

# Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz

Natalia Rodríguez Rodríguez ; Judith Elena Camacho Kurmen<sup>a</sup>

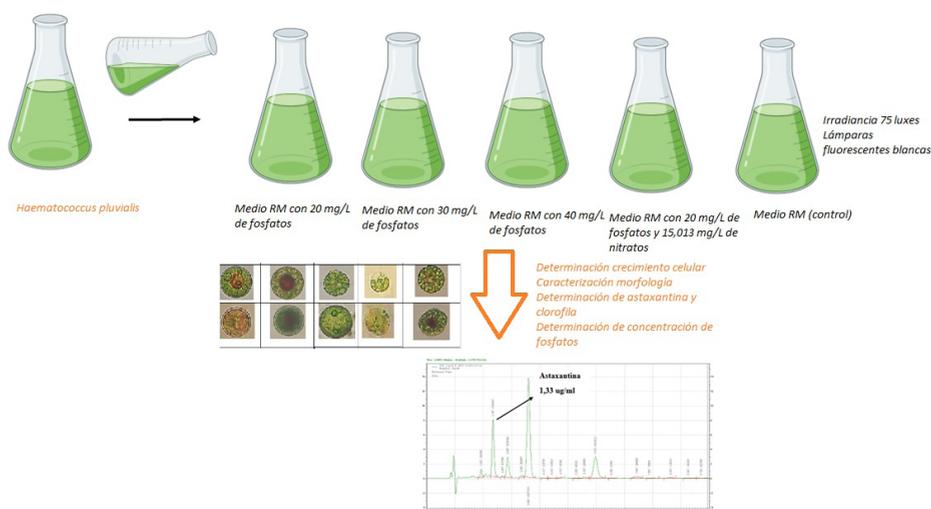
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.

<sup>a</sup>jelenacamacho@unicolmayor.edu.co

Fecha recepción: 18 de noviembre de 2023

Fecha aceptación: 6 de agosto de 2024

## Resumen gráfico



## Resumen

La astaxantina es un carotenoide producido por la microalga *Haematococcus pluvialis*, la cual acumula hasta un 3 % de astaxantina en peso seco, lo cual se realiza bajo condiciones de estrés, como el aumento de luz y la limitación de nutrientes. Por esto, el objetivo es establecer condiciones para que *H. pluvialis* produzca astaxantina usando alta irradiancia y deficiencia de fosfatos en el medio Rudic (RM).

Se utilizaron biorreactores con *H. pluvialis* UTEX 2505, los cuales contenían de fosfatos 20 mg/L (RM1), 30 mg/L (RM2) y 40 mg/L (RM3), 20 mg/L de fosfatos con 15,013 mg/L de nitratos (RM4) y un control (RM5), usando pH de 6.8, fotoperiodo 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de  $20 \pm 1$  °C. El tratamiento con mayor crecimiento fue el RM3 con  $9.69 \times 10^5$  cel./mL; El ANOVA (95 %) no estableció diferencias significativas entre tratamientos (F:0,272; P: 0,895; df: 4). La mayor concentración de clorofila fue para RM3, con 26.2 µg/mL; (27 pg/cel.) sin diferencias significativas entre tratamientos (F: 1,053; P: 0,392; df: 4). También, RM3 obtuvo mayor consumo de fosfatos (62,5 %) con diferencias significativas entre tratamientos (F: 3,887; P: 0,011; df: 4). Los cambios morfológicos demostraron mayor acumulación de células aplanosporas para RM1 y RM2. El tratamiento RM2 obtuvo mayor concentración de astaxantina con 5.772 µg/mL (6,11 pg/cel); sin diferencias significativas entre tratamientos (F: 0,622; P: 0,649; df: 4). Estableciéndose que la deficiencia de fosfatos combinada con alta intensidad de luz, aumentan la producción de astaxantina.

**Palabras clave:** Microalga; Carotenoide; Deficiencia de fosfatos; Medio de cultivo; Alta intensidad de luz.

Cita: Rodríguez Rodríguez N, Camacho Kurmen JE. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz. rev. ion. 2024;37(2):49-64. doi:10.18273/revion.v37n2-2024004

# Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under the phosphate deficiency effect and high light intensity

## Abstract

Astaxanthin is a carotenoid produced by the microalgae *Haematococcus pluvialis*, which can accumulate up to 3% of Astaxanthin in dry weight. It is produced under stress conditions, such as increased light and nutrient limitation. The objective is to establish conditions for *H. pluvialis* to produce astaxanthin using phosphate deficiency in the Rudic medium (RM).

Bioreactors with *H. pluvialis* UTEX 2505 were used, which contained 20 mg/L (RM1), 30 mg/L (RM2), 40 mg/L (RM3) phosphate, 20 mg/L phosphate with 15,013 mg/L of nitrate (RM4) and a control (RM5). A pH of 6.8, photoperiod 20h light and 4h darkness and irradiance of 75 luxes in stress phase, white light, temperature of  $20 \pm 1$  °C was used. The fastest growing treatment was RM3 with  $9.69 \times 10^5$  cell/mL; The ANOVA (95 %) didn't establish significant differences between treatments (F: 0.272; P: 0.895; df: 4). The highest concentration of chlorophyll was by RM3, with 26.2 µg/mL (27 pg/cell); no significant differences were established between treatments (F: 1.053; P: 0.392; df: 4). In addition, RM3 obtained higher phosphate consumption (62.5%); with significant differences between treatments (F: 3.887; P: 0.011; df: 4). The morphological changes demonstrated an accumulation of aplanospores cells for RM1 and RM2 treatments. The RM2 treatment obtained higher astaxanthin with 5,772 µg/mL (6.11 pg/cell); no significant differences were established between treatments (F: 0.622; P: 0.649; df: 4). It was established that phosphate deficiency combined with high light intensity, increases the production of astaxanthin in *H. pluvialis*.

**Keywords:** Microalgae; Carotenoid; Phosphate deficiency; Grow medium; High light intensity.

# Produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* sob efeito da deficiência de fosfato e alta intensidade luminosa

## Resumo

A astaxantina é um carotenóide produzido pela microalga *Haematococcus pluvialis*, que acumula até 3% de astaxantina em peso seco, o que ocorre em condições de estresse, como aumento de luminosidade e limitação de nutrientes. O objetivo estabelecer condições para que *H. pluvialis* produza astaxantina utilizando alta irradiância e deficiência de fosfato no meio Rudic (RM).

Foram utilizados biorreatores com *H. pluvialis* UTEX 2505, que continham 20 mg/L (RM1), 30 mg/L (RM2) e 40 mg/L (RM3) de fosfatos, 20 mg/L de fosfatos com 15,013 mg/L de nitratos (RM4) e um controle (RM5), utilizando pH de 6,8, fotoperíodo 20h de luz e 4h de escuro e irradiância de 75 lux na fase de estresse, luz branca, temperatura de  $20 \pm 1$  °C. O tratamento que apresentou maior crescimento foi o RM3 com  $9,69 \times 10^5$  células/mL; A ANOVA (95 %) não estabeleceu diferenças significativas entre os tratamentos (F: 0,272; P: 0,895; gl: 4). A maior concentração de clorofila foi para RM3, com 26,2 µg/mL (27 pg/cel.); sem diferenças significativas entre os tratamentos (F: 1,053; P: 0,392; gl: 4). Além disso, o RM3 obteve maior consumo de fosfato (62,5 %); com diferenças significativas entre os tratamentos (F: 3,887; P: 0,011; gl: 4). As alterações morfológicas demonstraram maior acúmulo de células de aplanósporos para RM1 e RM2. O tratamento RM2 obteve maior concentração de astaxantina com 5,772 µg/mL (6,11 pg/cel.); sem diferenças significativas entre os tratamentos (F: 0,622; P: 0,649; gl: 4). Estabelecer que a deficiência de fosfato combinada com alta intensidade luminosa aumenta a produção de astaxantina.

**Palavras-chave:** Microalgas; Carotenóides; Deficiência de fosfato; Crescimento médio; Alta intensidade luminosa.

## Introducción

Los organismos fotosintéticos como las microalgas son de interés biotecnológico ya que se han utilizado para distintos fines como producir biodiésel, acumular metabolitos de interés, como ácidos grasos. Se han aprovechado sus capacidades para biorremediar aguas residuales, producir bioproteínas para la alimentación humana y animal, y además, se han utilizado sus propiedades para la acumulación de pigmentos carotenoides [1]. Por lo tanto, las microalgas como *H. pluvialis* disponen de una gran cantidad de aplicaciones, lo cual hace que posean un alto interés comercial como es la producción de astaxantina [2,3].

