

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus* sp. en
fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina
bajo diferentes condiciones de estrés**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Marco Antonio Cruz Jiménez

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Marco Antonio Cruz Jiménez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinoza

M. en C. Abelardo Campos Espinoza



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Marco Antonio Cruz Jiménez © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Marco Antonio Cruz Jiménez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Cultivo masivo de la microalga *Haematococcus* sp. en fotobiorreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

La microalga *Haematococcus* spp. puede acumular el carotenoide astaxantina (hasta el 5 % de su peso seco), este pigmento tiene una gran relevancia en diferentes industrias, ya que proporciona diferentes beneficios para la salud humana y animal. Es por ello que en varias regiones del mundo se siguen aislando cepas de este género, con el objetivo de evaluar su potencial para la producción de astaxantina. En este estudio se evaluó una cepa de *Haematococcus* sp. aislada localmente. En un primer ensayo se evaluó el efecto de tres intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en el crecimiento. En el segundo ensayo, se indujo la carotenogénesis exponiendo a las células a condiciones de estrés, con intensidad de luz ((91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), una salinidad de 0.034 M y una temperatura de 30 °C. Los cultivos se realizaron a nivel masivo en fotobiorreactores planos (FBP). Las mayores densidades celulares se obtuvieron al día 36 con las intensidades de luz de 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con un promedio de 900×10^3 cél·ml⁻¹; en esta última intensidad de luz, fue en donde se produjo la mayor biomasa 394 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($p<0.05$) de peso seco (p.s.). En el segundo ensayo, con temperaturas de 30 °C por 14 días, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de astaxantina entre las diferentes intensidades de luz para un mismo día de cultivo, a excepción del día 9, donde las mayores concentraciones se obtuvieron con la mayor intensidad de luz (282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Los resultados indican que la intensidad de luz de 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ junto con el incremento de la temperatura de 39°C, produjeron la mayor cantidad de carotenoides. Los pigmentos identificados y cuantificados por HPLC fueron astaxantina (1.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ p.s.), cantaxantina (0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ p.s.), β -caroteno (0.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ p.s.), licopeno (4.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ p.s.) y clorofila *a* (127 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ p.s.).

Palabras clave: Astaxantina, Carotenogénesis, Fotobiorreactores, Microalga *Haematococcus*.

Abstract of the thesis presented by **Marco Antonio Cruz Jiménez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Mass culture of the microalgae *Haematococcus* sp. in flat photobioreactors for the production of astaxanthin under different stress conditions

Abstract approved by:

PhD. Beatriz Cordero Esquivel
Thesis Codirector

PhD. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Codirector

The microalgae *Haematococcus* spp. can accumulate the pigment carotenoid astaxanthin (up to 5% of its dry weight), this pigment has a great relevance in different industries, since it provides different benefits for human and animal health. For this reason, in the future new strains of this genus will be isolated in several regions of the world, in order to evaluate their potential for the production of astaxanthin. In this study, a strain of *Haematococcus* sp. locally isolated was evaluated. In a first trial the effect of three light intensities (30, 40 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on growth was evaluated. In the second trial, carotenogenesis was induced by exposing the cells to stress conditions, with light intensity of 91, 116 and 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a salinity of 0.034 M and a temperature of 30 °C. The cultures were carried out at a massive level in flat panel photobioreactors (FPB). The highest cell densities were obtained at day 36 with light intensities of 40 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, with an average of 900×10^3 cells·ml⁻¹; in this last intensity of light, it was where the highest biomass was 394 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of dry weight, DW). In the second test, with temperatures of 30 °C for 14 days, no significant differences were found in the astaxanthin concentration between the different intensities of light for the same day of culture, except for day 9, where the highest concentrations were obtained with the highest intensity of light (282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The results indicate that the light intensity of 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, together with the temperature increase of 39 °C, produced the highest amount of carotenoids. The identified and quantified pigments by HPLC were astaxanthin (1.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW), canthaxanthin (0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW), β -carotene (0.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW), lycopene (4.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW) and chlorophyll a (127 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW).

Keywords: Astaxanthin, carotenogenesis, photobioreactor, microalgae *Haematococcus*

Dedicatoria

Con gran afecto y cariño a mis padres, quienes me han apoyado con su comprensión, consejos, valorarme como quien puede realizarlo todo y sobre todo por inculcarme la creencia de que existe un Dios verdadero, que sin El no estaría ni habría llegado hasta donde estoy y darme a conocer el objetivo de mi existencia.

*No te niegues a hacer el bien a quien es debido,
cuando tuvieres poder para hacerlo.*

Proverbios 3:27

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca (21808) de posgrado para realizar esta tesis, gestionando los pocos recursos públicos e invirtiendo y creyendo en la siguiente generación de este gran país (México).

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al Departamento de Acuicultura, por darme la oportunidad de concluir mi posgrado en sus instalaciones.

A mi directora de Tesis la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por tener el gusto de aceptarme en el posgrado de Acuicultura, por confiar en mí, otórgame sus conocimientos, encaminarme a este mundo de las microalgas, y haber revisado y dado su punto de vista objetiva para la finalización de mi trabajo de tesis.

A l Dr. Benjamín Barón Sevilla, por compartir parte de su tiempo como codirector en la elaboración de este trabajo, por resolver mis dudas no solo en cuanto a microalgas sino también en otras áreas y puntualizar sus aclaraciones y hacerme una visión intrínseca de las cosas.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa, por aceptar formar parte de mi comité de tesis, les agradezco por tomarse el tiempo necesario, por sus buenas observaciones, recomendaciones, y la disposición que tuvieron para mejorar esta tesis en cada reunión de avance.

Al excelente técnico M. en C. Abelardo Campos, por considerar su trabajo más que su tiempo, por aportar y compartir sus conocimientos para la realización de esta tesis y por aceptar formar parte de mi comité.

Un agradecimiento especial al técnico de Acuicultura, Luis Alberto Murillo Valenzuela, por la instalación del sistema eléctrico para los biorreactores, así como a Jesús Mariscal Medina y a Adrián Celaya Ortega quienes contribuyeron en la instalación de los fotobiorreactores (FBP) y a Carlos Campos Rodríguez, responsable del funcionamiento de los laboratorios húmedos, con el apoyo de todos ellos se agilizó la conclusión de mí trabajo de tesis.

A mi novia Brenda Priscila por ser un apoyo incondicional, motivarme, pasar tiempos muy agradables, sonriendo, platicando y hacer la estancia en esta ciudad más apacible. A la ayuda brindada en la elaboración de mis experimentos, por quedarse conmigo hasta horas muy tardes, por contribuir en la instalación de los FBP, que pareciera que son cosas incipientes, pero son muy preciadas para mí.

A mis ex compañeros de laboratorio que ya se titularon, los M. en C. Beatriz Nava y Enrique Zepeda por compartir parte de sus conocimientos y “tips” en el cultivo de microalgas, a la Biol. Claudia López por ayudarme en el cultivo de las microalgas y agilizar la terminación del cultivo, invirtiendo parte de su tiempo.

A mis compañeros “chilos”: Brenda Priscila, José Antonio, Brenda Bonet, Arely Eliam, Miriam Ester, Vladimir Muñoz, Estrella Córdoba, Claudia Lechuga y Francisco Rosales. Fue un gusto haberlos tenido como compañeros, en donde hubo momentos difíciles y alegres, aprendiendo juntos un poco más de este conocimiento inmensurable de la acuicultura y que al final salimos victoriosos, porque seguimos

afrontando las situaciones difíciles de la vida y que al final nos hacen más fuertes. Les deseo lo mejor a cada uno en su trayecto por este mundo, hay que seguir adelante aceptando los buenos cambios porque siempre hay algo que aprender.

A Don Mario Rene Reynoso (Guardia del Departamento de Acuicultura) por estar al pendiente de los cultivos durante las noches, siempre haciendo con gran agrado su trabajo y hablarme cuando se presentaban inconvenientes.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Justificación.....	7
1.2 Hipótesis.....	8
1.3 Objetivos.....	8
1.3.1 Objetivo general.....	8
1.3.2 Objetivos específico.....	8
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Obtención de la cepa.....	9
2.2 Cultivo de <i>Haematococcus</i> sp. en diferentes intensidades de luz a nivel semi masivo (15 L).....	10
2.3 Descripción del sistema de cultivo de los fotobiorreactores planos (FBP).....	11
2.4 Cultivo de <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz en FBP.....	13
2.4.1 Evaluación de la biomasa producida.....	14
2.5 Inducción a la carotenogénesis.....	15
2.6 Extracción de los pigmentos carotenoides.....	16
2.7 Análisis de pigmentos en HPLC y cálculo del contenido de pigmentos.....	17
2.8 Análisis estadístico y procesamiento de datos.....	18
Capítulo 3. Resultados	19
3.1 Biomasa producida de <i>Haematococcus</i> sp. a nivel semi masivo (15 L).....	19
3.2 Producción de biomasa de <i>Haematococcus</i> sp. en FBP (100 L).....	20
3.2.1 Densidad celular (cél·mL ⁻¹) de <i>Haematococcus</i> sp. en FBP.....	20
3.2.2 Peso seco total (PST) y orgánico (PSO) de <i>Haematococcus</i> sp. en FBP (100 L)..	21

3.3	Inducción a la carotenogénesis de <i>Haematococcus</i> sp. con intensidades de luz de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	22
3.3.1	Producción de biomasa en $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y en peso seco (PST Y PSO) con altas intensidades de luz.....	22
3.3.2	Producción de pigmentos carotenoides y clorofila a.....	25
Capítulo 4.	Discusión.....	30
Capítulo 5.	Conclusiones.....	36
Literatura citada.....		37
Anexos.....		46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema del sistema de cultivo en FBP para microalgas: A) sistema cartuchos y UV para la filtración y esterilización del agua dulce, B) sistema de biorreactores y C) controladores de pH y transformadores eléctricos para la iluminación. Tomado y modificado de Montes 2014.....	11
2	A) sistema de control y suministro de CO ₂ para los BRP. (a) sistema de control aquatronica (b) tanque de CO ₂ (c) Válvulas solenoides. B) Red de suministro de aire para los BRP. (a) Turbina de aire (b) cartuchos con filtro de aire (c) flujómetro de aire. Tomado y modificado de Montes 2014.....	12
3	Disposición de lámparas fluorescentes en los FBP y de los soportes cuadrangulares distribuidos entre los biorreactores.....	12
4	Diseño experimental para la optimización del cultivo <i>Haematococcus</i> sp. en FBP en diferentes intensidades de luz: 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	13
5	Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. a nivel semi masivo (15 L) con diferentes intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las barras verticales indican la desviación estándar.....	19
6	Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. en FBP (100 L) con diferentes intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las barras verticales indican la desviación estándar.....	20
7	Producción de biomasa de <i>Haematococcus</i> sp. en PST en los FBP con intensidades de luz de 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	21
8	Producción de biomasa de <i>Haematococcus</i> sp. en PSO en los FBP con intensidades de luz de 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	22
9	Crecimiento de <i>Haematococcus</i> sp. durante la fase de inducción a la carotenogénesis con diferentes intensidades de luz (91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), NaCl (0.034 M) y temperaturas promedio en FBP (100 L). Las barras verticales indican el error estándar.....	23
10	Producción de biomasa de <i>Haematococcus</i> sp. con base en el PST, cultivada con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y salinidad de 0.034 M en FBP (100 L). Las barras verticales indican la desviación estándar.....	24
11	Producción de biomasa de <i>Haematococcus</i> sp. con base en el PSO, cultivada con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y salinidad de 0.034 M en FBP (100 L). Las barras verticales indican la desviación estándar.....	24

12	Producción de astaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).....	25
13	Producción de cantaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).....	26
14	Producción de β -caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).....	27
15	Producción de licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).....	27
16	Producción de clorofila α ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. con diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).....	28

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Composición química y concentración de nutrientes del fertilizante empleado en el cultivo de la microalga <i>Haematococcus</i> sp. (valores expresados en mM y estandarizado para los nutrientes esenciales con base en el medio de cultivo Medio Basal Bold).....	9
2	Gradiente de dilución de la fase móvil en el análisis de pigmentos en HPLC.....	17
3	Rendimiento promedio de pigmentos (mg L^{-1}) obtenidos en cultivo de <i>Haematococcus</i> sp. con tres intensidades de luz: 282, 116 y $91 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una concentración de 0.034 NaCl.....	29
4	Biomasa promedio (peso seco total, PST y peso seco orgánico, PSO), en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de <i>Haematococcus</i> sp. en cultivada en biorreactores planos (BRP) con tres intensidades de luz (30, 40 y $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y en diferentes días de cultivo. Desviación estándar entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. p: nivel de significancia.....	46

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas que presentan diferentes formas, tamaños y colores. Son consideradas cosmopolitas, y se encuentran en ambientes húmedos, marinos, salobres y dulceacuícolas. Son de vida libre, aunque cierto número de microalgas viven en simbiosis con otros organismos (ej. zooxantelas) (Tomaselli, 2004; Lehman, 2010; Sahoo y Baweja, 2016). Se caracterizan por ser fotoautótrofos (en menor proporción los hay heterótrofos), tienen una gran variedad de patrones reproductivos (Grobbelaar, 2004; 2012; Zachleder *et al.*, 2016) y presentan una gran diversidad y complejidad química y genética. Es por ello que, se consideran una fuente importante de compuestos con alto valor y, las investigaciones en diferentes niveles están en constante crecimiento.

El cultivo de microalgas tiene gran trayectoria en la industria acuícola, ya que se utilizan como alimento para la producción de moluscos bivalvos durante todo el ciclo de vida, y en etapas tempranas de desarrollo de peces y crustáceos (Muller-Feuga, 2004; Helm *et al.*, 2006). Además, en los últimos años se ha incrementado el interés en las microalgas, ya que continuamente se encuentran múltiples aplicaciones en diferentes áreas de la actividad humana: alimenticia, farmacéutica, cosmética y agrícola, por la producción de compuestos bioactivos, nutracéuticos, y su uso en fertilizantes (Borowitzka, 1995; McHugh, 2002; Stolz, y Obermayer, 2005; Fassett y Coombes, 2011; Bishop y Zubeck, 2012 y Stengel y Connan, 2015). También, porque tienen la capacidad de metabolizar los nutrientes del medio en donde habitan, los cuales se utilizan para la biorremediación de aguas residuales y actualmente, a nivel mundial se está investigando su potencial para la producción de biocombustibles (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2016).

Algunos de los factores a considerar para la obtención de compuestos de interés, a partir de microalgas, es la elección de cepas tolerantes a las condiciones de cultivo, que crezcan rápidamente y que se adapten al sistema de cultivo considerado, de tal manera que se pueda tener una producción redituable (Barclay y Apt, 2013).

Entre de los productos más apreciados en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, producidos por las microalgas, están, entre otros, los pigmentos: β -caroteno, astaxantina, ficoeritrina y ficocianina, producidos principalmente por las microalgas *Dunaliella salina*, *Haematococcus* spp., *Porphyridium cruentum* y la cianobacteria *Arthrospira* spp. respectivamente (Román *et al.*, 2002; Dufossé *et al.*, 2005; Wijffels *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011; Bishop y Zubeck, 2012 y Ambati *et al.*, 2014).

Los pigmentos carotenoides, también denominados pigmentos accesorios o secundarios, cumplen funciones importantes en las microalgas, son captadores accesorios de la energía de la luz y la transfieren a los centros de reacción durante la fotosíntesis, además protegen a la célula del daño foto oxidativo. Los pigmentos secundarios absorben luz a diferentes longitudes de ondas (450 a 640 nm), en comparación con las que captan las clorofilas, alrededor de los 400 y 700 nm (Nelson y Cox, 2000; Egeland, 2016).

