

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**



Optimización de las condiciones de bioproducción de xantófilas  
como ingrediente nutracéutico a partir de *Haematococcus  
pluvialis*.

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**PRESENTA**

KIRYAG JEARIM HERNÁNDEZ MORALES

**DIRECTORA DE TESIS**

DRA. MARÍA EUGENIA PEREZ MORALES

**CODIRECTORA DE TESIS**

MC. MARÍA DEL CARMEN JAUREGUI ROMO

Tijuana, Baja California; Noviembre de 2015.

# Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 158

Tijuana, B. C., a 03 de noviembre de 2015

C. Kiryag Jearim Hernández Morales  
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud  
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS

Es propuesto, por las CC. Dra. María Eugenia Pérez Morales y M.C. María del  
Carmen Jáuregui Romo

Quienes serán las responsables de la calidad de trabajo que usted presente,  
referido al tema Optimización de las condiciones de bioproducción de xantófilas  
como ingrediente nutraceutico a partir de Haematococcus pluvialis.

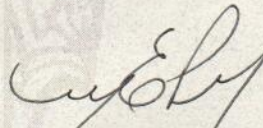
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

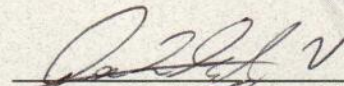
- I.- ANTECEDENTES
- II.- JUSTIFICACIÓN
- III.- OBJETIVO GENERAL
- IV.- METODOLOGIA
- V.- RESULTADOS
- VI.- DISCUSION
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA




FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA

  
Dra. María Eugenia Pérez Morales  
Directora de Tesis

  
Dr. José Luis González Vázquez  
Sub-Director Secretario

  
M.C. María del Carmen Jáuregui Romo  
Co-Directora de Tesis

  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director

---

## RESUMEN

---

**Antecedentes:** *Haematococcus pluvialis* es una microalga de interés industrial. En condiciones de estrés es capaz de producir cerca del 4% de peso seco de xantófilas principalmente astaxantina. Sin embargo, la obtención de estos pigmentos presenta algunas desventajas, por lo que es importante encontrar mejores condiciones de cultivo y producción.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de los factores medioambientales y nutricionales sobre la biosíntesis de xantófilas por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor con condiciones controladas para su uso en la producción de ingredientes nutraceuticos.

**Métodos:** El diseño del estudio fue un diseño factorial  $2^3$  con cuatro puntos centrales. Los factores evaluados fueron, intensidad de luz de 60 y 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ , longitud de onda blanco-rojo y azul y concentración de nitratos de 0.15 y 0.75 g/l. Se determinó la densidad celular, concentración de clorofila a y b, concentración de carotenoides y concentración de xantófilas. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza para medir los efectos principales e interacciones de los factores en las respuestas.

**Resultados:** Los mejores valores de operación de los factores para obtener la mejor densidad celular corresponden a una intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l. El factor con un efecto estadísticamente significativo fue la interacción entre la intensidad de luz y longitud de onda ( $P=0.0257$ ). El efecto de intensidad de luz ( $P=0.0075$ ), la interacción de intensidad de luz y longitud de onda ( $P=0.0341$ ) y la interacción entre longitud de onda y concentración de nitratos ( $P=0.0013$ ) fueron los factores que causaron un efecto significativo en la concentración de carotenoides, los mejores niveles de operación corresponden para intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ , longitud de onda 467 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l.

Intensidad de luz (0.0013) y la interacción entre la longitud de onda y concentración de nitratos ( $P=0.0011$ ) fueron los factores con un efecto significativo en la obtención de xantófilas. Los valores óptimos para alcanzar concentraciones de 0.85  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , son

una intensidad de luz de  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.15 g/l.

**Conclusiones:** De acuerdo con el análisis de varianza, la mejor combinación de factores de operación para obtener la mayor concentración de xantófilas se da en condiciones de estrés, siendo una intensidad de luz alta y deficiencia de nitratos. La longitud de onda ejerció una influencia importante en la respuesta, por lo que se determinó que un espectro amplio de longitud de onda de 467, 523 y 625 nm, es mejor para la obtención de xantófilas. En los resultados, se evidencio la presencia de interacción entre los factores, por lo que es de suma importancia analizar el efecto que generen sobre las respuestas.

**Palabras clave:** *Haematococcus pluvialis*, xantófilas, astaxantina, diseño factorial.

---

## ABSTRACT

---

**Background:** *Haematococcus pluvialis* is a microalgae of industrial interest. In conditions of stress is capable of producing about 4% of dry weight of xanthophylls mainly astaxanthin. However, the obtaining of these pigments has some disadvantages, it is important to find better growing conditions and production.

**Objective:** Evaluate the effect of nutritional and environmental factors on the biosynthesis of xanthophylls in *Haematococcus pluvialis* in a photobioreactor with controlled conditions for use in the production of ingredients nutraceuticals.

**Methods:** The design of the study was a 2<sup>3</sup> factorial design with four central points. The factors evaluated were, light intensity of 60 and 160  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ , wavelength of 467, 523 y 625 nm and nitrate concentrations of 0.15 and 0.75 g/l. It was determined the cell density, concentration of chlorophyll a and b, concentration of carotenoids and xanthophylls concentration. The results obtained with an analysis of variance were performed to measure the main effects and interactions of the factors in the responses.

**Results:** The best values of operation of the factors to obtain the best cell density correspond to a light intensity of 60  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ , wavelength of 467, 523 y 625 nm and nitrate concentration of 0.75 g/l. The factor with a statistically significant effect was the interaction between light intensity and wavelength ( $P=0.0257$ ). The effect of light intensity ( $P=0.0075$ ), the interaction of light intensity and wavelength ( $P=0.0341$ ) and the interaction between wavelength and nitrate concentrations ( $P=0.0013$ ) were the factors that caused a significant effect on the concentration of carotenoids, the best operating levels correspond to light intensity photon 160  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , 467 nm wavelength and nitrate concentration of 0.75 g/l.

Light Intensity (0.0013) and the interaction between the wavelength and nitrate concentrations ( $P=0.0011$ ) were among the factors with a significant effect on the obtaining of xanthophylls. Optimal values to achieve concentrations of 0.85  $\mu\text{g/ml}$ , are a light intensity photon 160  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , wavelength white-red and nitrate concentration of 0.15 g/l.

**Conclusions:** In accordance with the analysis of variance, the best combination of factors of operation to obtain the highest concentration of xanthophylls occurs in conditions of stress, being a light intensity high and deficiency of nitrates. The wavelength exercised an important influence on the response, so it was determined that a broad spectrum of wavelength 467, 523 y 625 nm, it is best to obtain xanthophylls. In the results showed the presence of interaction between the factors and therefore that it is of the utmost important to analyze the effect that generate on the answers.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*, xanthophylls, astaxanthin, factorial design.

---

## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>10</b>
<i>Haematococcus pluvialis</i> .....	12
Morfología, estructura y fisiología de <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	13
Aplicaciones de <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	16
Parámetros que influyen en el crecimiento y síntesis de xantófilas.....	19
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>PROCEDIMIENTO .....</b>	<b>45</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>

**LIMITACIONES.....75**

**FORTALEZAS .....76**

**7. CONCLUSIONES.....77**

**RECOMENDACIONES.....79**

**8. REFERENCIAS.....80**

**ANEXOS .....89**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Arreglo factorial del diseño experimental.	<b>33</b>
<b>2</b>	Composición química del medio de cultivo BBM modificado.	<b>36</b>
<b>3</b>	Resultados de concentración de xantófilas, carotenoides, clorofila a, clorofila b y densidad celular.	<b>40</b>
<b>4</b>	Análisis de varianza para densidad celular.	<b>45</b>
<b>5</b>	Análisis de varianza para concentración de carotenoides.	<b>50</b>
<b>6</b>	Análisis de varianza para la concentración de xantofilas.	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura	Descripción	Página
1	Células de <i>Haematococcus pluvialis</i> en su fase vegetativa con acumulación de xantófilas.	4
2	Figura 2. Colonias de <i>Haematococcus pluvialis</i> en medio solido BBM con síntesis de carotenoides.	5
3	Ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i> .	6
4	Fotobiorreactores.	35
5	Luces LEDs utilizados en las corridas experimentales.	35

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

---

Gráfica	Descripción	Página
1	Respuesta de la actividad fotosintética con respecto a la irradiancia, donde $I_c$ es intensidad de compensación, $I_s$ luz de saturación, $I_h$ Intensidad de inhibición y $P_{max}$ actividad fotosintética máxima	11
2	Gráficas de densidad celular de las corridas experimentales.	40
3	Gráfica de concentración final de clorofila a.	43
4	Grafica de concentración final de clorofila b.	44
5	Diagrama de Pareto estandarizado para densidad celular.	46
6	Gráfica de efectos principales para densidad celular.	47

<b>7</b>	Gráfica de interacción para densidad celular.	<b>48</b>
<b>8</b>	a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para densidad celular.	<b>49</b>
<b>9</b>	Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de carotenoides.	<b>51</b>
<b>10</b>	Efectos principales para concentración de carotenoides.	<b>52</b>
<b>11</b>	Gráfica de interacción para concentración de carotenoides.	<b>53</b>
<b>12</b>	a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para concentración de carotenoides.	<b>55</b>
<b>13</b>	Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de xantófilas.	<b>57</b>
<b>14</b>	Efectos principales para concentración de xantófilas.	<b>57</b>
<b>15</b>	Gráfica de interacción de intensidad de luz y longitud de onda para concentración de xantófilas.	<b>59</b>
<b>16</b>	a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para concentración de xantófilas.	<b>60</b>

---

## **ANTECEDENTES**

---

Durante los últimos años ha venido creciendo el interés por desarrollar nuevos productos que tengan un impacto benéfico en la salud del ser humano (Plaza, Cifuentes e Ibanez, 2008). Con el propósito de cubrir esta demanda se han desarrollado y comercializando diferentes productos tales como alimentos funcionales, nutraceuticos y suplementos alimenticios (Siró et al., 2008). El objetivo principal de estos productos está enfocado en mejorar la salud de los consumidores, así como ayudar a prevenir enfermedades crónico-degenerativas (Shahidi, 2009).

Existen varias fuentes de obtención de nuevos componentes bioactivos, los cuales son principalmente de origen acuático (Haefner, 2003). A pesar de que casi 18,500 nuevos componentes han sido aislados de fuentes acuáticas entre 1965 y 2006, se estima que casi el 97% de todos los componentes todavía no se han descubierto y por lo tanto no han sido sometidos a alguna caracterización química o biológica (Blunt et al., 2014). Además de su estructura química peculiar mucho de los componentes acuáticos tienen características terapéuticas importantes (Pulz y Gross, 2004), esto eleva el interés por el estudio de este tipo de sustancias con el propósito de desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos (De la Calle, 2007).

### **Microalgas**

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos, los cuales pueden usar la luz solar para la síntesis de compuestos esenciales tales como carotenoides, carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas (Costa y de Morais, 2011). La composición química de estos microorganismos fotosintéticos presentan grandes variaciones las cuales principalmente se encuentran relacionadas con factores

medioambientales tales como la temperatura, salinidad, luz y nutrientes disponibles. La mayoría de los parámetros medioambientales varían acorde a la estación, y estos cambios ecológicos pueden estimular o inhibir la biosíntesis de nutrientes (Marinho-Soriano et al., 2006).

Este tipo de microorganismos fotosintéticos siguen siendo hasta la fecha un amplio campo de investigación (Chauton, Olsen y Vadstein, 2013), representan una oportunidad única para el descubrimiento de nuevos principios activos y presentan ventajas con respecto a las plantas terrestres, las microalgas crecen fácilmente en condiciones desérticas y áreas costeras (Christaki, Florou-Paneri y Bonos, 2011). Adicional poseen la ventaja de tener una gran plasticidad metabólica que conduce a obtener una amplia gama de productos dependiendo de su estado fisiológico (Guedes et al., 2011). Similarmente, su metabolismo secundario puede ser activado por la aplicación externa de diferentes factores de estrés (Borowitzka, 2013).

Entre los metabolitos obtenidos a partir de microalgas (incluyendo cianobacterias) se encuentran las xantófilas (Guedes et al., 2011), ácidos grasos poliinsaturados (Mendes et al., 2009) y ficobilinas (Tan, 2007). Estos compuestos de alto valor agregado tienen un amplio rango de aplicación en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica (Christaki, Florou-Paneri y Bonos, 2011). Además su aplicación se extiende al campo de la biología molecular, utilizándolas como plataformas para la producción de proteínas recombinantes y el desarrollo de biocombustibles (Gong et al., 2011).

En Estados Unidos y a nivel mundial, muchas universidades y compañías biotecnológicas del sector privado (localizadas principalmente en Hawái y California)

han participado durante más de una década en la detección de metabolitos bioactivos producidos por microorganismos fotosintéticos (Olaizola y Huntley, 2003). Las microalgas y cianobacterias son los microorganismos más estudiados. Sin embargo, el desarrollo de bioprocesos innovadores y eficientes todavía sigue siendo un obstáculo para la comercialización a gran escala (Carvalho et al., 2011). A pesar de dicho obstáculo el potencial comercial de las microalgas es ampliamente reconocido (Walker et al., 2005).

Un caso particular es la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*, la cual ha sido implementada por Cyanotech (Hawái), Mera Pharmaceutical (Hawái) y por Fuji Health Science (Japón), igualmente la producción de  $\beta$ -carotenos a partir de *Dunaliella* es el objetivo de un amplio número de compañías incluyendo a Beatene®, Western Biotechnology y AquaCarotene ambas en Australia, así como Cyanotech (Hawái) e Inner Mongolia Biological Engineering (China) (Olaizola y Huntley, 2003; Del Campo, García-González y Guerrero, 2007).

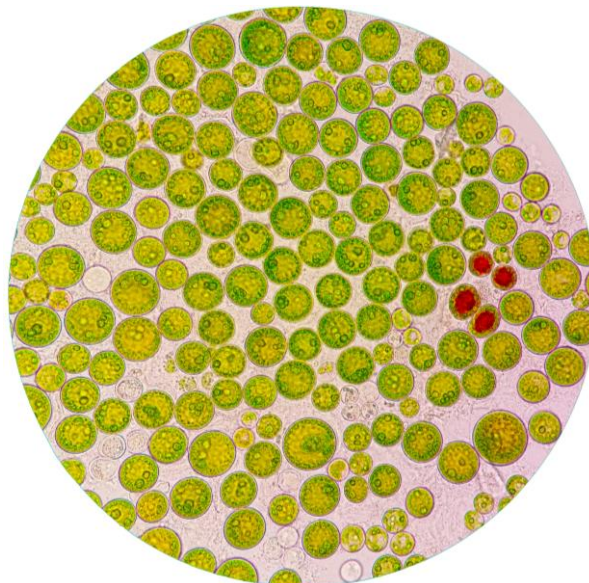
### ***Haematococcus pluvialis***

Dentro de la amplia gama de microorganismos fotosintéticos se encuentran varias especies de microalgas de interés comercial, entre ellas esta *Haematococcus pluvialis* (Han et al., 2012). Es una microalga verde, unicelular, de agua dulce, que en su clasificación taxonomía pertenece al phylum *Chlorophyta* (Sarada, Baskaran y Ravishankar, 2009). Tiene un tamaño entre 8 y 50  $\mu\text{m}$  y se caracteriza por presentar dos flagelos, lo que les confiere motilidad.

### **Morfología, estructura y fisiología de *Haematococcus pluvialis***

En condiciones favorables, los cultivos de *H. pluvialis* se componen generalmente de células vegetativas flageladas junto con células vegetativas en reposo (Katsuda et al., 2004). Las células flageladas son esféricas o elipsoidales con dos flagelos de igual longitud que salen de un extremo anterior. Las células contienen un único cloroplasto en forma de copa con varios pirenoides (Boussiba, 2000). En los cultivos líquidos, las células biflageladas (zooesporas) poseen una pared delgada, separada de la plasmalema por un gran espacio, que es atravesado por finas hebras citoplasmáticas que pueden verse seccionadas longitudinalmente, transversalmente u oblicuamente (Collins et al., 2011). En este estado, las células persisten y poseen clorofila a, b y los carotenoides primarios que normalmente se encuentran en las Clorofitas y en los cloroplastos de las plantas superiores, tales como  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina (Wayama et al., 2013).

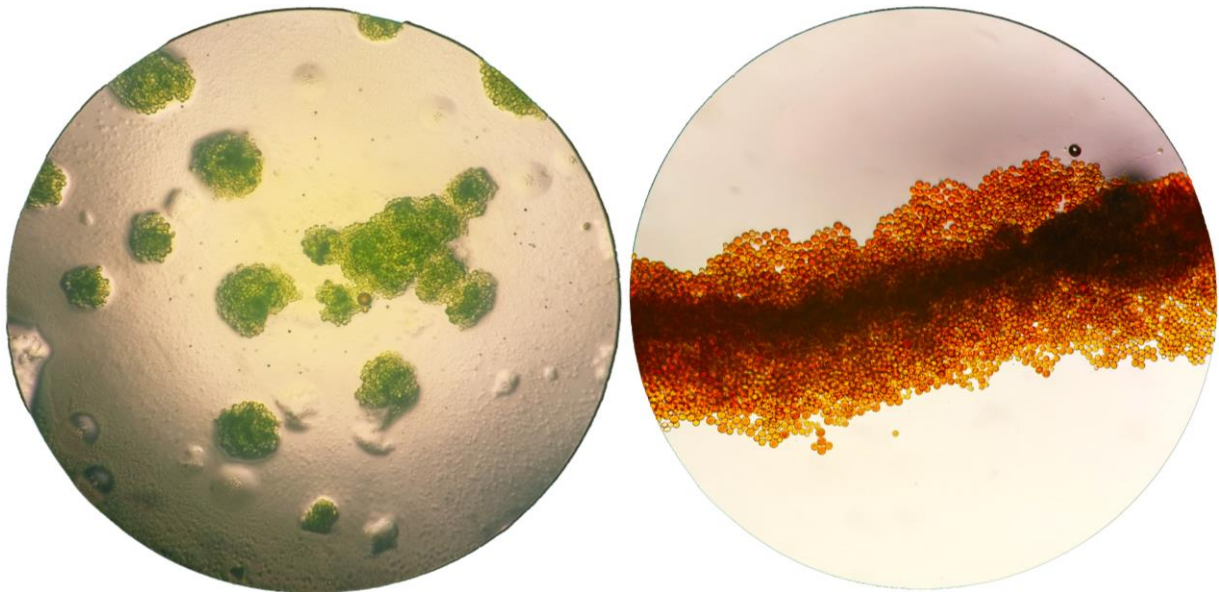
**Figura 1. Células de *Haematococcus pluvialis* en su fase vegetativa con acumulación de xantófilas.**



Cuando las condiciones ambientales llegan a ser adversas (privación de nutrientes, alta irradiación de luz, alta temperatura o alta salinidad) las células sufren cambios morfológicos, fisiológicos y en las características fotosintéticas, resultando así la formación de grandes aplanosporas rojas resistentes a las condiciones ambientales extremas (Kobayashi, 2003).

Durante la transformación, las células microalgales (ligeramente redondeadas), pierden sus flagelos, haciéndose células enquistadas inmóviles (Lemoine y Schoefs, 2010). A continuación, se forma una vaina trilaminar resistente a la acetólisis y se genera una pared secundaria de este material base y engrosada, coincidiendo con una expansión del volumen celular. Entonces se comienza a producir carotenoides secundarios tales como cantaxantina, equinenona y astaxantina seguido de una disminución de clorofilas y carotenoides primarios (figura 2) (Gu et al., 2013).

