

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LA COSECHA POR AUTOFLOCULACIÓN,  
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CAROTENOIDES DE *Haematococcus  
pluvialis* EN CULTIVOS SECUENCIALES BAJO ESTRÉS SALINO**

**POR**

**JOSÉ LUIS GALÁN GONZÁLEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**2024**

**EVALUACIÓN DE LA COSECHA POR AUTOFLOCULACIÓN,  
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CAROTENOIDES DE *Haematococcus  
pluvialis* EN CULTIVOS SECUENCIALES BAJO ESTRÉS SALINO**

**Comité de Tesis**

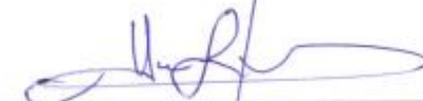


---

**Dra. Isela Quintero Zapata**  
**Directora**

---

**Dra. Myriam Elías Santos**  
**Secretario**



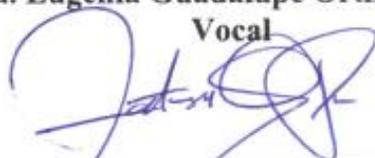
---

**Dr. Hugo Alberto Luna Olvera**  
**Vocal**



---

**Dra. Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga**  
**Vocal**



---

**Dra. Fátima Lizeth Gandarilla Pacheco**  
**Vocal**



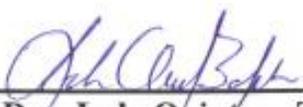
---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
**Subdirector de posgrado**

**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

**EVALUACIÓN DE LA COSECHA POR AUTOFLOCULACIÓN,  
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CAROTENOIDES DE *Haematococcus  
pluvialis* EN CULTIVOS SECUENCIALES BAJO ESTRÉS SALINO**

**Dirección de Tesis:**



---

**Dra. Isela Quintero Zapata**  
**Directora**



---

**Dr. Julio César Beltrán Rocha**  
**Asesor externo**

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a varias instituciones que han sido fundamentales en mi trayectoria académica. En primer lugar, deseo agradecer al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), cuyo apoyo ha sido invaluable para el desarrollo de mis estudios. Además, quiero extender mi gratitud a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Subdirección de Estudios de Posgrado (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), quienes han brindado un entorno académico excepcional y han sido un pilar en mi formación científica.

Doy un profundo agradecimiento a la Dra. Isela Quintero Zapata y la Dra. Myriam Elías Santos. Agradezco eternamente haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo y por su dedicación inquebrantable en mi desarrollo académico y profesional. Han estado siempre presentes, dispuestas a brindarme orientación, apoyo y sabios consejos en cada paso del camino. Gracias por creer en mí y ayudarme a aprender y crecer.

Al Dr. Claudio Guajardo Barbosa por su apoyo que ha sido de un valor incalculable, siendo un soporte esencial en el desarrollo de esta investigación. Además, su amistad incondicional ha sido un regalo que trasciende los límites académicos. Agradezco su apoyo y sabiduría en este camino.

Al Dr. Julio César Beltrán Rocha, que me ha guiado con sabiduría y paciencia, brindándome una invaluable enseñanza sobre la practicidad de las ideas científicas. Sus palabras y acciones han dejado una huella imborrable en mi corazón y en mi camino hacia la ciencia. Agradezco profundamente su dedicación y apoyo incondicional.

A mis padres y a mis abuelos. Gracias por creer en mí y por inspirarme a ir más allá de mis límites. Su influencia ha dejado una huella duradera en mi camino académico y profesional, y siempre lo llevaré en mi corazón como un ejemplo de excelencia y pasión por cualquier cosa que me determine a realizar.

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres José Luis Galán Franco y Erika González Virgen. Por todo el esfuerzo y sacrificio que han realizado a lo largo de los años. Aprecio profundamente cada gota de sudor y cada lágrima derramada en nombre de mi bienestar y crecimiento. Su amor incondicional como padres siempre ha sido un regalo preciado que atesoro con todo mi corazón; los quiero mucho y siempre será así.

A mí querido abuelo, Luis Jesús Galán Wong, por haber sido un mentor constante en mi vida y por estar siempre atento a cada situación. A lo largo de nuestra relación como nieto y abuelo, has sido una influencia invaluable en mi crecimiento personal y académico. Su compromiso y enfoque en sacar las cosas adelante, incluso cuando las circunstancias se tornaban difíciles, han sido ejemplares. Aprecio mucho su guía y liderazgo, pues sé que siempre lo ejercía para ayudarme a crecer y superar los desafíos presentados.

A mí querida abuela, Elva Nelly Franco Garza por todos los momentos que hemos compartido juntos. Tus comidas deliciosas, nuestras charlas sinceras y la convivencia llena de amor son recuerdos que atesoro en lo más profundo de mi corazón. Pero más allá de las comidas y las charlas, valoro enormemente nuestra convivencia. Cada momento que hemos pasado juntos, desde los momentos divertidos hasta los momentos de tranquilidad, han fortalecido nuestro vínculo y han creado recuerdos inolvidables. Eres un ejemplo de bondad, generosidad y amor incondicional. Me siento afortunado de tener una abuela tan maravillosa como tú.

A mí amada Jennifer Janeth Puente García, por ser mi novia, mi amiga y mi compañera de vida. No puedo imaginar mi vida sin ti y me siento bendecido de tenerte a mi lado. Por ser mi apoyo incondicional en los momentos difíciles y por envolverme con tu amor y serenidad. Eres mi refugio, mi calma y mi fuerza. Te amo más de lo que las palabras pueden expresar y siempre estaré agradecido por el amor que compartimos.

Les dedico la tesis a las cinco personas mencionadas, gracias por todo.

## RESUMEN

*Haematococcus pluvialis* es una microalga de gran interés debido a su capacidad de producir carotenoides, que tienen propiedades antioxidantes y nutracéuticas. En su producción a gran escala, la cosecha de *H. pluvialis* es crítica y costosa, representando el 30% o más del costo total. Actualmente, la floculación se ha presentado como una estrategia con destacadas ventajas en la cosecha de la biomasa de microalgas, ya que mejora la eficiencia en la separación de las células del medio de cultivo. Por otro lado, los medios de cultivo con mayor estrés salino han indicado que favorecen la floculación por autofloculación, por esta razón, se realizó una comparación entre dos medios de cultivo, el Basal Bold Medium (BBM) y el López-Chuken & Young (LC-Y), para evaluar la eficiencia de floculación, producción de biomasa y carotenoides. En el estudio se realizaron tres lotes secuenciales en fotobiorreactores en columna de burbujeo, el primer lote partiendo de quistes de *H. pluvialis* para su reactivación, el segundo con finalidad de generar adaptación y el tercero con un aumento del inóculo, donde, se analizaron los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica, porcentaje de floculación, producción de biomasa, contenido de lípidos, pigmentos (carotenoides y clorofila) y materia inorgánica (cenizas). Los resultados mostraron que, en los tres lotes evaluados, el medio de cultivo LC-Y presentó mayor producción de biomasa, eficiencia de floculación y contenido de materia inorgánica en comparación al medio BBM. Los niveles de clorofila A y carotenoides fueron muy similares en ambos medios, mientras que el medio BBM tuvo mejores resultados en cuanto a clorofila B y porcentaje de aceite producido en comparación con el medio LC-Y. Los resultados sugieren que el medio LC-Y aumenta el porcentaje de floculación y la producción de *H. pluvialis*. En conclusión, utilizar el medio LC-Y para cultivar y adaptar a *H. pluvialis* puede mejorar la producción de carotenoides y reducir costos, ya que facilita la floculación y la cosecha. Esto podría ser beneficioso para la industria de los nutracéuticos y otros sectores que utilizan estos compuestos.

## ABSTRACT

*Haematococcus pluvialis* is a microalga with significant potential due to its capacity to produce carotenoids with antioxidant and nutraceutical benefits. However, the cost of harvesting this microalga, constituting over 30% of total expenses in large-scale production, is a major concern. Efficient flocculation, aiding in cell separation from the culture medium, is crucial to address this issue. The study compared two culture media, Basal Bold Medium (BBM) and Lopez-Chuken & Young nutrient solution (LC-Y), LC-Y's elevated salt is pivotal, fostering saline stress, crucial for evaluating *H. pluvialis* flocculation, biomass, and carotenoid production. To assess stability and adaptation in a cultivation medium for *H. pluvialis*, three consecutive batches were executed in 2-liter photobioreactors, starting with *H. pluvialis* cysts, adaptation, and increased inoculum. Variables like pH, electrical conductivity and flocculation percentage were monitored, the study found that pH had no noticeable effect on flocculation, but electrical conductivity significantly influenced observed flocculation dynamics in the process. Results revealed that LC-Y nutrient solution consistently outperformed BBM, exhibiting higher yields, flocculation rates, and ash content. Chlorophyll A and carotenoid levels were comparable in both media, whereas BBM excelled in chlorophyll B and oil production. The findings suggest that LC-Y nutrient solution enhances *H. pluvialis* not only flocculation but also results in a higher biomass yield, providing a substantial mineral contribution, making it a cost-effective choice for carotenoid production. In conclusion, utilizing LC-Y nutrient solution for *H. pluvialis* cultivation can enhance carotenoid production and lower costs, benefiting industries.

# ÍNDICE

<b>1.-INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2.-ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Generalidades de las microalgas .....	3
2.2 Taxonomía de las microalgas .....	4
2.3 Clasificación de las microalgas .....	5
2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas .....	6
2.5 Especies importantes de microalgas .....	7
2.6 <i>H. pluvialis</i> .....	9
2.7 Ciclo de vida y reproducción de <i>H. pluvialis</i> .....	10
2.8 Distribución geográfica de <i>H. pluvialis</i> .....	12
2.9 <i>H. pluvialis</i> y su relevancia en la producción de biomasa .....	13
2.10 <i>H. pluvialis</i> y su importancia en la producción de carotenoides .....	15
2.11 Desafíos en la producción de carotenoides en <i>H. pluvialis</i> .....	17
2.12 Modos de cultivo en microalgas .....	18
2.13 Cultivo fotoautótrofo de microalgas. ....	18
2.14 Distintas formas de cultivo para microalgas. ....	19
2.15 Cultivo en lote secuencial de <i>H. pluvialis</i> .....	20
2.16 Técnicas de recuperación de microalgas .....	21
2.17 La floculación en microalgas .....	22
2.18 Autofloculación .....	23
2.19 Composición del medio de cultivo para <i>H. pluvialis</i> .....	24
2.20 Medio LC-Y .....	27
2.21 Importancia de las pruebas de cenizas en microalgas .....	27
2.22 Estandarización de técnicas analíticas .....	28
<b>3.-JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>4.-HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>5.-OBJETIVO GENERAL</b> .....	32
5.1 Objetivos particulares .....	32
<b>CAPÍTULO 1 Estandarización de las técnicas analíticas</b> .....	33

<b>Resumen</b> .....	33
<b>1.-Introducción</b> .....	34
<b>2.-Material y métodos</b> .....	35
2.1 Estandarización de la curva de calibración para el análisis de lípidos en microalgas.....	35
2.2 Estandarización del método de análisis de carotenoides .....	35
<b>3.-Resultados</b> .....	36
3.1- Selección de la longitud de onda óptima para la cuantificación de carotenoides .....	36
3.2 Análisis espectrofotométrico de contenidos de carotenoides en muestras estándar de $\beta$ - caroteno .....	37
3.3 Curva de calibración de lípidos .....	37
<b>4.-Discusión</b> .....	39
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	40
<b>Efecto de la inclusión de extracto de <i>Yucca schidigera</i> sobre la producción de <i>Haematococcus pluvialis</i> usando amonio como fuente de nitrógeno</b> .....	40
<b>Resumen</b> .....	40
<b>1.-Introducción</b> .....	41
<b>2.-Material y métodos</b> .....	43
2.1 Material biológico .....	43
2.2 Determinación de B <sub>50</sub> en extracto de <i>Y. schidigera</i> .....	43
2.3 Preparación del inóculo y condiciones del cultivo .....	44
2.4 Diseño experimental.....	44
2.5 Determinación de densidad celular .....	44
2.6 Tratamiento de las muestras .....	45
2.7 Análisis estadístico .....	45
<b>3.-Resultados</b> .....	46
3.1 Análisis microscópico de los tratamientos .....	46
3.2 Concentración de células en los 4 tratamientos.....	47
3.3 Determinación de B <sub>50</sub> .....	48
<b>4.-Discusión</b> .....	49
4.1 Impacto por la modificación del nitrógeno en densidad celular de <i>H. pluvialis</i> .....	49
4.2 Impacto de la sobresaturación y concentración de nutrientes en el crecimiento celular .....	50
4.3 <i>Yucca schidigera</i> en la reducción de emisiones de amoníaco .....	51
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	52