Actualmente la astaxantina es un pigmento utilizado en diferentes campos como la industria alimenticia, cosmética, nutracéutica, en alimentación animal y farmacéutica, y además de usarse en áreas como la ornitología y la acuicultura, se produce a nivel comercial [1,4,5]. Para el año 2028, el mercado de la astaxantina natural alcanzará los 4,75 billones de dólares, experimentando una tasa de crecimiento anual del 7,6% durante el período comprendido entre 2022 y 2028 [5]. Estas aplicaciones se deben

principalmente a su capacidad como colorante, a sus propiedades antioxidantes (inclusive en mayor proporción que el R-caroteno, alfa-caroteno, beta-caroteno y la luteína), además de ayudar a incrementar la respuesta inmune, inhibir radicales libres, tener un efecto preventivo contra el cáncer, entre muchas otras [5]. Es por esto que su uso ha mejorado la calidad de vida de diferentes seres vivos encontrados en los campos y áreas ya mencionados. La microalga *H. pluvialis* produce astaxantina de muy buena calidad, por lo que su producción a partir de esta microalga tiene un valor agregado para los consumidores, que no tiene la astaxantina producida sintéticamente. La astaxantina es producida por la microalga *H. pluvialis* de manera natural, acumulando hasta un 3% de astaxantina en peso seco, siguiendo la ruta biosintética de los carotenoides (Figura 1). Sin embargo, la microalga tiene un crecimiento lento debido a un ciclo celular complejo que dificulta la acumulación de astaxantina [4,6-8]. El pigmento es producido bajo condiciones de estrés, siendo estas principalmente el exceso de luz, limitaciones de fósforo y nitrógeno, y el estrés causado por diferentes concentraciones de sal.

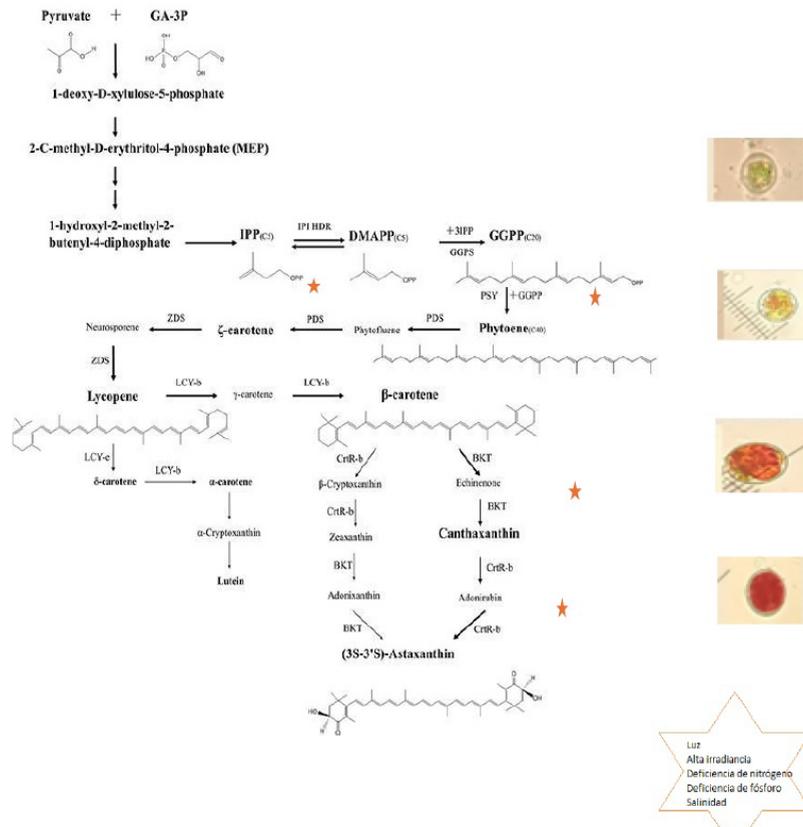


Figura 1. Biosíntesis de astaxantina por *H. pluvialis* [4].

Diferentes estudios han demostrado que la deficiencia de nutrientes como los fosfatos, son un factor de estrés para la microalga, haciendo que se obtenga una mayor acumulación de astaxantina debido a que estimula los genes *bkt* y *Crtb* en la ruta metabólica de la producción de astaxantina. He *et al.* [9], evaluaron el efecto que tenían diferentes parámetros en medios de cultivo EGJM y BG11 para el crecimiento de *H. pluvialis*, entre los cuales se encontraban la intensidad de luz y la carencia de hierro, fosfato y sulfuro. Se evidenció en el día 3 de cultivo que para tratamientos realizados en el medio BG11 se produjo el doble de contenido de astaxantina para cuando se utilizó medio BG11 sin azufre que cuando se utiliza medio BG11 con deficiencia de fosfato e hierro. Sin embargo, para los medios EGJM, aquel que no contenía fósforo obtuvo 29 pg/cel de astaxantina en el día 11 de cultivo, mientras que el medio sin azufre demostró una concentración de 30 pg/cel. Además, se observó que la mayor cantidad del carotenoide se obtuvo con una intensidad de luz de  $170 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Otro estudio fue el realizado por López *et al.* [10], donde se utilizó el medio de cultivo BG11 con 1,5 % de  $\text{CO}_2$ , en un biorreactor tipo *airlift* para el cultivo de *H. pluvialis*. Como resultados se obtuvo que, en los niveles de fosfato más bajos, es decir  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , hubo un crecimiento exponencial que estaba entre los días 5 y 17, alcanzado una biomasa de  $2,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y una velocidad específica de crecimiento de  $0,16 \text{ d}^{-1}$ . Por su parte, el contenido de astaxantina fue mayor en el día 21, con una concentración de  $34,8 \text{ mg/g}$  de biomasa.

En otro trabajo, Imamoglu *et al.* [11] utilizaron cuatro medios de cultivo para *H. pluvialis* y dos intensidades de luz diferentes, por un periodo de 14 días. Como resultados se obtuvo que, a una intensidad de luz de  $445 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  el agua destilada con  $\text{CO}_2$  fue quien obtuvo una mayor acumulación del carotenoide, con una producción máxima de  $27,53 \text{ mg/g}$ , seguido del medio libre de fosfato, que obtuvo una acumulación máxima de  $26,93 \text{ mg/g}$ .

Del mismo modo, Kang *et al.* [12] para el cultivo de *H. pluvialis* realizaron un cultivo *fed-batch* para posteriormente inducir una etapa fotoautotrófica utilizando un fotobiorreactor. La etapa de crecimiento se realizó suministrando una cantidad limitada de nutrientes como fosfatos y nitratos, cuya concentración se mantuvo alrededor de 11 y  $40 \text{ mg/L}$ , respectivamente. Se consiguió una producción de biomasa de  $1,47 \text{ g/L}$ , con una

productividad de  $0,33 \text{ g/L}^{-1}\text{día}$ . Sin embargo, posterior a esto se indujo la etapa fotoautotrófica de las células vegetativas en la que se aumentó la intensidad lumínica a  $400 \mu\text{mol fotón/m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con los demás parámetros de cultivo fijos, obteniendo una producción de astaxantina de  $190 \text{ mg/L}$  con una productividad de  $14 \text{ mg/L/día}$ .

De la misma manera, Nagaraj *et al.* [13] hallaron una mayor acumulación de astaxantina por *H. pluvialis* para cada una de las siguientes condiciones: a un pH de 7,0 se alcanzaron  $68,59 \mu\text{g/mL}$  de astaxantina; a una irradiancia de  $40,0 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  se logró una concentración de  $73,57 \mu\text{g/mL}$ ; con  $0,2 \text{ M}$  de  $\text{NaNO}_3$  se logró una concentración de  $67,49 \mu\text{g/mL}$ ; con  $2,0 \text{ mM}$  de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  se alcanzaron  $63,32 \mu\text{g/mL}$ ; utilizando  $2,0 \text{ mM}$  of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se llegó a  $66,21 \mu\text{g/mL}$ ; agregando  $0,02 \text{ M}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  se produjo  $77,65 \mu\text{g/mL}$  de astaxantina; y por último con  $0,06 \text{ M}$  de  $\text{NaCl}$  se llegó a  $68,26 \mu\text{g/mL}$  del carotenoide. En cuanto a la concentración de fosfatos, se encontró una mayor acumulación de clorofila *a* ( $8,32 \mu\text{g/mL}$ ) en una concentración de  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a los 21 días de cultivo; sin embargo, la mayor acumulación de clorofila *b* ( $4,9 \mu\text{g/mL}$ ) se obtuvo a los 18 días de cultivo, siendo 30 % mayor que en el control. Por otra parte, el máximo de carotenoides totales fue de  $77,65 \mu\text{g/mL}$  a  $0,02 \text{ M}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , siendo 20 % mayor que en el control. En este estudio se concluyó que los parámetros que se involucraron con un mayor contenido de astaxantina fueron la intensidad de luz y la concentración de fosfatos.