Los carotenoides son compuestos naturales, fácilmente reconocidos por sus colores, varían de amarillo brillante a rojo oscuro y algunos son de color morado, por ejemplo, el β -caroteno le da el color anaranjado en las zanahorias; la astaxantina, le da el color rojizo distintivo a la carne de salmón silvestre; y el licopeno le da el color rojo al tomate. Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos que realizan fotosíntesis: algunas bacterias, plantas y algas. También los producen organismos no fotosintéticos, como bacterias y hongos. Ningún animal puede producir o sintetizar estos compuestos, sin embargo, pueden acumularlos a partir de su dieta, ya que se transfieren a través de la cadena trófica (Armstrong, 1997; Britton, 1993; Paniagua-Michel *et al.*, 2012).

Entre los carotenoides de mayor interés comercial, por sus múltiples aplicaciones, destacan el β -caroteno y la astaxantina. Para el primero, la principal fuente natural es la microalga *Dunaliella salina*, su cultivo, producción y comercialización tiene una gran trayectoria (Ben-Amotz *et al.*, 1983; Oren, 2005; Subba-Rao, 2009). En las últimas décadas, la astaxantina sintética se ha utilizado principalmente en la industria acuícola, suministrada en la dieta, para la pigmentación de la carne de los salmones, truchas y camarones. Este carotenoide tiene funciones muy diversas en los organismos, e.g., como antioxidante, como precursor de hormonas, como estimulante de los sistemas inmunológico y reproductivo, como promotor de la maduración y el crecimiento (Torrissen *et al.*, 1989; Storebakken, 1988; Choubert, G. y Heinrich, O. 1993; Bell *et al.*, 2000). También se han realizado numerosas investigaciones sobre el efecto de la astaxantina en la salud humana (Kurihara *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2005; Kamath *et al.*, 2008, entre otros).

La astaxantina es conocida como un poderoso agente antioxidante, ya que elimina los radicales libres en el organismo, 10 veces más que el β -caroteno y 500 veces más que el α -tocoferol (Jyonouchi *et al.*, 1994; Liu y Osawa, 2007), evita enfermedades cancerígenas (Chew *et al.*, 1999; Kurihara *et al.*, 2002), protege contra las lesiones gástricas y mejora la salud gastrointestinal (Nishikawa *et al.*, 2005; Kamath *et al.*, 2008), previene enfermedades cardiovasculares y ataques cardíacos (Iwamoto *et al.*, 2000), evita enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer (Ferrante *et al.*, 1997), previene la proliferación de células cancerígenas de la próstata (Palozza *et al.*, 2009), también mejora la calidad del esperma y la motilidad

(Comhaire *et al.*, 2005), entre otros beneficios. Varios países han aprobado su comercialización como suplemento nutracéutico y ya se encuentra en el mercado en diferentes presentaciones.

Estudios realizados por Li *et al.* (2014) indican que el suministro de astaxantina de origen natural estimula más funciones biológicas que la forma sintético y Han *et al.* (2013) mencionan que, “*la astaxantina natural es de tres a cuatro veces más valiosa en los mercados nutracéuticos y farmacéuticos*”. Es por esto que las investigaciones relacionadas con la optimización de su producción han aumentado, pues actualmente, la forma natural solo representa el 1% del pigmento comercializado, en contraste con más del 90 % de la forma sintética, además, los precios en el mercado son muy atractivos, pues van de los \$2,500 a 7,000 dólares kg⁻¹ y en algunos casos hasta \$15,000 dólares kg⁻¹ dependiendo del grado de pureza, mientras que los costos de producción estimados rondan los \$1,000 dólares kg⁻¹ (Li *et al.*, 2011; Borowitzka, 2013; Koller *et al.*, 2014; Pérez-López *et al.*, 2014). Varios autores mencionan que la fuente más prometedor para la producción de este carotenoide es la microalga de agua dulce *Haematococcus* spp., pues lo puede producir en una concentración equivalente al 2 - 5% de su peso seco, en comparación con la cantidad producida por otros organismos (Renstrom, 1981; Boussiba, 2000; Lorenz y Cysewski, 2000).

El ciclo de vida de la microalga *Haematococcus* sp. es complejo y sensible a cambios en su ambiente. Elliot (1934), identificó cuatro morfotipos celulares durante su ciclo de vida: a) macrozooides, también llamadas zoosporas, b) microzooides, c) palmeloides y d) hematocistos, también denominadas aplanosporas. Cada tipo de célula se presenta en condiciones ambientales diferentes, las células macrozooides se caracterizan por su forma oval, tienen un tamaño de 20 a 30 micras y tienen dos flagelos que les permiten el desplazamiento en la columna de agua, se desarrollan en condiciones óptimas de crecimiento y tienen la capacidad de reproducirse asexualmente, ya sea por fisión binaria o esporulación. Las células reproducidas por esporulación y que resultan de la liberación, son denominadas microzooides, porque tienen tamaños menores a 10 µm (Kobayashi *et al.*, 1997; Triki *et al.*, 1997, Han *et al.*, 2013). Triki *et al.* (1997) mencionan que en casos excepcionales se puede observar la reproducción sexual.

Cuando las condiciones del medio son desfavorables, la microalga pierde sus flagelos y empieza a engrosar su pared celular, sintetiza carotenoides y adopta una forma circular, a esta fase se le conoce como palmeloide. Si las condiciones de estrés persisten la microalga continúa engrosando su pared y haciéndola más rígida, a medida que incrementa los carotenoides secundarios, como la astaxantina, que le da una coloración rojiza brillante, en esta última fase, la célula se denomina aplanospora (Wayama *et al.*, 2013). De acuerdo con Hagen *et al.* (2002) la pared celular está formada de tres capas, compuestas en un 70% de carbohidratos, 6% de proteínas y 3% de un material resistente llamado “algaenan”, un biopolímero

alifático con gran resistencia a los productos químicos (Damiani *et al.*, 2006). La microalga puede revertir su estado de aplanospora a zoospora cuando las condiciones de su medio son favorables, iniciando así, un nuevo ciclo de crecimiento vegetativo.

Para valorar la producción de compuestos algales de importancia, es necesario mantener el máximo control de su crecimiento en condiciones de cultivo, por lo cual es importante realizar la evaluación de cada uno de los factores que influyen en el cultivo de estos organismos. Es por eso que varios autores realizan estudios específicos en diferentes especies, controlando factores como la temperatura, las intensidades de luz, la salinidad, los nutrientes, el pH y los sistemas de cultivo, entre otros, para modificar la composición y la concentración de los compuestos deseados (Sandnes *et al.*, 2005; Moronta *et al.*, 2006; Piña *et al.*, 2007; Barclay y Apt, 2013; Xi *et al.*, 2016).

En el cultivo de *Haematococcus* se han evaluado varios factores para optimizar la producción de la biomasa y de los pigmentos carotenoides, principalmente de astaxantina, entre éstos se ha valorado la intensidad de luz, ya que, además de ser el principal factor para la fotosíntesis, tiene gran influencia en la composición bioquímica y en el crecimiento de las microalgas (Dubinsky *et al.*, 1995; Nelson y Cox, 2000; Dubinsky y Stambler, 2009). Cuando las intensidades de luz son reducidas, las células tienden a aumentar la concentración de clorofila *a* y otros pigmentos primarios para la captación de la energía de la luz; en contraste, cuando se incrementa la intensidad de la luz, las microalgas incrementan la producción de carotenoides secundarios y disminuyen su concentración de pigmentos primarios (Hu, 2013).

Varios autores han encontrado mayores biomásas en el cultivo de *Haematococcus* con intensidades de luz entre 20 y 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la mayor producción de astaxantina con intensidades de luz de entre 200 a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e incluso, en algunos casos con intensidades más altas (Kobayashi, 2000; Kang *et al.*, 2010; Escuredo, 2014; Hong *et al.*, 2015; Nava, 2017).

Otro factor importante en el cultivo de microalgas es la temperatura, ya que tiene efectos en las reacciones químicas y tiene una relación con la fijación de carbono en macromoléculas como las proteínas, carbohidratos y lípidos. La temperatura afecta la composición y contenido de lípidos en la membrana; una temperatura por debajo o por encima del nivel óptimo de crecimiento, propicia la disminución del contenido total de lípidos (Murata, 1989; Thompson *et al.*, 1992; Nishida y Murata, 1996; Xin *et al.*, 2011). Por otro lado, las temperaturas altas en los cultivos pueden acelerar las reacciones enzimáticas que promueven la carotenogénesis, además, pueden inducir la formación de radicales activos de oxígeno en las células, resultando en la síntesis de carotenoides por estrés oxidativo (Tjahjono *et al.*, 1994; Li *et al.*,

2008). Algunos autores mencionan que la temperatura óptima de crecimiento para *Haematococcus* spp. y para la síntesis de astaxantina está entre 20 y 25 °C, y dependiendo que cofactores se utilicen, varía entre 30 y 36 °C, respectivamente (Tjahjono *et al.*, 1994; Tripathi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2014; Giannelli *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2015).

La concentración de la salinidad en algunas microalgas promueve la síntesis de algunos metabolitos como sustancias osmorreguladoras, en respuesta a la presión osmótica del medio; entre los metabolitos producidos se encuentran principalmente el glicerol, manitol, sorbitol y sacarosa, entre otros (Ben-Amotz y Avron, 1981). Li *et al.* (2008) mencionan que un efecto interactivo entre la salinidad y altas intensidades de luz, puede influir en la generación de diferentes especies reactivas de oxígeno, promoviendo una estimulación en los genes implicados en la síntesis de carotenoides y en la cinética catalítica de las enzimas que promueven la síntesis de los pigmentos. Por otra parte, Cifuentes *et al.* (2001) mencionan que la salinidad puede influir de manera limitada en la carotenogénesis de las microalgas.

La salinidad en los cultivos de *Haematococcus* spp. se utiliza como factor de estrés para la síntesis de astaxantina, los estudios realizados por varios autores demuestran que concentraciones del 0.8 al 2.4 % de salinidad favorecen la síntesis de este carotenoide. Este efecto estresor puede estar acompañado de otros factores de inducción, como altas intensidades de luz o temperaturas, por mencionar algunos (Borowitzka *et al.*, 1991; Boussiba y Vonshak 1991; Cordero *et al.*, 1996; Harker *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1997; Cifuentes *et al.*, 2003).

Se han diseñado diferentes sistemas de cultivo para optimizar la producción de biomasa y de compuestos de interés de estos microorganismos. Entre estos sistemas se encuentran los fotobiorreactores (FBR), que se definen como sistemas de cultivo fotobiológicos en los que los fotones de luz, la principal fuente de energía para los procesos biológicos de estos organismos, no inciden directamente sobre la superficie del cultivo, sino que pasa a través de las paredes transparente del FBR para llegar a las células (Tredici, 2004).

Los FBR no permiten o minimizan el intercambio directo de gases y contaminantes (agua de lluvia, polvo, hongos, bacterias, protozoos, y otras especies de microalgas competidoras) entre el cultivo y la atmósfera, en comparación con los cultivos tradicionales en lagos y estanques naturales, estanques abiertos, tipo raceway o circulares, entre otros. Existen varios tipos de FBR de acuerdo a su diseño, por ejemplo, biorreactores planos y tubulares, horizontales, inclinados, verticales o en espiral, múltiples o serpentina, híbridos y flotantes (Zittelli *et al.*, 2013).

La microalga *Haematococcus* spp. tiene un crecimiento lento en comparación con otras microalgas, sin embargo, se ha evaluado el uso de diferentes sistemas de cultivo para la optimización de su crecimiento y de la producción del carotenoide astaxantina. Dependiendo del tipo de FBR es necesario encontrar la mayor eficiencia en la intensidad de la luz para que cada célula esté expuesta a un periodo mayor de luz (Hu *et al.*, 1996; Cifuentes *et al.*, 2003; Hu, 2013).

Para el cultivo de *Haematococcus* spp. a nivel masivo se ha implementado una estrategia de cultivo que consiste en cultivar esta microalga en dos fases, el primero, denominado estado vegetativo o estadio verde, consiste en obtener la mayor producción de biomasa en condiciones favorables de cultivo, la segunda fase es la inducción a la síntesis de astaxantina o estadio rojo, para lo cual se utilizan diferentes factores de estrés (Torzillo *et al.*, 2003; Aflalo *et al.*, 2007; Del Rio *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011). Issarapayup *et al.* (2009) cultivaron *Haematococcus pluviales* en fotobiorreactores planos para la producción de biomasa con una intensidad de luz de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, y obtuvieron una densidad de $0.041 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. García-Melea *et al.* (2006) cultivaron esta misma microalga en fotobiorreactores de columna y tubulares y encontraron los mejores resultados en este último FBR. El cultivo se realizó a la intemperie con una radiación promedio de luz de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y con una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ obtuvieron una densidad celular de $3.9 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para la inducción a la carotenogénesis utilizaron $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la concentración resultante de astaxantina fue del 2 % del peso seco de la microalga. Otro estudio realizado por Tran *et al.* (2015), en el que evaluaron la producción de biomasa y de astaxantina de *Haematococcus lacustris* en fotobiorreactores planos, utilizando luz roja y azul, obtuvieron la mayor producción de biomasa ($1.48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con luz mixta (rojo-azul) a $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y la producción de astaxantina fue de $2.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con luz roja y azul en proporción 1:3 y con una intensidad de luz de $160 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A pesar del avance que se ha tenido en el estudio de esta microalga, el reto es obtener mayores biomásas, ya que esto repercutirá en la cantidad de astaxantina que se produce durante el proceso de síntesis, pues a nivel masivo, para uso comercial, es una cuestión económica muy importante. A este nivel de cultivo, las condiciones ambientales tienen un efecto muy importante sobre los factores que estimulan la máxima producción del pigmento, en contraste con los experimentos realizado en laboratorio a volúmenes pequeños, ya que, al desarrollarse en condiciones ambientales controladas, tienen un efecto muy limitado sobre las variables que maximizan la producción del pigmento. Es por esto que en este estudio se tiene como objetivo cultivar la microalga *Haematococcus* sp. a nivel masivo en fotobiorreactores planos para producir la mayor cantidad de biomasa con la máxima densidad celular posible y posteriormente inducir

la producción de carotenoides, principalmente astaxantina, al someterlas a condiciones de estrés, como altas intensidades de luz y salinidad.

1.1 Justificación

Las microalgas son productoras de varios compuestos con alto valor comercial, entre ellos, la astaxantina; el género *Haematococcus* es conocido por la producción de este pigmento, el cual puede acumular hasta en un 5% de su peso seco. Dado que la tendencia de la nutrición y la salud humana y animal va dirigida hacia el consumo de productos de origen orgánico, la demanda del carotenoide astaxantina, obtenido de manera natural, se incrementará por el consumo en el mercado. Además, la atribución de múltiples beneficios para la salud, su uso en industrias tan importantes como la cosmética, farmacéutica y en la acuicultura, incrementará tal demanda.

Diferentes cepas de *Haematococcus* se han aislado en varias regiones de mundo; aunque se conocen aspectos del cultivo de algunas cepas, es necesario seguir incursionando en nuevas tecnologías que potencialicen su producción, así como del carotenoide astaxantina, principalmente a nivel masivo, que implica un considerable costo de producción. Además, se debe considerar que la capacidad de síntesis de pigmentos está influenciada por varios factores, que no son comunes para todas las especies, pero que pueden ser manipulados para obtener mayores densidades e incrementar los compuestos deseados. Todo esto motiva los estudios para la tecnificación y estandarización de métodos de cultivo que permitan encontrar las condiciones óptimas para obtener mayores biomásas y concentraciones de pigmentos. Por lo anterior, en este trabajo se tiene como objetivo cultivar masivamente la microalga *Haematococcus* sp. aislada localmente, en fotobiorreactores planos para la producción de biomasa y posteriormente someterla a diferentes condiciones de estrés para la síntesis de pigmentos carotenoides, especialmente astaxantina.

