

**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL:**  
**“MAXIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EMPLEANDO**  
***Haematococcus pluvialis*”**

**LUGAR DE REALIZACIÓN:**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA FCB-UANL**

**ASESORA EXTERNA:**

**DRA MYRIAM ELÍAS SANTOS**

**ASESORA INTERNA:**

**M.C. MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO**

**PRESENTA:**

**MANUEL DE JESÚS RAMÍREZ LÓPEZ**

**No. DE CONTROL:**

**14270425**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

## Agradecimientos

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi carrera, por haberme dado su apoyo y consejos en los momentos más difíciles, por depositar su confianza en mí y acompañarme en cada paso que doy en mi vida, por creer en mí, son mi ejemplo y modelo a seguir. Gracias por darme su comprensión y amor, y enseñarme que se debe de luchar por alcanzar los sueños.

A mi hermana, por estar conmigo en todo momento y darme su apoyo incondicional siempre, mi vida no sería igual sin ella.

Al laboratorio 6 del Instituto de Biotecnología de la facultad de ciencias biológicas de la UANL, en especial a la Dra. Myriam Elías y al Dr. Claudio por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y darme la confianza de trabajar al lado de ellos, esta es una etapa muy importante en mi carrera universitaria y la estancia en este laboratorio ha sido de lo más gratificante que me he podido llevar.

A mis alumnos de LBG y QBP por haberme permitido reafirmar mis conocimientos y sobre todo aprender de cada uno de ellos.

A mis docentes por tanta dedicación y entrega durante mi preparación universitaria.

A mis amigos durante mi carrera, Sé que siempre voy a poder contar con ellos en todas las formas, por hacer más amena e increíble la carrera, nos hemos apoyado incondicionalmente desde que nos conocimos y espero que nuestra amistad dure por siempre.

A Alejandra Pimentel, por ser parte de esto, que me ha apoyado incondicionalmente, que ha sabido estar.

A Anthony, por haberme apoyado en todo momento y dado consejos en muchos aspectos. Sé que siempre podré contar contigo, gracias por todo lo que haces por mí, día a día y ser una gran parte de mi felicidad.

## RESUMEN

Esta investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio L6 del instituto de biotecnología FCB-UANL.

En este trabajo se estudió la optimización en la producción de astaxantina empleando la micro alga *H. pluvialis*. Se abordó la problemática de la producción de biomasa y como consecuencia la producción de astaxantina. Se manejaron tres tratamientos todos por triplicados en un periodo de 21 días por cada repetición, llevando a cabo un muestreo de densidad celular por conteo en cámara de Neubauer, así como la ruptura celular y cuantificación de astaxantina.

En un trabajo preliminar se evaluaron cinco fuentes de carbono orgánico en el medio BBM todos por duplicado, para obtener la mayor cantidad de biomasa posible, por medio de los conteos en cámara se descartaron fuentes como glucosa, glicerol, quedándonos con fuentes como urea, acetato y citrato. Para después seguir con los objetivos planteados

Se concluye que el uso de fuentes de carbono como la urea y acetato, así como el uso de hidróxido de amonio como fuente de nitrógeno demostró ser una buena opción para mejorar la productividad del cultivo debido a que la biodisponibilidad que tiene, es mayor a otras alternativas que existen ya que se encontraron gametocitos en el medio de cultivo, mejorando la producción de biomasa de *H. pluvialis* y por ende la producción de astaxantina.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1.- INTRODUCCIÓN.....	6
2 DESCRIPCION DE LA EMPRESA .....	9
3 ÁREA DE TRABAJO.....	12
4.- PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS. ....	12
5. OBJETIVOS.....	13
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
6. JUSTIFICACIÓN.....	14
7. MARCO TEÓRICO .....	16
7.1 ASTAXANTINA .....	16
7.1.2 LA ASTAXANTINA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA .....	18
7.1.3 LA ASTAXANTINA EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA.....	19
7.1.4 LA ASTAXANTINA COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO .....	20
7.1.5 SÍNTESIS QUÍMICA DE LA ASTAXANTINA .....	20
7.1.6 BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA .....	20
7.2 <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	21
7.2.1 ETAPAS DEL CRECIMIENTO DE <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	21
7.2.1.1 HEMATOCISTE .....	22
7.2.1.2 MACROZOIDES .....	22
7.2.1.3 APLANOSPORA O HEMATOCISTE.....	23
7.3 BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA POR <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	23
7.3.1 RUTA DE SÍNTESIS DE ASTAXANTINA.....	23
7.4 CONDICIONES DE ESTRÉS QUE FAVORECEN LA BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA .....	26
7.5 MEDIOS DE CULTIVO .....	26
8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	27
8.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO .....	28
8.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE ASTAXANTINA .....	30

9. RESULTADOS .....	32
9.1 ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS.....	34
9.2 CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA .....	36
10. ACTIVIDADES SOCIALES .....	39
11. CONCLUSIONES DEL PROYECTO, RECOMENDACIONES Y EXPERIENCIA PERSONAL .....	40
12. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS .....	41
13. REFERENCIAS .....	42
14. ANEXOS.....	46

## 1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años la producción de carotenoides ha tenido un aumento comercialmente, esto es debido al reciente interés en uno de ellos la astaxantina. La 3,3'-dihidroxi- $\beta$ . $\beta$ -caroteno-4,4'-diona o astaxantina es un carotenoide perteneciente a la familia de las xantofilas que se encuentra naturalmente en algunos organismos marinos (en exoesqueleto o musculo), en plantas o microorganismos.

Está formado por una estructura hidrocarbonada de 40 átomos de carbono con dos anillos terminales y se puede encontrar en tres formas isoméricas diferentes dependiendo de su fuente de obtención. (Gajardo, 2011)

principalmente la astaxantina se utiliza como pigmento para dar color a los camarones, langostinos o peces como salmones y peces dorados en los criaderos debido a que estos animales no pueden sintetizarla por sí mismos y es necesario agregar cierta cantidad en su dieta para que puedan tener una coloración apropiada y su valor comercial aumente (Choubert, 2006). Sin embargo debido a sus propiedades antioxidantes mayores a las de la vitamina E se ha utilizado más recientemente como suplemento alimenticio, como fármaco o como aditivo en ciertas cremas de uso dermatológico. Algunos estudios defienden que la astaxantina ayuda a proteger contra el estrés oxidativo provocado por los radicales libres que se producen durante la cadena respiratoria, esto ayuda a prevenir daño celular, el envejecimiento celular, pérdida de función de tejidos, entre otras cosas. (Bonilla, 2009) (Gajardo, 2011) (Roland, 2012) (Rao, 2014)

La astaxantina puede obtenerse por diferentes métodos, ya sea sintetizándola químicamente o extrayéndola de una fuente natural, sin embargo la astaxantina de origen natural está certificada para el consumo humano como una molécula segura a diferencia de la de origen químico (Roland, 2012). Existen varios organismos entre los cuales se puede extraer la astaxantina como son *Phaffia rhodozima*, *Paracoccus haeundaensis*, cepas transformadas de *Escherichia coli*, algunas otras bacterias y *Haematococcus pluvialis* (Mostafa y col., 2012)

*H. pluvialis* es una microalga de agua dulce con forma ovoide o circular que mide de 50 a 80  $\mu\text{m}$  de diámetro dependiendo de la etapa en la que se encuentre.

Esta microalga puede crecer de forma autótrofa (con una fuente de carbono mineral y luz) heterótrofa (con una fuente de carbono orgánica sin necesidad de luz) o mixta (con ambas fuentes de carbono y luz), además requiere de otros nutrientes como son una fuente de nitrógeno, fosfatos, micronutrientes (como magnesio, fierro, cobre, etc.) entre otras cosas. Crece en un pH alrededor de 7.4 a una temperatura optima de 25 °C, con una intensidad lumínica cercana a los 2000 lx (Goksan, 2011) y puede crecer en una ambiente abierto o cerrado.

El alga presenta tres diferentes etapas dentro de su ciclo celular evita que crezca de manera acelerada en comparación con otros microorganismos como las levaduras. Esto ha evitado que *H. pluvialis* se situé como la mejor opción para la producción del carotenoide y aparte ha abierto un gran campo de investigación para encontrar las condiciones óptimas que le permitan al alga crecer de manera eficiente.

