

# OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE GENERACIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis*, MEDIANTE ESTÍMULO DE ESTRÉS UTILIZANDO RECURSOS NATURALES Y FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA CON FINES FARMACOLÓGICOS

OPTIMIZATION OF THE ASTAXANTHIN GENERATION PROCESS IN *Haematococcus pluvialis*, THROUGH STRESS STIMULATION USING NATURAL RESOURCES AND PHYSICAL-CHEMICAL FACTORS FOR THE QUANTIFICATION OF BIOMASS FOR PHARMACOLOGICAL PURPOSES

Oscar C. Medina Carpio<sup>1</sup>, Gretta S. Suarez Enríquez<sup>1</sup>, José Villanueva Salas<sup>1</sup>, Pamela L. Manrique Pino<sup>1</sup>, María R. Rivas Herrera<sup>2</sup>, Jeaneth M. Medina Pérez<sup>1</sup>

(1) Universidad Católica de Santa María, Arequipa - Perú.

(2) Bioandex Tech, Arequipa - Perú.

**RESUMEN:** *Haematococcus pluvialis* posee la capacidad de generar metabolitos de alto valor e interés comercial para diversas industrias. Estas son estudiadas por su capacidad de acumular altos niveles de astaxantina comparado con otras fuentes naturales. La astaxantina es un pigmento carotenoides de gran interés debido a su alta capacidad antioxidante que permite la eliminación de radicales libres. Se tuvo como objetivo optimizar el proceso de producción de *Haematococcus pluvialis* para la obtención de astaxantina. Se determinaron las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, las cuales alcanzaron una densidad celular máxima de  $14.5 \times 10^7$  cel/mL en medio de cultivo BG-11 con pH de 7.5, fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad y aireación continua en cultivos de 1000 mL. Además, se consideró la inducción del estrés con acetato de sodio 2.5 g/L e iluminación continua las 24 h en cultivos de bajos volúmenes y exposición a luz solar en cultivos de mayor volumen. Se demostró que las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* fueron las de mayor volumen expuestas a luz natural propia de la ciudad de Arequipa-Perú, bajo las cuales se logró una productividad celular  $14.5 \times 10^7$  cel/mL promedio. La biomasa fresca obtenida de *Haematococcus* mostró 54 % de humedad y presentó una concentración de 42.93 g de astaxantina por kilogramo de biomasa seca, expresada en base de ésteres de astaxantina (13-cis-astaxantina, all-transastaxantina, 9-cis-astaxantina).

**Palabras Clave:** *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, biomasa

**ABSTRACT:** *Haematococcus pluvialis* has the ability to generate metabolites of high value and commercial interest for various industries. These are studied for their ability to accumulate high levels of astaxanthin compared to other natural sources. Astaxanthin is a carotenoid pigment of great interest due to its high antioxidant capacity that allows the elimination of free radicals. The objective was to optimize the production process of *Haematococcus pluvialis* to obtain astaxanthin. The appropriate culture conditions for the biomass production of *Haematococcus pluvialis* were determined, which reached a maximum cell density of  $14.5 \times 10^7$  cells/mL in BG-11 culture medium with pH 7.5, photoperiod 12 h light:12 h darkness and continuous aeration in 1000 mL cultures. In addition, stress induction with 2.5 g/L sodium acetate and 24-h continuous lighting in low-volume cultures and exposure to sunlight in larger-volume cultures was considered. It was demonstrated that the most suitable culture conditions for the production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* were those with the largest volume exposed to natural light typical of the city of Arequipa-Peru, under which a cell productivity of  $14.5 \times 10^7$  cel was achieved. /mL average. The fresh biomass obtained from *Haematococcus* showed 54 % humidity and presented a concentration of 42.93 g of astaxanthin per kilogram of dry biomass, expressed on the basis of astaxanthin esters (13-cis-astaxanthin, all-transastaxanthin, 9-cis-astaxanthin).

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, biomass.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides contienen funciones biológicas importantes, como los precursores de vitaminas, estimulantes de la respuesta inmune, prevención del cáncer y poseen capacidad antioxidante (1). Los carotenoides tienen pigmentos naturales liposolubles, según la naturaleza química de ellos se dividen en dos grupos principales, carotenos y xantófilas.

La astaxantina se encuentra dentro de uno de los grupos principales de los carotenoides como lo es la xantófila, que ha tomado gran importancia en los últimos años gracias a su excelente aplicabilidad en las diferentes industrias de farmacia, cosmética y alimentos, ya que aporta grandes beneficios a la salud tanto humana como animal por sus excelentes propiedades, dentro de las que se destacan su efecto antiinflamatorio, anticancerígeno, preventivo contra los efectos de los rayos UV y su gran poder antioxidante. Además, en la industria de alimentos este antioxidante es responsable de la generación de la pigmentación roja en la carne de peces como salmón, trucha también de algunos crustáceos como el camarón (2).