Igualmente, Jiajie *et al.* [14] realizaron un estudio en el cual se evaluaron factores que podrían mejorar la producción de carotenoides por parte de *H. pluvialis*, dentro de estos se incluyeron diferentes concentraciones de  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , concentraciones de fosfatos y diferentes intensidades de luz, en medios MAVII, BBM y BG-11. Los resultados mostraron que el recuento de células rojas de la microalga aumentó en el medio BBM. Adicionalmente, se halló que la deficiencia de fosfato podría resultar en una producción efectiva de astaxantina, inclusive más que la deficiencia de hierro, nitratos y sulfatos. De igual forma se encontró que una alta intensidad de luz puede incrementar un 65 % la acumulación del carotenoide. Este estudio recalca la importancia de utilizar una mayor intensidad de luz junto con la deficiencia de fosfatos en el medio, para poder incrementar la producción de astaxantina en células de *H. pluvialis*.

Por otra parte, Chul *et al.* [15] realizaron un estudio en donde se evidenció que la producción de astaxantina por *H. pluvialis* incrementó al realizar un cultivo mixotrófico de dos etapas, una primera de perfusión, en donde se logró alcanzar una biomasa de 2,47 g/L con una concentración óptima de 720 mg/L de acetato, 118 mg/L de nitrato y 11,5 mg/L de fosfato. Y una segunda etapa de inducción en donde se obtuvo una producción de 12,3 g/L de biomasa y 602 mg/L de astaxantina, con un parámetro adicional que era el aumento gradual de la intensidad de luz, y con concentraciones de 54, 12,4 y 1,2 mg/L de acetato, nitrato y fosfato, respectivamente. Estos resultados indican que combinar estas dos etapas de cultivo en la microalga, se puede llegar a utilizar como una estrategia para la producción simultánea tanto de la biomasa como de la astaxantina en altas concentraciones para *H. pluvialis*.

También, Kumar en el año 2014 [16] realizó un estudio en el cual analizó el efecto de la deficiencia de fosfatos y nitratos, en cuanto al peso seco, la acumulación de clorofila, los carotenoides totales y la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* UTEX 2505. Para lograr este fin se utilizó el medio MES-Volvox, con un pH de 6,7, al cual se le redujo la concentración de nitratos y fosfatos un 50 %, es decir, que el medio quedó con 0,25 mM de  $\text{CaNO}_3$  y 0,08 de mM de  $\text{PO}_4$ , por lo tanto, la concentración que trae normalmente el medio MES-Volvox fue utilizada como control (0,50 mM  $\text{CaNO}_3$  y 0,16 mM  $\text{PO}_4$ ). Adicionalmente, el cultivo se expuso a diferentes concentraciones de luz: 246  $\mu\text{mol fotones/m}^2\text{s}^{-1}$ , 40  $\mu\text{mol fotones/m}^2\text{s}^{-1}$ ; el control se expuso a 123  $\mu\text{mol fotones/m}^2\text{s}^{-1}$ . El cultivo se inoculó por 7 días en 100 mL de medio y alcanzó una concentración de  $10^6$  cel/mL aproximadamente, posteriormente se incubó por 28 días. Se evidenció que en el control se obtuvo un valor de 28,66  $\mu\text{g astaxantina/mg}$ . En cuanto a la intensidad de luz, la menor de estas, es decir 40  $\mu\text{mol fotones/m}^2\text{s}^{-1}$  fue quien indujo un mayor peso seco.

En otro estudio, Miranda *et al.* [17] evaluaron el efecto de las bajas concentraciones de fosfato en el medio BBM sobre el crecimiento celular y la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* UTEX 2505. El crecimiento celular se evaluó a diferentes concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,20- 0,30-0,40 g/L) del medio de cultivo BBM por el método de peso seco cada 24 horas. En cuanto a las condiciones de cultivo, se utilizó un pH de 6,6, temperatura de 25 °C, fotoperiodos 12:12, intensidad lumínica de

52  $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$  y burbujeo de aire enriquecido con 2 % de  $\text{CO}_2$ . Como resultados, se evidenció que la concentración de 0,40 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  presentó el mayor crecimiento celular, con 1,21 g/L a los 10 días de cultivo, con velocidad específica de crecimiento de 0,18  $\text{d}^{-1}$ . Sin embargo, en cuanto a la producción de astaxantina, la mayor cantidad de esta fue de 39,99  $\mu\text{g/mL}$ , a una concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de 0,20 g/L.

También, Miranda *et al.* [18] evaluaron como se ve afectado el crecimiento de *H. pluvialis* UTEX 2505 y la producción de astaxantina, por diferentes concentraciones de nitrógeno y fosfatos. Los resultados indicaron que la mayor producción de biomasa se dio en un tratamiento que contenía 1,0 g/L de nitrógeno y 1,0 g/L de fósforo en medio BBM, sin embargo, este tratamiento obtuvo los niveles más bajos de astaxantina; por su parte el tratamiento que contenía 0,2 g/L de nitrógeno y 0,6 g/L de fósforo, fue el tratamiento que obtuvo una mayor producción de astaxantina con un valor de 168,4  $\mu\text{g/mL}$ . Se concluyó que, al disminuir las cantidades de nitrógeno incrementan los niveles de astaxantina en *H. pluvialis* UTEX 2505, además que las diferentes concentraciones de nitrógeno y fosfato afectan los niveles del perfil lipídico del microorganismo; de igual manera se demostró que la rigidez de la membrana celular de la microalga, disminuye a medida que se incrementan los niveles de astaxantina.

Del mismo modo, Li. *et al* [19] realizaron una comparación entre las células móviles y no móviles de la microalga *H. pluvialis*, respecto a su acumulación de astaxantina, cambios morfológicos, tasa de mortalidad y el diámetro de los quistes formados. Para este fin se utilizó un inóculo que se mantuvo con una irradiancia baja de 25  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$  fotones, en medio BBM con 0,75 g/L de  $\text{NaNO}_3$ . Se logró obtener un recuento celular de  $0,5 \times 10^6$  cel/mL para los dos tipos de células en medios libres de fosfatos. Posterior a esto las células se expusieron a 80  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$  fotones, a 25 °C por 9 días.

Los cultivos se airearon con 1,5 % de  $\text{CO}_2$  continuamente a 1,5 vvm. Como resultados se obtuvo que la mayor acumulación de astaxantina fue de  $48,42 \pm 3,13$  mg/L en las células vegetativas cuya productividad fue de  $5,04 \pm 0,15$  mg/día, marcando una diferencia significativa con respecto a las células móviles. En la observación microscópica se evidenció daño celular en las células móviles, con una tasa de mortalidad de  $22,2 \pm 3,97$  %. Este estudio evidencia la importancia de las células

vegetativas para la acumulación de astaxantina, pues debido a su composición resisten mejor las condiciones de estrés que las células móviles; además se evidencia que la carencia de fosfatos en el medio puede potenciar la acumulación del carotenoide en *H. pluvialis*.

En general se puede establecer que el uso de fosfatos en bajas concentraciones en los medios BBM, BG-11 y Mes Volvox, combinadas con un aumento gradual de la irradiancia hasta 400  $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}^{-1}$  permiten acumular astaxantina hasta cantidades de 190 mg/L y si se combina con deficiencia de nitratos se obtiene una mayor productividad de astaxantina como en los trabajos realizados por Kang *et al.* [12], Chul *et al.* [15], Kumar [16] y Miranda *et al.* [18] posiblemente por el aumento de la expresión de los genes *psy*, *pds*, *bkt* y *crtr-b* en la ruta metabólica de la astaxantina [20] debido a la combinación de estos factores de estrés.

Es así que se propone como objetivo establecer las condiciones para que *H. pluvialis* produzca astaxantina usando alta intensidad de luz blanca y deficiencia de fosfatos en medio de cultivo RM, determinando el crecimiento de la microalga, el cambio morfológico, la concentración de astaxantina y de clorofila producidas por la microalga, y la concentración de fosfatos presentada durante el periodo de estudio.

## Metodología

### Microorganismo

Se utilizó una cepa de referencia de la microalga *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505 (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA). La cepa se mantuvo en medio sólido y líquido Mes-Volvox (por recomendación de la UTEX), a baja irradiancia y una temperatura entre 15 y 20 °C.

### Preparación del inoculo

El cultivo se realizó en medio de cultivo Mes-Volvox, el cual consistió en (g/L):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  11,8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4,  $\text{Na}_2\text{glicerofosfato} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05,  $\text{KCl}$  0,05, MES 1,95,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,026, solución de metales PIV 6 mL L<sup>-1</sup>, Vitamina B12 1 mL L<sup>-1</sup>, HEPES y biotina 1 mL L<sup>-1</sup> (<https://utex.org/products/mes-volvox-medium>), ajustado a pH 6,7, luz blanca provista por lámparas fluorescentes (Tlt 20w/54RS marca Philips) con una irradiancia de 90  $\mu\text{E}$ , fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad, temperatura de 25 °C,  $\text{CO}_2$  al 5,0%

y agitación manual de 10 segundos al día. El cultivo se monitoreo por medio de microscopía en cámara de Neubauer para conteo y evaluación de parámetros como color (pigmento), morfología y viabilidad celular, cada tercer día [21].