1.2 Hipótesis

- Las intensidades bajas de luz ($<50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) propiciarán un mayor crecimiento de la microalga *Haematococcus* sp.
- El efecto interactivo del NaCl a concentración de 0.034 M en el medio de cultivo y altas intensidades de luz (91, 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), favorecerán la producción del carotenoide astaxantina en la microalga *Haematococcus* sp.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el crecimiento de la microalga *Haematococcus* sp. y la producción del carotenoide astaxantina bajo diferentes condiciones de cultivo a nivel masivo en fotobiorreactores planos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la biomasa producida ($\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ y peso seco) por *Haematococcus* sp. cultivada en fotobiorreactores planos con bajas intensidades de luz (30, 40 y $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).
- Evaluar el efecto interactivo del NaCl (0.034 M) y diferentes intensidades de luz (91, 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en la producción de biomasa ($\text{cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ y peso seco) y en la inducción a la carotenogénesis por *Haematococcus* sp. cultivada a nivel masivo.
- Identificar y cuantificar los pigmentos (clorofila a, y carotenoides) producidos por *Haematococcus* sp. cultivada bajo condiciones de estrés (NaCl y altas intensidades de luz).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de la cepa

La cepa de la microalga *Haematococcus* sp. de origen local, fue retomada de un estudio previo desarrollado por Nava (2017), quien realizó su aislamiento y reproducción en el laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La microalga fue reactivada y mantenida en estado vegetativo en matraces Erlenmeyer de 150 mL y en condiciones óptimas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) y pH (7.5-8), el medio de cultivo utilizado fue estandarizado por Escuredo-Vielba (2014) a partir del fertilizante agrícola foliar Plantafol (Marca Valagro) (Tabla 1). Los cultivos se irradiaron con luz continua a una intensidad de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizando lámparas fluorescentes de 32 Watts y 6500 Kelvin.

Tabla 1. Composición química y concentración de nutrientes del fertilizante empleado en el cultivo de la microalga *Haematococcus* sp. (valores expresados en mM y estandarizado para los nutrientes esenciales con base en el medio de cultivo Medio Basal Bold).

	Medio de cultivo	
	MBB	Plantafol
N	8.82	8.82
P	1.62	0.87
K	2.05	1.31
B	0	0.011
Cu	0	0.005
Fe	0.36	0.011
Mn	0.21	0.006
Mo	0.017	0
Zn	0.037	0.005
Co	0.008	0
Ca	0.17	0
Mg	0.3	0
Fuente de K, P	K ₂ HPO ₅ , KH ₂ PO	K ₂ O, P ₂ O ₅
Fuente de N	NaNO ₃	N amoniacal (2%), ureico (14%) y nítrico (4%)

Para el escalamiento del cultivo de *Haematococcus* sp., se realizaron cultivos en volúmenes crecientes desde 100 mL hasta 100 L. Para los cultivos de 100 mL, 800 mL y 2 L, se utilizó agua destilada previamente esterilizada en autoclave a 120 °C, a 15 libras de presión por 15 minutos, posteriormente se les agregó el medio de cultivo compuesto por el fertilizante agrícola foliar Plantafol; las vitaminas y los metales traza se agregaron en la concentración equivalente al medio f/2 (Guillar, 1975). Las condiciones ambientales para estos cultivos fueron las mismas que se utilizaron para los cultivos en 150 mL antes mencionado. Para iniciar cada nivel de escalamiento, se utilizaron como inóculo, cultivos en la fase de crecimiento exponencial. Para los cultivos masivos, de 15 L y 100 L, se utilizó agua dulce de la red del sistema municipal de Ensenada, B. C.

2.2 Cultivo de *Haematococcus* sp. en diferentes intensidades de luz a nivel semi masivo (15 L)

Se realizaron cultivos de *Haematococcus* sp., en botellones de vidrio, con un volumen útil 15 L, en tres intensidades de luz: 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con tres repeticiones por tratamiento. El agua dulce utilizada para el cultivo se filtró a través de una serie de cartuchos de 10, 5 y 1 μm y se irradió con luz ultravioleta, enseguida se agregó hipoclorito de sodio, a razón de 3 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$, dejando actuar al cloro durante 24 horas (Hemerick, 1973). Posteriormente, para la eliminación del cloro se utilizó tiosulfato de sodio (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloro) y aireación profusa por 24 horas. Posteriormente se agregó el medio de cultivo, constituido por el fertilizante agrícola foliar Plantafol, los metales traza y las vitaminas (previamente esterilizados en autoclave). Cada uno de los nueve botellones fue inoculado con 40,000 $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se mantuvieron con aireación continua, a una temperatura de $21\pm 1^\circ\text{C}$, pH de 7.5-8 y la intensidad de luz de cada tratamiento fue proporcionada con lámparas fluorescentes de 35 W y 6500 K, cuando fue necesario, se utilizó malla sombra para alcanzar las intensidades deseadas.

Para evaluar la densidad celular ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$), diariamente se realizaron recuentos celulares utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, con apoyo de un microscopio compuesto Primo Star, marca Carl Zeiss. Con base en los resultados obtenidos en este nivel de cultivo, para el siguiente escalamiento (fotobiorreactores de 100 L), se eligió la intensidad de luz en donde se cuantificó la mayor densidad celular.

2.3 Descripción del sistema de cultivo de los fotobiorreactores planos (FBP)

Los nueve FBP utilizados para el cultivo de *Haematococcus* sp., son de policarbonato, tienen dimensiones de 110 cm de largo por 110 cm de alto y 10 cm de ancho. Cada FBP está provisto de una tapa para evitar en lo posible la contaminación de los cultivos. Los FBP están conectados a un sistema tecnificado que controla el pH, con la inyección de CO₂ (Aquatronica, modelo ACQ110) (Fig. 1). El CO₂ se suministró por medio de un difusor de cerámica, el cual se controló con válvulas solenoides que estuvieron conectadas al sistema de control, los sensores de pH en cada uno de los FBP controlaron la apertura y cierre de las válvulas (Fig. 2 A). La luz se suministró con lámparas fluorescentes de 32 Watts y 6500 Kelvin.

El aire utilizado para la suspensión de las microalgas en la columna de agua en los FBP, se generó con una turbina de 1 hp. Para filtrar el aire y así evitar la contaminación de los cultivos, se colocaron filtros de 10, 5 y 1 µm conectados a los FBP. Se utilizaron flujómetros de aire para regular la cantidad suministrada a cada uno de los FBP. El aire se distribuyó a través de un tubo de cpvc de 1.27 cm de diámetro, con diez perforaciones de 1 mm de diámetro, distribuidas cada 10 cm a lo largo del tubo, que se dispuso en forma horizontal a 3 cm del fondo de cada biorreactor (Fig. 2 B).

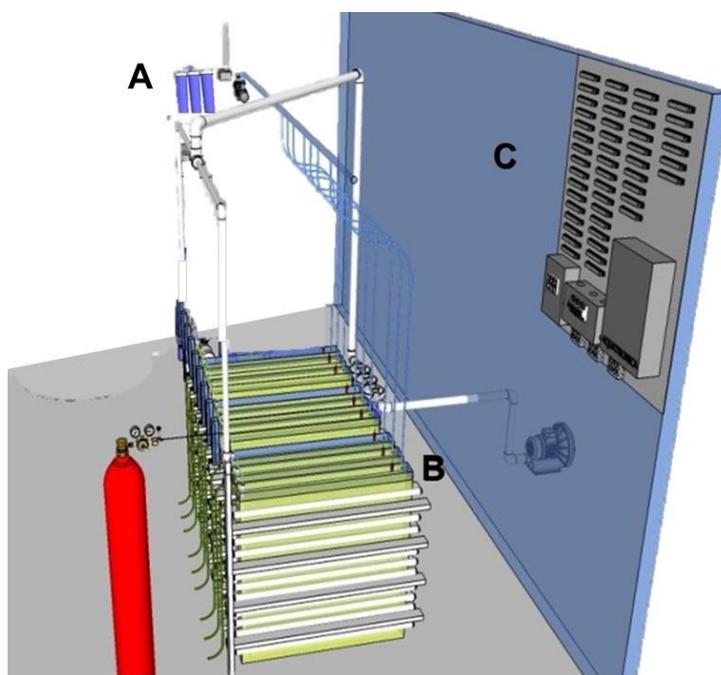


Figura 1. Esquema del sistema de cultivo en FBP para microalgas: A) sistema cartuchos y UV para la filtración y esterilización del agua dulce, B) sistema de biorreactores y C) controladores de pH y transformadores eléctricos para la iluminación. Tomado y modificado de Montes 2014.

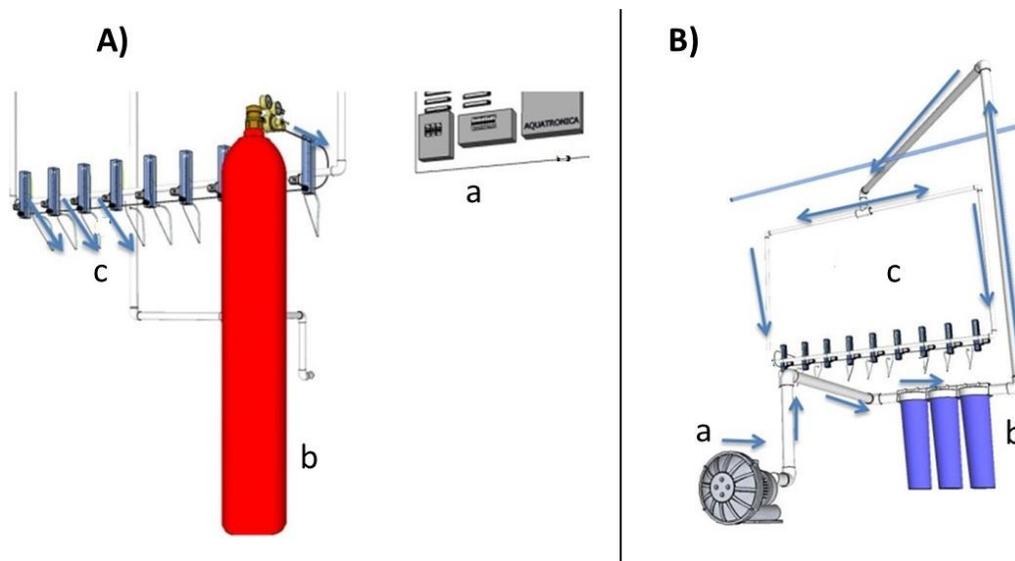


Figura 2. A) Sistema de control y suministro de CO₂ para los FBP. (a) sistema de control Aquatronica (b) tanque de CO₂ (c) Válvulas solenoides. **B)** Red de suministro de aire para los FBP. (a) Turbina de aire (b) cartuchos con filtro de aire (c) flujómetro de aire. Tomado y modificado de Montes 2014.

Cada grupo de tres biorreactores se conglomeraron con soportes cuadrangulares de aluminio (Fig. 3), por lo cual se tuvieron tres grupos, uno por cada tratamiento, en donde se dispusieron seis lámparas por lado para el primer grupo de biorreactores (12 lámparas por biorreactor y 24 por grupo), ocho para el segundo grupo (16 lámparas por biorreactor y 32 por grupo) y 10 para el tercer grupo (20 lámparas por biorreactor y 40 por grupo).

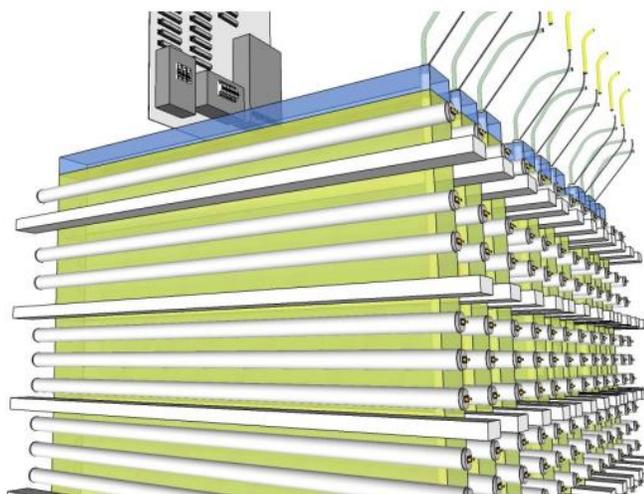


Figura 3. Disposición de lámparas fluorescentes en los FBP y de los soportes cuadrangulares distribuidos entre los biorreactores.

2.4 Cultivo de *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz en FBP

Previo al inicio de los cultivos, los FBP y todos los accesorios (Mangueras, tubos de aireación, difusores de CO₂) se lavaron con jabón (pro-san "PRIMO") y se enjuagaron con abundante agua corriente. Una vez instalados los nueve FBP en grupos de tres, se procedió a la instalación de las lámparas fluorescentes, de 32 W, 6500 K. El diseño experimental consistió en tres niveles de intensidad de luz: 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 4).

Para obtener las intensidades de luz deseadas, se confeccionaron fundas de malla de fibra de vidrio (tela mosquitero), las cuales se colocaron en cada una de las lámparas. La intensidad de luz incidente en los FBP se midió con un radiómetro marca Biospherical Instrumens modelo QSL 100. Las mediciones se hicieron dentro de cada biorreactor, en diferentes puntos (24 puntos, de arriba hacia abajo y de lado a lado) iniciando a 10 cm de la tapa del biorreactor y pegado a la pared de acrílico. Una vez obtenidas las medidas, se obtuvo el promedio para establecer las diferentes intensidades de luz en cada tratamiento.

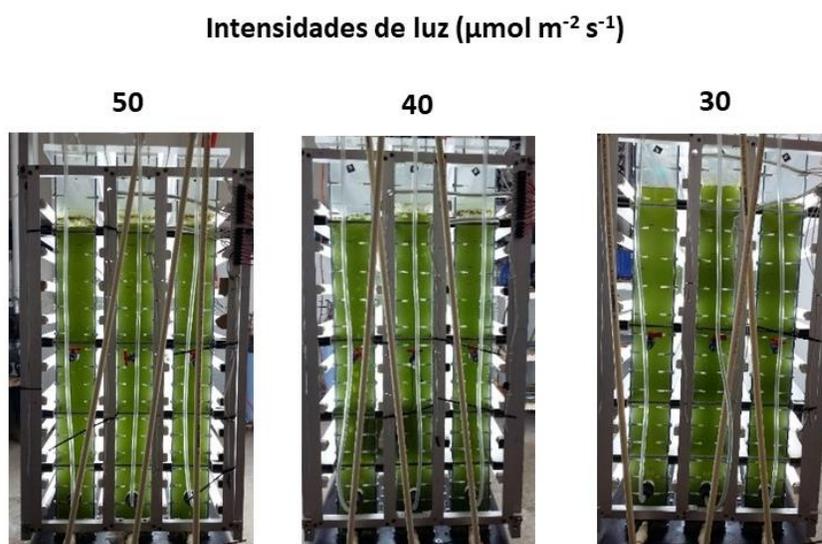


Figura 4. Diseño experimental para la optimización del cultivo de *Haematococcus* sp. en FBP en diferentes intensidades de luz: 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cada FBP se llenó totalmente con agua dulce, previamente tratada con el mismo protocolo mencionado anteriormente para los cultivos a nivel de 15 L. A continuación, se ajustó el volumen de agua del FBP a 96 L, para permitir la adición del inóculo de las microalgas, el cual se inició con una densidad de 40,000 cél·mL⁻¹.

¹. El volumen final de cada biorreactor fue de 100 L. Antes de inocular los biorreactores con la microalga, se agregó el medio de cultivo (el fertilizante agrícola foliar Plantafol, los metales traza y las vitaminas). Los cultivos en los FBP se mantuvieron durante 36 días con luz continua, a una temperatura de 22 ± 1 °C, pH 7.5 y aireación continua a una tasa de $10 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$.

