

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**CULTIVO DE LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*,  
EN LOTE Y FOTOBIOREACTOR  
PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.**

**PRESENTA**

**ING. EN ALIMENTOS: ANTONIETA ELIZABETH SOSA LIMA**

DIRECTOR:

DRA. MARGARITA SALAZAR GONZALEZ.

REALIZADO EN:

LAB. DE BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS.

MEXICO, D. F. A 9 DE OCTUBRE DEL 2009.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>JUSTIFICACION</b> .....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	7
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	8
<b>Recepción de la cepa <i>Haematococcus pluvialis</i></b> .....	8
<b>Resiembra y propagación de la cepa (A y G) de <i>Haematococcus pluvialis</i></b> .....	8
<b>Caracterización de <i>Haematococcus pluvialis</i> en cultivo lote</b> .....	9
Experimentos en cultivo lote de <i>Haematococcus pluvialis</i> .	
Parámetros determinados:	
- Medida indirecta de la biomasa celular.	
- Determinación de la concentración de clorofila.	
- Determinación de la concentración de astaxantina.	
<b>Caracterización de <i>Haematococcus pluvialis</i> en fotobiorreactor en cultivo continuo</b> .....	12
Experimentos en cultivo continuo de <i>Haematococcus pluvialis</i> .	
- Preparación de inóculo.	
- Preparación del fotobiorreactor.	
- Arranque y operación del cultivo continuo en fotobiorreactor.	
- Observación de la morfología de <i>Haematococcus pluvialis</i> al microscopio óptico.	
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	13
<b>CONCLUSION</b> .....	31
Fotografías 1 y 2. Células al microscopio óptico de <i>Haematococcus pluvialis</i> , en estado vegetativo (1000 X) y producción de astaxantina (aplanospora) (1000 X).....	34
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	35

# **CULTIVO DE LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*, EN LOTE Y FOTOBIORREACTOR PARA LA PRODUCCION DE CAROTENOIDES.**

## **INTRODUCCION**

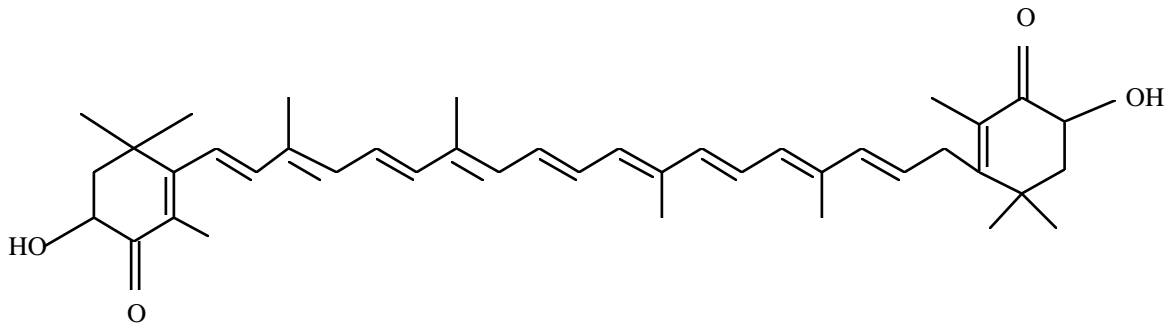
Las microalgas representan un sistema muy eficiente para la bioconversión de la energía luminosa, aunado a la utilización de los elementos nutritivos (nitrógeno, potasio y fósforo), los cuales se encuentran presentes en los diferentes medios acuáticos, además de la fijación de CO<sub>2</sub>, lo cual genera como producto final de la fotosíntesis, el aporte de oxígeno y una producción de biomasa que puede ser utilizable en diferentes áreas en la industria (Salazar, 1996). Es por esto que las microalgas, han adquirido una gran importancia en los últimos años, ya que presentan la solución a diversos problemas tanto en el aspecto de la alimentación como en la producción de biomasa y metabolitos de alto valor agregado de origen natural.

En la actualidad, las microalgas han adquirido gran importancia, debido a los múltiples usos y aplicaciones en los diferentes campos de la investigación y en las necesidades de cada región o país. Actualmente existen más de 3000 especies de microalgas, las cuales han sido objeto únicamente de estudios taxonómicos, y algunos cientos de estudios enfocados a aspectos fisiológicos y bioquímicos. Sin embargo, entre los diferentes campos de estudio se presentan investigaciones acerca de la explotación potencial de las microalgas, en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales, debido a la tolerancia de algunos géneros a concentraciones elevadas de nutrientes; como complemento en la alimentación de humanos y animales, así como en la producción de compuestos activos, como es el caso de las toxinas,

antibióticos y antifúngicos, pigmentos, vitaminas, lípidos y polisacáridos como agentes de viscosidad; en la industria de cosméticos, dietética, farmacéutica, agricultura, acuicultura y avicultura (Beneman, 1989 y 1992; Berlan *et al.*, 1972; Boersma *et al.*, 1975; Borowitzka, 1988; Honeycutt, 1983; Pesando *et al.*, 1979; Picard *et al.*, 1979; Richmond, 1983 y 1992; Thépenier *et al.*, 1985; Park *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006).

La importancia del desarrollo de esta tecnología limpia, se basa en la producción de moléculas activas completamente biodegradables, ya que dependiendo de los objetivos e intereses comerciales, es posible orientar el cultivo hacia las aplicaciones deseadas. Como es el caso de la utilización de los nutrientes contenidos en los efluentes por algunos géneros de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, etc), obteniéndose biomasa como producto, y la oxigenación del medio, mejorando de esta manera la calidad del efluente. Así también, existe la síntesis de metabolitos de origen natural, en algunos géneros de microalgas, como por ejemplo *Haematococcus pluvialis*, la cual produce metabolitos secundarios, de alto valor agregado, como es el caso de los carotenoides tales como astaxantina, la cual es una molécula activa, que tiene importantes aplicaciones en la industria farmacéutica, en la industria de cosméticos, en la de alimentación, en la acuicultura y en el complemento alimenticio de aves de corral.

La fórmula condensada de la astaxantina es  $C_{40}H_{52}O_4$  (3,3'-dihidroxy-*B,B*-caroteno-4,4'-diona) y la desarrollada es la siguiente:



Fórmula desarrollada de la astaxantina (Young y Britton, 1993).

Las tecnologías de cultivo y extracción de productos del metabolismo secundario de las microalgas, han sido desarrolladas en sistemas abiertos y cerrados, dependiendo de la especie en cultivo, siendo los primeros los más utilizados en la producción industrial de microalgas, con fines de alimentación humana como son Japan *Spirulina*, Taiwán *Chlorella*, así también para la producción de metabolitos, tales como el *B*-caroteno a partir de *Dunaliella salina* en Estados Unidos (Cyanotech, Earthrise Farms y Microbio Resources) en Australia (Western Biotechnology y Betatene LTD) (Borowitzka, 1991; Park *et al.*, 2001; Del Campo *et al.*, 2007).

Es importante considerar, que si los sistemas abiertos representan ventajas en cuanto a los bajos costos de instalación, con respecto a los sistemas cerrados, también presentan inconvenientes biológicos como son: la regulación de parámetros de cultivo, problemas biológicos de autosombreado, contaminación por otras especies, presencia de organismos depredadores que pueden llegar a ser dominantes y pueden existir también fluctuaciones en el

cultivo, ocasionadas por variaciones estacionales que modifican la productividad, alteran el metabolismo celular y por lo tanto la composición química de la biomasa algal. Sin embargo la mayoría de los problemas pueden ser solucionados, por la utilización de fotobiorreactores, mejorando las condiciones de cultivo mediante la regulación estricta de los parámetros más importantes, pudiéndose obtener productividades superiores a las reportadas en los sistemas abiertos, alcanzando valores entre 16 y 18 g/m<sup>2</sup>/día (Beneman, 1989; Borowitzka, 1992; Chaumont, 1993; Torzillo *et al.*, 1986; Trota, 1981; Tredici and Materassi; 1992; Richmond, 1992; Salazar, 1995 y 1996; García-Malea *et al.*, 2006; Del Campo *et al.*, 2007; Reza *et al.*, 2008).

Por lo anteriormente descrito, la aplicación de los fotobiorreactores, se presenta como una buena alternativa de solución a los problemas detectados en el crecimiento y desarrollo de las poblaciones algales, así como a la orientación del metabolito de interés, siendo indispensable considerar la biología de la especie a cultivar, así como la factibilidad de orientación del cultivo hacia la producción y extracción de los metabolitos primarios o secundarios de alto valor agregado, que justifiquen económicamente la mayor inversión financiera del fotobiorreactor, lo cual va a garantizar la producción estable de biomasa y metabolitos de calidad constante, que puedan satisfacer la demanda en el mercado nacional e internacional.