## Efecto de la deficiencia de fosfatos sobre la producción de astaxantina

### Preparación del cultivo

Para evaluar la deficiencia de fosfatos como condición de estrés, se utilizó medio RM el cual consistió en (mg/L) de  $\text{NaNO}_3$  300,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  80,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  60,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  58,5, EDTA 7,5,  $\text{NaCl}$  20,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,3,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,26,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  17, ajustado a pH 6,7 [22]. Los tratamientos con deficiencia de fosfatos se realizaron con concentraciones de 20 mg/L (RM1), 30 mg/L (RM2), y 40 mg/L (RM3) de fosfatos en forma de sales  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , las cuales fueron seleccionadas según revisión bibliográfica [11,23,24], además se utilizó un tratamiento con concentración de 20 mg/L de fosfatos y 15,013 mg/L de nitratos (RM4). Se tuvo un control, con medio RM sin modificar (RM5), que se trabajó bajo las mismas condiciones. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los tratamientos y el control se trabajaron a un pH de 6,8, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 19 días, lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradiancia de 65 luxes, temperatura de  $20 \pm 1$  °C, agitación manual una vez al día por 10 segundos y aire filtrado. Posterior a los 19 días, se aplicaron factores de estrés utilizando un fotoperiodo de 20 h luz y 4 h de oscuridad, con un aumento de la irradiancia a 75 luxes, hasta completar 65 días de cultivo.

### Generación de las curvas de crecimiento

Se construyeron curvas de crecimiento a partir de al menos tres ensayos independientes. Se tomó una muestra diaria para la determinación del número de células por mL por microscopía usando cámara de Neubauer [8].

### Determinación de la producción de clorofila y astaxantina

Se determinó la producción de pigmentos [1] la concentración de clorofila (clorofila a, Método APHA) y [4] la concentración de astaxantina, por método APHA [1] y HPLC [25].

## Determinación de los cambios morfológicos celulares

Los cambios de morfología durante las diferentes fases de crecimiento de *H. pluvialis* se documentaron por microfotografía y análisis de imagen.

## Determinación de fosfatos

Se midió la concentración de fosfatos, por reacción con ácido ascórbico, mezclando 50 µL de medio diluido con 50 µL de la solución, esta contenía ácido ascórbico al 2 %p/v,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,5 %p/v y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,6 M. La concentración en  $\text{PO}_4$  se obtuvo midiendo la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro. Se realizó la curva de calibración (absorbancia en función de la concentración expresada en mg/mL con patrones de referencia [26].

## Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento ensayado. Se aplicó el Software Dmfit, con base en el modelo de Baranyi y Roberts [27], para ajustar las curvas de crecimiento obtenidas. Además, se realizó un análisis de varianza ANOVA (95 %) usando Excel 2016, para determinar diferencias significativas entre tratamientos y t student.

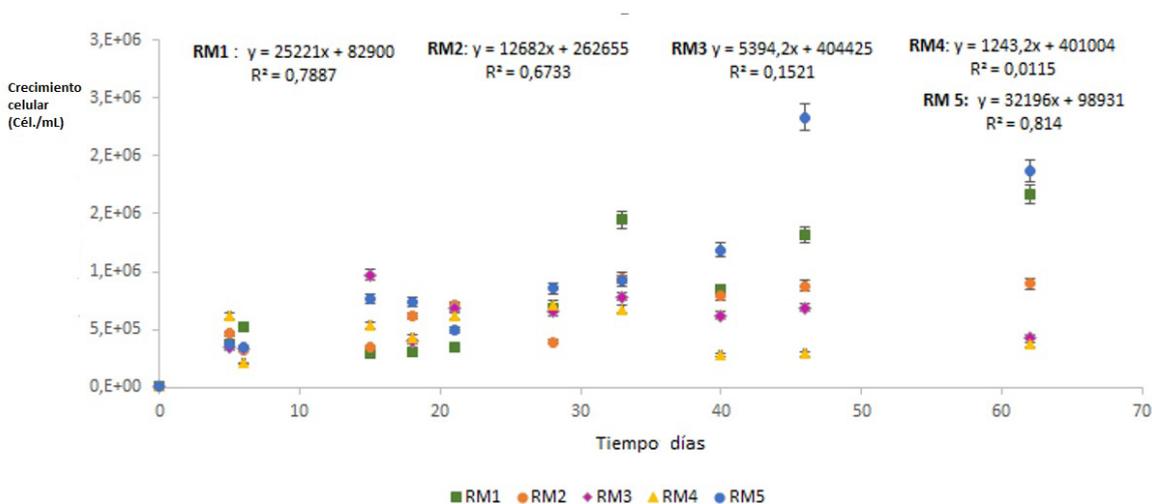
## Resultados

### Crecimiento de *H. pluvialis*

El tratamiento con mayor crecimiento celular fue el RM3 que contenía 40 mg/L fosfatos con  $9.69 \times 10^5$  cel/mL; El ANOVA (95 %) no estableció diferencias significativas entre tratamientos (F:0,272; P: 0,895; df: 4) (Figura 2).

De acuerdo con los resultados, se evidencia que el tratamiento que obtuvo una velocidad de crecimiento mayor fue el que contenía 30 mg/L de fosfatos con un valor de  $0,317 \text{ /d}^{-1}$ . De igual forma el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 % fue el que obtuvo una menor velocidad de crecimiento con  $0,009 \text{ /d}^{-1}$ ; el control que contiene medio RM presentó  $0,285 \text{ /d}^{-1}$ .

El ANOVA (95 %) estableció que no existen diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al recuento celular (F:0,272; P: 0,895; df: 4), sin embargo, como se mencionó previamente, el tratamiento en el cual se obtuvo un porcentaje mayor de crecimiento a los 15 días de cultivo fue el que contenía 40 mg/L fosfatos, tiempo en donde termina la fase de crecimiento exponencial. Las curvas de crecimiento mostraron un crecimiento exponencial en los tratamientos RM1, RM2 y RM3. El control presentó un crecimiento exponencial, indicando que hay un crecimiento por parte de la microalga. (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *H. pluvialis*: RM1: Tratamiento con 20 mg/L de fosfatos; RM2: Tratamiento con 30 mg/L de fosfatos; RM3: Tratamiento con 40 mg/L de fosfatos; RM4: Tratamiento con 20 mg/L de fosfatos y 15,013 mg/L de nitratos y RM5: Tratamiento control medio RM.

### Cambio morfológico de *H. pluvialis*

Macroscópicamente, se observaron cambios en el color durante el cultivo, desde un color verde inicial, hasta el depósito de pigmento rojo en las paredes de los biorreactores como sucedió en el tratamiento RM1 y en el control (RM5) (Figura 3). Se observó, para el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos, la acumulación del pigmento rojo en la pared del biorreactor para el día 62 de cultivo, esto debido al efecto de los diferentes factores de estrés utilizados, como la disminución de fosfatos y una alta intensidad de luz.

Microscópicamente, se observaron formas móviles vegetativas de color verde, en todos los

tratamientos. Además, se observaron células palmellas en su etapa vegetativa de color verde en todos los tratamientos para el día 15 de cultivo, a excepción del RM4, el cual contenía células biflageladas móviles. Lo que concuerda con un crecimiento lento debido a la disminución de la concentración de fosfatos y de nitrógeno (20 mg/L de  $K_2HPO_4$  y  $NaNO_3$  al 5 %). De igual forma se observaron células aplanosporas en todos los tratamientos, destacándose principalmente el RM1 y RM2, por lo que se evidenciaron todas las fases de cambio morfológico desde células vegetativas hasta aplanosporas en estos tratamientos (Figura 3).