2.4.1 Evaluación de la biomasa producida

La biomasa producida por *Haematococcus* sp. en los biorreactores, se evaluó por medio de la densidad celular ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) y con base en el peso seco total y orgánico (PST y PSO). El número de células se cuantificó diariamente tomando una alícuota de cada uno de los nueve biorreactores, se utilizó un hematocitómetro o cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad. La cantidad de células por mililitro se calculó con la siguiente fórmula:

$$C = N * 10^4 * \text{Dil} \quad (1)$$

En donde:

C = densidad celular (cél mL^{-1})

N = promedio de células en ocho cuadrantes

Dil = factor de dilución

10^4 = factor de conversión de 0.1 μL a 1mL

A partir de los conteos celulares, se calculó la tasa de crecimiento específico para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\log_2(x_2) - \log_2(x_1)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

μ = tasa de crecimiento

x_2, x_1 = biomasa en tiempo 2 y tiempo 1

t_1, t_2 = tiempo 1 y tiempo 2

Para cuantificar la biomasa producida con base en el peso seco total (PST) y orgánico (PSO), se tomaron alícuotas cada tercer día durante el tiempo que duro el experimento, las muestras se filtraron con filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, con 47 mm de diámetro y 1.2 μm de retención de partículas, los cuales fueron previamente lavados, incinerados a 490 °C en una mufla y pesados. Los filtros con microalgas se colocaron en una estufa (Thermolyne, modelo: oven series 9000) a 70 °C por 24 h y se pesaron nuevamente para conocer el peso seco total (PST), consecutivamente los filtros con microalgas se incineraron en una mufla a 490 °C por 12 h, posteriormente se pesaron para obtener el peso de cenizas (PC) y, por diferencia entre el PST y el PC, se calculó el PSO.

2.5 Inducción a la carotenogénesis

Para el ensayo de la inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp. en los FBP, se evaluaron tres intensidades de luz: 91, 116 y 282 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cada tratamiento con tres repeticiones.

Se utilizaron las microalgas que fueron cultivadas en el experimento anterior, las cuales se concentraron en un tanque con capacidad de 1,100 litros, se homogeneizaron y posteriormente, volúmenes iguales, se traspasaron en cada uno de los biorreactores y el volumen se ajustó a 100 L. El ensayo inició con 530,000 $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para estresar a la microalga, además del incremento de luz, a cada biorreactor se les añadió 0.034 M de NaCl, para incrementar la producción de astaxantina (Nava, 2017).

Para obtener las intensidades de luz en cada tratamiento, se utilizó el mismo número de lámparas (6, 8 y 10), sin las cubiertas de malla sombra, con las que se alcanzaron las intensidades de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 31 ± 1 °C por 14 días y, para acelerar el proceso de inducción, a partir del día 14 se elevó la temperatura a 39 ± 1 °C, cubriendo los biorreactores con plástico para evitar la pérdida de calor. El pH se mantuvo a 7.5. Dado que en estas condiciones de estrés las microalgas perdieron sus flagelos y se observó la formación de células palmeloides y aplanosporas, con el consecuente incremento de su tamaño celular y sedimentación de las mismas. Fue necesario incrementar la aireación en cada unidad experimental, a 30 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ con ayuda de bombas de alta presión (Sweetwater, Aquatic Eco-Systems, Inc.) para mantenerlas en suspensión. Debido a la evaporación que se observaba en cada biorreactor, diariamente se agregó agua estéril a cada uno de ellos para mantener el volumen constante. El experimento duro 23 días.

Para la evaluación de la biomasa, con base en el número de células, diariamente se tomaron alícuotas de cada uno de los biorreactores y cada tercer día se recolectaron volúmenes conocidos para cuantificar el peso seco (con la metodología descrita anteriormente), así como para los pigmentos producidos. Las muestras para el análisis de pigmentos se colocaron en tubos estériles de 15 mL, consecutivamente se centrifugaron por 10 min a 3000 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el paquete celular se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

2.6 Extracción de los pigmentos carotenoides

Los paquetes celulares de las microalgas que se almacenaron en congelación, se resuspendieron en agua destilada, se transferidos a microtubos de silicón (marca VWR®) y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 5 min.

La extracción de pigmentos se realizó por rompimiento mecánico de las células. A cada microtubo, con las microalgas, se le agregó 0.20 g de perlas de zirconia de 0.5 mm (marca BioSpec) y 1.5 mL de metanol grado HPLC, se introdujeron en nitrógeno líquido (-196 °C) en periodos no menores a 8 minutos, posteriormente se agitaron por 4 min en un Bead beater (marca BioSpec), enseguida se centrifugaron a 10,000 r.p.m. y se recolectó el sobrenadante que contenía los pigmentos. En los casos donde aún se observaba pigmentación en los paquetes celulares sedimentados, se realizó una segunda o tercera extracción, con la misma metodología, hasta que se observaba el pellet celular de color blanco, los sobrenadantes se mezclaron en el tubo correspondiente a la misma muestra. Todo el procedimiento se realizó evitando en lo posible la luz (oscuridad) para evitar la oxidación de los carotenoides.

El sobrenadante (metanol), con los pigmentos de cada muestra, se filtró a 0.2 µm, del volumen total se tomó una alícuota de 1.5 mL y se colocó en viales de vidrio, de color ámbar, de 2 mL (HP®). Las muestras se almacenaron a -20 °C para el posterior análisis en HPLC.

2.7 Análisis de pigmentos en HPLC y cálculo del contenido de pigmentos

El análisis de pigmentos se hizo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, marca Agilent Technologies®, modelo: 1260 INFINITY). Se empleó una columna de fase reversa C8 de 4.5 x 150 mm (marca Agilent Technologies, modelo Zorbax), con partícula de 5µm. Durante el funcionamiento del HPLC la columna se mantuvo a 30 °C.

El método utilizado para la cromatografía se definió de acuerdo al protocolo descrito por Orosa *et al.* (2005), modificando los porcentajes de los constituyentes de la fase móvil (Nava, 2017). El gradiente de dilución (tabla 2) consistió en la mezcla de acetona (eluyente A), metanol (eluyente B) y agua (eluyente C) en relación V:V:V, con un flujo de 0.5 mL por minuto. El volumen de inyección fue de 20 µL de muestra.

Tabla 2. Gradiente de dilución de la fase móvil en el análisis de pigmentos en HPLC.

Gradiente de dilución de solventes			
Minuto	A	B	C
	(Acetona)	(Metanol)	(Agua)
	(%)		
0	15	76	9
9	50	45	5
15	58	38	4
17	70	27	3
22	70	27	3
25	100	0	0
26	100	0	0
29	15	76	9

Los solventes orgánicos utilizados en la fase móvil fueron grado HPLC y se filtraron con filtros de membrana de nylon de 47 mm con un poro de retención de 0.45 µm. Los estándares de los pigmentos empleados para la identificación fueron: astaxantina, cantaxantina, β-caroteno, licopeno y clorofila a, de la marca DHI® Dinamarca.

Se realizaron curvas de calibración con cada uno de los estándares, se tomó como referencia la concentración inicial de cada estándar (en ng·µL⁻¹), el área de los picos en los cromatogramas y las diluciones correspondientes. El cálculo de contenido de pigmentos se realizó con base en el peso seco

orgánico ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el volumen ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), la fórmula utilizada fue la descrita por Hooker y Heukelem (2011). Se inyectaron en el HPLC 5 μL de cada estándar.

$$C_p = \left(\frac{V_x}{\text{mg ps}} \right) \left(\frac{C_l}{V_c} \right) \quad (3)$$

En donde:

C_p = concentración de pigmento ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$)

V_x = volumen de metanol para extracción (μl)

mg_{ps} = mg de peso seco de la muestra

C_l = cantidad de pigmento inyectado

V_c = volumen inyectado en HPLC

2.8 Análisis estadístico y procesamiento de datos

Se realizaron pruebas de Shapiro Wilks para comprobar la normalidad, y pruebas de Levene para la homogeneidad de varianzas de los datos.

Para evaluar el efecto de las bajas y altas intensidades de luz sobre el crecimiento e inducción a la carotenogénesis, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para el primer objetivo (las variables de respuesta que se evaluaron fueron producción de biomasa en $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, PST y PSO) y un análisis de covarianza para el segundo y tercer objetivo utilizando como cofactor los días de cultivo, las variables de respuesta que se evaluaron fueron la producción de pigmentos carotenoides y producción de biomasa ($\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, PST y PSO), todo con un nivel de significancia de 0.05. Cuando se obtuvieron diferencias significativas se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey, para observar las diferencias entre tratamientos. Todos los análisis se hicieron con el programa Statistica Soft 10[®].

Capítulo 3. Resultados

3.1 Biomasa producida de *Haematococcus* sp. a nivel semi masivo (15 L)

En la figura 5 se muestra el crecimiento de *Haematococcus* sp. a nivel semi masivo en tres intensidades de luz: 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, durante los 18 días de cultivo. En los tres tratamientos se observó que la fase de crecimiento exponencial inició desde el primer día, donde se presentó la mayor tasa de crecimiento (μ : divisiones·día⁻¹), con un promedio de 2.7 div·día⁻¹, sin diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P>0.05$). Esta fase de crecimiento tuvo una duración de un día para el tratamiento de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y de dos para los tratamientos de 30 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En el día dos, la densidad celular promedio, para los tres tratamientos fue similar ($p>0.05$), con un promedio de 279×10^3 cél·mL⁻¹. A partir del día 3 el cultivo entró en la fase de crecimiento lento y se mantuvo en esta fase hasta el día 6, donde se alcanzaron densidades promedio de 505×10^3 cél·mL⁻¹ (casi el doble de lo obtenido en el día dos), sin diferencias significativas entre las tres intensidades de luz ($p>0.05$). A partir de este día, el cultivo entró en la fase estacionaria y para el día 17 alcanzó biomasa promedio de 1510×10^3 cél·mL⁻¹, sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

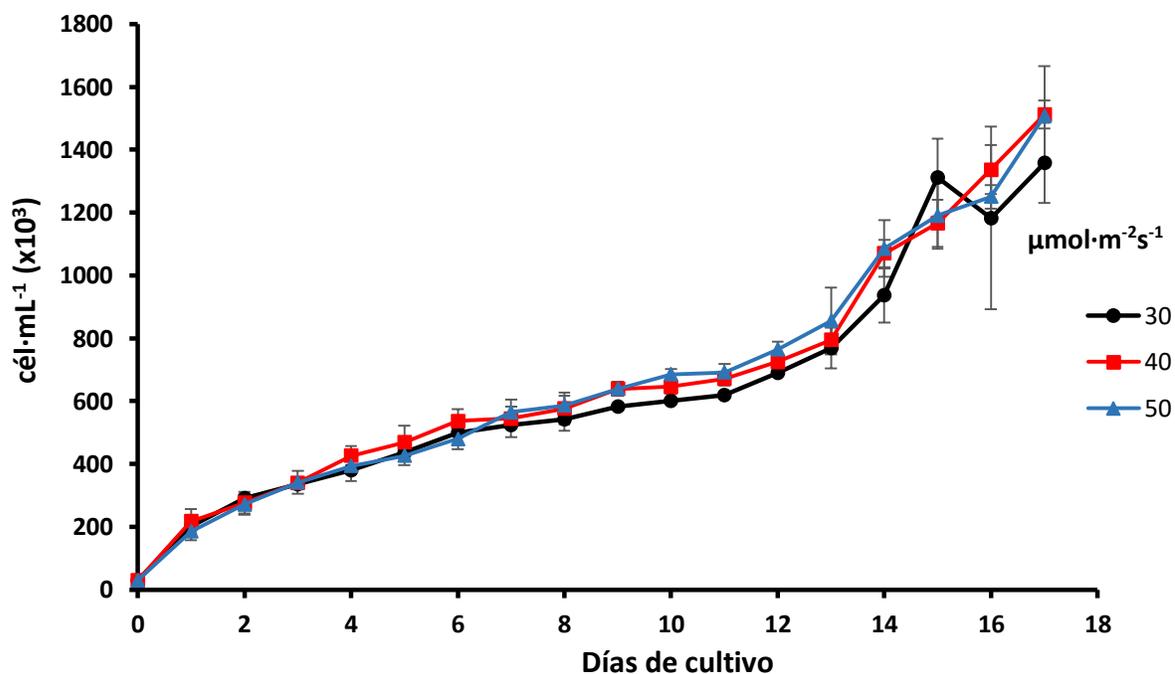


Figura 5. Crecimiento de *Haematococcus* sp. a nivel semi masivo (15 L) con diferentes intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

3.2 Producción de biomasa de *Haematococcus* sp. en FBP (100 L)

3.2.1 Densidad celular (cél·mL⁻¹) de *Haematococcus* sp. en FBP

En la figura 6 se muestra el crecimiento de *Haematococcus* sp. en FBP de 100 L, con intensidades de luz de 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, durante 36 días de cultivo. La fase de crecimiento exponencial en las intensidades de 30 y 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ inició un día después de la inoculación de los FBP (día 1), con tasas de crecimiento de 0.7 div·día⁻¹ y tuvo una duración de dos días, para 40 y 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente, sin embargo, en el día 5, el cultivo con 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nuevamente entró en la fase exponencial, con 0.8 div·día⁻¹. En el tratamiento con 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ esta fase se presentó hasta el día 5 con 0.5 div·día⁻¹, la biomasa promedio en los tres tratamientos fue de 79×10^3 cél·mL⁻¹. A partir del día 6, los cultivos entraron en la fase de crecimiento lento y a partir del día 13 inició la fase estacionaria, manteniéndose en esta fase, en general, hasta el día 36.

En el último día de cultivo (día 36) se alcanzaron densidades de 900×10^3 cél·mL⁻¹ en las intensidades de 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sin diferencias significativas entre estos tratamientos ($p > 0.05$), mientras que las biomásas obtenidas en estos dos tratamientos fueron significativamente mayores al cultivo con 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con una densidad celular de 644×10^3 cél·mL⁻¹ ($p = 0.015$).

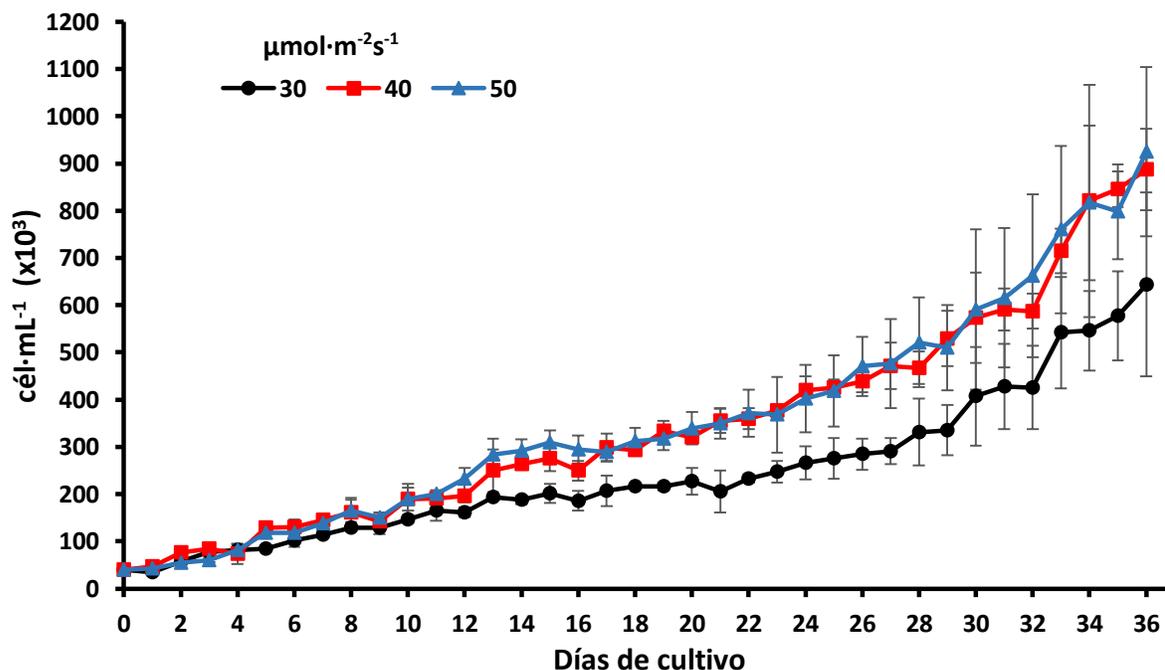


Figura 6. Crecimiento de *Haematococcus* sp. en FBP (100 L) con diferentes intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

3.2.2 Peso seco total (PST) y orgánico (PSO) de *Haematococcus* sp. en FBP (100 L).

En las figuras 7 y 8 se observa la biomasa producida de *Haematococcus* sp. con base en el PST y PSO. Después del día 6, y hasta el día 24, no se observaron diferencias significativas en el incremento en la biomasa en los diferentes tratamientos; las concentraciones obtenidas en las tres intensidades de luz en los días 12 al 24, estuvieron en el intervalo de 134 a 280 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para el PST y de 116 a 232 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para el PSO.