**Figura 2. Colonias de *Haematococcus pluvialis* en medio solido BBM con síntesis de carotenoides.**

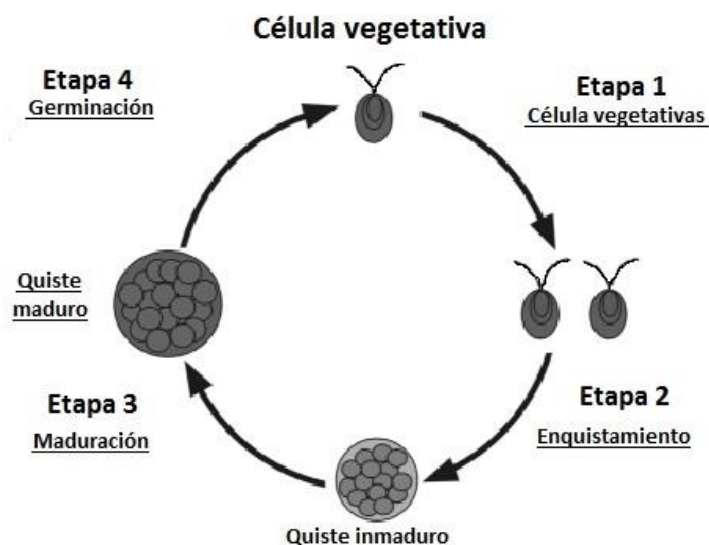


En las células móviles aparecen las primeras esferas pequeñas de inclusiones de astaxantina (limitadas cada una de ellas con una membrana no verdadera) en el citoplasma perinuclear (Han et al., 2012); En los quistes que están madurando el número de depósitos de pigmento aumenta y toman una variedad de formas. La unión de los gránulos globulares depende del incremento de las cantidades de astaxantina formada y de las fases de ciclo de vida de las células (Peled et al., 2012).

En las células maduras enquistadas el citoplasma está casi uniformemente rojo con reducidas cantidades de pigmentos en los cloroplastos. La astaxantina se dispersa hacia la periferia de las células de *Haematococcus pluvialis* bajo la inducción de luz y se mueve hacia el centro después que se interrumpe la iluminación (Han et al., 2012).

Sin embargo, este proceso es reversible, es decir, cuando los quistes maduros se transfieren a un medio fresco y se exponen a una baja de luz, las células hijas intracelulares se liberan de las células enquistadas maduras dentro del medio y las células vegetativas se regeneran de las células hijas (Fábregas et al., 2003).

**Figura 3. Ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis* (Nish y Tsuji, 1997).**



### **Aplicaciones de *Haematococcus pluvialis***

A pesar que astaxantina se puede obtener a partir de plantas terrestres, bacterias, algunos hongos, camarón y langostas, la microalga *Haematococcus pluvialis* representa la más rica fuente natural de astaxantina (García-Malea et al., 2005); El contenido de astaxantina en esta microalga puede superar el 4% de peso seco, este valor es por ahora el más alto reportado para cualquier microorganismo, incluyendo bacterias, hongos y otras microalgas (He, Duncan y Barber, 2007).

*H. pluvialis* sintetiza aproximadamente el 70% en forma monoéster, 25% diéster, y 5% en forma libre de astaxantina. La astaxantina libre junto con las formas monoéster y diéster tienen una quiralidad en forma 3S, 3'S (Denery et al., 2004). La forma de almacenamiento de astaxantina es por medio de vesículas citoplasmáticas lipídicas distribuidas a través de la célula (Grünwald, Hirschberg y Hagen, 2001). Por ello, es utilizada para la producción de astaxantina a gran escala (Kang et al., 2007).

### **Producción de astaxantina**

Hasta la fecha el sistema de cultivo de dos fases es implementado en la producción comercial de astaxantina a partir de *H. pluvialis* (Suh, Joo y Lee, 2006). La primera etapa es la fase verde donde se trabaja en aumentar la densidad celular y la segunda etapa es la fase roja la cual se enfoca en inducir la síntesis de astaxantina (Aflalo et al., 2007). En la fase verde el crecimiento celular es exponencial. Sin embargo, el contenido de astaxantina permanece en concentraciones mínimas. En la fase roja, las condiciones de crecimientos son modificadas, estos afectan de manera directa en la célula obligándola a retardar su duplicación y desencadenando respuestas fisiológicas para su supervivencia, las concentraciones de carotenoides se incrementa. Es por

eso, que en la primera fase se enfocan en obtener densidades celulares suficientes para posteriormente someter a condiciones de estrés para la producción de antioxidantes (Wan et al., 2014). Sin embargo, este proceso tiene algunas desventajas, entre ellas: pérdida de volumen por evaporación, grandes cantidades de medio de cultivo, alto riesgo de contaminación, bajo rendimiento, mezclado ineficiente y bajo control de parámetros como temperatura y pH (Brentner, Eckelman y Zimmerman, 2011). Recientemente se están desarrollando procesos de producción enfocados en el control sistematizado de estos parámetros. Una de estas tecnologías es el uso de fotobiorreactores (Yoo et al., 2012). Las ventajas del uso de fotobiorreactores en este tipo de procesos son: control de los parámetros medioambientales, baja probabilidad de contaminación y altos rendimientos (Pozza, Schmuck y Mietzel, 2010). Sin embargo, se pueden aumentar los costos en las etapas de producción (Jacobi et al., 2012). Con respecto al desempeño de *H. pluvialis*, esta microalga exhibe ciertas características desfavorables para su cultivo, tales como tasa lenta de crecimiento y ciclo de vida complejo (Jeon, Cho y Yun, 2006).

### **Xantófilas: Astaxantina**

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) pertenece a una subclase de los carotenoides denominados xantófilas (Mont et al., 2010). A diferencia del  $\beta$ -caroteno y otras moléculas de la misma clase, posee un átomo de oxígeno y un grupo -OH unidos a cada anillo terminal (Liu y Osawa, 2007).

Esta molécula de forma alargada posee una zona polar hidrofílica en los extremos y una parte no polar o hidrofóbica en el centro (Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela y Goycoolea, 2006). La parte polar está conformada por anillos  $\beta$ -ionona que tienen una

gran capacidad para inactivar radicales libres y otros oxidantes (Hussein et al., 2006). Las propiedades moleculares de astaxantina le permiten posicionarse de manera estratégica entre la membrana celular e interactuar con las lipoproteínas circulantes infundiéndoles un marcado efecto inflamatorio (Pashkow, Watumull y Campbell, 2008).

La fuente natural principal de síntesis de xantófilas es por medio de organismos fotosintéticos, principalmente las microalgas (Domínguez-Bocanegra, Ponce-Noyola y Torres-Muñoz, 2007). Generalmente, los animales la obtienen por fuente exógena; Se le ha atribuido una potencia antioxidante incluso cerca de 500 veces más potente que la vitamina E, y 38 veces más efectivo que el  $\beta$ -caroteno (Dong et al., 2014); numerosos estudios en el humano y modelos animales, han podido comprobar su eficacia (Capelli y Cysewski, 2007). Esta xantófila se ha encontrado acumulada en camarón, langosta, en tejidos de salmón y constituye un elemento de su dieta (Tume et al., 2009), sin embargo, la concentración más alta se da principalmente en las microalgas verdes, específicamente *Haematococcus pluvialis* (Sato et al., 2009). Las propiedades terapéuticas de astaxantina son múltiples, entre ellas, ejerce un fuerte poder antioxidante, capturando especies de oxígeno reactivas derivadas del proceso metabólico celular o de condiciones externas (Goto et al., 2001); En el sistema inmunitario permite disminuir el estrés oxidante neto, disminuye la respuesta inflamatoria e incrementa la respuesta inmunitaria humoral (Park et al., 2010). También disminuye considerablemente los índices de peroxidación de lípidos en linfocitos e incrementa el número de estas células en sangre periférica (Hussein et al., 2006). Estudios anteriores demostraron el efecto positivo de astaxantina en el

tratamiento de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (Wang, Willen y Wadstrom, 2000), así también, se demostró que presenta efectos antihipertensivos y neuroprotectores (Hussein et al., 2005).

Estudios farmacocinéticos muestran que después de la ingestión de astaxantina natural (esterificada) se puede encontrar en sangre solo en su forma no esterificada, esto se debe a que las enzimas digestivas hidrolizan los enlaces éster (Østerlie, Bjerkeng y Liaaen-Jensen, 2000). Una de las grandes ventajas de la astaxantina es que no es biotransformada en vitamina A por el hígado como sucede con el betacaroteno, en su lugar, se incorpora a lípidos de alta y baja densidad que circulan libremente distribuyendo la astaxantina en todos los tejidos (Kistler et al., 2002).

### **Parámetros que influyen en el crecimiento y síntesis de xantófilas**

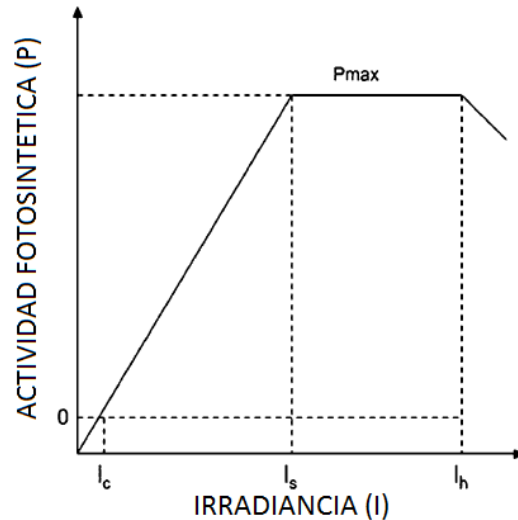
Los factores determinantes para el cultivo de microalgas y síntesis de xantófilas, al igual que para el cultivo de cualquier especie vegetal, son principalmente dos: radiación y nutrientes (Atta et al., 2013). Sin embargo, también hay otras variables que ayudan a controlar el crecimiento celular entre ellas se encuentra la temperatura, el pH, contenido de oxígeno y turbidez (Ranjbar et al., 2008).

### **Luz**

La luz es el factor más importante para la realización de la fotosíntesis en las microalgas y por ende en el crecimiento celular (Wang et al., 2011). Aunque la luz es esencial para la fotosíntesis, cantidades muy bajas o muy altas restringirá el desarrollo óptimo del funcionamiento celular (Fu et al., 2013), por ello la calidad y cantidad de luz suministrada a las células debe ser la adecuada debido a que altas

intensidades de luz provocan fotooxidación causando daño a las células expuestas (Hsieh y Wu, 2009).

**Gráfica 1. Respuesta de la actividad fotosintética con respecto a la irradiancia, donde  $I_c$  es intensidad de compensación,  $I_s$  luz de saturación,  $I_h$  Intensidad de inhibición y  $P_{max}$  actividad fotosintética máxima (Carvalho et al., 2011).**



La gráfica 1 describe la curva de respuesta de la tasa fotosintética con respecto a la irradiancia, se distinguen tres áreas principales, 1) la región de luz limitada, en donde la velocidad de entrada fotonica se aplica plenamente en la fotosíntesis, esta región está delimitada por la intensidad de luz a la cual las células comienzan a crecer y la intensidad en la cual el crecimiento celular se mantiene constante; 2) un área de saturación en donde la capacidad fotosintética del cultivo alcanza los valores máximos, el exceso de flujo fotonico es disipado en forma de calor y fluorescencia; 3) una región de fotoinhibición en la cual el incremento de irradiancia provoca daño celular y es expresado inicialmente por el decremento en la tasa de crecimiento (Carvalho et al., 2011).

## **Longitud de onda**

Las microalgas requieren condiciones específicas de luz para llevar a cabo la fotosíntesis (Rubio et al., 2003). El rango de longitud de onda ideal para la realización de esta se encuentra entre 400 y 700 nm, llamado PAR (photosintetic active radiation) (Mohsenpour, Richards y Willoughby, 2012). La respuesta fisiológica de las células es influenciada por una longitud de onda específica (Das et al., 2011). Por ello, es importante tomar en cuenta el tipo de luz, ya que cada especie muestra respuestas diferentes (Shu et al., 2012). En varios estudios se ha demostrado que la luz azul además de participar en la fotosíntesis, ayuda en la regulación de genes de transcripción, activación de enzimas, y en intensidades altas induce cambios morfológicos en la célula provocando la síntesis de astaxantina (Yoshimura et al., 2006).

## **Nutrientes**

El proceso de fotosíntesis el cual las plantas, microalgas y algunos protistas realizan para la síntesis de compuestos orgánicos, requiere de macronutrientes y micronutrientes (Chen y Chen, 2006). El principal componente nutritivo es el carbono inorgánico. Es el elemento más importante en el cultivo de microalgas ya que aporta esqueletos de carbono, además de ser una fuente de energía (Park et al., 2011). Para conseguir altas producciones de biomasa, el aporte externo de nutrientes es fundamental (Sellner, Doucette y Kirkpatrick, 2003).

## **Evaluación de factores de estrés en la producción de xantófilas**

Durante los últimos años se han realizado diversos experimentos para medir el efecto de diferentes variables en el crecimiento celular y producción de xantófilas en *H. pluvialis* (Guedes, Amaro y Malcata, 2011).

En nuestro grupo de investigación se llevó a cabo una revisión bibliográfica (Hernández et al., 2014) con el propósito de analizar la evidencia de estudios donde se evaluaron factores de estrés en la producción de xantofilas a partir de *H. pluvialis*. Se incluyeron 15 estudios. Se analizaron principalmente los factores de estrés medioambientales y bioquímicos que tuvieron un efecto en la producción de astaxantina por *H. pluvialis*. Estos estudios se realizaron en México, España, China, Turquía y Hong Kong; uno en cada país; cuatro en Corea del Sur y seis artículos se desarrollaron en Japón. El factor más evaluado fue intensidad de luz seguida por la modificación del medio de cultivo. En tres artículos se propone un diseño específico de fotobiorreactor como principal factor. En un artículo se evaluó la fase del ciclo de vida más propicia para ser transferida a la etapa de inducción de astaxantina. Katsuda et al. (2004) efectuaron una serie de investigaciones donde se evaluó el efecto de la longitud de onda (azul) utilizando lámparas LEDs. Hong et al. (2012), se enfocó en obtener una cepa fotosensible y determinó el efecto de esta en condiciones de estrés. Enseguida se muestra una breve descripción de los estudios incluidos.

Katsuda et al. (2004), estudiaron el efecto de diferentes longitudes de onda, (625, 525, 470, 410, 380 nm) a diferentes intensidades de luz en el crecimiento celular y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, la fuente de luz utilizada provino de lámparas de LEDs (diodos emisores de luz), estos tienen como característica una

emisión espectral estrecha. Los resultados obtenidos demuestran que utilizar luz roja (625 nm) en el cultivo permitió aumentar la densidad celular, mientras que usar luz azul (380-470 nm) indujo un cambio morfológico en la célula y mejoró la acumulación de astaxantina. El método de cuantificación del pigmento fue por cromatografía líquida de alta eficiencia. El equipo utilizado fue un sistema LC-10 Shimadzu equipado con una columna de fase reversa Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm. La fase móvil fue metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M10A, Shimadzu). Los autores realizaron una curva de calibración con estándares para la cuantificación de los pigmentos.

Dominguez-Bocanegra et al. (2004), realizaron un estudio para determinar el efecto de los siguientes factores medioambientales: intensidad de luz, aireación y nutrientes en el crecimiento celular y producción de astaxantina. El diseño experimental planteado se enfocó en realizar una serie de combinaciones de los factores, en donde la intensidad de luz se mantuvo constante ( $177 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ ), una vez obtenidos los resultados se ejecutó el análisis de ANOVA y se procedió a determinar la mejor combinación. De acuerdo con el análisis de varianza se encontró un efecto significativo en los tres factores evaluados ( $p < 0.001$ ) se realizó el análisis de comparación múltiple y se decidió trabajar con medio BAR a una nueva intensidad de  $345 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en los siguientes estudios para la evaluación de la producción de astaxantina. Con base en los resultados experimentales se concluyó que las condiciones óptimas para el crecimiento celular son: medio BBM a  $28^\circ\text{C}$  con luz continua fluorescente blanca ( $177 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ ) y aireación continua (1.5%  $\text{CO}_2$ ).

Asimismo, la combinación de medio BAR suplementado con 1 g/l de acetato de sodio, iluminación continua ( $345 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y aireación condujeron a la máxima producción de astaxantina. Para la cuantificación de astaxantina implementaron el método de Yuan, Gong y Chen. (1997) el cual se requiere de un HPLC acoplado a un detector de matriz de fotodiodos, una fase móvil que consiste de metanol (69%), acetonitrilo (11.5%) y agua (2.5%). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. Los autores no especifican el tipo de columna empleada. Se utilizó un estándar comercial de astaxantina marca Hoffmann-La Roche para la curva de calibración.

Lababpour et al. (2004), desarrollaron un estudio para determinar el efecto que presentan los siguientes factores: concentración de nutrientes, pH, método de adición de nutrientes e iluminación con luz roja y azul (LEDs): así como, el efecto de sus interacciones en la concentración y acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Para la inducción de astaxantina, la concentración del medio de cultivo fue de medio 2x, pH= 6.8, intensidad de luz roja ( $8.0 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ ) para posteriormente cambiar a luz azul ( $12.0 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ ). Los resultados revelan que el cambio de longitud de onda afectó positivamente la acumulación de astaxantina alcanzando concentraciones de  $76 \mu\text{g/cm}^3$ , valor mucho mayor que el reportado por Katsuda et al. (2004) que fue de  $42 \mu\text{g/cm}^3$ . El método de cuantificación del pigmento fue por cromatografía líquida de alta eficiencia. El equipo utilizado fue un sistema LC-10 Shimadzu equipado con una columna de fase reversa Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm. La fase móvil fue metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las lecturas de absorbancia se efectuaron en 470 nm y 680 nm y se realizaron con un detector de matriz de

fotodiodos (SPD-M10A, Shimadzu). Los autores realizaron una curva de calibración con estándares para la cuantificación de los pigmentos.

Orosa et al. (2005), llevaron a cabo un estudio para determinar las concentraciones óptimas de nitrato de sodio, acetato de sodio y malonato de sodio, con el propósito de mantener el crecimiento celular y maximizar la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. De acuerdo con el diseño experimental se determinó que a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 g/l de nitrato, la densidad celular aumentó en forma lineal, en concentraciones de 0.15 g/l se presentó una disminución en la proporción de clorofila a/carotenoides llegando a un valor de 1 en el día 15 del experimento, el cual es un buen indicador fisiológico de deficiencia de nitrato en la célula. Con respecto a acetato y malonato, concentraciones de 2% provocaron inhibición en la tasa de crecimiento celular. Sin embargo, una concentración de 0.25% causó un aumento en la tasa de crecimiento celular y acumulación de astaxantina por célula. Los resultados obtenidos revelan que concentraciones bajas de nitrato de sodio, acetato de sodio y malonato de sodio permiten mantener la tasa de crecimiento constante y a la vez promueven la síntesis de carotenoides. La cuantificación de los carotenoides se realizó con un equipo de HPLC marca Hewlett Packard acoplado a un detector de matriz de fotodiodos y una columna de fase reversa Hypersil C<sub>18</sub> 25 x 4 mm. La fase móvil consistió en A (agua), B (metanol) y C (acetona). El gradiente se corrió de la siguiente manera: 0 min 9% A, 76% B, 15% C; 9 min 5% A, 45% B, 50% C; 15 min 4% A, 38% B, 58% C; 17 min 3% A, 27% B, 70% C; 22 min 3% A, 27% B, 70% C; 25 min 100% C; 26 min 100% C. la velocidad del flujo fue de 1 ml/min. Las longitudes de onda programadas fueron 444 y 476 nm. Se utilizaron estándares de  $\beta$ -caroteno (Sigma) y

astaxantina, cantaxantina y equinenona (F. Hoffman. La Roche Ltd.) para la curva de calibración.