La producción de la astaxantina está fuertemente relacionada con los cambios morfológicos producidos en la microalga desde un estado vegetativo verde, hasta un estado cístico rojo, donde se presenta la mayor acumulación de astaxantina. Estos cambios son inducidos por factores como la deficiencia de nutrientes (nitrato, fosfato, sulfato), la intensidad lumínica, la salinidad del medio y las altas temperaturas, entre otros (Tripathi y col., 2002).

Bajo condiciones de estrés, se especula que el  $\beta$ -caroteno es transportado a través de la membrana cloroplástica y es convertida a astaxantina, la cual es acumulada en vesículas lipídicas afuera del cloroplasto (Grünwald, 2001). La astaxantina puede alcanzar hasta el 4% del peso seco total de la célula (Tjahjono; Hayama, 1994). Las condiciones de luz y nitrógeno son los 2 factores más efectivos que influyen el crecimiento de la microalga, siendo el nitratos la fuente más disponible de nitrógeno (Perez-García y col., 2012). Sin embargo, el amonio en estado puro no puede

utilizarse debido a que tiene poca estabilidad en medio acuoso y tiende a producir amoníaco el cual disminuye el crecimiento.

El cambio morfológico en *H. pluvialis* de células vegetativas verdes, para incrementar el número de células, a células con quistes rojos que acumulan astaxantina es inducido por algunos factores, tales como; temperatura alta, deficiencia de nutrientes (nitrato, magnesio, sulfato y fosfato), alta intensidad de luz, alta salinidad y estrés oxidativo (Yoshimura & Ranbjar, 2008).

En este trabajo se evaluaron diferentes fuentes de carbono orgánico y condiciones de estrés para maximizar la producción de biomasa así como la producción de astaxantina a partir de *H. pluvialis* en condiciones mixotrófica.





**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**Facultad de Ciencias Biológicas,**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**

## **2 DESCRIPCION DE LA EMPRESA**

El Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, fue creado el 5 de diciembre de 2003, inició labores académicas y científicas en marzo de 2004, y es el primer Instituto de investigación nacional certificado con la Norma ISO 9001:2000.

Hoy en día, el Instituto de Biotecnología cuenta con 23 profesores, 15 de ellos miembros el Sistema Nacional de Investigadores y 10 con reconocimiento de perfil PRODEP, 5 asistentes de investigación y 10 técnicos en un espacio de 10 laboratorios de investigación, área de instrumental, ocho áreas comunes de apoyo a la investigación, una Unidad de Bioprocesos, una Unidad de Bioensayos, un auditorio, un aula y laboratorio de posgrado, una biblioteca, área de informática y área administrativa, lo que representa un total de 4,100 m<sup>2</sup> de construcción.

El Instituto de Biotecnología es sede del programa académico de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, reconocido como de excelencia dentro del Programa Nacional de Posgrados del CONACYT, y de tres Cuerpos Académicos consolidados.

El Cuerpo Académico de Biotecnología (CAB) con clave UANL-CA-111, está conformado por once profesores con grado de Doctor en Ciencias, de los cuales 7 (72.72%) pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores y el 100% cuenta con el Perfil deseable PRODEP. Entre las actividades del CAB, destacan la docencia e investigación en pregrado (licenciatura) y posgrado, así como en servicios de extensión e impartición de cursos extracurriculares de actualización y capacitación.

Como consecuencia del trabajo en equipo, el CAB forma la parte medular del Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología el cual se encuentra dentro del Padrón Nacional de Posgrado (CONACYT), también se encuentra formando parte de una Red de Cuerpos Académicos reconocida por el CONACYT.

El CAB tiene como objetivos la generación de Conocimiento en Ciencia Básica y Aplicada en el área de Biotecnología así como el desarrollo de investigación de punta en áreas estratégicas dentro de sus Líneas de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC): Biotecnología Agrícola, Industrial, Ambiental, Vegetal y Animal, realizando Proyectos de Investigación específicos.

Actualmente tiene líneas de investigaciones como:

- **Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos para el desarrollo de procesos en el control biológico de plagas de interés agrícola, forestal y salud pública, con énfasis en la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los hongos *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana* e *Hirsutella citriformis*.**
- **Desarrollo de procesos y productos para el aprovechamiento de desechos agrícolas.**
- **Genómica estructural y funcional de *Bacillus thuringiensis* y otros microorganismos entomopatógenos o de importancia industrial.**
- **Desarrollo de métodos para la detección molecular de organismos transgénicos y estado sanitario de origen agrícola.**
- **Desarrollo y evaluación de formulados bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* y otros microorganismos entomopatógenos.**
- **Desarrollo, optimización y escalamiento de bioprocesos para la producción de bioinsecticidas a partir de *Bacillus thuringiensis* y de hongos entomopatógenos.**

- **Caracterización y desarrollo de aplicaciones de materiales avanzados basados en biopolímeros con potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.**
- **Uso de microorganismos (principalmente hongos filamentosos) y sus enzimas en procesos industriales a partir de recursos renovables.**
- **Obtención de subproductos (biopolímeros, antioxidantes, antimicrobianos) con alto valor potencial para el desarrollo de ingredientes funcionales con aplicaciones en alimentación, farmacia y cosmética a partir de residuos provenientes de la industria.**
- **Aislamiento y caracterización bioquímica de proteínas.**
- **Obtención de productos microbiológicos potencialmente importantes para la salud humana o animal.**
- **Identificación y producción de compuestos microbianos con actividad antitumoral.**
- **Desarrollo de sistemas diagnósticos para enfermedades infecciosas.**
- **Análisis de compuestos presentes en plantas sobre el crecimiento de microorganismos patógenos.**
- **Desarrollo de procesos para el mejoramiento operacional de reactores de tratamiento de aguas de desecho, sistemas de aceite soluble y torres de enfriamiento.**
- **Generación de procesos de biorremediación microbiana.**
- **Enzimas microbianas en la degradación de compuestos orgánicos persistentes.**
- **Uso de materiales bioadsorbentes en la remoción de contaminantes.**
- **Tecnologías para la producción de combustibles renovables.**

### **3 ÁREA DE TRABAJO**

El proyecto se desarrolló en el laboratorio número 6 del instituto de biotecnología, teniendo a cargo la investigación antes descrita, bajo la supervisión de los encargados de laboratorio.

### **4.- PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOS**

La problemática en el cultivo de *H. pluvialis* radica en su baja tasa de crecimiento, baja concentración celular y susceptibilidad a la contaminación (Göksan, 2010). Y diversos factores de estrés. Estos factores derivan en una baja obtención de los carotenoides de interés industrial como lo es la astaxantina.

Actualmente, hay un incremento en la demanda de la astaxantina producida de forma natural, ya que la astaxantina sintética no está aprobada para consumo humano y a su vez no tiene tanta biodisponibilidad como la producida de forma natural, en contraparte, la FDA garantizó a la astaxantina natural como un producto seguro (GRAS) (Grewe & Griehl, 2012; Capelli & Cysewski, 2013).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de astaxantina en un cultivo de *H. pluvialis* bajo condiciones mixotrófica

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las condiciones de cultivo
- Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono orgánico
- Estimar la tasa de crecimiento de *Haematococcus pluvialis* en medio BBM con citrato de sodio, glicerol, urea, glucosa y acetato de sodio como únicas fuentes de carbono
- Elegir las fuentes de carbono para la producción de astaxantina
- Cuantificar la producción de astaxantina

## 6. JUSTIFICACIÓN

*Haematococcus pluvialis* ha ganado gran interés comercial por su capacidad de acumular altos niveles de astaxantina comparado con otras fuentes.

La 3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4'-diona o astaxantina es un carotenoide perteneciente a la familia de las xantofilas que se encuentra naturalmente en algunos organismos marinos (en exoesqueleto o musculo), en plantas o microorganismos.

principalmente se utiliza como pigmento para dar color a los camarones, langostinos o peces como salmones y peces dorados en los criaderos debido a que estos animales no pueden sintetizarla por sí mismos y es necesario agregar cierta cantidad en su dieta para que puedan tener una coloración apropiada y su valor comercial aumente (Choubert, 2006).

