



***PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN LA Microalga *Haematococcus pluvialis*
USANDO LUZ LED BLANCA, ALTA IRRADIANCIA en medios KM y BBM***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C 2025**



***PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN LA Microalga Haematococcus pluvialis
USANDO LUZ LED BLANCA, ALTA IRRADIANCIA en medios KM y BBM***

ESTUDIANTE

JOSE ANTONIO RIAÑO BAUTE

ASESOR

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

QF. Esp. MSc. Dra. en Biociencias

Grupo Bioprocesos y control

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD CIENCIAS
DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C 2025**



***PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN LA Microalga *Haematococcus pluvialis*
USANDO LUZ LED BLANCA, ALTA IRRADIANCIA en medios KM y BBM***

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES _____

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD CIENCIAS
DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C 2025**

DEDICATORIA.

A Dios por ser mi guía y fortaleza en cada momento de este camino.

A mis padres Loida y Rafael, por su amor incondicional, esfuerzo y ser el ejemplo de mi vida. Este logro es también de ustedes.

A mis hermanos Dayana, María José, Jonathan y David, gracias por su compañía y palabras de ánimo, por siempre estar presentes en mi vida. Su presencia ha sido una motivación constante en este proceso.

A mis amigos quienes con su compañía y consejos me han motivado durante el camino.

Mi agradecimiento a todos ustedes por ser parte de este proceso y darme la fortaleza necesaria para alcanzar este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo constante y su impulso a seguir para alcanzar este objetivo.

Un agradecimiento a la Dra Judith Elena Camacho Kurmen por su compañía durante este proceso y por brindarme su valioso conocimiento, imprescindible para este proyecto. Quedo enormemente agradecido por ayudarme a cumplir esta meta.

Al laboratorio central y grupo de investigación Bioprocesos y control por darme la oportunidad de aprender y desarrollar conocimientos fundamentales de este proyecto.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarme el apoyo económico y ofrecerme la formación que me permitió alcanzar el presente proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

Contenido

INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	9
Resumen	10
Introducción	11
Objetivos.....	13
1 Antecedentes.....	14
2 Marco teórico.....	21
2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
2.1.1Ciclo de vida	22
2.2 Factores que afectan el crecimiento.....	23
2.2.1 pH.....	23
2.2.2 Temperatura	23
2.2.3 Luz:	24
2.2.4 Irradiancia	25
2.2.5Fotoperiodo	25
2.2.6 Fuentes de luz para el crecimiento algal en fotobiorreactores	25
2.2.7 Nutrientes.....	27
2.2.8 Nitrógeno	27
2.2.9 Fosfatos	27
2.2.10 Medio BBM	28
2.2.11 Medio Kobayashi (KM).....	28
2.2.12 CO ₂	29
2.2.13Factores de estrés	29
2.2.13 La deficiencia de nutrientes	29
2.2.14 Astaxantina	30
2.2.15 Diferencia entre carotenos y xantofilas, contenido de hidroxilo y cetona	31
2.2.16 Ruta metabólica de producción de astaxantina	32
2.2.17 Astaxantina: Usos y aplicaciones.....	34
3 Diseño metodológico.....	35
3.2 Hipótesis, variables e indicadores	35

3.3 Metodología propuesta.....	36
4 Resultados	41
5 Discusión.....	53
6 Conclusiones.....	58
7 Recomendaciones	59
8 Bibliografía:.....	61
9 Anexos	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en microalgas	28
Figura 2. Curva de crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medios BBM y KM.	35
Figura 3. Modelo logístico aplicado al crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medios BBM y KM-	35
Figura 4. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio KM.	36
Figura 5. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio BBM	36
Figura 6. pH de los cultivos de la microalga <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y KM.	38
Figura 7. Concentración de clorofila obtenida durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y KM.	41
Figura 8. Concentración de astaxantina obtenida durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y KM. .	42
Figura 9. Clorofila y Astaxantina en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en el medio KM.	43
Figura 10. Clorofila y Astaxantina en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> en el medio BBM	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de desarrollo de las células de <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
Tabla 2. Composición del medio Volvox-Mes	30
Tabla 4. Composición del medio Kobayashi	31
Tabla 5 Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los diferentes medios de cultivo.	35
Tabla 6. Matriz de coeficientes del modelo de crecimiento logístico o Baranyi- Roberts (1994) ajustado para los diferentes medios de cultivo.	36
Tabla 7 Cambio macroscópico de <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y Kobayashi..	39
Tabla 8. Morfología de <i>H. pluvialis</i> en los medios BBM y Kobayashi..	40
Tabla 9. Tabla resumen de los parámetros analizados y los tratamientos realizados.	44

Resumen

Las microalgas son una fuente valiosa de productos biotecnológicos como carotenoides y biomasa. Este estudio utiliza la microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow (1848) de *Chlamydomonadales* (*Chlorophyceae*).

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 usa una irradiancia de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con luz fluorescente blanca. En la etapa roja se aplicó estrés con luz led blanca a una irradiancia de 303,75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes). Se realizó el ANOVA (95%) para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

Se observó que el medio de cultivo BBM demostró ser mejor en el crecimiento celular 6,9 $\times 10^6$ cel./mL, una velocidad de crecimiento de 0.020/ día (R^2 : 0,86, modelo logístico) usando luz blanca fluorescente por 15 días y luego luz led blanca con una irradiancia de 303,75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes). El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). El tratamiento del medio KM presentó mayor producción de clorofila 34,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y astaxantina 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El ANOVA (95%) realizado indica que solo hay diferencias significativas en la producción de clorofila ($F=4,84$; $P=0,045$; $gl=1$). En su morfología celular presentó quistes de tonalidad rojiza, usando luz led blanca con una irradiancia de 303,75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, Concluyéndose que el uso de la luz led blanca incrementó el crecimiento de la microalga y la acumulación de astaxantina en los medios utilizados especialmente en el medio KM.

PALABRAS CLAVE: Microalga, luz led, astaxantina, condiciones de estrés, luz blanca

Estudiantes: José Antonio Riaño Baute

Asesora interna: Judith Elena Camacho Kurmen

Introducción

La microalga *H. pluvialis* es una microalga unicelular que se encuentra en fuentes de agua dulce y produce de forma natural astaxantina, un betacaroteno con diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética, piscícola, textil y alimentaria, actuando como colorante y antioxidante natural. La producción de astaxantina por *H. pluvialis* ocurre en respuesta a condiciones de estrés, como la falta de nutrientes, altas concentraciones de sal, variaciones en el pH y la intensidad lumínica. Este pigmento se acumula intracelularmente como mecanismo de defensa durante las etapas vegetativa, palmella y aplanospora (enquistado). Aunque la astaxantina puede ser producida por plantas, levaduras, crustáceos y otros organismos, las microalgas, especialmente *H. pluvialis*, son los productores más eficientes, ya que pueden contener hasta un 4% de su peso neto en astaxantina. Esto hace que el cultivo de *H. pluvialis* sea una alternativa natural atractiva, no solo por la reducción en los costos de producción, sino también por la eliminación de posibles efectos perjudiciales para la salud asociados a los pigmentos sintéticos.

Para incrementar la producción de astaxantina durante el cultivo de *H. pluvialis*, es crucial establecer condiciones adecuadas de estrés, como la correcta trayectoria de la luz, el fotoperiodo, la fuente de luz, el color y la irradiancia adecuada. Este proyecto de investigación busca establecer un sistema de luz LED que optimice la fuente, el color y la intensidad para aumentar la producción de astaxantina en *H. pluvialis* bajo estrés por alta irradiancia, luz LED blanca y deficiencia de nutrientes.

Dado el creciente interés en la astaxantina por sus propiedades bioactivas y su potencial como colorante en múltiples aplicaciones industriales, es esencial optimizar las condiciones de cultivo de *H. pluvialis*. La luz LED blanca de alta irradiancia, combinada con otros factores de estrés como la trayectoria y fuente de la luz, el fotoperiodo establecido, el color,

la irradiancia o intensidad adecuada de luz, de tal manera que todas las células de la microalga reciban el mismo estrés y así incrementar el carotenoide, se ha demostrado ser una condición efectiva para aumentar la producción de astaxantina.

La presente investigación es pertinente y oportuna debido a la creciente demanda de astaxantina en diferentes sectores industriales, este estudio se centrará en cómo la luz LED blanca de alta irradiancia puede influir en la producción de astaxantina en medios de cultivo específicos, como KM y BBM, proporcionando así conocimientos relevantes para optimizar la producción y mejorar la rentabilidad de la obtención de este carotenoide. Además, la comprensión de las variables ambientales que afectan la síntesis de compuestos bioactivos en microalgas facilitará su aplicación en diversas industrias, desde la cosmética hasta la alimentaria.

Las ventajas de utilizar LEDs en el cultivo de microalgas incluyen su diversidad en tamaños, su ligereza, durabilidad y eficiencia energética. Los LEDs tienen una mayor vida útil y generan más luz con menos consumo de energía en comparación con otras fuentes de luz. Esta investigación también contribuirá al avance del conocimiento en el campo de la biotecnología, proporcionando información detallada sobre los efectos de la iluminación con luz LED blanca de alta irradiancia en la síntesis de astaxantina en cultivos de *H. pluvialis*. Estos hallazgos serán aplicables a la producción a gran escala, permitiendo mejorar los procesos industriales y promoviendo prácticas más sostenibles, entender cómo estos factores influyen en la síntesis de carotenoides permitirá desarrollar estrategias más eficientes para la producción sostenible de astaxantina, beneficiando a la biotecnología y las industrias que dependen de este compuesto.

Más del 90% de la astaxantina comercial se vende en su forma sintética debido a que su producción implica menores costos de producción que la forma obtenida naturalmente, normalmente por medio de algas, bacterias o levaduras. *H. pluvialis* es una microalga estudiada por producir un pigmento de color rojo con propiedades antioxidante y su uso puede ser beneficioso para la salud humana. Con el proyecto de investigación se espera aportar una opción para suplir la demanda de astaxantina natural la cual ha venido en aumento en los últimos años, En el proyecto se buscará la disminución de los costos de producción y aumentando la calidad por medio del uso de cultivo de cepas de *H. pluvialis* en los medios de cultivo BBM, y KM. Esta opción puede aumentar la producción de astaxantina ya que la microalga puede alcanzar niveles de producción de hasta 5% de su peso neto, mejorar su calidad ya que se ha comprobado que la forma natural tiene mejores propiedades antioxidantes (1), de esta suplir la demanda aumentando las cantidades extraídas de astaxantina.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* en medio KM y BBM usando luz led blanca con alta irradiancia.

Objetivos específicos

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

1 Antecedentes

Se han realizado diferentes trabajos donde se han utilizado medios de cultivos, condiciones de cultivo y uso de biorreactores o fotobiorreactores desde 1 L hasta 10 L, usando diferentes fuentes de luz como la luz solar, lámpara fluorescente y led en biorreactores y fotobiorreactores para el crecimiento de las microalgas *H. pluvialis* y la producción de astaxantina, como los publicados por Ma *et. al.*, 2018 encontraron en su investigación que la biosíntesis de la astaxantina y sus ésteres monos y di-ésteres fue estimulada significativamente por debajo de $150 \text{ mmol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de Led blanco (150 W) en comparación con las intensidades de luz más bajas, pero las cantidades más altas de astaxantina se produjeron por debajo de $70 \text{ mmol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de Led azul (B-70) (2). Las transcripciones de los genes de biosíntesis de astaxantina *psy*, *crtO* y *bkt2* fueron reguladas por debajo de 150 W, mientras que *psy*, *lcy*, *crtO*, y *crtR-B* fueron reguladas por led azul. Christian *et. al.*, 2018 encontraron que estresando las células con una combinación de luz alta y niveles elevados de dióxido de carbono (5 o 15%), el rendimiento de astaxantina es 2 - 3 veces mayor que usando cualquiera de los dos factores de estrés solo y esto sugiere que este método es óptimo para la inducción a la producción de este pigmento (3).

En el estudio experimental de dos fases realizado en los medios BBM y RM donde células de *H. pluvialis* se sometieron a condiciones de cultivo de pH 6,8; temperatura de $20^\circ\text{C} + 2^\circ\text{C}$; fotoperiodo de 18/6 h luz oscuridad: con lámpara marca Phillips de $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de irradiancia $\approx 65 \text{ lux}$ en la primera fase y segunda fase a los 15 días hubo un cambio a luz LED con luces blancas, azul y roja con una emisión de 180 a 210 lux y fotoperiodo luz :oscuridad de 20h/4h, condiciones sin variación pH 6,8, temperatura de $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y agitación 100 rpm durante 36 días de cultivo. El medio BBM tuvo un crecimiento células más significativo de $2,88 \times 10^7$ cel./mL en comparación de medio RM $2,43 \times 10^7$ cel./mL. Las concentraciones de

astaxantina más altas se hallaron en el medio BBM en el día 29 con una concentración de 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un 6,4% más frente al medio RM. (4).

Por 35 días se llevaron a cabo cultivos en medios BBM y KM bajo las condiciones de pH 6,8, periodo de luz oscuridad de 18/6h iluminación con luz blanca por lámparas de la marca Phillips Tit 20w 54RS con una intensidad lumínica de 64 luxes, a los 15 días de cultivo se sometieron a condiciones de estrés de 20 horas luz 4 horas oscuridad utilizando luz blanca Leds de 360 luxes y acetato de sodio 0,375mg/L y 0,750mg/ L. El segundo medio con mejor rendimiento fue el BBM con adición de 0,375mg/L acetato de sodio, con una producción de astaxantina de 2,276 mg/ mL en el día 21 y un recuento celular de $1,89 \times 10^8$ cel./mL en el día 35 (5).

Se realizó un estudio de la cuantificación de astaxantina con disolventes eutécticos profundos de cultivos de *H. pluvialis* en un cultivo por triplicado en una botella de 1 litro de medio BBM a una temperatura de 21 ± 1 °C, intensidad lumínica de 90 100 μmol fotones por $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ con un ciclo de luz oscuridad de 16h./8.h cuando alcanzaron su fase vegetativa con 0,7 g L⁻¹ de peso seco, se les adicione una intensidad lumínica de 450-500 μmol de fotones por $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ y falta de nutrientes mediante dilución, se cuantificó la cantidad de astaxantina con varios métodos y su recuperación fue de timol TAO con rendimiento de extracción de $(83 \pm 13\%)$ ácido oleico mezclado con dl -mentol MAO ($74 \pm 4\%$) y Geraniol GAO ($66 \pm 6\%$) (6).

Este estudio realizado se cultivaron células de *H. pluvialis* en dos etapas, iniciando en la fase vegetativa con 150 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un ciclo de luz oscuridad de 12/12 bajo

iluminación de luz artificial durante 7 a 8 días, en la segunda etapa del proceso se estresan la células de *H. pluvialis* con un alto nivel lumínico de 1000-1200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con deficiencia de nitrato en un fotobiorreactor de polietileno para ambas fases, el crecimiento celular se examinó diariamente., se llevó a cabo una producción de biomasa de 0,6 g L⁻¹, con una producción de astaxantina de 163 mg g⁻¹ . una exposición a altas intensidades de luz junto a una deficiencia de nutrientes a un mayor contenido de producción de astaxantina (7).