En el día 36, con el tratamiento de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se encontraron las mayores concentraciones ($p < 0.001$) de PST y PSO, con 394 y 320 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente.

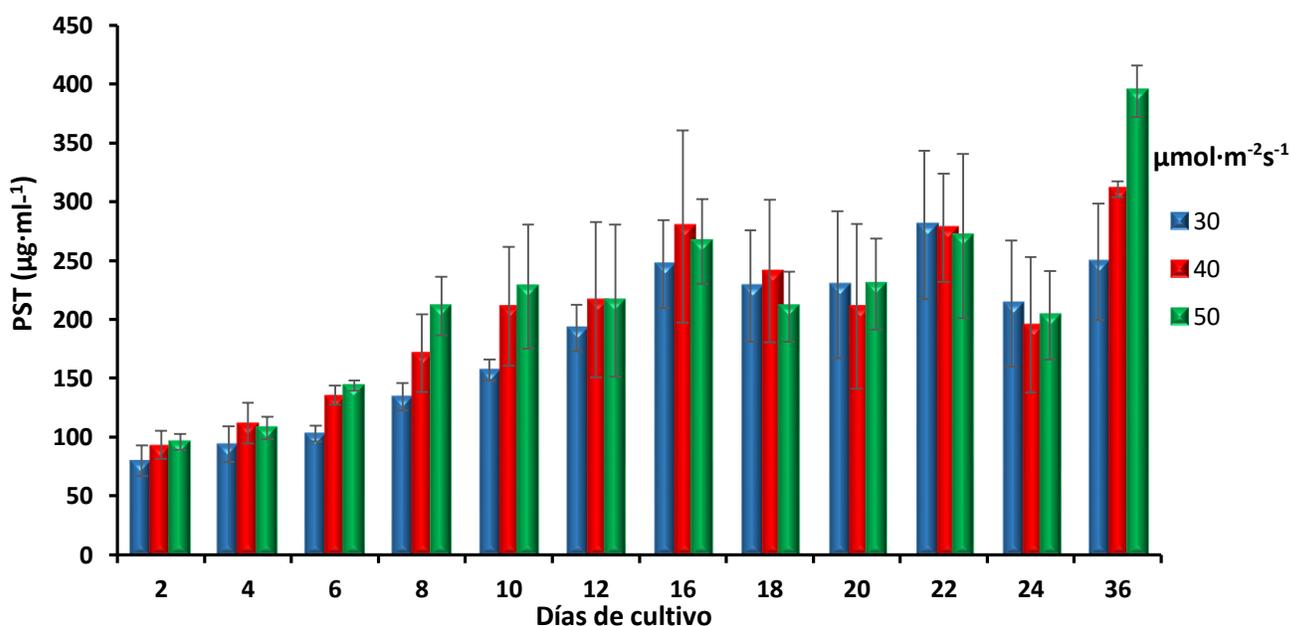


Figura 7. Producción de biomasa de *Haematococcus* sp. en PST en los FBP con intensidades de luz de 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

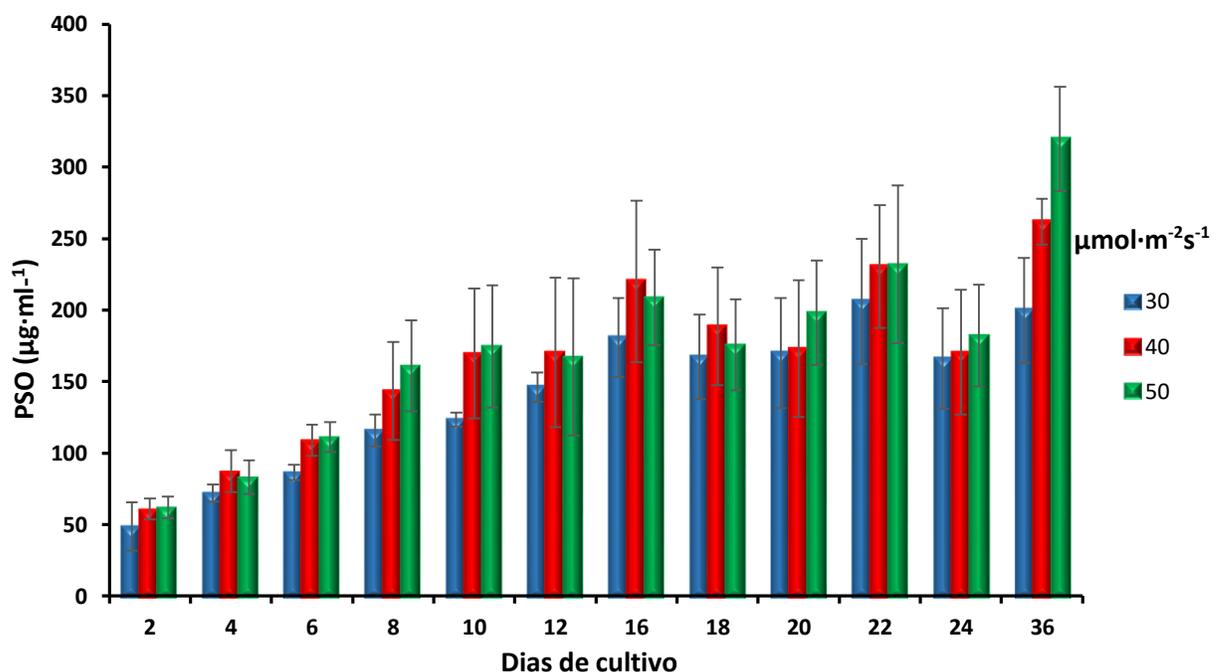


Figura 8. Producción de biomasa de *Haematococcus* sp. en PSO en los FBP con intensidades de luz de 30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.3 Inducción a la carotenogénesis de *Haematococcus* sp. con intensidades de luz de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

3.3.1 Producción de biomasa en $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y en peso seco (PST Y PSO) con altas intensidades de luz.

En la figura 9 se observa que la mayor densidad celular se alcanzó al día 14 con la intensidad de luz de 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ donde se obtuvieron $2,300 \times 10^3 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de ese día, cuando la temperatura se incrementó a $39 \pm 1^\circ$, se observó lisis celular y la disminución de la densidad celular hasta el día 21, cuando se registró un promedio de $234 \times 10^3 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ en los tres tratamientos.

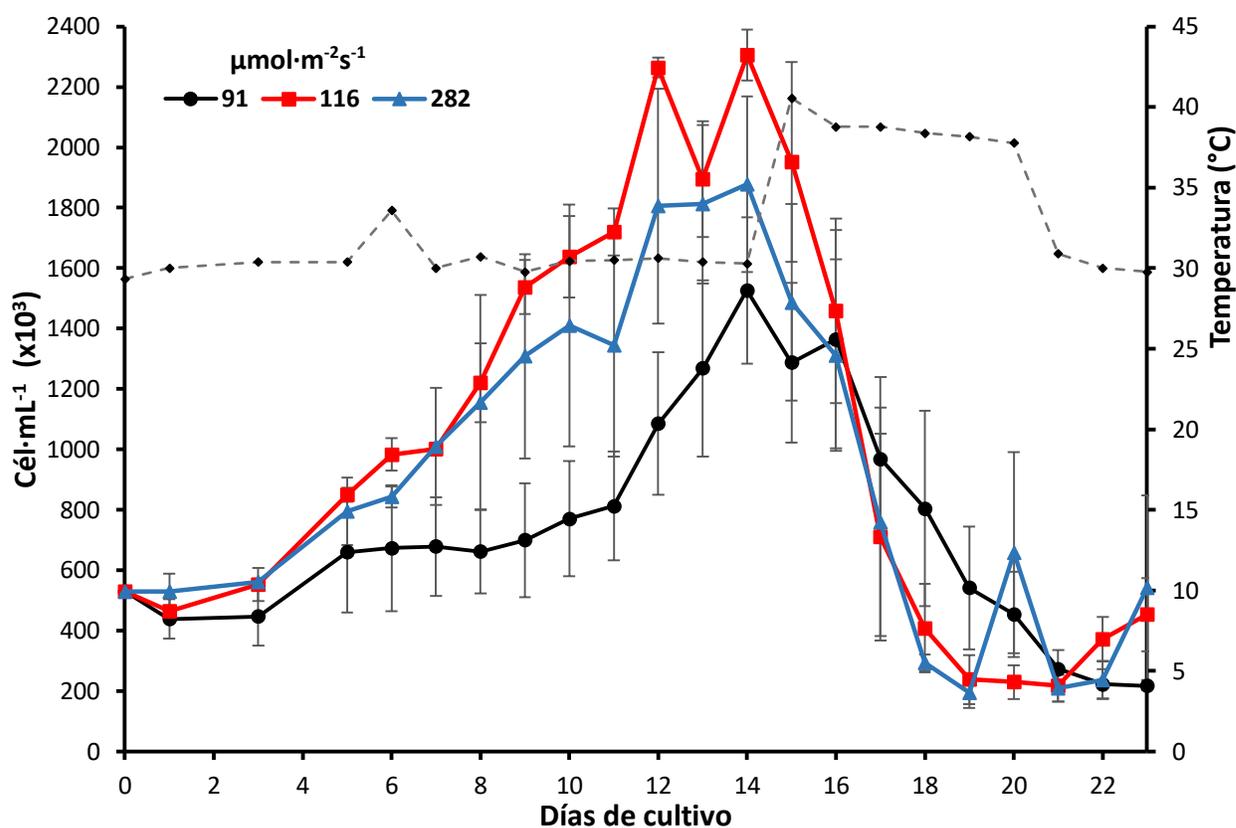


Figura 9. Crecimiento de *Haematococcus* sp. durante la fase de inducción a la carotenogénesis con diferentes intensidades de luz (91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), NaCl (0.034 M) y temperaturas promedio en FBP (100 L). Las barras verticales indican el error estándar.

En las figuras 10 y 11 se representan las biomásas de *Haematococcus* sp. que se expresan en PST y PSO. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (intensidades de luz) para un mismo día de cultivo ($P < 0.05$), a excepción del día 9, donde las mayores concentraciones se obtuvieron con la mayor intensidad de luz (282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Se observó un incremento gradual en el PST hasta los días 13 y 17 (Fig. 10), con las mayores concentraciones promedio, de 1163, 1295 y 1337.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para las intensidades de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. En el día 17 de cultivo se encontró una mayor producción (1334 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con los tratamientos de 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en comparación con el tratamiento de 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p < 0.05$) al día 13, con 1130 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En relación con el PSO (Fig. 11), se observa la misma tendencia que con el PST, con las mayores concentraciones promedio (para los días 13 y 17), de 1022, 1140.5 y 1188.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para las intensidades de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Igualmente, en el día 17 se encontró una mayor producción

promedio de $1183 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en los tratamientos de 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en comparación con $91 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p < 0.05$) del día 13 con $997 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

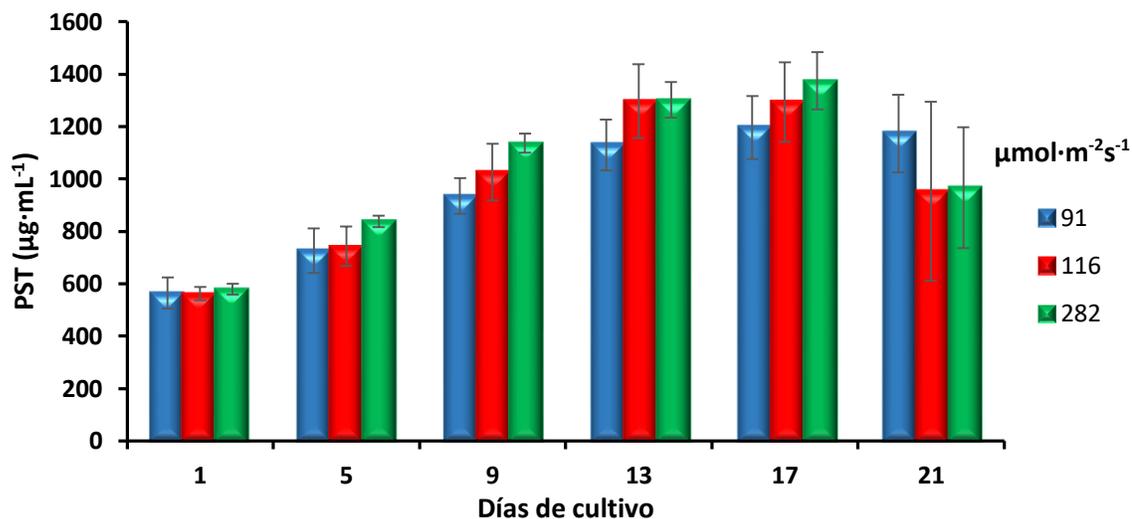


Figura 10. Producción de biomasa de *Haematococcus* sp. con base en el PST, cultivada con diferentes intensidades de luz (91 , 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y salinidad de 0.034 M en FBP (100 L). Las barras verticales indican la desviación estándar.

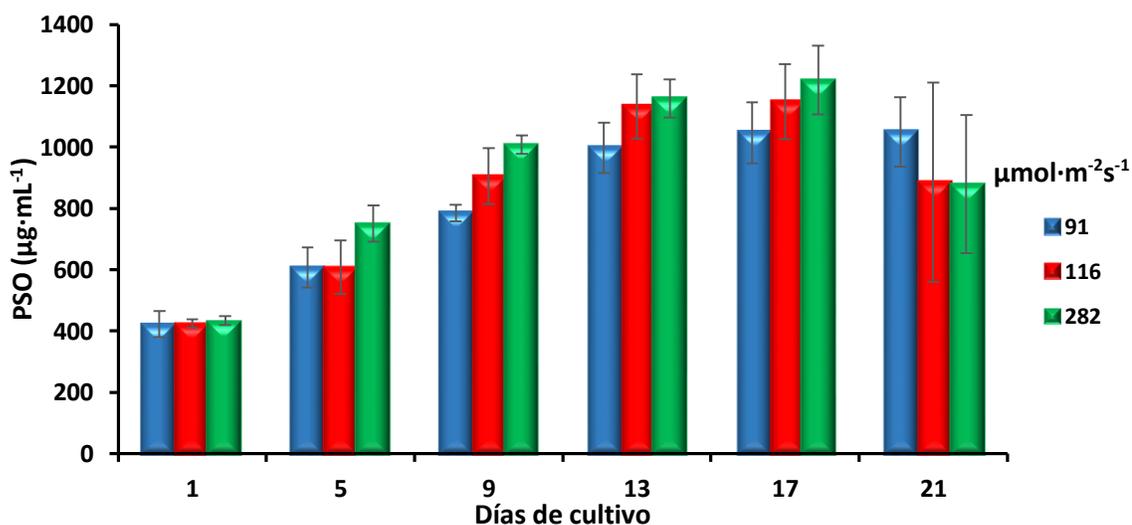


Figura 11. Producción de biomasa de *Haematococcus* sp. con base en el PSO, cultivada con diferentes intensidades de luz (91 , 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y salinidad de 0.034 M en FBP (100 L). Las barras verticales indican la desviación estándar.

3.3.2 Producción de pigmentos carotenoides y clorofila a.

Durante el proceso de inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* sp., con tres intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), se identificaron cuatro pigmentos carotenoides (astaxantina, cantaxantina, β -caroteno y licopeno) y clorofila *a*. Las concentraciones promedio se presentan en las figuras 12 a la 16.