De aquí la importancia de las perspectivas del desarrollo de cultivos, producción y extracción de los metabolitos secundarios de origen natural, dada su extensa distribución en el mundo vegetal y animal, debido al interés comercial a escala industrial y a la gran demanda de pigmentos a nivel mundial, siendo ésta anualmente insatisfecha de 20 toneladas por año por parte de Hoffman-La Roche, estimándose el costo de producción en 20 dólares/Kg, con un

costo de venta aproximadamente de 2000 a 2500 dólares/Kg (Johnson, 1991; Lorenz y Cysewski, 2000; Del Río *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2006; Del Campo *et al.*, 2007).

En este trabajo, se plantea la caracterización en lote y en cultivo continuo, orientado hacia la producción de metabolitos de alto valor agregado a partir de la microalga clorofita de agua dulce, *Haematococcus pluvialis*, como el desarrollo de una tecnología limpia, debido a que presenta un gran interés industrial, ya que se caracteriza por sintetizar y acumular carotenoides rojos como es el caso de la astaxantina, bajo condiciones de estrés, llegando a representar un porcentaje mayor entre el 5 y 6 % en peso seco (Bowen, 1967; Kobayashi *et al.*, 1991 y 1992; Lang, 1968; Santos y Mesquita, 1984; Santoshi *et al.*, 2006).

Esta microalga, perteneciente al orden Volvocales, se caracteriza porque durante su ciclo de vida presenta un polimorfismo celular, en el cual se tienen células verdes flageladas que en estadios vegetativos presentan movimiento; células redondas, que han perdido el flagelo y el movimiento; células en estado de palmela, que presentan en la región perinuclear pequeñas cantidades de astaxantina en el cromatóforo, dando comienzo a la acumulación del pigmento rojo astaxantina (sustancia de reserva en condiciones de alta intensidad luminosa o bien como un efecto de protección al aparato fotosintético por la célula) la cual se realiza en el citoplasma de la célula, a diferencia de los pigmentos primarios como la clorofila (Kobayashi *et al.*, 1997).

La presencia de este pigmento, representa un gran interés industrial, debido a las aplicaciones potenciales de la astaxantina como son:

- En la industria farmacéutica: como marcador en el seguimiento de células o como agente antioxidante y antitumoral.
- En la industria de cosméticos: colorante y antioxidante.
- En la industria alimenticia: como colorante de diversos productos.
- En la acuicultura: como fuente de pigmentación en la dieta alimenticia de crustáceos (camarón y langosta), de peces en la fijación del colorante en el músculo de la trucha arco iris y principalmente del salmón, dependiendo de la etapa de desarrollo del pez, así como del estado de maduración sexual y de la forma libre o esterificada del pigmento.
- Como complemento alimenticio de las aves de corral, con la finalidad de incrementar la coloración en la yema del huevo (Borowitzka, 1988; Boussiba y Vonska, 1991; Quinio, 1993; Fan *et al.*, 1994; Guerin *et al.*, 2003; Del Río *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

## **JUSTIFICACION**

En México, existen estudios específicos de las microalgas enfocados a aspectos fisiológicos y bioquímicos, pero no al desarrollo de cultivos enfocados a la producción de metabolitos. Debido a esto, el desarrollo de los cultivos continuos de la microalga *Haematococcus pluvialis* para la producción de metabolitos secundarios de origen natural de alto valor agregado, tales como los carotenoides específicamente astaxantina, con fines de aplicación industrial, (industria farmacéutica, de cosméticos, en la alimentación, en la acuicultura, etc.) se plantea como una excelente alternativa de producción.



La productividad de las microalgas en condiciones naturales nos permite una valorización económicamente interesante, por eso las investigaciones se orientan para desarrollar un crecimiento activo de las algas. Un estudio económico sobre las perspectivas comerciales, reveló que las más interesantes están basadas sobre el análisis de las oportunidades de mercado de 36 productos, además concluye que son rentables: los colorantes, los ácidos grasos, los fosfolípidos, las enzimas y las vitaminas (Callegari, 1989; Park *et al.*, 2001).

De aquí la importancia de las perspectivas del desarrollo de cultivos, orientación, producción y extracción de los metabolitos secundarios de origen natural, dada su extensa distribución en el mundo vegetal y animal, debido al interés comercial a escala y a la gran demanda de pigmentos a nivel mundial.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general

Realizar y orientar el cultivo continuo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, para la producción de metabolitos de alto valor agregado, tales como los carotenoides específicamente astaxantina.

### Objetivos específicos

- I- Caracterizar el cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis* en lote, en condiciones óptimas.
- II- Arranque y operación del cultivo continuo de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactor.

- III- Orientación del cultivo continuo, hacia la mayor producción del metabolito de interés (astaxantina) en fotobiorreactor.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Recepción de la cepa de *Haematococcus pluvialis*.**

Se recibieron 2 cepas en donación, de la Universidad de Santiago de Compostela en España, a las cuales se les denominó A y G.

Datos de la especie

Nombre científico:	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow
Clase:	Cloroficea
Orden:	Volvocales
Temperatura:	25°C
Ciclo de luz - oscuridad:	12 hrs. luz - 12 hrs. Oscuridad

### **Resiembra y propagación de la cepa (A y G) de *Haematococcus pluvialis*.**

Para el mantenimiento de las cepas obtenidas, se llevó a cabo la resiembra y propagación en dos diferentes condiciones de cultivo: en medio sólido con agar y en medio líquido, utilizando el medio químico selectivo Bristol (Salazar, 1995).

En el medio sólido, se trabajó en tubo con tapón de rosca para su mantenimiento en una cámara de incubación GCA (modelo 818), con un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12 hrs. oscuridad y una temperatura controlada de 25°C.

En el medio líquido, se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 135 ml del medio Bristol normal y un inóculo de suspensión algal de 15 ml, para la realización de los cultivos en lote, los cuales fueron cultivados en un agitador orbital (100 r.p.m) con un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12hrs. oscuridad a la temperatura ambiente del laboratorio.

### **Caracterización de *Haematococcus pluviialis* en cultivo lote.**

En el estudio de la caracterización de *Haematococcus pluviialis*, se realizaron diferentes cinéticas de cultivo, para lo cual se trabajó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, con 270 ml de medio Bristol y 30 ml de suspensión algal, de un cultivo en fase exponencial de la cepa A y G.

En los experimentos en cultivo lote de *Haematococcus pluviialis*, se estudiaron las siguientes condiciones de cultivo:

Efecto de la agitación.

**1.-** Con agitación orbital (100 r.p.m) en medio Bristol normal, se trabajó con las cepas A y G, con un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12 hrs. oscuridad, con lámparas de luz blanca y temperatura ambiente del laboratorio.

Los cultivos sin agitación se colocaron en la cámara de incubación, con el mismo fotoperiodo, con luz blanca y temperatura controlada a 25°C. Los parámetros determinados: medida indirecta de la biomasa celular (densidad óptica) y la concentración de clorofila a por la técnica (Azov *et al.*, 1982).

Efecto de la concentración de nitrógeno (nitrato de sodio).

2.- Con agitación orbital (100 r.p.m) en medio Bristol enriquecido, se trabajó con la cepa (A y G) con una concentración de nitrato de sodio de 1.0 y 1.25 g/L, en comparación con la concentración normal de 0.75 g/L, en las mismas condiciones del experimento anterior. Después de 8 días de cultivo, se cambiaron lámparas de luz blanca a lámparas de luz roja. El parámetro determinado: medida indirecta de la biomasa celular (densidad óptica).

3.- Se trabajó con la cepa G, con agitación orbital (100 r.p.m), en medio Bristol enriquecido a diferentes concentraciones de nitrógeno (nitrato de sodio) a 1.0, 1.25 y 1.5 g/L, con un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12 hrs. oscuridad, con lámparas de luz roja y temperatura ambiente del laboratorio. El parámetro determinado: medida indirecta de la biomasa celular (densidad óptica).

4.- Se trabajó con la cepa G, con el medio enriquecido a 1.5 g/L de nitrato de sodio, con agitación orbital (100 r.p.m) con luz continua de lámparas de luz roja y temperatura ambiente. Llevando a cabo la lectura de densidad óptica y determinando la concentración de clorofila a por las técnicas (Azov *et al.*, 1982) y (Fan *et al.*, 1994); para estimar la diferencia entre estas dos técnicas, así como la determinación de la concentración de astaxantina (Boussiba *et al.*, 1992).