En el estudio realizado por los investigadores se seleccionaron dos tipos de cepas de *H. pluvialis* (NBU480 y RMS10) las cuales se llevaron a un cultivo de dos etapas en medio NBU3#, la fase vegetativa cultivadas en condiciones de 24 °C y poca iluminación (25–30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y fotoperiodo de luz oscuridad de 12/12 h, en la etapa de producción de astaxantina se aumentó a una intensidad lumínica a 200 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el crecimiento de poca luz RMS10 fue significativamente mayor 0,16g/L, un 31,9% mayor que NBU 489 (0,12 g/L), mientras que en condiciones con luz más alta las dos cepas mostraron un incremento, RMS10 y NBU489 de en promedio 0,13 g/L a 0,59 g/L donde RMS10 alcanzó en promedio 44,6 mg/g un 53,3% mayor que NBU 29,1 mg/g lo que mejoró significativamente (8).

En este artículo experimental se utilizaron cepas de *H. pluvialis* las cuales fueron cultivadas a 25 °C con intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol/m}^2 /\text{s}$ (lámparas led), 1% de CO₂ a velocidad de 0,15 vvm hasta un agotamiento del nitrógeno y luego a 160 $\mu\text{mol/m}^2 /\text{s}$, Las concentraciones de biomasa aumentaron con una intensidad de luz de 160 a 480 $\mu\text{mol/m}^2 /\text{s}$, mientras que a una intensidad de luz más alta 600 y 800 $\mu\text{mol/m}^2 /\text{s}$ bajo su biomasa, el estudio reveló que

la concentración más alta de biomasa fue a una intensidad de $480 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con una producción de $3,77 \text{ g/L}$ de biomasa, de manera similar el contenido de astaxantina mejoró con este aumento y su máximo de producción fue en el día 19 con $58,87 \text{ mg/g}$, mientras que descendió drásticamente con una intensidad de luz de $800 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. (9)

En un estudio donde se evaluaron diferentes medios de cultivo para *H. pluvialis*, en cultivos autótrofos (BBM, Z8, A9), heterotróficos (KM1) y mixotróficos (MM1, MM2) en condiciones de luz constante por debajo de $1,5 \text{ klux}$ a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, estas condiciones fueron aplicadas durante 12 días donde se pudo concluir que el medio con mayor rendimiento en el medio autótrofo fue BBM para el crecimiento de células verdes con una producción de $1,5 \times 10^5 \text{ cel./mL}$ en comparación con Z8 ($0,8 \times 10^5 \text{ cel./mL}$) y en el medio heterotrófico el KM con $4,35 \times 10^3 \text{ cel./mL}$ donde también se observan más fácilmente quistes de *H. pluvialis* con respecto a los autótrofos, en el medio MM1 prolongando la fase móvil (10),

En el trabajo de Hernández, 2019 con una cepa de *H. pluvialis* cultivada por 21 días utilizando dos medios de cultivo BBM y KM en los cuales tenían unas condiciones de irradiancia de 65 lux con lámparas led de color blanca. pH de $6,8$, agitación de 100 rpm y temperatura de 22°C , se revisó la morfología y conteo celular, además de medir el consumo de fosfatos y nitratos por los medios de cultivo, en los resultados se determinó que el medio de cultivo más idóneo para la obtención de astaxantina fue el BBM con una producción máxima de $8,2 \text{ ug/mL}$ y 75% de consumo de nitratos, mientras que el medio KM una de $5,9 \text{ ug/mL}$ y un consumo de 68% de nitratos. (11)

En otro estudio se utilizó un biorreactor de transporte aéreo de 1.0 litros con un pre cultivo de cultivo de *H. pluvialis* NIES-14 en medio Kobayashi, se transvasó a un matraz (0,033 g de células secas l⁻¹) y se cultivó en el biorreactor con 1000 mL de medio para algas a 20 C°, un pH controlado aproximadamente de 8 y una iluminación de 21,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas (FCL32ECW/30; Matsushita Electric Industrial, Osaka), después de 120h se incrementó a 48,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a las 200 h se dejó que las células consumieran los nutrientes, a las 300 horas se eliminó la mitad del caldo y se rellenó con agua esterilizada también hubo un incremento en su intensidad luminosa hasta 94,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que dio un aumento en la densidad celular de 7×10^6 células/ mL y su concentración de astaxantina 600 mg/ L después de 710 h (12).

También se han evaluado diferentes ondas de luz incluidas la luz roja, azul y blanca y mixta azul/roja en cultivos de *H. pluvialis* a 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20° C, donde se halló que la luz roja/ azul es la más adecuada para la división de las células $211 \pm 5 \times 10^4$ células/mL, que fue aproximadamente un 70% mayor que las cultivadas bajo luz blanca ($127 \pm 3 \times 10^4$ células/mL) y luz roja ($121 \pm 2 \times 10^4$ células/mL) sin embargo la luz roja 0,785 \pm 0,023 g/L y blanca (0,761 \pm 0,026 g/L) tuvieron un rendimiento más alto en cuanto al peso seco frente a las demás ondas de luz azul y azul/ roja, con un aumento del tamaño y contenido del protoplasto, además de tener un tamaño más uniforme con respecto a las demás ondas de luz ya que su tamaño era el de estado de vegetativa y no uniformes (13).

Igualmente, el contenido de fósforo, arrojó ser de importancia en la producción de astaxantina. En un estudio realizado por Rodríguez y Camacho, 2024, utilizando tres medios de cultivo RM1, RM2, RM3 y RM4 con 20, 30 y 40 y 20 g/mL y 5% de nitrógeno respectivamente de concentración de fosfatos y bajo estrés con luz LED blanca, y

fotoperiodo de 20 donde se pudo cuantificar la cantidad de fosfatos utilizados por la microalgas y se pudo concluir que el tratamiento RM3 tuvo mayor cantidad de biomasa de 9.69×10^7 sin embargo el tratamiento con mayor contenido de astaxantina fue el RM2 con un máximo de producción de astaxantina de $5.77 \mu\text{g/mL}$, en el día 62 de ensayo a 75 luxes (14).

En un estudio hecho con un cultivo de *H. pluvialis* en un medio fotoautotrófico BG11 con una iluminación continua de $100 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ a 25°C se centrifugó y se re suspendió en medio BG11 con una iluminación de $75 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ por 4 días, hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial de las células vegetativas o aproximadamente una concentración de 1×10^6 células/mL, Se suspensión 20 ml del cultivo de 4 días en Erlenmeyer de 250 ml, con 200 ml de cultivo de los medios B11, BG11 modificado, OHM, Basal y RM. El tiempo del ensayo fue por 12 días a 25°C con aire suministrado de $0,8 \text{ L min}^{-1}$. En los resultados se obtuvo que el medio RM fue el más efectivo para producir biomasa, obtuvo una concentración $9,50 \times 10^6 \text{ cel.} / \text{mL}$ seguido del medio Basal con $8,85 \times 10^6 \text{ cel.} / \text{mL}$ a los 7 días de ensayo. El medio menos efectivo con una concentración menor fue el BG11 modificado con $5,2 \times 10^5 \text{ cel.} / \text{mL}$. (15)

En una revisión hecha por Oslan et al. (16) consideran la importancia de que los cultivos de *H. pluvialis* provean fuentes de nitrógeno (nitrato , amonio, urea) y carbono ya que ayuda a el aumento de la biomasa porque el nitrógeno está implicado en varios procesos metabólicos de las algas, porque un cultivo con poco nitrógeno disminuye el crecimiento de la microalga, además se estableció que un medio de cultivo apropiado para el cultivo de *H. pluvialis* es BBM Medium Basal Bold ya que provee nitrógeno inorgánico que puede ser metabolizado por la microalga.

En un estudio hecho por Tolga et al (17), se utilizó un cultivo de *H. pluvialis* cultivado a $75 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$, hasta la fase estacionaria. En la etapa dos del ensayo se utilizaron diferentes

intensidades de luz 20, 45, 75 y 150 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$, con una adición de acetato de sodio (1g L^{-1}) como carbono inorgánico, en sus resultados se obtuvo que los cultivos con la adición de acetato incrementaron de 21,7 a $42,9 \times 10^4$ cel. / mL a una intensidad de $75 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ demostrando que una fuente de carbono inorgánico puede ser efectiva para el crecimiento de la biomasa.

También en su estudio propuso que una fuente de carbono puede aportar significativamente en el crecimiento de la biomasa de *H. pluvialis* y en la acumulación de astaxantina. El estudio realizado se añadió citrato trisódico (TSC) 0.06mM como fuente de carbono inorgánico, el cual aumentó 11,9% el contenido de astaxantina en el medio de cultivo, es decir 2,4 veces más, en el día 7 de cultivo, además se encontró que el citrato trisódico actúa como promotor para la expresión de genes para la eliminación de ROS y biosíntesis de la membrana (18)

Nava G, (19) utilizó un cultivo de *H. pluvialis* con el objetivo de estimular la producción de astaxantina, con tres diferentes temperaturas (21,23 y 25°C) en el medio BBM 3N con intensidades de luz 30,40,50 y 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, en biorreactores de 150 mL de volumen con 100 mL de medio de cultivo por triplicado con un inóculo inicial de 3×10^3 cel /mL y un fotoperiodo de 12:12 luz/ oscuridad. En los resultados se obtuvo que el tratamiento con 50 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ hasta el día 7 obteniendo una mayor biomasa que los demás cultivos con $2,143 \times 10^5$ cel./mL y el medio menos efectivo fue el 30 $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}^{-1}$ con una concentración de $7,9 \times 10^4$ cel./ mL, sin embargo, este último se recuperó y alcanzó una concentración de $3,20 \times 10^5$ cel./mL, siendo la concentración más alta obtenida en el día 12 de ensayo.

En el estudio de Graciela D, (20). donde se evaluaron 6 diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio en biorreactor de 5 litros con medio RM en condiciones de 20:4 luz/ oscuridad con lámparas blancas a 75 luxes y aire filtrado, donde se obtuvo resultados de concentración de astaxantina, morfología celular, densidad celular etc. En los ensayos se

obtuvo que el medio con mayor concentración de astaxantina obtenido se le añadió 1,6 g/L de acetato de sodio con 6,4 g/L de cloruro de sodio, el cual acumulo 7,3 µg/mL) de astaxantina concluyendo que la adición de cloruro de sodio y acetato de sodio son promotores de la acumulación de este carotenoide en *H. pluvialis*.

En general se puede establecer según los estudios revisados que la luz blanca ayuda a aumentar el tamaño y la uniformidad de las células de la microalga *H. pluvialis*, además de aumentar la granularidad y que la irradiancia adecuada es de 400-500 µmol/ m²s⁻¹, para la producción de células enquistadas para producción de astaxantina.

2 Marco teórico

2.1 *Haematococcus pluvialis*

La microalga *H. pluvialis* Flotow (1848) (*Chlamydomonadales, Chlorophyceae*) es un alga verde biflagelada en su etapa vegetativa, comúnmente encontrada en cuerpos de agua dulce. Esta microalga se caracteriza por la presencia de clorofila a y b, así como de carotenoides primarios, lo que le permite realizar la fotosíntesis de manera eficiente. *H. pluvialis* presenta un ciclo de vida complejo que incluye tres formas distintas: la forma vegetativa o verde, que es elipsoidal y presenta flagelos; la forma palmella, en la cual adopta una estructura más redondeada y pierde los flagelos; y la forma aplanospora o enquistada, que se genera como respuesta a diversas condiciones de estrés ambiental. (21,22) En esta forma, *H. pluvialis* detiene su movilidad y entra en un estado de reposo, durante el cual produce carotenoides secundarios como la astaxantina en grandes cantidades. A diferencia de otras microalgas, *H. pluvialis* puede acumular aproximadamente el 4% de su peso seco en astaxantina. Esta característica la convierte en la microalga más estudiada en el ámbito industrial para la

producción de astaxantina. Este carotenoide es ampliamente utilizado en la industria como un potente antioxidante para la elaboración de diversos productos. (23,24)

2.1.1 Ciclo de vida

H. phuvialis (Chlorophyceae, Volvocales) pertenece al grupo de microalgas verdes unicelulares, ampliamente distribuidas en cuerpos de agua dulce en todo el mundo. Esta microalga se caracteriza por experimentar varios cambios morfológicos a lo largo de su ciclo de vida, el cual se divide en dos fases: la fase vegetativa o móvil (verde), en la que presenta flagelos, y la fase no móvil o no vegetativa (roja). Durante su ciclo de vida, *H. phuvialis* presenta cuatro formas principales: zoosporas, microzooides, palmella y aplanospora o enquistada. En esta última fase, que se genera bajo condiciones de estrés, se produce la mayor cantidad de astaxantina. (25). Este carotenoide se acumula en vesículas de lípidos citoplasmáticas en condiciones de estrés, lo que permite a la microalga adaptarse y sobrevivir en ambientes adversos. (26)

La fase móvil se refiere a las células de *H. phuvialis* que poseen dos flagelos isométricos que le permiten moverse libremente en el agua y una pared celular delgada. En esta fase, el núcleo de la célula se sitúa en el centro y tiene una apariencia de copa o forma granular, durante esta fase, la microalga está en su estado más activo y productivo. En la segunda fase, las zoosporas se forman a partir de la célula móvil o inmóvil, cuando esta última desarrolla un esporangio que genera múltiples células. Al romperse el esporangio, se liberan las zoosporas, que son células pequeñas y flageladas. (25) En la fase de palmella, las células inmóviles de *H. phuvialis* han perdido sus flagelos debido a condiciones ambientales desfavorables y entran en un estado de reposo. Si estas condiciones de estrés persisten, las células avanzan al estadio de aplanospora o enquistada. En esta fase, las células desarrollan una vaina trilaminar y una pared secundaria, lo que les permite acumular una mayor cantidad

de astaxantina para protegerse del daño por estrés oxidativo (Ver Tabla 1). Si las condiciones ambientales se vuelven favorables nuevamente, la célula puede revertir este proceso y formar zoosporas una vez más. (27, 28).

