

## Efecto de los parámetros cinéticos de escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactores para producir astaxantina

### Effect of the Scaling Kinetic Parameters of the Culture of *Haematococcus Pluvialis* in Photobioreactors to Produce Astaxanthin

Paula Andrea Martínez Rodríguez<sup>ac</sup>, María José Peinado Cárdenas<sup>ad</sup> y Judith Elena Camacho Kurmen<sup>be</sup>

<sup>a</sup> Semillero de Investigación Bioprocesos y Control, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

<sup>b</sup> Grupo de Investigación Bioprocesos y Control, Programa de Bacteriología y Laboratorio, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

<sup>c</sup> paulaamartinez@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-1164-5571>

<sup>d</sup> mpeinado@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0001-6001-6280>

<sup>e</sup> jelenacamacho@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>

**Citation:** Martínez Rodríguez, P. A., Peinado Cárdenas, M. H., y Camacho Kurmen, J. E. (2022). Efecto de los parámetros cinéticos de escalamiento del cultivo de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactores para producir astaxantina. *Mutis*, 12(2). <https://doi.org/10.21789/22561498.1739>

**Recibido:** 21 de abril del 2021  
**Aceptado:** 30 de agosto del 2021

**Copyright:** © 2022 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### RESUMEN

El *Haematococcus pluvialis* es una microalga de interés biotecnológico por su capacidad para producir astaxantina, un carotenoide que tiene uso como pigmento y compuesto bioactivo, con aplicación en la industria farmacéutica, cosmética, nutracéutica, alimenticia y la acuicultura. Este carotenoide se obtiene cuando la microalga es sometida a condiciones de estrés como intensidad de luz, color de luz, deficiencia de nutrientes y salinidad, e involucra el uso de fotobiorreactores (FBR). Por esto, este artículo busca conocer el tipo de FBR que se ha utilizado en su escalamiento y los parámetros cinéticos relacionados que influyen en el rendimiento del proceso. Los FBR facilitan el ajuste y control de las condiciones de cultivo, tanto en la fase verde como en la fase roja; de igual manera, el uso de los parámetros cinéticos de escalamiento permiten evaluar el proceso y así establecer las condiciones que deben ajustarse, para mejorar el cultivo de la microalga y la obtención de astaxantina. Los parámetros cinéticos de escalamiento revisados fueron la biomasa (cel./mL), la productividad de biomasa (g/Ldía), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ /día), el tiempo de duplicación (día), el contenido de astaxantina (mg/g) y su productividad. Se demuestra así la factibilidad tecnológica de los fotobiorreactores para el escalamiento de la microalga para producir astaxantina. Los FBR más usados son los de forma tubular y cilíndrica por tener una superficie mayor de iluminación y eficiencia en la distribución de la luz, y por reportar mayor productividad de astaxantina; su desventaja pueden ser los costos de limpieza.

**Palabras clave:** astaxantina; carotenoide; escalamiento; fotobiorreactor; *Haematococcus pluvialis*; Microalga; parámetros cinéticos.

#### ABSTRACT

*Haematococcus pluvialis* is a microalga of biotechnological interest due to its ability to produce astaxanthin, a carotenoid that is used as a pigment and a bioactive compound. It has applications in the pharmaceutical, cosmetic, nutraceutical, food, and aquaculture industries. This carotenoid is obtained when the microalgae is sub-

jected to stress conditions such as light intensity, light color, nutrient deficiency, and salinity, and involves the use of photobioreactors (PBR). For this reason, this article is intended to show the type of PBR that has been used in its scaling and the related kinetic parameters that influence the performance of the process. PBRs facilitate the adjustment and control of the cultivation conditions, both in the green phase and in the red phase. Likewise, the use of the kinetic scaling parameters allows evaluating the process, thus, establishing the conditions that must be adjusted, to improve the cultivation of the microalgae and obtaining astaxanthin. The kinetic scaling parameters reviewed were biomass (cel/mL), biomass productivity (g/Lday), specific growth rate ( $\mu$ /day), doubling time (day), astaxanthin content (mg/g) and its productivity. Thus, the technological feasibility of photobioreactors for the scaling of microalgae to produce astaxanthin is demonstrated. The most commonly used PBRs are tubular and cylindrical because they have a greater illumination surface and efficiency in light distribution, and because they report higher astaxanthin productivity; its downside may be the costs for their cleaning.

**Keywords:** astaxanthin; carotenoid; scaling; photobioreactor; *Haematococcus pluvialis*; Microalgae; kinetic parameters.

## INTRODUCCIÓN

El *H. pluvialis* es una microalga verde biflagelada que bajo condiciones de estrés acumula cantidades considerables del carotenoide astaxantina, el cual es empleado en diferentes industrias como la alimentarias, farmacéutica, cosmética, acuicultura y nutracéutica, por ser un colorante y un compuesto bioactivo (Damiani et al., 2010; Camacho et al., 2013; Miranda et al., 2019; Gómez et al., 2019; Hossain et al., 2017). Las condiciones de estrés utilizadas son la luz (Li et al., 2019), la fotoinducción, el color, la irradiancia, el fotoperiodo, deficiencia de nutrientes, salinidad, altas concentraciones de CO<sub>2</sub>; para ello, se usan fotobiorreactores (FBR) (Hernández et al., 2015; Liang et al., 2015; Cheng et al., 2016; Hi et al., 2017; Christian et al., 2018; Cho et al., 2018; Azizi et al., 2019; Gómez et al., 2019; Han et al., 2019) y sonidos (Christwardana y Hadiyanto, 2017).

Las clases de FBR utilizadas para el cultivo de la microalga son los planos (Jiménez, 2017; Guzmán et al., 2020), los FBR tubulares o en columna (Pan-utai et al., 2017; Zhang et al., 2018; Miranda et al., 2019) y los FBR de biopelícula inmovilizada en ángulo interior (Tran et al., 2019); y se aplican diferentes condiciones de cultivo y de estrés, produciendo biomasa en calidad y cantidad suficiente de la microalga para producir astaxantina.

Los FBR están diseñados para convertir la energía solar en productos deseables, debido a sus ventajas favorables, como una mayor eficiencia fotosintética, mayores concentraciones, la obtención de productos, una baja contaminación, la prevención de la pérdida de agua causada por evaporación, y un ambiente controlado con precisión, apoyado en el uso de sensores como los de temperatura, pH, antiespumante, oxígeno disuelto, agitación y velocidad de los gases suministrados. El crecimiento de microorganismos fotosintéticos es un proceso que se ve afectado por condiciones como la luz, la irradiancia, la agitación, la transferencia de masa, la temperatura, el pH y los nutrientes presentes. En la selección del FBR más adecuado para el proceso a realizar, es importante tener en cuenta los costos operativos, que incluyen el control de temperatura, la limpieza periódica, el mantenimiento y la vida útil (Huang et al., 2017).

En el estudio de Lv et al. (2016) se evaluó el efecto de acumulación de astaxantina por la inducción de luz en un cultivo de *H. pluviali*, utilizando medio BBM, irradiancia de  $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ , temperatura de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%, pH 7.5, fotoperiodo de 16 horas luz (6 oscuridad), en biorreactores de 500 mL; se encontró una producción alta de astaxantina de 14.6 veces de acuerdo con el inóculo inicial durante 28 días de experimentación. También Xi et al. (2016) estudiaron el efecto de dos diferentes colores led para aumentar la producción de astaxantina utilizando medio OHM, irradiancia de  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ , temperatura de  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , aire filtrado o estéril a un caudal de 100 mL/minuto, pH 7.5-8,0, fotoperiodo de 20 horas en oscuridad, en una cantidad de 120 mL; se encuentra una producción de biomasa de  $3,5 \times 10^5$  células/mL usando led roja y  $2,3 \times 10^5$  células/mL con led azul durante 16 días de experimentación.