**Correspondencia:**

Jeaneth M. Medina Pérez

E-mail: jmedinap@ucsm.edu.pe

El mayor problema en la comercialización de la astaxantina de origen natural se da en la etapa de la producción por su elevado costo de sín-tesis lo cual genera baja rentabilidad en comparación con la síntesis de astaxantina de forma sintética (4); Una manera de obtener natural-mente este antioxidante tan importante se da gracias a la microalga verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis* que contiene una de las fuentes naturales con mayor producción de astaxantina, esta es capaz de acumular hasta un 3 % de astaxantina en peso seco (5). Las extre-mas condiciones de crecimiento que se requieren en la etapa de cultivo de *Haematococcus pluvialis* genera dificultad en su producción a nivel industrial, ya que su crecimiento es lento y causa una baja concentra-ción celular, alta susceptibilidad a daños hidrodinámicos y un ciclo de vida complejo con distintas formas celulares que varían de acuerdo con los factores del cultivo (6). Por tal motivo, el objetivo principal de esta investigación fue optimizar los procesos involucrados en el incremento de la concentración de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* (ex-presada en valor de ésteres de astaxantina) utilizando un estímulo de estrés con recursos naturales propios de la región Arequipa en Perú y factores físico-químicos para determinar el valor de su biomasa en el mercado. *Haematococcus pluvialis*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del preinóculo e inóculo

Se ha utilizó la cepa de microalga *Haematococcus pluvialis* suministrada por el laboratorio de Biotecnología Microalgal UNSA (colección de cultivos de algas, Universidad Nacional de San Agustín). La elaboración del preinóculo se realizó a partir de la cepa de *Haematococcus pluvialis* en fase vegetativa, la cual se transfirió a un erlenmeyer de 250 mL con adición de 200 mL de medio de cultivo BG-11 estéril a pH 7, se mantuvo en fotoperiodo de 12 horas luz - 12 horas de oscuridad, alimentación de aire durante todo el día a 25 °C por 21 días.

Se realizó el monitoreo del preinóculo mediante microscopía óptica para evaluar su morfología, color y viabilidad celular de células de tipo palmela, móvil y aplanospora; se hizo conteo celular mediante cámara de Neubauer obteniendo una concentración celular de  $16 \times 10^4$  cel/mL; a partir de esta concentración se procedió a determinar el volumen de inóculo a usar por biorreactor, para obtener una concentración de  $1 \times 10^4$  cel/mL en un volumen de 350 mL de medio.

El evaluaron 2 medios de cultivo de *Haematococcus pluvialis* aún en fase vegetativa en biorreactores de 10, 250, 500 y 1000 mL, donde por ejemplo para el volumen de 500 mL se colocaron 350 mL de cada uno de los medios a evaluar (Medio Basal Bold BBM y BG-11, usados por Boussiba y Vonshak), y 150 mL de inóculo de concentración celular  $1 \times 10^4$  cel/mL, este ensayo se hizo por triplicado y de manera aséptica, evaluándose la mayor concentración celular.

Todos los ensayos se realizaron bajo las condiciones de pH 7, fotoperiodo de 12 h luz – 12 h oscuridad, lámparas de luz fluorescentes blanca de intensidad 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  (Tlt20W/54RS, marca Philips) controladas por un programador digital automatizado marca Stronger, temperatura de 25+/-1 °C y alimentación de aire durante todo el día.

### Cultivo en medio líquido y evaluación de estímulos de estrés

Una vez obtenido el medio de cultivo óptimo se inoculó 150 mL de *Haematococcus pluvialis* en 350 mL del medio de cultivo BG11 y se mantuvo a las mismas condiciones del inóculo (temperatura de 25+/- 1 °C, ciclo de 12 h-12 h luz/ oscuridad, intensidad de luz de 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  y aireación constante).

Posteriormente se hizo un primer escalamiento a 1 L, el nuevo bio-rreactor consistió en un 30 % de inóculo y 70 % de medio de cultivo. Así mismo, se trabajó con una matriz experimental preliminar de: luz (na-tural/artificial), aireación (con/sin), fotoperiodo (12 h-12 h/18 h-6 h), pH (5.5/7.5), y C/N (0.01 g/0.1 g). Este ensayo se hizo en dos bloques en los cuales se realizó una mezcla al azar de cada parámetro en 12 frascos por bloque, dándonos un total de 24 frascos con una capacidad de 1 L; se evaluó diariamente la densidad y la morfología celular de cada frasco por un periodo de 8 días.