Sin embargo debido a sus propiedades antioxidantes mayores a las de la vitamina E se ha utilizado más recientemente como suplemento alimenticio, como fármaco o como aditivo en ciertas cremas de uso dermatológico. Algunos estudios defienden que la astaxantina ayuda a proteger contra el estrés oxidativo provocado por los radicales libres que se producen durante la cadena respiratoria, esto ayuda a prevenir daño celular, el envejecimiento celular, las arrugas, perdida de función de tejidos, entre otras cosas. (Bonilla, 2009) (Gajardo, 2011) (Roland, 2012) (Rao, 2014)

La astaxantina puede obtenerse por diferentes métodos, ya sea sintetizándola químicamente o extrayéndola de una fuente natural, sin embargo la astaxantina de origen natural está certificada para el consumo humano como una molécula segura a diferencia de la de origen químico (Roland, 2012). Existen varios organismos entre los cuales se puede extraer la astaxantina como son *Phaffia rhodozima*, *Paracoccus haendaensis*, cepas transformadas de *Escherichia coli*, algunas otras bacterias y *Haematococcus pluvialis* (Mostafa y col., 2012) siendo *Haematococcus pluvialis* la más representativa debido a su alta producción; sin embargo debido a que el alga presenta tres diferentes etapas dentro de su ciclo celular evita que crezca de manera acelerada en comparación con otros microorganismos como las levaduras.

Esto ha evitado que *H. pluvialis* se situé como la mejor opción para la producción del carotenoide y aparte ha abierto un gran campo de investigación para encontrar las condiciones óptimas que le permitan al alga crecer de manera eficiente.

Hoy en día las investigaciones han sido encaminadas a optimizar el proceso de crecimiento de la microalga y la acumulación de este metabolito, evaluando parámetros como la intensidad de luz, diferentes medios de cultivo, el efecto del nitrógeno, fósforo, minerales, temperatura, entre otros factores que favorecen el estrés de la microalga.

## 7. MARCO TEÓRICO

### 7.1 ASTAXANTINA

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-diona, figura 7.1) es un pigmento que pertenece a la familia de las xantofilas. Es uno de los principales pigmentos presentes en el medio marino, contribuyendo a la coloración típica del caparazón de muchos crustáceos (camarón, quisquilla, gamba, langosta, etc.), de la carne de salmónidos y de las plumas de algunas aves (flamenco). Este compuesto de coloración rosa-anaranjada fue aislado e identificado por primera vez a partir de langostas (Kuhn y Sorensen, 1938).

Presenta un peso molecular de 596,8 Da; teniendo como fórmula  $C_{40}H_{52}O_4$ . Está compuesta por una larga cadena poliénica de dobles enlaces con un anillo polar de seis carbonos en los extremos, lo que le confiere carácter insoluble en agua y naturaleza lipofílica. Su número del registro del CAS es 472-61-7 y su temperatura de fusión es de aproximadamente 224°C. Cuando cristaliza forma un cristal fino de color marrón violeta oscuro. Es soluble en compuestos orgánicos como el disulfuro de carbono, acetona, benceno y cloroformo. Es insoluble en solventes acuosos y la mayoría de solventes orgánicos, pero puede disolverse a temperatura ambiente en diclorometano, cloroformo, acetona, dimetilsulfoxido y otros solventes no polares.

Este pigmento es una molécula simétrica, que presenta dos centros quirales y que por lo tanto presenta cuatro estereoisómeros: 3R,3'S; 3S,3'R; 3S,3'S y 3R,3'R. Los estereoisómeros con las conformaciones 3S,3'S y 3R,3'R se denominan enantiómeros, mientras que las conformaciones: 3R,3'S y 3S,3'R se les suele llamar conformaciones "meso", siendo formas ópticamente inactivas. En el hongo *X. dendrorhous* la conformación mayoritaria es 3R,3'R; al igual que la existente en el krill. Sin embargo, tanto en el salmón como en el alga verde *H. pluvialis* la conformación predominante es 3S,3'S. En cada anillo terminal existen como sustituyentes un grupo ceto (posiciones 4 y 4') y un grupo hidroxilo (posiciones 3 y 3').



Estos grupos hidroxilo pueden estar libres o pueden reaccionar con un ácido (como un ácido graso) para formar un éster. Así, la formación de esteres con ácidos grasos provoca que la molécula resultante sea más hidrofóbica. En términos de hidrofobicidad, se observa que la hidrofobicidad de los di-esteres es mayor que la de los mono-esteres y que a su vez es mayor que la de la astaxantina libre. Mientras que en el salmón la forma dominante es la libre, en el kril, *Xanthophyllomyces* y *Haematococcus* la forma mayoritaria es la esterificada.

Su utilización dentro de la industria de la acuicultura es muy importante puesto que provee la coloración rojiza-anaranjada a los animales, al carecer de la fuente natural de este pigmento. También, este compuesto es esencial como componente nutricional dado que favorece un adecuado crecimiento y reproducción de los salmónidos y crustáceos. Además de por su color, la astaxantina tiene un gran valor debido a sus propiedades antioxidantes, las cuales han demostrado ser superiores a las del  $\beta$ -caroteno e incluso a las del  $\alpha$ -tocoferol (Niki, 1991).

La astaxantina, a diferencia de otros carotenoides, es uno de los más poderosos antioxidantes que existen en la naturaleza, siendo 550 veces más potente que la vitamina E y 11 veces más que el  $\beta$ -caroteno (López y Mach, 2012) dándole importante valor comercial.

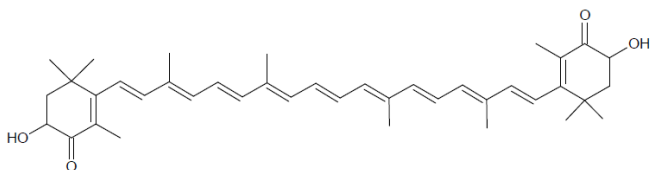


Figura 7.1 Estructura química de la astaxantina

### **7.1.1 LA ASTAXANTINA EN LA ACUACULTURA**

El color rojizo característico de ciertas criaturas marinas (como son el camarón, el salmón entre otros) se debe principalmente a la integración de carotenoides en las membranas celulares de los músculos y exoesqueletos de los organismos, siendo la astaxantina uno de los más importantes. Esto es debido a que la astaxantina por ser un carotenoide liposoluble permite su integración a las membranas celulares de los músculos de los peces (Tolga, 2011).

Los organismos marinos por sí mismos no pueden sintetizar estos carotenoides, sino más bien la obtienen por el consumo de algas pigmentadas que producen los carotenoides para después fijarla. Sin embargo los peces de criadero no se alimentan propiamente con este tipo de algas por lo que tienden a presentar una coloración pobre o nula en sus músculos, lo que reduce su atractivo y valor comercial. Estudios han demostrado que al agregar cierta cantidad de astaxantina a la dieta de los peces de criadero provoca una mejora en la coloración del músculo de estos, aumentando su atractivo comercial además de agregar beneficios a la salud del espécimen como son mejoras en el sistema inmune, antioxidantes, entre otros (Choubert, 2006) por lo que la mayor parte de la astaxantina producida anualmente se destina para esta actividad.

### **7.1.2 LA ASTAXANTINA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

A pesar de que la astaxantina se utiliza principalmente como aditivo en la dieta de peces y crustáceos, debido a su importante actividad como antioxidante en la última década se ha invertido gran cantidad de recursos en la investigación de los beneficios que la astaxantina puede traer al cuerpo humano ayudando en enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, desarrollo de cataratas, degeneración muscular y algunos tipos de cáncer (Ziegler, 1991; Mayne, 1996).

Debido a su actividad metabólica el cuerpo humano crea moléculas altamente oxidativas que se denominan como radicales libres, estos radicales libres pueden causar un daño conocido como estrés oxidativo que se origina en las alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, lo que puede provocar una alteración en las funciones primarias de los sistemas dentro del organismo (Bonilla, 2009). Por su actividad antioxidante la astaxantina puede neutralizar estos radicales libres previniendo el daño oxidativo en el tejido.

Además de esto algunos estudios revelan que la astaxantina también tiene propiedades que mejoran la respuesta inmune y también sirve para reducir el riesgo de vascular y las enfermedades infecciosas cuando se consume en combinación con otros carotenoides como la vitamina E (Rao y col., 2014).