En la figura 12 se muestran los valores del contenido de astaxantina y se observa que en los días 1 al 15, las concentraciones de astaxantina fueron bajas, con un intervalo entre 0.01 y 0.02 % (sin sobrepasar los 0.240 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO). Se detectaron diferencias significativas entre algunos de los tratamientos ($p < 0.004$), en general, los mayores contenidos se observaron los días 7, 9, 11 y 15 con el tratamiento con 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A partir del incremento de la temperatura a $39 \pm 1^\circ\text{C}$ (en el día 14), se observó la mayor producción de astaxantina a partir del día 17 con el tratamiento de 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con diferencias muy significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos. En el día 19 se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$), entre los tratamientos de 91 y 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con respecto a 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, obteniendo la mayor concentración con esta última intensidad de luz, con 1.922 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, 74 % más que el producido por los tratamientos de 91 y 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

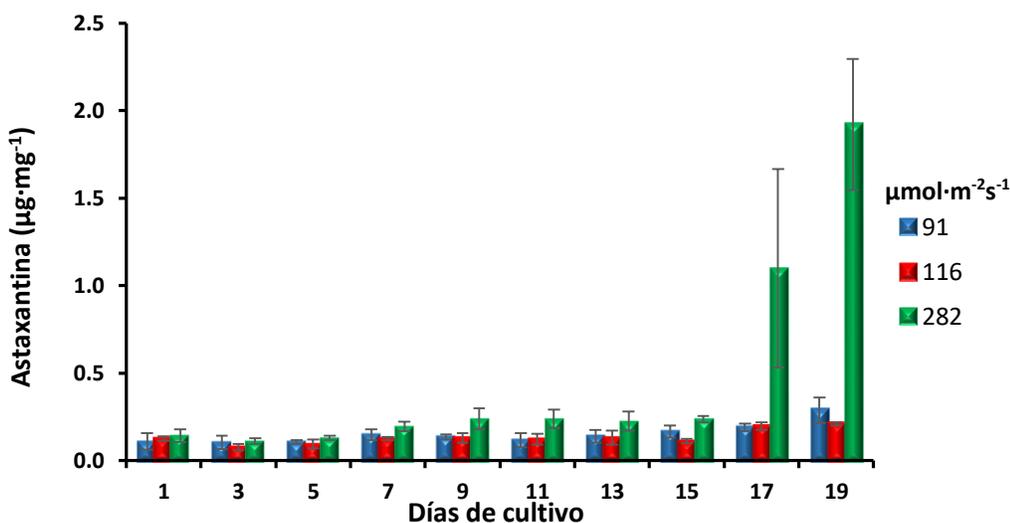


Figura 12. Producción de astaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz (91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).

Los contenidos del carotenoide cantaxantina se observan en la figura 13. En los primeros 15 días de cultivo se observan las menores concentraciones de este pigmento, desde 0.04 a 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ en las tres intensidades de luz. Al igual que para la astaxantina, a partir del incremento de 10 °C en la temperatura (día 14 de cultivo), también se observó un incremento en la producción de cantaxantina para los días 17 y 19. En donde las mayores concentraciones (0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) se encontraron con el tratamiento de 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sin diferencias significativas entre éstos días de cultivo. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el día 17 ($p=0.006$) con los valores obtenidos con los otros dos tratamientos (116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

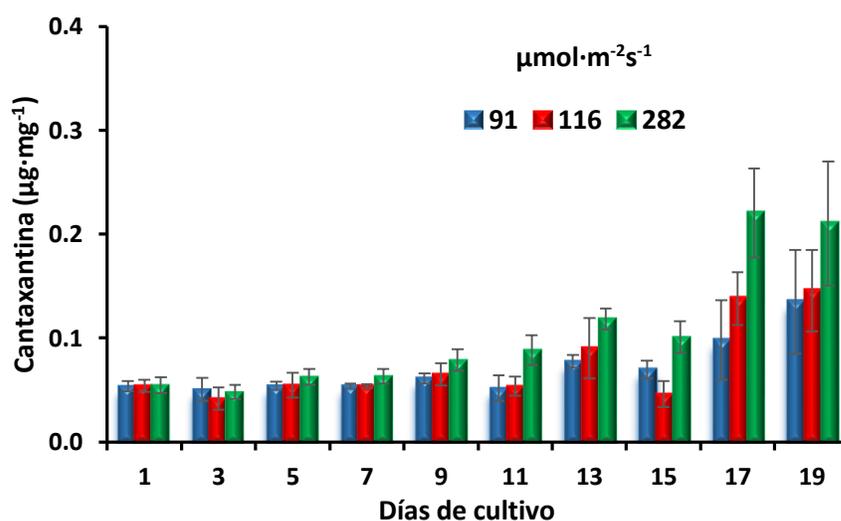


Figura 13. Producción de cantaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz (91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).

Los resultados del contenido de β -caroteno se presentan en la figura 14. Entre los días 1 al 15, el contenido de este pigmento en los tres tratamientos, se mantuvo entre 0.20 y 0.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO. En los días 17 y 19 se observó un decremento en la concentración, con un promedio de 0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ entre tratamientos.

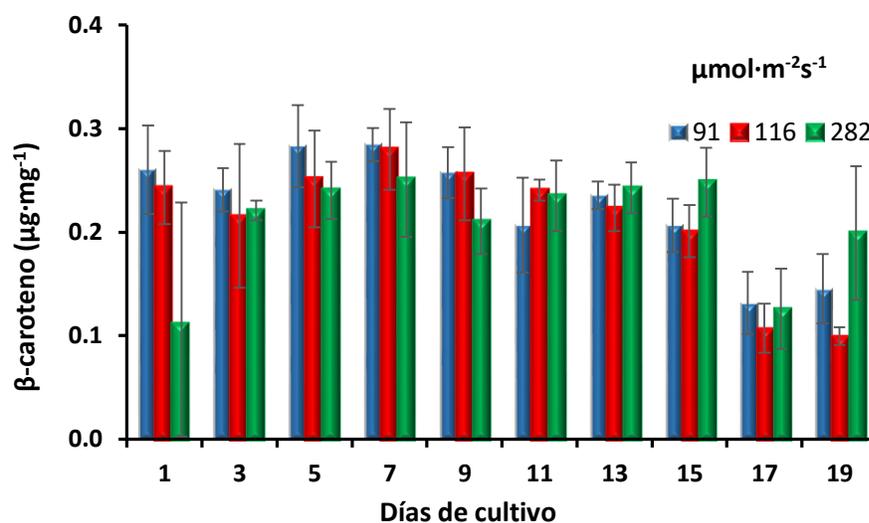


Figura 14. Producción de β -caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz (91, 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).

En la figura 15 se observa la producción de licopeno en los diferentes tratamientos durante los 19 días de inducción. Se observó un incremento en la concentración con el tratamiento de $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p < 0.05$) en el día 7 al día 15 (2.5 y $4.5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO, respectivamente), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos para el día 17 y para el día 19 solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento de mayor intensidad de luz con respecto al de menor intensidad de luz. A partir del día 1 al 19, hubo un incremento promedio del 89% en la concentración de licopeno, con la intensidad de luz de $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PSO.

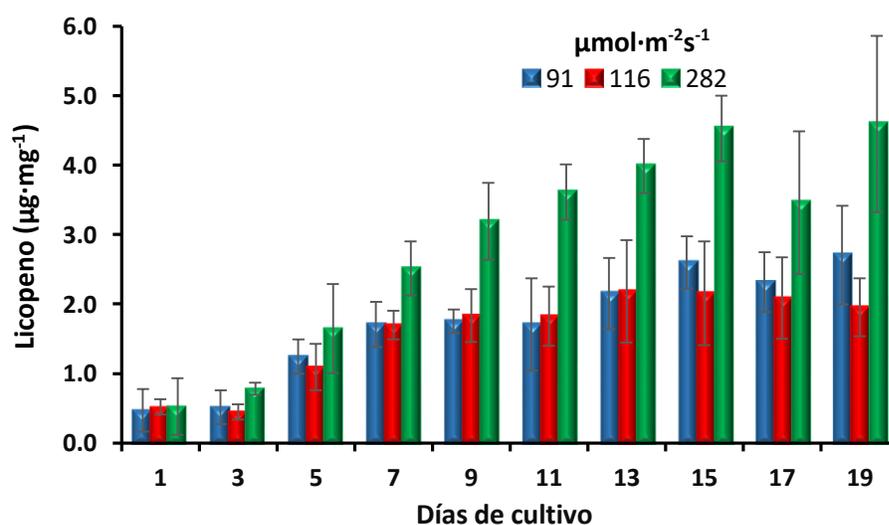


Figura 15. Producción de licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz (91, 116 y $282 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).

El contenido de clorofila a de *Haematococcus* sp. expuesta a las diferentes intensidades de luz se presenta en la figura 16. No se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos en los tres tratamientos para cada día de cultivo, con algunas excepciones (días 13 y 19).

En el primer día se obtuvo la mayor concentración de clorofila a, con las intensidades de luz de 91 y 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (con 108 y 127 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO, respectivamente), con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos y entre los diferentes días, a excepción del día 5. Los valores que se obtuvieron con la intensidad de luz más alta (282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no marcaron diferencias significativas ($p > 0.05$), con valores de 64 a 116 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Del día 1 al 19, se observó una disminución del 56 % en el contenido promedio de clorofila con los tres tratamientos.

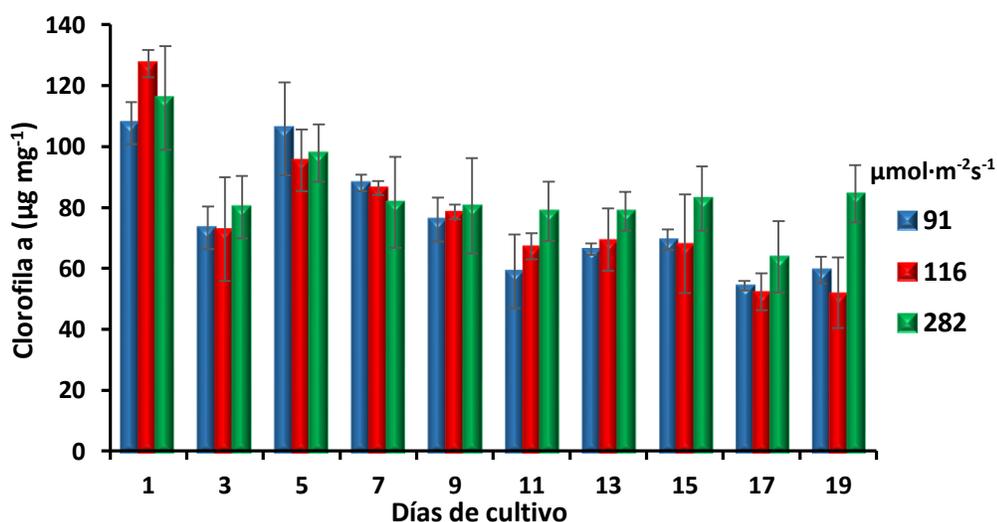


Figura 16. Producción de clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de PSO) de la microalga *Haematococcus* sp. con diferentes intensidades de luz (91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y NaCl (0.034 M) en FBP (100 L).

En la tabla 3 se presenta el rendimiento promedio (mg L^{-1}) de los pigmentos de *Haematococcus* sp., que se obtuvieron con las diferentes intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y en los diferentes días de inducción. Se observa que el mayor rendimiento de pigmentos se obtuvo en la intensidad de luz más alta (282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En el caso de la astaxantina, se presentaron en el día 17 y 19, con 1.255 y 1.892 mg L^{-1} , respectivamente y para cantaxantina fue de 0.265 y 0.201 mg L^{-1} para los mismos días. Los valores de β -caroteno fueron cercanos a los que se obtuvieron para cantaxantina, con 0.293 mg L^{-1} , está al día 15 del

cultivo, mientras que para licopeno para el mismo día fue de 5.345 mg L⁻¹. Los rendimientos más altos de clorofila a también se encontraron al día 15, con 98 mg L⁻¹.

Tabla 3. Rendimiento promedio de pigmentos (mg L⁻¹) obtenidos en cultivo de *Haematococcus* sp. con tres intensidades de luz: 282, 116 y 91 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una concentración de 0.034 NaCl.

Tiempo en días	Intensidad de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Pigmentos (mg L ⁻¹)				
		Astaxantina	Cantaxantina	β -caroteno	Licopeno	Clorofila a
1	91	0.047	0.023	0.111	0.200	43
	116	0.053	0.023	0.103	0.220	53
	282	0.062	0.024	0.048	0.227	49
3	91	0.049	0.024	0.117	0.240	36
	116	0.039	0.021	0.108	0.227	37
	282	0.064	0.027	0.125	0.442	45
5	91	0.064	0.033	0.172	0.746	65
	116	0.056	0.033	0.153	0.651	58
	282	0.097	0.047	0.179	1.208	70
7	91	0.110	0.040	0.211	1.257	66
	116	0.101	0.044	0.227	1.363	70
	282	0.173	0.056	0.223	2.231	72
9	91	0.107	0.048	0.202	1.377	60
	116	0.116	0.058	0.234	1.645	71
	282	0.240	0.079	0.213	3.211	81
11	91	0.111	0.048	0.194	1.598	55
	116	0.130	0.058	0.260	1.951	72
	282	0.263	0.097	0.262	3.994	87
13	91	0.130	0.077	0.230	2.121	66
	116	0.146	0.100	0.253	2.418	78
	282	0.261	0.137	0.280	4.603	91
15	91	0.178	0.075	0.224	2.777	75
	116	0.128	0.053	0.230	2.422	77
	282	0.281	0.119	0.293	5.345	98
17	91	0.192	0.100	0.140	2.407	57
	116	0.239	0.157	0.120	2.403	60
	282	1.255	0.265	0.151	4.140	77
19	91	0.249	0.121	0.133	2.104	55
	116	0.189	0.136	0.097	1.838	49
	282	1.892	0.201	0.193	4.291	76

Capítulo 4. Discusión

La microalga *Haematococcus* spp. es conocida por su capacidad para acumular pigmentos carotenoides y de manera particular astaxantina, este pigmento tiene una amplia demanda en el mercado, por sus múltiples aplicaciones y beneficios para la salud humana y animal. Entre las condiciones de cultivo que se han evaluado, tanto para la optimización de su crecimiento, como para la producción de este carotenoide están: las intensidades de luz, la composición del medio de cultivo, temperatura y salinidad, entre otros, así como la interacción de algunas de estas variables (Renstrom, 1981; Boussiba, 2000; Cifuentes *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos de estos factores son especie-específicos, por lo que es necesario estudiar cada cepa y en particular aquellas aisladas localmente, para valorar su potencial, ya que esto permitirá una rápida aclimatación cuando los cultivos se deseen escalar a nivel comercial.

La cepa de *Haematococcus* sp. objeto de este estudio, fue colectada localmente y estudiada inicialmente por Nava-Gómez (2014), quien evaluó algunos factores para establecer las condiciones óptimas de cultivo y para la inducción a la síntesis de pigmentos, especialmente astaxantina. No obstante, su investigación se realizó en volúmenes pequeños (hasta 500 ml), por lo que en este estudio se retomaron sus resultados para realizar el escalamiento del cultivo a nivel masivo, en fotobiorreactores planos, en donde los riesgos de contaminación se reducen en comparación con cultivos abiertos.

Los resultados que se obtuvieron en la primera fase de este estudio (producción de biomasa), donde se obtuvieron hasta 0.9×10^6 cél·mL⁻¹ en las intensidades de luz de 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, son acordes a los resultados obtenidos en PST y PSO para el día 36 de cultivo, con 394 y 320 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Estas biomásas son superiores a las reportadas por Nava-Gómez (2017), que cultivó esta misma cepa utilizando el medio de cultivo Basal Bold (MBB) y obtuvo densidades máximas de 0.32×10^6 cél·mL⁻¹, con una intensidad de luz menor ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). De manera similar, Escuredo-Vielba (2014), cultivó otra cepa de *Haematococcus*, con el medio de cultivo Plantafol y con una intensidad de luz mayor ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y obtuvo biomásas menores a las de este estudio (0.72×10^6 cél·mL⁻¹). Esta diferencia puede ser debido a que los autores utilizaron diferentes intensidades de luz, trabajaron en volúmenes pequeños (< 1 L), y no controlaron el pH de los cultivos.