Niño et al. (2017) determinaron el medio de cultivo más apropiado para el crecimiento y producción de astaxantina en la microalga *H. pluvialis*; para ello, evaluaron el efecto tres medios de cultivo, BBM, OHM y RM, en biorreactores de 500 mL con 350 mL de medio y  $1 \times 10^4$  cel./mL de inóculo en fase exponencial. Las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH. 6.7 a 7,  $\text{CO}_2$  al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz (8 oscuridad) e irradiancia  $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Se realizó una curva de crecimiento y un análisis de los cambios morfológicos de las células, dando como resultados que el mayor crecimiento celular se obtuvo en el medio RM con  $7,5 \times 10^5$  cel./mL en el día 36, y la mayor producción de astaxantina se obtuvo en el medio RM con una concentración de  $8.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

En el trabajo de Pan-utai et al. (2017) se estudiaron los efectos de los agentes inductores en el crecimiento de *H. pluvialis*; se cultivó la microalga en medio NSIII en un fotobiorreactor de columna de vidrio transparente. La intensidad de la luz se mantuvo a  $104 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  con luz fluorescente diurna de 18 vatios y el ciclo de luz/oscuridad fue de 16:8 h. Se agregaron agentes inductores para generar la acumulación de astaxantina en las células como acetato de sodio (NaOAc), acetato de potasio (KOAc), acetato de magnesio (MgOAc) y bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Los resultados establecieron que la adición de acetato de potasio, acetato de magnesio y bicarbonato de sodio en concentraciones de 100 mM, 10 mM y 10 mM, respectivamente, dieron las mayores concentraciones de astaxantina.

Christian et al. (2018) plantearon un método económico de dos etapas para la producción de astaxantina natural de *H. pluvialis* sin una etapa de reemplazo del medio. En la etapa 1, el *H. pluvialis* creció bajo iluminación de poca luz hasta que alcanzaron la biomasa óptima. En la etapa 2, las células se cambiaron a las condiciones de inducción de astaxantina utilizando la combinación de iluminación de alta irradiancia y niveles elevados de dióxido de carbono (5 o 15%). El rendimiento de astaxantina resultante fue de 2 a 3 veces mejor que al usar cualquiera de los factores de estrés solo. Este método de inducción con astaxantina tiene muchas ventajas sobre los métodos actuales, que incluyen un corto tiempo de inducción de menos de cuatro días.

Similar trabajo fue desarrollado por Panis y Carreon (2016), quienes establecen que el *H. pluvialis* inicia con una fase vegetativa y móvil donde pasa a una etapa de reposo denominada etapa roja; pero para que se dé este paso de una etapa a otra, es necesario que se tengan en cuenta condiciones como tipo de luz, aumento de irradiancia, color de luz, pH, temperatura y deficiencia de nutrientes; se recomienda que las etapas se den en medio de cultivo diferentes, para que una etapa no afecte a la otra.

Actualmente la obtención de astaxantina de manera sintética cuesta U\$ 2500/kg (Camacho et al., 2013; Shah et al., 2016; Sugawara y Maoka, 2021), por lo cual se sugiere aprovechar la microalga *H. pluvialis* para su obtención de manera natural, ya que acumula una cantidad mayor que otros microorganismos, y la astaxantina que produce es la de mejor calidad. Además, según el cambio en la legislación, existe una gran demanda de las industrias para implementarlo como colorante o compuesto bioactivo en su forma natural (Mularczyk et al., 2020).

Miranda et al. (2019) evaluaron el efecto de la concentración de nitrógeno y fósforo sobre la acumulación de astaxantina en *H. pluvialis* UTEX 2505; evidenciaron que la productividad celular aumenta al incrementar los niveles de nitrógeno, en contraste con las bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo, que muestran un efecto positivo sobre la producción de astaxantina. El estrés generado por la limitación de nutrientes (fuente de nitrógeno y fósforo) disminuye la rigidez de la pared celular en la microalga; en consecuencia, se concluye que para obtener concentraciones más altas de astaxantina, es necesario limitar los niveles de nitrógeno y fósforo. En este trabajo también se tienen en cuenta los parámetros cinéticos a utilizar para monitorear el proceso, como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), el tiempo de duplicación (td), la concentración de nitrógeno, la concentración de fosfato y la productividad del pigmento.

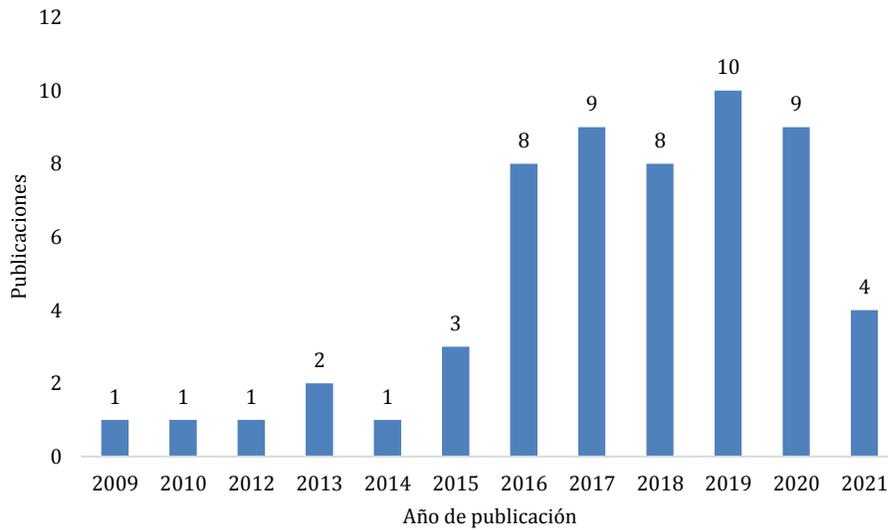
El crecimiento celular y la evaluación de parámetros cinéticos para monitorear el crecimiento celular se pueden realizar diariamente mediante la medición de la concentración celular por triplicado, determinada por la densidad óptica del cultivo; se puede utilizar para ello una longitud de onda de 670 nm en un espectrofotómetro, por conteo celular (células/ml) o por peso seco de biomasa (gr) (De Mendonça et al., 2018).

Los parámetros cinéticos son una herramienta esencial para evaluar el crecimiento de la microalga; y en el caso del escalamiento usando FBR, son importantes para monitorear el cultivo de la microalga y la obtención del producto de interés. Se hace uso de los parámetros como la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), el tiempo de duplicación (td), la productividad tanto de biomasa (g/L d) como del colorante de interés ( $\mu\text{g/L d}$ ), el  $\text{CO}_2$ , el oxígeno disuelto (mg/L), el pH, la conductividad y el contenido de nitrógeno ( $\mu\text{g/L}$ ) y de fósforo ( $\mu\text{g/L}$ ) para cada uno de los ensayos realizados. Mediante el estudio de estos parámetros se logra esclarecer cuáles condiciones de cultivo y/o de estrés deberían modificarse o ajustarse para incrementar la obtención de astaxantina a partir de *H. pluvialis* en FBR (Deniz, 2020). Estos parámetros cinéticos, además de ser una herramienta que evalúa el crecimiento de los microorganismos, permiten —durante el escalamiento del proceso— evaluar los procedimientos implementados en los procesos (De Mendonça et al., 2018).

Este trabajo resume los principales parámetros cinéticos utilizados como monitoreo durante el escalamiento de *H. pluvialis* para producir astaxantina usando FBR; se establecen los más comunes, sus características, el volumen trabajado, los costos, las condiciones de estrés y los parámetros consolidados para el monitoreo del cultivo a escala de la microalga y en la producción de la astaxantina, a fin de poder proyectarlo hacia condiciones de producción a nivel industrial. Los datos fueron analizados usando Excel 2013 con diferentes variables por analizar, incluyendo año de publicación, idioma (Figura 2B), temas de estudio y enfoque del estudio. Finalmente, se utilizó estadística descriptiva para analizar los resultados. Los indicadores bibliométricos analizados y usados fueron *citación* y *contenido* (Figura 2A).

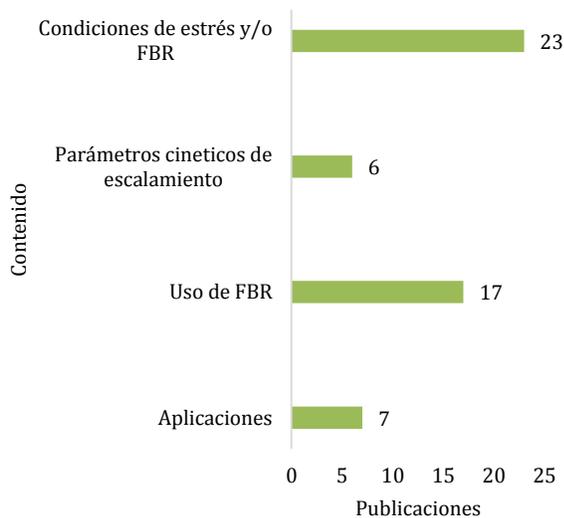
El 84% de las publicaciones revisadas se encuentran en el periodo comprendido entre el 2016 y el 2021. Las publicaciones revisadas incluyen 53 artículos, 2 tesis, un manual y un libro (Figura 1).