Eficiencia de floculación, así como la producción de biomasa, lípidos y carotenoides del cultivo en lote secuencial en los medios BBM y LC-Y.....	52
<b>Resumen</b> .....	52
<b>1.-Introducción</b> .....	53
<b>2.-Material y Métodos</b> .....	55
2.1 Material biológico .....	55
2.2 Medios de cultivo .....	55
2.3 Preparación del inóculo y cultivo en lotes para la reactivación y adaptación .....	55
2.4 Determinación de floculación y producción de biomasa (peso seco) .....	57
2.5 Evaluación del cultivo de <i>H. pluvialis</i> (Lote 3) y análisis de biomasa.....	57
<b>2.6-Evaluación de los carotenoides totales</b> .....	58
<b>2.7-Análisis de lípidos</b> .....	58
<b>2.8-Evaluación de la materia inorgánica (Prueba de cenizas)</b> .....	59
<b>2.9-Análisis Estadístico</b> .....	59
<b>3.-Resultados</b> .....	60
3.1 Comparación visual de floculación en medios BBM y LC-Y.....	60
3.2 Producción de biomasa y floculación de <i>H. pluvialis</i> .....	62
3.3 Resultados de floculación y peso seco de <i>H. pluvialis</i> .....	63
3.4 pH y conductividad eléctrica.....	66
3.5 Contenido de materia inorgánica, lípidos y pigmentos en biomasa de <i>H. pluvialis</i> .....	69
<b>4.-Discusión</b> .....	70
4.1 Producción de biomasa y floculación de <i>H. pluvialis</i> .....	70
4.2 pH y conductividad eléctrica en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> .....	72
4.3 Análisis de biomasa de <i>H. pluvialis</i> .....	74
<b>5.-CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>6.-PERSPECTIVAS</b> .....	77
<b>7.-BIBLIOGRAFÍA</b> .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Efectos positivos en la salud derivados de los metabolitos secundarios de especies de microalgas específicas.....	8
<b>Tabla 2.-</b> Contenido de biomasa entre las etapas verde y roja de <i>H. pluvialis</i> .....	14
<b>Tabla 3.-</b> Análisis comparativo de la composición de nutrientes en varios medios de cultivo: BG11, BG11 Modificado, Basal, OHM y RM .....	26
<b>Tabla 4.-</b> Contenidos de carotenoides en muestras de estándar de $\beta$ -Caroteno .....	36
<b>Tabla 5.-</b> Reactivos para las reacciones de unión y blanco.....	43
<b>Tabla 6.-</b> Reacción blanco .....	43
<b>Tabla 7.-</b> Resultados de floculación y producción de <i>H. pluvialis</i> para los medios BBM y LC-Y durante su cultivo en lote secuenciales.....	62
<b>Tabla 8.-</b> Contenido mineral, de lípidos y pigmentos en la biomasa de <i>H. pluvialis</i> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1.-</b> Microscopía óptica que ilustran las distintas etapas del ciclo de vida de las células de <i>H. pluvialis</i> .....	10
<b>Fig 2.-</b> Ciclo de vida de <i>H. pluvialis</i> .....	12
<b>Fig 3.-</b> Aplicaciones potenciales de <i>H.pluvialis</i> .....	15
<b>Fig 4.-</b> Ubicación de la astaxantina y otros antioxidantes en la membrana celular .....	16
<b>Fig 5.-</b> Proceso de recolección de floculación de células de algas con un floculante reciclable.....	22
<b>Fig 6.-</b> Ejemplo de autofloculación a tres diferentes concentraciones de medio de cultivo y distintas visualizaciones en determinados periodos de tiempo.....	23
<b>Fig 7.-</b> Longitud de onda óptima para análisis de carotenoides .....	36
<b>Fig 8.-</b> Curva de calibración de lípidos .....	38
<b>Fig 9.-</b> <i>H. pluvialis</i> en microscopio electrónico. ....	46
<b>Fig 10.-</b> Análisis del extracto de <i>Yucca schidigera</i> . ....	48
<b>Fig 11.-</b> Temperatura del cultivo del lote 3 de <i>H. pluvialis</i> .....	56
<b>Fig 12.-</b> Monitoreo del cultivo en Lote 3 de <i>H. pluvialis</i> .....	60
<b>Fig 13.-</b> Comparación visual del desarrollo de <i>H. pluvialis</i> en los medios de cultivo (BBM y LC-Y) .....	61
<b>Fig 14.-</b> Floculación en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> con medio BBM. ....	64
<b>Fig 15.-</b> Floculación en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> con medio LC-Y.....	65
<b>Fig 16.-</b> Peso seco en el cultivo de <i>H. pluvialis</i> con medio BBM y LC-Y.....	65
<b>Fig 17.-</b> Cinética de pH (lote 3) durante el cultivo de <i>H. pluvialis</i> .....	67
<b>Fig 18.-</b> Cinética de C.E (lote 3) de <i>H. pluvialis</i> .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BBM:** Medio Basal Bold

**LC-Y:** Medio López-Chuken & Young 2010

**mM:** Milimoles

**mS/m:** milisiemens por metro

**rpm:** Revoluciones por minuto

**vvm:** Volumen de aire por volumen de líquido por minuto

**Pv:** sulfo-phospho-vanilina

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados

**SPS:** polisacáridos sulfatados

**C.E:** conductividad eléctrica

**BS (g L<sup>-1</sup>):** concentración de sólidos suspendidos en el agua, expresada en gramos por litro.

**PF:** alimentación por pulsos

**WPF:** sin alimentación por pulsos

**CaOx:** oxalato de calcio

**C.V:** Coeficiente de Variación

## 1.-INTRODUCCIÓN

La microalga *Haematococcus pluvialis* tiene una gran relevancia comercial debido a su capacidad de generar carotenoides valiosos como  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, cantaxantina y astaxantina, acumulados durante su metabolismo primario o en respuesta al estrés, como la falta de nutrientes, exceso de luz y alta salinidad (Cezare-Gomes et al. 2019; Lafarga et al. 2020; Khoo et al. 2019). En general, los metabolitos de *H. pluvialis* son útiles por sus propiedades colorantes y antioxidantes, donde la astaxantina es el carotenoide más destacable que se utiliza en nutrición animal, suplementos alimenticios, industria cosmética y farmacéutica (Mularczyk et al. 2020). La producción de astaxantina y  $\beta$ -caroteno, representan casi la mitad del mercado global de carotenoides naturales con ingresos de entre USD 152-180 millones en 2021 (Cezare-Gomes et al. 2019; Lafarga et al. 2020; Rammuni et al. 2019). Debido a la alta demanda y la baja acumulación de carotenoides en especies como *H. pluvialis*, el costo de los metabolitos es elevado, lo cual vuelve relevante su optimización teniendo en cuenta que las proyecciones monetarias de su valor hasta los 800 millones de dólares a nivel mundial en 2026 (Rammuni et al. 2019; Yang et al. 2023).

La producción de astaxantina en *H. pluvialis* puede representar entre un 2% a 3% de la cantidad comercializada en comparación a la cantidad producida sintéticamente en el mercado, que representa más del 95% (Casella et al. 2020). Sin embargo, el uso de pigmentos sintéticos puede comprometer la calidad de los productos como, por ejemplo: pérdida de valor nutricional, impacto negativo en el medio ambiente, así como también plantear riesgos para la salud, como alergias, asma y una potencial carcinogénesis (Zielinski et al. 2021). Para lograr una óptima producción de *H. pluvialis*, es necesario mantener el cultivo en condiciones operacionales favorables tales como: un manejo de pH, temperatura, agitación, adición de CO<sub>2</sub>, iluminación y un fotoperiodo adecuado (Lee et al. 2023; Teng et al. 2023). Los factores que también afectan la producción de biomasa, se puede ver influenciada en gran medida por el sistema empleado, la cepa utilizada y principalmente los costos de cosecha (Ma et al. 2023). Gobi et al. (2021) sugiere que un período de adaptación en la operación de cultivos de microalgas podría mejorar la producción de biomasa y su cosecha. La elección del método de cosecha de

microalgas varía según las características (densidad y composición celular, sensibilidad a los métodos de cosecha, requisitos de procesamientos posteriores, etc.) presente del cultivo, así como las necesidades específicas del producto final y la posibilidad de reutilizar el medio (Singh et al. 2018). Para generar una adaptación previa se pueden realizar cultivos en lote secuencial. Sin embargo, existe falta de estudios que respalden esta información específicamente para la producción y cosecha de *H. pluviialis* (Mussagy 2022).

Las técnicas de cosecha convencional como: centrifugación, flotación, sedimentación por gravedad y filtración tienen las desventajas de consumir una gran cantidad de energía, tiempo, y no recuperar la totalidad de la biomasa de las microalgas (Li et al. 2020; Zeng et al. 2022). Entre los métodos que se destacan para la cosecha por su factibilidad técnica y rentabilidad económica son los basados en floculación, que se caracterizan por la formación de agregados celulares que sedimentan y se recuperan fácilmente. Cabe destacar que los métodos de floculación se basan en la estrecha relación de la célula con la interacción química de los agentes floculantes con los polisacáridos presentes en las células de las microalgas (Matter et al. 2019; Poh et al. 2020). La autofloculación se destaca por ser una técnica simple y económica que se puede lograr ajustando la composición del medio de cultivo con diferentes tipos de sales inorgánicas que representan una mínima toxicidad (Alishah et al. 2019; Matter 2019; Zhu et al. 2020). De acuerdo a Nagappan et al. (2019) la autofloculación de las microalgas se incrementa a medida que se aumenta el nivel de estrés salino, lo que conduce a una mayor eficiencia en la recolección de la biomasa, asimismo, puede ser inducida por diversos factores, como un pH alcalino, el consumo del CO<sub>2</sub> por actividad fotosintética y la presencia de precipitados inorgánicos, siendo los medios de cultivo un factor crítico en el proceso de autofloculación (Beltrán-Rocha et al. 2021; Matter et al. 2019; Mubarak et al. 2019; Poh et al. 2020). Por las razones anteriores el presente estudio se enfoca en obtener evidencia de los efectos de adaptación de *Haematococcus pluviialis* durante su cultivo en lotes secuenciales utilizando una solución nutritiva que podría generar estrés salino y facilitar la cosecha por autofloculación; evaluando además la producción de biomasa, contenido de lípidos, carotenoides y materia inorgánica en la biomasa generada.

## 2.-ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de las microalgas

Los ecosistemas acuáticos albergan una sorprendente diversidad de vida, incluyendo a las microalgas, un grupo de microorganismos unicelulares que superan las 50.000 especies identificadas. Estas microalgas presentan una amplia variedad de formas y tamaños (2–50  $\mu\text{m}$ ), pueden desarrollarse en diferentes tipos de agua; dulce, salobre o salada, desempeñando un papel clave en los ecosistemas acuáticos, al ser organismos responsables del 40% de la fotosíntesis global. Entre estas especies, se encuentran ejemplos notables como *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*, *Aphanizomenon flosaquae*, *Nostoc commune*, etc. Las microalgas han llamado la atención de la comunidad científica porque pueden producir una amplia variedad de metabolitos, que van desde los primarios como: vitaminas, carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados hasta metabolitos secundarios como: pigmentos, carotenoides y compuestos fenólicos, así como también, por su capacidad de sintetizar aminoácidos similares a las micosporinas (utilizados como protección UV) y fitoesteroles (para la regulación del estrés oxidativo y la regulación de la membrana). La literatura científica destaca los metabolitos de las microalgas por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas y antitumorales; lo que sugiere que las microalgas podrían ser una fuente prometedora de alimentos saludables y sostenibles, dada su capacidad para producir una amplia variedad de compuestos bioactivos de alto valor.

La salud humana, en parte, se ve beneficiada por múltiples metabolitos, ejemplo de ellos son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que encontramos en las microalgas. Estos nutrientes no solo promueven la salud cerebral y ocular, sino que también ofrecen defensa contra enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y artritis; algunas de las microalgas destacadas por su capacidad para producir PUFA son *Ulkenia*, *Cryptocodinium*, y *Schizochytrium* (Ampofo et al. 2022; Elisabeth et al. 2021).

De la misma manera, los géneros *Chlorella*, *Isochrysis*, *Porphyridium*, *Phaeodactylum*, *Tetraselmis* y *Rhodella* son ampliamente explotados por su producción de polisacáridos ya que estos compuestos cumplen diversas funciones, sirviendo como agentes protectores, componentes estructurales y como reservas de energía. Se clasifican en pectinas, proteínas glicol, SPS y homo/heteropolisacáridos. Los polisacáridos a menudo se explotan por sus aplicaciones tecnofuncionales, como espesantes, estabilizadores, emulsionantes, o pueden ser utilizados en la encapsulación de compuestos activos, entre otros usos técnicos y funcionales.

Proteínas y péptidos: es importante señalar un posible cambio en el mercado mundial de estos metabolitos para el año 2054. Según Khanra et al. 2018, aproximadamente el 50% de estas sustancias proviene de plantas terrestres. Sin embargo, se anticipa que una creciente sustitución por proteínas derivadas de microalgas e insectos. En este sentido, los péptidos de microalgas extraídos de especies como *Chlorella*, *Navicula*, *Nitzschia* y *Tetraselmis* han sido objeto de investigación y desarrollo (Ampofo et al. 2022).

## **2.2 Taxonomía de las microalgas**

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que abarcan una gran diversidad de especies y hábitats. Se encuentran en una variedad de entornos acuáticos, como océanos, lagos, ríos y estanques, así como en ambientes terrestres húmedos, como suelos, rocas húmedas y superficies de plantas. Estos organismos son eucariotas, lo que significa que sus células tienen núcleo y orgánulos internos, y comparten muchas características con las células vegetales, como la presencia de cloroplastos para llevar a cabo la fotosíntesis.

La clasificación taxonómica de las microalgas se basa en una combinación de características morfológicas, bioquímicas y genéticas. En este sentido, las microalgas se encuentran generalmente ubicadas en el reino protista, aunque algunas también pueden clasificarse en otros reinos dependiendo de su composición y estructura celular. A partir de esta clasificación inicial, se procede a la división de las microalgas en grupos principales, tales como *Chlorophyta* (algas verdes), *Bacillariophyta* (diatomeas), *Cyanophyta* (algas cianobacterianas), *Dinophyta* (dinoflagelados). Dentro de cada división, las microalgas se subdividen en clases basadas en características más específicas. Por ejemplo, en la división

*Chlorophyta*, las clases son: *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* y *Chlorophyceae*, donde esta última pertenece *H. pluvialis*. Estas clases a su vez se organizan en órdenes, que agrupan a las especies con características aún más similares. Además, cada especie de microalga se agrupa en un género, que a su vez se agrupa en una familia. Es importante tener en cuenta que la taxonomía de las microalgas está en constante revisión y actualización debido al desarrollo de nuevas técnicas de análisis molecular y genómico. Estos avances proporcionan información más detallada sobre las relaciones evolutivas entre las diferentes especies, lo que conlleva a cambios en la clasificación de algunas especies y al descubrimiento de nuevas relaciones filogenéticas entre grupos de microalgas (Fleurence 2021).

### **2.3 Grupos importantes de microalgas**

Las microalgas se clasifican en grupos de: *Chlorophyta*, *Chromophyta* y *Rhodophyta*, cada uno con sus propias características distintivas. Además, las cianobacterias, que alguna vez se clasificaron como microalgas, son un grupo importante de bacterias fotosintéticas que también se encuentran en una variedad de hábitats acuáticos y terrestres. Es importante resaltar que la clasificación de las microalgas se basa en una combinación de características morfológicas, bioquímicas y genéticas, lo que permite distinguir entre diferentes grupos y especies dentro de cada grupo, a continuación, se presenta información de cada clasificación:

*Chlorophyta*: Microalgas que son conocidas por su color verde debido a la presencia de clorofila, se encuentran en una variedad de hábitats acuáticos y terrestres, y pueden ser unicelulares o multicelulares. Muchas especies de algas verdes son importantes en la industria alimentaria y farmacéutica.

*Chromophyta*: Este grupo comprende microalgas que pueden ser de color dorado o marrón y se encuentran comúnmente en ambientes marinos. Incluye las diatomeas, que son algas unicelulares con paredes celulares de sílice que se encuentran en aguas dulces y saladas, y las algas pardas, que son multicelulares y se encuentran principalmente en aguas costeras.

*Rhodophyta*: Estas microalgas son reconocidas por su pigmentación roja debida a la presencia de pigmentos como la ficobilisina. Se encuentran en una variedad de hábitats

marinos, desde las profundidades hasta las zonas intermareales. Muchas especies de algas rojas son utilizadas en la industria alimentaria y cosmética debido a sus propiedades nutricionales y beneficios para la piel.

**Cianobacterias:** Las cianobacterias son a menudo clasificadas junto con las microalgas debido a su capacidad para realizar la fotosíntesis. Estas bacterias fotosintéticas se encuentran en una amplia variedad de hábitats acuáticos y terrestres, y desempeñan un papel importante en la producción de oxígeno y la fijación de nitrógeno en los ecosistemas.

Estas microalgas desempeñan roles ecológicos vitales, como la producción de oxígeno, la fijación de carbono y la formación de la base de la cadena alimentaria en muchos ecosistemas acuáticos. Además, su capacidad para adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales y su rápido crecimiento las hacen interesantes para aplicaciones en biotecnología, como la producción de biocombustibles, alimentos nutricionales, productos farmacéuticos y como agentes de biorremediación para purificar aguas contaminadas (Fleurence 2021).