### **7.1.3 LA ASTAXANTINA EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA**

Recientes estudios demuestran que la exposición prolongada al sol causa un daño a la piel llamado foto envejecimiento (Febres 2015). Tanto la radiación UVA como la UVB contribuyen al fenómeno del foto envejecimiento pero de diferentes maneras: Mientras los rayos UVB alteran los componentes celulares y extracelulares directamente, los UVA provocan los daños vía formación de radicales libres, que destruyen lípidos y proteínas de las células de la piel así como la matriz extracelular, desencadenando además procesos inflamatorios en “cascada” hasta la formación de enzimas que degradan la matriz celular llamadas metaloproteínas. Esto lo han visto varias empresas en cosméticos y han lanzado al mercado diferentes cremas y cosméticos con contenido de astaxantina ya que gracias a su poder antioxidante ayudan a reducir los radicales libres formados por los rayos UVA, además de que protegen contra la radiación UVB absorbiendo los rayos en su estructura, brindando protección FPS (Gajardo, 2011).

#### **7.1.4 LA ASTAXANTINA COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO**

Una de las principales causas de la producción de radicales libres en el organismo es debido a la actividad acelerada de la cadena respiratoria en las mitocondrias. Esto puede deberse a una actividad física prolongada como la que realizan deportistas de alto rendimiento (Bonilla, 2005). Una gran demanda de productos enriquecidos en antioxidantes ha tenido un aumento en los últimos años. Es por esto que muchas industrias que se dedican a vender suplementos alimenticios para deportistas han encontrado una forma de satisfacer esta demanda enriqueciendo sus productos con antioxidantes de alto poder como la astaxantina.

#### **7.1.5 SÍNTESIS QUÍMICA DE LA ASTAXANTINA**

De acuerdo con la patente US385961 existen tres procesos patentados de síntesis química de astaxantina, la patente N° 4.245.109 (Mayer et al.) la patente N° 4,283,559 (Broger et. al.) y la patente N° 4,585,885 (Bernhard y col), estas tres patentes mencionan que se parte de un 6,11-dimethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaene-2,15-diyl que después es oxidado por ácido percarboxílico lo que resulta en una  $\alpha$ -siloxo cetona, posteriormente es hidrolizada a  $\alpha$ -hidoxi cetona.

#### **7.1.6 BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA**

Como ya se ha mencionado antes la astaxantina se encuentra de forma natural en diferentes organismos como pueden ser plantas, crustáceos, peces y microorganismos, estos últimos son los que han tenido un valor comercial más importante gracias a su fácil manejo y crecimiento exponencial. A estos organismos se les cultiva generalmente en biorreactores de alta capacidad y en el momento de mayor concentración se les extrae la astaxantina generalmente lisando la célula por procesos físicos o bioquímicos y posteriormente se aplican solventes como son acetona, dimetilsulfóxido, diclorometano, metanol y dimetilsulfóxido (Herrera y col.,

2011). Dentro de los microorganismos que producen este carotenoide se encuentran *Phaffia rhodozima*, *Paracoccus haeundaensis*, cepas transformadas de *Escherichia coli*, algunas otras bacterias y *H. pluvialis* (Mostafa y col., 2012). *H. pluvialis* es de gran importancia comercial, ya que bajo condiciones de cultivo apropiadas es capaz de sintetizar y acumular gran cantidad de astaxantina, (Aravena, 2011).

## **7.2 *Haematococcus pluvialis***

*Haematococcus pluvialis* es un alga verde dulceacuicola que presenta una forma elíptica en las primeras etapas de su desarrollo y una forma circular en las últimas etapas, además en su estado vegetativo presenta una biflagelación lo que le permite movimiento. Esta alga se incluye en la clasificación de Chlorophyta por poseer clorofila a y b. Se considera a *H. pluvialis* como una especie Cosmopolitan, ya que se ha encontrado cepas nativas en todos los continentes, con excepción de la Antártida, aislándola de cortezas secas de árboles, piedras, aguas de charcas de lluvia, etc. (Abalde y col., 1999).

### **7.2.1 ETAPAS DEL CRECIMIENTO DE *Haematococcus pluvialis***

*Haematococcus pluvialis* presenta diferentes estados a lo largo de su ciclo de vida dentro de los cuales pueden distinguirse los siguientes estados se pueden distinguir los siguientes estados: su forma más común y de resistencia denominada hematociste, su forma flagelada alargada denominada macrozooide, su forma pequeña flagelada denominada microzooide y el estado inmóvil de aplanospora encerrada en una fina membrana de celulosa. (Abalde y col., 1999) la célula del alga varía entre estos estados dependiendo de las condiciones del medio donde se encuentre.

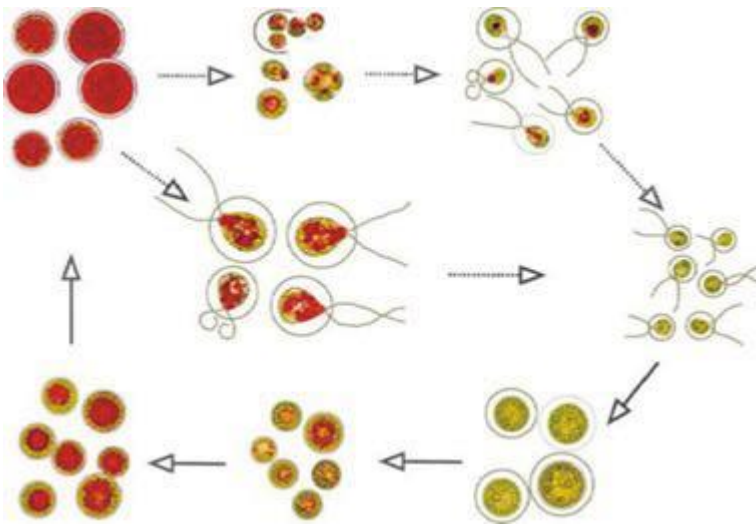


Figura 7.2 Ciclo biológico de *H. pluvialis*. Imagen extraída de Domínguez y col., 2006

#### 7.2.1.1 HEMATOCISTE

Esta es la forma común de la microalga o forma de resistencia, esto se debe a que la pared celular se separa considerablemente del protoplasma unido por delgados hilos que pueden ser simples o ramificados. Este estadio de la célula mide alrededor de 50 a 80  $\mu\text{m}$  de diámetro, presenta una coloración verde sin presencia de astaxantina y además presenta una gruesa capa de celulosa.

Esta capa suele romperse por proteínas líticas cuando la célula encuentra condiciones óptimas para el crecimiento, liberando, gracias a la fisión, varias células hijas en estadios de microzooides o macro zooides.

#### 7.2.1.2 MACROZOOIDES

Este estadio de la célula presenta una flagelación que le permite movimiento al microalga, presenta además una capa delgada, en comparación con la de la hematocite, formada principalmente por glicoproteínas que protege el protoplasma. Mide alrededor de los 50  $\mu\text{m}$  incluyendo los flagelos, lo que relativamente es la mitad del

tamaño de su estadio hematociste. Mientras la célula es joven presenta una acumulación de astaxantina residual proveniente de su estadio de aplanospora que va degradando poco a poco hasta terminarla.

### **7.2.1.3 APLANOSPORA O HEMATOCISTE**

La aplanoespora es la forma más grande de las microalga llegando a medir alrededor de 80  $\mu\text{m}$ , se encuentra cubierta por una membrana compuesta por celulosa y glicoproteínas que protegen al alga de las condiciones estresantes del medio, además presenta una acumulación de astaxantina asociada a la membrana celular que proporciona una protección contra la oxidación y la radiación ultravioleta.

## **7.3 BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA POR *Haematococcus pluvialis***

Es en la etapa de aplanospora donde se acumula principalmente la astaxantina, sin embargo la síntesis del caroteno se lleva a cabo en los macrozooides o microzooides poco antes de convertirse en aplanosporas. Este cambio sucede cuando la célula entra en estado de estrés, ocasionado por falta de nutrientes, altas concentraciones salinas, radiación o altas temperaturas, los que provocan el enquistamiento de la célula y la producción y acumulación de astaxantina (Collins y col., 2015).

### **7.3.1 RUTA DE SÍNTESIS DE ASTAXANTINA**

La ruta de la astaxantina está formada por dos fases, una donde se sintetiza primeramente  $\beta$ -caroteno dentro de las células vegetativas y la posterior donde el  $\beta$ -caroteno es transformado en astaxantina y acumulado en la etapa de aplanospora. La ruta da comienzo con la molécula geranil-geranil difosfato a fitoeno por la fitoeno sintetasa. Después dentro de la membrana por diferentes enzimas como son la fitoeno desaturasa que convierte el fitoeno en  $\zeta$ -caroteno, la  $\zeta$ -caroteno desaturasa lo

transforma posteriormente a licopeno, finalmente el licopeno es transformado a  $\beta$ -caroteno por la licopeno  $\beta$ -ciclasa (Camacho y col., 2013). La segunda fase se activa durante la transformación a aplanoespora como ya mencionamos anteriormente, al  $\beta$ -caroteno es catalizado por la  $\beta$ -caroteno cetolasa de esta forma es oxidada y convertida en grupos intermediarios conocidos como echinenona y cantaxantina, posteriormente la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa agrega los grupos hidroxilo para la formación de la astaxantina (Ramirez, 2013).



