaxantina							
Dia	#	Medio KM			Medio BBM		
		Absorbancia medio Km	$X=(y-b)/m$ $\mu\text{g/mL}$	cantidad final promedio $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia	$X=(y-b)/m$ $\mu\text{g/mL}$	cantidad final promedio $\mu\text{g/mL}$
1	T1	0,6190	19,9687	15,4232	0,0430	1,9122	2,1003
	T2	0,4200	13,7304		0,0720	2,8213	
	T3	0,3830	12,5705		0,0320	1,5674	
22	T1	0,7300	23,4483	20,2926	0,0520	2,1944	2,3093
	T2	0,6100	19,6865		0,0640	2,5705	
	T3	0,5480	17,7429		0,0510	2,1630	
38	T1			12,1944	0,0610	2,4765	4,4514
	T2	0,3620	11,9122		0,2380	8,0251	
	T3	0,3800	12,4765		0,0730	2,8527	
45	T1	0,3410	11,2539	13,8349	0,1310	4,6708	4,4619
	T2	0,6080	19,6238		0,1060	3,8871	
	T3	0,3210	10,6270		0,1380	4,8276	
51	T1	0,2400	8,0878	10,1672	0,1730	5,9875	7,9937
	T2	0,4020	13,1661		0,2180	7,3981	
	T3	0,2770	9,2476		0,3200	10,5956	
60	T1	0,3610	11,8809	9,4880	1,1580	36,8652	16,2800
	T2	0,4930	16,0188		0,1500	5,2665	
	T3		0,5643		0,1960	6,7085	
65	T1	0,4660	15,1724	12,2153	0,4420	14,4201	9,1327
	T2	0,2610	8,7461		0,1760	6,0815	
	T3	0,3880	12,7273		0,2020	6,8966	
72	T1	0,2940	9,7806	11,5831	0,1970	6,7398	8,8924
	T2	0,4090	13,3856		0,3740	12,2884	
	T3				0,2260	7,6489	

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 6. Mediciones de pH

pH					
Día	#	Medio KM		Medio BBM	
		pH	Medio KM	pH	Medio BBM
1	T1	8,75	8,7	8,2	7,9
	T2	8,9		7,6	
	T3	8,5		7,9	
22	T1	7,8	7,6	7,6	7,7
	T2	7,5		7,8	
	T3	7,5		7,8	
38	T1	7,8	7,9	7,7	7,8
	T2	7,9		7,8	
	T3			8	
45	T1	8,5	8,6	7,9	7,9
	T2	8,7		8	
	T3	8,7		7,8	
51	T1	8,7	8,3	8,1	8,1
	T2	8		8	
	T3	8,3		8,1	
60	T1	8,7	8,6	8,2	8,0
	T2	8,4		7,9	
	T3			7,9	
65	T1	8,1	8,6	8,3	8,1
	T2	8,8		7,9	
	T3	8,8		8,1	
72	T1	8,5	8,4	7,8	7,9
	T2	8,3		8,2	
	T3			7,8	

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 7. Resultados Tratamiento estadístico crecimiento celular

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Medio KM	8	6963333,34	870416,6675	1,66652E+11	
Medio BBM	8	11346666	1418333,25	1,00448E+12	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	1,20085E+12	1	1,20085E+12	2,05074709	0,174078875
Dentro de los grupos	8,19794E+12	14	5,85567E+11		
Total	9,39879E+12	15			

Anexo 8. Resultados Tratamiento estadístico producción de clorofila

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Medio KM	8	1,5072	0,1884	0,01105276	
Medio BBM	8	0,8758	0,109475	0,026028605	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	0,024916623	1	0,024916623	1,343889175	0,265740127
Dentro de los grupos	0,259569555	14	0,018540683		
Total	0,284486178	15			

Anexo 9. Resultados Tratamiento estadístico producción de astaxantina

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Medio KM	8	105,1987	13,1498375	11,8860874	
Medio BBM	8	55,6217	6,9527125	22,0235111	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	153,6174331	1	153,6174331	9,06041001	0,009363079
Dentro de los grupos	237,3671897	14	16,95479927		
Total	390,9846228	15			

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Medio KM	Medio BBM
Media	13,1498375	6,9527125
Varianza	11,88608739	22,02351115
Observaciones	8	8
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	3,010051497	
P(T<=t) una cola	0,005021437	
Valor crítico de t (una cola)	1,770933396	
P(T<=t) dos colas	0,010042873	
Valor crítico de t (dos colas)	2,160368656	

Anexo 10. Resultados Tratamiento estadístico pH

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Medio KM	8	66,7	8,3375	0,15410714	
Medio BBM	8	63,4	7,925	0,01928571	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0,680625	1	0,680625	7,85066941	0,014127262
Dentro de los grupos	1,21375	14	0,086696429		
Total	1,894375	15			

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Medio KM	Medio BBM
Media	8,3375	7,925
Varianza	0,154107143	0,019285714
Observaciones	8	8
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	2,801904605	
P(T<=t) una cola	0,010324145	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112933	
P(T<=t) dos colas	0,020648289	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157163	

Anexo 11. Cálculos de la velocidad de crecimiento en modelo logístico

$$\text{Velocidad de crecimiento (día}^{-1}\text{) BBM} = \frac{e^{\ln(996\,666)} - e^{\ln(313\,333)}}{51-1} = 0.0231$$

$$\text{Velocidad de crecimiento (día}^{-1}\text{) KM} = \frac{e^{\ln(753\,333)} - e^{\ln(1\,400\,000)}}{51-1} = -0,0124$$

Anexo 12. Resultados de Modelo Baranyi-Roberts en el medio KM

Linear Model	
R-square:	0.022
SE of Fit:	0.651
Initial value	5.323 ± 0.404
Maximum Rate	0.00941 ± 0.00866

Anexo 13. Resultados de Modelo Baranyi-Roberts en el medio BBM

Baranyi and Roberts Model (no lag) 	
R-square:	0.617
SE of Fit:	0.466
Initial value	4.826 ± 0.314
Maximum Rate	0.0271 ± 0.0102
Final Value	6.457 ± 0.455