## **2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas**

El verdadero impulso en la biotecnología de las microalgas surgió en el siglo pasado, transformando su aplicación y potencial. Estos organismos tienen una amplia gama de aplicaciones comerciales. Por ejemplo, pueden mejorar el valor nutricional de los alimentos gracias a su composición química. Además, son fundamentales en la acuicultura, ya que muchas especies marinas las utilizan como alimento. La industria cosmética también ha reconocido el potencial de las microalgas, utilizando sus compuestos en productos para el cuidado del cabello y la piel. Los antioxidantes producidos como metabolitos secundarios de las microalgas han llevado a que estas y sus derivados sean considerados moléculas de alto valor. Los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados se emplean en fórmulas infantiles y suplementos nutricionales, los pigmentos naturales se utilizan como colorantes en diversos productos industriales.

Además de su aplicación en la industria alimentaria y cosmética, las microalgas desempeñan un papel crucial en la investigación científica. Los bioquímicos de isótopos estables obtenidos de las microalgas son fundamentales para la determinación estructural y

los estudios metabólicos, contribuyendo al avance del conocimiento en diversas disciplinas, las cuales son: biología molecular, biotecnología, ecología, bioquímica, química orgánica, nutrición y medicina (Spolaore et al. 2006).

Asimismo, la integración del cultivo de microalgas en los procesos de tratamiento de aguas residuales se considera una estrategia ambiental y económicamente ventajosa, debido a su capacidad notable para sintetizar una variedad de metabolitos valiosos, como biopolímeros, carbohidratos, proteínas, lípidos, carotenoides, entre otros; siendo la biomasa con un alto contenido de metabolitos una prometedora fuente de biocombustibles y bioproductos de alto valor. Sin embargo, es crucial reconocer que la calidad y eficacia de estos productos están directamente influenciadas por la especie de microalga utilizada (Condori et al. 2024).

## **2.5 Especies importantes de microalgas**

Entre la amplia variedad de especies de microalgas, algunas destacan por su diversidad y su papel fundamental en diversos campos. Por ejemplo, las *Chlorella spp.*, reconocidas por su rápido crecimiento y su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales, son una fuente clave para la producción de alimentos funcionales y biocombustibles. Por otro lado, *Spirulina spp.*, con su perfil nutricional rico en proteínas, vitaminas del complejo B y hierro, son ampliamente utilizadas como suplemento dietético y en la industria cosmética. *Dunaliella spp.*, adaptada a ambientes hipersalinos, es conocida por su producción de betacaroteno, utilizado en la coloración de alimentos y en la industria cosmética. *Nannochloropsis spp.*, apreciada por su alto contenido de lípidos, ha destacado en la producción de biocombustibles y productos cosméticos.

Por último, una de las especies más notables, *Haematococcus pluvialis*, ha captado la atención especialmente por su capacidad para producir astaxantina, un antioxidante y pigmento carotenoides valioso para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, cabe destacar que los metabolitos secundarios de las microalgas, como los carotenoides, no solo les confieren propiedades únicas, sino que también las hacen valiosas para una amplia gama de aplicaciones en diversos sectores industriales (Tabla 1) (Ampofo et al. 2022).

**Tabla 1.-**Efectos en la salud humana derivados de los metabolitos secundarios de especies de microalgas específicas (modificado de Ampofo et al. 2022).

Genero/Especie	Metabolito	Concentración	Efecto Bioactivo
<i>Dunaliella salina</i> <i>Chlorella sorokiniana</i>	Luteína	0.4-0.8% 5.21mg/g	Antioxidante, anticancerígena, protección contra cataratas, degeneración macular.
<i>Heterochlorella luteoviridis</i> <i>Dunaliella salina</i>	β- Caroteno	0.19 mg/g 0.01-15.0g/L	Anticancerígena, antioxidante, protección contra degeneración macular.
<i>Chaetoceros</i> sp. <i>Ondotella</i> sp.	Fucoxantina	1.5-2.0% 5.13 mg/g	Antioxidante, anticancerígena, anticolesterol, antidiabético, antitumoral.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antoxantina	1.95-2.75	Antibacteriano, anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano.
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina	1.5%	Antibacteriano, anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano.
<i>Heterochlorella luteoviridis</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Lyngbya</i> sp. <i>Lyngbya</i> sp.	Zeaxantina	0.244 mg/g 6mg/g 0.13 mg/g 27.47 mg/g	Mejora la salud ocular, antidiabético.
<i>Anabaena</i> sp. <i>Cyanidium caldarium</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Arthrospira platensis</i> <i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	Ficocianina	8.3% 4-53 mg/g 6.5-152 mg/g 54.65 mg/g 27.43 mg/g	Neuroprotector, antiinflamatorio, antioxidante, antienviejecimiento, antitumoral.

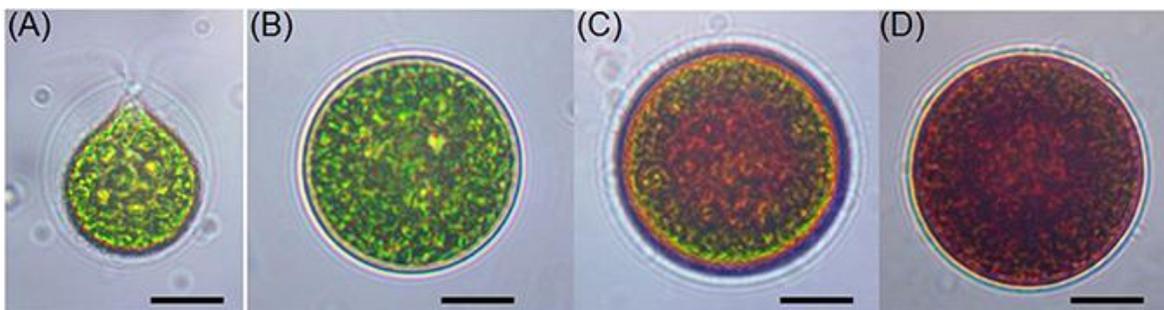
## 2.6 *H. pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* es una microalga verde unicelular que pertenece al Phylum Chlorophyta; el reconocimiento y la importancia de *H. pluvialis* se debe a su capacidad de producir grandes cantidades de astaxantina, el cual, es un carotenoide de alto valor nutricional y comercial y, además, es la responsable del color rojo característico que adquiere esta microalga en ciertas etapas de su ciclo de vida. *H. pluvialis*, perteneciente al grupo de las algas verdes, ha sido objeto de estudio en la biotecnología, la investigación farmacéutica, la industria alimentaria y la acuicultura, entre otros campos (Hazen 1899; Shah et al. 2016).

*H. pluvialis* es destacable por su resistencia a condiciones ambientales adversas. Puede sobrevivir en una amplia gama de temperaturas y niveles de salinidad, lo que la convierte en un organismo extremadamente adaptable. Esta capacidad de resistencia le permite prosperar en hábitats acuáticos diversos, desde lagos y ríos hasta estanques y charcos temporales. Desde un punto de vista biotecnológico, *H. pluvialis* ofrece un potencial significativo con aplicaciones en la industria alimentaria, la cosmética y la medicina. Además, su capacidad para acumular lípidos la convierte en un candidato prometedor para la producción de biocombustibles y la biorremediación de aguas contaminadas (Hazen 1899; Shah et al. 2016). Debido a esto, *H. pluvialis* ha sido objeto de numerosos estudios para comprender mejor su fisiología, genética y metabolismo. Se han desarrollado técnicas de cultivo avanzadas para optimizar su producción de astaxantina y otros compuestos de interés, así como para estudiar su respuesta a factores ambientales y estresantes (Souza et al. 2020).

## 2.7 Ciclo de vida y reproducción de *H. pluvialis*

*Haematococcus pluvialis* muestra una diversidad morfológica a lo largo de su ciclo de vida. Se identifican cuatro tipos celulares principales que son macrozooides (zoosporas), microzooides, palmella y hematocistos (aplanosporas). La primera forma, los macrozooides o zoosporas, son células vegetativas flageladas que crecen rápidamente en condiciones favorables. Luego, cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables, los macrozooides se transforman en palmellas, células vegetativas en reposo que pierden sus flagelos y aumentan de tamaño. Las palmellas representan una etapa de transición hacia los hematocistos o aplanosporas, células enquistadas asexuales. Estas aplanosporas, bajo estrés ambiental continuo, desarrollan una vaina trilaminar gruesa y rígida, acumulando astaxantina y adquiriendo un color rojo característico (Fig 1) (Shah et al. 2016).



**Fig 1.- Microscopía óptica de las distintas etapas del ciclo de vida de las células de *H. pluvialis*.** (A) Célula vegetativa en movimiento, coloreada de verde. (B) Célula de palmella vegetativa en estado verde. (C) Célula de palmella en transición a aplanospora, destacándose la acumulación de astaxantina. (D) Célula de aplanospora con notable acumulación de astaxantina (Shah et al. 2016).

Por último, durante la gametogénesis, algunas aplanosporas pueden producir microzooides, células sexuales haploides más pequeñas. Sin embargo, la reproducción sexual es poco común en *H. pluvialis*, donde predomina la reproducción vegetativa. Estas variaciones en la morfología celular revelan la complejidad del ciclo de vida de *H. pluvialis* y su capacidad de adaptación a diversos entornos.

Hazen (1899) informa que las zoosporas en *H. pluvialis* son altamente adaptables, y, tienen la capacidad de moverse libremente en cuerpos de agua dulce, además de que están especializadas en la dispersión activa a través de las corrientes acuáticas. Cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, sus zoosporas se asientan y pasan a una forma vegetativa no flagelada, lo que marca el inicio del desarrollo continuo del alga y la síntesis de sus valiosos metabolitos secundarios (Souza et al. 2020), aunado a esto, durante el ciclo de vida, cuando se presentan condiciones de estrés, como la falta de nutrientes o la exposición a altos niveles de luz, las células vegetativas de *H. pluvialis* pueden desencadenar una respuesta de defensa y supervivencia, esto en respuesta ante estos estímulos, por lo que las células vegetativas experimentan una transformación en la que se producen cambios morfológicos y bioquímicos, la cual, se conoce como la etapa de "células de resistencia" o "células enquistadas" (Zhang et al. 2017). Durante esta etapa de células enquistadas, las células de *H. pluvialis* se envuelven en una capa protectora y asumen una forma esférica, estas células enquistadas, conocidas como "quistes", pueden resistir condiciones ambientales adversas durante períodos prolongados, como sequías o temperaturas extremas (Souza et al. 2020) (Fig 2).

Es importante aclarar que *H. pluvialis*, como se mencionó, se puede reproducir tanto de manera asexual como sexual, donde, la reproducción asexual ocurre principalmente a través de la división celular que una célula madre se divide para formar dos células hijas genéticamente idénticas (Zhang et al. 2017). Esta forma de reproducción contribuye a la rápida proliferación de la especie bajo condiciones favorables, por otro lado, la reproducción sexual implica la fusión de células sexuales haploides, conocidas como gametos, para formar un cigoto diploide, posteriormente el cigoto luego se desarrolla en una nueva célula vegetativa o puede pasar a la etapa de célula enquistada (Sah et al. 2016).

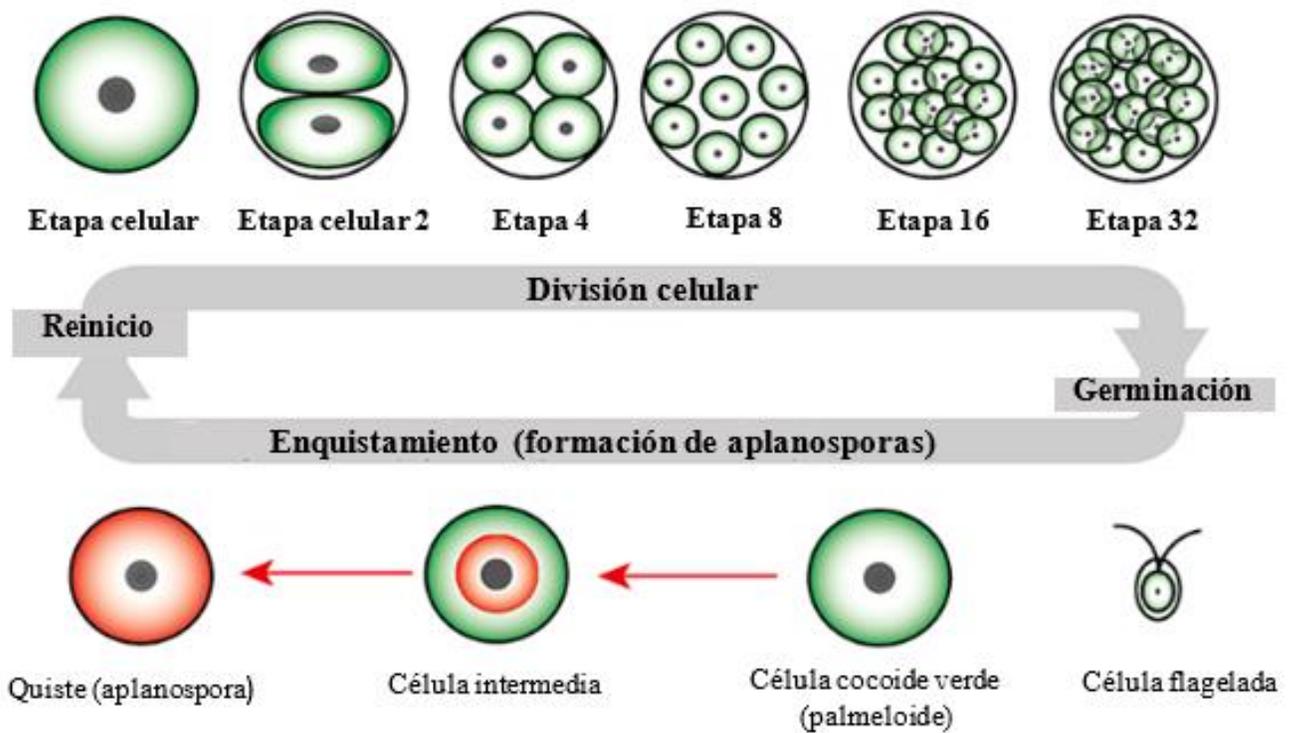


Fig 2.- Ciclo de vida de *H. pluvialis* (modificado de: Shah et al. 2016).

## 2.8 Distribución geográfica de *H. pluvialis*

*H. pluvialis* es cosmopolita. Se ha reportado en cuerpos de agua dulce, como estanques, lagos y charcas, sin embargo, también se han encontrado poblaciones de esta microalga en ambientes marinos, aunque con menor frecuencia. Se ha observado que *H. pluvialis* tiende a prosperar en aguas dulces estancadas o poco movidas, especialmente en regiones con climas templados o tropicales (Shao et al. 2019).

## **2.9 *H. pluvialis* y su relevancia en la producción de biomasa**

*H. pluvialis* puede crecer rápidamente en condiciones favorables, duplicando su biomasa en un corto período de tiempo, lo que la convierte en una candidata ideal para aplicaciones comerciales y la hace atractiva en términos de eficiencia de producción (Sung y Sim 2022).