Adicionalmente, y para determinar los factores de estrés óptimos para la obtención de astaxantina, se trabajó con una matriz experimen-tal con los siguientes parámetros: luz (con/sin), aireación (con/sin), pH (5.5/7.5), y acetato de sodio (0.5 g/2.5 g), este ensayo se llevó a cabo también en 2 bloques en los cuales se realizó una mezcla al azar de los parámetros escogidos, los frascos a trabajar por bloque fueron 16 de capacidad de 500 mL. Se evaluó la densidad celular de tres tipos de células; móvil y palmela (fase vegetativa) y aplanospora (célula en-quistada-fase roja) durante un periodo de 12 días en las siguientes horas 1, 36, 72, 108, 144, 188, 216, 252 y 288 h.

### Escalamiento de la producción de astaxantina

Una vez definidos los parámetros óptimos, se procedió al cultivo de *Haematococcus pluvialis* en fase vegetativa y en fase roja en fotobio-rreactores raceways con capacidad de 300 L.

Para la extracción de astaxantina se utilizó la biomasa fresca enquis-tada (fase roja), se dejó precipitar por un tiempo de 30 minutos para que así se separe de la fase líquida de la biomasa fresca, seguida-mente se retiró y separó todo el agua y el precipitado ya enrojecido obtenido se pasó a una malla de porosidad de 0,2  $\mu\text{m}$  para culminar de retirar el agua remanente, seguidamente se prensó la biomasa fresca enquistada y se dejó secando bajo el sol por un tiempo de 2 horas. Fi-nalmente se culminó con el proceso de triple molido para hacer una buena ruptura celular, y se pasó al decantador para hacer una extrac-ción sólido-líquido con aceite natural de sacha inchi y sonica-ción-centrifugación en acetonitrilo.

### Determinación de ésteres de astaxantina por HPLC

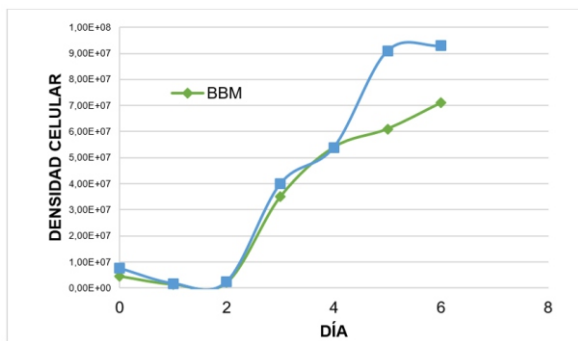
Una vez obtenidos los parámetros óptimos para la producción de ma-yor volumen de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, se procedió a la determinación de ésteres de astaxantina (Fatty acid esters of (3S, 3'S)-3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4,4'-dione) en biomasa de *Haemato-coccus pluvialis*, para ello se utilizó un HPLC Primaide Hitachi con de-ctor de arreglo de diodos, la separación se llevó a cabo en una co-lumna de fase reversa C-18 Thermo Scientific 250 x 4 mm. Se desarro-lló un método simple, económico en comparación a los publicados a la actualidad. Las condiciones de trabajo de HPLC se efectuaron con una fase móvil de acetonitrilo: agua acidulada:acetona (75:5:20), flujo de 2 mL/min, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura de horno de 15 oC y longitud de onda del detector de 475 nm. Para la curva de cali-bración se usaron concentraciones de

13, 24, 35, 46 y 57 mg/L de ésteres de astaxantina en acetonitrilo y se leyeron por triplicado, las muestras de biomasa extraídas fueron recolectadas y aforadas a 5 mL, siendo necesaria la realización de diluciones para poder ser introducida al HPLC.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Al evaluarse 2 medios de cultivo: BBM y BG-11, en distintos volúmenes (10, 250, 500 y 1000 mL), se observó que a una capacidad de 10 mL de cultivo de medio BBM la más alta densidad celular obtenida fue  $5 \times 10^7$  cel/mL, mientras que en 250 mL se obtuvo  $7 \times 10^7$  cel/mL, en 500 mL la densidad más alta fue con  $6 \times 10^7$  cel/mL y en 1000 mL fue de  $8,2 \times 10^7$  cel/mL.