**Figura 1.** Relación de publicaciones revisadas por año de publicación.

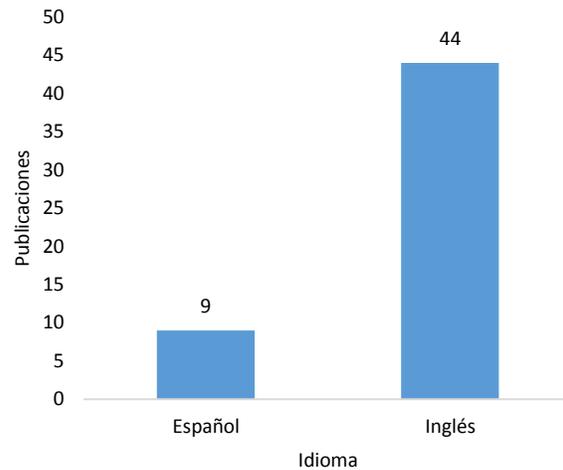


Fuente: elaboración propia.

**Figura 2a.** Contenido y metodología



**Figura 2b.** Idioma de las publicaciones revisadas



Fuente: elaboración propia.

**Nota.** Indicador de colaboración: en los 53 artículos revisados, 239 autores fueron relacionados. Indicador de citación: el artículo de Ho *et al.* (2012) presenta la mayor citación, con un valor de 655. Se encontró que todos los artículos revisados presentan citación.

### Principales características del *Haematococcus pluvialis*

El *H. pluvialis* pertenece a la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales* y familia *Haematococceae*; es una microalga de agua dulce, unicelular, se encuentra en varios ecosistemas existentes en diferentes partes del mundo. La importancia de esta microalga radica en su carotenoide secundario, conocido como astaxantina, un metabolito secundario obtenido tras el proceso de fotosíntesis y/o glucólisis, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el cultivo (Shah et al., 2016).

En el ciclo de vida de *H. pluvialis* hay cuatro tipos de morfología celular diferenciable: macrozooides (zoosporas), microzooides, pálmela y hematocistos (aplanosporas). Los microzooides y la etapa de palmela corresponden a la morfología celular de la fase vegetativa o fase verde, en tanto los hematocistos o aplanosporas se presentan en la fase de la acumulación de astaxantina o fase roja. Los macrozooides pierden sus flagelos cuando hay deficiencia de nutrientes, convirtiéndose así en palmelas, células vegetativas en reposo, que por privación de nutrientes se transforman en aplanospora. Una vez se está en esta fase, se da la acumulación de astaxantina, que presentará un color rojo brillante (Shah et al., 2016).

Se ha estudiado que *H. pluvialis* tiene la capacidad de sintetizar una gran cantidad de polisacáridos y carbohidratos en la fase de aplanospora, lo cual explica la aparición de agregados en los cultivos que son sometidos a estrés, como se observa cuando las células pierden su flagelo y pasan al estado de palmela; se estima que ocho días después estas aumentaron su tamaño, volviéndose células esféricas que formaron una pared celular rígida. Alrededor de dos semanas después las aplanosporas comienzan a acumular astaxantina, sobre todo en el centro de la célula; justo en este punto las aplanosporas maduran y lo que se observa en la siguiente fase es una célula productora de astaxantina cubriendo todo el volumen celular (Orona-Navar et al., 2017).

### Condiciones de cultivo

En el diseño de un FBR eficiente, la penetración de la luz y la distribución dentro del reactor son los factores dominantes, así como una buena mezcla y transferencia de masa, una temperatura y un pH favorables —que pueden mejorar significativamente el crecimiento de las microalgas (Hernández et al., 2015; Huang et al., 2017)—, al igual que nutrientes como el nitrógeno y el fosfato (Nahidian et al., 2018). A continuación se presentan las condiciones que afectan el cultivo de la microalga:

**Luz:** Es una de las condiciones más importantes en los cultivos de microalgas; generalmente, esta es luz solar, la cual es usada por las microalgas. La radiación utilizable fotosintéticamente (PAR) permite a la microalga llevar a cabo diferentes procesos tales como el metabolismo y el crecimiento. Otro de los factores que determinan el crecimiento de la microalga es la intensidad en la que esta es proporcionada, pues bien se sabe que la tasa de fotosíntesis aumenta cuando la intensidad luminosa es mayor. En los cultivos de microalgas, la luz usada puede ser artificial o natural, cada una de las cuales tiene ventajas y desventajas, pues la luz natural no es un gasto energético, pero no puede ser controlada (Shah et al., 2016, Oslan et al., 2021).

**Temperatura:** La microalga por lo general se adecúa a la temperatura del ambiente en el que se encuentra. Se ha observado que el cambio de esta temperatura afecta al metabolismo junto con los requerimientos nutricionales de las microalgas, pues hay una relación estrecha entre la temperatura y la actividad biológica: a medida que la tasa de crecimiento aumenta, la temperatura también (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021).

**pH:** Las membranas celulares de estas microalgas no son completamente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, razón por la cual las concentraciones de estas —ya sean intracelulares o extracelulares— no son iguales y no conservan un equilibrio. Cada microalga requiere de un pH diferente; una caída en los niveles de pH puede llegar a ser letal, mientras que un aumento de esta puede tolerarse hasta cierto límite. La importancia del pH radica en que este determina la capacidad del CO<sub>2</sub> de los minerales, que tiene una influencia directa e indirectamente en el metabolismo de la microalga (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021).

**Salinidad:** Se refiere a las concentraciones de sales inorgánicas disueltas como acetato de sodio o cloruro de sodio, pues la tolerancia de estas sales varía dependiendo de la especie de microalga.

**Carbono:** Es el macronutriente más importante ya que constituye alrededor del 50 % de la biomasa de la microalga; este generalmente es suministrado con aire. La fuente más común de suministrar este carbono es CO<sub>2</sub> puesto que se difunde rápidamente al interior de la célula y se utiliza de inmediato en los procesos de fijación (Shah et al., 2016; Oslan et al., 2021).

**Nitrógeno:** Se encuentra generalmente alrededor del 7 % al 10 % de la célula por peso seco, es un constituyente esencial de todas las proteínas funcional y estructuralmente en las células del alga. En general, la microalga tiene una limitada habilidad para producir materiales almacenados de nitrógeno cuando crece bajo condiciones suficientes de nitrógeno. Cuando esto sucede, el efecto más golpeado es la degradación específica y activa de ficobilisomas (Richmond, 2013; Oslan et al., 2021).

**Fósforo:** Es otro macronutriente que juega un importante rol en el proceso metabólico celular por la formación de algunos componentes estructurales y funcionales requeridos para el crecimiento normal y desarrollo de la microalga. Los ortofosfatos son incorporados como componentes orgánicos a través de la fosforilación. El fosfato inorgánico se presenta en las células en forma de polifosfatos y se acumula en gránulos. Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en crecimiento celular normal bajo suficiente fosfato, pero desaparecen en deficiencia de fosfato (Richmond, 2013; Oslan et al., 2021).

**Costos de capital y costos de operación:** Desde el punto de vista económico, un FBR comercial podría tener las siguientes características: relación alta del área de superficie de iluminación/volumen para capturar la radiación solar, fácil control de temperatura, un buen proceso de transferencia de masa y mezcla, bajo estrés de deformación sobre las células, y bajos costos de capital y costos de operación, como los de limpieza, mantenimiento, control de pH y control de temperatura (Huang et al., 2017).

### Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-, -caroten-4,4'-diona) es un betacaroteno de la familia de las Xantofilas; a nivel químico se han descrito tres estereoisómeros (Santose et al., 2014; Shah et al., 2016). Como ya se ha mencionado, la principal fuente de obtención de la astaxantina es la microalga *H. pluvialis*, que es cultivada en fotobiorreactores bajo condiciones de estrés específicas para lograr una producción a gran escala. Al pertenecer a los carotenoides tetraterpenos, se entiende que uno de los intermediarios más importantes es el pirofosfato de isopenitenilo, que puede originarse ya sea bien por la vía del mevalonato —la cual se da en el citosol— o por la vía del no mevalonato (MEP-DOXP) —la cual se da en el cloroplasto—. Según Shah et al. (2016), el pirofosfato de isopenitenilo intermediario para la obtención de astaxantina a partir de *H. pluvialis* se da por medio de la vía no mevalonato; sin embargo, la *H. pluvialis* carece de tres enzimas las cuales se encargan de convertir todos los productos de

las fotosíntesis (piruvato y gliceraldehído-3-fosfato) en pirofosfato de isopentenilo mediante MEP-DOXP.

Después de la obtención de IPP (pirofosfato de isopentenilo), este pasa por un proceso de isomerización a dimetilalil difosfato (DMAPP), con adiciones lineales subsiguientes de tres moléculas de pirofosfato de isopentenilo, las cuales son catalizadas por GGPS (geranilgeranil pirofosfato sintasa); luego de este proceso se da la formación de GGPP (geranil-geranil difosfato), que pasa a ser condensada a fitoeno, este último descrito como precursor de la astaxantina y de otros carotenoides. Ambos extremos de licopeno sufren una catálisis llevada a cabo por licopeno ciclasas, lo cual hace que se dé la producción de  $\alpha$ -caroteno (precursor de la luteína) y  $\beta$ -caroteno (precursor de otros carotenoides, incluida la astaxantina) (Kim et al., 2015; Shah, 2016).

### Fotobiorreactores

Son dispositivos combinados con algún tipo de luz y están compuestos por varios subsistemas, como fuente de luz, sistemas de manejo de aire, sistemas de filtración, sistemas eléctricos y sistemas de instrumentación, destinados al cultivo masivo de microalgas. Los fotobiorreactores poseen dos tipos de diseños diferentes: por un lado, fotobiorreactores abiertos, en los cuales el cultivo se encuentra en contacto con la atmósfera; al estar expuestos al medioambiente son susceptibles a la invasión de otros microorganismos, por lo que este tipo de biorreactores es útil para el cultivo de microalgas robustas y de rápido crecimiento; por otro lado, fotobiorreactores cerrados, que mantienen el cultivo totalmente aislado del exterior y generalmente están equipados con sistemas de agitación, aireación, control de pH, adición de medio y CO<sub>2</sub> (Figura 3) (Gómez-Torres et al., 2014).

Los fotobiorreactores, a diferencia de los cultivos de sistema abierto, tienen la capacidad de ajustar y monitorear las condiciones de cultivo y los requerimientos óptimos para la producción de biomasa y la posterior obtención de astaxantina. Se ha observado que el cultivo de microalgas en sistemas cerrados reduce los riesgos de contaminación y en cambio aumenta la reproducibilidad de esta (Rubio-Fernández y Hernández, 2016; Huang et al., 2017; Cañedo y Lizarraga, 2016; Guzmán et al., 2020). Los parámetros principales para tener en cuenta al momento de diseñar un fotobiorreactor son los siguientes (Sanz Martínez, 2019):

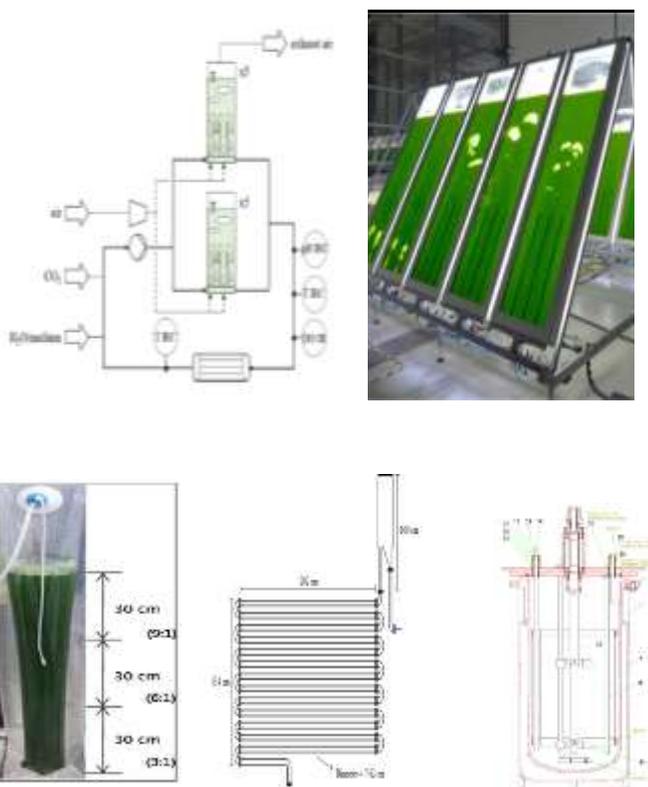
- Capacidad para reutilizarse (facilidad de limpieza y reutilización).
- Material de construcción (resistente, inerte, tolerante al daño por pH, temperatura y salinidad).
- Iluminación (penetración e intensidad de la luz, fotoperiodo e intermitencia).
- Mezcla (una mezcla pobre da lugar a un aumento del ensuciamiento y de la concentración de oxígeno).
- Aireación (número/tamaño de las burbujas, transferencia de materia).
- pH (solubilización de CO<sub>2</sub>, envejecimiento del cultivo, composición del medio).
- Temperatura (efecto de la luz, eliminación del exceso de calor).

### Clases de fotobiorreactores

#### Fotobiorreactores tubulares

1. *Tubular vertical*: Se trata de una columna tubular en posición vertical, por lo general fabricada en polietileno o vidrio, con el fin de permitir una penetración óptima por parte de la luz solar; la introducción de CO<sub>2</sub> se hace por la parte inferior.
2. *Tubular horizontal*: Está formado por tubos horizontales conectados como un sistema de tuberías, donde la microalga tiene la capacidad de circular por esta línea de tuberías; la circulación se da por una bomba localizada al final del sistema (Sanz Martínez, 2019).
3. *Tubular helicoidal*: Está compuesto por una serie de tubos que disponen de una estructura abierta cilíndrica, acompañada de una torre de intercambio de gases, además de intercambio de calor (Ho et al., 2012; Sanz Martínez, 2019) (Figura 3).

Figura 3. FBR de flujo; 3B: FBR placa plana; 3C: FBR airlift; 3D: FBR tubular horizontal equipado con airlift; 3E: biorreactor tubular.



Fuente: Koller et al. (2018), Morais et al. (2018), Ho et al. (2012), Biostat A Plus (2009).

#### Fotobiorreactores de superficie plana

El principal objetivo de estos es tener un uso eficiente de la luz, están formados por paneles estrechos unidos entre sí por conexiones por las cuales se puede hacer introducción de CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de O<sub>2</sub> disueltas son bajas y las eficiencias fotosintéticas que se alcanzan son altas. También se tiene como ventajas la alta productividad y una distribución uniforme de la luz (Koller et al., 2018; Sanz Martínez, 2019).

### Fotobiorreactor de columna

El diseño de este tipo de fotobiorreactores consta con 2 tubos concéntricos. El cilindro interior, también conocido como *Riser*, permite canalizar el flujo de aire y, por lo tanto, la mezcla gas-líquido, generando así el flujo ascendente. En la categoría de fotobiorreactores cerrados, las columnas son fáciles de construir ya que gracias a su forma cilíndrica la luz se puede distribuir de forma más eficiente y se soporta bien la presión en la base (Sanz Martínez, 2019). Los factores que mejoran los fotobiorreactores son: (a) radio H/D y (b) pendiente inferior en forma de V (Morais et al., 2018).

Un ejemplo del uso de un fotobiorreactor en columna para el cultivo de *H. pluvialis* y la obtención de astaxantina es el siguiente: FBR de tamaño entre 1 y 96 litros; condiciones de estrés: deficiencia de nutrientes, alta intensidad de luz, color de luz (led roja y azul), alta salinidad dada por acetato de sodio o combinación cloruro de sodio/acetato de sodio, pH; se obtiene un aumento en el contenido total de carotenoides y contenido total de astaxantina ( $81.19 \pm 3.16$  mg /L) (Legrand et al., 2021). En la Tabla 1 se pueden observar las diferentes condiciones de cultivo y de estrés utilizadas para la producción de biomasa de *H. pluvialis* usando diferentes FBR.