La biomasa de *H. pluvialis* tiene múltiples aplicaciones en diversas industrias. Se utiliza como fuente de materia prima para la extracción de carotenoides, incluida la astaxantina, pero también se aprovecha como alimento para organismos acuáticos y como suplemento nutricional en la formulación de alimentos para animales (Panis et al. 2016). Además, la biomasa de *H. pluvialis* ha despertado interés como materia prima para la producción de biocombustibles y otros productos químicos sostenibles, debido a su alto contenido de lípidos y su capacidad de crecimiento rápido (Tabla 2) (Moreno-Garcia et al. 2017). La eficiencia en la producción de biomasa de *H. pluvialis* es fundamental para garantizar la viabilidad económica y sostenible de su cultivo a gran escala (Trivedi et al. 2015). Por lo tanto, aún existe el reto de desarrollar estrategias para optimizar las condiciones de cultivo y maximizar la productividad de biomasa de esta microalga, con el objetivo de satisfacer la creciente demanda de carotenoides y otros productos derivados de *H. pluvialis* en diferentes sectores industriales (Panis et al. 2016).

**Tabla 2.-** Contenido de biomasa entre las etapas verde y roja de *H. pluvialis* (modificado de: Shah et al. 2016).

Contenido de composición (% de PS)	Etapa verde	Etapa roja
Proteínas	29-45	17-25
Lípidos (% Total)	20-25	32-37
Lípidos Neutrales	59	51.9-53.5
Fosfolípidos	23.7	20.6-21.1
Glicolípidos	11.5	25.7-26.5
Carbohidratos	15-17	36-40
Carotenoides (% Total)	0.5	2.5
Neoxantina	8.3	n.d
Violaxantina	12.5	n.d
$\beta$ -Caroteno	16.7	1.0
Luteína	56.3	0.5
Zeaxantina	6.3	n.d
Astaxantina (Incluidas Esteres)	n.d	81.2
Adonixantina	n.d	0.4
Adonirrubina	n.d	0.6
Cantaxantina	n.d	5.1
Equinenona	n.d	0.2
Clorofila	1.5-2	0

## 2.10 *H. pluvialis* y su importancia en la producción de carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales con propiedades antioxidantes y biológicas beneficiosas para la salud humana, lo que los convierte en compuestos de alto valor comercial en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Cezare-Gomes et al. 2019), además, *H. pluvialis* destaca por sus posibles aplicaciones potenciales (Fig 3).

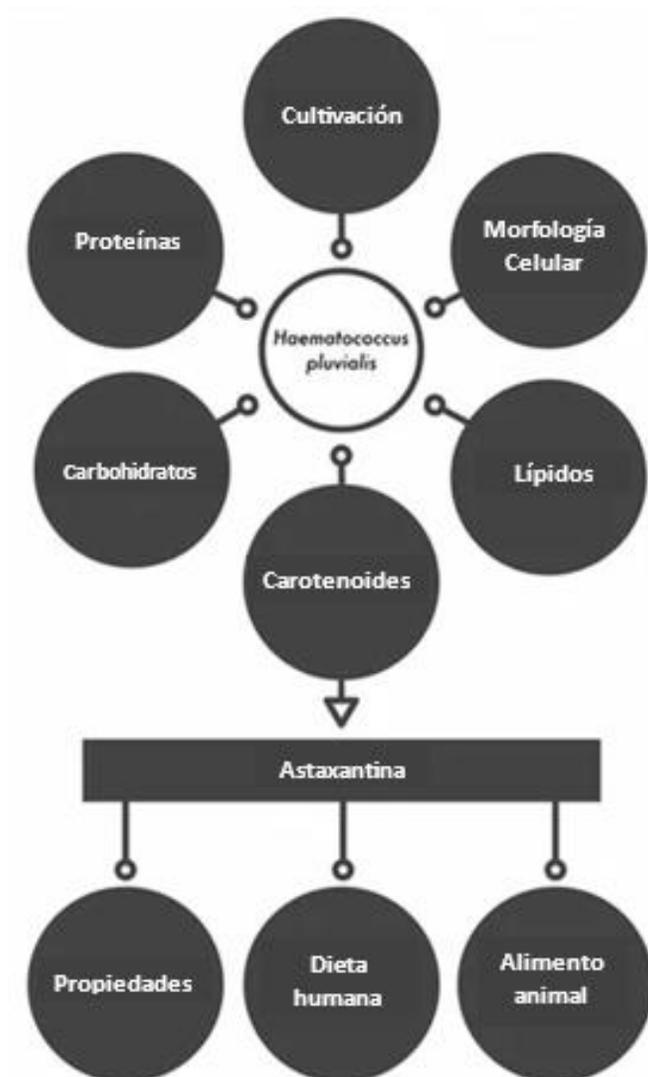
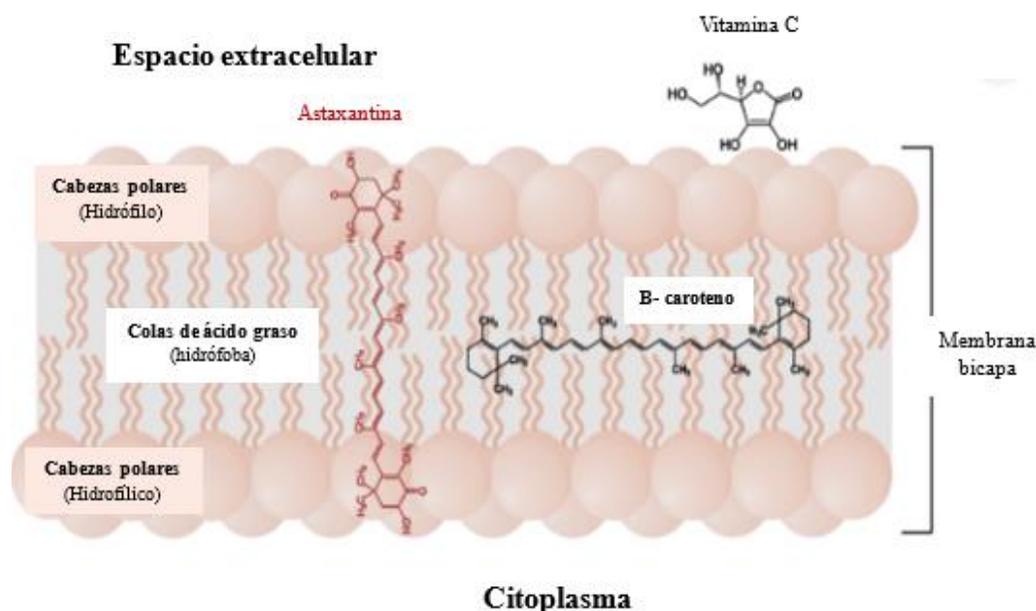


Fig 3.-Aplicaciones potenciales de *H. pluvialis* (modificado de: Mularczyk et al. 2020).

La astaxantina es el carotenoide más estudiado y valorado en *H. pluvialis*; este compuesto puede alojarse dentro de la bicapa lipídica de la membrana celular debido a su estructura polar-no polar. Sus anillos terminales polares se sitúan cerca de la superficie de la membrana, mientras que su cadena de carbono polieno hidrofóbica se inserta en la región hidrofóbica de la membrana (Fig 4). Esta capacidad de inserción le confiere una intensa actividad antioxidante, lo que significa que puede neutralizar los radicales libres y proteger las células del daño oxidativo. Esto contribuye significativamente a la salud y bienestar humano (Kidd 2011; Stachowiak et al. 2021).



**Fig 4.-**Ubicación de la astaxantina y otros antioxidantes en la membrana celular (modificado de Stachowiak et al. 2021).

Además de la astaxantina, *H. pluvialis* produce otros carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, luteína, cantaxantina, zeaxantina y violaxantina. Cada uno de estos carotenoides tiene sus propias propiedades y beneficios para la salud. El  $\beta$ -caroteno juega un papel crucial en la neutralización de los radicales libres y la protección celular contra el estrés oxidativo. Además, al ser precursor de la vitamina A, contribuye significativamente a la salud ocular, la inmunidad y la salud de la piel. La producción de  $\beta$ -caroteno a partir de *H. pluvialis* es crucial debido a su capacidad para proporcionar una fuente natural y sostenible de este compuesto. *H. pluvialis* tiene la capacidad única de acumular grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno, lo que, combinado con su cultivo adaptable y versátil, lo convierte en una opción prometedora para satisfacer la creciente demanda de  $\beta$ -caroteno en diversas industrias,

desde la alimentaria hasta la farmacéutica y la cosmética, de manera más respetuosa con el medio ambiente (Ablon 2021). La luteína y zeaxantina son carotenoides que se acumulan en el tejido ocular y se ha demostrado que protegen contra enfermedades oculares como la degeneración macular relacionada con la edad (Guerin 2003). La producción de carotenoides en *H. pluvialis* puede variar dependiendo de varios factores, como la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de estrés a las que se somete la microalga (Schüler et al. 2020). Estos factores pueden influir en la síntesis y acumulación de carotenoides en la célula (Coesel et al. 2008) por lo que, a su vez, la producción de sus metabolitos secundarios en microalgas se verá influenciada por los factores mencionados. Por ejemplo, la exposición a altas intensidades de luz y la limitación de nutrientes como el nitrógeno pueden aumentar la acumulación de metabolitos. La intensidad lumínica adecuada estimula la acumulación de carotenoides como defensa contra el estrés oxidativo, pero una exposición prolongada puede reducir su producción. Además, la disponibilidad de nutrientes, como el nitrógeno, es crucial para el crecimiento y la biosíntesis de metabolitos, mientras que el estrés salino puede inducir una mayor acumulación de carotenoides como respuesta defensiva. Comprender cómo estos factores afectan la biosíntesis de carotenoides es esencial para optimizar los métodos de cultivo y maximizar su producción en *H. pluvialis* (Schüler et al. 2020).

### **2.11 Desafíos en la producción de carotenoides en *H. pluvialis***

En términos de costos de producción, la obtención de carotenoides en *H. pluvialis* puede presentar desafíos debido a la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo y los métodos de cosecha para obtener altas concentraciones de carotenoides de manera eficiente (Shah et al. 2016). La generación de biomasa y carotenoides de *H. pluvialis* a gran escala puede ser costosa debido a los requerimientos de infraestructura, energía y mano de obra (Trivedi et al. 2015). Sin embargo, se han realizado investigaciones y mejoras tecnológicas para reducir los costos de producción de *H. pluvialis* y sus carotenoides (Trivedi et al. 2015). El desarrollo de sistemas de cultivo a gran escala, como fotobiorreactores, y la optimización de los medios de cultivo pueden ayudar a mejorar la eficiencia y reducir los costos de producción. Además, se han explorado diferentes métodos de extracción y

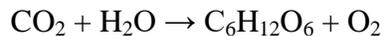
purificación de carotenoides para mejorar la rentabilidad y la calidad del producto final (Trivedi et al. 2015).

## **2.12 Modos de cultivo en microalgas**

Al igual que todas las células vivas, las microalgas requieren una fuente de energía y materiales para su crecimiento y división celular. Según las fuentes de carbono y energía utilizadas, las microalgas se clasifican en cuatro grupos: fotoautótrofas, heterótrofas, mixotróficas y fotoheterotróficas. Es importante destacar que algunas microalgas heterótrofas y mixotróficas también pueden llevar a cabo el metabolismo fotoautótrofo. Por ejemplo, ciertas especies de microalgas fotoautótrofas pueden exhibir vías metabólicas secundarias heterótrofas y mixotróficas. El cultivo de microalgas se lleva a cabo a través de estos cuatro modos, y cada uno tiene implicaciones significativas en la investigación, el diseño y el crecimiento de las microalgas, así como en la composición bioquímica de la biomasa resultante. Por lo que, la elección del modo de cultivo es un factor crucial que debe considerarse al investigar *H. pluvialis*, en este caso, fotoautótrofo (Daneshvar et al. 2021).

## **2.13 Cultivo fotoautótrofo de microalgas**

Las microalgas fotoautótrofas realizan la biosíntesis de materia orgánica utilizando carbono inorgánico, como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), como fuente de carbono, y la luz solar como fuente de energía. Este proceso tiene lugar a través de la fotosíntesis, donde se captura la energía lumínica y se convierte en energía química. La ecuación representa la biofijación de carbono y la fotosíntesis en organismos que contienen clorofila a:



El crecimiento celular de microalgas fotoautótrofas depende principalmente del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), lo que implica que la captura de CO<sub>2</sub> ocurre en el proceso de cultivo fotoautótrofo. El carbono capturado por las microalgas se incorpora en su estructura molecular, como lípidos, proteínas y carbohidratos, que pueden ser aprovechados para producir diversos productos biológicos de valor agregado, además, es crucial considerar que la elección de las formas de cultivo puede influir significativamente en la productividad de la biomasa en el cultivo fotoautótrofo de microalgas. Por ejemplo, el

cultivo en campo abierto y el cultivo continuo presentan diferencias en cuanto a la cantidad de luz disponible para las algas. Esta variación en la exposición a la luz puede tener un impacto directo en el éxito del cultivo de microalgas fotoautótrofas, además, tenemos otro factor crucial a considerar son las diferentes formas para cultivar a las microalgas, los cuales, pueden afectar la productividad y el rendimiento en las microalgas (Daneshvar et al. 2021).

## **2.14 Distintas formas de cultivo para microalgas**

El cultivo de microalgas abarca una variedad de técnicas, cada una con sus propias particularidades y aplicaciones específicas. Una de estas técnicas es el cultivo a campo abierto, donde las microalgas se desarrollan en estanques al aire libre, aprovechando la luz solar como fuente de energía. Aunque este método es económico, puede ser vulnerable a fluctuaciones ambientales y contaminación. Por otro lado, el cultivo en fotobiorreactores ofrece un enfoque más controlado. Aquí, las microalgas se cultivan en sistemas cerrados donde se puede regular con precisión la temperatura, la luz y los nutrientes. Aunque su implementación puede ser más costosa, proporciona un control más riguroso del ambiente de cultivo, lo que puede traducirse en una mayor productividad y calidad de las microalgas. Una variante similar es el cultivo en sistemas cerrados al aire libre, que busca combinar los beneficios del control ambiental con un costo potencialmente menor que los fotobiorreactores tradicionales. Estos sistemas pueden ser menos sofisticados y utilizar materiales más simples como bolsas o recipientes cerrados. Además, existe el cultivo mixto o mixotrófico, que ofrece una mayor flexibilidad en los nutrientes. Aquí, las microalgas se cultivan en medios que contienen tanto nutrientes orgánicos como inorgánicos, con el objetivo de aumentar la productividad al brindarles mayores recursos energéticos. Por otro lado, el cultivo heterótrofo implica cultivar microalgas en medios que contienen fuentes de carbono orgánico. Aunque puede ser útil en condiciones donde la luz es limitada, este método tiende a ser más costoso debido al suministro de nutrientes que requiere. Finalmente, si se busca mejorar la adaptabilidad de las microalgas en los medios de cultivo, el cultivo en lote secuencial es una opción destacada (Ahmad et al. 2021; Liaqat et al. 2023; Peter et al. 2022).