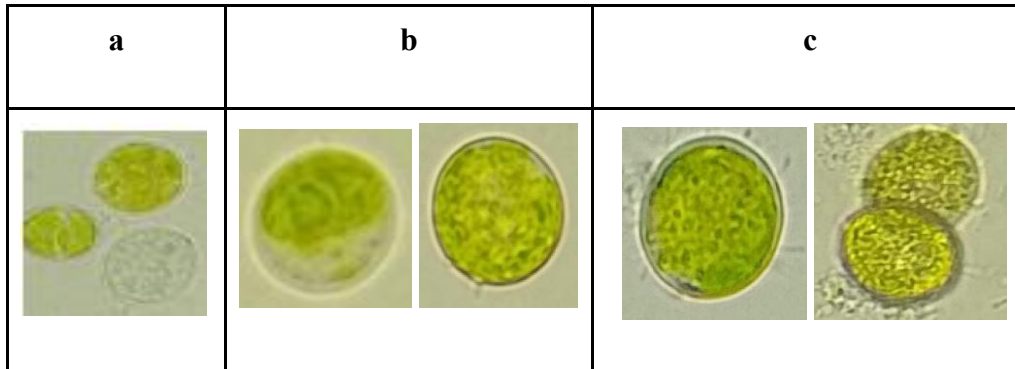


Tabla 1. Secuencia de desarrollo de las células de *H. pluvialis* a. Forma vegetativa Célula verde. b. Palmella e incremento de tamaño c. Aumento de tamaño con quistes. Fuente autor 2024

2.2 Factores que afectan el crecimiento

2.2.1 pH

En la literatura no se menciona un pH ideal de cultivo sin embargo es un factor a tener en cuenta, en varios estudios realizados se observaron los pH más óptimos y utilizados por esto autores variando entre 6.5 y 7.0

junto a diferentes factores de estrés (29,30,31), incluso se ha identificado como el pH neutro como ideal para el crecimiento celular ya una caída de este parámetro puede provocar un descenso en la actividad de alguna enzima involucrada en la fotosíntesis (9)

2.2.2 Temperatura

El crecimiento de astaxantina en *H. pluvialis* depende de mantener una temperatura adecuada. Temperaturas muy altas pueden causar la supresión tanto del crecimiento celular como de la

producción de astaxantina. Se ha observado que una temperatura óptima para el crecimiento de las células de *H. pluvialis* varía entre 25 y 28 °C (32); sin embargo, se considera ideal una temperatura de 27 °C. Superar los 30 °C puede inducir a la muerte celular. Mantener esta temperatura es crucial no sólo para maximizar el crecimiento celular, sino también para asegurar una alta productividad de astaxantina. Una gestión adecuada de la temperatura es esencial para optimizar los rendimientos y la calidad del cultivo, asegurando así su viabilidad en aplicaciones industriales. (33)

2.2.3 Luz:

La intensidad de luz y distribución (34), es uno de los factores de estrés más importantes para la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* en cultivos, el aumento de la intensidad de luz es un requerimiento de estrés que provoca la fotooxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) en *H. pluvialis*, una intensidad lumínica de 100 y 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se considera óptima para la producción de astaxantina (32).

La intensidad y distribución de la luz son factores de estrés cruciales para la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* en cultivos (33). El aumento de la intensidad lumínica es un requerimiento de estrés que provoca la fotooxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) en *H. pluvialis*. Se considera que una intensidad lumínica entre 100 y 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es óptima para la producción de astaxantina (32).

Las luces LED se utilizan para proporcionar una fuente de luz controlada y eficiente en los cultivos de *H. pluvialis*. Estas luces permiten ajustar la intensidad y el espectro de luz, lo que puede influir significativamente en el crecimiento y la producción de astaxantina de la microalga. Algunos estudios han demostrado que las luces LED azul y roja pueden mejorar la acumulación de astaxantina al inducir condiciones de estrés adecuadas. Además, las luces LED son más eficientes energéticamente y tienen una vida útil más larga en comparación con

otras fuentes de luz, lo que las hace una opción preferida en la investigación y producción industrial de astaxantina (35).

2.2.4 Irradiancia

La irradiancia influye en el contenido de astaxantina, ya que acelera el consumo de nutrientes y promueve la transición de una etapa vegetativa a una etapa aplanospora o quística. A una irradiancia de $50 \mu\text{mol de fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, las células se mantienen en la etapa vegetativa, mientras que a irradiancias más altas, iguales o superiores a $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, las células de *H. pluvialis* comienzan a acumular carotenoides y entran en la fase aplanospora (33, 36). Sin embargo, no se necesita una irradiancia excesiva cuando existen otros tipos de factores estresantes (25).

2.2.5 Fotoperiodo

El fotoperiodo se refiere al tiempo de luz y oscuridad aplicado a un cultivo. Es una estrategia que minimiza los costos de producción de astaxantina al reducir la cantidad de energía. El uso de luces LED es un método eficaz, ya que permite controlar la longitud de onda y la densidad de flujo de fotones, lo que resulta en una estrategia efectiva para manejar estos factores que influyen en el crecimiento (37). Al no ser una fuente de luz continua, las luces LED minimizan el riesgo de fotoinhibición en los fotosistemas, especialmente en el fotosistema II, que es más sensible a altas longitudes de onda. Por lo tanto, una luz continua puede dañar este fotosistema (38).

2.2.6 Fuentes de luz para el crecimiento algal en fotobiorreactores

1 Luz solar: la luz solar es la fuente natural de luz que tiene el espectro perfecto (espectro visible) para el crecimiento de algas.

2 lámpara fluorescente: Las lámparas fluorescentes que emiten en el espectro de luz azul o roja se utilizan en los PRP.

3 diodo emisor de luz (LED): led emite luz monocromática con colores altamente saturados. convirtiendo eficientemente la energía eléctrica en luz sin desperdiciar mucha energía como calor. Suministran únicamente las longitudes de onda de luz que son más útiles para el cultivo de algas (39).

El sistema LED fue desarrollado por primera vez en 1962 por Nick Holonyak Jr., mientras trabajaba en General Electric Company, y fue introducido como un componente electrónico práctico que emite luz roja visible de baja intensidad, se define como un dispositivo semiconductor de estado sólido que permite que la corriente eléctrica fluya a través de una sola dirección y emite luz cuando fluye suficiente corriente a través del objeto.

Los LED son fuentes de luz fría a diferencia de las lámparas incandescentes, son pequeños, ligeros, duraderos y eficientes en términos de mayor vida útil y están diseñados para emitir luz cuando los electrones pasan a través de ellos. La cantidad de luz emitida es muy alta comparada con la cantidad de energía utilizada. El concepto de utilizar LEDs para cultivar algas ha sido un proceso continuo durante muchos años, ya que los LED son altamente eficientes. En comparación con las lámparas de descarga tubulares convencionales y las bombillas, los LED con sus características de longitud de onda de banda estrecha y bajo consumo de energía, se consideran las fuentes de luz óptimas para el crecimiento de algas. El crecimiento de las algas es directamente proporcional a la intensidad de la luz (39)

Se ha estudiado el efecto de la irradiación LED en el crecimiento y la producción de astaxantina por *H. lacustris*. reportándose que la proporción de luz roja a azul afectaba a la producción de astaxantina. La máxima cantidad de astaxantina producida fue de 55.1, 50.3 y 36.3mg/L para

las relaciones de luz rojo-azul de 1:3,2:2 y 3:1, respectivamente. La biomasa máxima obtenida con iluminación mixta rojo-azul (1:3 relación) fue de 1,48g/L, seguida de luz azul, roja y fluorescente a 1,36g/L, 1,06 g/L y 0,96 g/L, respectivamente. La configuración de LED rojo-azul mixto resultó ser más eficaz en comparación con diferentes luces monocromáticas (40).

2.2.7 Nutrientes

La adición de cultivos con acetato o lactato más Fe^{2+} induce una rápida formación de células vegetativas (28). Además, el Fe^{2+} como sulfato ferroso (0.45 mM) induce la producción de radicales hidroxilos, lo que aumenta la síntesis de carotenoides. Sin embargo, la privación de nitrógeno puede duplicar esta producción (25). El magnesio (Mg) es esencial para la formación de la clorofila, ya que se encuentra en el centro del anillo de porfirina de la clorofila, lo que permite la captura de luz necesaria para la fotosíntesis.

2.2.8 Nitrógeno

La asimilación de nitrógeno es crucial para la producción de proteínas y ácidos nucleicos. El nitrato y el amonio son las dos principales fuentes de nitrógeno que se añaden al cultivo de *H. pluvialis*. Sin embargo, no hay una diferencia significativa en la producción de astaxantina entre ambas fuentes. El amonio, como fuente de nitrógeno, se agota más rápido que el nitrato debido a su transformación directa en componentes orgánicos. No obstante, puede disminuir el pH debido a la liberación de iones H^+ (9).

2.2.9 Fosfatos

Este macronutriente es uno de los más importantes después del nitrógeno. Se incorpora al medio de cultivo en forma de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 . En las microalgas, está involucrado en varios procesos metabólicos, como la formación de energía en forma de ATP, la constitución

de bases nitrogenadas para la formación de material genético y la construcción de la membrana celular (11,41).

2.2.10 Medio BBM

En el medio de cultivo se puede promover el crecimiento y la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Los medios más utilizados son BG11, BBM, OHM y KM, los cuales pueden ser modificados según los requerimientos de la cepa a cultivar (25,69). El medio BBM, comúnmente utilizado para el cultivo de algas de agua dulce, contiene nitrato de sodio como fuente de nitrógeno (NaNO_3 0.25 g/L) y otros nutrientes como fósforo en forma de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y fosfato monopotásico (KH_2PO_4), así como potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), azufre, carbono y cloro (42) los cuales provee un crecimiento en la biomasa de la microalga (16).

2.2.11 Medio Kobayashi (KM)

El medio Kobayashi es adecuado para el crecimiento de microalgas como *H. pluvialis* debido a su composición específica de compuestos nitrogenados, contenido de Mg, P o F metabolizados por las microalgas en sus diferentes ciclos de vida para la obtención de energía y construcción de su biomasa (25). Este medio contiene acetato de sodio, L-asparagina, extracto de levadura, tris (hidroximetil)-aminometano, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, que proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de las microalgas como *H. pluvialis*. Este medio ha sido utilizado en diversas investigaciones para la obtención de astaxantina para alcanzar una fase exponencial del crecimiento celular (11).

2.2.12 CO₂,

El contenido de CO₂ se utiliza como fuente de carbono y depende de la cepa a analizar. Sin embargo, en algunos estudios se utilizan concentraciones de 1 a 2.5% de CO₂, ya que influyen positivamente en el crecimiento de la biomasa al mejorar la actividad fotosintética (9). El carbono puede ser asimilado por las algas y contribuir a la formación de precursores para el carotenogénesis. También se usa como una alternativa para inducir el déficit de nitrógeno sin necesidad de cambiar los medios de cultivo, al alterar la relación carbono/nitrógeno (37,38).

2.2.13 Factores de estrés

El estrés por irradiancia, junto con la deficiencia de nutrientes, es uno de los factores más relevantes para la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. En la etapa inicial móvil, la producción de astaxantina no es significativa con luz alta o baja (17). Sin embargo, en la etapa no móvil, la alta intensidad de luz contribuye a una mayor acumulación de astaxantina (43), ya que influye en la expresión de enzimas carotenoides como la BKT y la BCH, que intervienen en el metabolismo de la astaxantina (38, 44). Aunque algunas cepas mutadas pueden permanecer en un estado móvil con altas cantidades de luz y contener astaxantina en estas etapas (43), la luz con alta irradiancia es propicia para el cultivo de una alta cantidad de biomasa de *H. pluvialis* y favorece el aumento de su tamaño (13).

2.2.13 La deficiencia de nutrientes

El nitrógeno y el fósforo se han establecido como dos de los factores de estrés más importantes que inducen la producción de astaxantina en *H. pluvialis* (25). Se han registrado estudios que confirman cómo la deficiencia de nitrógeno en medios de cultivo es eficaz para

maximizar la producción de astaxantina en estas microalgas. En estos estudios, se observa que cuanto menor es la adición de nitrógeno, mayor es la producción del carotenoide (27,45, 46), siendo considerado uno de los factores de estrés más poderosos (47). La falta de nitrógeno inhibe la producción de clorofila a y b por *H. pluvialis*, limitando su capacidad fotosintética, lo que implica la acumulación de fuentes de carbono y lípidos (27, 21) y la síntesis y acumulación de astaxantina por la microalga (18).

El fósforo es otro macronutriente esencial para el crecimiento de *H. pluvialis*. Sin embargo, su deficiencia aumenta el porcentaje de células inmóviles en un 40%, las cuales posteriormente acumulan astaxantina. Combinado con el aumento de NaCl, puede incrementar su eficiencia (24). Esto se debe a que el fósforo (P) está relacionado con la asimilación de carbono fotosintético en el ciclo de Calvin, lo que afecta la tasa fotosintética de *H. pluvialis*. Cuando la disponibilidad de fósforo inorgánico (Pi) disminuye, se produce un desequilibrio en la producción de energía ATP (48), lo que induce el enquistamiento y el almacenamiento de almidón para mantener su integridad.

2.2.14 Astaxantina

La astaxantina es un carotenoide liposoluble presente en algunos microorganismos, plantas y animales. Comúnmente se utiliza como suplemento en la acuicultura junto con otros carotenoides como el β -caroteno y la zeaxantina, debido a su influencia en la pigmentación. Proporciona el característico color rojizo-naranja a ciertos peces y mariscos, ya que estos no pueden sintetizarlo de forma natural como lo hacen algunas plantas, levaduras y microalgas, por lo que deben obtenerlo a través de la dieta (49,50).

Este pigmento es ampliamente valorado por su potente efecto antioxidante y su capacidad para capturar radicales libres. De hecho, es más eficaz que otros antioxidantes bien conocidos en la industria, como la vitamina C, vitamina E, β -caroteno, pycnogenol y la astaxantina sintética, siendo entre 14 y 65 veces más potente en su capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Incluso es 20 veces más potente que la astaxantina sintética que actualmente predomina en el mercado y que solo se utiliza en la acuicultura debido a la falta de estudios suficientes en humanos (51). La astaxantina se produce en mayor proporción en las microalgas durante su fase quística o roja, siendo *H. pluvialis* la que contiene la mayor concentración. Por esta razón, ha sido objeto de numerosos estudios en el ámbito biotecnológico para la producción de astaxantina natural (26).

2.2.15 Diferencia entre carotenos y xantofilas, contenido de hidroxilo y cetona

Carotenos: Estos son hidrocarburos insaturados $C_{40}H_x$ que no contienen átomos de oxígeno en su estructura química por lo tanto no contiene grupos hidroxilo, ni cetona. Ejemplos comunes incluyen α -caroteno, β -caroteno y licopeno 1. Los carotenoides son responsables de los colores rojos, amarillo y anaranjados sintetizados en algunas plantas, algas y bacterias, en *H. pluvialis* estos carotenoides son aproximadamente 70% monoesteres de astaxantina 10% ésteres de astaxantina y b-caroteno, astaxantina, luteína y otros (52).

Xantofilas: Hacen parte del grupo de los carotenoides contienen átomos de oxígeno en forma de grupos hidroxilo o cetonas los cuales le proveen de diferente propiedades y funciones biológicas para reducir radicales libres (53) Ejemplos son la luteína, zeaxantina y β -criptoxantina 1. En su estructura química en los extremos terminales tiene un anillo cíclico en cada uno, los cuales son los que le confieren su actividad antioxidante debido a que están los grupos hidroxilo. Ya que los animales no pueden sintetizar de forma natural este carotenoide, se debe añadir a la dieta, por ejemplo de algunos salmónidos, langostas o aves (54,22).