**Tabla 1.** Cultivo de *H. pluvialis* usando distintos fotobiorreactores.

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Volumen de cultivo	Condiciones de cultivo	Tiempo de cultivo (días)	Biomasa	Referencia
FBR acrílico	OHM	60 L	pH: 6.5 y 6.8 T: 25 °C Irradiancia 20,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ . Aireación con una velocidad de 100 ml/min sin $\text{CO}_2$ adicional.	22	$3,467 \times 10^2$ cél. / mL / día	Christwarday Hadiyanto, (2017)
FBR tubulares de 20 litros	Medio Basal Bold modificado (BBM-Modificado)	50 mL de medio de cultivo estéril BBM-líquido Etapa del preinóculo que contenía 860 mL	T: $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 12:12, intensidad de luz $52 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ y burbujeo de aire enriquecido con 3% de $\text{CO}_2$	11	1.5-1.9 g/L de biomasa 168.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del carotenoide en el tratamiento Nitrogeno (1) fosforo (2)	Miranda. et al. (2019)

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Volumen de cultivo	Condiciones de cultivo	Tiempo de cultivo (días)	Biomasa	Referencia
FBR de columna 4.5 L	Medio basal Bold modificado (mBBM)	inoculación inicial 1,2 L	T: $25 \pm 1$ °C bajo iluminación continua de 30-40 $\mu\text{mol}$ de fotones / $\text{m}^2$ s.  $\text{CO}_2$ al 1%	35	5,4 mg / L	Wang et al. (2019)
FBR de sustrato poroso de doble capa (TL-PSBR) de pequeña escala 20L	BG-11 repleto de nutrientes	20 L		10	6,6 g/ $\text{m}^2$ d de biomasa seca	Do et al. (2019)
FBR de una botella de vidrio de 2 L	medio Basal Bold (BBM)	volumen de trabajo de 1,8 L	T: $30 \pm 2$ °C Intensidad de luz de 2000 lx en un día 12:12 h ciclo de luz / oscuridad	Se cultivaron microalgas en modo discontinuo durante  42 días	41 mg / L	Liyanaarach et al. (2020)
FBR de tanque agitado de 2 L	medio BG-11	La biomasa incubada se utilizó como inóculo al 10% (v / v) en 900 ml de medio BG-11	Irradiancia de 65 $\mu\text{E} / \text{m}^2$ s usando una tasa de aireación de 1 vvm a 24 ° C.	12	4,57 mg / g	Deniz (2020)
FBR de panel plano airlift  93,000 L	N.A	0,006 L	Luz led de 0,08 kW, $\text{CO}_2$ 79,35 Nm <sup>3</sup> / h  T: 25 y 28 °C.	310–225	0,75 g/L al día	Onorato y Rösch (2020)

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Volumen de cultivo	Condiciones de cultivo	Tiempo de cultivo (días)	Biomasa	Referencia
FBR de panel de pared verde 93,000 L	N.A	1L	Luz LED es de 0,08 kW CO <sub>2</sub> 79,35 Nm <sup>3</sup> / h T:25 y 28 °C	310–225	0,21 g/L al día	Onorato y Rösch (2020)
FBR tubular horizontal de una capa 93,000 L	N.A	0,28 L	Luz led es de 0,08 kW CO <sub>2</sub> 79,35 Nm <sup>3</sup> / h T:25 y 28 °C	330	0,07 g/L al día	Onorato y Rösch (2020)
FBR cilíndricos de 1 L (10 cm de diámetro)	Medio medio OHM	1 L	pH 7.0 y 7.5 T: 21 °C luz azul (450 nm), luz roja (660 nm) y mezcla de rojo y azul luz con diferentes proporciones rojo: azul: 1: 4; 1: 1 y 4: 1	4	7.0 × 10 <sup>6</sup> Cel./ mL	Pereira y Otero, (2020)
FBR de tanque agitado de 5L	Medio BG-11	3L	pH7.5 Fotoperiodo: luz oscuridad 16/8 24°C 50 rpm 0,04% de CO <sub>2</sub>	7	1,05 ± 0,05 g/L	Azizi et al., (2020)

Fuente: elaboración propia.

Las condiciones utilizadas en los cultivos en FBR para el *H. pluviialis* son temperaturas entre 20 °C y 25 °C, un pH entre 6.5 y 8.0, luz con lámparas fluorescentes de color blanco, uso de leds, agitación continua, fotoperiodos, suministro de CO<sub>2</sub>, uso de medios como BBM y BG-11, volúmenes hasta 60 litros. Los FBR más empleados son los de columna, cilíndricos y tubulares, condiciones que influyen en la obtención de la biomasa de la microalga, debido a que presenta gran superficie de iluminación. Como desventaja se encuentran los costos altos de operación, como los de limpieza y de control de la temperatura que pueden necesitar (Huang et al., 2017).

En la Tabla 2 se encuentran las ventajas y desventajas de los fotobiorreactores más usados para el cultivo de microalgas incluyendo los costos (Huang et al., 2017):

**Tabla 2.** Ventajas de desventajas de los fotobiorreactores utilizados en el cultivo de microalgas

Tipo de fotobiorreactor	Ventajas	Desventajas
FBR tubular	Simple, gran superficie de iluminación	Temperatura alta, foto limitación, pH alto, gradiente de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> , costos de capital y operativos altos
FBR bolsa de plástico	Bajos costos de capital a corto plazo	Fotolimitación, mezcla baja, fragilidad a fugas, periodo de vida corto
FBR columna airlift	Consumo de energía bajo; esfuerzo cortante bajo; mezcla y transferencia de masa buena	Costo alto, costo de limpieza alto
FBR Flat-panel airlift	Consumo de energía y esfuerzo cortante bajo; control de temperatura sencillo; mezcla y transferencia de masa adecuada; vida útil larga; proporción de superficie iluminada alta según volumen; costo operativo bajo	1 alto

Fuente: elaboración propia.

### Parámetros cinéticos de crecimiento

El crecimiento celular y la evaluación de parámetros cinéticos para monitorear el crecimiento celular de una microalga se pueden realizar mediante la medición de la concentración celular por triplicado, determinada por la densidad óptica del cultivo, utilizando una longitud de onda de 670 nm en un espectrofotómetro, por conteo celular (células/ml) o por peso seco de biomasa (gr) (De Mendonça et al., 2018).

La concentración celular se obtiene a través de una curva estándar sobre peso seco y densidad óptica (X máxima). Con estos datos, la productividad máxima (P máxima) se calcula con la tasa de crecimiento específica máxima (μ<sub>máx</sub>) y el tiempo de generación (tg). La productividad (P, g.L./d) se calcula según la ecuación, donde X (g/L) representa la concentración celular final; X<sub>0</sub> (g/L), la concentración de inicial cultivo de biomasa; t (d), el tiempo final; y t<sub>0</sub>, el tiempo inicial de cultivo:

$$P = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad [1]$$

La máxima velocidad de crecimiento (rata de crecimiento) ( $\mu_{\text{máx}}$ ) se obtiene por regresión exponencial en la fase exponencial (fase log), donde se multiplican las células y el tiempo de generación se obtiene de la siguiente ecuación:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad [2]$$

Como complemento al monitoreo, se mide cada 24 horas el pH del cultivo (De Mendonça et al., 2018).

### Fijación de CO<sub>2</sub>

La acumulación de CO<sub>2</sub> se determina según la ecuación:

$$FA = (X_t - X_0) m_{\text{cbm}} V_{\text{biorreactor}} (M_{\text{CO}_2} / M_c) \quad [3]$$

Donde  $X_t$  (g/L) es la concentración celular en el tiempo  $t$  (d),  $X_0$  (g/L) es la concentración a tiempo  $t_0$ ,  $m_{\text{cbm}}$  (gc/g<sub>amostra</sub>) es el peso de la fracción de carbono determinada en la biomasa microalgal,  $V_{\text{biorreactor}}$  es el volumen de medio del biorreactor,  $M_{\text{CO}_2}$  (g/mol) y  $M_c$  son la masa molecular de CO<sub>2</sub> y de carbono (De Mendonça et al., 2018).