Lababpour et al. (2005), realizaron un estudio para evaluar el efecto del método de alimentación (*fed-batch*) e iluminación con luz azul (LEDs) en la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. La adición de nutrientes por el método *fed-batch* mantuvo la actividad fisiológica de las células y el cambio de luz de roja a azul aceleró la acumulación de astaxantina. Por otra parte valores de pH superiores a 9.5 suprimen la síntesis de carotenoides. Se comparó el resultado con un estudio realizado previamente donde se utilizó el método de reemplazo de medio y el rendimiento obtenido es superior al reportado, por lo que se concluye que el método de alimentación *fed-batch*, luz azul y no ajuste de pH son parámetros efectivos para la producción de astaxantina en fotobiorreactores. La concentración de astaxantina se cuantificó por medio de un sistema HPLC (LC-10; Shimadzu) equipado con una columna de fase reversa (Cosmosil 5C18-ms-II, 4.6 x 150 mm). La fase móvil utilizada fue metanol a una velocidad de flujo de 1 cm<sup>3</sup>/min. La longitud de onda programada fue 470 y 680 nm utilizando un detector de matriz de fotodiodos (SPD-M10A; Shimadzu).

Kim et al. (2006), plantearon el uso de lámparas intermitentes como fuente de luz, con el propósito de aumentar la producción de astaxantina en *H. pluvialis*, las pruebas experimentales se diseñaron para evaluar el efecto de luz intermitente localizadas tanto en el interior como en el exterior del fotobiorreactor a intensidades de 65.6 y 16.4  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  respectivamente. La fuente de luz exterior, obtuvo rendimientos por fotón por lo menos 60% mayor que la luz continua, mientras que la luz interior

presentó un incremento en el rendimiento por fotón de 400%. Se observó que a pesar de que las intensidades aplicadas son bajas, hubo resultados positivos en la acumulación de astaxantina basándose en el rendimiento por fotón utilizado, ante esto, utilizar intensidades altas de luz intermitente de preferencia localizadas en el interior del fotobiorreactor podría mejorar de manera positiva la acumulación de astaxantina. La cuantificación de las xantofilas se realizó con un espectrofotómetro modelo HP8453B, Hewlett-Packard, el solvente de extracción fue acetona. Realizaron una curva de calibración con estándares de astaxantina sintética (A9335, Sigma-Aldrich). Los resultados de concentración de astaxantina fueron calculados con la ecuación  $\text{mg/L} = 0.0045 \times \text{Densidad optica}_{475}$ .

Suh, Joo y Lee. (2006), plantearon el uso del fotobiorreactor de doble región. El propósito del diseño fue mantener simultáneamente el crecimiento celular en la región interna y estimular la síntesis de astaxantina en la región externa del fotobiorreactor. El objetivo fue simplificar el proceso de producción de dos etapas de astaxantina a partir de *H. pluvialis*. De acuerdo con el diseño experimental, las condiciones de estrés fueron intensidad alta de luz y deficiencia de nitrógeno. La máxima acumulación de astaxantina fue de 357 mg/ml en la región exterior del fotobiorreactor, mientras que, la concentración celular en la región interior fue de  $4.0 \times 10^5$  cel/ml. Los resultados demuestran que el diseño del fotobiorreactor estimuló la producción de astaxantina utilizando altas intensidades de luz y deficiencia de nitrógeno y al mismo tiempo mantuvo el crecimiento celular en la región interna utilizando la misma fuente de luz. Para la cuantificación de astaxantina se utilizó un espectrofotómetro modelo HP8453B, Hewlett Packard.

He, Duncan y Barber (2007), llevaron a cabo un estudio en el cual se enfocaron en evaluar el efecto de la combinación de intensidad de luz y deficiencia de azufre, hierro y fosfato en el cultivo de *H. pluvialis* para la producción de astaxantina. De acuerdo al diseño experimental, se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, las variables de pH y temperatura se mantuvieron constantes. Para la determinación de astaxantina por célula a intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  se utilizó medio BG<sub>11</sub>, los resultados indicaron que el medio en deficiencia de azufre fue el que acumuló la mayor concentración de astaxantina. Para la determinación de carotenoides por célula se utilizó la mezcla de medio Euglena Gracilis y Jaworski (1:1), las combinaciones experimentales se describen en la tabla 1, de acuerdo con los resultados, al onceavo día en deficiencia de azufre se presentó la mayor acumulación de carotenoides por célula. Con base en los resultados obtenidos, la deficiencia de azufre generó un ambiente celular estresante superior que los demás factores evaluados. El método de cuantificación fue el planteado por Boussiba y Vonshak (1991). Utilizaron un espectrofotómetro (UV-1601, Shimadzu). La longitud de onda programada fue de 492 nm. La cantidad de astaxantina se calculó aplicando el coeficiente de absorción de 2220 en dimetilsulfoxido de acuerdo con Steinbrenner y Linden (2001).

Ranjbar et al. (2008), realizaron un estudio para evaluar el efecto que causa la interacción entre la reducción de nutrientes por medio de dilución e intensidad de luz alta en la acumulación de astaxantina por *H. pluvialis*, se ejecutaron 4 corridas a diferentes condiciones de cultivo en un fotobiorreactor de columna de burbujas, durante las primeras 300 horas a los cultivos se les adicionó medio inorgánico estándar concentrado (*fed-batch*). Después de las 300 horas de cultivo, a las corridas

dos, tres y cuatro se les extrajo la mitad de cultivo y se sustituyó por agua esterilizada, en la corrida cuatro, la intensidad de luz se disminuyó a  $21.5 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ . De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación del método *fed batch* junto con iluminación a  $48.5 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  presentó el mejor efecto en el crecimiento celular, mientras que una reducción en la concentración de nitratos por debajo de 4 mM e intensidad de  $48.5 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  dio como resultado los mejores valores de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo por medio de HPLC (LC-10; Shimadzu), una columna de fase reversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm) la fase móvil consistió en metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El equipo fue acoplado a un detector UV-visible (SPD-10AV). La concentración de astaxantina se determinó por medio de una curva de calibración preparada con muestras de astaxantina libre.

Ranjbar et al. (2008) efectuaron un estudio para determinar el efecto que presenta la interacción entre altas intensidades de luz, deficiencia de nitrógeno y el tipo de circulación del líquido en el cultivo de *H. pluvialis* y la acumulación de astaxantina. El tipo de fotobiorreactor usado fue *airlift* (tubo interno tipo bucle). Los resultados se compararon con los obtenidos en otro estudio realizado por los mismos autores (Shiraishi et al., 2008), donde se utilizó un fotobiorreactor de columna de burbujas, las condiciones de cultivo y parámetros de estrés son similares al estudio previo. Con los resultados se observó que una reducción en la concentración de nitratos por abajo de 4 mM e intensidad de  $48.5 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  mejoró un 16% la acumulación de astaxantina. Posteriormente se aplicó una intensidad de  $94.3 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , la cual aumentó 35% la concentración de astaxantina después de las 720 horas. De acuerdo

con los resultados se concluyó que el diseño del fotobiorreactor *airlift* incrementó la densidad celular y la producción de astaxantina significativamente. La cuantificación de astaxantina se llevó a cabo por medio de HPLC (LC-10; Shimadzu), una columna de fase reversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 mm x 150 mm) la fase móvil consistió en metanol a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El equipo fue acoplado a un detector UV-visible (SPD-10AV). La concentración de astaxantina se determinó por medio de una curva de calibración preparada con muestras de astaxantina libre. El procedimiento se basó del método de Yuan y Chen (1998).

Katsuda et al. (2008), investigaron el efecto de la frecuencia e intensidad de luz en la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis*. El efecto de luz intermitente dio mejores resultados que luz continua. De acuerdo con los resultados, la concentración final de astaxantina en luz intermitente a 18  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y una intensidad de luz incidente de 12  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  fue de 35  $\mu\text{g/ml}$  siendo superior a la obtenida en condiciones de luz continua de 12  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , el cual fue aproximadamente de 27  $\mu\text{g/ml}$ . El tiempo de cultivo fue de 300 horas. Por lo tanto se determinó la utilidad de luz intermitente en el cultivo de microalgas. La cuantificación se realizó con un HPLC (LC-10; Shimadzu), con una columna de fase reversa (Cosmosil 5C18-MS-II, 4.6 x 150 mm). Se utilizó metanol como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El equipo se acopló a un detector UV-visible (SPD-10AV; Shimadzu). Además se reporta que se realizó una curva de calibración usando estándares de astaxantina marca Sigma Aldrich. El procedimiento fue siguiendo el método de Yuan y Chen (1998).

Imamoglu et al. (2009), realizaron una investigación para comparar el efecto de la interacción entre diferentes medios de cultivo y dos niveles de intensidad de luz, con

el propósito de mejorar la tasa de acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*. Se evaluó la combinación de cinco medios de cultivo a dos niveles de intensidad lumínica, los mejores resultados se obtuvieron a partir del medio de cultivo libre de nitrógeno con 546  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y agua destilada con 546  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ . El estudio determinó la interacción que existe entre la intensidad de luz y la concentración de nutrientes en el medio, de acuerdo con los resultados la combinación óptima elegida fue agua destilada y una intensidad de luz de 546  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ . en base con lo obtenido se concluye que la reducción de nitratos en el medio junto con altas intensidades de luz resultaron ser una combinación óptima. Sin embargo, el uso de agua destilada como medio, obtuvo resultados favorables en la síntesis de astaxantina. Tomando como criterio el factor económico, utilizar agua destilada en sustitución del medio de cultivo original resulta ser más barato que utilizar medio libre de nitratos. En sistemas de producción de tamaño industrial el ahorro resultaría favorable. Para la determinación de astaxantina se utilizó dimetilsulfoxido como solvente de extracción. Se realizaron lecturas de absorbancia a 490 nm. Así también desarrollaron una curva de calibración utilizando un estándar de astaxantina pura (Acros Co.).

Wu et al. (2010), desarrollaron un diseño factorial 3x3x3 a diferentes intensidades de radiación ultravioleta (UV-B) y varios intervalos de tiempo para evaluar el efecto en la acumulación de astaxantina en cultivos de *H. pluvialis*. De acuerdo con los resultados, la radiación UV-B tuvo un efecto negativo en la tasa de células vivas ( $P < 0.01$ ) pero no presentó efecto significativo en el incremento del peso seco celular ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, influyó de manera positiva en la acumulación de astaxantina ( $P < 0.01$ )

obteniendo concentraciones de 3.2 mg/g con respecto a los resultados del experimento control. Las células fueron expuestas a 3 y 5 W/m<sup>2</sup> de UV-B por 60 minutos para evaluar la actividad antioxidante enzimática y los resultados demostraron que la enzima glutatión peroxidasa presentó una alta actividad en presencia de luz UV-B como factor de estrés. El estudio permitió demostrar que la radiación UV-B tiene un efecto negativo en la tasa de supervivencia de las células, sin embargo, aceleró la acumulación de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se realizó por medio de HPLC de acuerdo al procedimiento de Boussiba et al. (1999).

Choi et al. (2011), evaluaron el comportamiento de seis inóculos en diferentes fases de crecimiento, el propósito fue determinar la mejor fase del ciclo de vida de *H. pluvialis* para ser transferida a la segunda etapa del proceso de producción de astaxantina, se utilizaron métodos de cultivo *batch* y semicontinuos, en ambos se confirmó que el inóculo número seis el cual se encuentra en una fase de vida senescente con un tamaño celular grande, en condiciones altas de irradiación, deficiencia de nitrógeno y adición de acetato, es la mejor opción para la acumulación de astaxantina. La cuantificación de astaxantina se realizó utilizando dimetilsulfoxido y efectuando lecturas a 492 nm con un espectrofotómetro de acuerdo al método propuesto por Davies (1976).

Hong et al. (2012), realizaron un estudio para evaluar el comportamiento de una cepa fotosensible (mutante) de *H. pluvialis* en la producción de astaxantina. Se efectuó una lesión parcial en el fotosistema II del aparato fotosintético de las células. La cepa PP-PS #160 mostró el mejor rendimiento en la producción de astaxantina. Se realizó un análisis al extracto obtenido y se determinó que la distribución del éster de

astaxantina no presenta diferencias de la obtenida por cepas silvestres. Las características fotosensibles y fotoinducibles de la cepa mutante se mantuvieron inalteradas durante un año y medio. La luz requerida para producir 1 g de astaxantina se redujo 76%, por el contrario la proliferación celular se vio reducida en la fase vegetativa. Los resultados demuestran que la cepa fotosensible aumentó el rendimiento de astaxantina en condiciones de luz moderada ( $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ). La cuantificación de astaxantina se efectuó por medio de HPLC (Shimadzu) equipado con un detector UV-visible SPD-10A, Shimadzu (Kang et al., 2005).

### **Importancia comercial**

La biotecnología de microalgas es un campo reciente de estudio, sin embargo, en países de Asia tiene una importante presencia en la industria alimenticia (Pulz y Gross, 2004). La producción mundial anualmente de microalgas es de 10,000 toneladas (Christaki, Florou-Paneri y Bonos, 2011). En el 2004 se estimó en 640 millones de euros el valor total del mercado de todos los carotenoides comercialmente usados a nivel mundial, además de presentar una tasa de aumento promedio anual del 2.2% aproximadamente (Del Campo, García-González y Guerrero, 2007).

La demanda de astaxantina se incrementa cada año en diferentes campos industriales como el alimenticio, nutracéutico y farmacéutico. Esto ha promovido el aumento en la producción de astaxantina. Sin embargo, una cantidad considerable de astaxantina se produce sintéticamente (Zhu et al., 2009). La molécula precursora consta de 9 carbonos, llamada cetoisoforonona, el cual es obtenida a partir derivados del petróleo (Ernst 2002; Jackson, Braun y Ernst, 2008). No obstante, la alta demanda

de este pigmento y los altos costos de producción a partir de procesos sintéticos aunado a los efectos poco estudiados de este tipo de sustancias, han obligado a investigar en fuentes naturales de astaxantina, como microalgas, levaduras y productos de crustáceos (Bhosale y Bernstein, 2005). Por lo anterior es importante seguir investigando el efecto que tienen los diferentes factores ambientales y bioquímicos en la respuesta fisiología de *H. pluvialis* ante condiciones de estrés.

### **Diseño estadístico de experimentos**

También conocido como diseño de experimentos es una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas cuyo objetivo es ayudar al investigador a seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener información relevante con el mínimo costo y evaluar los resultados obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones obtenidas a partir de ellos (Daniel et al., 2011).

Entre los muchos diseños experimentales, se encuentra el diseño factorial  $2^k$ , el cual es una prueba (o un conjunto de pruebas) durante la cual se realizan cambios sistemáticos y controlados a las variables de entrada para medir el efecto sobre la respuesta, además que permite medir la interacción entre ellos (Cema et al., 2004)

Dependiendo del diseño factorial, se pueden agregar puntos centrales al diseño. Esto significa adicionar niveles intermedios, con el propósito de obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla de análisis de varianza sin perjudicar el balance en la estimación ni los efectos de interés, además los puntos centrales nos permiten detectar la posible presencia de curvatura en al menos uno de los factores objeto de estudio (Gutierrez, 2012).

Cuando se prueban varias variables independientes es necesario utilizar un modelo matemático para poder describir la relación entre una variable de respuesta en función de una o más variables independientes esto con el propósito de predecir, optimizar o controlar el proceso.

---

## JUSTIFICACIÓN

---

El interés por los ingredientes nutraceuticos es cada vez mayor, dado que éstos, además de satisfacer las necesidades energéticas y nutricionales básicas, son capaces de aportar beneficios adicionales a nuestra salud (Biruet et al., 2009)

Aunado a esto, hoy en día existe una tendencia entre los consumidores dirigida hacia la ingesta de productos procedentes de fuentes naturales en contraposición a los obtenidos de forma sintética.

Las microalgas se consideran como fuente de ingredientes nutraceuticos (Ranjbar et al., 2008), capaces no sólo de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales, sino también de afectar positivamente la salud de animales y humanos. Poseen y producen cantidades apreciables de carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6) y antioxidantes (Christaki, Florou-Paneri y Bonos, 2011).

Algunas tienen, incluso, un contenido de aminoácidos superior al presentado por los alimentos convencionales.

La microalga *Haematococcus pluvialis* representa la más rica fuente natural de astaxantina, y ahora es cultivada a gran escala (Guerin, Huntley y Olaizola, 2003). El contenido de astaxantina en esta microalga puede superar el 4% de peso seco, este valor es por ahora el más alto reportado para cualquier microorganismo (He, Duncan y Barber, 2007).

La astaxantina es una xantófila de fuerte actividad antioxidante, diez veces superior que el caroteno y más de 500 veces más efectivo que el tocoferol (Shengzhao et al., 2014).

Actualmente, el mayor consumo de astaxantina esta se utiliza como fuente de pigmentación en acuicultura, especialmente en salmón y trucha. La astaxantina es comercializada con un costo de US \$2000 a US \$2500/Kg, con un mercado mundial anual estimado de US \$200 millones. Sin embargo, el 95% de este mercado consume astaxantina sintética dejando en segundo plano la producción de astaxantina natural (Lorenz y Cysewski, 2000).

Aunque el 95% del mercado consume derivados de astaxantina sintética, la demanda de los consumidores por los productos naturales hace que los pigmentos sintéticos sean mucho menos deseables (Nguyen, 2013). Esto abre la puerta para la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan el desarrollo de mejores técnicas de cultivo y producción de astaxantina por *H. pluvialis* (Pulz y Gross, 2004).

De acuerdo al incremento de la demanda de este producto y los beneficios para la salud es necesario iniciar estudios que permitan la caracterización y las condiciones óptimas en la cinética de crecimiento para lograr las mejores condiciones de cultivo y de producción de xantófilas por *H. pluvialis*, optimizando el rendimiento en la obtención de este metabolito.

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

El cultivo reciente de microorganismos fotosintéticos se ha convertido en una industria importante en todo el mundo (Gong et al., 2011). En base a estudios realizados en microalgas se ha determinado que estas tienen la capacidad de producir diferentes sustancias con potencial benéfico al ser humano, entre estas se encuentran las xantófilas, compuestos químicos pertenecientes al grupo de los carotenoides (Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela y Goycoolea, 2006).

Se ha descubierto que las xantófilas, en particular astaxantina, presentan un potencial antioxidante incluso cerca de 400 veces más potente que la vitamina C, y más efectivo que el  $\beta$ -caroteno y el  $\alpha$ -tocoferol (Shengzhao Dong et al., 2014) numerosos estudios en el humano y modelos animales, han podido comprobar su eficacia (Goswami, Chaudhuri y Dutta, 2010).

Así también, se ha demostrado que las xantófilas confieren un amplio rango de beneficios tales como: antioxidante, prevención del cáncer, combate a la aterosclerosis, problemas cardiovasculares, entre otros, esto incluso en bajas concentraciones (4 mg/día o menos), por lo que es utilizado como suplemento alimenticio, alimento funcional o ingrediente nutracéutico (Guerin, Huntley y Olaizola, 2003).

Este compuesto es sintetizado por una variedad de microorganismos tales como, bacterias (*Agrobacterium auratin*), hongos (*Phaffia rhodozyma*) y microalgas (*Haematococcus pluvialis*) (Dominguez-Bocanegra et al., 2004).

Se ha observado que el uso de *Haematococcus pluvialis* ha presentado grandes ventajas debido a que sintetiza grandes cantidades de xantófilas (Guedes, Amaro y

Malcata, 2011). Sin embargo, esta microalga exhibe ciertas características desfavorables para su cultivo, como la sensibilidad a los cambios en las variables independientes que afectan directamente la tasa de crecimiento, además de presentar un ciclo de vida complejo (García-Malea et al., 2005), en comparación con otras microalgas exitosamente cultivadas a escala comercial, como es *Dunaliella spp.* y *Spirulina spp.* (Guedes, Amaro y Malcata, 2011).