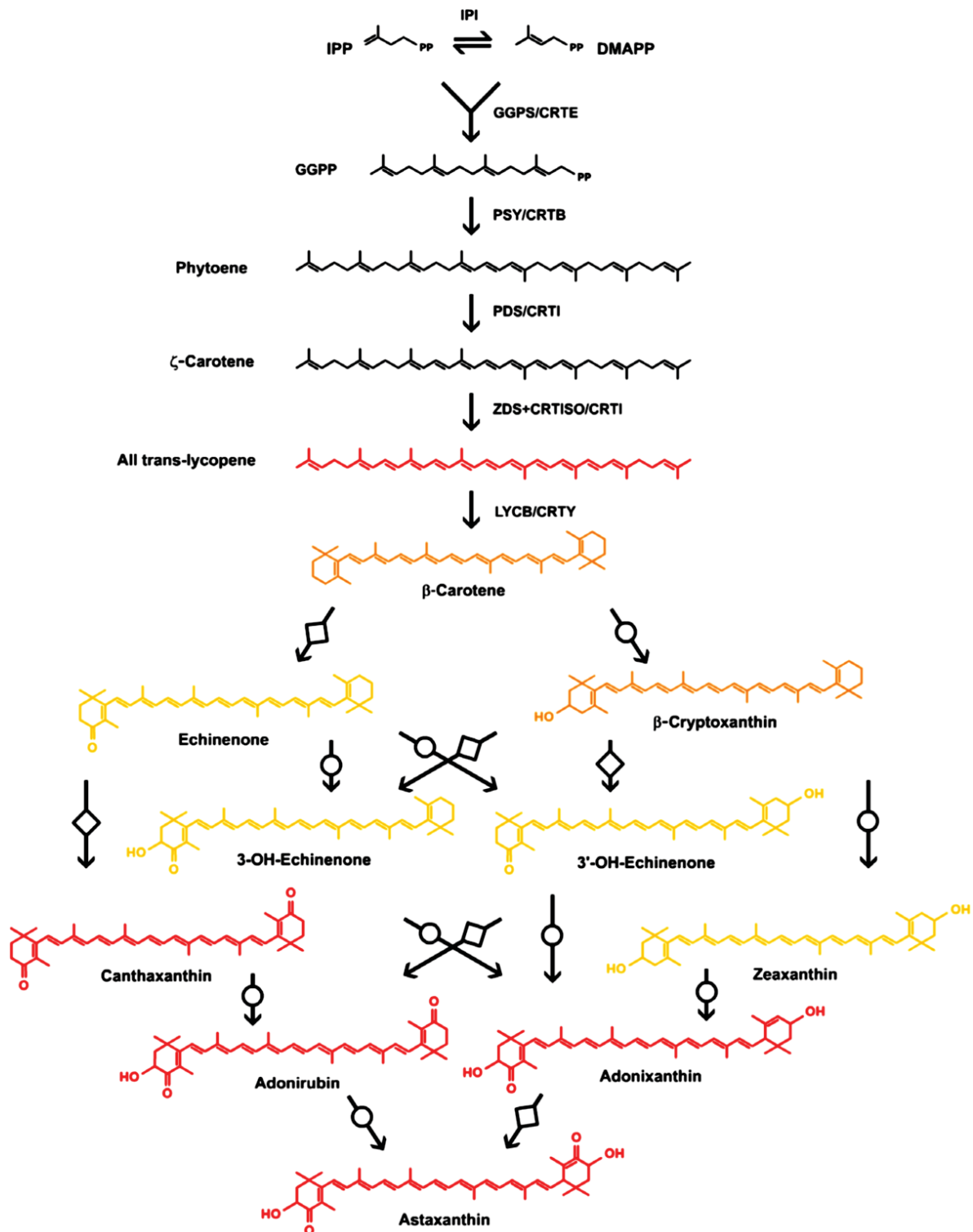


FIGURA. 7.3 Ruta de síntesis de astaxantina o carotenogénesis en la microalga *Haematococcus pluvialis* (Zhu y col., 2009).

## **7.4 CONDICIONES DE ESTRÉS QUE FAVORECEN LA BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA**

Como ya se ha mencionado antes la producción de astaxantina está regulada por diferentes factores que estresan a la célula como pueden ser la falta de nutrientes (nitrógeno, carbono, fosfato), altas temperaturas, radiación, concentraciones altas de sal, entre otras. Dependiendo del tipo o de la intensidad el estrés la microalga puede acumular más o menos cantidad de astaxantina dentro de su membrana, es por esto que el estudio de cómo se comporta el alga a los diferentes tipos de estrés y la cantidad de carotenoide acumulado ha tenido un aumento en la última década. Una investigación realizada por Camacho en 2015 reportó que utilizando diferentes condiciones de estrés y la cantidad porcentual de astaxantina acumulada provocada por dicho estrés donde se puede notar que una combinación de factores de estrés como la cantidad de luz, la concentración de CO<sub>2</sub>, la agitación y el pH puede ser más eficiente que un solo factor.

## **7.5 MEDIOS DE CULTIVO**

Se han reportado diferentes medios de cultivo para el crecimiento autotrófico de *Pluvialis* entre los que se destacan los medios OHM (Fábregas y col., 2001), F1 (Issarapayup y col., 2009) y Medio Basal Bold (BBM) (Vega-Estrada y col., 2005) por su alta productividad.

Fábregas y col., (2001) han reportado una alta densidad celular con un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* (OHM), de  $6,25 \times 10^5$  cel/mL. Por otro lado Tripathi y col., (1999), desarrollan un estudio con los medios de cultivo Basal y Z8, encontrando una mayor densidad celular en el BBM.

## 8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Con el objetivo de maximizar el crecimiento y estimar el tiempo ideal en la cinética de crecimiento, se adaptó de forma preliminar a la microalga cultivándola en el caldo BBM durante 15 días. Se evaluaron cinco fuentes de carbono orgánico en condición mixotrófica. Esto con la finalidad de evaluar la mejor fuente de carbono para el crecimiento óptimo de la microalga.

La microalga es *Haematococcus pluvialis*, obtenida a partir de una cepa cultivada en el Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Como medio de cultivo de referencia, se utilizó el medio basal Bold (BBM) (Kaewpintong y col, 2007).

### Preparación del medio BBM (mg, g, µg /L)

(Kaewpintong y col., 2007).

- **CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O** 25 mg/L
- **KNO<sub>3</sub>** 10 mg/L
- **NaNO<sub>3</sub>** 1.5 g/L
- **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** 75 mg /L
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** 175 mg/L
- **NaCl** 2.513 g/L
- **KOH** 30.85 mg/L
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 0.99 mg/ L
- **FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O** 4.976 mg /L
- **MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O** 4 mg/L
- **ZnSO<sub>4</sub>** 8.827 µg/L
- **CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O** 1.572 g/L
- **H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** 10.948 mg/L
- **EDTA-Na · 2H<sub>2</sub>O** 49.34 mg/L

## 8.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La preparación del inóculo se realizó preparando cinco matraces bafleados de 500 mL, con 400 mL de medio. En cada matraz se le agregó la fuente de carbono correspondiente a cada tratamiento. Se utilizó como tratamiento control medio BBM sin fuente de carbono, y como referencia acetato de sodio (Hata y col., 2001; Jeon y col., 2006).

En base al contenido de carbono presente en el acetato de sodio se estimó la concentración de carbono usado en los demás tratamientos. Esto con la finalidad de asegurar la misma cantidad de carbono en todos los tratamientos.

Tabla 8.1 concentración de las fuentes de carbono

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACIÓN
Acetato de sodio	2.92 g/L
Glucosa	7.30 g/L
Citrato	10.46 g/L
Glicerol	5.92 ml/L
Urea	14.61 g/L

Los matraces se esterilizaron en autoclave por 15 minutos, a una temperatura de 121°C.

## PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Posteriormente se inoculó la cepa de referencia a una concentración de  $3.40 \times 10^4$  células /mL de la microalga a cada matraz.