2.2.16 Ruta metabólica de producción de astaxantina

En las células vegetativas sin factores de estrés predominan los carotenoides primarios como la clorofila a y b, la zeaxantina y la neoxantina. A medida que cambian las condiciones ambientales, estos carotenoides son reemplazados por carotenoides secundarios como la astaxantina (25). La astaxantina posee dos centros quirales en los anillos de β -ionona en los extremos, lo que le permite tener tres enantiómeros, que son isómeros ópticos: (3S,3S), (3S,3R) y (3R,3R). El tipo de enantiómero depende de la fuente de la astaxantina. Por ejemplo *H. pluvialis* posee mayoritariamente el enantiómero (3S,3S), *Phaffia rhodozyma* contiene principalmente el (3R,3R), mientras que los camarones y la astaxantina sintética contienen una mezcla de estos enantiómeros en diversas proporciones (52,55).

En condiciones de estrés, la microalga acumula astaxantina a partir de la conversión de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato a través de dos vías (Figura 1): la mevalonato (MVA) y la no mevalonato (MEP), generando isopentenil pirofosfato (IPP), un intermediario clave en la conversión. El IPP se isomeriza a dimetilalil difosfato (DMAPP), posiblemente por la acción de la 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR). Finalmente, se forma el pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), con ayuda de la fitoeno sintasa (PSY), da lugar al fitoeno (precursor de algunos carotenoides). Posteriormente, en cuatro reacciones catalizadas por la fitoeno desaturasa (PDS) y el caroteno desaturasa (ZDS), se forma el licopeno altamente insaturado. Los extremos del licopeno sufren una ciclación catalizada por licopeno ciclasas (LCY-e y LCY-b), produciendo así α -caroteno y β -caroteno (precursor de la astaxantina como carotenoide). En estos últimos pasos, se da la oxigenación de la astaxantina, al ser un carotenóide xantofilo que posee átomos de oxígeno en su estructura.

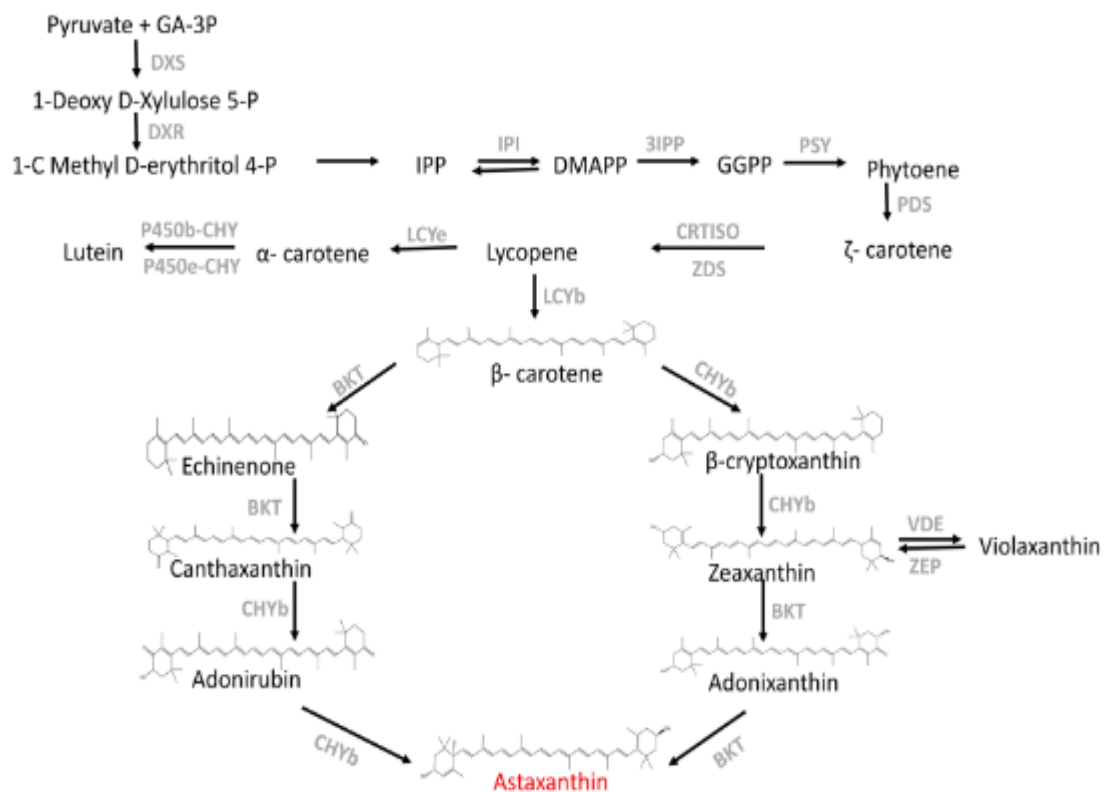


Figura 1.

Ruta de biosíntesis de carotenoides en microalgas.: abreviaturas y nombres de genes: DXS: D-xilosa sintasa, DXR: D-xilosa reductasa; Ipi: isopentenil difosfato isomerasa; IPP: pirofosfato de isopentenilo; DMAPP: difosfato de dimetilalilo; PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; ZDs: ζ-caroteno desaturasa; CRTISO: carotenoide isomerasa; LCYe: licopeno ε-ciclasa; p450bCHY: citocromo p450 β-hidroxilasa; p450eCHY: citocromo p450 ε-hidroxilasa; CHYb: β-caroteno hidroxilasa; BKT: β-caroteno cetolasa; ZEP: zeaxantinoepoxidasa; VDE: violaxantina de-epoxidasa (56)

En estos procesos actúan la β-caroteno cetolasa (BKT) y la β-caroteno hidroxilasa (CrtR-b), siendo BKT la que mayor afinidad presenta. Dependiendo de la ubicación de los grupos OH, puede producir 3 isómeros. En *H. pluvialis* predomina la isoforma (3S,3S). Los genes se regulan positivamente, y uno de ellos es el gen BTK en la etapa de palmella. El paso de β-

caroteno a astaxantina puede tener precursores intermedios, como equinenona, zeaxantina, cantaxantina, entre otros (56, 57, 58).

2.2.17 Astaxantina: Usos y aplicaciones

La astaxantina es un carotenoide ampliamente utilizado por tener una gran capacidad como antioxidante y pigmento, la mayor parte del mercado se concentra en la industria acuícola, en el cultivo de peces ya que ayuda a mejorar la reproducción aumentando la cantidad y la calidad del semen ya que provee la capacidad de proteger las células testiculares del estrés oxidativo (59), por su poder como pigmento incluso más alto que otros carotenoides dota del color rojo- anaranjado a algunos peces como los salmónidos, langostas, camarones ya que estos animales no pueden sintetizar astaxantina naturalmente sino deben ser incorporados a la dieta (54, 60, 61,).

En cuanto a beneficios que han sido estudiados para la salud humana, la astaxantina natural otorga una protección de los rayos UV y colaborar en mantener una piel sana (62), ayuda a inhibir la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) en los vasos sanguíneos y la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) evitando la aterogénesis que consiste en una placa de lípidos en los vasos que puede disminuir el flujo sanguíneo contribuyendo a problemas cardíacos asociados al estrés oxidativo (45,64), aumentar los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) o colesterol bueno que se encarga de disminuir la LDL, lo que la hace aún más eficiente (65), reduce los marcadores inflamatorios y estrés oxidativo (66), aumenta la neuroprotección y ayuda a combatir la degeneración macular asociada a la edad (67,68).

3 Diseño metodológico

3.1 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 fotoperiodo 20h luz/ 4h oscuridad y luz led blanca con irradiancia en promedio de 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22.512) 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).

3.2 Hipótesis, variables e indicadores

El uso de las condiciones combinadas de estrés, deficiencia de nutrientes y alta irradiancia de luz led blanca incrementa la producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* en los medios BBM y KM.

Variables dependientes

Producción de astaxantina y clorofila, cambio morfológico

Indicadores:

$\mu\text{g}/\text{mL}$ astaxantina, $\mu\text{g}/\text{mL}$ Clorofila

Morfología: vegetativa, palmella, aplanospora

Variables independientes

Condiciones de estrés deficiencia de nutrientes y alta intensidad de luz led blanca
 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) utilizando la microalga *H. pluvialis* UTEX 2505 y
 los medios KM y BBM

Indicadores:

Luz: iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips),
 intensidad lumínica de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 7 por 15 días. Período de estrés iluminación con
 luz led blanca con intensidad lumínica de 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes).

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

3.3 Metodología propuesta

Microorganismo

H. 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).

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

Tabla 2. Composición del medio Volvox-Mes

Condiciones de cultivo

Preparación del Inóculo:

Para preparar el inóculo se tomará una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX 2505 y se transferirá asepticamente a un Erlenmeyer de 500 mL que contiene 200 mL de medio Volvox-MES fresco y estéril bajo continua iluminación, CO₂ 5% en aire, agitación continua a 25 °C por 4 días. Para todos los experimentos un cultivo de 4 días es usado como el inóculo (en la fase exponencial de crecimiento).

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

Sistema de cultivo

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

Medios:

Tabla 3. Composición del medio BBM (42)

MEDIO BBM (g/L)
NaNO ₃ 0.25
CaCl ₂ .2H ₂ O 0.025
K ₂ HPO ₄ 0.075
KH ₂ HPO ₄ 0.175
MgSO ₄ .7H ₂ O 0.075
NaCl 0.025
Na ₂ EDTA.2H ₂ O 1.0×10 ⁻³
Micronutrientes
H ₃ BO ₃ 2.8×10 ⁻³
MnCl ₂ 1.8×10 ⁻³

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2×10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.4×10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08×10 ⁻³
CO(NO ₃) ₂ ·5H ₂ O	0.05×10 ⁻³

Condiciones de cultivo

Tabla 4. Composición del medio Kobayashi (KM) (11)

MEDIO KOBAYASHI (etal.,1993)
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

(1) Condiciones estándar:

- Cada medio estéril con el pH ajustado se adiciona en biorreactores de 500 mL hasta un volumen de 400 mL. Se sellan para garantizar esterilidad.
- Se procede a adicionar el inóculo de la microalga 1x 10⁴ Cel./mL).
- Se realiza el montaje de cada medio por triplicado en forma aleatoria, bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, temperatura 20°C, agitación continua, aire filtrado, fotoperiodo 18 horas luz: 4 horas de oscuridad, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ por 15 días.
- Toma de muestra cada siete días en forma aséptica.
- Conservación de las muestras en solución formosalina (1:9), en una proporción 1:1, se toman 500 μl y se realiza control del cultivo (conteo celular y ver

morfología) y el resto de muestra se utiliza para medición de pH. El conteo celular se realiza en cámara de Neubauer

- Se lleva control de Temperatura, agitación, iluminación, medios.

(2) Condiciones de estrés: deficiencia de nutrientes, fotoperiodo 20 horas luz:4 horas oscuridad y luces led blanca con irradiancia $303.75 \text{ umol/ m}^2/\text{s}$ (22512 luxes).

Generación de las curvas de crecimiento

Se construirán curvas de crecimiento a partir de al menos tres ensayos independientes. Se tomará una muestra cada siete días para la determinación del número de células por mL por microscopía. Las tendencias de crecimiento se ajustarán al modelo logístico mediante la transformación de los valores de Y a los cuales se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. Se utilizará el Software Dmfit 2.0 para determinación de parámetros cinéticos, según modelo Baranyi-Roberts.

Determinación del pH

El pH se determinará utilizando un potenciómetro marca Hanna Instruments tomando 15 mL de muestra. El potenciómetro se calibrará 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 lavará con agua destilada y se procederá a la lectura de la muestra.

Fase 2. Cambio morfológico

Se evaluarán los cambios morfológicos usando la cámara de Neubauer. Para el monitoreo de la microalga se utilizará un microscopio de luz marca OLYMPUS CX31 para determinar el

color, tamaño, viabilidad y morfología de las células, realizando registro fotográfico a 40x (26).

Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.

Se realizará el procedimiento APHA (11). Inicialmente se tomará 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 adicionará 1 mL de metanol al 90% y se calentará 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 ug/mL) con patrones de referencia, la lectura espectrofotométrica se hizo en el equipo Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 667 nm para clorofila (ver Anexo 1) y 477 nm para astaxantina (Ver Anexo 2), con el fin de encontrar las concentraciones en ug/ml. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Diseño experimental y análisis de datos

Cada experimento se repetirá tres veces con al menos tres replicaciones. Todas las observaciones y cálculos se harán separadamente para cada set de experimentos y se expresarán en promedio de 6SD. La significancia ($P < 0.05$) de las variables estudiadas se medirá por un análisis de varianza (ANOVA) y Test t.

4 Resultados

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

El crecimiento de la microalga *H. pluvialis* se presenta con una densidad celular máxima en los medios BBM y KM fue de $6,9 \times 10^6$ cel./mL y $4,1 \times 10^6$ cel./mL, respectivamente. En el tratamiento realizado en el medio BBM se presentó un 30% más de crecimiento de la microalga respecto al tratamiento realizado en el medio KM (Ver Figura 2)

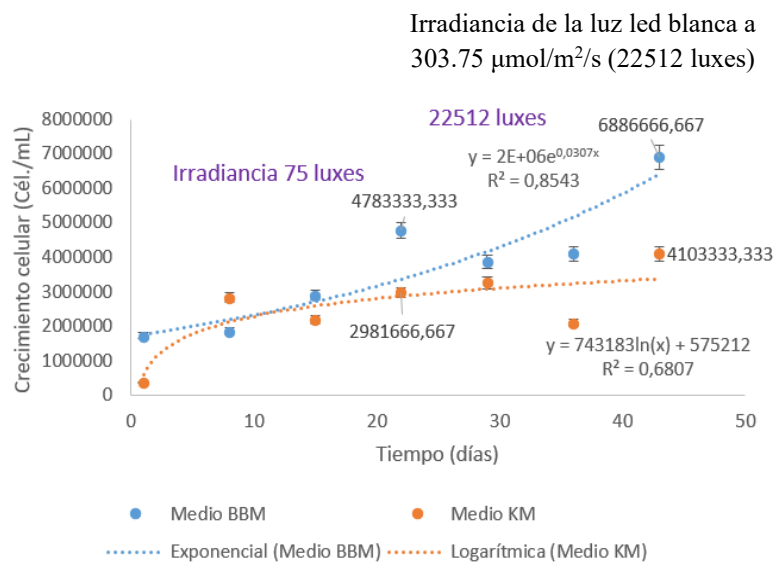


Figura 2. Curva de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en medios BBM y KM. ANOVA (95%) indica que no hay diferencias significativas ($F=2,12;P=0,170;gl=1$), Elaborado por el autor, 2024.

El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas en el crecimiento de la microalga ($F=2,12;P=0,170;gl=1$), lo cual indica que los dos medios sirven para el crecimiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas, sin embargo el mayor crecimiento se observa en el medio BBM con un valor de $6,9 \times 10^6$ cel./mL.