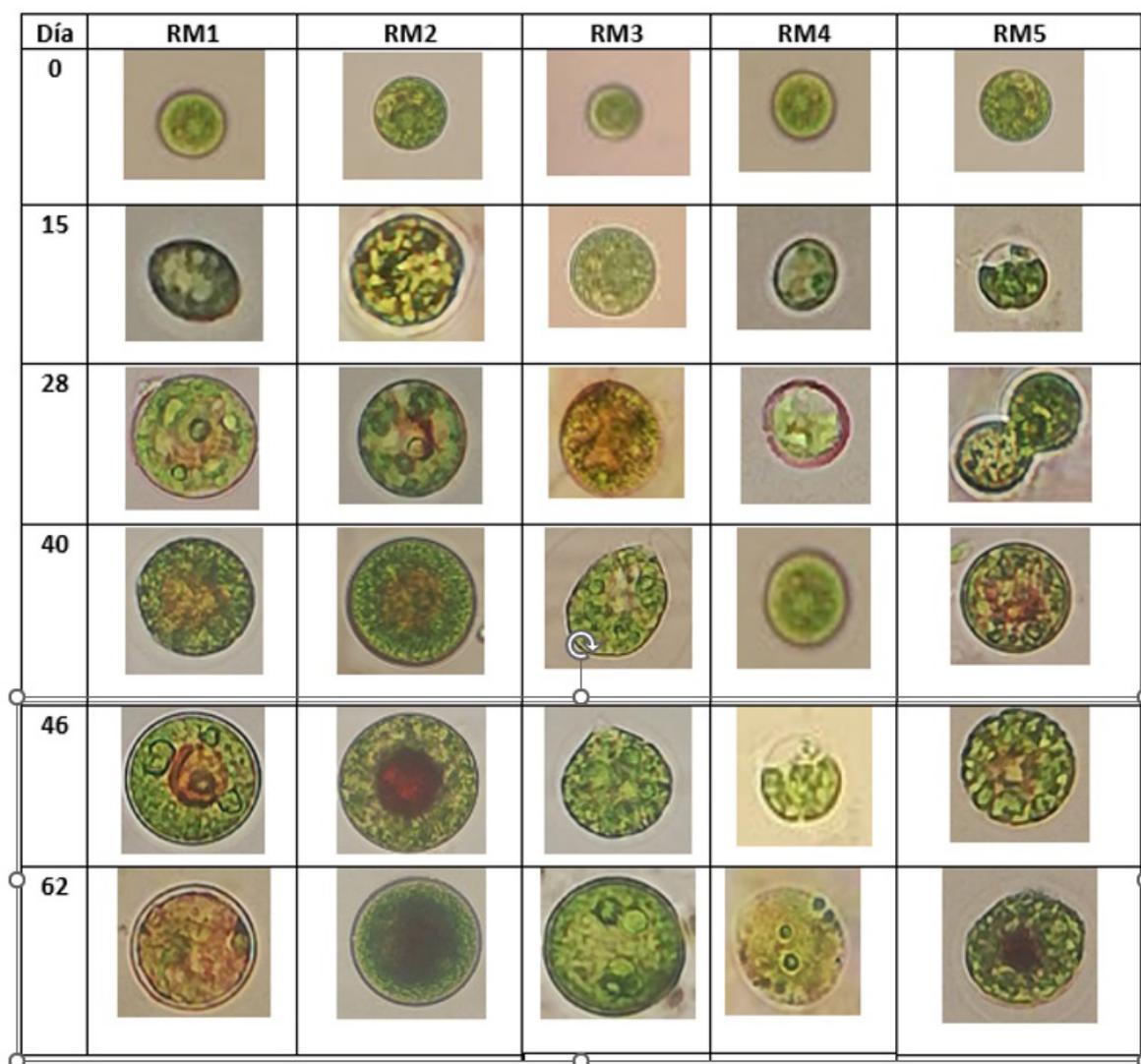


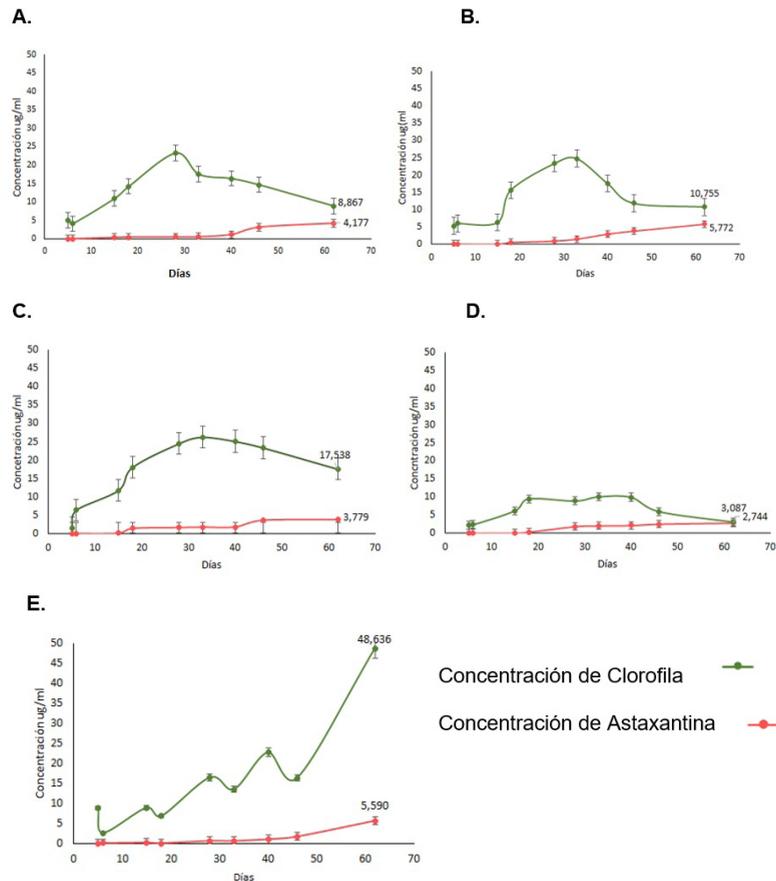
Figura 3. Cambio morfológico para cada uno de los tratamientos (RM1, RM2, RM3, RM4 y control). Tamaño 40x.

**Efecto de la deficiencia de fosfatos y una irradiancia alta sobre la producción de astaxantina**

Se puede evidenciar que para el día 40 de cultivo los tratamientos que tuvieron una mayor acumulación de astaxantina fueron el que contenía 30 mg/L de fosfatos con 2,89 µg/mL (3,06 pg/cel), seguido del que contenía 20 mg/L de fosfatos y 15,013 mg/L de nitratos con 2,08 µg/mL (2,92 pg/cel), el que contenía 40 mg/L de fosfatos con 1,81 µg/mL (1,87 pg/cel), y el que contenía 20 mg/L de fosfatos con 1,12 µg/mL (0,671 pg/cel). El día 62 de cultivo, el tratamiento que obtiene mayor concentración del pigmento es el que contenía 30 mg/L de fosfatos con 5,77 µg/mL (6,11 pg/cel) de astaxantina, seguido por el que contenía 20 mg/L de fosfatos con 4,18 µg/mL (2,50 pg/cel); del carotenoide, el que contenía 40 mg/L de fosfatos obtiene 3,77 µg/mL (3,89 pg/cel); y el que contenía 20 mg/L de fosfatos y 15,013 mg/L de nitratos obtiene 2,74 µg/mL (3,85 pg/cel) de astaxantina. El control obtuvo 5,59 µg/mL (2,40 pg/cel) (Figura 4).

El tratamiento que obtuvo una mayor cantidad de clorofila fue el que contenía 40 mg/L de fosfatos con 26,2 µg/mL (27 pg/cel) para el día 33, seguido el que contenía 30 mg/L de fosfatos con 24,7 µg/mL (26,2 pg/cel). El control obtuvo una concentración de 48,636 µg/mL (21 pg/cel) en el día 62 de cultivo, indicando un mayor metabolismo celular y por lo tanto una mayor biomasa (Figura 4).

Al finalizar el cultivo, se evidencia que el tratamiento que tenía 40 mg/L de fosfatos tuvo un 82,4 % más clorofila que el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 %, de igual forma el tratamiento con 30 mg/L de fosfatos obtuvo 71,3 % más clorofila que el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 %. Lo que se correlaciona con un mayor metabolismo celular y por lo tanto un mayor crecimiento celular, debido a la disponibilidad de nutrientes como fosfatos y nitrógeno, como es el caso del tratamiento con 30 mg/L de fosfatos , que presentó un crecimiento de  $9,69 \times 10^5$  cel/mL a los 15 días de cultivo.



**Figura 4.** Concentración de clorofila y astaxantina en µg/ml por el método espectrofotométrico. **A.** Tratamiento con 20 mg/L de fosfatos. **B.** Tratamiento con 30 mg/L de fosfatos **C.** Tratamiento con 40 mg/L de fosfatos **D.** Tratamiento con 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 %. **E.** Tratamiento control medio RM.

El ANOVA (95 %) no encontró diferencias significativas para clorofila (F: 1,053; P: 0,392; df: 4) ni para astaxantina (F: 0,622; P: 0,649; df: 4) entre tratamientos.

La mayor concentración de astaxantina fue obtenida en el tratamiento que contenía 30 mg/L de fosfatos con 5,772 µg/mL (6,11 pg/cel), a los 62 días de cultivo. Este medio tenía un pH de 6,8, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 19 días, irradiancia de 65 luxes. Posterior a los 19 días, se utilizó un fotoperiodo de 20 h luz y 4 h de oscuridad, con un aumento de la irradiancia a 75 luxes.