Todos los matraces se incubaron en una agitadora mara 150 rpm con una temperatura controlada  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 16 días, con luminosidad continua a  $40 \mu\text{mol.foton}/\text{m}^2 \text{S}$ , sin fotoperiodo y en condición mixotrófica.



Figura 8.1 Preparación de medios de cultivo

Se realizó monitoreo cada cuatro días, evaluando conteo celular mediante cámara de Neubauer (células/mL). A partir de esta concentración se procedió a determinar el volumen de inóculo a usar por matraz en los replicados para obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^4$  en un volumen de 350 mL de medio de cultivo, mediante la siguiente fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2.$$

Una vez teniendo el inóculo se realizaron los replicados del inóculo en cada medio con su respectiva fuente de carbono inoculando  $1 \times 10^4$  Células /mL.

Se procedió a un conteo en cámara de Neubauer de las células durante 8 días por triplicado.

El peso seco se determinó al final de los cultivos tomando 50 mL de muestra y centrifugando a 3000 rpm en una centrifuga marca 80-2, durante 20 min, el sedimento fue resuspendido en agua destilada, agitando en Vortex a 2000 rpm (Ramírez, 2013), y centrifugando de nuevo las muestras a 2500 g por 20 min. El precipitado se secó a 60°C hasta obtener peso constante.

## **8.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE ASTAXANTINA**

Para determinar la cantidad de astaxantina total de *H. pluvialis* se realizó la extracción de los carotenos utilizando metanol como solvente y analizando las muestras en un espectrofotómetro Beckman Coulter Mod. DU 650, empleando celda de absorbancia plástica de 2 mL de capacidad y trayectoria de luz de 1 cm. Se tomó una muestra de 1 mL de medio de cultivo, y se centrifugó a 7000 rpm por 5 min utilizando una centrifuga para viales EPPENDORF modelo 5415C. Se retiró el sobrenadante utilizando una micro-pipeta y se le adicionó al precipitado 1 mL de metanol y 0,4 g de partículas de sílica (sílica gel); se realizó el rompimiento celular agitando la muestra con un Vortex a 2000 rpm por 10 min (Ranjbar y col., 2008). Las muestras fueron centrifugadas a 7000 rpm por 5 min, retirando el sobrenadante y repitiendo el procedimiento hasta que no se observó color rojo en la extracción.

Para la cuantificación se utilizó el coeficiente de extinción molar específico para este pigmento, relacionando la absorbancia a una determinada longitud de onda con un valor expresado como coeficiente de absorción; el coeficiente de extinción específico se define como la absorbancia teórica de dilución de concentración 1 % (P/V) en una cubeta de 1 cm de paso de la luz.

## PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

En las literaturas revisadas existen tablas para distintos carotenoides en varios disolventes, especificándose así mismo la longitud de onda que debe leerse la absorbancia (Roman, 2009).

Se mezclaron los sobrenadantes y se determinó la absorbancia a 477 nm, utilizando un coeficiente másico de extinción, A 1% de 2306,6 mL g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> por el método de Davies (1976), descrito por Tripathi y col., (2002) y Aquasearch-Inc. (1999), manteniendo las muestras en completa oscuridad.

## 9. RESULTADOS

Durante la adaptación del inóculo, el empleo de las fuentes carbono como glucosa y glicerol presentaron una buena concentración celular, como se puede observar en la figura 9.1, es importante mencionar que esas son fuentes muy susceptibles a contaminación; por esta razón se optó por descartarlas, eligiendo las fuentes de citrato, acetato y urea para la siguiente etapa del proyecto.



Figura 9.1 Adaptación del inóculo en la fuente de carbono correspondiente

Analizando la cinética de crecimiento obtenida durante esta primera etapa de adaptación del inóculo se pudo observar que en el día 8 es cuando se obtiene mayor biomasa, tal como se observa en la figura 9.2.

Tal como se aprecia en la figura la glucosa resultó ser la mejor fuente de carbono, estos resultados son similares a lo reportado por Borowitzka en 1999. Este comportamiento se debe a la mayor biodisponibilidad de carbono en la glucosa, así



también es sabido el efecto benéfico de la glucosa en la carotenogénesis, sin embargo es una fuente muy susceptible a contaminación.

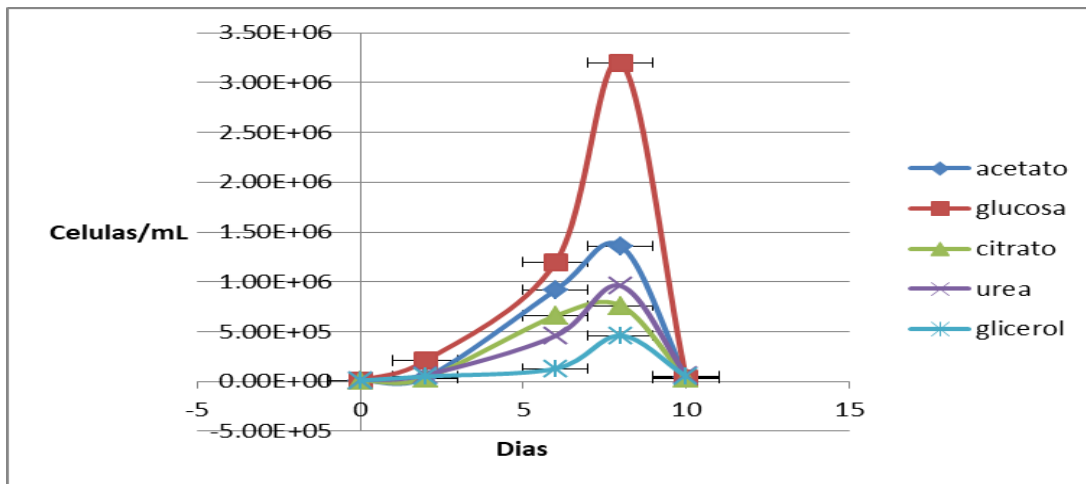


Figura 9.2 Cinética de crecimiento de *H. pluvialis*

Las condiciones de cultivo se mantuvieron a lo largo de los 10 días de cultivo. Para evaluar el efecto de los diferentes fuentes de carbono y las condiciones establecidas sobre el crecimiento de *Haematococcus*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, Para realizar todos los análisis se empleó el programa STATGRAPHICS.

De acuerdo al análisis realizado se encontró que no existe diferencia significativa en los tratamientos respecto al control en los días 0-6, sin embargo en la figura 9.2 podemos ver como *H. pluvialis* se va adaptando a cada fuentes de carbono, todo esto de acuerdo a su biodisponibilidad. El análisis estadístico indica que sí existe diferencia en el día 8, donde se observa mayor tasa de crecimiento tanto en acetato y urea, superando la producción máxima en el día 12 reportado por Imamoglu y col., (2007), quienes reportan una concentración celular de  $9.50 \times 10^5$  células/mL, utilizando diferentes medios de cultivos y con variaciones de luminosidad.

## 9.1 ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS

El cálculo de la velocidad de crecimiento específico fue realizado empleando la siguiente ecuación:

$$\mu (d^{-1}) = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Dónde:

$\mu$ : Velocidad de crecimiento específico;

x: Número de células

t: Tiempo

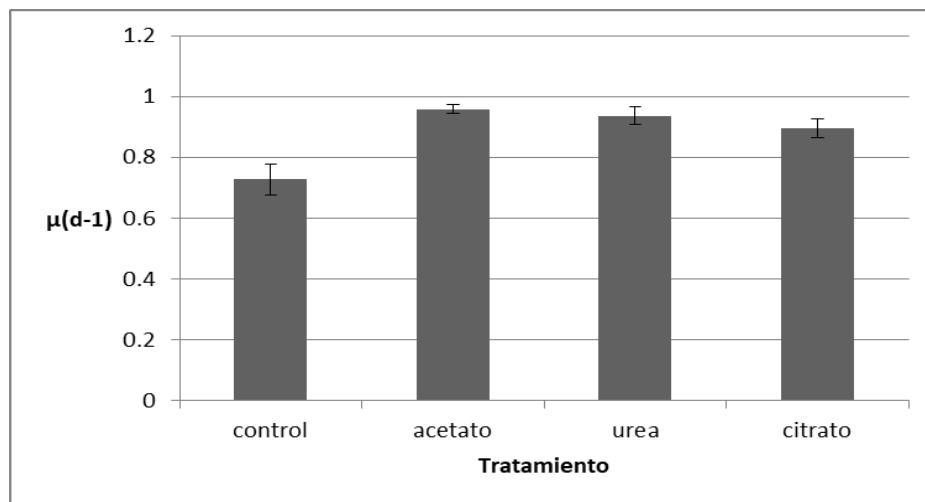


Figura 9.3 Velocidades de crecimiento específica de *H. pluvialis*

En la figura 9.3 se puede observar que las velocidades específicas se mejoran respecto al tratamiento de control, y superan la velocidad específica reportada por Escurero (2004), quien reporta una velocidad de crecimiento de  $0.80 \text{ d}^{-1}$ , utilizando BBM como control y la evaluación de fertilizantes Plantafol (PT), Nitrocel+agro-K (NA), Bayfolán (BF). Este comportamiento se debe a la mayor disponibilidad de carbono en el medio así como la presencia de nitrógeno tal es el caso de la urea.