Así mismo, las diferentes máximas densidades obtenidas al evaluar el medio de cultivo BG-11 en los mismos volúmenes, mostraron valores de  $6 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$  y  $9 \times 10^7$  cel/mL para los volúmenes de 10, 250, 500 y 1000 mL de medio BG-11 respectivamente.

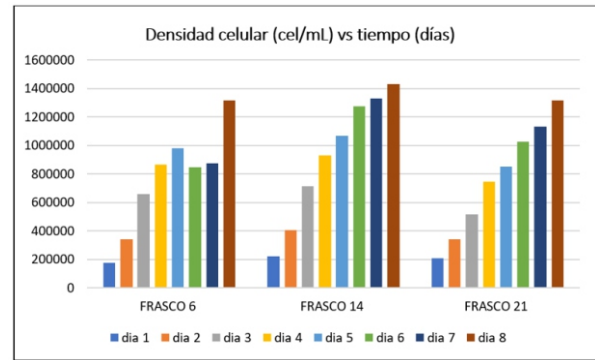


**Fig. 1 Densidad poblacional de la microalga Haematococcus pluvialis, en medio de cultivo BBM y BG-11 en un volumen de 1000 mL, se observa que para ambos medios de cultivo la fase exponencial inicia al 2 día y el medio BG-11 alcanzó a una densidad celular de  $9 \times 10^7$  cel./mL, mientras que el medio de cultivo BBM solo se alcanzó una densidad celular de  $7 \times 10^7$  cel./mL, al sexto día.**

En la Figura 1 se observa la comparación de las densidades celulares evaluadas en fase vegetativa obtenidas en 1000 mL de medios BBM y BG-11 y monitoreadas durante 6 días, lo que nos da un alcance del medio óptimo de cultivo de Haematococcus pluvialis bajo las condiciones nombradas en el apartado anterior.

Al someter los datos a un análisis estadístico con el método LSD Fisher para la densidad poblacional en cel/mL de la microalga Haematococcus pluvialis por cada día de crecimiento y diferentes medios de cultivo, para el volumen de 1000 mL, se produjo un valor p de 0.01, con lo que se infiere que las densidades celulares del día 0, 2, 3, 5 y 6 son significativamente diferentes entre tipos de medios y que el medio que alcanza mayor densidad celular es el BG-11.

La evaluación de diferentes medios de cultivo para poder optimizar el crecimiento de Haematococcus pluvialis ha sido un enfoque importante para la mayoría de los autores, los resultados obtenidos en esta investigación dan a conocer que el mejor medio de cultivo para producción de biomasa en fase vegetativa fue en el medio BG-11.



**Fig. 2 Comparación de las densidades celulares en fase ve-ge-tativa en tres frascos significativos de medio BG-11, el frasco 14 lo-gró mayor densidad celular, siendo los parámetros óptimos establecidos: luz natural, con aireación constante, fotoperiodo 12h-12h, pH 7.5, y relación C/N 0.1 g, durante 8 días.**

La evaluación de densidades celulares y parámetros para el cultivo en fase vegetativa en medio BG-11 en 3 frascos (mejores resultados), durante 8 días (datos promedio), mostraron (Figura 2) que todas las condiciones generaban aumento de densidad celular al octavo día, sin embargo, el frasco 14 presentó un crecimiento exponencial y la mayor densidad celular, con valores de  $1430000$  cel/mL al día 8, mientras que los demás frascos llegaron a una densidad celular entre  $1316666.7 - 1320000$  cel./mL.

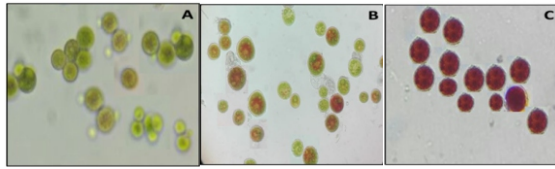
Diversos autores han realizado investigación con la única finalidad de poder obtener tasas mayores de crecimiento de Haematococcus pluvialis ensayando diversos métodos, como lo son evaluación de pH, temperatura, agitación del medio de cultivo, CO<sub>2</sub>, exposición de luz por un tiempo determinado, factores de estrés como adición de sales, aumento a la intensidad de luz (irradiación), entre otros más (20) (13).

Los mejores resultados que obtuvimos de crecimiento de esta microalga en fase vegetativa se produjeron con algunos cambios de condiciones de crecimiento Tabla 1, en los que se puede afirmar claramente la necesidad de un cultivo con aireación constante y pH de 7.5 como parámetros indispensables.