5.- Se trabajó la cepa G con diferentes concentraciones de nitrato de sodio 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 g/L, con agitación orbital (100 r.p.m), con luz continua utilizando lámparas de

luz roja y temperatura ambiente del laboratorio. Determinando la lectura de la densidad óptica, la concentración de clorofila a (Fan *et al.*, 1994) y la concentración de astaxantina (Boussiba *et al.*, 1992).

En la evaluación de las cinéticas de cultivo, se determinaron los siguientes parámetros:

-Medida indirecta de la biomasa celular: por medio de la lectura de la densidad óptica a 760 nm, en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU-65).

-Determinación de la concentración de clorofila a: mediante la técnica de metanol caliente (Azov *et al.*, 1982).

-Determinación de la concentración de clorofila a: utilizando dimetil-sulfóxido como solvente para la extracción de la clorofila (Fan *et al.*, 1994); (Boussiba *et al.*, 1991) y (Seely *et al.*, 1972).

-Determinación de la concentración de astaxantina: siguiendo la técnica de extracción con una mezcla de ácido acético y dimetil-sulfóxido (Boussiba *et al.*, 1991 y 1992) (Davies, 1976).

### **Caracterización de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactor en cultivo continuo.**

Preparación de inóculo.

Para la obtención del inóculo para el arranque del fotobiorreactor, se prepararon 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, con 270 ml de medio Bristol enriquecido con 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub> y 30 ml de suspensión algal (cepa G) de cultivo en fase exponencial, en condiciones

de agitación orbital (100 r.p.m) con un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12 hrs. oscuridad y a temperatura ambiente de laboratorio.

Preparación del fotobiorreactor.

El fotobiorreactor, está construido en vidrio, con un volumen de 2200 ml, con una doble capa exterior para el control de la temperatura a 28°C, por medio de la circulación del agua a través de un baño María, la circulación air-lift es llevada a cabo por la entrada de una mezcla de aire y CO<sub>2</sub> en la parte inferior, a través de un filtro estéril. La iluminación es continua, utilizando la combinación de lámparas de luz blanca y luz roja.

Arranque y operación del cultivo continuo en fotobiorreactor.

Una vez inoculado el fotobiorreactor, se lleva a cabo la estabilización de 3 a 6 días en lote, para posteriormente alimentarlo con el medio Bristol modificado a diferentes tiempos de retención, desde 3, 2 y 1.5 días, orientando de esta manera el cultivo hacia la producción de células jóvenes, flageladas, para llevar a cabo la maduración del cultivo hacia la producción de astaxantina. En la evaluación de la cinética de cultivo se determinaron los siguientes parámetros: la medida indirecta de la biomasa celular, por medio de la lectura de la densidad óptica (760 nm) en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU-65).

Observación de la morfología de *Haematococcus pluvialis*, al microscopio óptico Olympus (modelo BH-2).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

En cuanto al mantenimiento, resiembra y propagación de las cepas de *Haematococcus pluviialis*, se pudo llevar a cabo con cierta frecuencia, sin problemas de contaminación para las cepas A y G, por lo que los experimentos de los cultivos de caracterización en lote y en cultivo continuo se realizaron con estas dos cepas.

### **Caracterización de *Haematococcus pluviialis* en cultivo lote.**

Efecto de la agitación.

En los experimentos de caracterización de la cepa de *Haematococcus pluviialis* en lote, se probaron como condiciones iniciales de cultivo, los parámetros de agitación y sin agitación. Los resultados obtenidos en los cultivos (día 28), muestran que el mayor crecimiento poblacional para ambas cepas, utilizadas A y G, en cuanto a la densidad óptica y la concentración de clorofila a, se presenta en los cultivos desarrollados en condiciones de agitación (Figs. 1 y 2), ya que aunque no se trabajó en ambas cepas en la misma condición controlada de temperatura, la agitación favorece la homogenización del cultivo, así como la distribución de nutrientes y por lo tanto genera un mayor crecimiento y desarrollo poblacional, lo cual se observa tanto para la densidad óptica como una medida indirecta de la biomasa, así como para la clorofila a. En la figura 1, se observa que la fase de adaptación se lleva a cabo en los primeros 5 días de cultivo, después de lo cual da inicio la fase de crecimiento exponencial, lo cual concuerda con la concentración de clorofila a (Fig. 2).

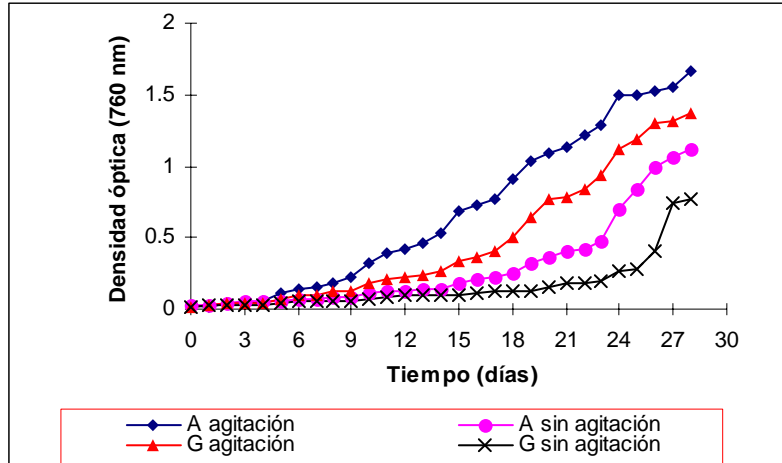


Figura 1. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa A y G, realizadas con agitación y sin agitación.

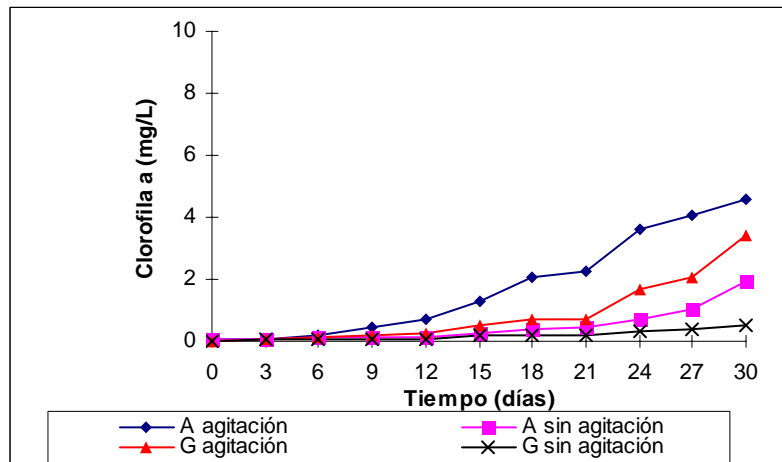


Figura 2. Concentración de clorofila a, (mg/L), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa A y G realizada con agitación y sin agitación. Utilizando la técnica de Azov *et al.*, 1982.



Valores máximos de densidad óptica, alcanzados en agitación.

		Agitación
Cepa A	Densidad óptica (760 nm)	1.66
	Clorofila <u>a</u> (mg/L)	4.6
Cepa G	Densidad óptica (760 nm)	1.37
	Clorofila <u>a</u> (mg/L)	3.4

Efecto de la concentración de nitrógeno (nitrato de sodio).

Considerando que el mayor crecimiento poblacional, se obtuvo en condiciones de agitación, según los resultados en los experimentos anteriores, se decidió conservar este parámetro aunado al enriquecimiento del medio Bristol en cuanto a la concentración de nitrato de sodio a 1.00 y 1.25 g/L, probando ambas cepas A y G con la finalidad de disminuir la fase de adaptación del cultivo, y acelerar la fase exponencial de crecimiento microalgal.

Los resultados obtenidos, se presentan en las figuras 3 y 4, en la cual se observa claramente una disminución de la fase de adaptación del cultivo hasta 3 días para la cepa A, y para la cepa G desaparece prácticamente y entra en fase exponencial. Dada por la medida indirecta de la biomasa celular como lo es la densidad óptica para las dos cepas cultivadas A y G en ambas concentraciones.

En cuanto a las concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  utilizadas, no se presentó una respuesta significativa en las células, ya que se observa que no existe diferencia en el crecimiento en

ambas cepas probadas. Aún cuando en el día 9 se cambiaron las lámparas de luz blanca a lámparas de luz roja con la finalidad de acelerar la fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto la ventaja es disminuir la fase de adaptación para tener cultivos disponibles en menor tiempo posible para futuros experimentos dependiendo de las necesidades de producción.