Por lo anterior, es necesario la caracterización y el estudio de la cinética de crecimiento para lograr las mejores condiciones en la producción de xantofilas por *Haematococcus pluvialis*, optimizando el rendimiento en la obtención de este metabolito.

---

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Evaluar el efecto de los factores medioambientales y nutricionales sobre la biosíntesis de xantófilas por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor con condiciones controladas para su uso en la producción de ingredientes nutraceuticos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

1. Diseñar un fotobiorreactor que permita el control de condiciones medioambientales para el desarrollo y biosíntesis de xantófilas por *Haematococcus pluvialis* con el propósito de utilizarlos en la producción de ingredientes nutraceuticos.
2. Determinar los factores medioambientales y nutricionales que influyen en la producción de xantófilas por *Haematococcus pluvialis* bajo condiciones controladas para el cálculo de parámetros cinéticos y productividad.
3. Analizar el efecto de los parámetros fisicoquímicos más relevantes en la producción de xantófilas en un cultivo in vitro de *Haematococcus pluvialis* para aumentar el rendimiento del producto de interés con respecto a la biomasa y el sustrato utilizado.

---

## **METODOLOGÍA**

---

### **Microalga**

La microalga en estudio fue *Haematococcus pluvialis*, se obtuvo del cepario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR).

### **Tamaño de inóculo**

El tamaño del inóculo inicial para las corridas experimentales fue de 80 ml de medio de cultivo con una densidad celular aproximada de  $1.0 \times 10^5$  células de tamaño mediano en fase vegetativa con motilidad.

### **Diseño del estudio experimental**

El diseño experimental consistió en un diseño factorial  $2^3$  con cuatro puntos centrales. Este diseño nos permitió evaluar el efecto de tres factores con dos niveles cada uno. Además, los cuatro puntos centrales nos permitieron detectar la presencia de posibles curvaturas en la respuesta. La resolución del diseño factorial fue de  $V^+$  (Gutierrez, 2012) (Tabla 1). Los parámetros de salida que van a ser estudiados son densidad celular, concentración de astaxantina, clorofila y carotenoides totales.

**Tabla 1. Arreglo factorial del diseño experimental.**

Intensidad de luz ( $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ )	Longitud de onda (nm)	Concentración de nitrato de sodio (g/l)
60	467, 523 y 625	0.75
110	467, 523 y 625	0.45
110	467	0.45
160	467	0.15
160	467, 523 y 625	0.75
60	467	0.15
110	467	0.45
60	467	0.75
160	467	0.75
160	467, 523 y 625	0.15
60	467, 523 y 625	0.15
110	467, 523 y 625	0.45

### **Variables independientes**

- **Intensidad de luz:** los niveles evaluados de intensidad de luz fueron de 60 a 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada y a las condiciones de laboratorio.
- **Longitud de onda:** las longitudes de onda utilizadas en el estudio fueron, 467 nm (azul), 523 nm (verde) y 625 nm (rojo).
- **Concentración de nitrato de sodio:** el rango de estudio fue de 0.15 g/l a 0.75 g/l, los demás componentes del medio de cultivo se mantuvieron constantes. Al medio de cultivo de las corridas experimentales no se adicionaron vitaminas.

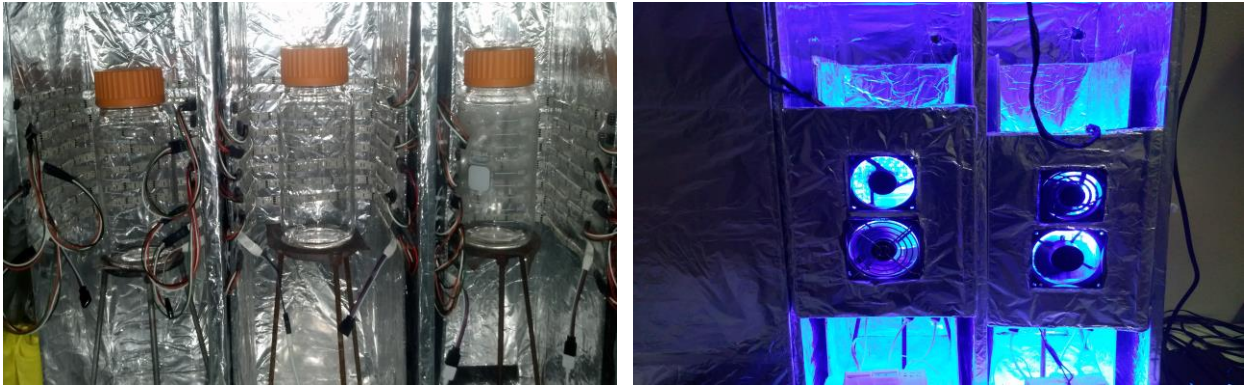
## **Análisis estadístico**

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar los efectos principales, secundarios e interacciones de los factores en las respuestas. Los resultados se calcularon con un efecto máximo de tercer orden. Las corridas se realizaron de forma aleatoria. Los factores controlables no incluidos en el estudio se mantuvieron lo más fijo posibles durante la realización de las pruebas. Además se estimaron los parámetros de regresión múltiple para predecir y entender mejor el comportamiento de la respuesta. Con estas herramientas estadísticas fue posible medir el efecto de los factores en la respuesta además de calcular las mejores condiciones de crecimiento celular y producción de xantófilas. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics centurion XVI.

## **Diseño de fotobiorreactor**

Las corridas experimentales se llevaron a cabo en tres fotobiorreactores. Estos se componen de un vaso Pyrex de 1 litro, instalado en una cámara aislada recubierta con material reflectante con un sistema de enfriamiento y 600 LEDs distribuidos horizontalmente (Figura 4).

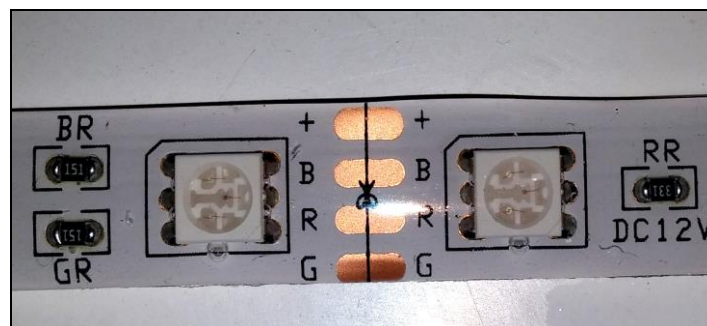
**Figura 4. Fotobiorreactores**



**Diodos emisores de luz**

Los LEDs utilizados fueron RGD SMD 5050 de alta eficiencia de 12V, con un controlador que permite manejar diferentes longitudes de onda e intensidad de luz con un mando infrarrojo a distancia. El diseño de los LEDs incluyó tres colores principales, 467 nm (azul), 523 nm (verde) y 625 nm (rojo), la combinación de ellos permitió obtener diferentes tonalidades de luz (Figura 5).

**Figura 5. Luces LEDs utilizados en las corridas experimentales.**



---

## PROCEDIMIENTO

---

### Condiciones de cultivo

La primera fase del trabajo experimental consistió en cultivar y conservar la microalga *Haematococcus pluvialis*. Esta cepa fue conservada en 100 ml de medio de cultivo BBM modificado (tabla 2) en matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Así también, se prepararon cajas Petri con medio BBM+agar e inoculados con una varilla codada. Las condiciones de crecimiento fueron: temperatura de 25°C, se utilizaron lámparas marca Tesler de 90 W con LEDs rojo y azul para suministrar un flujo continuo de luz de 40  $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ , un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, pH de 6.45 y agitación manual.

**Tabla 2. Composición química del medio de cultivo BBM modificado.**

Componentes	Concentración (g/l)
NaNO <sub>3</sub>	25.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	7.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5
NaCl	2.5
EDTA	0.75
FeSO <sub>4</sub>	0.097
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.041
ZnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0050
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.002
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.004
Vitamina B <sub>1</sub>	0.12
Vitamina B <sub>12</sub>	0.1

### **Medición de intensidad de luz**

La luz con la que se irradiaron los cultivos se midió con un equipo Apogee MQ-200, el cual incluye un sensor separado con un rango de trabajo de 1 a 3000  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ . El equipo fue calibrado para medir la irradiación de fuentes eléctricas. La distancia de lectura fue de 3 centímetros en todas las direcciones.

### **Determinación de la densidad celular**

La determinación de la densidad celular se realizó todos los días. Esta se efectuó con una cámara de Neubauer marca Superior Marienfeld y un microscopio óptico marca Axiostar Zeiss.

### **Esterilización y preparación de materiales**

El material y medios de cultivo utilizados para la conservación de cepas, resiembra y mantenimiento de los cultivos fueron esterilizados previamente en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Para la limpieza y esterilización de superficies de trabajo se usó alcohol etílico 95°. Así mismo, todos los recipientes utilizados para el cultivo de microalgas, los reactores de columna de 1 litro y medios de cultivo fueron esterilizados por medio de autoclave a 121° C durante 15 minutos.

### **Corridas experimentales**

Las corridas experimentales se realizaron de acuerdo al arreglo factorial propuesto. Las corridas se llevaron a cabo en fotobiorreactores de un litro de capacidad. Los frascos utilizados fueron lavados con agua destilada y jabón libre de fosfatos, para

eliminar el remanente de jabón se realizaron varios enjuagues. Posteriormente se adicionaron los componentes del medio de cultivo y se esterilizó a 121° C durante 15 minutos. Una vez esterilizados, se dejaron enfriar los medios de cultivo para enseguida ser inoculados en una campana de flujo laminar. Los parámetros de trabajo que se mantuvieron constantes fueron: volumen de trabajo de 800 ml de medio de cultivo, pH de  $6.45 \pm 0.03$ , temperatura de 25°C, ciclo luz/oscuridad 24/0 horas con agitación manual. La preparación de los medio de cultivo se efectuó en una campana de flujo laminar. El tiempo experimental tuvo una duración de 12 días por corrida.

### **Cuantificación de clorofila a, clorofila b y carotenoides**

Para la cuantificación se tomaron 10 mililitros de muestra por triplicado. Se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos a 15°C. Enseguida se añadió 3 ml de acetona. Posteriormente se realizó una ruptura celular por medio de trituración y después las muestras se sometieron a ultrasonido por 16 minutos. Una vez terminado este proceso las muestras se almacenaron a 4°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de almacenamiento, las muestras se volvieron a sonicar en las condiciones antes mencionadas. Una vez finalizada la ruptura celular, se procedió a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos, enseguida se separó el extracto de pigmentos con una pipeta Pasteur limpia y se colocó en otro tubo protegido de la luz. La extracción y determinación del contenido total de pigmentos de las muestras se realizó en condiciones de oscuridad para evitar degradación de la muestra. Los pigmentos se colocaron en una celda de cuarzo y se procedió a tomar lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro marca Thermo Scientific. Los resultados fueron procesados

utilizando la ecuación de Jeffrey y Humphrey (Ritchie, 2006) para el cálculo de concentración de clorofila y carotenoides. Para la cuantificación de xantofilas se usó la primera derivada utilizando el programa MATLAB (X. J. Liu et al., 2011; Lababpour y Lee, 2006).

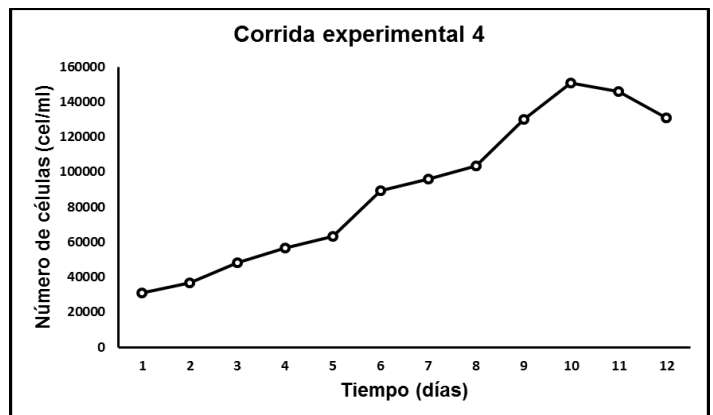
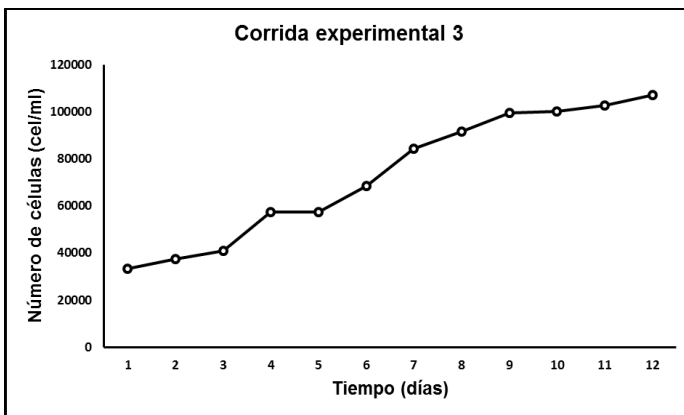
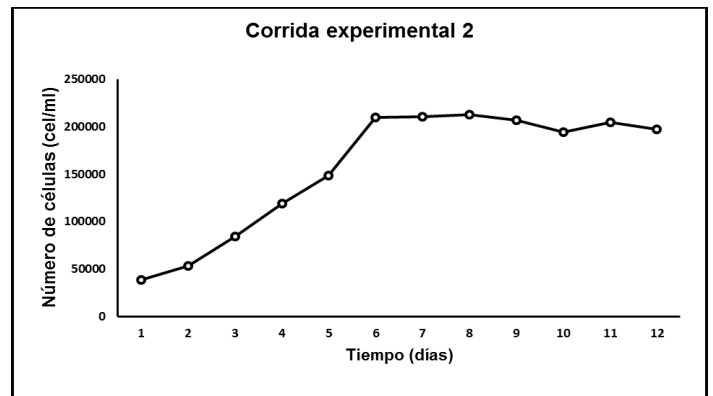
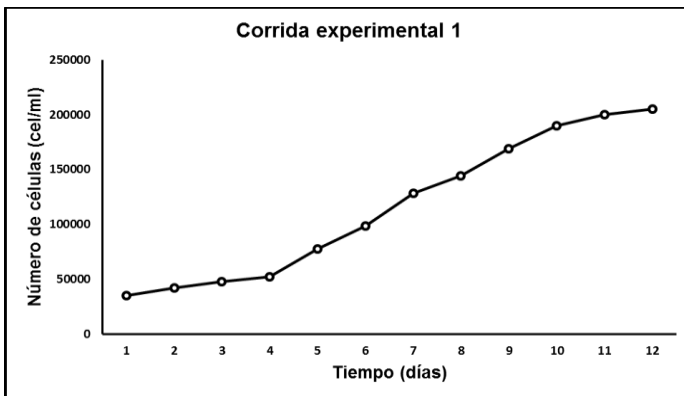
---

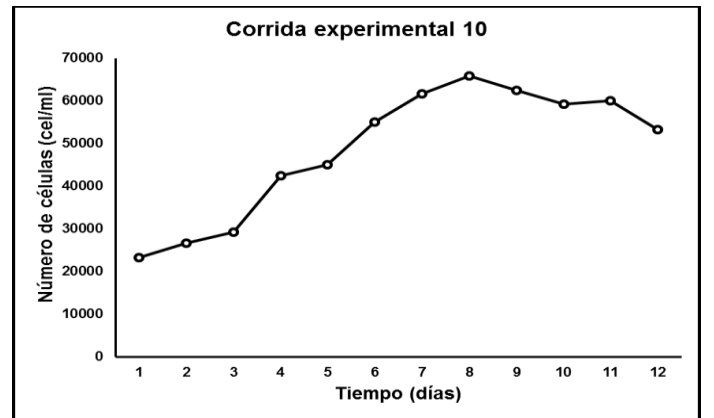
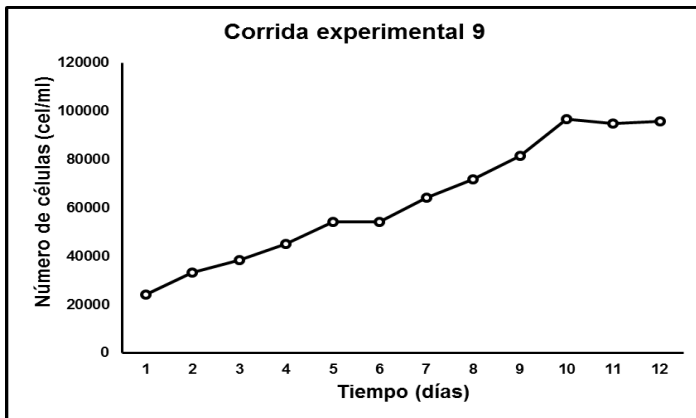
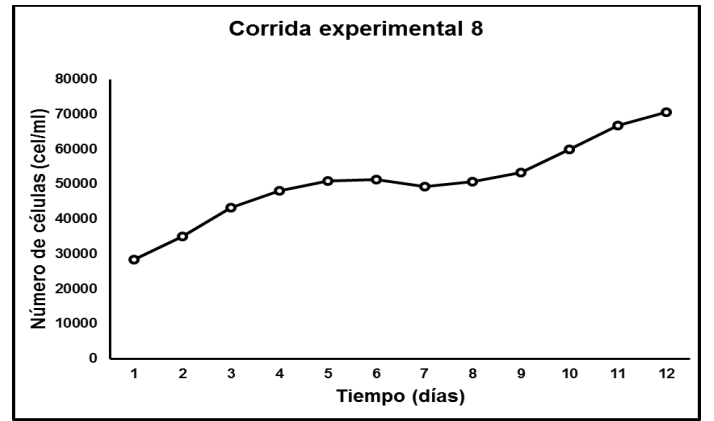
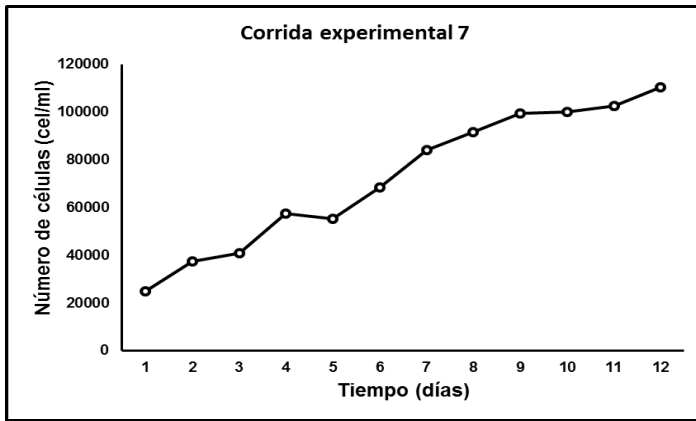
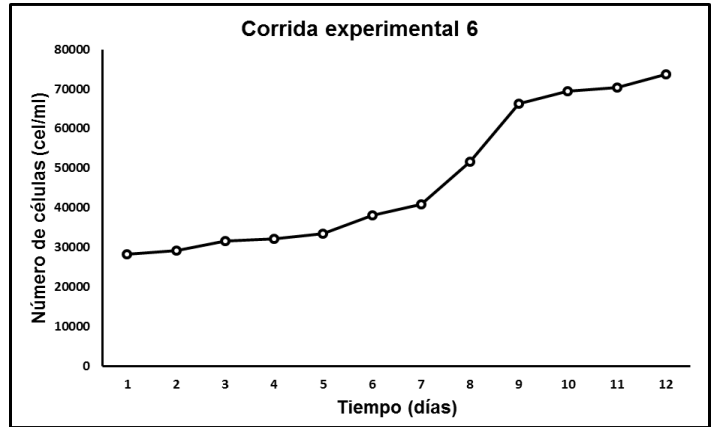
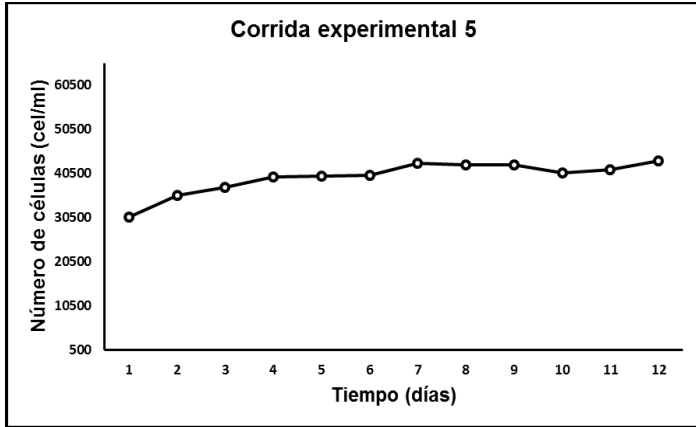
## RESULTADOS