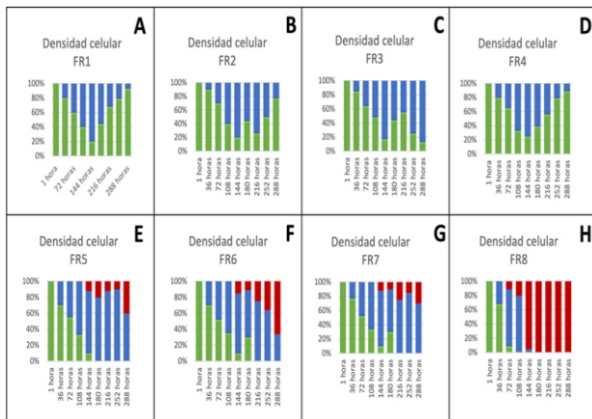
**Tabla 1. Condiciones de cultivo de Haematococcus pluvialis que obtuvieron mayor densidad celular**

Frasco/ condición	Luz	Aireación	Fotoperiodo	pH	C/N
FR 6	artificial	con	12h 12h	7.5	0.01
FR 14	natural	con	12h 12h	7.5	0.1
FR 21	artificial	con	18h 6h	7.5	0.01

Por otro lado, es importante resaltar el hecho de que, en las condiciones ambientales propias de la ciudad de Arequipa-Perú, no hay una diferencia significativa entre el uso de luz natural o luz artificial, la combinación de parámetros de luz natural, aireación constante, fotoperiodo 12h luz- 12h oscuridad, pH 7.5, C/N 0.1g/L dieron un resultado óptimo para la producción de biomasa, con una densidad celular de  $14.5 \times 10^7$  cel./mL.



**Fig. 3 Fases de Haematococcus pluvialis en una vista al microscopio óptico de 40X (A) Haematococcus pluvialis en fase vegetativa o verde, la célula es conocida por el nombre de célula móvil. (B) Pre-sencia de antaxantina que comienza desde el núcleo de la célula de Haematococcus pluvialis. (C) Enquistamiento de la célula, esta célula es denominada Aplanospora.**



**Fig.4 Gráficas del proceso de la densidad celular de la Fase verde a la Fase roja, durante un periodo de 12 días evaluadas en las siguientes horas 1, 36, 72, 108, 144, 188, 216, 252 y 288. El color verde indica la célula móvil, el color azul la célula palmela y color rojo célula aplanospora, se observa que el FR8 obtuvo un 100 % de células aplanospora a los 12 días, lográndose en cultivo con medio BG11 con luz, sin aireación, pH 5.5, y acetato de sodio 2.5 g.**

La concentración de nitrato y carbono juega un papel muy importante en la tasa de división celular y en la acumulación de carotenoides secundarios de Haematococcus pluvialis (35,36). Esto sugiere que la síntesis de astaxantina requiere nitrógeno y carbono, y muy probablemente refleja la necesidad de una síntesis continua de proteínas con el fin de apoyar la masiva acumulación del pigmento. Es por ello por lo que, dentro de nuestros parámetros elegimos la variación de C/N (0.01 g/0.1 g) y se verificó que al añadir 0.1 g/L adicional de C/N al medio de cultivo nos da un resultado satisfactorio en el aumento de densidad celular.

Para poder inferir sobre los resultados de las diversas condiciones de cultivo y en especial de los estímulos de estrés se reportaron densidades celulares de 3 tipos de células: móvil y palmela relacionadas a la Fase vegetativa o verde, la que responde al aumento de biomasa por tipo de medio y condiciones de cultivo; y las células aplanospora, relacionadas a la Fase roja o de enquistamiento que da indicios de concentración de astaxantina, en la Figura 3 se muestran las características morfológicas de éstos 3 tipos de células las cuales fueron evaluadas tras 12 días de cultivo.