En la figura 9.4 se muestra el peso seco promedio obtenido en los replicados, según el tratamiento, se puede observar un rendimiento promedio máximo de  $6.08 \text{ g/L}$  superando al control que se obtuvo  $4.98 \text{ g/L}$ , estos resultados se asemejan a lo reportado por García-Malea López y col., en 2006 quien reporta  $7 \text{ g/L}$  de producción máxima en su evaluación en distintos medios de cultivo.

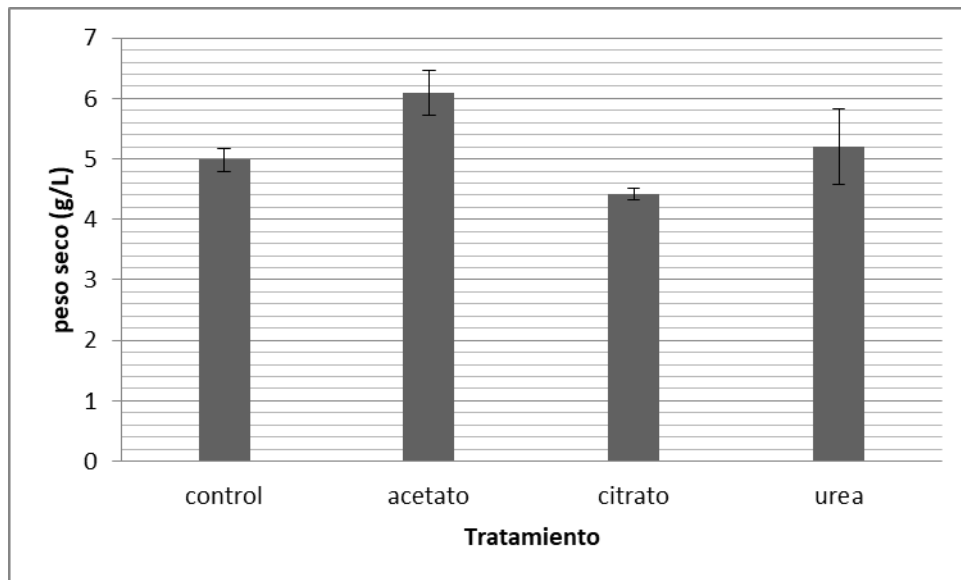


Figura 9.4 Pesos secos de *H. pluvialis* empleando diferentes fuentes de carbono

## 9.2 CUANTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA

La cuantificación de astaxantina utilizando el coeficiente de extinción molar, permitió realizar un análisis estadístico donde se observó que no existe diferencia significativa en lo obtenido de astaxantina en los tratamientos como se observa en la figura 9.5.

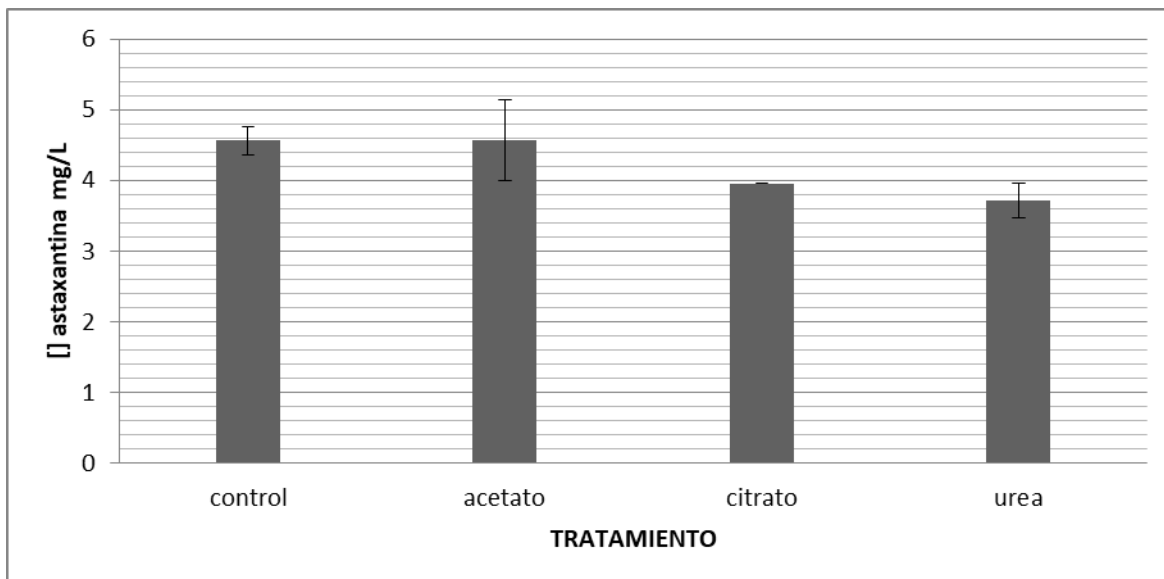


Figura 9.5. Concentración de astaxantina en cada tratamiento.

Los rendimientos de astaxantina en cada tratamiento se asemejan al tratamiento control que presenta un alto rendimiento como se puede observar en la tabla 9.1, se evidencia la eficiencia del medio BBM como lo citan diferentes trabajos anteriores, en el presente trabajo podemos ver como las fuentes de carbono si influye directamente a la producción de astaxantina, así como las condiciones de estrés que se manejaron, ya que en el control la micro alga se ve afectada por una deficiencia de nutrientes a diferencia de los tratamientos en que se vieron enriquecidas por una fuente de carbono, y es por esto que se estresa más y como respuesta a este estrés, induce a la producción de astaxantina, los resultados de los rendimientos son buenos en cada tratamiento, sin embargo se notó que el rendimiento de astaxantina en la fuente de urea respecto al control es bajo comparado con el control.

Tabla 9.1 Rendimientos de producto respecto a la biomasa obtenida

Fuente	Y p/x (mg producto/g biomasa)
control	0.91493
acetato	0.75026
citrato	0.89585
urea	0.71331

Es interesante mencionar que la morfología de las células observadas en el cultivo con urea, evidenciaron mayor tamaño comparada a las morfologías generadas con las otras fuentes de carbono, este fenómeno sugiere que se podría obtener más rendimiento de este pigmento aplicando métodos de extracción ya sea usando otros solventes o métodos más precisos, como lo es el caso de fluidos súper críticos debido a que en el estado de aplanospora la célula se enquista de manera considerable aumentando su grosor y resistencia como lo describen Hagen y col., (2002). Así también el hecho de que la fuente urea contiene nitrógeno contribuye al buen desarrollo de la célula *H. pluvialis*, sin embargo la poca producción de astaxantina se debe probablemente a que el medio no está completamente limitado de nitrógeno y no favorece a un estrés total del alga para sintetizar astaxantina como lo describen Harker y col., (1996).