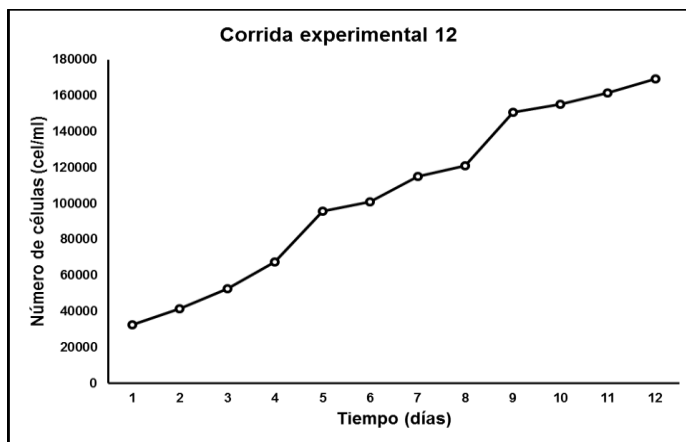
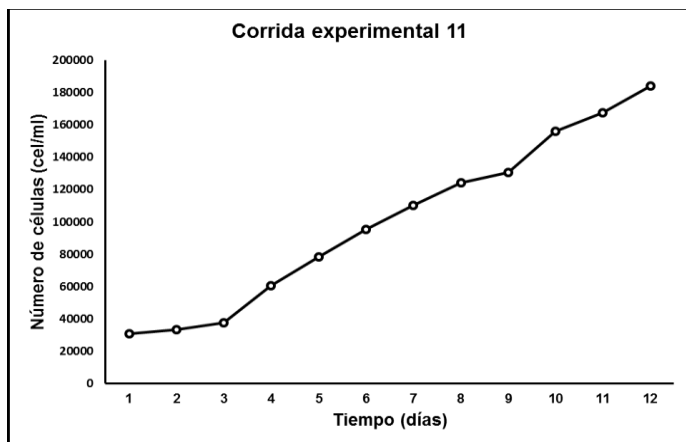
---

Durante los primeros días de los experimentos, las células tuvieron que adaptarse a las condiciones de cultivo. Los primeros cuatro días la densidad celular se mantuvo en valores similares, sin embargo, a partir del quinto día se presentó un crecimiento celular exponencial hasta el décimo día. Posteriormente las células presentaron un comportamiento variado dependiendo de la combinación de factores y niveles de cultivo. La grafica 2 muestra la evolución del crecimiento celular en función del tiempo de las corridas experimentales.

**Gráfica 2. Gráficas de densidad celular de las corridas experimentales.**







En la tabla 3, se reportan los resultados obtenidos de las 12 corridas experimentales, correspondientes a la concentración de xantófilas, carotenoides, clorofila a, clorofila b y densidad celular. Los resultados se relacionan a las condiciones de cultivo.

**Tabla 3. Resultados de concentración de xantófilas, densidad celular, carotenoides, clorofila a y clorofila b.**

Corrida	Intensidad de luz ( $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ )	Longitud de onda (nm)	Concentración de nitratos (g/l)	Concentración de xantófilas ( $\mu\text{g/ml}$ )	Densidad celular (cel/ml)	Carotenoides ( $\mu\text{g/ml}$ )	Clorofila a ( $\mu\text{g/ml}$ )	clorofila b ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	60	467, 523 y 625	0.75	ND	205000	0.37±0.06	0.25±0.03	0.10±0.01
2	110	467, 523 y 625	0.45	0.46±0.05	197500	0.46±0.04	0.12±0.05	0.05±0.04
3	110	467	0.45	0.17±0.06	107000	0.34±0.06	0.19±0.04	0.10±0.08
4	160	467	0.15	ND	130833	0.13±0.009	0.29±0.02	0.11±0.007
5	160	467, 523 y 625	0.75	0.11±0.02	43333	0.15±0.009	0.05±0.004	0.02±0.008
6	60	467	0.15	ND	73750	0.04±0.001	0.24±0.03	0.02±0.005
7	110	467	0.45	0.33±0.10	110333	0.40±0.09	0.19±0.05	0.07±0.02
8	60	467	0.75	ND	70625	0.21±0.02	0.51±0.07	0.21±0.05
9	160	467	0.75	0.89±0.001	95833	0.83±0.07	0.46±0.04	0.17±0.02
10	160	467, 523 y 625	0.15	1.05±0.06	53333	0.72±0.10	0.27±0.04	0.10±0.01
11	60	467, 523 y 625	0.15	0.15±0.04	184167	0.34±0.007	0.14±0.009	0.05±0.01
12	110	467, 523 y 625	0.45	0.33±0.06	169167	0.34±0.06	0.12±0.03	0.06±0.04

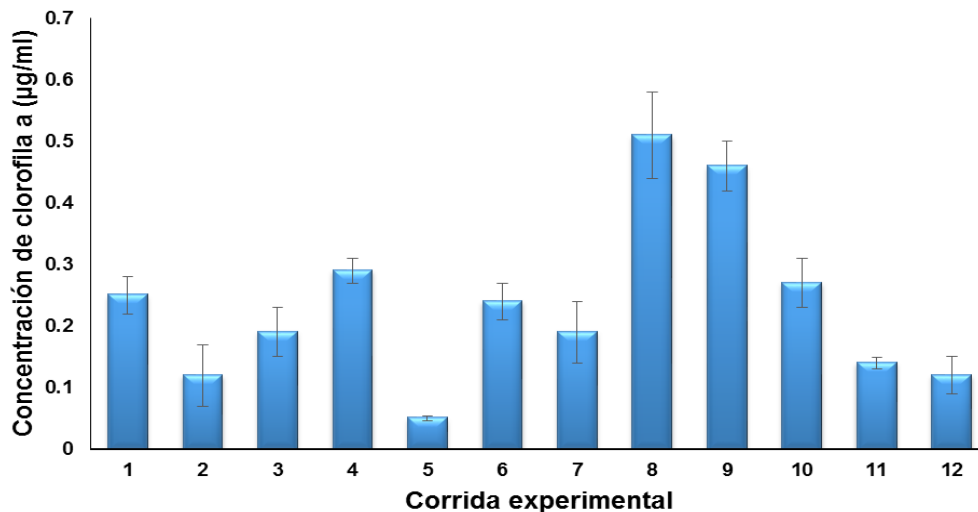
ND= No Detectado

En la corrida uno, cuatro, seis y ocho la concentración de xantófilas no fue detectada.

La concentración mayor de xantófilas (1.05  $\mu\text{g/ml}$ ) se obtuvo en la corrida 10, en la

cual se combinaron una intensidad de luz de  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.15 g/l. De acuerdo con la tabla 3 la combinación de factores de  $60 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  para intensidad de luz, longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l dio la mayor densidad celular con 205,000 células/ml. En el caso de concentración de carotenoides podemos apreciar que el valor máximo fue de  $0.83 \mu\text{g/ml}$ , los niveles de operación establecidos fueron  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  de intensidad de luz, longitud de onda de 467 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l el cual correspondieron para la corrida nueve.

**Gráfica 3. Gráfica de concentración final de clorofila a.**

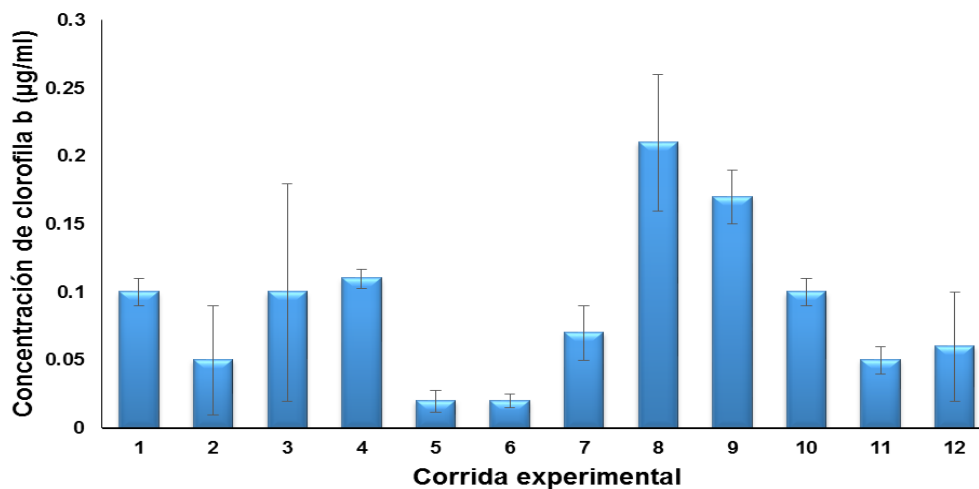


Con respecto a la concentración de clorofila a, en la gráfica 3, se observa que en la corrida ocho y nueve se alcanzaron los valores más altos de este pigmento siendo  $0.51 \mu\text{g/ml}$  y  $0.46 \mu\text{g/ml}$  respectivamente. Por el contrario, la corrida cinco en donde se ajustaron los niveles de cultivo a  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , 467, 523 y 625 nm y

concentración de nitratos de 0.75 g/l obtuvo la menor concentración de clorofila a (0.05  $\mu\text{g/ml}$ ).

Los valores de concentración de clorofila b se reportan en la gráfica 4 donde se observa que las concentraciones son pequeñas además de presentar cierta variación en los resultados. Sin embargo, los resultados son proporcionales a los obtenidos con clorofila a. La mayor concentración de clorofila b se produjo en la corrida ocho con 0.21  $\mu\text{g/ml}$  y 0.17  $\mu\text{g/ml}$  en la corrida nueve. En la corrida cinco y seis podemos observar la menor concentración de clorofila b casi indetectable llegando a 0.02  $\mu\text{g/ml}$  en ambos experimentos.

**Gráfica 4. Gráfica de concentración final de clorofila b.**



Se evaluó el efecto principal, así como las posibles interacciones de los factores medioambientales y fisicoquímicos en la densidad celular, concentración de carotenoides y concentración de xantófilas. Los resultados de las doce corridas experimentales se sometieron a un análisis de varianza.

## Densidad celular

La interacción de los factores de intensidad de luz y longitud de onda tuvieron un efecto significativo ( $P=0.0257$ ) con respecto a los factores principales. La intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos no afectaron significativamente en la respuesta. Esto se puede ver claramente en la tabla 4. En donde se reporta el valor-P de cada uno de los factores evaluados.

**Tabla 4. Análisis de varianza para densidad celular.**

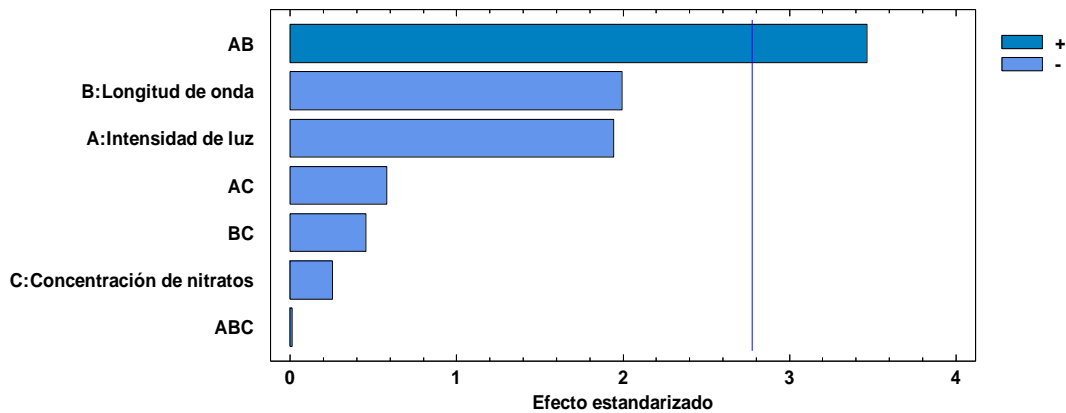
Factor	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F <sub>o</sub>	Valor-P
A: Intensidad de luz	5.52353E9	1	5.52353E9	3.78	0.1239
B: Longitud de onda	5.81355E9	1	5.81355E9	3.98	0.1169
C: Concentración de nitratos	9.31067E7	1	9.31067E7	0.06	0.8132
AB	1.75586E10	1	1.75586E10	12.01	0.0257
AC	4.91537E8	1	4.91537E8	0.34	0.5931
BC	2.99611E8	1	2.99611E8	0.20	0.6743
ABC	135721.	1	135721.	0.00	0.9928
Total error	5.84901E9	4	1.46225E9		
Total (corr.)	3.56291E10	11			

$R^2=0.8358$ , error estándar=38239.4, Durbin-Watson=2.00778 ( $P=0.4258$ )

Con respecto a la interacción de intensidad de luz y concentración de nitratos y la interacción triple ABC (intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos), los resultados demuestran que el efecto no es estadísticamente significativo.

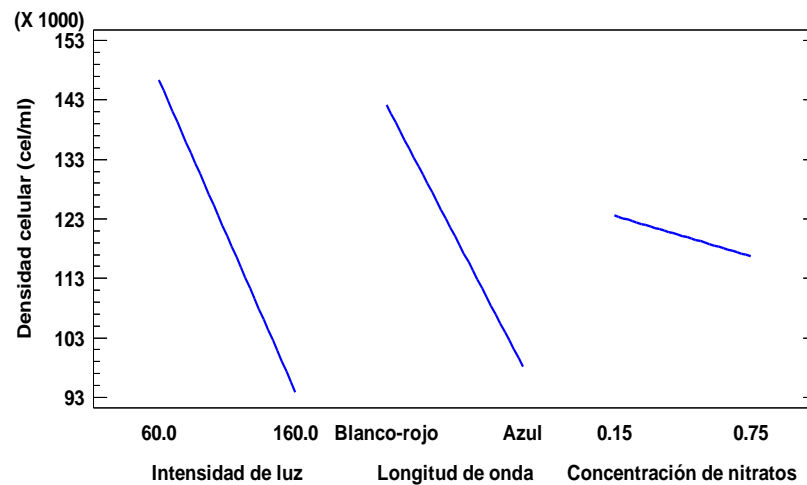
Como se observa en la gráfica 5, que corresponde al diagrama de Pareto estandarizado, la interacción de AB (intensidad de luz y longitud de onda) presentó un valor de efecto estandarizado mayor que el valor crítico calculado. Lo que demuestra la importancia del efecto generado en la respuesta. Los factores que siguen en importancia son longitud de onda e intensidad de luz, el cual sus efectos muestran ser muy similar en la respuesta. Sin embargo, se mantienen por debajo del valor crítico.

**Gráfica 5. Diagrama de Pareto estandarizado para densidad celular.**



Para determinar el efecto de los niveles de cada factor evaluado, en la gráfica 6, que corresponde a la gráfica de efectos principales, se reportaron los resultados obtenidos. La intensidad de luz a un nivel de operación de  $60 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  alcanzó 146,274 células/ml, mientras que intensidad de luz de  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  disminuyó la densidad celular a 93,807 células/ml. Las longitudes de onda programadas en un nivel de 467, 523 y 625 nm obtuvo 142,103 células/ml. El cambio de longitud de onda a 467 nm resultó en un decremento en el valor de densidad celular llegando a 98,112 células/ml. En el caso de la concentración de nitratos el cambio en los niveles de operación no parece significativa, un nivel de 0.15 g/l de nitratos aumento la densidad celular a 123,673 células/ml mientras que, 0.75 g/l de nitratos alcanzó 116,812 células/ml.

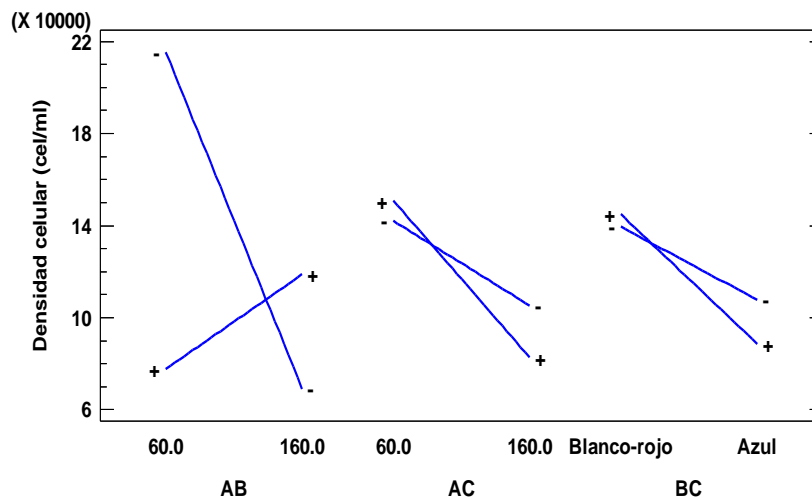
**Gráfica 6. Gráfica de efectos principales para densidad celular.**



Los niveles de operación inferiores los cuales son 60  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y 467, 523 y 625 nm para intensidad de luz y longitud de onda respectivamente son los que arrojan valores mayores de densidad celular. Específicamente el valor mayor de densidad celular se obtiene con una intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$ .

El efecto de interacción entre los factores es analizado en la gráfica 7. Cuando la intensidad de luz cambió su nivel de 160 a 60  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y la longitud de onda se mantuvo en 467, 523 y 625 nm, la densidad celular aumentó considerablemente llegando a 216,009 células/ml. Por otra parte, la longitud de onda en niveles de 467 nm afectó en la densidad celular de 76,689 células/ml.