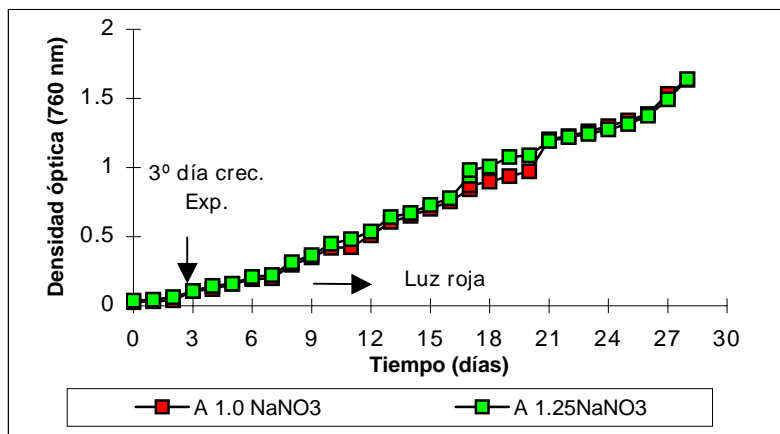


Figura 3. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa A enriquecido el medio a una concentración de 1.0 y 1.25 g/L de NaNO<sub>3</sub>, en condiciones de agitación.

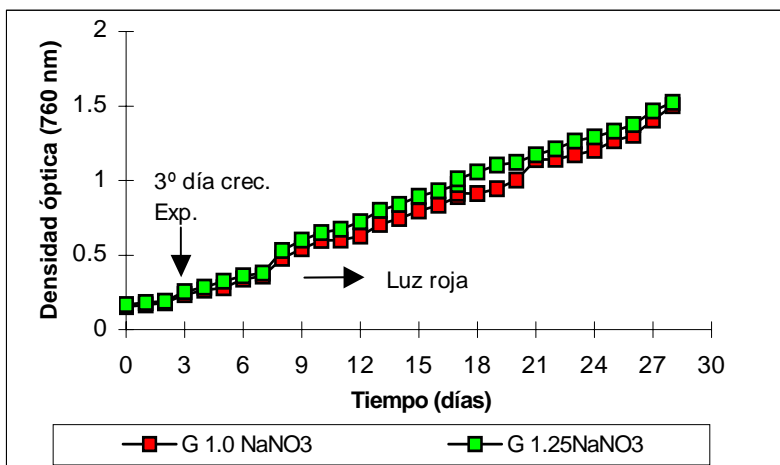


Figura 4. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G, enriquecido el medio a una concentración de 1.0 y 1.25 g/L de NaNO<sub>3</sub> en condiciones de agitación.

Valores máximos de densidad óptica, alcanzados en concentración de NaNO<sub>3</sub>.

		1.0 g/L (NaNO <sub>3</sub> )	1.25 g/L (NaNO <sub>3</sub> )
Cepa A	Densidad óptica (760 nm)	1.50	1.63
Cepa G	Densidad óptica (760 nm)	1.50	1.52

En los experimentos enriquecidos con el medio de cultivo Bristol a diferentes concentraciones de nitrato de sodio 1.0, 1.25 y 1.5 g/L, para el cultivo de la cepa G, se observó que no existe diferencias significativas en el crecimiento durante los 33 días de cultivo (Fig. 5). Ya que comparando con la figura 3 y 4, los valores de la densidad óptica son muy bajos. Especificando que este experimento se desarrollo en invierno, donde la temperatura ambiente de laboratorio es menor, y la temperatura especifica para esta cepa de *Haematococcus pluvialis* es de 25-28°C, y aquí no se controló ese parámetro, por eso la necesidad de trabajar con fotobiorreactores, ya que con ellos controlaremos la temperatura que es un factor físico importante que interviene en el mejor desarrollo y crecimiento de las poblaciones de microalgas.

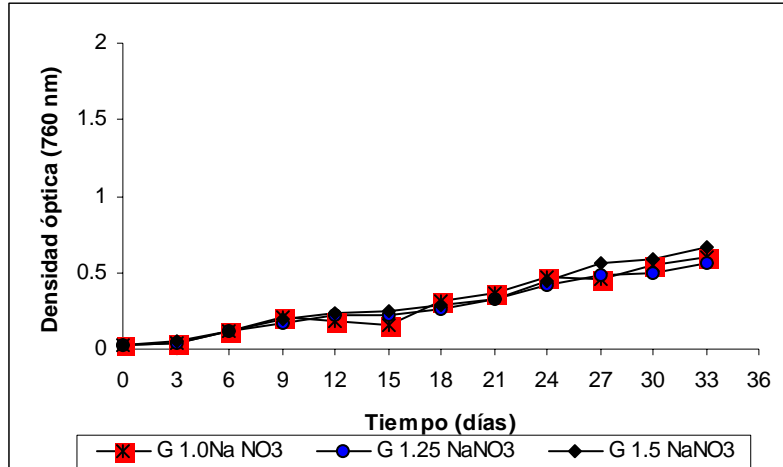


Figura 5. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G, enriquecido el medio a una concentración de 1.0, 1.25 y 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub> en condiciones de agitación, con luz roja y con un fotoperiodo de 12 hrs. luz /12 hrs. oscuridad.

Valores máximos de densidad óptica, alcanzados en diferente concentración de NaNO<sub>3</sub> en el cultivo.

		1.0 g/L (NaNO <sub>3</sub> )	1.25 g/L (NaNO <sub>3</sub> )	1.5 g/L (NaNO <sub>3</sub> )
Cepa G	Densidad óptica (760 nm)	0.59	0.56	0.66

Sin embargo, se observa que con una concentración de 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, bajo condiciones de iluminación (luz roja) continua, se presentó un mayor crecimiento con un valor de D.O (1.17 nm) (Fig. 6), lo cual nos demuestra que comparando con el experimento anterior, la cantidad de la luz es importante en el crecimiento y desarrollo poblacional de las microalgas, ya que al utilizar un fotoperiodo, aun con condiciones elevadas de NaNO<sub>3</sub> no fueron utilizadas por las células. Sin embargo, al utilizar una concentración alta de 1.5 g/L bajo condiciones de iluminación continua, los nutrientes son aprovechados y el cultivo presenta un mayor crecimiento poblacional.

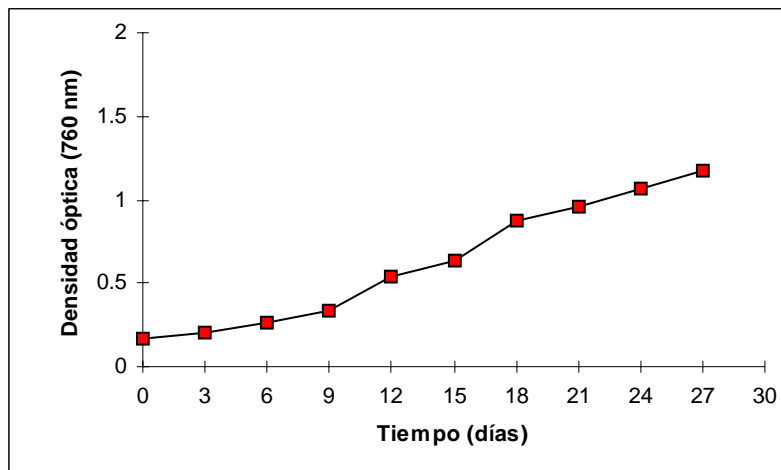


Figura 6. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G, con el medio enriquecido a una concentración de 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, con luz roja continua, en condiciones de agitación.

#### Comparación de extracción de clorofila a.

Una vez que las cepas de *Haematococcus pluvialis*, han sido caracterizadas y cultivadas en las diferentes condiciones experimentales probadas con agitación y sin agitación, con el medio Bristol normal y enriquecido en cuanto a la concentración de NaNO<sub>3</sub>, se procedió a realizar cinéticas de cultivo en las condiciones óptimas de crecimiento con la finalidad de estandarizar las técnicas de extracción de clorofila a y astaxantina.

Con la finalidad de comparar las técnicas de extracción de clorofila a, se desarrollaron cultivos en medio enriquecido a una concentración de 1.5 g/L, en las mismas condiciones que el experimento anterior, probando la extracción con metanol caliente (Azov *et al.*, 1982) y dimetil-sulfóxido (Fan *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos, se presentan en la figura 7, los cuales muestran que con la técnica (Fan *et al.*, 1994), se obtiene mayor concentración de clorofila a, en el día 18 de cultivo con valores máximos de 9.1 mg/L, en comparación con lo obtenido por la técnica de (Azov *et al.*, 1982) con un valor de 7.97 mg/L (Fig. 8).