Ramírez *et al.* (2013), mencionan que los FBP presentan una buena eficiencia en la producción de biomasa al aprovechar mayormente la luz en toda su dimensión. Dependiendo del diseño del FBR, se debe optimizar esta variable, ya que cuando se excede la intensidad de luz necesaria para estimular la fotosíntesis, se puede presentar fotoinhibición, se reduce la tasa de crecimiento y se produce una menor densidad celular (Tredici y Zittelli, 1998). García-Melea *et al.* (2006) realizaron cultivos al exterior de *H. pluvialis*, en fotobiorreactores tubulares de diferentes dimensiones, donde las intensidades de luz variaron desde 50 a 2000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y obtuvieron biomásas hasta cerca de 4×10^6 cél·mL⁻¹.

Torzillo y Vonshak (2013), mencionan que cuando se cultivan microalgas, es necesario incrementar la intensidad de luz en forma gradual, ya que a medida que hay una mayor densidad celular, hay una penetración limitada de fotones de luz para la realización de los procesos fotosintéticos. Grobbelaar (2013), indica que la absorción de los nutrientes depende de la energía luminosa disponible y, por ende, la demanda de nutrientes tiende a incrementarse. Por lo que es necesario agregar nuevos nutrientes una vez que estos disminuyen en los cultivos. En este trabajo, las intensidades de luz en cada tratamiento se mantuvieron constantes a lo largo del cultivo, lo que podría explicar el largo periodo de la fase de crecimiento lento de esta cepa de *Haematococcus*, pero sin entrar a la fase de muerte, a pesar de que los cultivos tuvieron una duración de más de 30 días.

En el presente estudio se utilizó el fertilizante Plantafol como medio de cultivo, este fertilizante y otros, fueron utilizados previamente por Escuredo-Vielba (2014) para el cultivo de otra cepa de *Haematococcus* y obtuvo las biomásas más altas con el fertilizante "Plantafol" (hasta 61% más que con el medio MBB), esto podría deberse a que el MBB solo tiene NaNO₃ como fuente de nitrógeno, mientras que el fertilizante "Plantafol" contiene nitrógeno amoniacal (2%), uréico (14%) y nítrico (4%), que pueden ser utilizados en forma eficiente por las microalgas. Grobbelaar (2013) menciona que es preferente suministrar estos tres componentes en el cultivo como fuente de nitrógeno, ya que el suministro de un solo componente, como el nitrógeno amoniacal tiende a disminuir el pH por la liberación de iones H⁺ y el nítrico a subirlo; de acuerdo con Kaplan *et al.* (1986), con el suministro de estos tres compuestos se obtienen tasas de crecimiento con buen rendimiento. El trabajo de Dalay *et al.* (2007) refuerza este hecho, pues también encontraron que en el cultivo de *H. pluvialis*, con el medio de cultivo preparado a partir del fertilizante triple 20, N:P:K (N: nítrico 6.11%; amoniacal 3.9%; uréico 10%), se produjeron 900 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de peso seco, en comparación con el medio de cultivo convencional BG 11, que contiene la misma fuente de nitrógeno que el MBB, y con el que se produjeron 760 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de peso seco.

Los medios de cultivo, elaborados a base de fertilizantes agrícolas, se han utilizado en diferentes especies de microalgas y se han obtenido buenos resultados, por lo que se ha considerado su aplicación por la reducción de costos (hasta el 70%), en comparación con los medios de cultivo convencionales a base de productos químicos de grado analítico o técnico (Dalay *et al.*, 2007; Piña *et al.*, 2007; Tocquin *et al.*, 2012).

En la literatura existen diversos estudios sobre los factores de estrés que inducen la producción de pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina, en la microalga *Haematococcus*, entre estos están: altas intensidades de luz, altas temperaturas, salinidad, limitación de nutrientes, inclusión de acetato de sodio como fuente de carbono y hierro, entre otros (Boussiba *et al.*, 1999; Chekanov *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1993; Sarada *et al.*, 2002).

En este trabajo, para la inducción a la carotenogénesis de la microalga *Haematococcus* sp., se utilizó una salinidad de 0.034 M (equivalente a aproximadamente 2 UPS), seleccionada con base en las condiciones de cultivo evaluadas por Nava (2017). Este factor estresor ni afectó la producción de biomasa, ni ocasionó un daño celular aparente. Harker *et al.* (1995), estudiaron la efectividad de la adición de NaCl en la carotenogénesis de *H. pluvialis* y observaron que el mejor rendimiento de astaxantina se obtuvo con una concentración de NaCl entre 0.025-0.03 M y con la interacción de una alta irradiancia ($1600-1700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). No obstante, en varios trabajos en los que se ha evaluado el efecto de la salinidad sobre la inducción a la carotenogénesis en *Haematococcus* spp. se han obtenido diferentes resultados, por ejemplo, Sarada *et al.* (2002), mencionan que las concentraciones de salinidad mayores que 1 UPS ocasionaron blanqueamiento y lisis celular en *H. pluvialis*. En el trabajo de Boussiba y Vonshak (1991) el mejor rendimiento de astaxantina lo obtuvieron utilizando 0.8 UPS. Sin embargo, Harker *et al.* (1996) y Nagaraj *et al.* (2012) obtuvieron mejores resultados con salinidades de 2.35 y 3.5 UPS respectivamente.

Hong *et al.* (2015) mencionan que cuando *H. pluvialis* se cultiva en condiciones de estrés, se detiene el crecimiento vegetativo de un gran número de células de la población, sin embargo, en este trabajo se observó que cuando las microalgas estuvieron expuestas (hasta el día 14), a factores de estrés, como intensidades de luz de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperaturas de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, su efecto fue moderado, ya que las microalgas continuaron reproduciéndose, hasta alcanzar una densidad de $2.31 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, en contraste, con las intensidades de luz de 40 y $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, donde las densidades fueron menores ($900 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$). Así mismo, el PST ($1,374 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y PSO ($1,218 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) también fueron superiores a los obtenidos con las dos intensidades de luz bajas. En este ensayo se observó un gran número de microzooides, que, aunque no fueron considerados para el cálculo del número de células, es de esperar que contribuyeran en la producción de biomasa con base en el peso seco.

Las altas intensidades de luz estimulan la síntesis de pigmentos carotenoides, cuya función es proteger a las células del daño fotooxidativo (Hu, 2013), sin embargo, estas condiciones de luz también pueden ocasionar fotoinhibición (Torzillo y Vonshak, 2013) y, por ende, una reducción en el rendimiento del cultivo. Es por esto que, para la producción de pigmentos, el cultivo de *Haematococcus* se realizó en dos fases: cultivo vegetativo (producción de biomasa en condiciones óptimas) e inducción a la carotenogénesis (síntesis de pigmentos con factores de estrés).

Algunos autores han utilizado intensidades de luz altas para el cultivo de *H. pluvialis*, de 400 a 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e incluso mayores, como las que se registran en cultivos a la intemperie, con intensidades que superan los 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y en menos de 14 días han obtenido buenos rendimientos en la acumulación de pigmentos, estas condiciones indujeron una división celular mínima y en estos trabajos las temperaturas se mantuvieron entre 28 y 34 °C (Imamoglu *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014).

La temperatura utilizada en este trabajo (30 °C), causó un estrés moderado que no indujo la síntesis de astaxantina en *Haematococcus*, ya que se observó que las células se encontraban aún en estado flagelado y palmeloide y muy pocas aplanosporas. Para acelerar el proceso de inducción, a partir del día 14 y durante siete días, se aumentó la temperatura a 39 °C, no obstante, a pesar de que fue evidente un gran número de células aplanosporas, en los días consecutivos se observó lisis celular y un decremento en la biomasa, por lo que se decidió reducir la temperatura a 30 °C, con lo que los cultivos empezaron a recuperarse lentamente. Schrader *et al.* (2004) mencionan que las altas temperaturas (>36°C) ocasionan daño celular y desintegración de membranas tilacoides en los cloroplastos.

En otros estudios con *Haematococcus*, se han obtenido buenos resultados en la producción de pigmentos utilizando temperaturas similares (entre 28-33 °C), en combinación con altas intensidades de luz y limitación de nitrógeno, principalmente (Boussiba y Vonshak, 1991; Fan *et al.*, 1994; Tjahjono *et al.*, 1994; Giannelli *et al.*, 2014).

Hong *et al.* (2015) compararon dos cultivos de *H. pluvialis*, uno fototrófico y otro mixotrófico, a una temperatura de 36 °C; en el primer caso la producción de astaxantina fue menor, mientras que, en el segundo cultivo, en el que se agregó hierro, se observó un incremento en la producción de astaxantina de hasta 133 %. Estos autores aluden que en el cultivo fototrófico se generaron especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como los agentes oxidantes: radical anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mientras que en el cultivo mixotrófico, la inclusión de hierro promueve la proliferación

de agentes súper oxidantes como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Kobayashi *et al.* (1993) indica que el fierro es un buen promotor de la generación de ROS y a su vez promueve la generación de pigmentos, de acuerdo con Tiahjono *et al.* (1994), en los cultivos de *H. pluvialis*, mantenidos a una temperatura de 30 °C por 10 días, se obtuvieron mayores concentraciones de astaxantina (600 pg cél^{-1}) cuando agregaron acetato de sodio (45 mM), fierro y peróxido de hidrógeno ($0.1 \text{ }\mu\text{M}$).

Los principales carotenoides intermediarios en la síntesis de la astaxantina, siguen la ruta: licopeno \rightarrow β -caroteno \rightarrow cantaxantina \rightarrow astaxantina, con diferentes concentraciones, dependiendo las condiciones de inducción a la carotenogénesis (Paniagua-Michel *et al.*, 2012). Los principales carotenoides involucrados en la ruta biológica de la síntesis de astaxantina fueron identificados y estuvieron presentes en diferentes concentraciones: licopeno ($4.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), β -caroteno ($0.28 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), cantaxantina ($0.22 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y astaxantina ($1.9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), el carotenoide astaxantina fue sintetizada en mayor proporción que la cantaxantina y el β -caroteno. Orosa *et al.* (2001; 2005), en un estudio con *H. pluvialis*, encontraron que las concentraciones de éstos y otros carotenoides, también fueron más bajas que la astaxantina, la cual representó el 80 % de los pigmentos. Los valores de astaxantina en el presente estudio representaron un porcentaje reducido ($<1\%$), en comparación con los reportados por otros autores (entre el 2.5 y 4 %, con base en el peso seco) (Wan *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016), quiénes utilizaron la interacción de diferentes factores de estrés para la inducción a la carotenogénesis.

En este estudio se observó que a medida que la concentración de clorofila *a* decrecía, se incrementaba la concentración de los carotenoides; esta misma tendencia se ha observado en diferentes trabajos realizados en *Haematococcus* (Boussiba *et al.* 1999; He *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2012). Conforme pasa el tiempo de inducción, el estrés se vuelve más intenso y empieza la formación y acumulación de astaxantina en cuerpos lipídicos en el citoplasma de las microalgas, que sirven como “paraguas” para proteger los cloroplastos del exceso de energía de la luz, ya que en estos organelos celulares se encuentran los sistemas fotosintéticos y el material genético de la célula, además del núcleo (Hagen *et al.*, 1994; Holtin *et al.*, 2009). Fan *et al.* (1998) cuestionan el papel fotoprotector de la astaxantina y proponen que las reacciones intermedias en la vía de la síntesis de este pigmento consumen electrones reactivos reduciendo el riesgo oxidante y que la astaxantina es un producto final de este proceso en lugar de agente protector.

Los resultados de la presente investigación, destacan que la producción de biomasa en los FBP indica que estos dispositivos pueden ser adecuados para la producción masiva de microalgas y sus compuestos de alto valor, sin embargo, los retos que el cultivo de *Haematococcus* implica son de mayor complejidad, por lo que es necesario continuar investigando las condiciones de cultivo que promuevan las mayores

producciones de biomasa, como la evaluación del incremento gradual de la intensidad de luz. De la misma forma, es necesario continuar con la búsqueda de las condiciones de estrés que promuevan la mayor síntesis de astaxantina en la cepa estudiada en este trabajo, lo que ayudaría en un futuro el poder sentar las bases para la producción a nivel masivo y comercial.

Capítulo 5. Conclusiones

1. Las intensidades de luz de 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ favorecieron la mayor producción de biomasa de *Haematococcus* sp., con densidades de 0.9×10^6 cél·mL⁻¹ y 394 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de PST.
2. En la inducción a la carotenogénesis se obtuvieron biomásas de PST (1,374 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y PSO (1,218 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) mayores que en la producción de biomasa, con bajas intensidades de luz.
3. La interacción de los diferentes factores de estrés como temperatura (30-39°C), salinidad (0.034 M) y la exposición a intensidades de luz de 91, 116 y 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, favorecieron la acumulación moderada de pigmentos carotenoides en *Haematococcus* sp.
4. La mayor producción de pigmentos carotenoides se obtuvo con la intensidad de luz de 282 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, cuando la temperatura se incrementó a 39 °C.
5. Los mayores contenidos de astaxantina (1.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y licopeno (4.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) se obtuvieron en los días 17 y 19.

Literatura citada

- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A. y Boussiba, S. 2007. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol*, 98, 300-305.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S. y Aswathanarayana, S. G. 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar. Drugs*, 12: 128-152.
- Armstrong, G. A. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Ann. Rev. Microbiol.* 51: 629-659.
- Barclay, W. y Apt, K. 2013. Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. En: Richmond, A., Hu Q. (Eds.), *Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. (2^{da} Ed.). Blackwell Science Ltd. UK. pp 69-79.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Tocher, D.R. y Sargent, J.R., 2000. Depletion of a-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 130: 1800 -1808.
- Ben-Amotz, A. y Avron, M. 1981. Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. *Trends in biochemical sciences*, 6: 297-299.
- Ben-Amotz, A., Kartz, A. y Avron, M. 1983. Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of b-carotene globules from *Dunaliella bardawil*. *Journal of Phycology*, 18: 529–537.
- Bishop, W.M. y Zubeck, H. M. 2012. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *J Nutr Food Sci*, 2(5):1-6.
- Borowitzka, M. A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7: 3-15.
- Borowitzka, M. A. 2013. High-value products from microalgae - their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 25:743-756.
- Borowitzka, M. A., Huisman, J. M. y Osborn, A. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology* 3: 295-304.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol Plant*, 108:111–117.
- Boussiba, S. y Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.*, 32(7): 1077-1082.
- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J. P., Zarka, A. y Chen, F. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* 21, 601-604.
- Britton, G. 1993. Biosynthesis of carotenoids. En: Young, A., Britton, G. (Eds.), *Carotenoids in Photosynthesis*. Chapman & Hall, London, UK. pp. 96-126.

- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R. y Solovchenko, A. 2014. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). *Mar. Drugs*, 12, 4504-4520.
- Chew, B.P., Park, J. S. y Wong, T. S. 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary b-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res.* 19: 1849-1854.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
- Choi, Y. E., Yun, Y. S., Park, J. M., y Yang, J. W. 2011. Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluvialis* cultivation. *Bioresour. Technol.* 102, 11249-11253.
- Choi, Y. Y., Hong, M. E. y Sim, S. J. 2015. Enhanced astaxanthin extraction efficiency from *Haematococcus pluvialis* via the cyst germination in outdoor culture systems. *Process Biochemistry*, 50: 2275-2280.
- Choubert, G. y Heinrich, O. 1993. Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*, 112: 217-226.
- Cifuentes, A. S., González, A. M., Vargas, S., Hoeneisen, M. y González, N. 2003. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory Conditions. *Biol. Res.*, 36: 343-357.
- Cifuentes, A. S., González, M.A., Inostroza, I. y Aguilera, A. 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *J. Phycol.*, 37: 334-344.
- Comhaire, F. H., El Garem, Y., Mahmoud, A., Eertmans, F. y Schoonjans, F. 2005. Combined conventional/ antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind randomized trial. *Asian J. Androl.* 7: 257-262.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B. A., Fábregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology Letters*, 18(2): 213-218.
- Dalay, M. C., Imamoglu, E. y Demirel, Z. 2007. Agricultural Fertilizers as Economical Alternative for Cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 17(3), 393-397.
- Damiani, M.C., Leonardi, P.I., Pieroni, O.I. y Caceres, E.J. 2006. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behavior during cyst germination. *Phycologia* 45: 616-623.
- Del Rio, E., Ación, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E. y Guerrero, M. G. 2007. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 397-402.
- Dubinsky, Z. y Stambler, N. 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences and applications. *Aquat. Microb. Ecol.*, 56: 163-176.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R. y Karube, I. 1995, Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Mar. Biotechnol.*, 2: 61-65.