### **2.15 Cultivo en lote secuencial de *H. pluvialis***

El cultivo en lote secuencial en microalgas es una estrategia de cultivo que implica la transferencia de un cultivo de microalgas de un sistema a otro en diferentes etapas de crecimiento. Este método se utiliza para maximizar la productividad y la eficiencia del cultivo, permitiendo el mantenimiento de condiciones óptimas para el crecimiento de las microalgas en cada fase. El proceso típico de cultivo en lote secuencial implica comenzar con un cultivo inicial en una etapa de crecimiento exponencial. Una vez que la densidad celular alcanza cierto punto, una fracción del cultivo se transfiere a un nuevo medio fresco para iniciar un nuevo lote. Este proceso se repite varias veces a lo largo del tiempo de cultivo, con transferencias periódicas de cultivos a nuevos medios (Lawal et al. 2023; Kumar et al. 2018).

El cultivo en lote secuencial en *H. pluvialis* permite optimizar las condiciones de cultivo para cada etapa del ciclo de vida de la microalga, lo que resulta en una mejora en la adaptabilidad de la cepa y un aumento en las producciones de biomasa. Al proporcionar condiciones específicas para el crecimiento, la inducción de estrés y la acumulación de metabolitos secundarios, se aumenta la eficiencia del proceso y se obtiene un producto final de mayor calidad y rendimiento (Lawal et al. 2023; Hata et al. 2001).

Investigaciones como las realizadas por Suh et al. (2006) y Wang et al. (2022) corroboran que la aplicación de respuestas al estrés en el cultivo secuencial de microalgas, incluyendo *H. pluvialis*, puede mejorar su adaptabilidad y la eficiencia de los sistemas de cultivo, resultando en mayores rendimientos de biomasa y astaxantina.

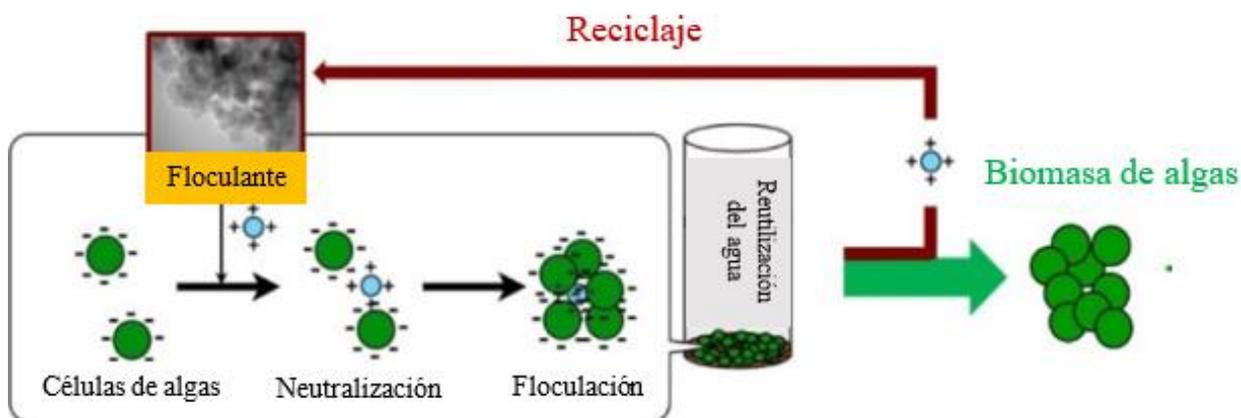
## **2.16 Técnicas de recuperación de microalgas**

Las técnicas de recuperación de microalgas son procesos fundamentales en la producción y procesamiento de estos microorganismos unicelulares. La recuperación implica la separación y concentración de las microalgas del medio de cultivo para su posterior uso en aplicaciones industriales, biotecnológicas o alimentarias. Entre las técnicas más comunes se encuentran la centrifugación, la filtración, la flotación, la sedimentación, la extracción líquido-líquido y el secado (Liber et al. 2020).

La centrifugación es un método que implica el giro rápido de un recipiente que contiene la mezcla de microalgas y medio de cultivo, generando fuerzas centrífugas que separan las células de microalgas del líquido circundante. La filtración utiliza membranas porosas o filtros para retener las microalgas mientras permite el paso del líquido de cultivo. La flotación se basa en la adhesión de las microalgas a burbujas de aire o agentes químicos, lo que facilita su separación de la fase líquida. Por otro lado, la sedimentación aprovecha la gravedad para que las microalgas se depositen en el fondo de un contenedor, donde pueden ser recolectadas. La extracción líquido-líquido se utiliza para separar compuestos específicos de las microalgas mediante la adición de solventes adecuados que extraen los compuestos de interés. Finalmente, el secado implica la eliminación del agua de las microalgas mediante métodos como la evaporación, la liofilización o la atomización, lo que resulta en un producto seco y estable. Estas técnicas de recuperación pueden ser utilizadas individualmente o combinadas según las características específicas de las microalgas y los requisitos del proceso de producción, aunado a esto, importante considerar que la floculación también es una técnica relevante en este contexto. La elección de la técnica adecuada depende de factores como la densidad celular, el tamaño de las microalgas, las propiedades del medio de cultivo y las aplicaciones finales de los productos obtenidos (Liber et al. 2020; Menegazzo et al. 2021).

## 2.17 La floculación en microalgas

La floculación es el proceso mediante el cual las partículas se aglomeran al neutralizar sus cargas superficiales, formando flóculos. Por lo general, la manera de separación de los flóculos se da mediante la sedimentación inducida por gravedad. La floculación es una técnica eficaz y simple que ha sido ampliamente estudiada como una estrategia prometedora para recolectar diferentes especies de algas (Fig 5) (Matter et al. 2019).



**Fig 5.**-Proceso de recolección de floculación de células de algas con un floculante reciclable (modificado de: Matter et al. 2019).

La floculación en la producción depende de la especie específica de microalga, incluso cuando se mantienen los parámetros operativos adecuados. Vandamme et al. (2012) realizaron un estudio utilizando *Chlorella vulgaris* y precipitados de  $\text{CaCO}_3$  a pH 10.5, 11 y 12, pero no observaron floculación en su experimento. Esto indica que, a pesar de los valores adecuados de pH y la presencia de precipitados, la floculación no se produjo con esa especie de microalga en particular. Cabe mencionar que, en general, se ha observado que un pH ácido en el rango de 3.5-4 y un pH básico en el rango de 9.5-12.5 pueden favorecer la floculación en algunas condiciones (Putri 2020).

Aunado a esto, Tran et al. (2017) investigaron el efecto de la actividad fotosintética y el pH alcalino en la floculación de *Nannochloropsis oculata*. Al aumentar la actividad fotosintética y presentarse un pH alcalino, se observó la floculación en el medio de cultivo específicamente en respuesta a esos factores específicos de la microalga utilizada.

Asimismo, Beltrán-Rocha et al. (2021) realizaron un trabajo con 16 consorcios de microalgas nativas. Encontraron una producción de biomasa de 1.4 a 4.4 g de peso seco por litro ( $\text{g L}^{-1}$ ) y porcentajes de floculación del 81% al 100%. Este estudio demuestra que, en presencia de un alto contenido de sales inorgánicas disueltas y el aumento natural de pH a través de la fotosíntesis, se logró una alta floculación junto con una producción de biomasa significativa en los distintos consorcios de microalgas evaluados. En general, estos ejemplos ilustran que la floculación en la producción de microalgas puede variar dependiendo de la especie de microalga utilizada. Aunque los parámetros operativos, como el pH, pueden influir en la floculación, es importante tener en cuenta que la respuesta puede ser diferente para cada especie, por lo tanto, se requiere un enfoque específico y considerar las características individuales de cada microalga para obtener una floculación exitosa.

### 2.18 Autofloculación

La autofloculación se refiere al proceso mediante el cual las células de una especie de microalgas tienden a aglomerarse o formar flóculos de forma espontánea sin necesidad de algún agente externo, donde, esto ocurre en un periodo de tiempo de sedimentación, la cual puede ser beneficiosa para las cosechas parciales, que implican la recolección de una fracción de las células para su posterior procesamiento (Fig 6) (Muylaert et al. 2017).



**Fig 6.-** Ejemplo de autofloculación a tres diferentes concentraciones de medio de cultivo y distintas visualizaciones en determinados periodos de tiempo (modificado de: Matter et al. 2019).

La autofloculación en *H. pluvialis* se ha observado en condiciones específicas de cultivo, como altas densidades celulares, bajos niveles de nutrientes o estrés ambiental (Nagappan et al. 2019). Los factores que contribuyen a la autofloculación incluyen la secreción de polisacáridos y mucopolisacáridos por parte de las células, la interacción entre las células y la formación de agregados debido a fuerzas electrostáticas y cohesión celular (Moreira et al. 2022).

En el contexto del cultivo de algas, la influencia de los nutrientes en la autofloculación y producción de biomasa es un aspecto crucial para considerar. Matter et al. 2019 al emplear *Chlorella vulgaris*, reportaron que la utilización de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en lugar de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fuente de nitrógeno mejora notablemente la eficiencia de autofloculación. Esta mejora se atribuye, en gran medida, a la co-precipitación de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) presentes en el medio, que se combinan con las células de algas.

La autofloculación reduce la necesidad de utilizar métodos de separación más complejos técnicamente y costosos por los volúmenes de operación, como la centrifugación o la filtración, que se requieren en cultivos de microalgas que no presentan este fenómeno de agregación espontánea, además, al permitir la cosecha parcial, se puede obtener una fracción de células enriquecida en compuestos de interés (Li et al. 2020; Zeng et al. 2022).

### **2.19 Composición del medio de cultivo para *H. pluvialis***

Los medios de cultivo desempeñan un papel esencial en el crecimiento, desarrollo y producción óptima de las microalgas al proporcionar los nutrientes esenciales necesarios. En la industria y la investigación, se emplean diversos medios comunes, como el BBM (Basal), BG11, BG11 modificado, OHM y RM. Entre ellos, el BG11 y el BBM destacan por su equilibrio de sales inorgánicas, nitratos y fosfatos, convirtiéndolos en opciones preferidas para el cultivo de cianobacterias y algunas microalgas (Imamoglu et al. 2007). El BBM sirve como punto de partida estándar para el desarrollo de medios específicos al proveer los nutrientes esenciales para el crecimiento inicial de las microalgas. Sin embargo, suele requerir ajustes adicionales para adaptarse a las necesidades particulares de cada cepa. En este contexto, se exploró el medio de cultivo LC-Y, nunca utilizado en microalgas, debido a sus características nutricionales, que incluyen una variedad de nutrientes

esenciales como el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) y el nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Aunque difiere ligeramente en su composición (véase la composición del medio LC-Y y BBM en la sección de metodología), comparte nutrientes esenciales para *H. pluvialis*, como, por ejemplo: el sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), el cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), el etilendiaminotetraacetato disódico ( $\text{EDTA-Na}_2$ ), etc. (Tabla 3). La elección del medio adecuado es crucial y depende tanto de la especie de microalga que se cultiva como de los objetivos del cultivo. Por consiguiente, la composición precisa del medio juega un papel determinante en la optimización del crecimiento de la microalga. Además, la optimización continua de los medios de cultivo es esencial para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de la producción de microalgas a gran escala, tanto en aplicaciones comerciales como en investigación biotecnológica (Imamoglu et al. 2007). Asimismo, se han registrado diversos crecimientos de *H. pluvialis* en distintos medios de cultivo, como el KM1, MM2 y Provasoli. Entre estos, el medio Provasoli modificado ha mostrado resultados prometedores, según el estudio realizado por Marinho et al. (2021). Este medio se destacó por su eficiencia al aumentar la producción de astaxantina en *H. pluvialis*. Los resultados de la investigación revelaron una producción de biomasa de  $4,9 \pm 0,0004$  mg/mL, así como ésteres metílicos de ácidos grasos y una productividad de astaxantina de  $9,28 \pm 0,4$  mg/L/día bajo condiciones mixotróficas. La optimización del medio de cultivo y la selección de cepas adecuadas son estrategias clave para potenciar la producción de metabolitos secundarios en microalgas, como en el caso de este estudio, donde el objetivo era aumentar la floculación, así como la producción de biomasa, lípidos y carotenoides en *H. pluvialis*.

**Tabla 3.-** Análisis comparativo de la composición de nutrientes en varios medios de cultivo: BG11, BG11 Modificado, Basal, OHM y RM (Imamoglu et al. 2007).

COMPONENTE	BG11 (mg/L)	Mod. BG11 (mg/L)	OHM (mg/L)	Basal (mg/L)	RM <sup>a</sup> (mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	1500	1500	-	-	300
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40	320	-	-	80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	20
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	150	-
KNO <sub>3</sub>	-	-	410	100	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	30	-	-
B-NA <sub>2</sub> Glicerofosfato	-	-	-	50	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	75	200	246	40	10
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	36	36	110	-	58.5
Ácido cítrico	6	6	-	-	-
Citrato férrico de amonio	6	6	-	-	-
EDTA Na <sub>2</sub>	1	1	-	2.71	-
EDTA	-	-	-	-	7.5
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	100	-	-	-
NaCl	-	-	-	-	20
Vitamina B12	-	-	0.0150	0.0001	-
Biotina	-	-	0.025	0.0001	-
Tiamina-HCl	-	-	-	0.01	-
Tiamina	-	-	0.0175	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	2.86	-	-	0.3
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.81	1.81	0.98	0.108	-
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	1.5
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.22	0.22	-	0.066	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.39	0.39	0.12	0.0075	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	0.3
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08	0.08	0.012	-	0.08
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	-	-	0.26
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	-	-	-	5.888	17
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	-	-	0.011	0.012	-
Trisaminometano	-	-	-	500	-
Citrato de Fe (III) H <sub>2</sub> O		-	2.62	-	-
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		-	0.075	-	-
SeO <sub>2</sub>		-	0.005	-	-

## **2.20 Medio LC-Y**

López-Chuken y Young (2010) desarrollaron un medio de cultivo que originalmente fue diseñado para su uso en plantas. Sin embargo, Beltrán-Rocha et al. (2021) lo aplicaron por primera vez en microalgas, donde observaron que este medio promovía la floculación.

## **2.21 Importancia de las pruebas de cenizas en microalgas**

En el contexto de las microalgas, la materia inorgánica abarca los minerales y compuestos inorgánicos presentes en estos organismos. Las pruebas de cenizas en microalgas son fundamentales, ya que proporcionan información valiosa sobre su composición mineral. Este conocimiento puede tener implicaciones significativas en una variedad de aplicaciones y procesos relacionados con las microalgas (Ali et al. 2021).

Las pruebas de cenizas en microalgas son importantes porque destacan:

**Composición Nutricional:** son valoradas por su alto contenido de nutrientes, incluidos los minerales esenciales como el calcio, el hierro, el magnesio y el potasio. Las pruebas de cenizas pueden determinar la cantidad de estos minerales presentes en las microalgas, lo que ayuda a evaluar su valor nutricional y capacidad para su uso en alimentos, suplementos dietéticos y piensos (Chugh et al. 2022; Sukarni et al. 2014).