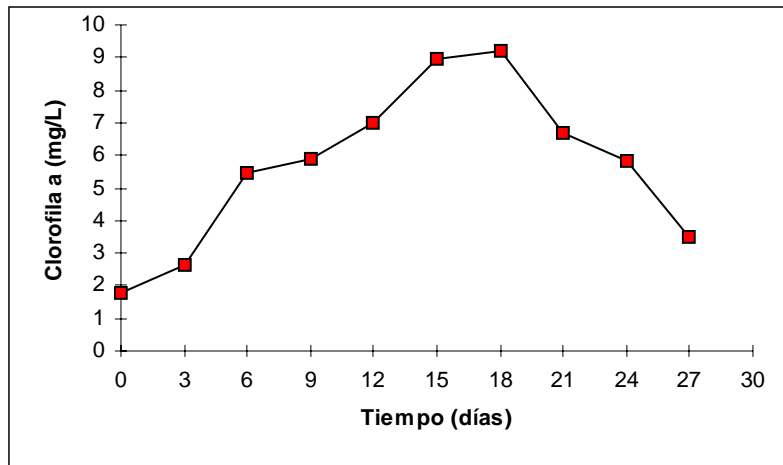


Figura 7. Concentración de clorofila a, (mg/L), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G utilizando la técnica de Fan *et al.*, 1994.

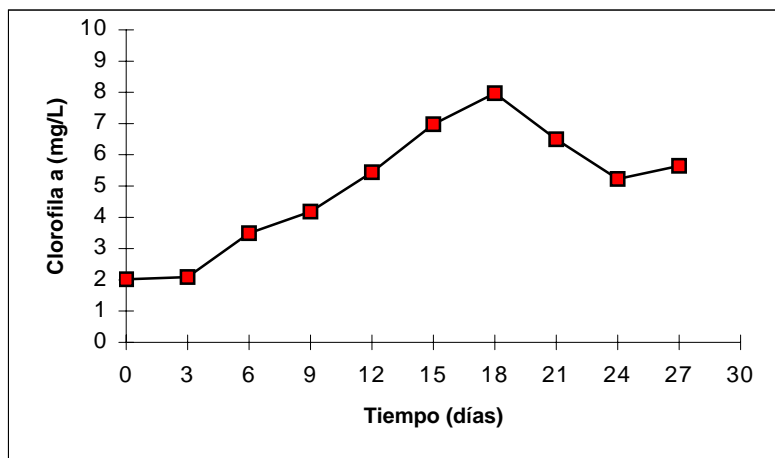


Figura 8. Concentración de clorofila a, (mg/L), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G, utilizando la técnica de Azov *et al.*, 1982.

La necesidad de realizar las dos técnicas de extracción, se llevó a cabo, debido a que *Haematococcus pluvialis*, presenta una capa gruesa de polisacáridos en estado vegetativo, la cual es muy difícil de romper. Pero se observa en las figuras 7 y 8 que ambas técnicas (dimetil-sulfóxido y metanol caliente) son buenas para la extracción de la clorofila a, en las cuales se realiza la extracción completa del pigmento. Como se obtuvieron mejores resultados con la técnica de (Fan *et al.*, 1994), utilizando como solvente el dimetil-sulfóxido se continuo el trabajo con esta técnica.

La concentración de astaxantina, se presenta en la figura 9, en la cual se observa que al principio del experimento, al tiempo cero, no existe la presencia de este pigmento secundario astaxantina, sin embargo comienza a sintetizarse inmediatamente, ya que al tercer día de cultivo se observa una concentración superior a 0.15 mg/L, lo cual nos indica la importancia y el efecto de la iluminación de lámparas de luz roja, ya que el aparato fotosintético se ve inhibido y la célula comienza la síntesis de astaxantina como una respuesta de fotoprotección, llegando a producir en el día 18 de cultivo una concentración superior a 0.74 mg/L.

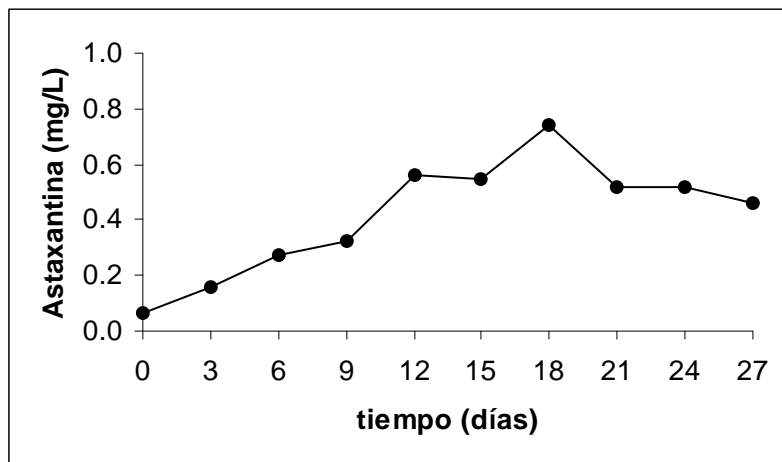


Figura 9. Concentración de astaxantina (mg/L), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G utilizando la técnica de Boussiba *et al.*, 1992.

Considerando los experimentos anteriores y resultados obtenidos, se llevó a cabo un cultivo (cepa G) en el cual se decidió probar diferentes concentraciones de nitrato de sodio 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 g/L, agitación orbital (100 r.p.m), luz continua, lámparas de luz roja y temperatura ambiente de laboratorio. Evaluando la densidad óptica, y las concentraciones de clorofila a y astaxantina.

Los resultados muestran que el mayor crecimiento poblacional, en cuanto a la densidad óptica, así como las mayores concentraciones de clorofila a y astaxantina, se obtuvieron en los cultivos realizados a concentraciones de 0.25 y 1.5 g/L de nitrato de sodio, figuras 10, 11 y 12, lo cual nos demuestra que las condiciones de estrés, a las cuales son sometidas los cultivos, en cuanto a las concentraciones de nutrientes esenciales, en este caso el nitrógeno en forma de nitrato, en deficiencia o enriquecimiento en el cultivo, ocasiona una respuesta positiva, tanto en el crecimiento de las poblaciones algales, como en la producción de



pigmentos primarios, y secundarios en la célula, lo cual ha sido sugerido en trabajos anteriores (Boussiba *et al.*, 1992).

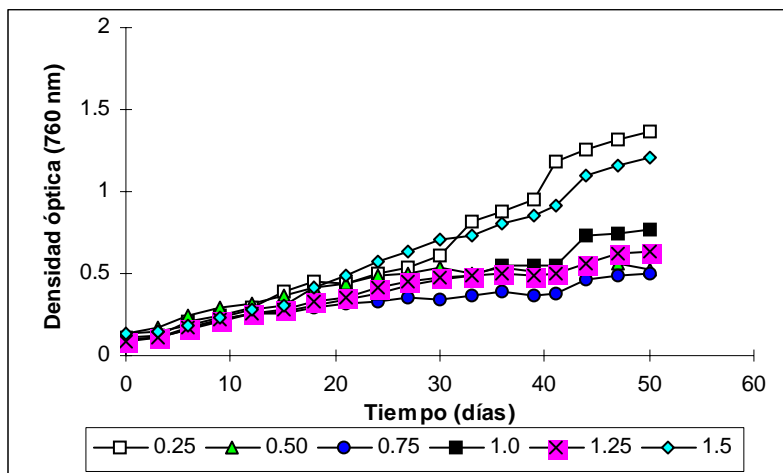


Figura 10. Densidad óptica (760 nm), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G con diferentes concentraciones de NaNO<sub>3</sub>.

Comparando la concentración de clorofila a con la concentración de la astaxantina en el día 50 de cultivo con 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, hay (8.44 mg/L) de clorofila a y menor concentración de astaxantina (0.97 mg/L) ya que este pigmento es de fotoprotección al aparato fotosintético, sin embargo no pierde el contenido de clorofila a ya que son pigmentos primarios y secundarios, figuras 11 y 12. Lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía, que la acumulación comienza inicialmente alrededor del núcleo y continúa progresivamente hasta invadir la totalidad de la célula, confiriéndole el color rojo característico a un quiste de astaxantina (Bubrick, 1991).

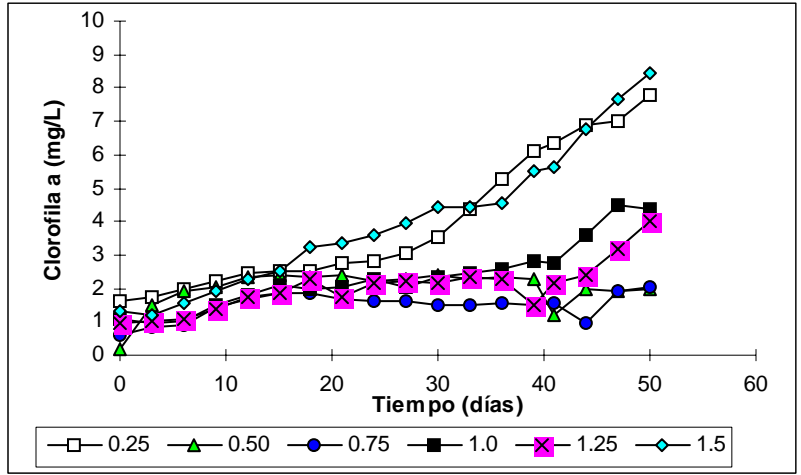


Figura 11. Concentración de clorofila a, (mg/L) del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G utilizando la técnica de Fan *et al.*, 1994.