**Gráfica 7. Gráfica de interacción para densidad celular.**

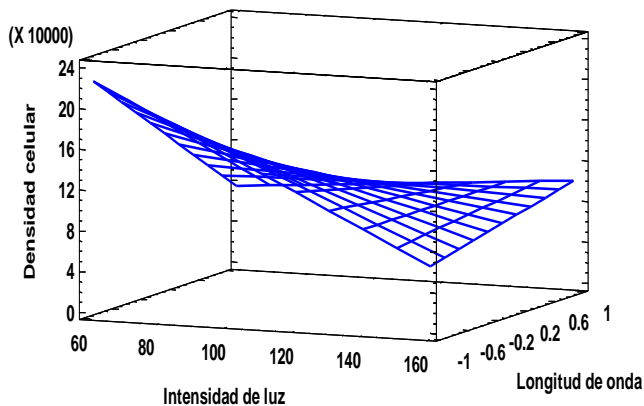


Si la intensidad de luz se mantiene en 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  el comportamiento de la respuesta es completamente diferente. Las longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm afectó de manera negativa la respuesta disminuyendo el número de células en el medio de cultivo (67,981 células/ml). Por el contrario, una longitud de onda de 467 nm incrementó ligeramente la densidad celular a 119,501 células/ml. Cuando se evaluaron la intensidad de luz y concentración de nitratos, se observaron cómo niveles en 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  de intensidad de luz y 0.15 g/l de nitratos produjeron resultados de 142,721 células/ml. Mientras tanto, el cambio de concentración de nitratos a 0.75 g/l aumentó la densidad a 151,066 células/ml. La modificación de la intensidad de luz a 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , cambió el comportamiento de los efectos, se obtuvo 104,263 células/ml con un nivel de 0.15 g/l, mientras que con un nivel de 0.75 g/l se obtuvieron 82,494 células/ml. La interacción de longitud de onda y concentración de nitratos, dio resultados similares a la interacción de intensidad de luz y concentración de nitratos. Cuando se evaluó las longitudes de onda de 467, 523 y

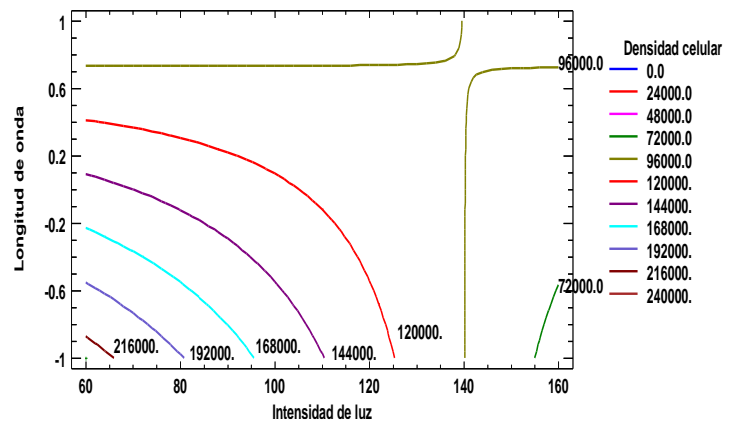
625 nm y concentración de nitratos de 0.15 g/l se obtuvieron 139,819 células/ml. Igualmente la combinación de 467, 523 y 625 nm y 0.75 g/l dio resultados de 145,261 células/ml. En contraste, el cambio de longitud de onda a 467 nm y una concentración de nitratos de 0.15 g/l arrojó un resultado menor de células de 107,166 células/ml. La última combinación evaluada consistió en 467 nm y 0.75 g/l, en donde, los resultados no fueron mejores que los anteriores, (87,210 células/ml). En la gráfica 8 se presenta la gráfica de superficie estimada y de contornos, que resultan del ajuste de la ecuación de regresión lineal siguiente:  $Densidad\ celular = 157131 - 290.37 * Intensidad\ de\ luz - 116328 * Longitud\ de\ onda + 46110.7 * Concentración\ de\ nitratos + 940.888 * Intensidad\ de\ luz * Longitud\ de\ onda - 522.567 * Intensidad\ de\ luz * Concentración\ de\ nitratos - 19444.0 * Longitud\ de\ onda * Concentración\ de\ nitratos - 8.68333 * Intensidad\ de\ luz * Longitud\ de\ onda * Concentración\ de\ nitratos$ . El coeficiente de determinación calculado ( $R^2$ ) es de 0.8358.

**Gráfica 8. a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para densidad celular.**

a)



b)



Se puede observar en la gráfica de superficie de respuesta la región experimental evaluada, la cual presenta un incremento en la zona localizada en los niveles de 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  para intensidad de luz y 467, 523 y 625 nm para longitudes de onda en donde se obtuvo un resultado de 220,000 células/ml. La gráfica de contornos muestra con bastante exactitud las coordenadas de la zona con mayor densidad celular, el cual se encuentra en la zona izquierda inferior correspondiente a los mismos niveles de operación que se presentan en la gráfica de superficie de respuesta.

### Concentración de carotenoides

Para medir y analizar el efecto generado por los factores evaluados en la concentración final de carotenoides, la tabla 5 reporta los resultados del análisis de varianza donde la interacción de la longitud de onda y concentración de nitratos presentaron efecto significativo en la obtención de carotenoides ( $P=0.0013$ ). Así también, la interacción triple ABC (intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos) reportó un efecto significativo con un valor- $P=0.0029$ .

**Tabla 5. Análisis de varianza para concentración de carotenoides.**

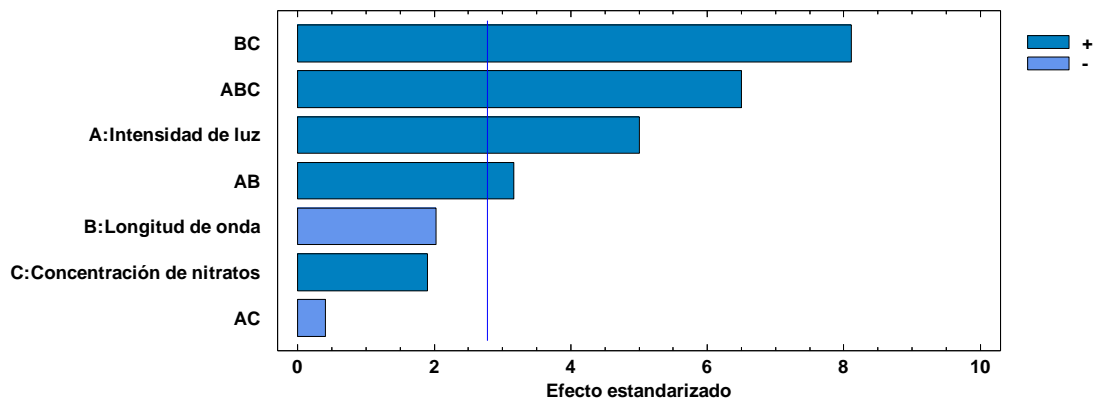
Factor	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F <sub>o</sub>	Valor-P
A:Intensidad de luz	0.0946125	1	0.0946125	25.05	0.0075
B:Longitud de onda	0.0154083	1	0.0154083	4.08	0.1135
C:Concentración de nitratos	0.0136125	1	0.0136125	3.60	0.1305
AB	0.0378125	1	0.0378125	10.01	0.0341
AC	0.0006125	1	0.0006125	0.16	0.7078
BC	0.248512	1	0.248512	65.79	0.0013
ABC	0.159612	1	0.159612	42.26	0.0029
Total error	0.0151083	4	0.00377708		
Total (corr.)	0.585292	11			

$R^2= 0.9741$ , error estándar= 0.061458, Durbin-Watson= 2.07216 ( $P=0.4727$ )

La intensidad de luz afectó significativamente obteniendo un valor- $P=0.0075$ . La interacción intensidad de luz y concentración de nitratos y los factores principales no ejercieron un efecto significativo en la respuesta.

El diagrama de Pareto, gráfica 9, muestra que la interacción de longitud de onda y concentración de nitratos presentaron el mayor efecto significativo en la respuesta. Así también, la interacción triple ABC (intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos) presentó un efecto importante. La intensidad de luz, como efecto principal, tuvo influencia en la respuesta al igual que la interacción de intensidad de luz y longitud de onda.

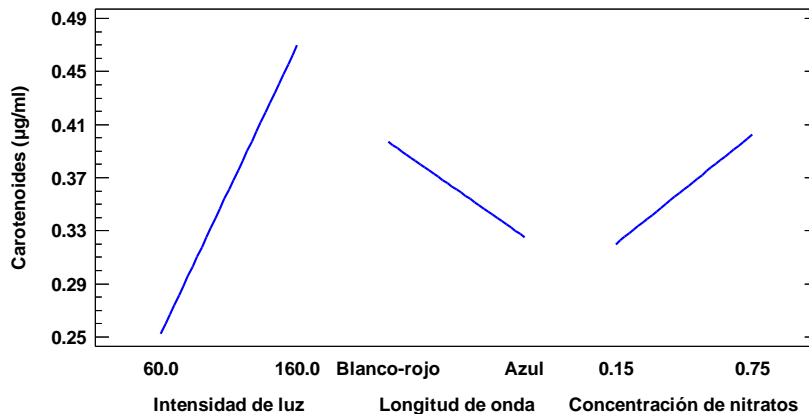
**Gráfica 9. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de carotenoides.**



La longitud de onda, concentración de onda (como efectos principales) y la interacción de intensidad de luz y concentración de nitratos se encuentran por debajo del valor crítico.

En la gráfica 10, la cual corresponde al efecto de cada uno de los niveles de los factores evaluados en la concentración de carotenoides, los resultados obtenidos con niveles de 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  para intensidad de luz son de 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que, para un nivel de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  se alcanzó concentraciones de 0.46  $\mu\text{g/ml}$ . Con respecto a las longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm la concentración de carotenoides se encontró en valores de 0.40  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que con una la longitud de onda de 467 nm la concentración disminuyó a 0.33  $\mu\text{g/ml}$ . El efecto de concentración de nitratos a un nivel de 0.15 g/l obtuvo concentraciones de 0.32  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides. Por el contrario, un nivel de 0.75 g/l de concentración de nitratos aumentó la respuesta alcanzando 0.40  $\mu\text{g/ml}$  de carotenoides.

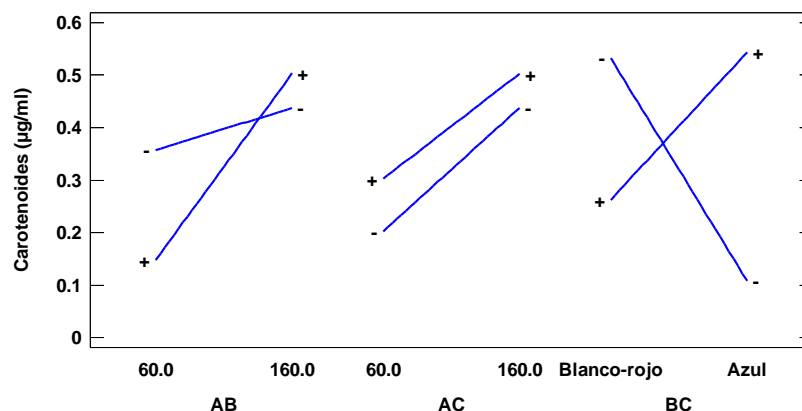
**Gráfica 10. Efectos principales para concentración de carotenoides.**



El mayor efecto en la concentración de carotenoides se obtiene con la intensidad de luz a un nivel de operación de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y una concentración de nitratos de 0.75 g/l.

Debido a que el efecto de interacción es más importante que el efecto principal, es fundamental analizar el impacto de estos factores. En la gráfica 11, se observa como la intensidad de luz y la longitud de onda interaccionaron significativamente, donde el cambio de nivel de 60 a 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  en la intensidad de luz y una longitud de onda de 467 nm incrementó considerablemente las concentraciones de carotenoides alcanzando 0.51  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que este mismo cambio, pero con longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm, produjo un ligero incremento en la concentración llegando a 0.43  $\mu\text{g/ml}$ . Con respecto a la interacción de intensidad de luz y concentración de nitratos, cuando la intensidad se mantuvo constante en 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y se adicionó una concentración de 0.15 g/l de nitratos el resultado de concentración de carotenoides obtenido fue de 0.20  $\mu\text{g/ml}$ . En cambio, concentraciones de 0.75 g/l de nitrato produjo 0.30  $\mu\text{g/ml}$ . Modificando el nivel de intensidad de luz a 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y retomando una concentración de 0.15 g/l el resultado de concentración de carotenoides aumento a 0.40  $\mu\text{g/ml}$ , el ajuste en la concentración de nitrato a 0.75 g/l dio valores de 0.50  $\mu\text{g/ml}$ .

**Gráfica 11. Gráfica de interacción para concentración de carotenoides.**



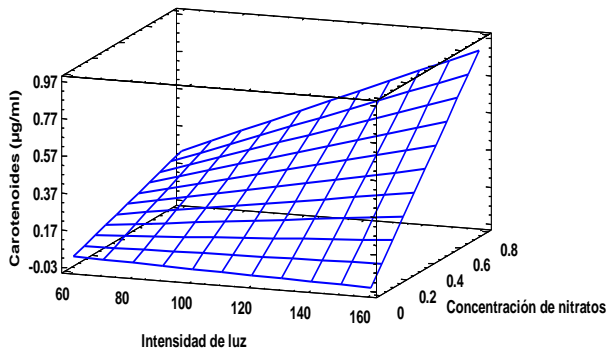
En el caso de la interacción longitud de onda y concentración de nitratos, las pendientes de las líneas son complemente diferentes por lo que existe una fuerte interacción entre ambos factores. Cuando las longitudes de onda se mantiene en 467, 523 y 625 nm y una concentración de nitratos en 0.75 g/l la concentración de carotenoides es menor con respecto al resultado obtenido con 0.15 g/l el cual es considerablemente mayor. Si la longitud de onda cambia a 467 nm sucede lo contrario, a una concentración de nitratos de 0.15 g/l se obtiene la menor concentración de carotenoides, mientras que una concentración de 0.75 g/l el incremento de la respuesta es significativo.

La gráfica de superficie de respuesta estimada se calculó con la siguiente ecuación de regresión lineal: Concentración de carotenoides = 0.0308333 + 0.0024375\*Intensidad de luz + 0.0146667\*Longitud de onda + 0.201667\*Concentración de nitratos - 0.0028625\*Intensidad de luz\*Longitud de onda - 0.000583333\*Intensidad de luz\*Concentración de nitratos - 0.448333\*Longitud de onda\*Concentración de nitratos + 0.00941667\*Intensidad de luz\*Longitud de onda\*Concentración de nitratos. El coeficiente de determinación es de 0.9741.

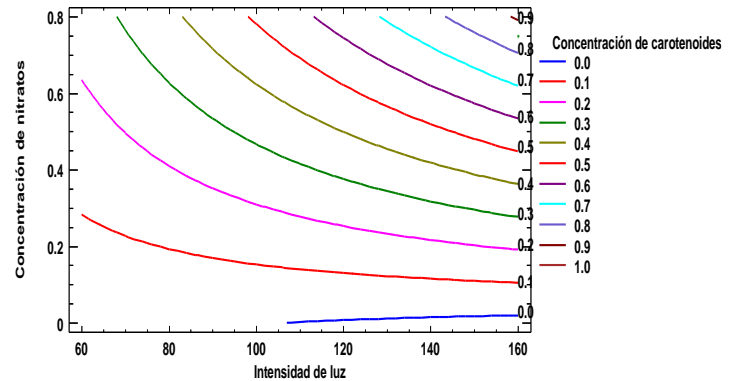
La región experimental calculada con el modelo de regresión propuesto se graficó en la gráfica 12, en donde la zona de mayor concentración de carotenoides (0.85 µg/ml) se encuentra en el nivel 160 µmol fotón/m<sup>2</sup>/s de intensidad de luz y 0.75 g/l de concentración de nitratos manteniendo la longitud de onda en 467 nm.

**Gráfica 12. a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para concentración de carotenoides.**

a)



b)



Esto se confirma con la gráfica de contornos, donde se observan claramente las coordenadas con mayor concentración de carotenoides en niveles de 160  $\mu\text{mol}$  fotón/ $\text{m}^2/\text{s}$  y 0.75 g/l para intensidad de luz y concentración de nitratos respectivamente.

### **Concentración de xantófilas**

La síntesis de xantófilas se inicia a partir de condiciones medioambientales y fisicoquímicas específicas. Principalmente son condiciones que generan estrés fisiológico a las células. Entre estos, se encuentra altas intensidades de luz y deficiencia de nutrientes. Tal como se observa en la tabla 6. El factor de intensidad de luz afectó de manera significativa ( $P=0.0013$ ) la síntesis de xantófilas en las células.

**Tabla 6. Análisis de varianza para la concentración de xantófilas.**

Factor	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F <sub>o</sub>	Valor-P
A: Intensidad de luz	0.45125	1	0.45125	63.71	0.0013
B: Longitud de onda	0.0420083	1	0.0420083	5.93	0.0716
C: Concentración de nitratos	0.005	1	0.005	0.71	0.4481
AB	0.0018	1	0.0018	0.25	0.6407
AC	0.00125	1	0.00125	0.18	0.6960
BC	0.49005	1	0.49005	69.18	0.0011
ABC	0.3528	1	0.3528	49.81	0.0021
Total error	0.0283333	4	0.00708333		
Total (corr.)	1.37249	11			

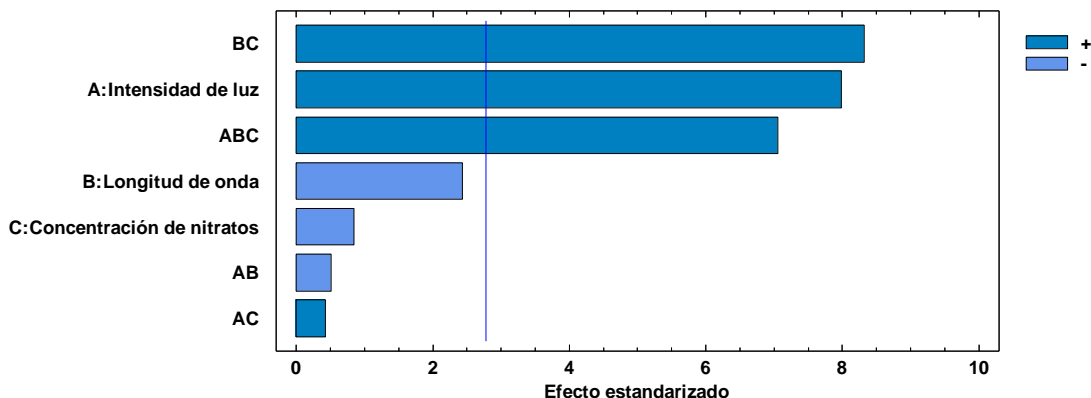
$R^2=0.9793$ , error estándar=0.0841625, Durbin-Watson=2.59179 (P=0.8194)

Los factores principales de longitud de onda y concentración de nitratos no causaron un efecto estadísticamente significativo. Sin embargo, el valor de longitud de onda se encuentra muy cercano del valor crítico de 0.05, por lo que se considera importante. La interacción BC (longitud de onda-concentración de nitratos) presentó efecto significativo (P=0.0011) en la concentración de xantófilas por lo que se toma como prioridad con respecto a los factores principales.

Con el diagrama de Pareto se confirma el impacto de la interacción de longitud de onda y concentración de nitratos el cual tuvo el mayor efecto sobre la concentración de xantófilas siendo el más importante (gráfica 13). La intensidad de luz es el siguiente factor con mayor impacto, siguiéndole la interacción triple ABC (intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos).

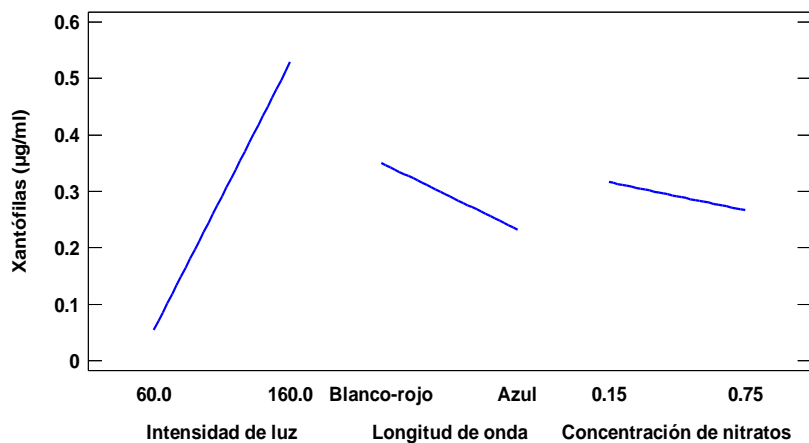
La longitud de onda, concentración de nitratos, interacción AB (intensidad de luz y longitud de onda) y la interacción AC (intensidad de luz y concentración de nitratos) se encuentran por debajo del valor crítico. La gráfica 14, muestra el efecto correspondiente a cada nivel de operación, siendo el nivel de 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  de intensidad de luz el que mayor concentración de xantófilas generó con 0.52  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Gráfica 13. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de xantófilas.**



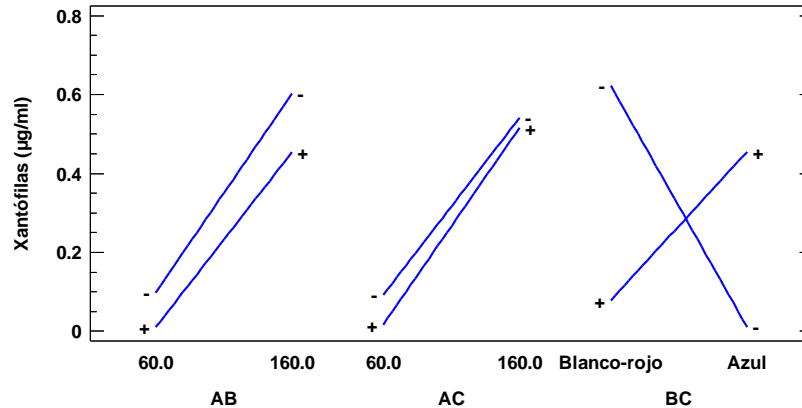
Por el contrario, una intensidad de luz de 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  dio concentraciones mínimas de xantófilas de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ . Longitud de onda de 467, 523 y 625 nm reportó resultados de 0.35  $\mu\text{g/ml}$  de xantófilas, mientras que el cambio de longitud de onda a 467 nm produjo 0.23  $\mu\text{g/ml}$ . El factor de concentración de nitratos dio resultados similares, el nivel de 0.15 g/l alcanzó concentraciones de 0.32  $\mu\text{g/ml}$ , así mismo, el nivel de 0.75 g/l reportó resultados de 0.26  $\mu\text{g/ml}$  de xantófilas.