Las tendencias de crecimiento se ajustaron al modelo logístico ver figura 3

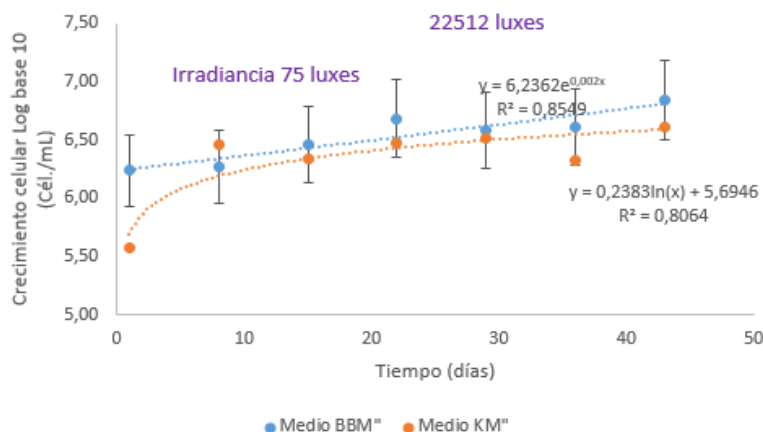


Figura 3. Modelo logístico aplicado al crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en medios BBM y KM.

Elaborado por el autor, 2024.

A continuación, se presenta los coeficientes del modelo logístico aplicado al crecimiento de la microalga *H. pluvialis* en los medios BBM y KM bajo las condiciones de crecimiento y de estrés aplicadas aumentando la irradiación de luz led blanca (Figura 3) (Tabla 5).

Tabla 5 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*	7	5,5	6,4	0,019	81
BBM *	7	6,24	6,88	0,020	86

* Con luz led blanca alta irradiación $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes).

Los resultados del Modelo logístico, establecieron que el medio que favorece el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* es el medio BBM combinado con las condiciones de trabajo anteriormente descritas y estrés de alta irradiación $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes), presentando una velocidad de crecimiento de $0.020 / \text{día}$ ($R^2 = 0,86$) correspondiente a un crecimiento de $6,9 \times 10^6$ células/mL (figura 2 y 3).

Los resultados del Modelo Baranyi-Roberts, se presentan en la Figura 4 y Figura 5, así como en la Tabla 5 bajo las condiciones de estrés trabajadas, estableciéndose que el medio que favorece el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* es el medio KM combinado con las condiciones de trabajo anteriormente descritas y estrés de alta irradiancia $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes), presentándose una velocidad de crecimiento de 0.131 ± 0.0911 / día ($R^2 = 0,871$) correspondiente a una crecimiento de $4,1 \times 10^6$ células/mL (figura 2 y 4).

Figura 4. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio KM.

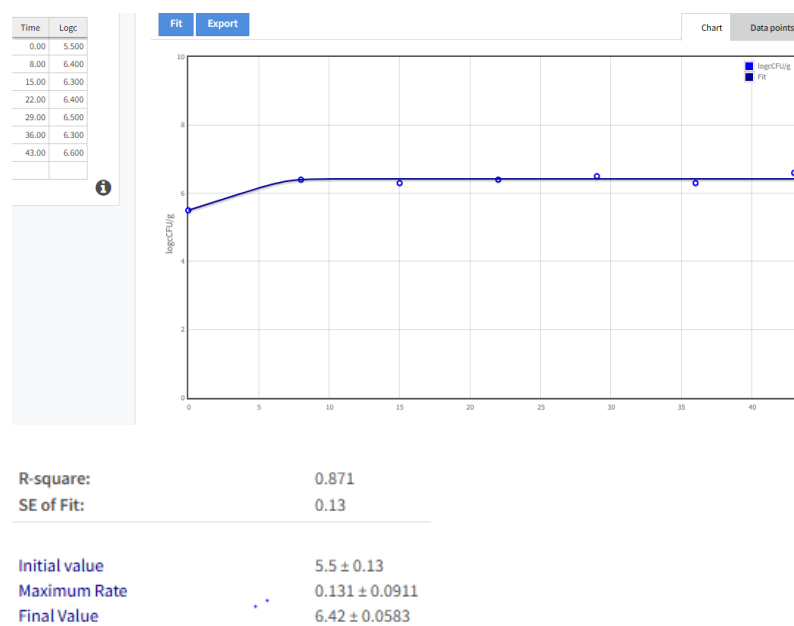
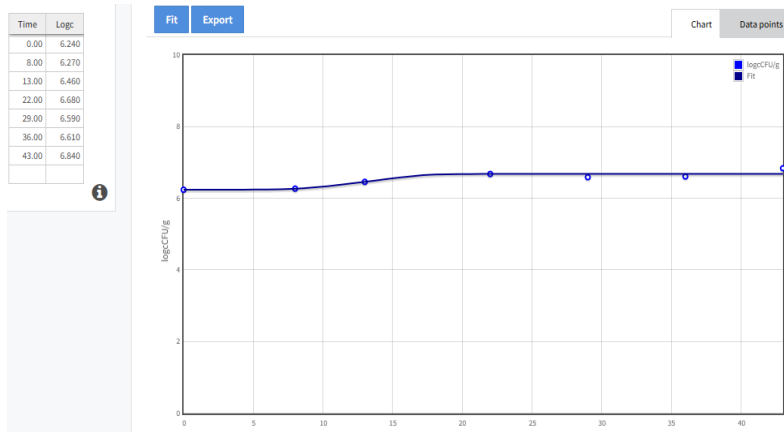


Figura 5. Modelo Baranyi-Roberts, en el medio BBM



R-square:	0.729
SE of Fit:	0.113
Initial value	6.24 ± 0.113
Lag/shoulder	8.735 ± 7.682
Maximum Rate	0.0511 ± 0.0779
Final Value	6.68 ± 0.0568

Tabla 6. Matriz de coeficientes del modelo de crecimiento logístico o Baranyi- Roberts (1994) ajustado para los diferentes medios de cultivo. Elaborado por el autor 2024.

Medio de cultivo	Nº Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento (día ⁻¹)	Coefficiente de determinación (R ²)
KM *	7	5,5	6,4	0.131 ± 0.0911	87
BBM *	7	6,24	6,88	0.0511 ± 0.0779	73

* Con luz led blanca y alta irradiancia 303.75 μmol/m²/s (22512 luxes).

Según modelo Baranyi-Roberts (1994), el cultivo con mayor velocidad de crecimiento fue el medio KM con 0.131 ± 0.091 /día. (ver tabla 6).

Según los resultados observados se puede establecer que el modelo que más se ajusta a las condiciones del crecimiento y de estrés establecidas en este trabajo para la microalga *H.*

pluvialis es el modelo Baranyi y Roberts (1995) cuando se usa el medio KM combinado con estrés con luz led blanca y alta irradiancia de $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes), presentando una velocidad de crecimiento de 0.131 ± 0.0911 /día ($R^2 = 0.87$) valor más cercano a 1, (Ver Tabla 6), lo que sugieren que este modelo explica matemáticamente el comportamiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas.

Determinación del pH

En la figura 6, se presentan los valores de pH de los tratamientos realizados en los medios BBM y KM, utilizando condiciones de estrés con luz led blanca.

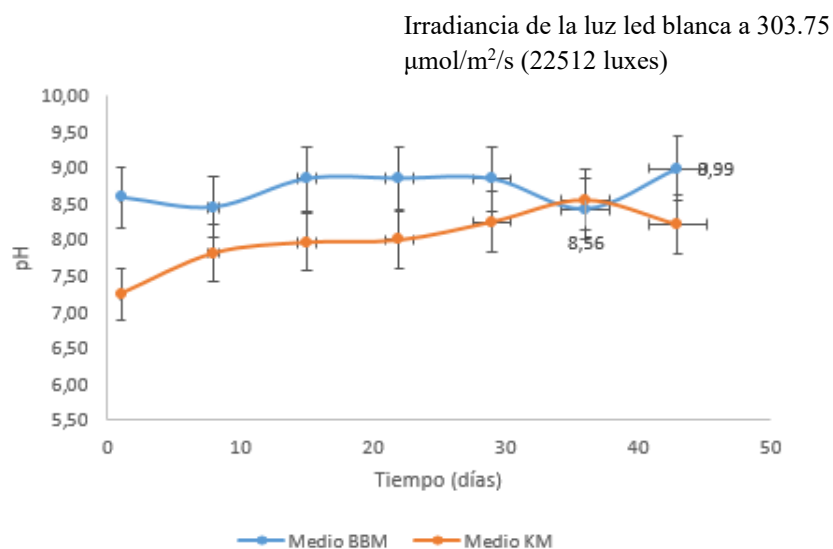


Figura 6. pH de los cultivos de la microalga *H. pluvialis* en los medios BBM y KM. ANOVA (95%) indica que hay diferencias significativas entre tratamientos ($F=15,9$; $P=0,001$; $gl=1$). pH Medio BBM estadísticamente significativo ($t= 3,99$; $P= 0,001$). Elaborada por el autor, 2024.

























En el medio de cultivo BBM se visualizó un rango de pH de 8.4 a 8.9 y para el medio KM de 7.2 a 8.9, (Ver Anexo 7) al realizar un promedio de estos intervalos se encontró que el pH promedio es de 8.35, alcalinidad ligera, haciendo una correlación entre el crecimiento celular y el pH ideal. El ANOVA (95%) realizado indica que hay diferencias significativas en el pH de los medios la microalga ($F=15,9$; $P=0,001$; $gl=1$) (Ver Anexo 10), se visualiza una mayor tasa de crecimiento en el día 43 con un pH de 8.9 en el medio BBM, con un crecimiento de

$6,9 \times 10^6$ cel/mL, Siendo estadísticamente significativo ($t= 3,99$; $P= 0,001$). Los valores de pH se encuentran dentro del rango de pH establecido para la microalga 5,0 a 9,0.

Fase 2. Cambio morfológico

En la observación macroscópica (Tabla 7) se ve cambio de color inicial verde y a partir del día 22 a color amarillento y aclaramiento del color de los medios de cultivo KM y BBM por efecto del aumento de irradiancia de luz led blanca con un valor de $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes). La morfología presentada por las microalgas en los dos medios de cultivo bajo las condiciones de cultivo y de estrés se observan en la (Tabla 8). En la fase vegetativa la microalga presenta formas redondas de menor tamaño de color verde, flagelos y en fase de estrés por el aumento de irradiancia de la luz led blanca a $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) se presentaron células de mayor tamaño enquistadas sin flagelos en los dos medios llegando a palmella y enquistada.

Tabla 7 Cambio macroscópico de *H. pluvialis* en los medios BBM y Kobayashi. Elaborado por autor, 2024.

Tratamiento Días	BBM 1	BBM2	BBM3	KM1	KM2	KM3
1						
8						
15						
303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes)						






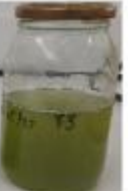












29						
36						
43						

Tabla 8. Morfología de *H. pluvialis* en los medios BBM y Kobayashi. Elaborado por autor,2024.

Tratamiento Días	BBM 1	BBM2	BBM3	KM1	KM2	KM3
1						
8						
15						
303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes)						
29						
36						
43						

Fase 3. Determinación de clorofila y astaxantina.

En la Figura 7 y Figura 8 se presenta la concentración de clorofila y de astaxantina, encontrada durante el cultivo de la microalga *H. pluvialis* bajo las condiciones trabajadas

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

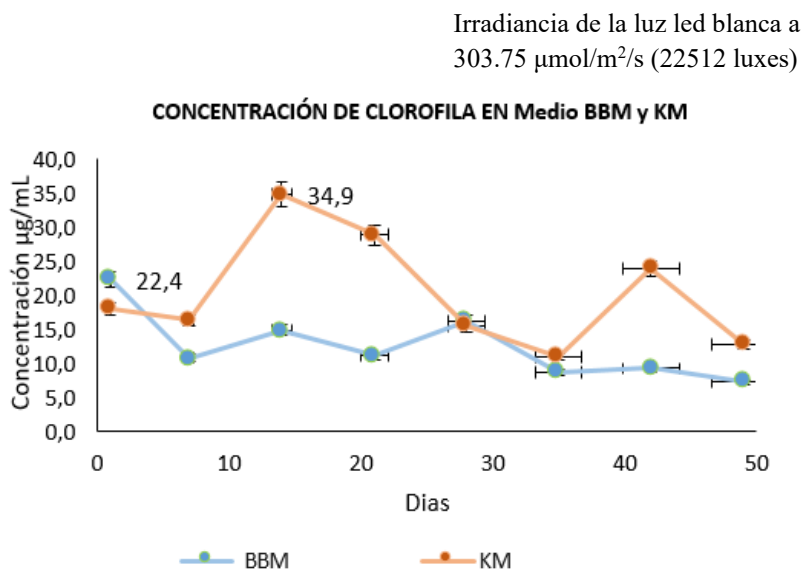


Figura 7. Concentración de clorofila obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios BBM y KM. El ANOVA (95%) indica que hay diferencias entre tratamientos ($F=4,84; P=0,045; gl=1$), Elaborada por el autor, 2024.

En la figura 7 se observa que el tratamiento realizado en el medio BBM presenta una mayor concentración de clorofila inicialmente llegando a 22,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bajo una menor irradiancia 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. En el tratamiento realizado en el medio KM se presentó una mayor producción de clorofila de 34,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la microalga *H pluvialis* bajo las condiciones trabajadas de menor irradiancia 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Ver Anexo 5) El ANOVA (95%) realizado indica que hay diferencias significativas en la producción de clorofila en la microalga ($F=4,84; P=0,045; gl=1$), (ver Anexo 8), siendo estadísticamente significativa para medio KM ($t=2,20; P=0,02$) (Ver Anexo 6) ya que se presentó un mayor contenido de clorofila en el medio KM correlacionado con un crecimiento de $2,98 \times 10^6$ cel./mL.(Figura 2). Se observa

en general que al aumentar la irradiancia de la luz led blanca a 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) a partir del día 22 se observa una disminución del contenido de clorofila, posiblemente relacionado con una fotoinhibición causada por el impacto de la irradiancia alta de luz led blanca, lo cual también se ve en la morfología con células transparentes (Tabla 8).

DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA

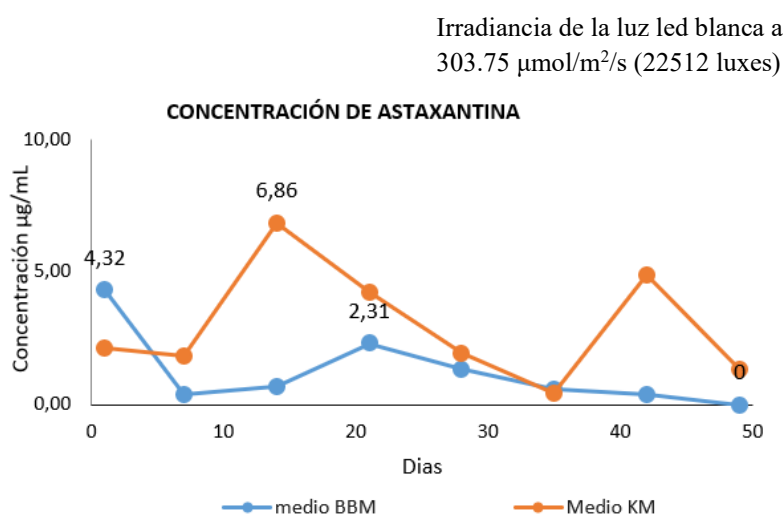


Figura 8. Concentración de astaxantina obtenida durante el cultivo de *H. pluvialis* en los medios BBM y KM. El ANOVA (95%) indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($F=3,44$; $P=0,085$; $gl=1$), lo Elaborada por el autor, 2024.

En los resultados presentados en la Figura 8, se evidencia que el medio de cultivo con mayor producción de astaxantina fue el tratamiento realizado en el medio de cultivo KM con 6,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y para el medio BBM fue mayor la producción con 4, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bajo una irradiancia de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, disminuyendo a 2,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bajo una alta irradiancia de 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes). Se observa en general que el aumento de la irradiancia a 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ disminuyo la producción de astaxantina, posiblemente relacionado con una fotoinhibición causada por el impacto de la irradiancia alta de luz led blanca, lo cual también se ve en la morfología con células transparentes (Tabla 8).

Según los resultados obtenidos el tratamiento realizado en el medio KM presenta una producción 3 veces mayor de astaxantina que la obtenida en el tratamiento realizado en el medio.BBM, bajo una irradiancia baja.

El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas en la producción de astaxantina en la microalga en los dos tratamientos utilizados ($F=3,44$; $P=0,085$; $gl=1$) (ver Anexo 9), lo cual indica que los dos medios sirven para producir astaxantina en la microalga bajo las condiciones trabajadas.

Irradiancia de la luz led blanca a $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes)

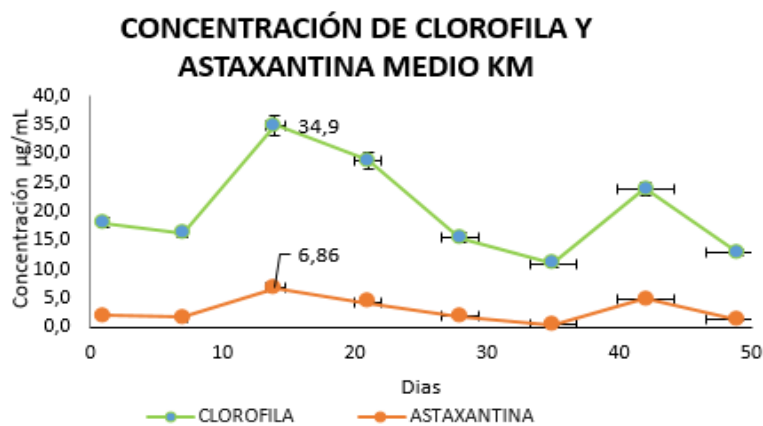


Figura 9. Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio KM. Elaboración del autor, 2024.

Irradiancia de la luz led blanca a $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes)

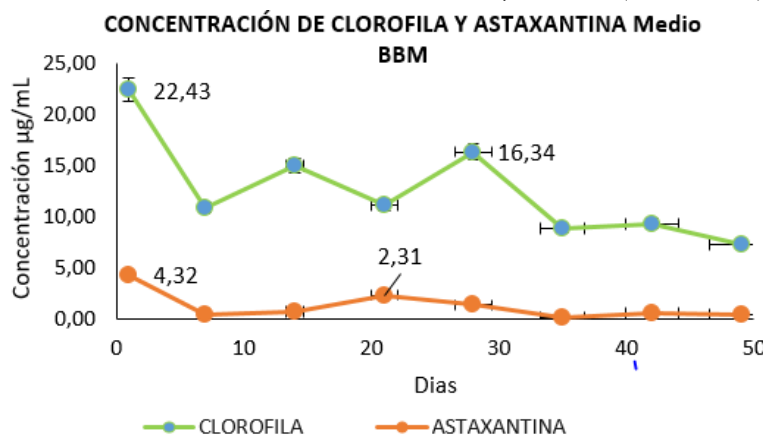


Figura 10. Clorofila y Astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio BBM. Elaboración del autor, 2025.

Se observa en las figuras 9 y 10 la relación del contenido de clorofila/astaxantina de las células de *H. pluvialis* en los dos medios de cultivos KM y BBM, respectivamente. En la Figura 9 se observa en el día 14 de cultivo en medio KM una concentración máxima de clorofila de 34,9 µg/mL y de astaxantina 6,86 µg/mL ambas bajo una irradiancia de 70 µmol/m²/s, observándose en general que las concentraciones de clorofila durante los días de cultivo fueron más elevadas con respecto a la astaxantina.

En cuanto a la figura 10 se observa que la clorofila es más alta con relación a la astaxantina en el cultivo de *H. pluvialis* en el medio BBM, su máxima concentración de clorofila fue en el día 1 con 22,4 µg/mL y la concentración máxima de astaxantina fue de 4,32 µg/mL igualmente en el día 1, bajo una irradiancia de 70 µmol/m²/s los siguientes picos más altos de clorofila y astaxantina fueron en el día 21 y 28 de cultivo respectivamente, bajo una irradiancia de 303, 75 µmol/m²/s.

A continuación, se presenta una tabla resumen de los tratamientos realizados: medios KM y BBM.

Tabla 9. Tabla resumen de los parámetros analizados y los tratamientos realizados.

Parámetro	Medio kM *	Medio BBM *
Crecimiento celular (cél/mL)	4,1x10 ⁶	6,9 x10 ⁶
Velocidad de crecimiento (µmáx) Modelo Logístico y coeficiente de correlación	(0,019 R ² : 0,81)	0,020 (R ² :0,86)

Velocidad de crecimiento ($\mu_{max.}$) Modelo Baranyi-Roberts y coeficiente de correlación	0.0511 \pm 0,0799 (R ² : 0,87)	0,131 \pm 0,0911 (R ² : 0,73)
Rango Ph	7,2-8,9	8,4-8,9
Clorofila ($\mu\text{g/mL}$)	34,9	22,4
Astaxantina ($\mu\text{g/mL}$)	6,86	4,32

Se puede establecer que las mejores condiciones para producción de astaxantina son el uso de medio KM utilizando luz led blanca con una irradiancia de 303.75 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) como condiciones de estrés produciendo 6,86 $\mu\text{g/mL}$ ya que si bien el medio tuvo un aumento en la producción de biomasa y una velocidad de crecimiento más baja, la concentración de astaxantina que se obtuvo fue un 37% mayor que la obtenida en el medio BBM bajo las mismas condiciones de estrés. Esto resalta que para obtener astaxantina se necesita una biomasa adecuada que permita la distribución de luz para que todas las células presentes de la microalga reciban la intensidad de luz necesaria para causar estrés y no se presente sombra de unas células sobre otras y así generar el cambio morfológico necesario que nos indica la acumulación de astaxantina.

5 Discusión

El cultivo de algas para fines biotecnológicos ha avanzado continuamente, por lo que se hace necesario optimizar los procesos de cultivo para optimizar los beneficios de las algas como *H. pluvialis* para la producción de astaxantina la cual hace parte de diversos productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos. A lo largo del desarrollo del proyecto se visualizó

como la microalga se ha adaptado a las diferentes condiciones de estrés producto de la deficiencia de nutrientes, fotoperiodo y alta irradiancia.

En los resultados más relevantes del estudio con las condiciones de pH 6,7, temperatura 20°C, agitación continua, aire filtrado, fotoperiodo 18 horas luz: 4 horas de oscuridad, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ por 15 días y etapa de estrés con deficiencia de nutrientes, fotoperiodo 20 horas luz:4 horas oscuridad y luces led blanca con irradiancia 303, 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) mostraron ser condiciones adecuadas para el estrés de *H. pluvialis* por lo que se vieron distintos cambios morfológicos indicadores de la adaptación, pasando por su diferentes estadios desde el estado vegetativo hasta las formas de palmella y aplanospora encontrándose enquistamiento.

Se encontró el mayor crecimiento de la microalga en el medio BBM con un valor máximo de $6,8 \times 10^6$ células / mL con una velocidad de crecimiento de 0.0511 ± 0.0799 /día, según modelo Baranyi y Roberts (1995) con respecto al medio KM que presentó un crecimiento máximo de $4,1 \times 10^6$ células / mL y 0.131 ± 0.0911 /día en 52 días de cultivo. El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas en el crecimiento de la microalga ($F=2,12; P=0,170; gl=1$), lo cual indica que los dos medios sirven para el crecimiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas, sin embargo el mayor crecimiento se observa en el medio BBM con un valor de $6,9 \times 10^6$ cel./mL,

Lo cual se puede presentar porque el medio de cultivo BBM contiene más concentración de macronutrientes como el Nitrato de sodio (NaNO_3 0.25g/L) y Fosfato de potasio (KH_2PO_4 0.075g/L). Hernández (2019), justifica que en el medio BBM hay más consumo de nitrógeno por ende mayor producción de biomasa en la microalga. Diferentes autores presentan buenos resultados en el crecimiento de la microalga *H. pluvialis* por el uso de medio BBM (4,5,11,16,), siendo estos micronutrientes importantes en el metabolismo y la estructura de la

célula como parte de los ácidos nucleicos y proteínas estructurales (69,70). Como en el estudio realizado por Manrique-Pinzón (2019) quien obtuvo mejor concentración en el medio BBM con $2,88 \times 10^7$ cel/mL. lo que puede indicar que el medio BBM es mejor para el crecimiento de la microalga *pluvialis* bajo las condiciones trabajadas usando luz blanca ya que obtuvo una mayor concentración celular, con de 6.8×10^6 cel./ mL con respecto al medio KM el cual no cuenta con estos macronutrientes obteniendo de crecimiento $4,1 \times 10^6$ cel./mL, siendo su principal fuente nutricional la asparagina. Sin embargo, en el estudio de Imamoglu et al. (2019), arrojó que el mejor medio para producir biomasa fue el RM seguido del BBM con producciones de $9,50 \times 10^6$ cel/mL y $8,5 \times 10^6$ cel/mL respectivamente.

El modelo que más se ajusta al crecimiento de la microalga y que explica su comportamiento corresponde al modelo Baranyi y Roberts (1995), modelo que explica cómo afectan las condiciones ambientales el crecimiento de la microalga (71,72), como son las condiciones de estrés utilizadas en este estudio cuando se usa medio KM bajo irradiancia de $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) con un R^2 de 0.87 muy cercano a 1, con respecto al tratamiento realizado en el medio BBM con R^2 0.73. Para el tratamiento realizado en el medio BBM en el cual se presentó el mayor crecimiento, se explica mejor el comportamiento de la producción de biomasa de la microalga *H. pluvialis* por el modelo logístico con un R^2 de 0,86 y una velocidad de crecimiento de 0,020/día.

En los medios de cultivo se pudo observar que el contenido de clorofila era mayor con una irradiancia de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ lo que puede indicar una buena adaptación a la luz mostrando que el predominio de la microalga era en un estado vegetativo (verde) porque esta intensidad de luz favorece el crecimiento vegetativo y no favorece la producción de astaxantina (Oslan et al, (61)(Tabla 8) la cual cuenta con más contenido de clorofila, los dos medios de cultivo obtuvieron una máxima concentración en la fase de crecimiento, después

de los 15 días de cultivo y entrar en la fase de estrés, al aumentar la intensidad de luz a $303,75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la clorofila disminuyó considerablemente en los dos medios de cultivo debido a que estas irradiancia entre 100 y $500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ favorece la producción de astaxantina, pero si se deja demasiado tiempo se puede presentar fotoinhibición (37).

Se presentó un pH entre 8,3 y 8,9 en el cultivo de la microalga *H. pluvialis* realizada en el medio BBM y un pH de 7,3 a 8,5 para el cultivo realizado en el medio KM, bajo las condiciones trabajadas concordando con el pH adecuado para el correcto crecimiento de la microalga que varía entre 6.5 y 9.0 como lo reporta la literatura (29,30,31), los cuales describen que el mayor crecimiento de la microalga es en estos rangos, lo cual permitió el crecimiento en los medios de cultivo.

La mayor producción de astaxantina se presentó en el medio de cultivo KM con $6,86 \mu\text{g}/\text{mL}$, y para el medio BBM fue de $4,32 \mu\text{g}/\text{mL}$ bajo una irradiancia de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, disminuyendo a $2,32 \mu\text{g}/\text{mL}$ bajo una alta irradiancia de $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes). El ANOVA (95%) realizado indica que no hay diferencias significativas en la producción de astaxantina en la microalga en los dos tratamientos utilizados ($F=3,44$; $P=0,085$; $gl=1$), lo cual indica que los dos medios sirven para producir astaxantina en la microalga bajo las condiciones trabajadas a una baja irradiancia de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. En comparación con los resultados obtenidos por Hernandez, (2019), quien obtuvo mejores concentraciones en el medio BBM con $8,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Para aumentar la producción de astaxantina se recomienda usar reactores tipo Bach, con poco nivel de profundidad según los volúmenes de biomasa a utilizar, ya que en el fondo se segregan las microalgas formando capas lo cual impide el paso de la luz y la distribución proporcional de la luz en las mismas, ya que las células más superficiales recibirán más intensidad de luz y entrarán en una fase de estrés mientras las otras aún siguen en estado vegetativo. Si no es posible, se recomienda la importancia de tener

una agitación continua de los biorreactores para cumplir con una buena distribución de intensidad lumínica, para así asegurar una buena distribución luminosa 72)

El impacto de luz blanca sobre un cultivo fotoautotrófo en la microalga *H. pluvialis* se ha comprobado que tiene la capacidad de promover el paso de la célula vegetativa móvil a la fase enquistada inmóvil como lo obtuvieron los autores Kuo Zhao et al. (2022) y Torres et al. (2021), ya que una alta irradiancia sobreexcita los fotosistemas captadores de luz, estructuras encargadas de oxidar el agua para obtener energía convirtiendo los pigmentos en ATP y NADPH a través de una cadena de transporte de electrones fotosintéticos, liberando protones y oxígeno O₂. La liberación de especies reactivas de oxígeno, se da cuando el estrés sobrepasa los límites de captación de luz por el fotosistema y hay una fotoinhibición lo cual hace que disminuya la productividad de la microalga minimizando el nivel de clorofila y astaxantina, fotoinhibiéndolas. Como lo obtuvo Ma R et al. (2021), el cual a una irradiancia de 600-800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ obtuvo un decrecimiento en la biomasa lo que se correlaciona con hallazgos observados en el presente estudio con las células sin color (Tabla 8).