Se observó el pico estándar de astaxantina a 0,1µg/mL (Figura 5-A), demostrando que con la metodología cromatográfica empleada se logró la elución rápida del analito. Se observó que la muestra tiene una complejidad de entre 8 y 17 componentes (Figura 5-B). Se encontró una concentración máxima de astaxantina para el tratamiento que tenía 40 mg/L de fosfatos, de 1,33 µg/mL para el día 40 de cultivo (Figura 5-B), resultado cercano al obtenido por el método espectrofotométrico en la misma muestra (1,81 µg/mL).

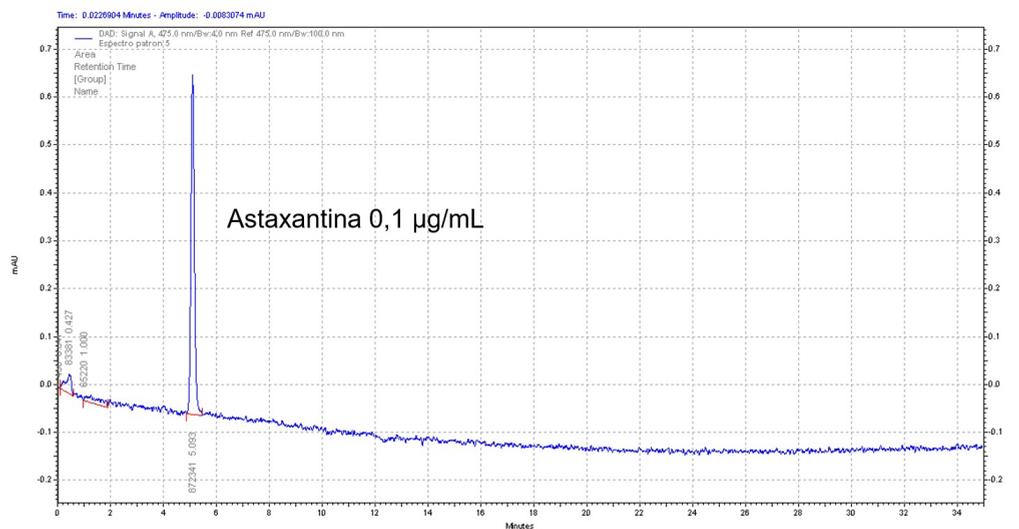


Figura 5A. Cromatograma estándar de astaxantina.

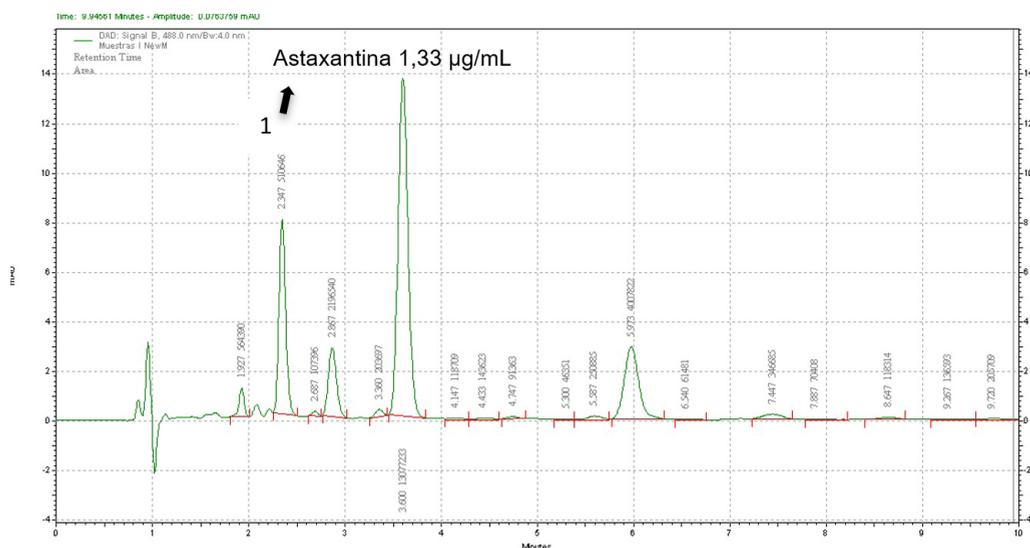


Figura 5B. Cromatograma de la muestra de *H. pluvialis* UTEX 2505 productora de astaxantina.

### Determinación de fosfatos

Se observó la reducción del 47,8 % de fosfatos en tratamiento que tenía 20 mg/L de fosfatos, del 55,9 % en el tratamiento que tenía 30 mg/L de fosfatos, del 62,5 % en el tratamiento que tenía 40 mg/L de fosfatos y del 43 % en el tratamiento que tenía 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 %. El control presentó un consumo del 80,6 % de fosfatos (Figura 6).

El ANOVA (95 %) estableció diferencias significativas para el consumo de fosfatos entre tratamientos (F: 3,887; P: 0,011; df: 4). Esta diferencia significativa se observó al comparar el tratamiento RM1 (t= 1,94; P: 0,0326), RM2 (t= 1,94; P: 0,042) y RM4 (t= 1,94; P: 0,037), con el tratamiento Control (RM5).

Siendo el tratamiento que contenía 40 mg/L de fosfatos obtuvo el mayor consumo de estos

nutrientes (62,5 %), lo que se complementa con un crecimiento celular de  $9.69 \times 10^5$  cel/mL a los 15 días de cultivo, siendo el mayor para este tiempo. Al correlacionar los resultados obtenidos con la producción de astaxantina, se observa que hubo un consumo de entre el 43 y 62,5 % de fosfatos, siendo un factor de estrés para aumentar la acumulación de astaxantina como ocurre en los tratamientos que contenían 20 mg/L de fosfatos y el tratamiento que contenían 30 mg/L de fosfatos, en los cuales se produjo  $4.17 \mu\text{g/mL}$  ( $2,50 \text{ pg/cel}$ ) y  $5,77 \mu\text{g/mL}$  ( $6,11 \text{ pg/cel}$ ), respectivamente. Por su parte, el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos y  $15,013 \text{ mg/L}$  de nitratos obtuvo menor consumo de fosfatos (43 %), lo que se correlaciona con un menor crecimiento celular  $5,41 \times 10^5$  cel/mL a los 15 días de cultivo.

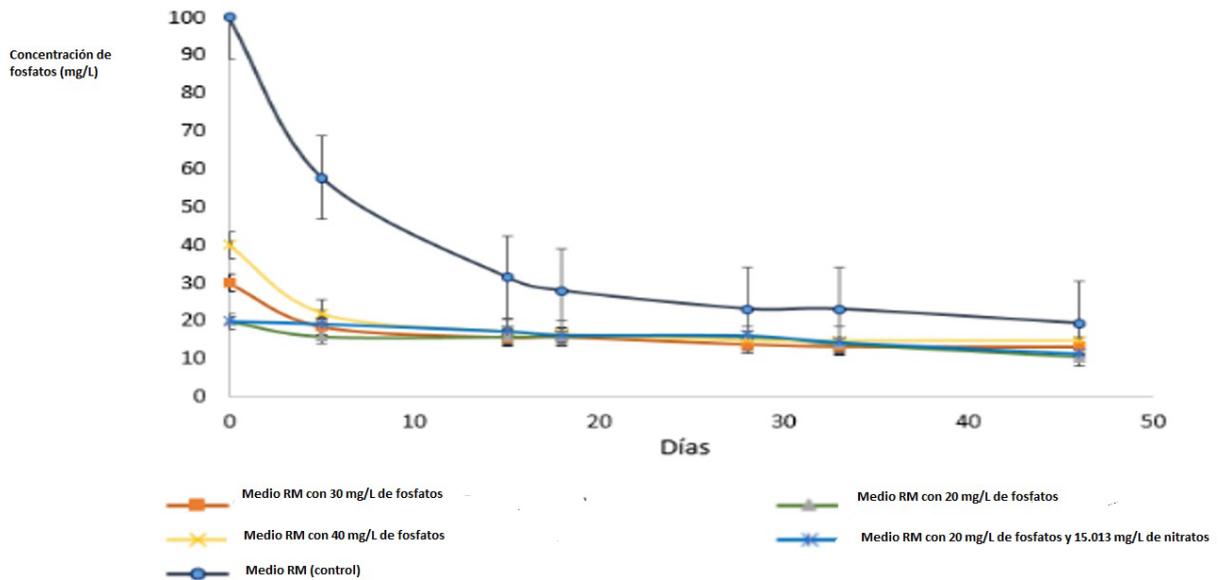


Figura 6. Concentración de fosfatos.