Los parámetros cinéticos por tener en cuenta en el proceso de escalamiento de la microalga son el crecimiento celular (células/mL) o biomasa obtenidos en gr/L, la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), el tiempo de duplicación ( $t_d = \ln 2 / \mu_{\text{máx}}$ ), la productividad tanto de biomasa (g/L d) como del colorante de interés ( $\mu\text{g/L d}$ ), el CO<sub>2</sub>, el oxígeno disuelto (mg/L), el pH, la conductividad, el contenido de nitrógeno ( $\mu\text{g/L}$ ) y de fósforo ( $\mu\text{g/L}$ ) para cada uno de los ensayos realizados. También se han reportado tres criterios de escalado en fotobiorreactores: el consumo de energía volumétrica constante (P/V), el coeficiente de transferencia de masa constante (kLa) y el tiempo de mezcla constante ( $t_m$ ). Se ha tenido en cuenta la cantidad de biomasa o bioproducto para elegir el mejor criterio de escalado para las producciones de las dos etapas de la microalga —fase verde y fase roja— y también la proporción de la cantidad total de bioproductos por concentración de biomasa (productividad de astaxantina) (Deniz, 2020; Guzmán et al., 2020).

En la Tabla 3 se presentan los parámetros cinéticos de escalamiento tenidos en cuenta en el cultivo de *H. pluvialis* utilizando fotobiorreactores.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de escalamiento para el cultivo de microalga *H. pluvialis* relacionados con la obtención de astaxantina

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Biomasa inicial (X <sub>0</sub> )	Biomasa final (X <sub>f</sub> )	Velocidad de crecimiento (μ <sub>máx</sub> )	Tiempo de duplicación (td)	Concentración de astaxantina	Productividad de astaxantina (Y <sub>p</sub> /Y <sub>x</sub> )	Bibliografía
FBR de columna	BG11	0.33 ± 0.1	3.43 ± 0.6	0.80 ± 0.09	7D	81.19 ± 3.16 mg / l	10.06 ± 0.21 mg/L/d	Zhang <i>et al.</i> (2018)
FBR de columna	MBG 11	5,1 ± 0.3	9.6 ± 0.2	N. A.	N. A.	1.6 ± 0.3% de DW	5.1 (mg/L/d)	Wang <i>et al.</i> (2019)
FBR de tanque agitado de 2 L	BG11	0.49	1,48	0,14	4,92	4.57% de Dw	0.044 1 (mg/L/d)	Deniz <i>et al.</i> (2020)
FBR de transporte aéreo tubulares	Bold (BBM)	0.65	5.9	N. A	8 D	87.4 mg / L	12.2 mg/L/d	Cheng <i>et al.</i> (2016)
FBR de columna	Bold modificado (mBBM)	5,2 ± 0,1	20,1 ± 0,2	0.9	15 D	2,7 ± 0,1% de Dw	18.1 (mg/L/d)	Wang <i>et al.</i> (2019)
FBR tubular 20 litros	N1P1, N 1.0 P 1.0	0.196 ± 0.021	1.9 g/L	0.196 ± 0.021	3.525 ± 0.357	41.9 μg/mL	11.9 μg/mL/d	Miranda <i>et al.</i> (2019)
FBR tubular 20 litros	N1P0, N 1.0 P 0.6	0.262 ± 0.013	1.5 g/L	0.179 ± 0.031	3.855 ± 0.053	58 μg/mL	15 μg/mL/d	Miranda <i>et al.</i> (2019)
FBR tubular 20 litros	N1P-1, N 1.0 P 0.2	0.259 ± 0.088	1.4 g/L	0.171 ± 0.010	4.034 ± 0.249	50 μg/mL	12.4 μg/mL/d	Miranda <i>et al.</i> (2019)
FBR tubular 20 litros	NOP1, N 0.6 P 1.0	0.246 ± 0.091	1.3 g/L	0.143 ± 0.015	4.840 ± 0.441	43 μg/mL	8.95 μg/mL/d	Miranda <i>et al.</i> (2019)

Fotobiorreactor	Medio de cultivo	Biomasa inicial (X <sub>0</sub> )	Biomasa final (X <sub>f</sub> )	Velocidad de crecimiento (μ <sub>máx</sub> )	Tiempo de duplicación (td)	Concentración de astaxantina	Productividad de astaxantina (Υ <sub>p</sub> /Υ <sub>x</sub> )	Bibliografía
FBR tubular 20 litros	NOPO, N 0.6 P 0.6	0.240 ± 0.059	1.2 g/L	0.153 ± 0.017	4.506 ± 0.495	90 μg/mL	20 μg/mL/d	Miranda et al. (2019)
FBR tubular 20 litros	NOP-1, N 0.6 P 0.2	0.243 ± 0.066	1.1 g/L	0.200 ± 0.004	3.455 ± 0.079	125 μg/mL	36.17 μg/mL/d	Miranda et al. (2019)
FBR tubular 20 litros	N-1P1, N 0.2 P 1.0	0.200 ± 0.081	1.0 g/L	0.194 ± 0.039	3.565 ± 0.899	150 μg/mL	42 μg/mL/d	Miranda et al. (2019)
FBR tubular 20 litros	N-1P0, N 0.2 P 0.6	0.193 ± 0.096	0.9 g/L	0.214 ± 0.015	3.237 ± 0.226	168.4 μg/mL	52.02 μg/mL/d	Miranda et al. (2019)
FBR tubular 20 litros	N-1P-1, N 0.2 P 0.2	0.250 ± 0.077	0.85 g/L	0.176 ± 0.090	3.936 ± 0.102	65 μg/mL	16.5 μg/mL/d	Miranda et al. (2019)
FBR de biopelícula inmovilizada en ángulo interior	BG-11 modificado	7.5 g/m <sup>2</sup>	12 g/m <sup>2</sup> d	0,047	15	3%	7.2 mg/L/d	Tran et al. (2019)

Fuente: elaboración propia.

El proceso de cultivo de microalgas usando FBR utiliza los parámetros cinéticos de escalamiento como monitoreo del proceso a fin de seleccionar las condiciones adecuadas para producir astaxantina en mayor cantidad, teniendo en cuenta el rendimiento del proceso al utilizar determinada productividad de astaxantina y la velocidad máxima de crecimiento (μ<sub>máx</sub>). En la Tabla 2 se observa que los FBR tubulares y en columna presentan el mejor rendimiento del proceso, con una mejor productividad de astaxantina (Li et al., 2020b). Esta situación puede explicarse por la producción de la biomasa relacionada con la mayor conservación del producto dentro de la célula, como lo explica Deniz (2020). Los FBR que presentan mayor velocidad de crecimiento son los de columna, debido posiblemente a que su forma cilíndrica hace que la luz se distribuya en forma más eficiente (Sanz Martínez, 2019).

Miranda et al. (2019) evalúan de manera independiente el resultado obtenido al momento de suministrar tanto nitrógeno como fósforo al cultivo de *H. pluvialis* mediante el uso de los parámetros cinéticos, como la concentración final de astaxantina y la velocidad específica de crecimiento (μ<sub>max</sub>). Hacen para ello un análisis del efecto de la deficiencia de nitrógeno y

de fósforo, en forma combinada o individual sobre el cultivo de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina; resaltan la inclusión de estos parámetros cinéticos en los procesos de escalamiento y de obtención del carotenoide para determinar su productividad, ya que no existe un modelo preciso que incorpore simultáneamente entradas multiparamétricas como carbono, nitrógeno, fósforo e intensidad lumínica como parámetros definitorios para la vida de las microalgas (Tijani et al., 2018)

En los FBR también deben tenerse en cuenta como parámetros cinéticos de escalamiento el diseño, la forma, el volumen, la distribución de luz, la formación de espuma y los requisitos de energía, así como la agitación que mejora la transferencia de masa y calor e incrementa la cantidad del producto deseado; dependiendo del FBR, los parámetros hidrodinámicos como la constante de difusión o la constante de transferencia de calor cambian, como en los FBR de tanques agitados, dos veces más altos en comparación con los otros tipos de FBR (Deniz, 2020; Guzmán et al., 2020). Estos parámetros cinéticos están relacionados con la aplicación de modelos matemáticos como el logístico, monod, Gompertz, Baranyi-Roberts y exponencial.