**Aplicaciones Industriales:** Las microalgas tienen una amplia gama de aplicaciones industriales, que van desde la producción de biocombustibles y productos químicos hasta la fabricación de cosméticos y productos farmacéuticos. La composición mineral de las microalgas puede influir en su idoneidad para estas aplicaciones industriales, y las pruebas de cenizas proporcionan información crucial para este fin (Chugh et al. 2022; Jannel et al. 2020).

**Calidad del Agua y Medio Ambiente:** La presencia de ciertos minerales en las microalgas puede indicar la calidad del agua en la que crecen, así como la presencia de contaminantes o nutrientes en el medio ambiente acuático. Las pruebas de cenizas pueden utilizarse como una herramienta para monitorear la calidad del agua y evaluar la salud de los ecosistemas acuáticos (Chugh et al. 2022; Ali et al. 2021).

## **2.22 Estandarización de técnicas analíticas**

El análisis de carotenoides, lípidos y clorofilas en microalgas es un campo de estudio crucial para comprender su composición bioquímica y su potencial aplicativo en diversas industrias (Kholssi et al. 2023). Estos compuestos desempeñan roles fundamentales en la fotosíntesis, protección celular y adaptación al medio ambiente. El estudio de su perfil químico proporciona información valiosa para la selección de cepas con características deseables, el desarrollo de métodos de cultivo eficientes y la optimización de procesos de extracción. Además, estos análisis son esenciales para la evaluación de la calidad nutricional y funcional de las microalgas, así como para el diseño de productos innovadores en sectores como la alimentación, la energía y la salud.

La estandarización de técnicas y métodos para el análisis de metabolitos en microalgas es fundamental para garantizar la precisión, la reproducibilidad y la comparabilidad de los datos obtenidos en diferentes estudios científicos y aplicaciones industriales. Dado el creciente interés en el potencial biotecnológico de las microalgas, es crucial contar con protocolos bien establecidos que permitan cuantificar y caracterizar de manera confiable una amplia gama de metabolitos, como lípidos, carotenoides y clorofilas (Kassem et al. 2023). Estos metabolitos son de gran importancia debido a sus roles en la nutrición, la salud, la energía y la industria.

El análisis de carotenoides y clorofilas en microalgas tiene sus raíces en la investigación sobre la fotosíntesis y la biología molecular de estos organismos. A medida que avanzaba la comprensión de los procesos bioquímicos involucrados en la fotosíntesis, surgió la necesidad de desarrollar técnicas para cuantificar y caracterizar estos pigmentos esenciales (Kassem et al. 2023; Sun et al. 2018).

En las décadas de 1950 y 1960, se realizaron importantes avances en la separación y análisis de pigmentos fotosintéticos utilizando técnicas de cromatografía. La cromatografía en papel y la cromatografía en capa delgada se convirtieron en herramientas comunes para separar y detectar carotenoides y clorofilas en extractos de microalgas. Con el tiempo, surgieron métodos más sofisticados, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas, que permitieron una mayor precisión y sensibilidad

en el análisis de pigmentos. Estos avances tecnológicos permitieron no solo cuantificar los pigmentos, sino también identificar compuestos específicos y determinar su estructura molecular con mayor precisión (Beecher 2024). La aplicación de estas técnicas en la investigación de microalgas ha sido amplia y diversa. Desde el estudio de la fisiología y la ecología de las microalgas hasta su aplicación en la producción de biocombustibles, alimentos funcionales y productos farmacéuticos, el análisis de carotenoides y clorofilas ha sido fundamental para comprender y aprovechar el potencial de estos organismos unicelulares en diversas áreas (Occhipinti et al. 2024).

El método de análisis de lípidos en microalgas utilizando fosfovanillina por espectrofotometría UV-Vis se basa en la capacidad de la fosfovanillina para formar complejos fosfolípidos-fosfovanillina que exhiben una absorbancia máxima a una longitud de onda específica en el rango UV-Vis. Este método fue desarrollado por primera vez en microalgas en 2015 por Anschau y colaboradores. La fosfovanillina se utiliza como reactivo para extraer lípidos de las muestras de microalgas y formar complejos coloreados que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente. El proceso implica la adición de fosfovanillina a una muestra de extracto de lípidos de microalgas, seguida de la medición de la absorbancia de la solución a una longitud de onda específica utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. La concentración de lípidos en la muestra se determina comparando la absorbancia con una curva de calibración previamente generada con estándares conocidos de lípidos.

Este método se ha aplicado ampliamente en la investigación de microalgas para cuantificar la concentración total de lípidos en muestras de cultivos de microalgas. Ha sido utilizado en estudios de optimización de condiciones de cultivo, selección de cepas de microalgas con alto contenido de lípidos y evaluación de la viabilidad de microalgas como fuentes de materias primas para la producción de biocombustibles, alimentos funcionales y productos químicos de valor añadido. En resumen, el método de análisis de lípidos en microalgas utilizando fosfovanillina por espectrofotometría UV-Vis ha sido una herramienta valiosa en la investigación de microalgas, permitiendo la cuantificación rápida y precisa de lípidos en muestras de cultivos de microalgas con potencial aplicativo en diversos campos de la investigación.

### 3.-JUSTIFICACIÓN

El desafío principal en la producción de *H. pluvialis* a gran escala es garantizar una recolección eficiente y optimizar la producción de biomasa, lípidos y carotenoides. Además, es crucial evaluar la eficiencia de floculación y la capacidad de acumulación de compuestos bajo diferentes condiciones de cultivo, utilizando medios específicos como el BBM y el LC-Y para maximizar la rentabilidad. Se han investigado diversas estrategias de floculación, como el uso de coagulantes, control de pH y tratamientos químicos, con resultados variables según los estudios y las condiciones de cultivo, esto subraya la importancia de una evaluación rigurosa de la eficiencia de floculación en cultivos de *H. pluvialis*.

La optimización de la producción de biomasa es crucial para garantizar la viabilidad económica a gran escala. Aunque se han logrado avances mediante estrategias como el lote secuencial, que alterna las fases de crecimiento y acumulación, aún hay margen para mejorar tanto la eficiencia como la calidad de la biomasa obtenida. Además, la producción de lípidos y carotenoides, con sus amplias aplicaciones comerciales en industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica, es otro aspecto clave a considerar. Maximizar la rentabilidad en la producción de *H. pluvialis* requiere evaluar su capacidad para acumular estos compuestos bajo diversas condiciones de cultivo, incluyendo el uso de medios específicos como el BBM (Medio Basal Bold) y el LC-Y (López-Chucken & Young).

El objetivo principal de esta tesis es evaluar la eficiencia de floculación de *H. pluvialis* en cultivos en lote secuencial, así como la producción de biomasa, lípidos y carotenoides en los medios BBM y LC-Y.

## **4.-HIPÓTESIS**

El cultivo de *H. pluvialis* en lotes secuenciales induce la adaptabilidad al estrés salino del medio LC-Y y a su vez favorece la floculación, producción de biomasa, lípidos y carotenoides.

## 5.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de floculación, así como la producción de biomasa, lípidos y carotenoides del cultivo en lote secuencial en los medios BBM y LC-Y en *H. pluvialis*.

### 5.1 Objetivos particulares

1. Estandarización de las técnicas analíticas.
2. Realizar pruebas preliminares para evaluar las densidades ópticas de *Haematococcus pluvialis* en un medio con amonio como fuente de nitrógeno utilizando distintas concentraciones de *Yucca schidigera*.
3. Realizar tres cultivos de lote secuencial con *H. pluvialis* utilizando los medios BBM y LC-Y.
4. Determinar la producción de biomasa y eficiencia de la floculación en *H. pluvialis* en los medios BBM y LC-Y.
5. Monitorear el pH y conductividad eléctrica (C.E.) del tercer lote.
6. Finalizando el tercer cultivo en lote secuencial cuantificar la producción de lípidos, clorofila, carotenoides totales y materia inorgánica por *H. pluvialis* en los cultivos con medio BBM y LC-Y.

# **CAPÍTULO 1**

## **Estandarización de las técnicas analíticas**

### **RESUMEN**

La estandarización de técnicas analíticas es esencial para garantizar resultados precisos y comparables en el análisis de lípidos y carotenoides. La curva de calibración para lípidos permite establecer una relación cuantitativa entre la concentración de lípidos y la respuesta instrumental, lo que facilita la cuantificación precisa de los lípidos en muestras desconocidas. Esta estandarización garantiza la exactitud de las mediciones y la reproducibilidad de los resultados, lo que es crucial en la investigación y la industria alimentaria para evaluar la calidad de los productos y monitorizar los procesos de producción. Asimismo, la estandarización del análisis de longitud de onda óptima para carotenoides asegura que se utilice la configuración más adecuada del espectrofotómetro para maximizar la sensibilidad y selectividad en la detección de carotenoides. Esto garantiza una medición precisa de los niveles de carotenoides en diversas muestras, lo que es fundamental en la investigación nutricional, agrícola y alimentaria para evaluar el contenido de nutrientes y la calidad de los alimentos.

## 1.-INTRODUCCION

Los lípidos y los carotenoides son componentes esenciales de las microalgas, y su importancia económica radica en diversas aplicaciones industriales y nutricionales. Los lípidos, como los ácidos grasos y los triglicéridos, son valiosos por su potencial como fuentes de biocombustibles, productos químicos y alimentos funcionales. Por otro lado, los carotenoides, como la astaxantina y la beta-caroteno, tienen demanda en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades antioxidantes y pigmentantes. La explotación eficiente de estos compuestos en microalgas puede impulsar la bioeconomía y la sostenibilidad en sectores clave (Anschau et al. 2017; Vo et al. 2017)

La clorofila es fundamental para la fotosíntesis, el proceso mediante el cual las plantas y las microalgas convierten la luz solar en energía química. Sin embargo, hay varios tipos de clorofila, como la clorofila a, b, c y d, cada una con distintas capacidades de absorción de luz. La importancia de los diferentes tipos de clorofila en las microalgas radica en su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y de luz (Gonzalez y Rodriguez 2023) El análisis de carotenoides, lípidos y clorofilas en microalgas es esencial para comprender su composición bioquímica y su potencial aplicativo en diversas industrias. Estos compuestos desempeñan roles fundamentales en la fotosíntesis, protección celular y adaptación al medio ambiente, proporcionando información valiosa para la selección de cepas, el desarrollo de métodos de cultivo eficientes y la optimización de procesos de extracción. Además, son críticos para evaluar la calidad nutricional y funcional de las microalgas, y para diseñar productos innovadores en sectores como la alimentación, la energía y la salud. La estandarización de técnicas y métodos analíticos es crucial para garantizar la precisión, reproducibilidad y comparabilidad de los datos en estudios científicos y aplicaciones industriales. Con el creciente interés en el potencial biotecnológico de las microalgas, contar con protocolos bien establecidos es fundamental para cuantificar y caracterizar de manera confiable metabolitos como lípidos, carotenoides y clorofilas. Estos estándares no solo facilitan la comparación de resultados entre laboratorios y estudios, sino que también impulsan avances en la comprensión de la biología y la bioquímica de las microalgas, así como en el desarrollo de aplicaciones innovadoras en diversos campos (Anschau et al. 2017; Vo et al. 2017).

## 2.-MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Estandarización de la curva de calibración para el análisis de lípidos en microalgas.

La cantidad de lípidos totales fue determinada por el método propuesto por Anschau et al. (2015). En un tubo de ensayo, se añadieron 40 µL de aceite de canola Sigma-Aldrich (cat. 46961) y 400 µL de ácido sulfúrico concentrado. Tras agitar en un vortex durante 30 segundos, el tubo se colocó en un baño maría y se mantuvo a ebullición durante 10 minutos. Luego, se retiró del baño maría y se enfrió en un baño de agua durante 10 minutos adicionales.

Se agregaron 1000 µL de fosfovanillina al tubo, seguido de una agitación en vortex por 30 segundos. La muestra se incubó a 37°C durante 15 minutos y posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a 522 nm.

### 2.2 Estandarización del método de análisis de carotenoides

La cantidad total de carotenoides fue determinada mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Vo et al. 2017). Como estándar de referencia se utilizaron 5 mg de β-caroteno marca Sigma-Aldrich # 22040 (pureza 97%) y se disolvió en hexano hasta diluirlo 1000 veces. Se tomó 1 mL del extracto hexánico y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-650 a 450 nm. Para la cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$mg \text{ Caroteno}/g = (A \times V \times 104)/(A_{cm^{-1}} \times 100 \times g)$$

Donde: A = Absorbancia 450 nm V = Volumen del extracto

$$A_{cm^{-1}} = 2500 \quad g = \text{Gramos de muestra}$$

### 3.-RESULTADOS

#### 3.1 Selección de la longitud de onda óptima para la cuantificación de carotenoides

Para mejorar la precisión en el análisis de carotenoides, se llevó a cabo un estudio para determinar la longitud de onda más adecuada. Nuestros resultados indican que la longitud de onda de 452 nm es la óptima para este propósito, demostrando una mayor sensibilidad y selectividad en la detección de estos compuestos (Fig 7).

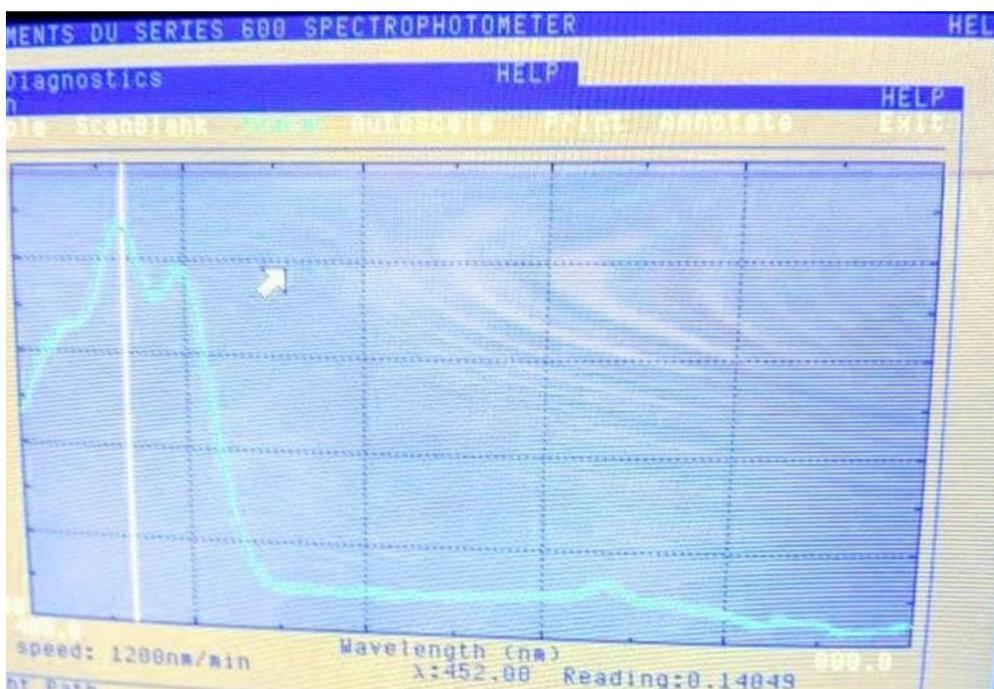


Fig 7.- Longitud de onda óptima para análisis de carotenoides.