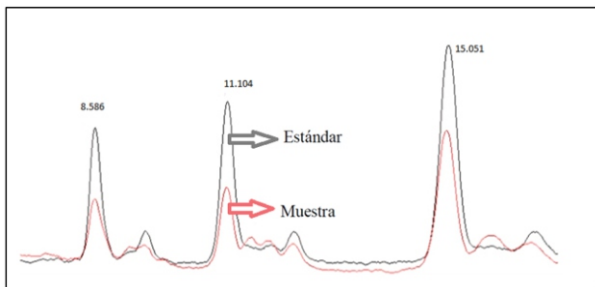
Para el estudio de los diferentes estímulos de estrés aplicados sobre Haematococcus pluvialis en medio BG-11, con el fin de obtener mayores concentraciones de astaxantina, reportamos densidades de los 3 tipos de células Figura 4, donde al probar estímulos de estrés como condiciones de cultivo con y sin luz, con y sin aireación, pH de 5.5 y 7.5, y concentraciones de acetato de sodio de 0.5 g y 2.5 g, se mostró que en los frascos FR1, FR2, FR3 y FR4 se desarrollaron mayor cantidad de células móviles y palmela, lo cual nos indica que los parámetros utilizados no aportaron en la producción de astaxantina ya que hay ausencia de las células aplanosporas, mientras que en los frascos FR5, FR6 y FR7 se desarrollaron los tres tipos de células, pero la célula objetivo para nosotros es la célula aplanospora la cual solo tuvo un desarrollo del 30 % al 60 % en su densidad celular. Sin embargo, el frasco FR8 evidenció el mejor resultado ya que llegó al 100 % de producción de células tipos aplanospora desde las 180 hasta las 288 horas, lo cual nos dice que este ensayo con los parámetros seleccionados tuvo una mayor concentración de producción de astaxantina, seleccionándose entonces éstas condiciones de estímulo de estrés para la cuantificación de astaxantina.

En cuanto a la acumulación de astaxantina, la falta de nitrógeno es una forma eficaz de mejorar la acumulación de astaxantina en Haematococcus pluvialis. Dentro de los parámetros prueba seleccionados para la producción de astaxantina se quitó nutrientes dentro de estos, el nitrógeno y se añadió una sal como el acetato de sodio 2.5 g/L cambio que dio resultados favorables sobre la concentración de astaxantina, reflejado en la concentración de células de tipo aplanospora, mismo resultado que se obtuvo al restringir la aireación por completo notándose también una mayor densidad celular de célula aplanospora y por ende mayor concentración de astaxantina.

Pero si se utiliza una aireación constante las células predominantes son la célula móvil y la célula palmela que son células que no acumulan mayor cantidad de astaxantina, eso nos quiere decir que solo se daba un ciclo de reproducción celular mas no de enquistamiento; de igual manera sucedía con el acetato de sodio y el pH, los cuales demostraron que a un pH de 5.5 y acetato de sodio de 2.5 g/L obteníamos mayor densidad celular de aplanosporas.

Estos valores óptimos fueron muy importantes para poder seguir con el proceso de escalamiento, pudiendo obtener 1 kilogramo de biomasa seca de astaxantina en un periodo de 7 a 12 días, lo cual nos demuestra la gran importancia de los ensayos previos para poder llegar a una producción óptima.

Los parámetros óptimos seleccionados para el escalamiento para la FASE VEGETATIVA fueron: Luz natural, aireación constante, fotoperiodo de 12h luz- 12h oscuridad, se reguló el pH a 7.5 y C/N 0.1 g/L; y para la FASE ROJA: Se restringió la entrada de nutrientes (BG-11), la luz usada fue natural, llevándose a cabo el escalamiento y prueba en el distrito de Jacobo Hunter de la ciudad de Arequipa-Perú, se quitó la aireación totalmente y se añadió acetato de sodio 2,5 g para 1 L. Como resultado del escalamiento pudimos obtener las condiciones óptimas para la producción de astaxantina y producción de biomasa fresca. En el proceso de extracción se llegó a obtener un 1 kg de biomasa en fase roja por fotobiorreactor en un periodo de 7 a 12 días.



**Fig. 5 Cromatograma de ésteres de astaxantina, 13-cis- as-taxanthin, all-transastaxanthin y 9-cis-astaxanthin, donde se observa en rojo la corrida de muestra y en negro la de estándares habiendo relación en los picos entre ellos, condiciones cromatográficas; fase móvil: acetonitrilo: agua acidulada:acetona (75:5:20) a 2 mL/min, 20 µL de inyección, 15 oC y longitud de onda de 475 nm.**

La biomasa de *Haematococcus pluvialis* extraída tras el escalamiento del cultivo y aplicación de estímulos de estrés, fue tratada para determinar el porcentaje de humedad, hallándose que contenía 54 % de humedad, sobre el producto seco de determinó la concentración de astaxantina en base a 3 ésteres de astaxantina (13-cis-astaxanthin, all-transastaxanthin y 9-cis-astaxanthin) por un nuevo método por HPLC; el cual resulta ser el método de análisis utilizado mayoritariamente para este fin dado sus características de buena sensibilidad, eficiencia, corto tiempo de análisis y relativo bajo precio; para ello se utilizaron estándares USP con los cuales se realizó la estandarización de la técnica, la cual resultó ser lineal, exacta y reproducible, dando en el cromatograma de los ésteres de astaxantina Figura 5, los tiempos de retención de 8.586, 11.104 y 15.051 minutos.