En estudio de Oslan et al.(2021) se puede observar que la alta irradiancia con luz blanca, el ciclo de Calvin y el ciclo de TCA (ciclo del ácido tricarbóxico) proporcionaban más precursores para otras vías como el enquistamiento de la célula aumentando la producción de astaxantina, lo que confirma que una irradiancia óptima para la producción de astaxantina en *H. pluvialis* oscila entre 100 y 500 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dependiendo de la fase de crecimiento y las condiciones de cultivo.(4, 8, 11), lo cual se presentó en el trabajo realizado ya que bajo una irradiancia de 303.75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) usando luz led blanca se obtuvo hasta 6,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de astaxantina en el tratamiento realizado en el medio KM y las células de la microalga entraron en fase de estrés produciendo pigmentos secundarios como la astaxantina con un cambio en la morfología de células vegetativa verdes biflageladas a células con mayor tamaño, redonda y de pared más gruesa lo que le provee el poder protector

formando aplanosporas (73, 74). Este cambio morfológico y la producción de astaxantina responde también al aumento de la expresión de los genes involucrados en la ruta biosintética de este carotenoide como son el *psy*, *pds*, *chy* y *bkt* (75,76), por efecto de los factores de estrés combinados como el aumento de irradiancia usando luz led blanca y la deficiencia de nutrientes, condiciones trabajadas en este estudio.

Se observó en los dos medios de cultivos un cambio morfológico pasando de su forma vegetativa a formas de palmella y aplanospora, debido a la combinación de condiciones de estrés alta irradiancia, luz led blanca y deficiencia de nutrientes.

6 Conclusiones

El tratamiento realizado en el medio de cultivo BBM demostró ser mejor en el crecimiento de la microalga con $6,9 \times 10^6$ cel./mL una velocidad de crecimiento de 0,020/día (R^2 : 0,86, modelo logístico) usando luz blanca fluorescente por 15 días y luego luz led blanca con una irradiancia de $303,75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes), no presentando según el ANOVA (95%) realizado diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), lo que indica que cualquiera de los dos medios sirven para cultivar la microalga, bajo las condiciones trabajadas.

El modelo que más se ajusta al crecimiento de la microalga y que explica su comportamiento corresponde al modelo Baranyi y Roberts (1995), cuando se usa medio KM bajo irradiancia de $303.75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) con un R^2 de 0.87 muy cercano a 1, con respecto al tratamiento realizado en el medio BBM con R^2 0.73.

El tratamiento realizado en el medio KM presentó mayor producción de clorofila, $34,9 \mu\text{g}/\text{mL}$ bajo la irradiancia de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. El ANOVA (95%) realizado indica que hay diferencias significativas entre tratamientos ($F=4,84$; $P=0,045$; $gl=1$), presentándose la mayor producción en el medio KM.

Se observó cambio morfológico pasando de su forma vegetativa a formas de palmella y aplanospora en los tratamientos realizados bajo las condiciones realizadas.

En el medio KM se produjo la mayor cantidad de astaxantina, 6,29 $\mu\text{g/mL}$, presentando la microalga quistes de tonalidad rojiza por acumulación de este pigmento, usando luz blanca, sin embargo, el ANOVA(95%) realizado indica que no hay diferencias significativas de tratamientos ($p < 0,05$), lo que indica que en ambos tratamientos se obtiene, bajo las condiciones trabajadas astaxantina.

Se estableció que el uso de la luz blanca incrementó el crecimiento de la microalga y la acumulación de astaxantina en los medios utilizados.

7 Recomendaciones

Seguir usando la irradiancia de 303,75 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (22512 luxes) de luz led blanca para producir astaxantina.

Realizar estudios de evaluación de expresión de genes relacionados con la producción de astaxantina bajo las condiciones trabajadas.

Se recomienda realizar el estudio de concentración de astaxantina por medio del método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para mayor especificidad.

Participación en eventos

EVENTO: XXII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación RedCOLSI Nodo Bogotá –

Cundinamarca “Cooperación, Innovación y Creación: una mirada desde los semilleros de

investigación



La Fundación Red Colombiana de Semilleros de Investigación RedCOLSI

Hace constar que:

José Antonio Riaño Baute
Con identificación No. 1.000.217.296

Participó en calidad de **Ponente** durante la realización del "XXII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación Nudo Bogotá - Cundinamarca" Con el proyecto: Producción de astaxantina en la microalga haematococcus pluvialis usando luz led blanca, alta irradiancia en medios km y bbrn.


Victor Molina Mandón
Director Nudo Bogotá-Cundinamarca

Se hace entrega en Bogotá, a los 30 días del mes de agosto de 2024.

ORGANIZA

APOYAN



8 Bibliografía:

- (1) Cordoba Astroc N, Acero Reyes N, Duque Buitrago L, Jimenez Aguilar J, Serna Jiménez JA. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. UGCiencia. 2016 Jan 27;21:73.
- (2) Ma, Ruijuan, et al. Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions. *Bioresource Technology*, 2018, vol. 250, p. 591-602.
- (3) Christian, David, et al. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource technology*, 2018, vol. 256, p. 548-551.
- (4) Manrique-Pinzón, M, Marín Corredor, D Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y 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. [Tesis de grado]. Bogotá DC: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019.
- (5) Torres Cadavid, L, Ubaque Ramírez, J Producción de Astaxantina usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz utilizando la biomasa de la microalga *Haematococcus Pluvialis* obtenida en el biorreactor Biostat a plus de 5 L. [Tesis de grado]. Bogotá D.C: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2021.
- (6) Pitacco W, Samori C, Pezzolesi L, et al. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with hydrophobic deep eutectic solvents based on oleic acid. *Food Chem.* 2022;379(132156):132156. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132156>
- (7) Khadilkar J, Karande V, Prakash G, Pandit R. Simultaneous extraction and purification of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using adsorptive chromatography. *Bioresour Technol Rep.* 2023;24(101691):101691. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101691>
- (8) Chen F, Xu N, Liu K, et al. Increasing production and bio-accessibility of natural astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by screening and culturing red motile cells under high light condition. *Bioresour Technol.* 2022;364(128067):128067. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128067>
- (9) Ma R, Tao X, Chua ET, et al. Enhancing astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* QLD by a pH steady NaHCO₃-CO₂-C/NH₄Cl-N culture system. *Algal Res.* 2022;64(102697):102697. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2022.102697>
- (10) Tripathi U, Sarada R, Rao SR, Ravishankar GA. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresour Technol.* 1999;68(2):197–9. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00143-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00143-6)
- (11) Hernández Cortes, Á Producción de biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando los medios de cultivo ohm y kobayashi en el biorreactor tecferm de 5 litros. [Tesis de grado] Bogotá DC: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019.
- (12) Ranjbar R, Inoue R, Katsuda T, Yamaji H, Katoh S. High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor. *J Biosci Bioeng.* 2008;106(2):204–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.106.204>

- (13) Zhao K, Li Y, Yan H, Hu Q, Han D. Regulation of Light Spectra on Cell Division of the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Insights from Physiological and Lipidomic Analysis. *Cells*. 2022;11(12). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11121956>
- (14) 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. *Revista ION*. 2024;37(2):9–64. Disponible en: <https://doi.org/10.18273/revion.v37n2-2024004>
- (15) Imamoglu E, Sukan F, Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *Ijnes*. 2019;1(3):05–9. Disponible en: <https://ijnes.org/index.php/ijnes/article/view/375>
- (16) 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;11(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11020256>
- (17) Goksan T, Ak I, Gokpinar S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *J Microbiol Biotechnol*. 2010;20(9):1276–82
- (18) Du F, Hu C, Sun X, Zhang L, Xu N. Transcriptome analysis reveals the promoting effect of trisodium citrate on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light condition. *Aquaculture*. 2021;543(736978):736978. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484862100641>
- (19) Nava-Gómez, B. Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo [Tesis de Maestría en Ciencias]. Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada: 2017.
- (20) Lancheros Díaz AG, Díaz Barrera LE, Camacho Kurmen JE. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L. *Revista Mutis*. 6 de julio de 2021;11(2):64-83. Disponible en: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1780>
- (21) Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Res*. 2015;12:170–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- (22) Camacho Kurmen JE, González G, Klotz B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*. 2013;11(19):93. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009.
- (23) Granda Jara GP. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Tesis de Licenciatura]. Quito: Universidad de las Américas; 2015.
- (24) Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—multifunctional applications. *Mar Drugs*. 2020;18(9):459. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/9/459>
- (25) Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci*. 2016;7:172296. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plantscience/articles/10.3389/fpls.2016.00531/full>
- (26) Zhang C, Liu J, Zhang L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chin J Oceanol Limnol*. 2017;35(5):1205–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-017-6103-8>

- (27) Li F, Cai M, Wu Y, et al. Effects of nitrogen and light intensity on the astaxanthin accumulation in motile cells of *Haematococcus pluvialis*. *Front Mar Sci*. 2022;9:909237. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.909237/full>
- (28) Li F, Zhang N, Zhang Y, et al. NaCl promotes the efficient formation of *Haematococcus pluvialis* nonmotile cells under phosphorus deficiency. *Mar Drugs*. 2021;19(6):337. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/md19060337>
- (29) Mark Harker §, Alex J. Tsavalos, Andrew J. Young. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *ScienceDirect*. 1996; 82(2):113–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0922338X96850318?via%3Dihub>
- (30) Nino-Castillo CM, Rodriguez-Rivera FC, Diaz LE, Lancheros Diaz AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*. 2017;15(28). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000200019#:~:text=pluvialis%20se%20obtienen%20utilizando%20un,la%20respuesta%20celular%20de%20H.
- (31) Debnath T, Bandyopadhyay TK, Vanitha K, Bobby MN, Nath Tiwari O, Bhunia B, et al. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. *Food Res Int*. 2024;176(113841):113841. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841>
- (32) Sushanta Kumar Saha a, Edward McHugh b, Jeremiah Hayes a, Siobhan Moane a, Daniel Walsh a, Patrick Murray a. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresouse technology*. 2013; 128:118–24
- (33) Pereira S, Otero A. *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Res*. 2020;51(102027):102027. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.102027>
- (34) Wu K, Ying K, Zhou J, Liu D, Liu L, Tao Y, et al. Optimizing *Haematococcus pluvialis* growth using a novel microbubble-driven photobioreactor. *iScience*. 2021;24(12):103461. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.103461>.
- (35) Gamboa Herrera AD, Guerrero Martínez IM, Camacho Kurmen JE. Revisión: efecto del factor estrés, color e intensidad de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. *Rev Mutis*. 2024;14(2):1–33. Disponible en: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/revision-efecto-factor-estres-haematococcus-pluvialis>
- (36) Saha SK, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresouse technology*. 2013;128:118–24. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.biotech.2012.10.049>
- (37) Zarekarizi A, Hoffmann L, Burritt DJ. The potential of manipulating light for the commercial production of carotenoids from algae. *Algal Res*. 2023;71(103047):103047. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2023.103047>
- (38) Shareefdeen Z, Elkamel A, Babar ZB. Recent developments on the performance of algal bioreactors for CO₂ removal: Focusing on the light intensity and photoperiods. *BioTech (Basel)*. 2023;12(1):10. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2673-6284/12/1/10>

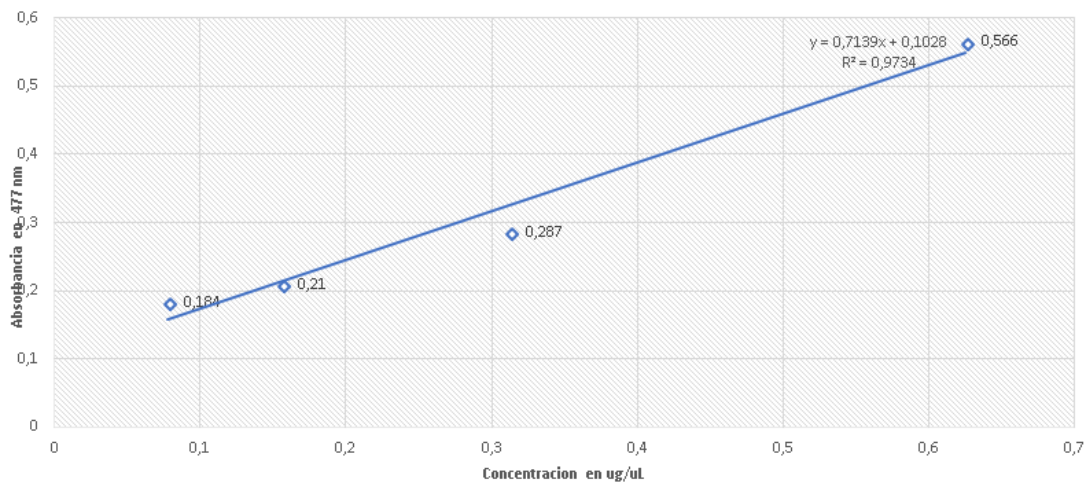
- (39) Blanken, Ward, et al. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, 2013, vol. 2, no 4, p. 333-340
- (40) Mazumdar, N., Novis, P. M., Visnovsky, G., y Gostomski, P. (2019). Effect of culturing parameters on the vegetative growth of *Haematococcus alpinus* (strain lcr-cc-261f) and modeling of its growth kinetics. *Journal of Phycology*, 55(5), 1071-1081
- (41) Hernández-Pérez A, Labbé, JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 2024;49(2), 157–173. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200001>
- (42) Previsto U. Medio Basal de Bold (BBM Bold's Basal Medium). Com.mx. Disponible en: <https://algaebank.com.mx/wp-content/uploads/2022/07/BBM-new-3.pdf>
- (43) Li F, Cai M, Lin M, et al. Accumulation of astaxanthin was improved by the nonmotile cells of *Haematococcus pluvialis*. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/8101762>
- (44) Krayem M, Khatib SE, Hassan Y, Deluchat V, Labrousse P. In search for potential biomarkers of copper stress in aquatic plants. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2021;239(105952): 105952. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105952>
- (45) Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2008;101(10):S58–68. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18474276/>
- (46) Miranda AM, Ossa EA, Vargas GJ, Sáez AA. Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *CIT Inform Tecnol*. 2019;30(1):23–32. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000100023
- (47) Fábregas J, Domínguez A, Álvarez DG, Lamela T, Otero A. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett*. 1998;20(6):623–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1005322416796>
- (48) Rychter A, Rao I. Role of Phosphorus in Photosynthetic Carbon Metabolism. 2005;2:123–48. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Idupulapati-Rao/publication/266213987_7_Role_of_Phosphorus_in_Photosynthetic_Carbon_Metabolism/links/54b680670cf2e68eb27e96e9/7-Role-of-Phosphorus-in-Photosynthetic-Carbon-Metabolism.pdf
- (49) Meyers SP. Papel del Carotenoide Astaxantina en la Nutrición de Especies Acuáticas. 2000; 473-491 Disponible en: <http://file:///C:/Users/baute/Downloads/admin,+28.pdf>
- (50) Long X, Wang L, Li Y, Sun W, Wu X. Effects of long-term *Haematococcus pluvialis* astaxanthin feeding on the growth, coloration, and antioxidant capacity of commercial-sized *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Rep*. 2023;30(101603):101603. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101603>
- (51) Capelli B, Bagchi D, Cysewski GR. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*. 2013;12(4):145–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s13749-013-0051-5>
- (52) Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M. y Petit, T. (2020). Nuevos conocimientos sobre la producción biotecnológica de astaxantina derivada de *Haematococcus pluvialis* : Avances y desafíos clave para permitir su uso industrial como nuevo ingrediente alimentario. *Journal of Marine Science and Engineering* , 8 (10), 789. <https://doi.org/10.3390/jmse8100789>