### Condiciones de estrés

El uso de fotobiorreactores en el cultivo de *H. pluvialis* permite establecer las condiciones de estrés que favorecen la producción de astaxantina (Tabla 4) y relacionarlas con los parámetros cinéticos de escalamiento como biomasa inicial, biomasa final, productividad, velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, así como las condiciones relacionadas con el tipo de FBR, su diseño, su forma, el tamaño, el mezclado, la velocidad de gases, la esterilidad, la distribución de luz, los controles de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Se ha observado que el coeficiente de transferencia de masa (kl. a) es el parámetro más sensible para la síntesis de biomasa con máxima influencia en la trayectoria de respuesta de crecimiento (Tijani et al., 2018).

**Tabla 4.** Cultivo de *H. pluvialis* en FBR usando condiciones de estrés para producir astaxantina

Fotobiorreactor y volumen del cultivo	Condiciones de estrés	Concentración máxima de astaxantina	Referencia
FBR cilíndricos de vidrio diámetro: 8.2 cm, altura: 15.3 cm	Radiación nuclear rayos $\gamma$ de 4000 Gy saturación de CO <sub>2</sub> , 6%	46.0 mg / L	Cheng et al. (2016)
FBR horizontales de 7 L, que se fabricaron con recipientes de 10 L de capacidad con tapa de plástico y dos tomas de aire alimentadas por bomba.	Adición de NaCl 0.45 % Estrés lumínico de luz azul continua .	9.72 $\mu$ g / mL	Torres et al. (2017)

Fotobiorreactor y volumen del cultivo	Condiciones de estrés	Concentración máxima de astaxantina	Referencia
FBR cilíndrico de 1 L	Alta irradiancia, 450-500 $\mu\text{mol}$ de fotones por $\text{m}^2$ , luz led blanca durante 16 h de 24	$3.1 \pm 0.1$ g/L	Samori et al. (2018)
FBR de columna	Intensidad luminosa, 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , luz blanca Nitrógeno 0 mg /L	71.4 mg/l	Zhang et al. (2018)
FBR cilíndrico	luz constante, lámparas fluorescentes blancas frías con una intensidad de luz de fotón de 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,	10%	Domínguez et al. (2019)
FBR de 20 L	Interacción de la fuente de nitrógeno y la fuente de fósforo, (0.2 g/L) de nitrógeno (0.6 g/L) de fósforo	168.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el tratamiento de $\text{N}_1\text{P}_0$	Miranda et al. (2019)
FBR cilíndricos de 6 L	Luz led blanca continua 170 $\pm$ 3 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	0,049 mg/L	Wong et al. (2016)
FBR cilíndrico de 1 L aireado con bombas de diafragma	Luz led blanca continua 110 $\mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1,77%	Niizawa et al. (2019)
FBR a escala de laboratorio de 2 L	Alta intensidad de luz led blanca, con un ciclo de iluminación de 12 horas que luego pasó a 24 a una intensidad de 5000 lux y una limitación de fosfato 41 mg / L	$27.0 \pm 1.9$ mg / L	Liyanaarachci et al. (2020)
FBR cilíndrico	Irradiación de luz de alta intensidad 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , luz blanca por 16 horas Adición de ácido $\gamma$ -aminobutírico 5 mM	214.48 mg/ L	Li et al. (2020)
FBR cilíndrico	Irradiancia continua de 300 $\mu\text{mol}$ de fotón $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producida por diodos emisores de luz (LED): luz azul (450 nm)	25 a 30 mg g <sup>-1</sup>	Pereira y Otero (2020)
FBR de tubo vertical	Citrato férrico de amonio 5 $\mu\text{M}$ Luz constante blanca de 35000 lux	60 mg/ L	Zhu et al. (2021)
FBR de columna de vidrio 1,2 L	Fuente de nitrógeno en forma de nitrógeno ureico 3mM) iluminación bilateral de alta luminosidad (BHLLI, 300 $\mu\text{mol}$ fotones / $\text{m}^2 / \text{s}$ ). de cada lado)	$2.7 \pm 0.1$ % DW	Wang et al. (2019)
FBR tanque agitado de 2 L	Velocidad de agitación 167 RPM	2,34 mg / L	Deniz (2020)

Fuente: elaboración propia.

Los FBR en el cultivo de *H. pluvialis* utilizan diferentes condiciones de estrés con el fin de aumentar las concentraciones de astaxantina, como fotoinducción, intensidad luminosa, deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo, adición de CO<sub>2</sub>, emisión de rayos gamma, estrés salino, agitación. Forma de FBR como los cilíndricos, tubulares y en columna, los cuales facilitan la distribución de luz en una forma eficiente sobre el cultivo en volúmenes de 1L hasta 20 L, presentan una mayor acumulación de astaxantina, llegando hasta 214,48 mg/ L al usar un FBR cilíndrico con luz blanca con alta irradiancia de 120 μmol/m<sup>2</sup>/s por 16 horas (Li et al., 2020); como desventaja se presentan los costos de capital y operativos altos.

El cultivo se realiza teniendo en cuenta que el *H. pluvialis* y sus productos se cultivan en dos fases en escalas comerciales; primero las células crecen en la fase verde, incrementando su producción (Sun et al., 2017), y luego, a medida que se alcanza la cantidad requerida de biomasa, la acumulación de astaxantina se induce en la fase roja usando las condiciones de estrés previamente mencionadas. Zhang et al. (2018) estudiaron las condiciones de estrés como intensidad luminosa, 400 μmol/m<sup>2</sup>/s, luz blanca con una deficiencia total del nitrógeno (0 mg/L), y obtuvo una concentración máxima de astaxantina de 71.4 mg/L utilizando un FBR de columna.

## CONCLUSIONES

El uso de fotobiorreactores para la obtención de astaxantina permite no solo trabajar volúmenes más grandes, sino también modificar las condiciones de estrés, tanto de la fase verde como de la fase roja, las cuales son un factor importante para obtener cantidades grandes de astaxantina para su uso industrial; de igual manera, el crecimiento de esta biomasa se puede evaluar mediante los parámetros cinéticos de escalamiento, los cuales pueden modificarse o ajustarse para incrementar la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis*; se realiza el proceso en dos pasos: el paso 1 es la producción de biomasa y el paso 2 es el sometimiento a estrés de la biomasa para obtener astaxantina.

## REFERENCIAS

Azizi, M., Motesshafi, H., y Hashemi, M. (2020). Distinctive nutrient designs using statistical approach coupled with light feeding strategy to improve the *Haematococcus pluvialis* growth performance and astaxanthin accumulation. *Bioresource Technology*, 300, 122594. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122594>

Azizi, M., Hejazi, M. A., y Hashemi, M. (2019). Supplementation with polyalcohols and sequential mixotrophy dilution photoinduction strategy boost the accumulation of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*, 511, 734225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734225>

BIOSTAT. (2009). *A Plus Operating Manual*. Sartorius BBI Systems GmbH.

Camacho Kurmen, J. E., González, G., y Klotz, B. (2013). Astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* under different stress conditions. *Nova*, 11(19), 94-104. <https://doi.org/10.22490/24629448.1022>

Cañedo, J. C. G., y Lizárraga, G. L. L. (2016). Considerations for photobioreactor design and operation for mass cultivation of microalgae. <https://doi.org/10.5772/63069>

Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., Y Cen, K. (2016). Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology*, 204, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.076>

Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., y Peng, C. A. (2018). Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology*, 256, 548-551. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.074>

Christwardana, M., y Hadiyanto, H. (2017). The effects of audible sound for enhancing the growth rate of microalgae *Haematococcus pluvialis* in vegetative stage. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(3), 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.08.009>

Jiménez, M. A. C. (2017). *Cultivo masivo de la microalga Haematococcus sp. en fotobioreactores planos para la producción de astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés* [tesis de maestría]. Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Cho, K. S., Shin, M., Kim, S., y Lee, S. B. (2018). Recent advances in studies on the therapeutic potential of dietary carotenoids in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4120458>

Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., y Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101(11), 3801-3807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>

De Mendonça, H. V., Ometto, J. P. H. B., Otenio, M. H., Marques, I. P. R., y Dos Reis, A. J. D. (2018). Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, 633, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.157>

Deniz, I. (2020). Scaling-up of *Haematococcus pluvialis* production in stirred tank photobioreactor. *Bioresource Technology*, 310, 123434. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123434>