## Discusión

En este estudio se utilizó el medio de cultivo de Rudic (RM), el cual ha sido empleado por algunos autores para obtener biomasa de *H. pluvialis* y su consecuente acumulación de astaxantina (3,5, 20). El uso del medio RM ha demostrado una mayor tasa de crecimiento de la microalga con respecto a otros medios, ya que estudios como el de Niño *et al.* [8] e Imamoglu *et al.* [22] muestran un incremento en la acumulación de astaxantina al emplearlo, comparado con otros medios como BBM y OHM. La composición del mismo evidencia una concentración de 0,08 g/L para  $K_2HPO_4$ , 0,02 g/L de  $KH_2PO_4$  y 0,3 g/L de  $NaNO_3$ , demostrando así que existe un requerimiento mayor de nitrógeno, con respecto al fósforo por parte de *H. pluvialis*.

De acuerdo a los resultados, se evidenció que a los 15 días de cultivo el tratamiento que obtuvo una mayor producción de biomasa fue el que contenía 40 mg/L de fosfatos con  $9,69 \times 10^5$  cel/mL tiempo en donde termina la fase exponencial de crecimiento. Por su parte, el tratamiento con 20 mg/L de fosfatos tuvo mayor producción de biomasa a partir del día 33 con  $1,44 \times 10^6$  cel/mL. El control obtuvo  $2,33 \times 10^6$  células/mL en el día 46 de cultivo, indicando que el ensayo se realizó adecuadamente y con las condiciones adecuadas. Estos resultados evidencian que concentraciones más altas de fosfatos en el medio, hacen que la biomasa se incremente rápidamente debido a la disponibilidad de nutrientes que tiene *H. pluvialis* para su desarrollo y metabolismo. Por lo tanto la biomasa obtenida se puede comparar con algunos estudios como el de Tocquin *et al.* [26], en donde se evidencia un crecimiento celular de  $2 \times 10^6$  cel/mL en medio BBM en donde la concentración de fosfatos era mayor.

Es importante recalcar, que tanto los nitratos como los fosfatos son elementos esenciales para el crecimiento de la microalga; por su parte, el nitrógeno es esencial en todas las proteínas funcionales y estructurales de las microalgas, además de que representa entre el 7 – 10 % del peso seco celular en las mismas [1,7]. Por lo tanto, si existe una limitación de la concentración de nitrógeno en el medio, *H. pluvialis* va a generar un aumento de la expresión de genes *psy*, *pds*, *bkt* y *crtr-b* obteniendo una mayor productividad de astaxantina [20]. De igual forma, si las concentraciones de nitrógeno disminuyen a un valor muy bajo, el flujo de carbono fijado en la fotosíntesis, ya no conducirá a la vía para sintetizar

proteínas, sino que toma la vía para sintetizar carbohidratos o lípidos [1]. Por lo que la limitación de nitrógeno es un factor de estrés para *H. pluvialis*, pudiendo acumular mayores cantidades de astaxantina. Algunos estudios como el de Wang *et al.* [28], Gómez *et al.* [20] y Miranda *et al.* [17,18] demuestran que la deficiencia de nitrógeno en medios RM y BBM incrementa significativamente los niveles de astaxantina en los cultivos.

Por su parte, el fósforo desempeña un rol fundamental dentro de las microalgas, pues es un macronutriente esencial para el proceso metabólico, ya que hace parte de compuestos estructurales y funcionales que son esenciales para el desarrollo del microorganismo, como la síntesis de ácidos nucleicos [1,4]. Adicionalmente, este macronutriente es tomado por *H. pluvialis* en forma de ortofosfatos, quien se une a diferentes compuestos orgánicos a través de diferentes tipos de fosforilación.

De igual forma, se sabe que el requerimiento de fósforo por parte de la microalga es menor en cuanto al nitrógeno, sin embargo, una relación N:P en el medio puede variar la toma de nutrientes por parte de *H. pluvialis* [1]. Es por ello, que en este estudio el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos y nitrógeno al 5 %, obtuvo el menor valor de biomasa comparado con los demás tratamientos, debido a que este medio no solo tiene una carencia de fosfatos (20 mg/mL) sino una deficiencia de nitrógeno a 15,013 mg/L en el medio RM que no le permitió al microorganismo reproducirse en mayor cantidad, con una velocidad de crecimiento de  $0,009$  /d<sup>-1</sup>; a diferencia del medio control, que tuvo una velocidad de crecimiento de  $0,285$ /d<sup>-1</sup>. Esto se correlaciona con estudios como el de Ding *et al.* [24], en donde mayores concentraciones de biomasa se obtuvieron en medios donde había mayor disponibilidad de fosfatos.

Los resultados demuestran un mayor consumo de fosfatos en el tratamiento que contenía 40 mg/L de fosfatos con 62,5%; el control por su parte obtuvo un consumo del 80,6 %, lo que se correlaciona con una mayor biomasa en este medio ( $2,33 \times 10^6$  cel/mL), debido a la disponibilidad del macronutriente. Esto demuestra que los fosfatos son utilizados para el metabolismo de la microalga, y una deficiencia de los mismos es un factor de estrés que puede contribuir a la acumulación de astaxantina, como se observó en el tratamiento que contenía 20 mg/L de fosfatos, en el que se ve una acumulación del carotenoide en las paredes de los biorreactores.

Durante el cultivo se pudo observar en cuanto al cambio morfológico de *H. pluvialis*, las tres formas que se muestran en el trabajo de Shah *et al.* [4], las cuales son: célula móvil vegetativa verde o macrozoide, célula palmella vegetativa verde y la célula aplanospora, esta última siendo la que acumula finalmente la astaxantina; las células aplanosporas se vieron en todos los tratamientos, sin embargo se destacan en presencia en los tratamientos con 20 y 30 mg/L de fosfatos, quienes tenían mayor deficiencia de fosfatos y en el control (debido al aumento de la biomasa). Estos cambios se pueden relacionar con el estudio de Niño *et al.* [8] en donde se utilizó el medio RM obteniendo gran cantidad de células aplanosporas. Además, se observa el efecto de la combinación de los factores de estrés, como la disminución de fosfatos y el aumento de luz blanca.

Es importante aclarar que las células macrozoides pueden ser de forma esférica, elipsoidal o células en forma de pera con dos flagelos que emergen del extremo anterior, y un cloroplasto con numerosos pirenoides; tiene una longitud de 8-20  $\mu\text{m}$  con una característica matriz extracelular gelatinosa, y posee una gran cantidad de vacuolas cerca del protoplasto de la célula [1,4]. Cuando las condiciones ambientales o de cultivo son desfavorables, los macrozoides pierden sus flagelos, aumentan su tamaño y empiezan a formar una estructura amorfa de múltiples capas en las regiones internas de la matriz extracelular o la pared celular primaria a medida que se convierten en células palmella no móviles, son células que se pueden llegar a dividir en 3-32 células hijas a través de la mitosis [2].

Además, cuando continúan las condiciones de estrés y cesa la división celular, la célula palmella se transforma en aplanospora asexual. En este último las células contienen una funda trilaminar gruesa y rígida, y una pared celular secundaria de material resistente; estas dos estructuras hacen que la célula pueda resistir las condiciones de estrés a las que está sometida. Las aplanosporas hacen referencia a la fase enquistada con acumulación de astaxantina en el ciclo de vida de *H. pluvialis*; esto debido a que es capaz de acumular carotenoides como la astaxantina en forma de lípidos depositados en el citoplasma, haciendo que tenga un color rojo brillante característico de estas células [4]. Como ya se mencionó previamente, estas células aplanosporas se evidenciaron en mayor proporción en los tratamientos con mayor deficiencia de fosfatos, relacionándose con la

cantidad de astaxantina presente en los medios: 4,17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2,50 pg/cel) en el tratamiento con 20 mg/L de fosfatos y 5,77  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (6,11 pg/cel), en el tratamiento con 30 mg/L de fosfatos.

De igual forma, se pudo establecer que la combinación de una alta intensidad de luz con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 horas oscuridad junto con la deficiencia de fosfatos, fueron un factor clave para que se acumulara mayor cantidad del pigmento. Como se observa en el día 62 de cultivo, en los tratamientos con 20 mg/L y 30 mg/L de fosfatos (4,17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2,50 pg/cel) y 5,77  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (6,11 pg/cel), de astaxantina, respectivamente). Es importante destacar que para este tiempo de cultivo, los tratamientos ya habían empezado una fase de muerte celular, consecuencia de la poca disponibilidad de nutrientes, por lo que empezaron a disminuir la cantidad de células palmellas y junto con ellas la acumulación del carotenoide, siendo evidente que el estrés combinado de la limitación de fosfato y estrés con luz continua fue la combinación más efectiva utilizada para mejorar la productividad de la astaxantina en *H. pluvialis*, como también lo reporta Liyanaarachchi *et al.* [29]. El ANOVA (95 %) no estableció diferencias significativas entre tratamientos para las concentraciones de astaxantina halladas (F: 0,622; P: 0,649; df: 4). Sin embargo, la concentración más alta de astaxantina se encontró en el tratamiento que contenía 30 mg/L de fosfatos, junto con una alta exposición de luz, lo cual se correlaciona con estudios como el de Nagaraja *et al.* [13] y el de Miranda *et al.* [17] en donde se utilizó estrés por deficiencia de fosfatos, logrando una alta concentración de astaxantina.