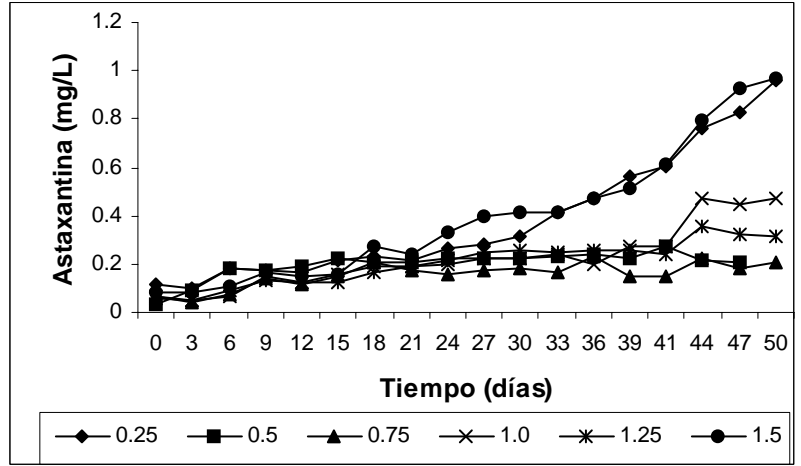


Figura 12. Concentración de astaxantina (mg/L), del cultivo de *Haematococcus pluvialis*, cepa G utilizando la técnica de Boussiba *et al.*, 1992.

Valores máximos de densidad óptica, alcanzados en la concentración mínima y máxima de NaNO<sub>3</sub> en los cultivos experimentales.

Cepa G	0.25 g/L (NaNO <sub>3</sub> )	1.5 g/L (NaNO <sub>3</sub> )
Densidad óptica (760 nm)	1.36	1.20
Clorofila <u>a</u> (mg/L)	7.79	8.44
Astaxantina (mg/L)	0.95	0.97

De acuerdo a éstos resultados, se ha reportado en la literatura, que la síntesis de astaxantina requiere de nitrógeno para la acumulación masiva del pigmento, la cual es inducida siempre que se provoca una alteración en el crecimiento y división celular, bajo lo cual la célula produce metabolitos secundarios (Boussiba *et al.*, 1991); (Maillard *et al.*, 1993). Sin embargo, también acumula carotenoides bajo condiciones desfavorables en el cultivo tal como la deficiencia de nitrógeno (Kobayashi *et al.*, 1992, 1997; Cordero *et al.*, 1996); (Boussiba *et al.*, 1992).

Por lo tanto, entre los principales factores que favorecen la producción masiva de carotenoides, específicamente la astaxantina, han sido reportados la luz, la temperatura alta y los nutrientes, principalmente el aporte del nitrógeno en forma de NaNO<sub>3</sub> (Cordero *et al.*, 1996; Boussiba *et al.*, 1991). De tal manera que la combinación de los diferentes factores de estrés puede estimular la acumulación masiva de la astaxantina, la cual puede representar un porcentaje mayor al 5% en peso seco (Boussiba *et al.*, 1992). En esta microalga verde (*Haematococcus pluvialis*), el contenido de astaxantina se considera del 90% del total de

carotenoides. Por lo tanto las condiciones de estrés inducen al enquistamiento y cambios en su morfología de células vegetativas móviles a inmóviles llamadas aplanosporas (células enquistadas) (Kakizono *et al.*, 1992).

### **Caracterización de *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactor en cultivo continuo.**

Los experimentos realizados en cultivo continuo, se llevaron a cabo con la finalidad de orientar la producción de astaxantina, de acuerdo a las condiciones de estrés aplicadas y al estado del ciclo de vida en el cual se encuentran las células, por lo que se trabajaron en diferentes tiempos de retención en los fotobiorreactores, hasta llevarlos a la producción de células jóvenes. Inicialmente, se inoculó con un cultivo de *Haematococcus pluvialis* en fase exponencial en condiciones totalmente estériles, para evitar cualquier tipo de contaminación, ya que esto podría ocasionar que el cultivo en continuo se pierda y no lograr la estabilización.

El cultivo en lote se estabilizó durante 3 días con lámparas de luz roja y lámparas de luz blanca, seguido por la alimentación en continuo, con medio Bristol enriquecido a una concentración de 1.5 g/L (NaNO<sub>3</sub>), ya que bajo estas condiciones se obtuvieron los mejores resultados en los experimentos en lote, y luego se cambiaron a lámparas de luz blanca a lámparas de luz rojas y en continuo.

El primer tiempo de retención hidráulico es de 3 días, esperando tres cambios de alimentación en el fotobiorreactor, después 2 días y finalmente 1.5 días. Durante todo este tiempo se lleva a cabo la lectura de la densidad óptica, así como la observación de la morfología de las células de las microalgas al microscopio, para saber en que momento dominan en el cultivo

únicamente células flageladas susceptibles de responder más rápidamente a las condiciones de estrés aplicadas al cultivo, produciéndose de ésta manera una mayor concentración de carotenoides.

Se logró estabilizar y alimentar los fotobiorreactores por separado y no en serie como se había diseñado para la producción de células jóvenes por un lado y la maduración en el otro y en continuo. Esto es debido que la microalga *Haematococcus pluvialis*, es una especie que presenta fragilidad celular en fotobiorreactor, debido al fenómeno de polimorfismo celular durante su ciclo de vida, con formas móviles, jóvenes y flageladas, que pueden ser susceptibles de sufrir alteraciones morfológicas.

Los resultados obtenidos, de un sólo fotobiorreactor, se muestran en la figura 13, en donde se puede apreciar que en los tiempos de retención de 2 y 1.5 días la densidad óptica tiende a disminuir, ya que bajó desde 0.500 hasta 0.195, por lo que se decidió suspender la alimentación y conservar los fotobiorreactores en lote para no perder el cultivo y llevarlos nuevamente a la estabilización y maduración.

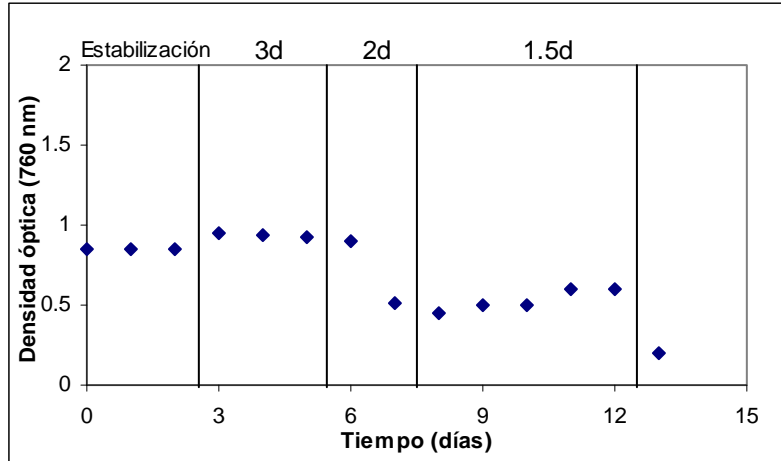


Figura 13. Densidad óptica (760 nm) del cultivo continuo en fotobiorreactor 1 de *Haematococcus pluvialis*, mostrando la estabilización en lote durante 3 días, con iluminación continua y combinada (luz blanca y luz roja), y luego a diferentes tiempos de retención de 3, 2 y 1.5 días con iluminación continua con lámparas de luz roja.

Las observaciones morfológicas llevadas a cabo, durante los diferentes tiempos de experimentación del fotobiorreactor, se presentan en la tabla 1, en donde se observó la presencia de la formación del cromatóforo en las células de microalgas jóvenes con flagelo y en algunas redondas en estado vegetativo, así también es posible remarcar que se observó durante estos experimentos el ciclo de vida completo de *Haematococcus pluvialis*, con células pequeñas, redondas en los sacos, en división con y sin flagelos, y ambas con un cromatóforo perfectamente desarrollado, lo cual nos permite decir que debido a que estos cultivos recibieron la iluminación continua de lámparas de luz roja, a partir de la presencia de células flageladas, nos permite afirmar que es este tipo de luz roja, es la que favorece la síntesis inicial del pigmento astaxantina alrededor del núcleo, que posteriormente abarca la mitad de la célula, continuando progresivamente hasta cubrirla completamente, dando a la célula un color rojo característico de los quistes de astaxantina, lo cual fue observado en el microscopio.