**Gráfica 14. Efectos principales para concentración de xantófilas.**



Para determinar la importancia del efecto de interacción de los factores de longitud de onda y concentración de nitratos, la gráfica 15 permite determinar el grado del efecto de esta interacción. Como se observa cuando se tienen longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y 0.15 g/l de nitratos el resultado de concentración de xantófilas se ve incrementado llegando a 0.62  $\mu\text{g/ml}$ . Mientras que en concentraciones de 0.75 g/l disminuyó considerablemente alcanzando 0.07  $\mu\text{g/ml}$  la concentración de xantófilas. Cuando se cambió la longitud de onda a 467 nm y se estableció una concentración de 0.15 g/l de nitratos el valor de xantófilas no es detectable, en contra parte, a concentraciones de 0.75 g/l de nitratos se alcanzó concentraciones de 0.45  $\mu\text{g/ml}$ . La combinación de intensidad de luz y longitud de onda no presentaron interacción entre ellas, ya que cuando la intensidad estuvo en 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  a una longitud de onda de 467, 523 y 625 nm se produjo 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que con longitud de onda de 467 nm el resultado no es detectable. Cuando la intensidad de luz se ajustó a 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y se programó con el mismo factor de longitud de onda, dio los siguientes resultados, intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y longitud de onda 467, 523 y 625 nm dio 0.60  $\mu\text{g/ml}$  de xantófilas; intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y longitud de onda de 467 nm dieron como resultado 0.45  $\mu\text{g/ml}$  de xantófilas.

**Gráfica 15. Gráfica de interacción de intensidad de luz y longitud de onda para concentración de xantófilas.**



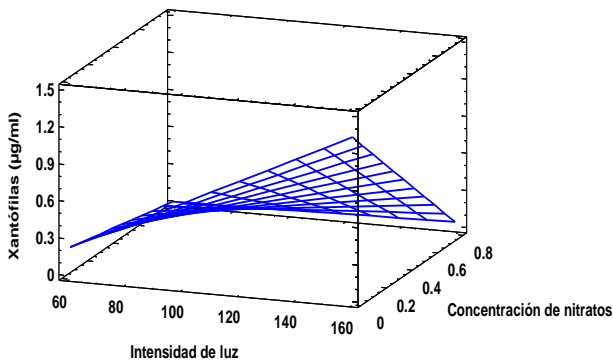
Con respecto a la combinación de intensidad de luz y concentración de nitratos, estos factores no reflejaron una interacción importante, ya que cuando la intensidad de luz se mantuvo en 60  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y se adicionó 0.15 g/l de nitratos la concentración de xantófilas no fue detectable, al igual que con concentraciones de 0.75 g/l de nitratos. Sin embargo, cuando se aumentó la intensidad de luz a 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y se agregó 0.15 g/l de nitratos el valor alcanzó 0.54  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , manteniendo la misma intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y ajustando la concentración de nitratos a 0.75 g/l, el resultado obtenido es similar a la condición anterior siendo de 0.51  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de xantófilas.

El Modelo de regresión lineal ajustado se calculó obteniendo la siguiente ecuación:  
 Concentración de xantófilas =  $-0.152917 + 0.004375 \cdot \text{Intensidad de luz} + 0.295583 \cdot \text{Longitud de onda} - 0.175 \cdot \text{Concentración de nitratos} - 0.0066 \cdot \text{Intensidad de luz} \cdot \text{Longitud de onda} + 0.000833333 \cdot \text{Intensidad de luz} \cdot \text{Concentración de nitratos} - 0.715 \cdot \text{Longitud de onda} \cdot \text{Concentración de nitratos} + 0.014 \cdot \text{Intensidad de luz} \cdot \text{Longitud}$

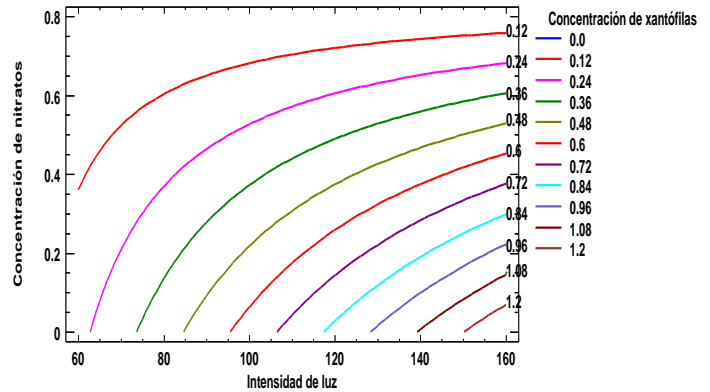
de onda\*Concentración de nitratos. Teniendo un coeficiente de determinación de 0.9793.

**Gráfica 16. a) Gráfica de superficie estimada. b) Gráfica de contornos para concentración de xantófilas.**

a)



b)



La región experimental descrita en la gráfica 16 a) refleja el comportamiento de la respuesta a diferentes niveles de operación, siendo el mejor tratamiento, aquella zona con niveles de 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  de intensidad de luz, concentración de nitratos de 0.15 g/l y una longitud de onda de 467, 523 y 625 nm, alcanzando concentraciones de xantófilas de 1.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La figura 21 b) la cual consiste de la gráfica de contornos en donde las coordenadas del mejor tratamiento se encuentran en la derecha inferior en el nivel de 160  $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2/\text{s}$  y 0.15 g/l de intensidad de luz y concentración de nitratos respectivamente.

---

## DISCUSIÓN

---

En nuestro estudio se evaluaron los efectos de la intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos, en las respuestas de densidad celular, concentración de carotenoides y principalmente en la concentración de xantófilas.

Las células cultivadas en intensidades altas de luz consumen nitrógeno a una tasa mayor y alcanzan la fase estacionaria rápidamente. Presentando una densidad celular menor en la fase estacionaria. Al mismo tiempo, intensidades altas de luz pueden proveer mayor energía para la fijación de carbono. Resultando en tasas altas de síntesis de xantófilas (Fábregas et al., 2003).

En todas las corridas experimentales las células tuvieron cambios bioquímicos y morfológicos. Pasaron de células vegetativas con motilidad, al inicio de las corridas, a formar quistes rojos (carotenogénesis), perdieron la motilidad, aumentando de tamaño y engrosando la pared celular, Anexo 1.

Cuando las microalgas son expuestas a altas intensidades de luz, la eficiencia fotosintética se ve afectada, la razón de esta ineficiencia es debido a que la tasa de absorción de fotones por la clorofila y otros pigmentos antena excede la tasa de absorción óptima a la cual funciona la fotosíntesis, produciendo un exceso de fotones y provocando la inhibición de la fotosíntesis (Carvalho et al., 2011).

De acuerdo con las gráficas 3 y 4, la mayor concentración de clorofila a y b se obtuvieron en la corrida 8 con 0.51  $\mu\text{g/ml}$  y 0.21  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, en donde los factores de intensidad de luz se encontraron en el nivel mínimo de 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ ,

longitud de onda de 467 nm y 0.75 g/l de nitratos, demostrando que en condiciones favorables de crecimiento, principalmente en intensidades de luz moderada, las células mantienen su estado vegetativo y la concentración de sus pigmentos fotosintéticos estables. La densidad celular obtenida en estas condiciones de cultivo fue de 70,625 cel/ml, donde la mayoría se encontraba en estado vegetativo (fase verde).

Por el contrario, las concentraciones mínimas de clorofila a (0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) y b (0.02  $\mu\text{g/ml}$ ) se dieron en la corrida experimental 6, donde los factores experimentales fueron intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitud de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l, en este caso, las condiciones de cultivo son desfavorables para el crecimiento celular. La densidad celular se vio afectada, las células sufrieron de fotoinhibición y posteriormente muerte celular. Esto se confirma con la concentración celular final de solo 43,333 cel/ml siendo la más baja de todas las corridas experimentales. Esto se relaciona con la baja concentración de clorofila obtenida.

Los resultados demostraron que el crecimiento celular es estimulado por la interacción entre la intensidad de luz y la longitud de onda, el cual fue el efecto más importante (0.0257). Cuando la intensidad se establece en 60  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y una longitud de onda de 467, 523 y 625 nm las células tuvieron una respuesta fisiológica favorable, aumentando el número a 225,625 células/ml. Nuestros resultados confirman estudios previos donde las intensidades de luz favorables para crecimiento celular se encuentra entre 60 – 150  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  y una concentración de nitratos de 0.75 g/l (García-Malea et al., 2006; Göksan, Ak y Kılıç, 2011).

Concentraciones de nitrato juegan un rol muy importante en la tasa de división celular y en la acumulación de carotenoides secundarios en *H. pluvialis* (Orosa et al., 2005). Esto se comprueba en los resultados obtenidos donde la mayor concentración de nitratos fue el mejor factor que indujo mayor número de células.

Bajo estas condiciones de cultivo, la luz absorbida por los pigmentos antena es convertida en energía química formando ATP y NADPH a través de la cadena de transporte de electrones. Esta energía química es finalmente almacenada en forma de almidón por medio de la fijación de CO<sub>2</sub> a través de ciclo de Calvin (Boussiba, 2000). Sin embargo estas condiciones de cultivo no son las mejores para la producción de carotenoides y xantófilas a partir de *H. pluvialis*.

Generalmente, los carotenoides tales como astaxantina tienen un rol importante en el organismo fotosintético en *H. pluvialis*, actuando como pigmentos receptores accesorios. Absorbiendo en el rango de 400-500 nm (Collins et al., 2011).

Así también, y más importante, los carotenoides protegen el aparato fotosintético de intensidades de luz y longitud de onda que generan algún estrés a la célula (Ranga Rao et al., 2013)

En el caso de producción de carotenoides, la intensidad de luz tuvo influencia (P=0.0075) en la acumulación de carotenoides, sin embargo la interacción entre longitud de onda y concentración de nitratos fue el efecto más significativo (P=0.0013). Los mejores niveles de operación para aumentar la acumulación de carotenoides hasta 0.85 µg/ml, son una intensidad de luz de 160 µmol fotón/m<sup>2</sup>/s, longitud de onda azul y 0.75 g/l. En este caso particular la longitud de onda 467 nm

influyo de manera importante en la interacción con los demás factores para generar estrés a las células y desencadenar la síntesis de estos pigmentos. esto concuerda con lo realizado por Katsuda et al. (2008), que reportó el uso de luz azul intermitente para la producción de astaxantina.

En la producción de xantófilas, es de suma importancia el control de los factores de estrés utilizados. Entre los más importantes se encuentra la intensidad de luz, longitud de onda y deficiencia de nutrientes (Ugwu, Aoyagi y Uchiyama, 2007). En muchos estudios realizados, se ha confirmado que altas intensidades de luz generan condiciones estresantes para la síntesis de xantófilas por *H. pluvialis* (Göksan, Ak y Kılıç, 2011), y se analiza el efecto de la interacción entre la intensidad de luz y la concentración de nitratos, la cual nos da una idea del comportamiento de los factores.

Según Katsuda et al. (2004), reportaron la utilización de una longitud de onda azul (380–470 nm), obteniendo la mayor concentración de astaxantina. Sin embargo, en nuestro trabajo demostramos que longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm tuvo un mejor desempeño en la producción de xantófilas. Por lo anterior se puede observar que a pesar que la luz azul genera estrés moderado, la combinación de longitud de onda de 467, 523 y 625 nm a intensidades altas tienen mayor incidencia en el aparato fotosintético y de protección, activando la carotenogénesis. En el análisis de varianza expuesto en la tabla 6 se observa como afectó la interacción entre la longitud de onda y la concentración de nutrientes ( $P=0.0011$ ) en la concentración de xantófilas. Cuando se utilizan más de dos factores de estrés, es importante evaluar la posible interacción entre dichos factores. En este estudio se presentó este fenómeno, el comportamiento de la longitud de onda no es similar cuando se cambian la concentración de nitratos y

la intensidad de luz tal y como lo demuestran los resultados. Cuando se encuentra la longitud de onda en 467, 523 y 625 nm, y una concentración de nitratos de 0.15 g/l, a una intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  se obtiene la mayor concentración de xantófilas (1.07  $\mu\text{g/ml}$ ), siendo los mejores valores del experimento para la obtención de estos pigmentos. Esto confirma que un rango amplio de longitudes de onda mejora la acumulación de xantófilas, además de participar en el aumento de la densidad celular en combinación con los demás factores de cultivo. De acuerdo con Orosa et al. (2005), concentraciones de 0.15 g/l fue la mejor concentración en la producción de xantófilas en *H. pluvialis*, ya que evita que cese la división celular durante los primeros días de cultivo, y al mismo tiempo induce la acumulación de carotenoides y xantófilas en la célula.

---

## **LIMITACIONES**

---

Una limitación fue que los frascos de 1 litros no tenían un sistema integrado de obtención de muestra por lo que era necesario realizar la toma de muestras en una campana de flujo laminar. Esto conllevaba a que el cultivo fuera retirado de las condiciones de cultivo establecidas. Aunque el efecto no fue significativo en los resultados finales, ya que la toma de muestra se realizó de manera rápida y eficiente.

---

## **FORTALEZAS**

---

Una fortaleza de este estudio fue el diseño factorial utilizado, ya que nos permitió evaluar los efectos principales y las posibles interacciones entre la intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos.

---

## CONCLUSIONES

---

En el presente trabajo experimental se observó:

1. Que los primeros días de cultivo las células se encontraban en una fase vegetativa con motilidad. Al pasar los días, éstas se transformaron en células grandes, perdieron sus flagelos, desarrollaron una pared celular y comenzaron a desarrollar carotenogénesis. Dependiendo de las condiciones de estrés fue la acumulación de carotenoides y xantófilas.
2. Que una intensidad de luz de  $60 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l, fueron los mejores niveles de los factores evaluados para obtener la mejor densidad celular (225,625 cel/ml). El factor de interacción entre intensidad de luz y longitud de onda fue el que generó el efecto más significativo ( $P=0.0257$ ).
3. De acuerdo con los resultados en las corridas experimentales para determinar la densidad celular, éstos no se autocorrelacionaron, demostrando que no existió dependencia entre los valores obtenidos, tal y como lo constata el estadístico de Durbin Watson = 2.00778 ( $P=0.4258$ ).
4. La Intensidad de luz de  $160 \mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitud de onda de 467 nm y concentración de nitratos de 0.75 g/l, fueron la mejor combinación de niveles que dieron la mayor concentración de carotenoides. Se demuestra que los valores no se autocorrelacionaron (Durbin Watson = 2.07216,  $P=0.4727$ ).

5. Que la mejor combinación de factores para obtener concentraciones de xantófilas cerca de 1.07  $\mu\text{g/ml}$ , fueron intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$ , longitudes de onda de 467, 523 y 625 nm y concentración de nitratos de 0.15 g/l. El supuesto de independencia se cumple tal y como lo demuestra el estadístico de Durbin Watson=2.59179 (P=0.8194).
6. Que tanto en los resultados de concentración de carotenoides y xantófilas, la intensidad de luz desempeñó un papel significativo en las respuestas evaluadas, por lo que se confirma la importancia de controlar y obtener los niveles de operación óptimos para la producción de estos pigmentos de interés industrial.
7. Que es importante que se tome atención a las interacciones presentes entre los factores utilizados en la producción de xantófilas. Ya que evaluar un factor a la vez y no tomar en cuenta las posibles interacciones entre los factores puede llevar a la mal interpretación de los resultados obtenidos.
8. Que iluminar los fotobiorreactores con luces LEDs utilizando una longitud de onda específica permitió controlar de manera eficiente las condiciones fisiológicas del cultivo celular.
9. La implementación del diseño factorial  $2^3$  con cuatro puntos centrales nos permitió medir y analizar los efectos, y las posibles interacciones, entre la intensidad de luz, longitud de onda y concentración de nitratos en la densidad celular y la concentración final de carotenoides y xantófilas.

---

## **RECOMENDACIONES**

---

Debido a que en los resultados obtenidos se encontraron interacciones entre los factores evaluados, se recomienda que se analice el efecto de estos dándole mayor importancia a las interacciones sobre los factores principales.

Se recomienda la utilización de luces LEDs en fotobiorreactores ya que permiten controlar la intensidad de luz y longitud de onda, dos factores importantes en el crecimiento celular y acumulación de pigmentos de interés industrial.

---

## REFERENCIAS

---

- Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci Technol*. 2008;19(1):31-39.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*. 2008;51(3):456-467.
- Shahidi F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends Food Sci Technol*. 2009;20(9):376-387.
- Haefner B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003;8(12):536-544.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers R a, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2014;31(2):160-258.
- Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65(6):635-648.
- De la Calle F. Fármacos de origen marino. *Treballs la SCB*. 2007;58:141-155.
- Costa JAV, de Morais MG. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol*. 2011;102(1):2-9.
- Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour Technol*. 2006;97(18):2402-2406.
- Chauton MS, Olsen Y, Vadstein O. Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. *Biomass and Bioenergy*. 2013;58:87-94.
- Christaki E, Florou-Paneri P, Bonos E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *Int J Food Sci Nutr*. 2011;62(8):794-799.
- Guedes a C, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of high added-value compounds--a brief review of recent work. *Biotechnol Prog*. 2011;27(3):597-613.
- Borowitzka M a. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol*. 2013;25(3):743-756.
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs*. 2011;9(4):625-644.

- Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, Guerra P, Lopes Da Silva T. Crypthecodinium cohnii with emphasis on DHA production: A review. *J Appl Phycol.* 2009;21(2):199-214.
- Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry.* 2007;68(7):954-979.
- Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011;38(12):1879-1890.
- Olaizola M, Huntley ME. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Science.* 2003;9:143-164.
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89(5):1275-1288.
- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 2005;24(11):629-641.
- Del Campo J, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(6):1163-1174.
- Han D, Wang J, Sommerfeld M, Hu Q. Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) to photooxidative stress. *J Phycol.* 2012;48(3):693-705.
- Sarada AR, Baskaran V, Ravishankar GA. Identification of Carotenoids from Green Alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC - MS ( APCI ) and Their Antioxidant Properties. 2009;19(August):1333-1341.
- Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, Katoh S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb Technol.* 2004;35(1):81-86.
- Boussiba S. Minireview Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia plantarum* 2000;(2):111-117.
- Collins AM, Jones HDT, Han D, Hu Q, Beechem TE, Timlin J a. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS One.* 2011;6(9):e24302.