Por otra parte, es importante mencionar que la luz juega un papel fundamental en cultivos fotoautótrofos de *H. pluvialis*, debido a que regula el ciclo celular y provoca la fotosíntesis. Sin embargo, una alta intensidad de luz induce la acumulación de astaxantina, ya que los carotenoides tienen un efecto fotoprotector en la célula. El crecimiento celular depende de la intensidad de flujo de fotones, la calidad y cantidad de este, y el fotoperiodo al cual se expone la microalga [21,30]. En este trabajo se utilizó una irradiancia de 75luxes con un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 horas oscuridad como condiciones de estrés. En diferentes estudios como el de He *et al.* [9] y el de Imamoglu *et al.* [22] han utilizado irradiancias altas en medios EGJM y BG11 para el primero y RM libre de fosfatos para el segundo, obteniendo concentraciones elevadas de astaxantina (26,93 mg/g). Esto demuestra

la importancia de combinar altas irradiancias y factores de estrés, como la deficiencia de fosfatos, para aumentar la producción de células aplanosporas, incrementando así las concentraciones de astaxantina; por lo que se recomienda para mejorar la productividad de *H. pluvialis* en posteriores estudios.

Se estableció que la combinación de factores de estrés como la deficiencia de fosfatos y el aumento de la intensidad de luz blanca, incrementan la producción de astaxantina como se pudo observar en los tratamientos con mayor deficiencia de fosfatos (20 y 30 mg/L), así como disminuye los costos de producción.

### Conclusiones

La mayor concentración de astaxantina fue obtenida en el tratamiento que contenía 30 mg/L de fosfatos, con 5,77 µg/mL (6,11 pg/cel.) a los 62 días de cultivo. Bajo las condiciones de un pH de 6,8, un fotoperiodo de 20 horas luz y 4 horas oscuridad e irradiancia de 75 luxes, en fase de estrés. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la concentración de astaxantina (F: 0,622; P: 0,649; df: 4). El tratamiento que obtuvo un mayor consumo de fosfatos fue el que contenía 40 mg/L de fosfatos con 62,5 %. Demostrando así que el fósforo es un macronutriente importante para el metabolismo de *H. pluvialis*, correlacionándose con un mayor crecimiento de la microalga y mayor contenido de clorofila. Se hallaron diferencias significativas entre tratamientos para el consumo de fosfatos (F: 3,887; P: 0,011; df: 4), en los tratamientos RM1 (t=1,94; P: 0,0326), RM2 (t= 1,94; P: 0,042) y RM4 (t= 1,94; P: 0,037), comparados con el tratamiento Control. En este estudio se pudo establecer que la combinación de factores de estrés como lo son la limitación de fosfatos y una alta intensidad de luz blanca, permitieron obtener el pigmento astaxantina en la microalga *H. pluvialis*.

### Agradecimientos

A la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca, al grupo Bioprocesos y Control y a cada una de las personas que hicieron posible de alguna u otra forma este proyecto.

### Referencias

- [1] Richmond A. Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae. En: Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2 ed. Richmond A, Hu Q, editor. Wiley-Blackwell; 2013. p. 169-204. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>
- [2] García MC, Ación FG, Del Río E, Fernández JM, Cerón CM, Guerrero M, et al. Production of Astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: Taking the One-Step System Outdoors. Biotechnol. Bioeng. 2009;102:651-657. <https://doi.org/10.1002/bit.22076>
- [3] Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology Advances. 2011;29(6):568-574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>
- [4] Shah MR, Liang Y, Cheng YJ, Daroch M. Astaxanthin- Production Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. Front. Plant Sci. 2016;7(531):1-28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- [5] Mussagy CU, Kot A, Dufossé L, Gonçalves CNDP, Pereira JFB, Santos-Ebinuma VC, et al. Microbial astaxanthin: from bioprocessing to the market recognition. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023;107:4199-4215. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12586-1>
- [6] Camacho JE, González G, Klotz B. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. NOVA. 2013;11(19):93-104.
- [7] Córdoba Astroc N, Acero Reyes N, Duque Buitrago L, Jiménez Aguilar J, Serna Jiménez JA. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. UGCiencia. 2015;21:73-82. <https://doi.org/10.18634/ugcj.21v.1i.426>
- [8] Niño Castillo CM, Rodríguez Rivera FC, Díaz LE, Lancheros Díaz AG. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. NOVA. 2017;15(28):19-31.

- [9] He P, Ducan J, Barber J. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of Cultivation Parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007;49(4):447-451. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
- [10] López GL, Ponce T, Flores CM, Cristini E, Cañizares RO. Estimulación de la carotenogénesis en *Haematococcus pluvialis* mediante la adición de CO<sub>2</sub>. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 2009.
- [11] Imamoglu E, Conk M, Vardar F. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3-4):199-204. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.08.007>
- [12] Kang CD, Han SJ, Choi SP, Sim SJ. Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2010;33:133-139. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0362-5>
- [13] Nagaraja S, Arulmurugana P, Rajarama MG, Sundararajb R, Rengasamy R. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Phykos*. 2012;42(1):59–71.
- [14] Xu Jiajie XJ, Galan A, Zhao Fengmin ZF, Cao Youfu CYF, Liu Wei LW, Su Xiurong SX. Kinetic model analysis of *Haematococcus pluvialis* in a cultivation optimization to accumulate lipids. *IAEJ*. 2012;22(3-4):74-81.
- [15] Chul J, Phill C, Hong ME, Jun S. Enhanced astaxanthin production from microalga *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess Biocyst Eng*. 2014;37:2039-2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- [16] Kumar C. Studies on Production Potential of Astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* (Tesis doctoral). Nueva Delhi, India: Indian Agricultural Research Institute; 2014.
- [17] Miranda A, Meneses O, Hoyos H, Sáez A, Vargas G. Evaluación del efecto de las bajas concentraciones de fosfato en el crecimiento y acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular. 2018.
- [18] Miranda AM, Ossa EA, Vargas GJ, Sáez AA. Efecto de las bajas concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *Inf. tecnol*. 2019;30(1):23-32. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000100023>.
- [19] Li F, Cai M, Lin M, Huang X, Wang J, Zheng X, *et al*. Accumulation of Astaxanthin Was Improved by the Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis*. *BioMed Research International*. 2019;2019:8101762. <https://doi.org/10.1155/2019/8101762>
- [20] Gómez L, Orozco MI, Quiroga C, Díaz JC, Huérfano J, Díaz LE, *et al*. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae, Volvocales*) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*. 2019;9(2):7-24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>
- [21] Galvão RM, Sanatana TS, Fontes CH, Sales EA. Modeling of Biomass Production of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Mathematics*. 2013;4:50-56. <https://doi.org/10.4236/am.2013.48A008>
- [22] Imamoglu E, Vardar Sukan F, Conk Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *Int. J. Nat. Sci*. 2007;1(3):05-09.
- [23] Sun H, Guan B, Kong Q, Geng Z, Wang. Repeated cultivation: noncell disruption extraction of astaxanthin for *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*. 2016;6(20578):1-12. <https://doi.org/10.1038/srep20578>
- [24] Ding D, Chen S, Peng S, Jiang C. Zheng L, Li J. Strategies of phosphorus utilization in an astaxanthin producing green alga *Haematococcus pluvialis*, a comparison with a bloom-forming cyanobacterium *Microcystis wesenbergii*. *Aquat Ecol*. 2019;53:679-688. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09718-z>
- [25] Yuan J-P., Chen F. Hydrolysis Kinetics of Astaxanthin Esters and Stability of Astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during Saponification. *J. Agric. Food Chem*. 1999;47:31-35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
- [26] Tocquin P, Fratamico A, Franck F. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol* 2012;24,365–373. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>

- [27] Baranyi J, Roberts T. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 1994;23(3):277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- [28] Wang J, Sommerfeld MR, Lu C, Hu Q. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae.* 2013;28(2):193-202. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.193>
- [29] Liyanaarachchi VC, Nishshanka GKSH, Premaratne RGMM, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Malik A. Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports,* 2020;28:e00538. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00538>
- [30] Liu JG, van der Meer J, Zhang LT, Zhang Y. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. En: *Microalgal Production for Biomass and High-Value Products.* Slocombe SP, Benemann JR, editor. New York, USA: CRC Press; 2016. p. 267–293.
- [31] Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T, Kato S. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2007;39(3):575-580. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.010>