Los cultivos en continuo, llevados a cabo en fotobiorreactor son factibles de realización para *Haematococcus pluvialis*, y seguir trabajando con las condiciones establecidas anteriormente, contando con el equipo necesario y controlando adecuadamente todas las condiciones del cultivo, para orientar la maduración y producción hacia la síntesis de astaxantina.

Tabla 1. Observación de la morfología al microscopio de las células de *Haematococcus pluvialis* cultivadas en continuo en el fotobiorreactor, a diferentes tiempos de retención.

<p align="center"><b>Densidad óptica (760nm.)</b></p>	<p align="center"><b>Observación al microscopio</b></p>
<p>Se inoculó el fotobiorreactor, estabilizandose en lote durante tres días. Con la combinación de lámparas blancas y rojas, con iluminación continua.</p>	<p>La mayoría de las células ovaladas, redondas, no presentan movimiento, verdes completamente.</p>
<p>Se alimentó con medio Bristol con (1.5g/L NaNO<sub>3</sub>). En continuo y TRH= 3 días.</p>	<p>Aquí hay células de todos tamaños, de color verde pasto, algunas flageladas con movimiento pero en poca cantidad, otras redondas.</p>
<p>TRH= 2 días.</p>	<p>La mayoría de las células se encuentran con flagelos, movimiento, alargadas y pequeñas. Otras redondas, todas verdes en menor proporción.</p>
<p>TRH= 2 días.</p>	<p>Las células se encuentran en división, algunas flageladas estas siendo ovaladas y pequeñas, algunas más grandes con movimiento.</p>
<p>TRH= 1.5 días. Cambio de lámparas grox lux (roja) y en continuo.</p>	<p>Células redondas, de todos tamaños las más pequeñas inician alrededor del núcleo el color rojo muy tenue, ovaladas.</p>
<p>TRH= 1.5 días.</p>	<p>Se encuentran más grandes, toman la forma redonda, disminuye un poco la coloración verde.</p>
<p>TRH= 1.5 días.</p>	<p>Se encuentran más grandes, toman la forma redonda, disminuye un poco el color, y presentan cromatóforo pequeño.</p>
<p>TRH= 1.5 días.</p>	<p>Redondas, medianas ya no presentan su cromatóforo pequeño.</p>
<p>TRH= 1.5 días.</p>	<p>Redondas, grandes y verde claro.</p>



## CONCLUSION

En cuanto a la caracterización de la cepa de *Haematococcus pluvialis* A y G, en los experimentos realizados en lote con las diferentes condiciones probadas, en cuanto al parámetro de agitación, los resultados nos muestran que favorece el crecimiento poblacional, ya que existe una homogenización constante y mejor distribución de los nutrientes en el cultivo para biodisponibilidad de las células.

El enriquecimiento del medio de cultivo en cuanto a la concentración de nitrato de sodio como fuente principal de nitrógeno (1.0 y 1.25 g/L), permite la disminución de la fase de adaptación (tres días), aumentando el crecimiento de las microalgas en fase exponencial, lo que favorece la experimentación, así como la producción de inóculo en menor tiempo posible.

A mayor concentración de  $\text{NaNO}_3$  se ve favorecida la división celular y el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis*, ya que es la fuente preferencial de toma de nitrógeno de las células. Así también la temperatura desempeña, un factor importante, ya que afecta las actividades enzimáticas (respiración y fotosíntesis) de las microalgas.

Los resultados mostraron que a concentraciones de 0.25 y 1.5 g/L de nitrato de sodio, se obtiene el mayor crecimiento poblacional, en cuanto a la densidad óptica, así como la concentración de clorofila a y astaxantina, lo que indica que bajo condiciones de estrés, dadas por deficiencia o enriquecimiento de la fuente de nitrógeno, las células presentan una respuesta favorable. Siendo esto de gran importancia para la continuación de los experimentos

dirigidos hacia la producción de biomasa o de carotenoides específicos, dependiendo de los intereses del proyecto.

Otro factor importante es la luz, ya que es necesario considerar la intensidad, la calidad, la cantidad y la periodicidad, ya que influye directamente en el crecimiento de las poblaciones de microalga. Además, la iluminación continua de la luz roja es favorable para la formación de astaxantina, ya que origina la formación del cromatóforo en el citoplasma de las células, sin llegar a perder el contenido de clorofila a, como una respuesta al efecto de protección del aparato fotosintético.

Con respecto, a las técnicas probadas para la extracción de clorofila a, (metanol caliente y dimetil-sulfóxido), es posible afirmar que la extracción completa se lleva a cabo con ambas técnicas, sin embargo se utilizó la técnica de (Fan *et al.*, 1994) con dimetil-sulfóxido (DMSO), ya que es una técnica específica para las microalgas de pared gruesa de polisacáridos y capa mucilaginosa como *Haematococcus pluvialis*, la cual es muy difícil de romper para extraer la clorofila a.

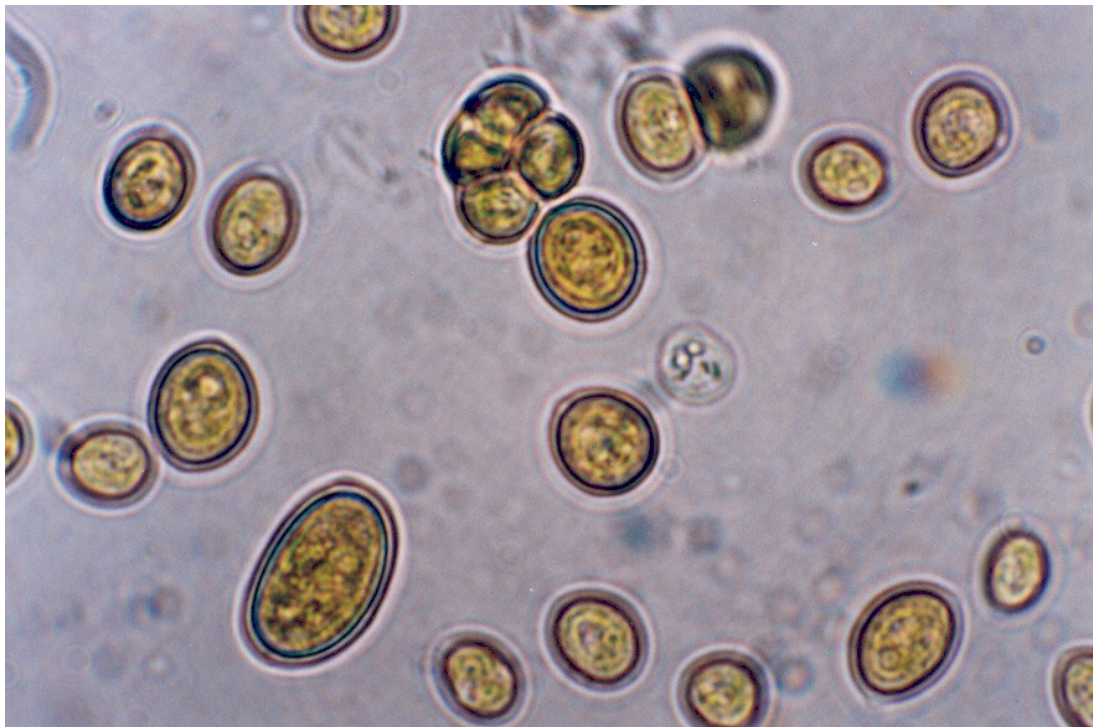
La técnica estudiada, para la determinación de astaxantina presentó una buena extracción ya que son métodos selectivos para esta microalga *Haematococcus pluvialis*.

La realización del cultivo continuo de *Haematococcus pluvialis*, en fotobiorreactor es factible, trabajando en las condiciones probadas en los cultivos lote, ya que se observó el desarrollo completo de la microalga y la formación del cromatóforo, dando inicio a la síntesis de la astaxantina en el citoplasma de la célula, sin embargo es necesario controlar minuciosamente todas las condiciones de cultivo, para poderlo mantener en continuo, en condiciones de operación tales, que nos permitan orientarlo hacia la producción de biomasa o a la maduración completa y producción de la astaxantina, con el objetivo de llegar a desarrollar un proceso de tecnología limpia aplicada en diversos campos potenciales, para satisfacer la demanda nacional e internacional con excelentes expectativas.