### 3.2 Análisis Espectrofotométrico de contenidos de carotenoides en muestras estándar de $\beta$ -Caroteno

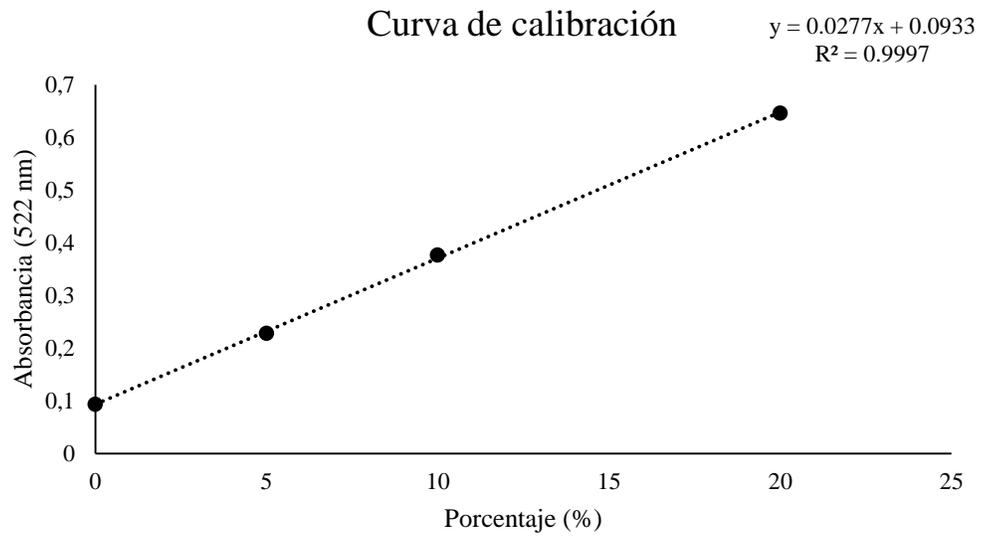
Se analizó el espectrofotométrico de muestras estándar de  $\beta$ -Caroteno, donde se evaluó la absorbancia a 452.5 nm y se determinó la cantidad de carotenoides presentes en cada muestra. Se determinó la concentración de  $\beta$ -Caroteno en mg por gramo de muestra, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para los resultados obtenidos. Los resultados proporcionan información detallada sobre la composición de carotenoides en las muestras analizadas (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Contenidos de Carotenoides en muestras de estándar de  $\beta$ -Caroteno.

Estándar	Abs 452.5 nm	Carotenoides	Peso (g)	mg $\beta$ -Caroteno/g	Promedio	Desvest	C.V.
<b>B-Caroteno</b>	0.225	0.945	0.0511	945	962.36	15.06	1.56
<b>B-Caroteno</b>	0.231	0.9702	0.05214	970.2			
<b>B-Caroteno</b>	0.2314	0.97188	0.4978	971.88			

### 3.3 Curva de calibración de lípidos

La curva de calibración obtenida para la cuantificación de lípidos exhibe una alta precisión con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9997. La curva se construyó utilizando diferentes concentraciones conocidas de lípidos y con lectura espectrofotométrica de 522nm. Los datos demuestran una excelente correlación entre la concentración de lípidos y la respuesta del espectrofotómetro, lo que garantiza una cuantificación precisa y confiable de los lípidos en las muestras analizadas. Este resultado refleja la robustez del método utilizado y su capacidad para proporcionar mediciones precisas incluso en concentraciones bajas de lípidos (Fig 8).



**Fig 8.-** Curva de Calibración de lípidos a cuatro niveles de concentración.

## 4.-DISCUSION

El método de análisis de lípidos en microalgas utilizando la técnica de fosfovanillina demostró una longitud de onda óptima similar a la propuesta por Anschau et al. (2015). En nuestro estudio, se llevaron a cabo las curvas de calibración utilizando cinco estándares de concentración en el método de análisis de lípidos, donde el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) superó 0.99 en ambas curvas, indicando una relación lineal altamente significativa.

En relación con la estandarización del método de análisis de carotenoides totales en microalgas, se encontró que la absorción máxima ocurrió en la región ultravioleta, con una longitud de onda óptima de 452 nm, en consonancia con lo reportado por otros investigadores (Vo et al. 2017). Respecto al análisis de exactitud utilizando un estándar de  $\beta$ -caroteno, el valor obtenido fue estadísticamente similar al reportado por el fabricante, alcanzando un 97% de precisión.

Es esencial resaltar la importancia de una estandarización meticulosa de los métodos analíticos, especialmente a través de la regresión lineal. Este enfoque riguroso implica el análisis minucioso de concentraciones conocidas, que abarcan idealmente entre tres y cinco puntos distintos, como señalan Montgomery y sus colegas en su investigación de 2021. Estos puntos de calibración se someten a mediciones precisas en el espectrofotómetro, asegurando que se mantengan las mismas condiciones que se aplican a las muestras problema. Este proceso garantiza la fiabilidad y la precisión de los datos obtenidos, sentando así una base sólida para la interpretación de los resultados y la validez de las conclusiones extraídas de la investigación.

## CAPÍTULO 2

Efecto de la inclusión de extracto de *Yucca shidigera* sobre la producción de *Haematococcus pluvialis* usando amonio como fuente de nitrógeno

### RESUMEN

Las microalgas tienen el potencial de impulsar la economía biológica al acumular compuestos secundarios, lípidos y carbohidratos. Sin embargo, para maximizar su crecimiento y producción de nutrientes, es esencial proporcionarles una fuente de nitrógeno eficiente. Aunque el amonio es preferido por *H. pluvialis* debido a su menor demanda energética, su toxicidad plantea desafíos. Se ha propuesto una solución innovadora para aumentar la producción de biomasa, lípidos y carotenoides en *H. pluvialis*, resolviendo el problema de la formación de amoniaco en medios de amonio que inhibe el crecimiento celular. Para abordar este desafío, se han empleado extractos de *Yucca schidigera* para adsorber el amoniaco, liberando así el amonio y convirtiéndolo en la principal fuente de nitrógeno para *H. pluvialis*. Se realizaron cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de extracto estandarizado de *Y. Schidigera*: 0, 100, 200 y 400 partes por millón (ppm). Durante el crecimiento a 200 ppm, se observó el máximo crecimiento registrado de  $3.37 \times 10^6$  células/mL. Sin embargo, a pesar de las expectativas de aumento en la producción al usar extracto de *Y. schidigera* en los cultivos de *H. pluvialis* con amonio, posteriormente los medios dejaron de crecer, lo que imposibilitó el análisis de los objetivos planteados. Esto subraya la complejidad de los sistemas biológicos y la importancia de una evaluación detallada en la investigación biotecnológica.

## 1.-Introducción

Bajo condiciones de estrés controlado, las microalgas tienen la capacidad de acumular una variedad de compuestos secundarios, además de lípidos y carbohidratos. La explotación de estos metabolitos secundarios en un contexto industrial puede significativamente fortalecer una economía centrada en la biología (Olguín et al. 2022). Estos organismos son cruciales para los ecosistemas acuáticos debido a su capacidad para fijar carbono y producir oxígeno. Sin embargo, para llevar a cabo estas funciones vitales, las microalgas requieren una fuente adecuada de nutrientes, entre los que destaca el nitrógeno, fundamental para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En los ecosistemas, el nitrógeno (N) desempeña un papel fundamental, circulando dinámicamente entre el agua, la atmósfera y el suelo en diversas formas y concentraciones. Estas incluyen el dinitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), amonio ( $NH_4^+$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) y formas orgánicas de nitrógeno, como la urea, aminoácidos y péptidos (Salbitani y Carfagna 2021). Como fuente de nitrógeno, las microalgas, al igual que las plantas, tienen preferencia por el amonio ( $NH_4^+$ ), ya que el proceso metabólico para convertirlo en materia orgánica requiere menos energía que otros compuestos nitrogenados. Cuando las microalgas utilizan amonio, evitan gastar energía en la conversión de nitrato ( $NO_3^-$ ) o nitrito ( $NO_2^-$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ). Este proceso de conversión de nitrato o nitrito a amonio involucra la producción y utilización de enzimas específicas llamadas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), respectivamente. Una vez que el amonio es transportado al interior de la célula de la microalga, se incorpora directamente en la síntesis de aminoácidos, que son los bloques de construcción de las proteínas. Este proceso se lleva a cabo a través de una vía metabólica conocida como ciclo GS-GOGAT. En este ciclo, dos enzimas juegan un papel clave: la glutamina sintetasa (GS) y el glutamato sintasa (GOGAT) (Chai et al. 2021; Salbitani y Carfagna 2021). La GS se encarga de catalizar la unión del amonio con el glutamato para formar glutamina (aminoácido precursor crucial para la síntesis de proteína), mientras que la GOGAT toma la glutamina producida de la GS y la convierte en otros aminoácidos, como el glutamato. Esto permite que el nitrógeno del amonio sea incorporado directamente en los aminoácidos sin necesidad de pasar por otras formas nitrogenadas, no obstante, es importante destacar que, en los cultivos de microalgas, el uso de amonio como fuente de nitrógeno no es común debido a su tendencia a

convertirse en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), un compuesto altamente tóxico para algunas especies de microalgas (Akizuki et al. 2020; Lee et al. 2021). La toxicidad del amoníaco puede limitar su aplicación en los cultivos de microalgas, por lo que los medios de cultivo clásicos, como Basal Bold, OHM, RM y BG-11, prefieren utilizar nitrato como fuente de nitrógeno. Aunque esta elección puede implicar un gasto energético adicional para *H. pluvialis*, se sigue utilizando debido a los problemas asociados con la formación de amoníaco en medios de amonio (Verma et al. 2020; Radice et al. 2022). Actualmente, la producción de astaxantina en *H. pluvialis* se enfrenta a desafíos significativos. Los medios de cultivo a base de nitrato rara vez han superado los  $10^6$  células/mL. Esta baja producción contrasta con la cantidad de astaxantina sintéticamente producida en el mercado, que representa más del 95% del total comercializado, mientras que la astaxantina natural apenas alcanza el 1%. La principal limitación para la comercialización de la astaxantina natural radica en la dificultad y el elevado costo de su síntesis, lo que la hace menos rentable en comparación con la astaxantina sintética (Fábryová et al. 2021; Mousavi et al. 2022; Zia 2021). En este sentido, el desafío actual de la biotecnología es lograr una producción masiva y eficiente de astaxantina en *H. pluvialis*.

Una posible solución emerge del estudio de una planta nativa del suroeste de EE. UU. y México: la *Yucca schidigera*, también conocida como Palma del desierto. Esta planta ha captado el interés de los investigadores, especialmente en el ámbito ganadero y avícola, debido a su capacidad para adsorber amoníaco, evidenciada por las propiedades de su extracto (Bafundo et al. 2020).

## 2.-Material y métodos

### 2.1 Material biológico

Se utilizo *H. pluvialis* CIB68 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas. El extracto de *Y. Schidigera* que se utilizó, fue de la marca BIOAQUA y será proporcionado por la empresa Baja Agro International S.A. de C.V. (AGROIN).

### 2.2 Determinación de B<sub>50</sub> en extracto de *Y. schidigera*.

Se adiciono 1 g del producto a 5 mL de buffer fosfato-EDTA y se dejó por 5 minutos la extracción, centrifugar y obtener el sobrenadante

Tabla 5.- Reactivos para las reacciones de unión y blanco

	Muestra	Solución Sulfato de amonio 0.8 mM	Agua	Producto
1S	0 µL	20 µL	80 µL	0 mg
2S	10 µL	20 µL	70 µL	2 mg
3S	20 µL	20 µL	60 µL	4 mg
4S	30 µL	20 µL	50 µL	6 mg
5S	40 µL	20 µL	40 µL	8 mg
6S	50 µL	20 µL	30 µL	10 mg

Tabla 6.- Reacción blanco

	Muestra	Solución Buffer fosfato-EDTA	Agua	BIOAQUA
1B	0 µL	20 µL	80 µL	0 mg
2B	10 µL	20 µL	70 µL	2 mg
3B	20 µL	20 µL	60 µL	4 mg
4B	30 µL	20 µL	50 µL	6 mg
5B	40 µL	20 µL	40 µL	8 mg
6B	50 µL	20 µL	30 µL	10 mg

Se agitaron los tubos y se dejó reposar por 10 minutos para la reacción. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos en este orden:

500 mL de solución de fenol nitroprusiato y 400 mL de solución alcalina de hipoclorito de sodio. Se agitarán los tubos y se incubarán por 20 minutos a 37°C. Por último, se adicionarán 5.0 mL de agua destilada y se medirá la absorbancia a 650 nm.

### **Cálculo de B<sub>50</sub>**

Se uso la absorbancia del tubo 1 como 100% de concentración de amoniaco libre y se graficaron los datos. En el eje vertical en la concentración de amoniaco y en el eje horizontal, la concentración de producto.

### **2.3 Preparación del inóculo y condiciones del cultivo**

Se tomo una colonia de *H. pluvialis* y se inoculo en un matraz bafleado de 250 mL de BBM modificado con NH<sub>4</sub>OH (3 mM de amonio) como fuente de nitrógeno, 1000 ppm de acetato de sodio como fuente de carbono y 40 ppm de extracto de *Y. schidigera*. Se cultivo de forma mixotrófica a 25 C, luz de 40 uM-foton/m<sup>2</sup>s, de luz continua, a 125 rpm en agitador horizontal Lab-Line.

### **2.4 Diseño experimental**

Se realizaron por triplicado 4 tratamientos del cultivo con BBM-NH<sub>4</sub>-OAc. A cada tratamiento se añadió extracto de *Y. schidigera* en concentraciones de 0, 100, 200 y 400 ppm en cada tratamiento utilizando como fuente de amonio NH<sub>4</sub>OH. Como variable independiente se tomó la concentración de extracto de *Y. Schidigera* y como variables dependientes se tomó la densidad celular.

### **2.5 Determinación de densidad celular**

La densidad celular se analizó cada tercer día, expresada en células por mililitro (cel/mL). Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la cámara de Neubauer como contador celular, contando los cuatro cuadrantes de la cámara. La densidad celular se determinó mediante la siguiente fórmula:

$\text{Cel/mL} = [(\text{Total de células contadas}) / 4] \times 10000 \times \text{Factor de dilución}$

Donde: OD = Densidad óptica

## **2.6 Tratamiento de las muestras**

Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante fue desechado, y el sedimento celular se lavó dos veces con 20 ml de agua destilada y luego se liofilizó utilizando un liofilizador de viales LABCONCO. El proceso de liofilización se llevó a cabo a  $-40^{\circ}\text{C}$  y aplicando vacío. Las células secas (25 mg) se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de tejidos de 15 ml (B. Braun, Melsungen, Alemania) a 10,000 rpm durante 5 minutos. Los pigmentos totales se extrajeron con alícuotas de 2 ml de una mezcla de disolventes de diclorometano y metanol (25:75, v / v). La mezcla se separó luego por centrifugación a 10000 g durante 5 min, y el sobrenadante con los pigmentos se recogió.

Los extractos de pigmento totales se centrifugaron nuevamente a 10000 g durante 15 minutos y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la subsiguiente saponificación y separación por HPLC. Todos los procesos anteriores fueron llevados a cabo en oscuridad.