Tras la extracción y determinación de ésteres de astaxantina se obtuvo una concentración final de 42.93 +/- 0.82 g de astaxantina por kg de biomasa de *Haematococcus pluvialis* en fase roja seca, obtenida bajo las condiciones estandarizadas para el cultivo y aplicación de estímulos sobre la microalga, varios autores han reportado concentraciones de este carotenoide en la misma especie dando valores como 30.9, 32.2 y 37 g de astaxantina por kg de biomasa de *Haematococcus pluvialis* (37,38,39), se sabe que, factores que interfieren con ciertos procesos celulares dentro del alga actúan como desencadenantes del enquistamiento celular y formación de astaxantina, dentro de los que nosotros hemos reportado como la restricción de aire, aplicación de acetato de sodio y utilización de luz propia de la zona como uso de un recurso natural, resaltando el hecho de que el Perú cuenta con regiones que gozan de un gran potencial solar y que Arequipa es una región que con un potencial diario promedio de 5.3 kWh/m<sup>2</sup> (40,41), por lo que constituye una zona que naturalmente puede favorecer la formación de astaxantina en esta especie.

#### 4. CONCLUSIONES

Se logró optimizar el proceso de producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis* con los siguientes parámetros luz (natural), aireación constante, fotoperiodo (12 h-12 h), pH 7.5, C/N 0.1 g/L, obteniendo una densidad celular 14.5x10<sup>7</sup> cel./ml. Así mismo se logró la optimización de los procesos involucrados en el incremento de la concentración de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* mediante el estímulo de estrés utilizando recursos naturales como la luz natural y sin aireación; y factores fisicoquímicos como el pH y acetato

de sodio, obteniendo una mayor concentración de células aplanosporas.

Se concluye que el uso del medio de cultivo BG-11 genera una mejor densidad celular que el medio de cultivo BBM, por lo cual la mayoría de los ensayos se trabajó con el medio BG-11.

Se pudo lograr un escalamiento de la producción de biomasa en fase vegetativa del *Haematococcus pluvialis* a partir de los parámetros óptimos ya determinados en 3 fotobiorreactores raceways de capacidad de 300 L cada uno.

Finalmente, se logró el escalamiento de la producción de astaxantina a partir de los parámetros óptimos ya determinados, pudiendo obtener 1 kg/semanal de alga por fotobiorreactor, con rendimientos de astaxantina elevados y aprovechando recursos naturales de la Región Arequipa en Perú.

#### Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María-Arequipa Perú: Fondo Interno 2015 – II “Optimización del proceso de generación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* mediante estímulo de estrés utilizando recursos naturales y factores físico-químicos para la determinación del valor de su biomasa en el mercado”

#### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] P López, N Mach, Efecto del consumo de Astaxantina en la salud Am J Nurs
- [2] RT Lorenz, GR Cysewski, Trends Biotechnol, Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin, 18: 160-167, 2000
- [3] D Mauricio, R Landínez, Tesis, Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift: Universidad nacional de Colombia, Bogotá, 2013
- [4] A Domínguez, Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*: Editorial Académica Española, España, 2011
- [5] M Kobayashi, T Kakizono, S Nagai, Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*, Appl Environ Microbiol, 59: 867-873, 1993
- [6] R Lorenz, A technical review of *Haematococcus* algae, Nature Tech Bull: 1999
- [7] M Kobayashi, T Katsuragi, Y Tani, Enlarged and astaxanthin-accumulating cyst cells of the green alga *Haematococcus pluvialis*, J Biosci Bioeng, 92: 565-568, 2001
- [8] U Tripathi, R Sarada, Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media, Bioresour Technol, 68: 197-199, 1999
- [9] M Salazar, O Monroy, R Beristain, F Cuevas, C Mendoza, Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*
- [10] J Fábregas, A Otero, A Maseda, A Domínguez, Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, J Biotechnol, 89: 65-71, 2001
- [11] AS Cifuentes, M a. González, S Vargas, M Hoeneisen, N González, Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions, Biol Res, 36: 343-357, 2003
- [12] R Domínguez-Bocanegra, Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, Bioresource technology, 92: 209-214, 2004