La observación al microscopio óptico de *Haematococcus pluvialis*, reveló que durante su ciclo de vida presenta un fenómeno de polimorfismo celular en el cual se presentan células verdes vegetativas, ovaladas, pequeñas de 4-5  $\mu\text{m}$  donde se observa la vacuola grande, células flageladas con gran movimiento en la fase exponencial y luego está asociada con un cambio en la etapa celular a grandes células inactivas e inmóviles y células completamente redondas, las cuales pierden sus flagelos y son un poco más grandes y completamente verdes y luego al someterlas a condiciones de estrés ambiental y nutricional experimentan cambios en la forma y composición celular, siendo así el cambio más pronunciado la acumulación de astaxantina en las células en reposo de 15-20  $\mu\text{m}$  de diámetro. (Fotografías 1 y 2).



Fotografía 1. Células al microscopio óptico de *Haematococcus pluvialis*, en estado vegetativo (1000 X).



Fotografía 2. Células al microscopio óptico de *Haematococcus pluvialis*, en producción de astaxantina (aplanospora) (1000 X).

## BIBLIOGRAFIA

- Azov, Y. Shelef, G. Moraine, R. y Levi, A. 1982 . Controlling algal genera in high rate wastewater oxidation ponds. In: Shelef, G. y Soeder, C. J. (Eds). Algae biomass. Elsevier-North Holland. Amsterdam. pp. 243-254.
- Benemann, J. R. 1989. The future of microalgal biotechnology. *In* : Cresswell R C, Ress TAV, Shah N (Eds). Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Longman Scientific and Technical, New York. pp. 317-337.
- Benemann, J. R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 4: 233-245.
- Berland, B. R., Bonin, D. J., Cornu, A. L., Maestrini, S. Y., and Marino, J. P. 1972. The antibacterial substances of the marine alga *Stichochrysis immobilis*. *J. Phycol.*, Vol. 8, pp. 383-392.
- Boersma, L. Barlow, E. W. R., Miner, J. R. Phinney, H. K. y Olfield, J. E. 1975. Protein production rates by algae using swine manures as substrate. *In*: Jewl, J. W. (Ed). Energy, Agriculture and Management. Mich. Ann. Arbor. Science. Pub. Inc. 475-493.
- Borowitzka, M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals from microalgae. *In* : M. A. Borowitzka and J. Borowitzka. (Eds). Microalgae Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. pp: 153-156.
- Borowitzka, L. J. 1991. Development of western biotechnology's algal  $\beta$ -carotene plant. *Bioresource. Technol.* 38: 251-252.
- Borowitzka, M. 1992. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4: 267-279.
- Boussiba, S., and Vonshak, A. 1991. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32 : 1077-1082.
- Boussiba, S., Fan, L. y Vonshak, A. 1992. Enhancement and determination of astaxantina accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* 213: 386-391.

- Bowen, W. R. 1967. Ultrastructural aspect of the cell boundary of *Haematococcus pluvialis*. *Trans. Amer. Micros.* 86: 36-43.
- Bubrick, P., Microbio Resources, Inc., Suite B -105, San Diego, CA, 92121, U.S.A.  
Production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource. Technol.*, 38: 237-239 (1991).
- Callegari, J-P. 1989. Feu Vert Pour Les microalgues. *Biofutur.* 25-40 p.
- Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 593-604.
- Cordero, B., Otero, A., Patino, M., Arredondo, B.O. and Fabregas, (1996). Astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis*, under different condition stress. *J. Biotechnol. Lett.*, 18: 213- 218.
- Davies, B. H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2<sup>nd</sup> Ed. Vol. 2, pp. 38-165. Academic Press London.
- Del Río E, Acien FG, García-Malea MC, Rivas J, Molina-Grima E, Guerrero MG, (2005a). Efficient One-Step Production of Astaxanthin by the Microalga *Haematococcus pluvialis* in Continuous Culture. *J. Biotechnol.* 91: 808-815.
- Del Campo J.A, García-González M, Guerrero M. G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1163-1174.
- Fan, L. Vonshak, A. and Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 30: 829-833.
- García-Malea M. C, Del Río E, Casas López J. L, Acien Fernández F. G, Fernández Sevilla J. M, Rivas J, Guerrero M. G, Molina Grima E. (2006). Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobiorreactors. *J. Biotechnol.* 123: 329-342.
- Guerin M. Huntley M. E, Olaizola M. 2003. H. astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21: 210-216.

- Honeycutt, S. S., Wallis, D. A. y Selba, F. 1983. A technic for harvesting unicellular algae using colloidal gas aphrons. *Biotechnol. Bioeng.* pp. 13: 567 - 575.
- Johnson, E. A. and G-H. 1991. Astaxanthin from Microbial sources. *Critical reviews in Biotechnology.* 11: 297-326.
- Kakizono, T., Kobayashi, M., and Nagai, S (1992). Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 403-405
- Kim, Z-H., Kim, S-H., Lee, H-S., Lee, C-G. (2006). Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 414-419.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., and Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 335-339.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., and Nagai, S. 1992. Effects of light intensity, light quality and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 61-63.
- Kobayashi, M., Yoshiro Kurimura, Toshihide Kakizono; Naomichi Nishio and Yasunobu Tsuji. 1997. Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga H.P. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* Vol.84, No. 1, 94-97.
- Lang, N. J. 1968 .Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *J. phycol.* Vol.4, pp. 12-19.
- Lorenz R. T. and Cysewski G. R. 2000. Comercial potencial for *Haematococcus pluvialis*, microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.
- Meng, C X, Wei, W, Su, Z-L and Qin, S. (2006). Characterization of carotenoid hydroxylase gene in *Haematococcus pluvialis*. *Indian J. of Biochem. and Biophysic.* Vol. 43 October 2006, pp. 284-288.

- Maillard, P.A., Triki, M. Salazar-Gonzalez, M. and Gudin, C. 1994. Carotenogenesis and Ethylene Production in *Haematococcus pluvialis*. During the Photoperiod in a Closed Tubular Photobioreactor. *Russian J. Plant Physiology*. Vol. 41: 184-188.
- Park, E K, Lee C-G. 2001. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various Light intensities and wavelengths. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11 (6), pp. 1024-1030.
- Pesando, D., Gnassia - Barelli, M., and Gueho, E.G. 1979. Antifungal properties of marine planktonic algae. *In: A. Hoppe et al.* (Eds). *Marine algae in pharmaceutical Science*. De Gruyter. Berlin, New York. pp: 461-472.
- Picard, G. A., De la Noüe, J., Piette, J. P., and Kirovac, C. 1979. Utilisation de l'algue *Oocystis sp.* pour le traitement tertiaire des eaux usées. I. Culture en vrac de cellules préalablement conditionnées en cyclostat. *Water Res.* 13: 1203-1212.
- Quinio, N. 1993. Etude technico-économique d' un pigment caroténoïde: l' astaxanthine. *Critt Biotechnologies, Chimie Fine et Environnement*. pp. 85
- Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraiishi, H., Katsuda, T., Katoh, S. (2008) High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 39: 575-580.
- Richmond, A. 1983. Phototrophic microalgae. *In: Dellweg, H.* (Ed). *Biotechnology*. Verlag. Chemie Weinheim. pp. 111-143.
- Richmond, A., 1992. Open system for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *J. Appl. Phycol.* 4: 281-286.
- Salazar G. M: 1995. Ecochimie et photoproduction de l' astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Université de droit d' économie et des sciences d' Aix - Marseille. Tesis de doctorado.
- Salazar, G. M. 1996. Cultivo y producción de microalgas: desarrollo de una tecnología limpia. *En: Kuppusamy, I, Briones, R.* (Eds). *Biodegradación de compuestos Industriales*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería. pp. 107-116.



- Santos, F. M. and Mesquita, J. F. 1984. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*. 49: 215 - 228.
- Satoshi Yoshimura, Reza Ranjbar, Ryota Inoue, Tomohisa Katsuda, and Shigeo Katoh (2006). Effective Utilization of Transmitted Light For Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis*. *J. of Biosc. and Bioengin.*. Vol. 102, No. 2 pp. 97-101
- Seely, G. R., Duncan, M. J. and Vidaver, W. E. 1972. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Marine Biology*. 12: 184-188.
- Thépenier, C., Gudin, C., and Thomas, D. 1985. Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. *Biomass*. 7: 231-246.
- Torzillo, G., Pushparaj, B., Bocci, F., Balloni, W., Materassi, R., and Florenzano, G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass* 11: 61-74.
- Tredici, M. R., and Materassi, R. 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4: 221-231.
- Trotta, P. 1981. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. *Aquaculture*. 22: 383-387.
- Young, A. and Britton, G. 1993. Carotenoids in photosynthesis. 1 st. De. Chapman and Hall. London pp. 498