- Dufossé, L., Galaupa, P., Yaronb, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C. y Ravishankar, G. A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 389–406.
- Egeland, E. S. 2016. Carotenoids. En: Borowitzka, M. A., Beardall, J. y Raven, J. A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing Switzerland. pp. 507-564.
- Elliott, A. 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Arch. Protistenk.* 82: 250- 271.
- Escuredo-Vielba, R. 2014. Evaluación de la biomasa producida por *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 52 p.
- Fan, L., Vonshak, A. y Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 30: 829-833.
- Fan, L., Vonshak, A., Zarka, A. y Boussiba, S. 1998. Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage?. *Z. Naturforsch. C*, 53: 93-100.
- Fassett, R. G. y Coombes, J. S. 2011. Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs*, 9: 447-465.
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H. y Beal, M. F. 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 69: 2064-2074.
- García-Malea, M. C., Ación, F. G., Del Río, E., Fernández, J. M., Cerón, M. C., Guerrero, M. G., Molina-Grima, E. 2009. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 651-657.
- García-Malea, M. C., Del Río-Sánchez, E., Casas-López, J. L., Ación-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Rivas, J., Guerrero, M.G. y Molina-Grima, E. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors, *Journal of Biotechnology* 123: 329–342.
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T. y Yamaji, H. 2014. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 20 (20): 1-6.
- Grobbelaar, J. U. 2004. Algal nutrition: Mineral nutrition. En: Richmond, A. (Ed.). *Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. pp 97-115.
- Grobbelaar, J. U. 2013. Inorganic algal nutrition. En: Richmond, A. y Hu, Q. (Eds.). *Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Blackwell Science Ltd. pp 123-133.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W.L. y Chanley, M.H. (Eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.
- Hagen, C., Braune, W. y Bjorn, L.O. 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a sunshade. *J. Phycol.*, 30: 241-248.

- Hagen, C., Siegmund, S. y Braune, W. 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37 (2): 217-226.
- Han, D., Li, Y. y Hu, Q. 2013. Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. En: Richmond, A. y Hu, Q. (Eds.), *Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Blackwell Science Ltd. pp 388-405.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. y Young, A. J. 1995. Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.*, 7: 399-406.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. y Young, A. J. 1996. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(2): 113-118.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. y Young, A. J. 1996. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 113-118.
- He, P., Duncan, J. y Barber, J. 2007. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of Cultivation Parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(4): 447-451.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 182 pp.
- Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G. y Albert, K. 2009. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395: 1613-1622.
- Hong, M. E., Choi, S. P., Park, Y. I., Kim, Y. K., Chang, W. S., Kim, B. W. y Sim, S. J. 2012. Astaxanthin production by a highly photosensitive *Haematococcus* mutant. *Process Biochemistry* 47: 1972-1979.
- Hong, M-E., Choi, Y. Y. y Sim, S J. 2016. Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions. *Journal of Biotechnology*, 218: 25-33.
- Hong, M-E., Hwang, S. K., Chang, W. S., Kim, B. W., Lee J. y Sim S. J. 2015. Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven Haber-Weiss reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1: 1 -13.
- Hooker, S. y Heukelem, L. 2011. A symbology and vocabulary for an HPLC lexicon. En: Roy, Z., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S. y Johnsen, G. (Eds.). *Phytoplankton Pigments. Characterization, Chemotaxonomy and applications in Oceanography*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp.243-256.
- Hu, Q. 2013. Environmental Effects on Cell Composition. En: Richmond, A. y Hu, Q. (Eds.), *Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Blackwell Science Ltd. pp 114-122.
- Hu, Q., Guterman, H. y Richmond, A. 1996. A flat inclined modular photobioreactor (FIMP) for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* 51: 51-60.

- Imamoglu, E., Dalay, M. C. y Sukan, F. V. 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New biotechnology*, 26(3):199-204.
- Issarapayup, K., Powtongsook, S. y Pavasant, P. 2009. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biotechnol.* 142:227-232.
- Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki, W., Kamiyama, M., Itakura, H., Yamamoto, S., Kondo, K. 2000. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J. Atheroscler. Thromb.* 7:216-222.
- Jyonouchi, H., Sun, S. y Gross, M. 1994. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. *Nutrition and Cancer*, 23:171-183.
- Kamath, B. S., Srikanta, B. M., Dharmesh, S. M., Sarada, R. y Ravishankar, G. A. 2008. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur. J. Pharmacol.* 590: 387-395.
- Kang, C. D. Han, S. J., Choi, S. P. y Sim, S. J. 2010. Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 33:133-139.
- Kaplan D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. y Aaronson, A. 1986. En: Richmond, A. (Ed.), *Algal nutrition*. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 147-198.
- Kobayashi, M. 2000. *In vivo* antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54: 550-555.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. y Nagai, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 867-873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y. y Tsuji, Y. 1997b. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*, 19(6): 507-509.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. y Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (1): 94-97.
- Koller, M., Muhr, A. y Brauneegg, G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* 6, 52-63.
- Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y. y Tanaka, T. 2002. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.* 70: 2509-2520.
- Lehman, R. L. 2010. Algas de los arrecifes. En: Tunnell, J. W., Chávez, E. A., Withers, K. (Eds.), *Arrecifes coralinos del Sur del Golfo de México*. Instituto Politécnico Nacional, México. pp. 129-140.

- Li, J., Zhu, D. L., Niu, J., Shen, S. D. y Wang, G. 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv.* 29, 568–574.
- Li, M., Wu, W., Zhou, P., Xie, F., Zhou, Q. y Mai, K. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 434: 227-232.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F. y Hu, Q. 2008. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Plant Physiol.*, 165: 1783-1797.
- Liu, X. y Osawa, T. 2007. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-trans isomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357: 187-193.
- Lorenz, R. T. y Cysewski, G. R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18: 160-167.
- Mata, T. M., Martins, A. A. y Caetano N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217–232.
- McHugh, D. J. 2002. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación Roma, 2002. Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia.
- Montes-González, O. G. 2014. Efecto de la intensidad de la luz y la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp. cultivada en biorreactores planos. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 58 p.
- Moronta R., Mora R. y Morales E. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas *Rev. Fac. Agron.*, 23 (1): 27-41.
- Muller-Feuga, A. 2004. Microalgae for Aquaculture. En: Richmond, A. (Ed.). *Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Scince Ltd. pp 352-364.
- Murata, N. (1989) Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21: 61-75.
- Nagaraja, S., Arulmurugan, P., Rajaram, M. G., Sundararaj, R. y Rengasamy, R. 2012. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Phykos* 42 (1): 59– 71.
- Nava-Gómez, B. 2017. Optimización del crecimiento y producción del carotenoide astaxantina por la microalga *Haematococcus* sp. en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Departamento de Acuicultura. 62 p.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2000. *Lehninger: principles of biochemistry*. (3ra Ed.). Worth publishers, Ney York.
- Nishida, I. y Murata, N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Phys.* 47: 541–568.

- Nishikawa, Y., Minenaka, Y., Ichimura, M., Tatsumi, K., Nadamoto, T., y Urabe, K. 2005. Effects of astaxanthin and vitamin C on the prevention of gastric ulcerations in stressed rats. *J. Nutr. Sci. Vit.* 51:135-141.
- Oren, A. 2005. Hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 1/2: 1-4.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. y Abalde, J. 2001. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology Letters*, 23: 373-378.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. y Abalde, J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96, 373-378.
- Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M. C. y Picci, N. 2009. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 283: 108-117.
- Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J. y Ruiz, M. A. 2012. Pathways of Carotenoid Biosynthesis in Bacteria and Microalgae. En: Barredo, J. L. (Ed.). *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae*. Humana Press, New York, USA. pp 1-12.
- Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E. y Sim, S. J. 2014. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(10): 2039-2047.
- Pérez-López, P., González-García, S., Jeffryes, C., Agathos, S. N., McHugh, E., Walsh, D., Murray, P., Siobhan Moane, S., Feijoo, G. y Moreira, M-T. 2014. Life-cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *J. Clea. Prod.* 64:332-344.
- Piña, P., Medina, A. M., Nieves M., Leal, S., López-Elías J. A. y Guerrero, M. A. 2007. Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.*, 28(3):225-236.
- Posten, C. 2012. *Discovering Microalgae as Source for Sustainable Biomass*. Ed: Posten C., Walter C. (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston. pp. 1-7.
- Ramírez, M. L. G., Zepka, L. Q. y Jacob-Lopez, E. 2013. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Ciencia y tecnología*, 6(2): 9-19.
- Renstrom, B., Borch, G., Skulberg, O. M. y Liaaen-Jensen, S. 1981. Optical purity of (3S, 3S') -astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochem.* 20: 2561-2564
- Román, R. B., Álvarez-Pez, J.M., Acién-Fernández, F.G. y Molina-Grima, E. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93: 73-85.
- Sahoo, D. y Baweja, P. 2016. General Characteristics of Algae. En: Sahoo, D., Seckbach, J. (Eds.). *The algae world*. Springer Dordrecht Heidelberg New York, London. pp 3-30.
- Sandnes, J. M., Källqvist, T., Wenner D. y Gislerød H. R. 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 17: 515–525.

- Sarada, R., Tripathi, U. y Ravishankar, G. A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry* 37: 623-627.
- Schmidt, J. J., Gagnon, G. A. y Jamieson, R. C. 2016. Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. *Ecological Engineering*, 95: 588–593.
- Schrader, S. M., Wise, R. R., Wacholtz, W.F., Ort, D. R. y Sharkey, T. D. 2004. Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in pima cotton. *Plant Cell Environ* 27(6):725-735.
- Stengel, D. B. y Connan, S. 2015. Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications. Ed: Stengel, D. B., Connan, S. (Eds.). *Natural products from marine algae: Methods and protocols*. pp. 1-38.
- Stolz, P. y Obermayer, B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries*, 120 (3): 99–106.
- Storebakken, T. 1988. Krill as a potential feed source for salmonids. *Aquaculture*, 70:193-197.
- Subba-Rao, D. V. 2009. Cultivation, Growth Media, Division rates and applications of *Dunaliella* species En: Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W., Subba-Rao. (Eds.). *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA. pp 45-90.
- Thompson, P.A., Guo, M. y Harrison, P.J. 1992. Effects of temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 28: 481-488.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. y Nagai, S. 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* 16: 133-138.
- Tocquin, P., Fratamico, A. y Franck, F. 2012. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol*, 24: 365-373.
- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. En: Richmond, A. (Ed.). *Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. pp 3-19.
- Torrissen, O. J., Hardy, W. H. y Shearer, K. D. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *Review of Aquatic Sciences*, 1:209-227.
- Torzillo, G. y Vonshak, A. 2013. Environmental stress physiology with reference to mass cultures. En: Richmond, A. y Hu, Q. (Eds.). *Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Blackwell Science Ltd. pp 90-113.
- Torzillo, G., Goksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J. y Masojidek, J. 2003. Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. *J. Appl. Phycol.* 15, 127-136.
- Tran, H-L., Lee, K-H. y Hong, C-H. 2015. Effects of LED irradiation on the growth and astaxanthin production of *Haematococcus lacustris*. *Biosci. Biotech. Res.*, 12(2): 1167-1173.
- Tredici, M. R. y Zittelli, G. Ch. 1998. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 57(2): 187-197.

- Tredici, M.R. 2004. Mass production of microalgae: photobioreactors. En: Richmond, A. (Ed.), *Microalgal Cultures: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. pp 178-214.
- Triki, A., Maillard, P. y Gudin, C. 1997. Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia* 36: 190-194.
- Tripathi, U., Sarada, R. y Ravishankar, G. A. 2002. Effect of culture conditions on growth of green alga-*Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(3): 323-329.
- Vega-Estrada, J. y Montes-Horcasitas, M. C., Domínguez-Bocanegra, A. R., Cañizares-Villanueva, R. O. 2005. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68: 31-35.
- Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J. y Wang, J. 2014. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 167: 276-283.
- Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M. R., Lu, C. y Hu, Q. 2013. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *Journal of applied phycology*, 25(1): 253-260.
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A. y Kawano, S. 2013. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*, 8(1): 1-9.
- Wijffels, R. H., Barbosa, M. y Janssen, M. 2009. Cultivation of *Dunaliella* for high value compounds. En: Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W., Subba-Rao. (Eds.). *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA. pp 91-110.
- Xi, T. Kim D. G., Roh, S. W., Choi, J.S. y Choi, Y. E. 2016. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100 (14): 6231-6238.
- Xin, L., Hu, H. y Zhang, Y. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperatures. *Bioresour. Technol.*, 102: 3098-3102.
- Yan, S. G., Zhu, L. P. Su, H. N., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. Ch. y Zhang Y. Z. 2011. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *J Appl Phycol*, 23:1-6.
- Zachleder, V., Bišová, K. y Vítová, M. 2016. The Cell Cycle of Microalgae. En: Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing Switzerland. pp. 3-46.
- Zittelli, G. C., Biondi, N., Liliana Rodolfi, L. y Tredici, M. R. 2013. Mass production of microalgae: photobioreactors. En: Richmond, A. y Hu, Q. (Eds.), *Microalgal Cultures: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. pp 225-266.

Anexos

Tabla 4. Biomasa promedio (peso seco total, PST y peso seco orgánico, PSO), en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de *Haematococcus* sp. cultivada en biorreactores planos (BRP) con tres intensidades de luz (30, 40 y 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), en diferentes días de cultivo. Desviación estándar entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. p: nivel de significancia.

	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	p
Día 2				
PST	79.8 (13) a	93.4 (12) a	95.9 (7) a	0.2261
PSO	48.8 (17) a	61.1 (7) a	62.2 (8) a	0.3515
Día 4				
PST	93.9 (15) a	112 (17) a	107.8 (10) a	0.3412
PSO	72.1 (6) a	87.4 (15) a	83.3 (12) a	0.3069
Día 6				
PST	102.9 (7) b	135.6 (8) a	143.7 (4) a	0.0006
PSO	86.6 (5) b	109.1 (11) a b	111.2 (11) a	0.0316
Día 8				
PST	134.4 (12) b	171.4 (33) a b	211.2 (25) a	0.0249
PSO	115.9 (11) a	143.7 (34) a	161.1 (32) a	0.2120
Día 10				
PST	157.1 (9) a	211.2 (51) a	228 (53) a	0.1827
PSO	123.3 (5) a	169.8 (46) a	174.8 (43) a	0.2376
Día 12				
PST	48.6 (20) a	167.3 (66) a	215.9 (65) a	0.8325
PSO	46.1 (10) a	170.6 (52) a	216.7 (55) a	0.7754
Día 16				
PST	247.0 (37) a	279.0 (82) a	266.3 (36) a	0.7864
PSO	180.9 (28) a	220.1 (57) a	208.9 (33) a	0.5249
Día 18				
PST	228.4 (47) a	241.1 (60) a	210.9 (30) a	0.7479
PSO	167.4 (30) a	188.7 (41) a	175.9 (32) a	0.7611
Día 20				
PST	229.3 (63) a	211.2 (70) a	230 (39) a	0.9072
PSO	170.1 (38) a	173.2 (48) a	198.3 (37) a	0.6739
Día 22				
PST	280.1 (63) a	277.9 (46) a	270.9 (70) a	0.9813
PSO	206.1 (44) a	230.6 (43) a	232 (55) a	0.7654
Día 24				
PST	21.1 (53) a	182.3 (58) a	203.4 (38) a	0.9074
PSO	24.8 (35) a	170.7 (44) a	195.4 (36) a	0.8697
Día 36				
PST	248.9 (49) b	310.6 (7) a	394 (22) a	0.0039
PSO	199.7 (37) b	261.9 (16) a b	319.8 (36) a	0.0096