- Wayama M, Ota S, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One*. 2013;8(1):e53618.
- Kobayashi M. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2003;8(6):322-330.
- Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res*. 2010;106(1-2):155-177.
- Gu W, Xie X, Gao S, Zhou W, Pan G, Wang G. Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLoS One*. 2013;8(7).
- Peled E, Pick U, Zarka A, Shimoni E, Leu S, Boussiba S. Light-induced oil globule migration in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). *J Phycol*. 2012;48(5):1209-1219.
- Fábregas J, Domínguez a, Maseda a, Otero a. Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(5-6):545-551.
- Nish N, Tsuji Y. Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Fermentation and Bioengineering* 1997;84(1):94-97.
- García-Malea MC, Brindley C, Río E Del, Ación FG, Fernández JM, Molina E. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochem Eng J*. 2005;26(2-3):107-114.
- He P, Duncan J, Barber J. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of Cultivation Parameters. *Plant Biology* 2007;49(4):447-452.
- Denery JR, Dragull K, Tang CS, Li QX. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal Chim Acta*. 2004;501(2):175-181.
- Grünwald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biol Chem*. 2001;276(8):6023-6029.
- Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74(5):987-994.

- Suh IS, Joo H-N, Lee C-G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J Biotechnol.* 2006;125(4):540-546.
- Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng.* 2007;98(1):300-305.
- Wan M, Zhang J, Hou D, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol.* 2014;167:276-283.
- Brentner LB, Eckelman MJ, Zimmerman JB. Combinatorial life cycle assessment to inform process design of industrial production of algal biodiesel. *Environ Sci Technol.* 2011;45(16):7060-7067.
- Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, Sim SJ. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 2012;35:309-315.
- Pozza C, Schmuck S, Mietzel T. A novel photobioreactor with internal illumination using Plexiglas rods to spread the light and LED as a source of light for wastewater treatment using microalgae. *Congress on Water Climate and Energy* 2010:1-7.
- Jacobi A, Steinweg C, Sastre RR, Posten C. Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics. *Eng Life Sci.* 2012;12(6):621-630.
- Jeon Y-C, Cho C-W, Yun Y-S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(3):490-495.
- Mont L, Juc A, Pedrosa C, et al. Astaxanthin : structural and funcional aspects. *Nutr. Campinas.* 2010;23(6):1041-1050.
- Liu X, Osawa T. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(1):187-193.
- Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(2):185-196.
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod.* 2006;69:443-449.

- Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2008;101(10A):58D - 68D.
- Domínguez-Bocanegra a R, Ponce-Noyola T, Torres-Muñoz J a. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;75(4):783-791.
- Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci World J.* 2014;2014:1-7.
- Tume RK, Sikes AL, Tabrett S, Smith DM. Effect of background colour on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked colour. *Aquaculture.* 2009;296(1-2):129-135.
- Satoh A, Tsuji S, Okada Y, et al. Preliminary Clinical Evaluation of Toxicity and Efficacy of A New Astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* Extract. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;44(3):280-284.
- Goto S, Kogure K, Abe K, et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2001;1512(2):251-258.
- Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:18.
- Wang X, Willen R, Wadstrom T. Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2452-2457.
- Hussein G, Nakamura M, Zhao Q, et al. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(1):47-52.
- Østerlie M, Bjerkgeng B, Liaaen-Jensen S. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *J Nutr Biochem.* 2000;11(10):482-490.
- Kistler A, Liechti H, Pichard L, et al. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch Toxicol.* 2002;75(11-12):665-675.

- Atta M, Idris A, Bukhari A, Wahidin S. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol*. 2013;148:373-378.
- Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T, Katoh S. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J*. 2008;39(3):575-580.
- Wang H-C, Cho M-G, Riznichenko G, Rubin AB, Lee J-H. Investigation of the maximum quantum yield of PS II in *Haematococcus pluvialis* cell cultures during growth: effects of chemical or high-intensity light treatment. *J Photochem Photobiol B*. 2011;104(3):394-398.
- Fu W, Guðmundsson O, Paglia G, et al. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(6):2395-2403.
- Hsieh C-H, Wu W-T. A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae. *Biochem Eng J*. 2009;46(3):300-305.
- Rubio FC, Camacho FG, Sevilla JMF, Chisti Y, Grima EM. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol Bioeng*. 2003;81(4):459-473.
- Mohsenpour SF, Richards B, Willoughby N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour Technol*. 2012;125:75-81.
- Das P, Lei W, Aziz SS, Obbard JP. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol*. 2011;102(4):3883-3887.
- Shu CH, Tsai CC, Liao WH, Chen KY, Huang HC. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012;87(5):601-607.
- Yoshimura S, Ranjbar R, Inoue R, Katsuda T, Katoh S. Effective utilization of transmitted light for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*. 2006;102(2):97-101.
- Chen G-Q, Chen F. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol Lett*. 2006;28(9):607-616.
- Park JH, Yoon JJ, Park HD, Kim YJ, Lim DJ, Kim SH. Feasibility of biohydrogen production from *Gelidium amansii*. In: *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol 36.; 2011:13997-14003.

- Sellner KG, Doucette GJ, Kirkpatrick GJ. Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(7):383-406.
- Dominguez-Bocanegra a. R, Legarreta IG, Jeronimo FM, Campocosio a. T. Influence of enviromental and nutritional factors in the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Bioresour Technol*. 2004;92(2):2089-2214.
- Yuan JP, Gong XD, Chen F. Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in Haematococcus lacustris by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. *J Agric Food Chem*. 1997;45(97):1952-1956.
- Lababpour A, Hada K, Shimahara K, Katsuda T, Katoh S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. *J Biosci Bioeng*. 2004;98(6):452-456.
- Orosa M, Franqueira D, Cid a, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in Haematococcus pluvialis. *Bioresour Technol*. 2005;96(3):373-378.
- Lababpour A, Shimahara K, Hada K, Kyoui Y, Katsuda T, Katoh S. Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. *J Biosci Bioeng*. 2005;100(3):339-342.
- Kim Z-H, Kim S-H, Lee H-S, Lee C-G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using Haematococcus pluvialis. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(3):414-419.
- Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga Haematococcus pluvialis. *Plant Cell Physiol*. 1991;32(7):1077-1082.
- Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga Haematococcus pluvialis. *Plant Physiol*. 2001;125(February):810-817.
- 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):204-207.
- Yuan J-P, Chen F. Chromatographic Separation and Purification of trans -Astaxanthin from the Extracts of Haematococcus pluvialis. *J Agric Food Chem*. 1998;46(8):3371-3375.
- Katsuda T, Shiraishi H, Ishizu N, Ranjbar R, Katoh S. Effect of light intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. *J Biosci Bioeng*. 2008;105(3):216-220.

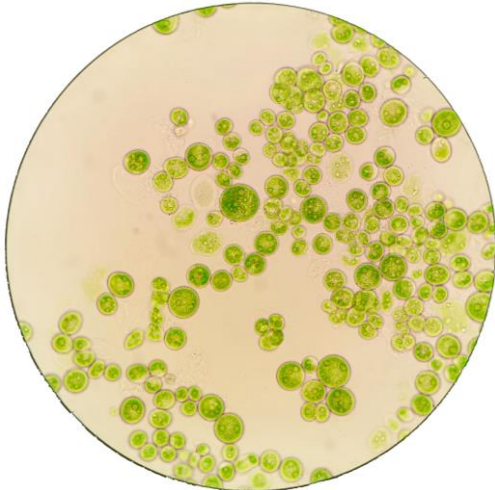
- Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *N Biotechnol*. 2009;26(3-4):199-204.
- Wu Z, Chen G, Chong S, Mak N-K, Chen F, Jiang Y. Ultraviolet-B radiation improves astaxanthin accumulation in green microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett*. 2010;32(12):1911-1914.
- Boussiba S, Bing W, Yuan JP, Zarka A, Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett*. 1999;21(7):601-604.
- Choi Y-E, Yun Y-S, Park JM, Yang J-W. Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluvialis* cultivation. *Bioresour Technol*. 2011;102(24):11249-11253.
- Davies BH. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. In: London: Academic Press.; 1976:38-155.
- Hong M-E, Choi SP, Park Y-I, et al. Astaxanthin production by a highly photosensitive *Haematococcus* mutant. *Process Biochem*. 2012;47(12):1972-1979.
- Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68:237-241.
- Zhu C, Naqvi S, Capell T, Christou P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch Biochem Biophys*. 2009;483(2):182-190.
- Ernst H. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(11):2213-2226.
- Jackson H, Braun CL, Ernst H. The Chemistry of Novel Xanthophyll Carotenoids. *Am J Cardiol*. 2008;101(10 SUPPL.).
- Bhosale P, Bernstein PS. Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(4):445-455.
- Daniel P, Varela M, Maria A, et al. Redalyc. Análisis crítico del diseño factorial 2k sobre casos aplicados. *Scientia et Technica*. 2011;XVII:101-106.
- Cema Udel, Los Eldey, Yacuzzi E. El diseño experimental y los metodos de Taguchi: conceptos y aplicaciones en la industria farmacéutica. 2004.
- Humberto Gutierrez Pulido R de la VS. *Análisis Y Diseño de Experimentos*. 3rd ed. Ciudad de Mexico: Mc Graw Hill; 2012.

- Biruete A, Hernandez E, Sierio E. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Pediatrics*. 2009;73(3)136-145.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*. 2003;21(5):210-216.
- Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga Haematococcus pluvialis. *Scientific World* 2014;2014.
- Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tib Tech* 2000;18:160-167.
- Nguyen KD. Astaxanthin : A Comparative Case of Synthetic VS . Natural Production Astaxanthin : A Comparative Case of. *Chem and biomolecular*. 2013.
- Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26(11):1925-1939.
- Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res*. 2006;89(1):27-41.
- Liu XJ, Wu YH, Zhao LC, Xiao SY, Zhou AM, Liu X. Determination of astaxanthin in Haematococcus pluvialis by first-order derivative spectrophotometry. *J AOAC Int*. 2011;94:1752-1757.
- Lababpour A, Lee C-G. Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in Haematococcus pluvialis cells by first-order derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. *J Biosci Bioeng*. 2006;101(2):104-110.
- García-Malea MC, Acién FG, Fernández JM, Cerón MC, Molina E. Continuous production of green cells of Haematococcus pluvialis: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme Microb Technol*. 2006;38(7):981-989.
- Göksan T, Ak İ, Kılıç C. Growth Characteristics of the Alga Haematococcus pluvialis Flotow as Affected by Nitrogen Source , Vitamin , Light and Aeration. 2011;383:377-383.
- Ranga Rao a., Baskaran V, Sarada R, Ravishankar G a. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass — A repeated dose study. *Food Res Int*. 2013;54(1):711-717.
- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of Chlorella sorokiniana. *Photosynthetica*. 2007;45(2):309-311.

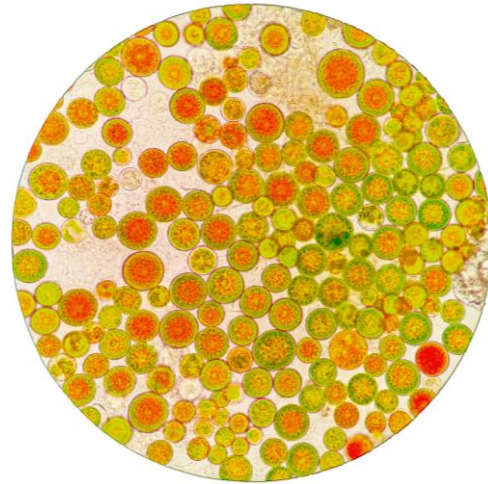
## ANEXOS

### ANEXO 1

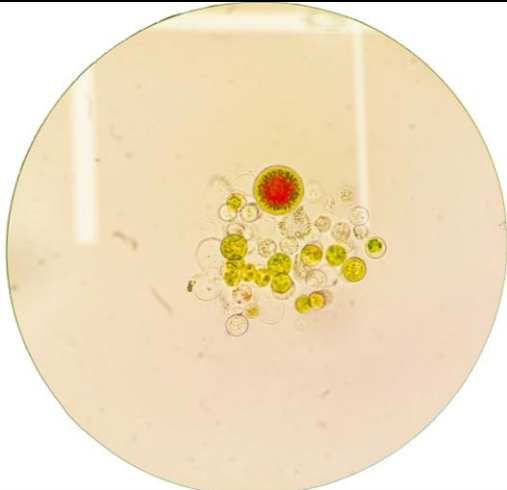
Fotos de las condiciones fisiológicas de las células al final de cada corrida experimental.



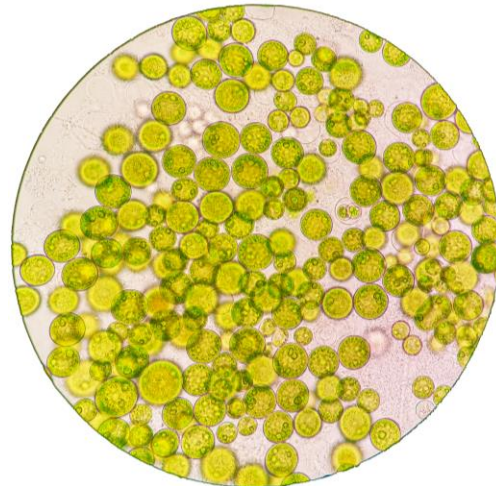
**Corrida experimental 1**



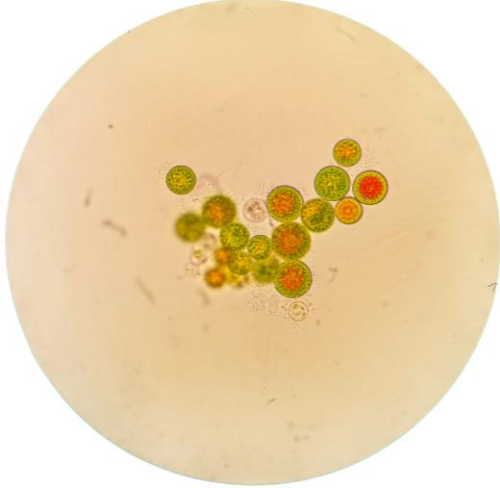
**Corrida experimental 2**



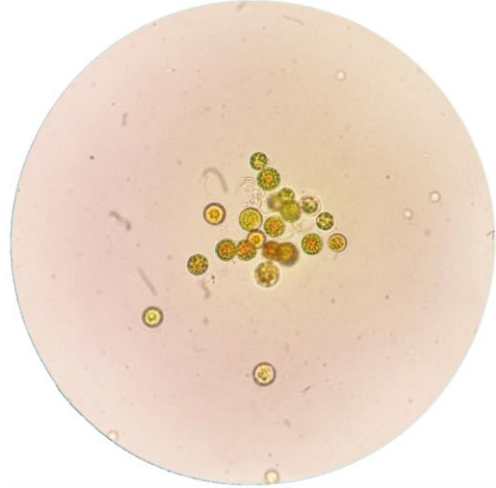
**Corrida experimental 3**



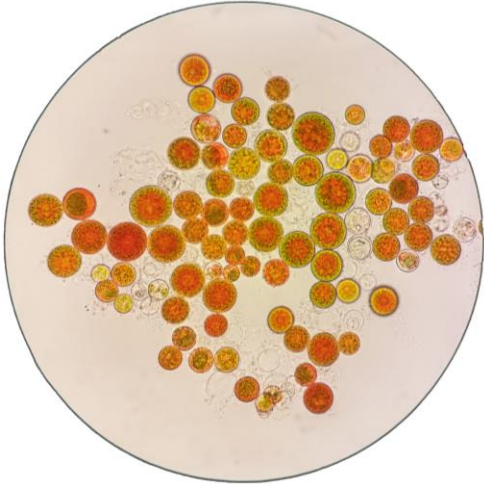
**Corrida experimental 4**



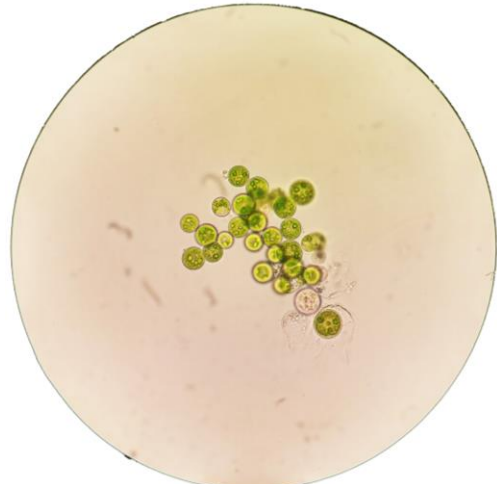
**Corrida experimental 5**



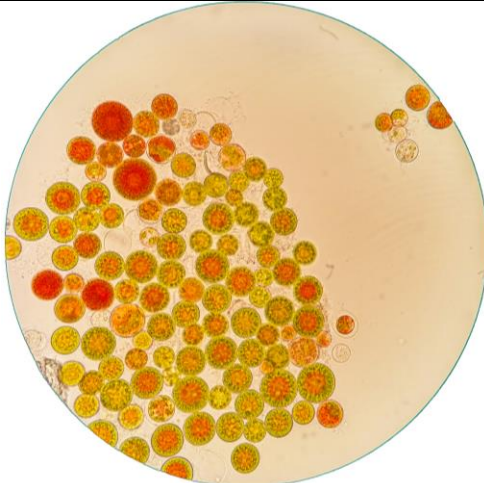
**Corrida experimental 6**



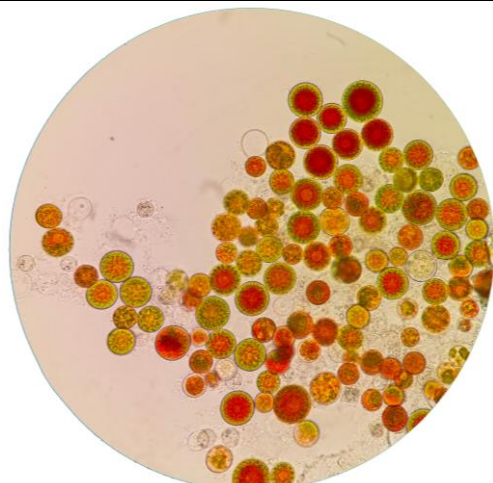
**Corrida experimental 7**



**Corrida experimental 8**

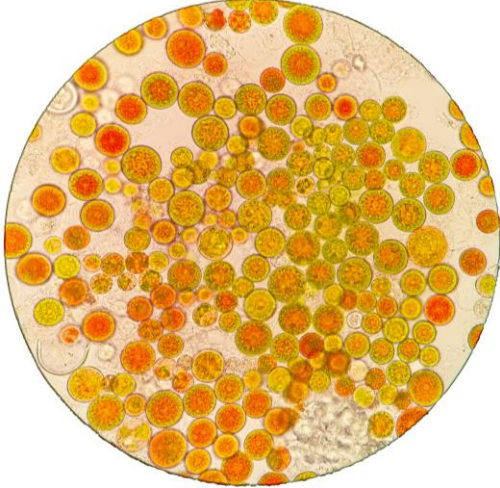


**Corrida experimental 9**

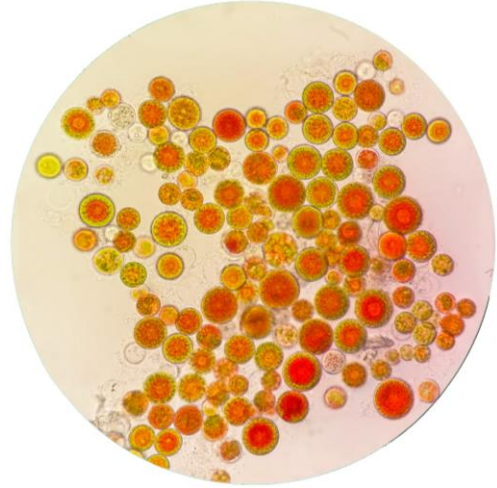


**Corrida experimental 10**

---



**Corrida experimental 11**



**Corrida experimental 12**

---