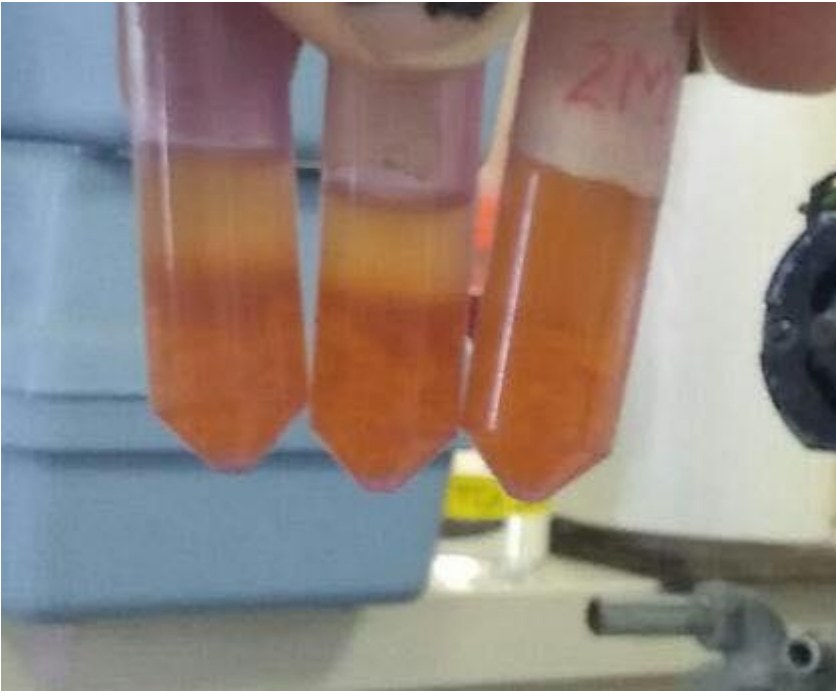


Figura 9.6 Extracción de astaxantina con solvente orgánico

## 10. ACTIVIDADES SOCIALES

En apoyo al equipo de trabajo y para reforzamiento de conocimientos propios impartí clases de la materia de biotecnología industrial a alumnos de séptimo semestre de las carreras de Químico Bacteriólogo Parasitólogo y Licenciado en Biotecnología Genómica.

Con el fin de complementar la materia se realizaron visitas guiadas al viñedo Rivero Gonzales, ubicado en parras Coahuila, así también se visitó la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma (Heineken México), donde se nos enseñó tanto parte de la historia y su proceso de elaboración principio a fin .

También se me capacitó de manera teórica-practica en la elaboración de cerveza artesanal tipo *ALE*, *PALE*, *STOUT*, *PORTER* e *IPA*. Posterior a la capacitación se me designo impartir los cursos de la misma manera teórica-practica a diferentes grupos, con duración de mes y medio cada curso

## 11. CONCLUSIONES DEL PROYECTO, RECOMENDACIONES Y EXPERIENCIA PERSONAL

Los resultados presentados en esta investigación han demostrado que bajo estas condiciones *H. pluvialis* tiene el crecimiento celular óptimo, cuyo valor de crecimiento celular rebasa a las literaturas que evalúan diferentes medios de cultivo, cuyo resultado es muy favorable si ponemos a consideración la producción de astaxantina.

Con respecto a la producción de astaxantina se obtuvieron valores muy atractivos, teniendo en cuenta que el método de extracción y cuantificación es viable económicamente; esto comparado con métodos actualmente más costosos.

Un aspecto importante a atender en el cultivo de esta microalga y producción de astaxantina es la contaminación por bacterias y otros microorganismos; deben tomarse las medidas adecuadas para evitar la contaminación desde el medio donde se desarrollan los cultivos así como los errores de manipulación de los equipos todo esto para llevar los cultivos a buen término.

Es necesario realizar un estudio puntual de la microalga utilizada como inóculo en esta investigación, con la finalidad de observar cambios ocasionados por el empleo del mismo medio de cultivo durante mucho tiempo. Todo esto con el fin de asegurar la estabilidad de la cepa.



## 12. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

Durante la estancia en el instituto de biotecnología y al trabajar en el proyecto me permitió implementar muchos conocimientos adquiridos durante la carrera, poniendo en práctica las bases de la ingeniería bioquímica que en su momento se vieron quizás de manera teórica, y con esto el llevarlo a la práctica y el ir rediseñando metodología para la optimización de bioprocesos. Así como aprendizaje con trabajo individual y colectivo.

De igual manera me es muy grato haber aportado conocimientos al equipo de trabajo, sé que los resultados obtenidos serán de gran ayuda para terminar con el proyecto "Obtención de condiciones óptimas para la producción de Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* a nivel de laboratorio y planta piloto" clave CT290-15

## 13. REFERENCIAS

Aravena-Contreras R I, Del Valle J M. (2011) Extracción de astaxantina de *haematococcus pluvialis* usando co<sub>2</sub> supercrítico. Santiago de Chile: Pontificia universidad católica de Chile.

Abalde J, Orosa M, Torres E, Cid A. (2011) Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados. Coruña España: Universidad de Coruña.

Bonilla F, Narváez R, Chuairé L. (2009). Sports as a cause of oxidative stress and hemolysis. *Colombia medica*.

Camacho-Kurmen J E, González G, Klotz (2013). B. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés.

Choubert G, Mendes-Pinto M, Morais R. Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*. 2006.

Collins A, Jones H, Han D, Hu Q, Beechem T, Timlin J. (2011). Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis*. *PLOSone*.

Cordero B, Otero A, Patino M, Arredondo BO, Fabregas J (1996). La producción de astaxantina a partir del alga verde *Haematococcus pluvialis* con diferentes condiciones de estrés. *Biotechnol. Letón*.

Fan L, Vonshak A, Gabbay R, Hirshberg J, Cohen Z, Boussiba S (1995) La ruta biosintética de astaxantina en un alga verde *Haematococcus pluvialis* como se indica por la inhibición con difenilamina. *Plant Cell Physiol*.

Gajardo-Solari S, Benites-Vilchez J, López-Vivar J, Burgos-Hermosilla N, Caro-Galán C, Rojas-Arredondo M. (2011) Astaxanthin: natural antioxidants with various applications in cosmetics. *BIOFARBO*.

García-Malea, M. C.; Brindley, C.; Río, E. D.; Acién, F. G.; Fernández, J. M., & Molina, E. (2005). Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemical Engineering Journal*.

Gong X, Chen F (1997) Optimización de medio de cultivo para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol*.

Hagen, C.; Grünewald, K.; Xyländer, M., & Rothe, E. (2001). Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*.

Harker M, Tsavalos AJ, AJ Young (1996) el crecimiento autotrófico y la producción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis* en un 30 litros de aire comprimido fotobiorreactor. *J. Ferment. Bioengng*.

Herrera-Andrade H, Sánchez-Machado D, López-Cervantes J, Núñez-Gastélum J A, Moreno-Ramos O H. (2011) Extracción de la astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*,

Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, Nishio N, Nagai S (1992) Crecimiento y formación de astaxantina *Haematococcus pluvialis* en condiciones heterotróficas y mixotróficas. *J. Ferment. Bioengng*.

Kobayashi M, Kurimura Y, Tsuji Y (1997) AS-Light-independiente taxanthin la producción por la microalga verde *Haematococcus pluvialis* bajo estrés salino. *Biotechnol. Letón*.

López-Roldán P, Mach N. (2012) efecto en el consume de astaxantina en la salud. *Nutrición comunitaria*.

Miki W (1991) funciones y actividades de los animales Biológicos carotenoides. *Pure Appl. Chem*.

Moya MJ, Sánchez-Guardamino ML, Vilavella A, Barbera E (1997) Crecimiento de *Haematococcus lacustris*: Una contribución a la modelización cinética.

Mostafa N, Hishamuddin O, Suhaimi N, Mohammad-Amin H, Soon-Guan T. Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *Haematococcus pluvialis*. *African Journal of Biotechnology* 2012.

Olaizola M (2000) La producción comercial de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* usando fotobiorreactores al aire libre 25.000 litros. *J. Appl.*

Pringsheim EG (1966) requerimientos nutricionales de *Haematococcus pluvialis* y especies afines. *J. Phycol.*

Ranjbar, R.; Inoue, R.; Katsuda, T.; Yamaji, H., & Katoh, S. (2008). High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

Ramírez-Landínez D. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Rao-Ambati R, Mio-Phang S, Ravi S, Gokare-Aswathamarayana R. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications. *Marine Drugs*. 2014.

Tripathi, U.; Sarada, R., & Ravishankar, G. (2002). Effect of culture conditions on growth of green alga —*Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiologiae Plantarum*.

Tjahjono AE, Hayama Y, Kakizono T, Terada Y, Nishio N, Nagai S (1994) Hyperacumulación de astaxantina en un alga verde *Haematococcus pluvialis* a temperaturas elevadas. *Biotechnol. Letón*.

Tolga G, İlknur A, Cenker K. (2011) Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by Nitrogen Source, Vitamin, Light and Aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.

## 14. ANEXOS