- (53) Mordi RC, Ademosun OT, Ajanaku CO, Olanrewaju IO, Walton JC. Free radical mediated oxidative degradation of carotenes and xanthophylls. *Molecules*. 2020;25(5):1038. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25051038>
- (54) Stachowiak B, Szulc P. Astaxanthin for the food industry. *Molecules*. 2021; 26(9):2666. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26092666>
- (55) Liu X, Xie J, Zhou L, et al. Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers. *Food Chem*. 2023;404(134605):134605. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134605>
- (56) ACHEAMPONG, Adolf, et al. A crosswalk on the genetic and conventional strategies for enhancing astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, p. 1-22.
- (57) Rodríguez Romero, L Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio. [Tesis de grado]. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2019.
- (58) Debnath T, Bandyopadhyay TK, Vanitha K, Bobby MN, Nath Tiwari O, Bhunia B, et al. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. *Food Res Int*. 2024;176(113841):113841. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841>
- (59) Dominguez Castanedo O, Toledano Olivares A, Avalos Rodriguez A. Efecto del suplemento de astaxantina sobre la calidad seminal en *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei: Characidae). *Lat Am J Aquat Res*. 2015;43(1):215–21. Disponible en: <https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718->
- (60) Torrissen OJ. Pigmentation of salmonids: Interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture*. 1989;79(1–4):363–74. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90478-x](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(89)90478-x)
- (61) Oslan SNH, Tan JS, Oslan SN, et al. *Haematococcus pluvialis* as a potential source of astaxanthin with diverse applications in industrial sectors: Current research and future directions. *Molecules*. 2021;26(21):6470. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26216470>
- (62) Sendra A, NPunto. Efectos del carotenoide Astaxantina en la salud humana, según la ciencia. *NPunto*. 2019;II(20):1–110. Disponible en: <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5ddb915d24571NPvolumen20-46-58.pdf>
- (63) Ito N, Seki S, Ueda F. The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people—A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2018;10(7):817. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/7/817>
- (64) Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar Drugs*. 2011; 9(3):447–65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/md9030447>
- (65) Yoshida H, Yanai H, Ito K, et al. Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2010;209(2):520–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.012>
- (66) Ma B, Lu J, Kang T, Zhu M, Xiong K, Wang J. Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Res*. 2022;99:40–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.005>

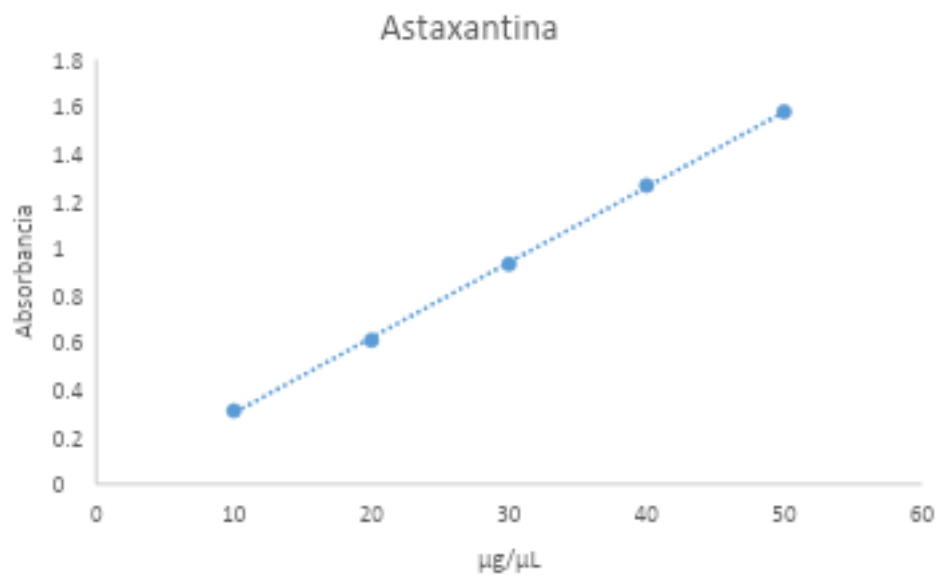
- (67) Queen CJJ, Sparks SA, Marchant DC, McNaughton LR. The effects of astaxanthin on cognitive function and neurodegeneration in humans: A critical review. *Nutrients*. 2024;16(6):826. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38542737/>
- (68) Parisi V, Tedeschi M, Gallinaro G, Varano M, Saviano S, Piermarocchi S. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy Italian study. *Ophthalmology*. 2008;115(2):324-333.e2. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17716735/>
- (69) Azizi M, Moteshafi H, Hashemi M. Distinctive nutrient designs using statistical approach coupled with light feeding strategy to improve the *Haematococcus pluvialis* growth performance and astaxanthin accumulation. *Bioresour Technol*. 2020;300:122594. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122594.
- (70) Domínguez A. R., Guerrer Legarreta I., Martínez F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. 2004;92(2):209–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
- (71) ORTIZ-MORENO, Martha Lucia, et al. Modeling the effects of light wavelength on the growth of *Nostoc ellipsosporum*. *Universitas Scientiarum*, 2020, vol. 25, no 1, p. 113-148.
- (72) BARANYI, Jozsef; ROBERTS, Terry A. Mathematics of predictive food microbiology. *International journal of food microbiology*, 1995, vol. 26, no 2, p. 199-218.
- (73) Vecchi V, Barera S, Bassi R, Dall'Osto L. Potential and Challenges of Improving Photosynthesis in Algae. *Plants (Basel)*. 2020 Jan 3;9(1):67. doi: 10.3390/plants9010067. PMID: 31947868; PMCID: PMC7020468.
- (74) Hu C, Cui D, Sun X, et al. Primary metabolism is associated with the astaxanthin biosynthesis in the green algae *Haematococcus pluvialis* under light stress. *Algal Res*. 2020;46:101768. doi: 10.1016/j.algal.2019.101768
- (75) GÓMEZ, Luisa, et al. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 2019, vol. 9, no 2, p. 7-24.
- (76) Lv H, Xia F, Liu M, et al. Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Res*. 2016;20:35–43. doi: 10.1016/j.algal.2016.09.019.

9 Anexos

● Anexo 1. Curvas de calibración de Clorofila



Anexo 2. Curva de calibración de astaxantina



Anexo 3. Mediciones de crecimiento células KM y BMM

Crecimiento celular							
Semanas	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Tiempo (día)	1	8	15	22	29	36	43
BBM1	1920000	3200000	2840000	3530000	4010000	4370000	7730000
BBM2	1730000	2250000	3080000	5750000	4420000	4860000	7940000
BBM3	1530000	130000	2800000	5070000	3160000	3070000	4990000
Promedio	1726666,66	1860000	2906666,66	4783333,33	3863333,33	4100000	6886666,66
KM1	150000	403000	113000	175000	6000000	762000	2200000
KM2	155000	2630000	2320000	2190000	1780000	3180000	4510000
KM3	830000	5510000	4130000	6580000	1990000	2320000	5600000
Promedio	378333,333	2847666,667	2187666,66	2981666,66	3256666,66	2087333,33	4103333,33

Anexo 4. Mediciones de absorbancia y concentración de astaxantina

ASTAXANTINA BBM								
muestra (días)	1	7	14	21	28	35	42	49
lectura 1	0,818	0,108	0,254	0,355	0,347	0,160	0,154	0,190
lectura 2	0,421	0,303	0,326	0,470	0,307	0,088	0,177	0,032
lectura 3	1,104	0,161	0,121	0,610	0,338	0,170	0,325	0,089
PROM ABS	0,781	0,191	0,234	0,478	0,331	0,139	0,219	0,104
Concentración astaxantin	4,5627907	-0,154817276	0,815282392	1,486378738	1,433222591	0,190697674	0,150830565	0,390033223
0,1313	1,92491694	1,140863787	1,293687708	2,250498339	1,16744186	-0,287707641	0,303654485	-0,659800664
0,1505	6,46312292	0,197342193	-0,068438538	3,180730897	1,373421927	0,257142857	1,287043189	-0,281063123
Promedio de concentraci	4,31694352	0,394462901	0,680177187	2,305869324	1,32469546	0,05337763	0,580509413	0,39

ASTAXANTINA KM								
muestra (días)	1	7	14	21	28	35	42	49
lectura 1	0,660	0,760	1,635	0,209	0,180	0,079	0,990	0,703
lectura 2	0,265	0,349	1,097	0,384	0,719	0,345	1,270	0,189
lectura 3	0,428	0,117	0,758	1,723	0,363	0,161	0,340	0,095
PROM ABS	0,451	0,409	1,163	0,772	0,421	0,195	0,867	0,329
Concentración astaxantin	3,51295681	4,177408638	9,991362126	0,51627907	0,32358804	-0,347508306	5,705647841	3,798671096
0,1313	0,88837209	1,446511628	6,416611296	1,679069767	3,904983389	1,419933555	7,566112957	0,383388704
0,1505	1,97142857	-0,095016611	4,164119601	10,57607973	1,539534884	0,197342193	1,386710963	-0,241196013
	2,12425249	1,842967885	6,857364341	4,257142857	1,922702104	0,423255814	4,886157254	1,313621262

Anexo 5.

Mediciones de absorbancia y concentración de clorofila

	CLOROFILA		BBM						
muestra (días)	1	7	14	21	28	35	42	49	
lectura 1	0,280	0,112	0,247	0,120	0,295	0,161	0,190	0,170	
lectura 2	0,394	0,259	0,375	0,182	0,293	0,122	0,143	0,070	
lectura 3	0,480	0,184	0,145	0,265	0,250	0,164	0,140	0,128	
PROM ABS	0,385	0,185	0,256	0,189	0,279	0,149	0,158	0,123	
Concentración clorofila	16,38150289	6,670520231	14,47398844	7,132947977	17,24855491	9,502890173	11,1791908	10,0231214	
	0,0034	22,97109827	15,16763006	21,87283237	10,71676301	17,13294798	7,248554913	8,46242775	4,24277457
	0,0173	27,94219653	10,83236994	8,578034682	15,51445087	14,64739884	9,676300578	8,28901734	7,59537572
Promedio de concentración	22,43159923	10,89017341	14,97495183	11,12138728	16,34296724	8,809248555	9,31021195	7,28709056	

	CLOROFILA		KM						
muestra (días)	1	7	14	21	28	35	42	49	
lectura 1	0,451	0,395	0,938	0,187	0,202	0,116	0,340	0,354	
lectura 2	0,201	0,305	0,491	0,305	0,353	0,301	0,600	0,202	
lectura 3	0,275	0,140	0,371	0,998	0,239	0,145	0,293	0,103	
PROM ABS	0,309	0,280	0,600	0,497	0,265	0,187	0,411	0,220	
Concentración clorofila	26,26589595	23,02890173	54,41618497	11,00578035	11,87283237	6,901734104	19,849711	20,6589595	
	0,0034	11,8150289	17,8265896	28,57803468	17,8265896	20,60115607	17,59537572	34,8786127	11,8728324
	0,0173	16,09248555	8,289017341	21,6416185	57,88439306	14,01156069	8,578034682	17,132948	6,15028902
Promedio de concentración	18,05780347	16,38150289	34,87861272	28,90558767	15,49518304	11,02504817	23,9537572	12,894027	

Anexo 6. Prueba t

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	12,64595374	20,19644027
Varianza	24,97470879	69,15028307
Observaciones	8	8
Diferencia hipotética de la	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-2,201240297	
P(T<=t) una cola	0,024988861	
Valor crítico de t (una cola	1,795884819	
P(T<=t) dos colas	0,049977722	
Valor crítico de t (dos cola:	2,20098516	

Anexo 7

Mediciones promedio de pH en los medios KM y BBM

pH							
Semanas	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Tiempo (días)	1	8	15	22	29	36	43
BBM1	8,66	8,53	8,77	8,74	8,8	9,27	8,94
BBM2	8,63	8,36	8,87	8,92	8,86	8,9	9,15
BBM3	8,47	8,46	8,9	8,89	8,87	7,1	8,88
Promedio	8,59	8,45	8,85	8,85	8,84	8,42	8,99
KM1	7,5	6,86	7,63	7,89	8,18	8,5	8,21
KM2	7,44	8,36	8,12	8,1	8,26	8,6	8,18
KM3	6,8	8,22	8,14	8	8,31	8,57	8,24
Promedio	7,25	7,81	7,96	8,00	8,25	8,56	8,21

Anexo 8

Resultados de tratamientos estadísticos

Análisis de varianza (Anova) clorofila

CLOROFILA	BBM	KM
	22,43	18,06
	10,89	16,38
	14,97	34,88
	11,12	28,91
	16,34	15,50
	8,81	11,03
	9,31	23,93
	7,29	12,89

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	8	101,1676301	12,64595376	24,974709
Columna 2	8	161,5915222	20,19894027	69,171689

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrado F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	228,1904211	1	228,1904211	4,8475656	0,044955214	4,600109937
Dentro de los grupos	659,0247841	14	47,07319887			
Total	887,2152052	15				

Anexo 9

Análisis de varianza (ANOVA) astaxantina

ASTAXANTINA	BBM	KM
	4,31	2,12
	0,39	1,84
	0,68	6,86
	2,31	4,26
	1,32	1,92
	0,05	0,42
	0,58	4,89
	0,39	1,31

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	8	10,04078627	1,255098283	2,024366902
Columna 2	8	23,62746401	2,953433001	4,67851725

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	11,53736325	1	11,53736325	3,442507133	0,08471448
Dentro de los grupos	46,92018906	14	3,351442076		
Total	58,45755231	15			

Anexo 10

Análisis de varianza (ANOVA) pH

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	7	60,99	8,7128571	0,0500905		
Columna 2	7	56,04	8,0057143	0,1700286		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de la	Suma de cuadrados	Grados de li	Promedio de F		Probabilida	Valor crítico para F
Entre grupos	1,750178571	1	1,7501786	15,902109	0,001801	4,7472253
Dentro de lo	1,320714286	12	0,1100595			
Total	3,070892857	13				

Anexo 11. Prueba t

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales			
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	
Media	8,712857143	8,0057143	
Varianza	0,050090476	0,1700286	
Observaciones	7	7	
Diferencia hipotética	0		
Grados de libertad	9		
Estadístico t	3,987744883		
P(T<=t) una cola	0,001584252		
Valor crítico	1,833112933		
P(T<=t) dos colas	0,003168504		
Valor crítico	2,262157163		