- [13] E Imamoglu, FV Sukan, Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of Haema-tococcus pluvialis, International journal of natural and engineering sciences, 1: 5-9, 2007
- [14] M a González, AS Cifuentes, PI Gómez, Carotenoid Content in Four Chilean Strains of Haemato-coccus pluvialis Flotow, Under Laboratory Conditions, Gayana Botánica, 66: 58-70, 2009
- [15] N Hanan, N Al-Shorgani, H Shukor, N Rahman, M Kalil, Pre-optimization conditions for Haemato-coccus pluvialis growth, Int J Adv Sci Eng Inf Technol, 3: 70-73, 2013
- [16] M. Nunes, A Vieira, E Pinto, R Carneiro, A Monteiro, Carotenogênese em células de Haematococcus pluvialis induzidas pelos estresses luminoso e nutricional, Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48: 825-832, 2013
- [17] J Baranyi, T Roberts, A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, Int J Food Microbiol: 277-294, 1994;
- [18] KHM Cardozo, T Guaratini, MP Barros, VR Falcão, AP Tonon, NP Lopez, Metabolites from algae with economical impact, Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol, 146: 60-78, 2007
- [19] L Li, Z Song, Y Zhan, S Duan, Q Zhao, Y Liu, Effect of Vitamin-B 12 and Vitamin-H on the Growth and Astaxanthin Content of Haematococcus pluvialis, 5: 1139-1142, 2013
- [20] J Steinbrenner, H Linden, plant physiol: 2001
- [21] A Lababpour, K Shimahara, K Hada, Y Kyoui, T Katsuda, S Katoh, Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by Haematococcus pluvialis, J Biosci Bioeng, 100: 339-342, 2005
- [22] S Yoshimura, R Ranjbar, R Inoue, T Katsuda, S Katoh, Effective utilization of transmitted light for astaxanthin production by Haematococcus pluvialis, J Biosci Bioeng, 102: 97-101, 2006
- [23] R Ranjbar, R Inoue, T Katsuda, H Yamaji, S Katoh, High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor, J Biosci Bioeng, 106: 204-207, 2008
- [24] Camacho Kurmen Judith Elena, González Gloria, Klotz Bernadette, Producción de Astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo diferentes condiciones de estrés, Nova, 11: 94-104, 2013
- [25] L. C. C. Ramírez, Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal, Nova, 12: 2014
- [26] Z. Y. A Galvez, Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfa-to, N OVA Publicación en Ciencias Biomédicas, 12: 165-177, 2015
- [27] O. E. Rodríguez, W. A. Andrade, F. E. Díaz, B Moncada, Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá, Nova, 13: 2015
- [28] Santos M., Mesquita J. Ultrastructural study of Haematococcus ( Girod .) Rostafinski ( Volvocales ) I . Some aspects of carotenogenesis. Cytologia (Tokyo). 1984;49:215-28.
- [29] Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga Haematococcus pluvialis: From Single Cell to High Value Commercial Products. Front Plant Sci 2016;7:531.
- [30] Rodrigo R. Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. Rodrigo R, editor. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2009. 358 p.
- [31] Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. Arch Toxicol. 2012;86(3):345-91.
- [32] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, Haematococcus pluvialis. Appl Environ Microbiol. 1993;59(3):867-73.
- [33] Acchiocca MARAB, Oward LUKEH, Oodill MAHA, Uang DEH, Oxin BOU, Acob ROJ. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. 2003;0-6
- [34] Hanan N, Al-Shorgani N, Shukor H, Rahman N, Kalil M. Pre-optimization conditions for Haemato-coccus pluvialis growth. Int J Adv Sci Eng Inf Technol. 2013; 3(2):70-3.
- [35] Imamoglu E, Sukan FV. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of Haema-tococcus pluvialis. International journal of natural and engineering sciences 2007; 1(3):5-9
- [36] Guajardo Barbosa, C. (2019). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de lípidos y carotenoides totales en un extracto hexánico de Haematococcus pluvialis en distintos periodos de estrés (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- [37] Peng, J., Xiang, W., Tang, Q. et al Comparative analysis of astaxanthin and its esters in the mutant E1 of Haematococcus pluvialis and other green algae by HPLC with a C30 column. SCI CHINA SER C 51, 1108-1115 (2008).
- [38] Jian-Ping Yuan, Feng Chen, Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga Haematococcus pluvialis, Food Chemistry, Volume 68, Issue 4, 2000, Pages 443-448.
- [39] Jian-Ping Yuan and Feng Chen, Chromatographic Separation and Purification of trans-Astaxanthin from the Extracts of Haematococcus pluvialis, Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998, 46 (8), 3371-3375
- [40] Gestión del cambio climático Perú, <https://www.proyectoapoyocambioclimatico.pe/#>
- [41] SENAMHI, Atlas de la energía solar del Perú, <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=arequipa&p=pronostico-meteorologico>

Recibido el 12 de octubre del 2022 y aceptado para su publicación el 18 de diciembre del 2022.