Do, T. T., Ong, B. N., Nguyen Tran, M. L., Nguyen, D., Melkonian, M., y Tran, H. D. (2019). Biomass and astaxanthin productivities of *Haematococcus pluvialis* in an angled twin-layer porous substrate photobioreactor: effect of inoculum density and storage time. *Biology*, 8(3), 68. <https://doi.org/10.3390/biology8030068>

Domínguez, A., Pereira, S., y Otero, A. (2019). Does *Haematococcus pluvialis* need to sleep? *Algal Research*, 44, 101722. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101722>

Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., Rodríguez, J., y Camacho K., J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>

Gómez-Torres, L. M., Moreno-Gómez, B., Velásquez-Lozano, M. E., Aguirre-Mancilla, C., & Aguado-Santacruz, G. A. (2014). Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión: Establecimiento y perspectivas de aplicación. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 165-179. <https://doi.org/10.35196/rfm.2014.2.165>

Guzmán, J. L., Acién, F. G., y Berenguel, M. (2020). Modelado y control de la producción de microalgas en fotobiorreactores industriales. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática industrial*, 18(1), 1-18. <https://doi.org/10.4995/riai.2020.13604>

El-Kasas, H. I., El-Sayerd, A. B., Mostafa, M., y Reda, M. K., AB, E. S., Maryam, M., y Marwa, M. (2017). Algal growth and nutrients removal as affected by nitrogen source. *Journal of Environmental Science*, 39(3), 51-73. <https://dx.doi.org/10.21608/jes.2017.20363>

Hernández Morales, K. J., Pérez Morales, M. E., Jáuregui Romo, C., Alcántara Jurado, L. A., y Hurtado Ayala, L. A. (2015). Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*, 46(1), 7-16.

Han, S. I., Yao, J., Lee, C., Park, J., y Choi, Y. E. (2019). A novel approach to enhance astaxanthin production in *Haematococcus lacustris* using a microstructure-based culture platform. *Algal Research*, 39, 101464. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101464>

Ho, S. H., Chen, C. Y., y Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus*. *CNW-N. Bioresource technology*, 113, 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>

Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., y Yang, C. (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*, 3(3), 318-329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>

Kim, J. H., Affan, A., Jang, J., Kang, M. H., Ko, A. R., Jeon, S. M., ... y Kang, D. H. (2015). Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (*Haematococcaceae*, *Chlorophyta*) isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 238-246. <https://doi.org/10.4014/jmb.1410.10032>

Koller, A. P., Wolf, L., Brück, T., y Weuster-Botz, D. (2018). Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(2), 213-220. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1859-y>

Legrand, J., Artu, A., y Pruvost, J. (2021). A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. *Reaction Chemistry & Engineering*. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/re/d0re00450b>

Li, L., Chen, Z., y Huang, Q. (2020). Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid promotes biomass and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 52, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102089>

Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., ... y Yang, S. (2020b). Enhanced biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* by a cell transformation strategy with optimized initial biomass density. *Marine Drugs*, 18(7), 341. <https://doi.org/10.3390/md18070341>

Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., ... y An, Y. (2019). Differences between motile and nonmotile cells of *Haematococcus pluvialis* in the production of astaxanthin at different light intensities. *Marine Drugs*, 17(1), 39. <https://doi.org/10.3390/md17010039>

Liang, C., Zhai, Y., Xu, D., Ye, N., Zhang, X., Wang, Y., y Yu, J. (2015). Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis* grown under high light and nitrogen deprivation stress. *Grasas y Aceites*, 66(2), e077-e077. <https://doi.org/10.3989/gya.0708142>

Liyanaarachchi, V. C., Nishshanka, Gannoru Kankanamalage Sanuji Hasara, Premaratne, Rankoth Gedara Malith Malsha, Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., y Malik, A. (2020). Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports*, 28, e00538. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00538>

Lv, H., Xia, F., Liu, M., Cui, X., Wahid, F., y Jia, S. (2016). Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 20, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.019>

Miranda, A. M., Ossa, E. A., Vargas, G. J., y Sáez, A. A. (2019). Efecto de la baja concentración de nitratos y fosfatos sobre la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. *Información Tecnológica*, 30 (1), 23-32. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000100023>

Morais, E. G. D., Cassuriaga, A. P. A., Callejas, N., Martínez, N., Vieitez, I., Jachmanián, I., ... y Costa, J. A. V. (2018). Evaluation of CO<sub>2</sub> biofixation and biodiesel production by *Spirulina* (*Arthospira*) cultivated in air-lift photobioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018161339>

Mularczyk, M., Michalak, I., y Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*-Multifunctional Applications. *Marine Drugs*, 18(9), 459. <https://doi.org/10.3390/md18090459>

Niño Castillo, C. M., Rodríguez Rivera, F. C., Díaz, L. E., y Lancheros Díaz, A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M., y Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, 255, 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.130>

Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ...y Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>

Onorato, C., y Rösch, C. (2020). Comparative life cycle assessment of astaxanthin production with *Haematococcus pluvialis* in different photobioreactor technologies. *Algal Research*, 50, 102005. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102005>

Orona-Navar, A., Aguilar-Hernández, I., Cerdán-Pasarán, A., López-Luke, T., Rodríguez-Delgado, M., Cárdenas-Chávez, D. L., . . . Ornelas-Soto, N. (2017). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* as a natural photosensitizer for dye-sensitized solar cell. *Algal Research*, 26, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.027>

Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ...y Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, *11*(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>

Paris, G., y Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, *18*, 175-190. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>

Pan-utai, W., Parakulsuksatid, P., y Phomkaivon, N. (2017). Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *12*, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.004>

Pereira, S., y Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, *51*, 102027. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102027>

Richmond, A. (2013). Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 169-204. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>

Rubio-Fernández, D., y Alejandro Hernández, G. (2016). Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. *Iteckne*, *13*(1), 44-56. <https://doi.org/10.15332/iteckne.v13i1.1381>

Sanz Martínez, V. F. (2019). *Diseño de un fotobiorreactor para la obtención de compuestos bioluminiscentes* [tesis de maestría]. Cataluña: Universidad Politécnica de Cataluña.

Shah, M. M., Liang, Y., Cheng, J. J., y Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>

Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K. W., y Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, *233*, 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.011>

Sugawara, T., y Maoka, T. (2021). Marine carotenoids. MDPI. .

Tijani, H., Yuzir, A., Dagang, Wan Rosmiza Zana Wan, Zamyadi, A., y Abdullah, N. (2018). Multi-parametric modelling and kinetic sensitivity of microalgal cells. *Algal Research*, *32*, 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.009>

Tran, H., Do, T., Le, T., Nguyen, M., Pham, C., y Melkonian, M. (2019). Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production on angled bench-scale and large-scale biofilm-based photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, *61*(3), 61-70. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.61\(3\).61-70](https://doi.org/10.31276/VJSTE.61(3).61-70)

Torres-Carvajal, L. K., González-Delgado, Á. D., Barajas-Solano, A. F., Suarez-Gelvez, J. H., y Urbina-Suarez, N. A. (2017). Astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis*: Effects of light wavelength and salinity. *Contemporary Engineering Sciences*, *10*(35), 1739-1746. <https://doi.org/10.12988/ces.2017.711196>

Martínez Rodríguez, P. A., Peinado Cárdenas, M. H., y Camacho Kurmen, J. E. (2022). <https://doi.org/10.21789/22561498.1739>

Wang, F., Gao, B., Wu, M., Huang, L., y Zhang, C. (2019). A novel strategy for the hyperproduction of astaxanthin from the newly isolated microalga *Haematococcus pluvialis* JNU35. *Algal Research*, 39, 101466. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101466>

Wong, Y. K. (2016). Effects of light intensity. *Illumination Cycles on Microalgae Haematococcus Pluvialis for Production of Astaxanthin*, 1-6. <http://www.dx.doi.org/10.15436/2381-0750.16.1083>

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6231-6238. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7301-6>

Zhang, W. W., Zhou, X. F., Zhang, Y. L., Cheng, P. F., Ma, R., Cheng, W. L., y Chu, H. Q. (2018). Enhancing Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* by Coupled Light Intensity and Nitrogen Starvation in Column Photobioreactors. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(12), 2019-2028. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07008>

Zhu, Y., Zhang, Z., Xu, X., Cheng, J., Chen, S., Tian, J., et al. (2021). Simultaneous promotion of photosynthesis and astaxanthin accumulation during two stages of *Haematococcus pluvialis* with ammonium ferric citrate. *Science of the Total Environment*, 750, 141689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141689>