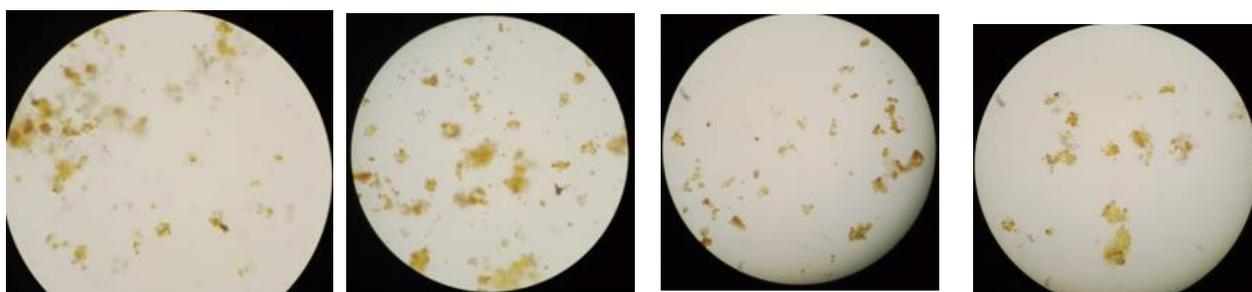
## **2.7 Análisis estadístico**

El análisis de datos se realizó utilizando el software estadístico SPSS. Se llevo a cabo un análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95%. La diferencia entre las medias fue valuada mediante un análisis de contrastes de Tukey.

### 3.-Resultados

#### 3.1 Análisis microscópico de los tratamientos

En los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2), se observó una cantidad alta de células palmela. Además, se encontraron cistos en ambos tratamientos, siendo más abundantes en T2 que en T1. En cuanto a los gromulos, T1 mostró una presencia muy alta de ellos, mientras que T2 no tenía ninguno. Por otro lado, T2 presentó pocas cantidades de quistes, mientras que T1 no tuvo ninguna presencia de quistes. En el tratamiento 3 (T3), se encontró una cantidad media de células palmela, cistos, gromulos y quistes, junto con la presencia de células globulares. En cuanto al tratamiento 4 (T4), se observó una baja cantidad de células palmela, cistos y quistes, y no se encontró ningún gromulo (Fig



9).

100ppm de  
*Y.schidigera*

200ppm de  
*Y.schidigera*

400ppm de  
*Y.schidigera*

**T1**  
Control

**Fig 9.- H.p** **T2** *en microscopio ele* **T3** *o.*  
**BBM-NH<sub>4</sub>-OA** **BBM-NH<sub>4</sub>-OA**

**T4**  
**BBM-NH<sub>4</sub>-OA**

### 3.2 Concentración de células en los 4 tratamientos

Se realizó el análisis de la determinación celular con la cámara de Neubauer. La densidad celular fue la siguiente:

$$T1 = \frac{(1266)(10000)}{4} = 3.6 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$T2 = \frac{(557)(10000)}{4} = 1.11 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$T3 = \frac{(1351)(10000)}{4} = 3.37 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$T4 = \frac{(320)(10000)}{4} = 8 \times 10^5 \text{ cel/mL}$$

### 3.3 Determinación de B<sub>50</sub>

El análisis realizado en Baja Agro International S.A. de C.V. (AGROIN) del extracto de *Yucca schidigera* marca BIOAQUA® L, revelando un contenido de saponinas del 11.13% y una capacidad de fijación de amoníaco/ValorB<sub>50</sub> de 3.6mg (Fig 10).



Fig 10.- Análisis del extracto de *Yucca Schidigera*.

## 4.-Discusión

### 4.1 Impacto por la modificación del nitrógeno en densidad celular de *H. pluvialis*

La modificación de la fuente de nitrógeno en los medios de cultivo desempeña un papel crucial en el desarrollo de las estrategias para optimizar el crecimiento celular en cultivos de microalgas (Salbitani y Carfagna 2021). Nuestro estudio reveló que el tratamiento 3 alcanzó la más alta tasa de crecimiento celular, registrando una densidad de  $3.37 \times 10^6$  cel/mL utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  como fuente de nitrógeno. La variación en las fuentes de nitrógeno puede afectar la capacidad de las células para sintetizar componentes esenciales, como proteínas, y a su vez, influye en su crecimiento (Chai et al. 2021). Por ejemplo, el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ha demostrado ser una forma de nitrógeno más fácilmente asimilable para las microalgas, lo que puede impulsar un mayor crecimiento celular al mejorar la eficiencia en la utilización de nitrógeno (Salbitani y Carfagna 2021; Lee et al. 2021).

Contrastando con nuestros hallazgos, Moraes et al. (2023), investigaron las diferentes fuentes de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ) y estrategias de alimentación (PF y WPF) en *H. pluvialis*, encontrando diferencias significativas en la densidad celular máxima entre las condiciones de alimentación para nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ -PF) y Urea ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -PF)) con valores de  $1.76 \times 10^4$  cel/mL y  $1.65 \times 10^4$  cel/mL respectivamente. También observaron una mayor concentración de carotenoides totales y astaxantina en nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -WPF) ( $23 \text{ mg g}^{-1}$ ). Sin embargo, contrastando con los resultados de Lancheros et al. (2021), obtuvieron una mayor concentración (cel/mL) en medios RM con nitrato como fuente de nitrógeno con *H. pluvialis*, presentando tasas de crecimiento de  $2.0 \times 10^4$  cel/mL y  $3.5 \times 10^4$  células/mL respectivamente. Estos hallazgos resaltan la importancia tanto de la fuente de nitrógeno como de las estrategias y condiciones de cultivo en el crecimiento celular de *H. pluvialis*, así como la variabilidad que puede existir debido a diferentes cepas y métodos de estudio, aunado a esto, se explicaría por qué se obtuvo una alta densidad celular en el tratamiento control ( $3.16 \times 10^6$  cel/mL), sugerimos que posiblemente altas concentraciones en el inóculo pueden haber contribuido a este resultado. Sin embargo, es importante reconocer que otros factores como, por ejemplo: la intensidad y duración de la luz, la temperatura, el pH, la presencia de contaminantes y la genética de las

cepas utilizadas pueden influir en esta tasa de crecimiento (Daneshvar et al. 2021; Liaqat et al. 2023; Salbitani y Carfagna 2021).

La modificación de la fuente de nitrógeno no solo afecta directamente la capacidad de las células para utilizar nutrientes, sino que también puede alterar el entorno químico y físico del medio de cultivo, influyendo en la fisiología y el metabolismo celular. Por ejemplo, cambios en el pH del medio o en la disponibilidad de otros nutrientes pueden tener efectos indirectos en el crecimiento celular (Salbitani y Carfagna 2021). Además, la presencia de compuestos adicionales en las fuentes alternativas de nitrógeno puede jugar un papel crucial. Por ejemplo, la urea no solo proporciona nitrógeno sino también carbono, actuando como una fuente adicional de energía y nutrientes para las células (Moraes et al. 2023).

#### **4.2 Impacto de la sobresaturación y concentración de nutrientes en el crecimiento celular**

Nuestros resultados destacan que una concentración de 200 ppm de nutrientes proporciona los mejores resultados en términos de crecimiento celular, indicando que esta concentración podría ser óptima para el cultivo de microalgas al proporcionar los nutrientes necesarios para un crecimiento saludable. Sin embargo, al aumentar la concentración a 400 ppm, observamos una disminución en el crecimiento celular ( $8 \times 10^5$  cel/mL). Ranaweera et al. (2023) investigaron el efecto inhibitorio de la sobresaturación, utilizando soluciones sobresaturadas de CaOx 25 veces mayores que el nivel normal, aunque esto se realizó en peces. Sus hallazgos destacaron que altas concentraciones de este compuesto químico pueden provocar inhibiciones, así como propiedades de disolución y posibles efectos adversos o toxicidad asociados con el extracto de mijo. Aunque se realizó en un contexto diferente, sus resultados subrayan la importancia de entender cómo y en qué medida los niveles de sobresaturación pueden influir en los sistemas biológicos y los procesos celulares en general. Además, la sobresaturación de oxígeno disuelto en microalgas ha sido documentada en varios estudios, como los realizados por El-Sheekh et al. (2023), Yin et al. (2024) y Lu et al. (2024), donde se destaca la importancia de la temperatura y la luz en este fenómeno, denotando como puede afectar la disponibilidad de nutrientes para las células, así como otros procesos metabólicos y fisiológicos esenciales para el crecimiento celular óptimo.

### **4.3 *Yucca schidigera* en la reducción de emisiones de amoníaco**

Es importante resaltar el papel de *Y. schidigera* en el control del amoníaco en entornos de cultivo. Varios estudios han corroborado que esta planta posee propiedades para reducir las emisiones de amoníaco en diferentes contextos, como el rumen y el metano (Dai et al., 2023). La investigación ha identificado las saponinas presentes en *Y. schidigera* como responsables de esta reducción al modular la acumulación de nitrógeno ureico sérico y ácido láctico en diversos tejidos y fluidos corporales (Dai et al., 2023; Parvathy et al., 2023). Esta capacidad para optimizar el metabolismo del nitrógeno puede tener implicaciones significativas en la disponibilidad de nutrientes, incluido el amonio, en entornos de cultivo de microalgas, lo que a su vez puede influir en el crecimiento celular y la productividad del cultivo. En nuestro estudio, el cálculo del B<sub>50</sub> nos permitió cuantificar el efecto de *Y. schidigera* en la reducción del amoníaco en entornos de cultivo de microalgas. Mediante este cálculo, determinamos la concentración de *Y. schidigera* necesaria para alcanzar una disminución del 50% en las emisiones de amoníaco (EFSA 2021). Este análisis nos proporcionó una comprensión más precisa de la capacidad de *Y. schidigera* para mitigar los niveles de amoníaco, lo cual es esencial para optimizar las condiciones de cultivo y mejorar el rendimiento de la biomasa de microalgas. Los resultados obtenidos resaltan el potencial de *Y. schidigera* como una herramienta prometedora para reducir las emisiones de amoníaco en entornos de cultivo, lo que podría tener implicaciones significativas para la sostenibilidad y la eficiencia de los sistemas de producción de microalgas.

## CAPÍTULO 3

Eficiencia de floculación, así como la producción de biomasa, lípidos y carotenoides del cultivo en lote secuencial en los medios BBM y LC-Y.

### Resumen

*Haematococcus pluvialis* es una microalga de gran interés debido a su capacidad de producir carotenoides, que tienen propiedades antioxidantes y nutracéuticas. En su producción a gran escala, la cosecha de *H. pluvialis* es crítica y costosa, representando el 30% o más del costo total. Actualmente, la floculación se ha presentado como una estrategia con destacadas ventajas en la cosecha de la biomasa de microalgas, ya que mejora la eficiencia en la separación de las células del medio de cultivo. Por otro lado, los medios de cultivo con mayor estrés salino han indicado que favorecen la floculación por autofloculación, por esta razón, se realizó una comparación entre dos medios de cultivo, el Basal Bold Medium (BBM) y el López-Chuken & Young (LC-Y), para evaluar la eficiencia de floculación, producción de biomasa y carotenoides. En el estudio se realizaron tres lotes secuenciales en fotobiorreactores en columna de burbujeo, el primer lote partiendo de quistes de *H. pluvialis* para su reactivación, el segundo con finalidad de generar adaptación y el tercero con un aumento del inóculo, donde, se analizaron los siguientes parámetros: pH, la conductividad eléctrica, porcentaje de floculación, producción de biomasa, contenido de lípidos, pigmentos (carotenoides y clorofila) y materia inorgánica (cenizas). Los resultados mostraron que, en los tres lotes evaluados, el medio de cultivo LC-Y presentó mayor: producción de biomasa, eficiencia de floculación y contenido de materia inorgánica en comparación al medio BBM. Además, los niveles de clorofila A y carotenoides fueron muy similares en ambos medios, mientras que el medio BBM tuvo mejores resultados en cuanto a la clorofila B y el porcentaje de aceite producido en comparación con el medio LC-Y. Los resultados sugieren que el medio LC-Y aumenta el porcentaje de floculación y la producción de *H. pluvialis*. En conclusión, utilizar el medio LC-Y para cultivar y adaptar a *H. pluvialis* puede mejorar la producción de carotenoides y reducir costos, ya que su operación facilita la floculación y la cosecha. Esto podría ser beneficioso para la industria de los nutracéuticos y otros sectores que utilizan estos compuestos.

## 1.-Introducción

La microalga *Haematococcus pluvialis* tiene una gran relevancia comercial debido a su capacidad de generar carotenoides valiosos como  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, cantaxantina y astaxantina, acumulados durante su metabolismo primario o en respuesta al estrés, como la falta de nutrientes, exceso de luz y alta salinidad (Cezare-Gomes et al. 2019; Lafarga et al. 2020; Khoo et al. 2019). En general, los metabolitos de *H. pluvialis* son útiles por sus propiedades colorantes y antioxidantes, donde la astaxantina es el carotenoide más destacable que se utiliza en nutrición animal, suplementos alimenticios, industria cosmética y farmacéutica (Mularczyk et al. 2020). Durante el cultivo de *H. pluvialis* se producen metabolitos como la astaxantina y  $\beta$ -caroteno, que representan casi la mitad del mercado global de carotenoides naturales con ingresos de entre USD 152-180 millones en 2021. (Cezare-Gomes et al. 2019; Lafarga et al. 2020; Rammuni et al. 2019). Debido a la alta demanda y la baja acumulación de carotenoides en *H. pluvialis* durante su producción, el costo de los metabolitos es elevado, teniendo proyecciones monetarias de hasta los 800 millones de dólares a nivel mundial en 2026 (Rammuni et al. 2019; Yang et al. 2023).

La producción de astaxantina en *H. pluvialis* puede representar entre un 2% y un 3% de la cantidad comercializada en comparación a la cantidad producida sintéticamente en el mercado, que representa más del 95% (Casella et al. 2020). Sin embargo, el uso de pigmentos sintéticos puede comprometer el valor nutricional y comercial de los productos como, por ejemplo: pérdida de valor nutricional, impacto negativo en el medio ambiente y plantear riesgos para la salud, como alergias, asma y una potencial carcinogénesis (Zielinski et al. 2021). Para lograr una óptima producción de *H. pluvialis*, es necesario mantener el cultivo en condiciones operacionales favorables tales como: un manejo de pH, temperatura, agitación, adición de CO<sub>2</sub>, iluminación y un fotoperiodo adecuado (Lee et al. 2023; Teng et al. 2023). Asimismo, la producción de biomasa de *H. pluvialis* se verá influenciada en gran medida por el tipo de sistema empleado, la cepa utilizada y los costos de cosecha (Ma et al. 2023). Gobi et al. (2021) sugiere que un período de adaptación en la operación de cultivos de microalgas podría mejorar la producción de biomasa y su cosecha.

Por otro lado, la elección del método de cosecha de microalgas varía según las características de las microalgas (densidad y composición celular, sensibilidad a los métodos de cosecha, requisitos de procesamientos posteriores, etc.) presente del cultivo, así como las necesidades específicas del producto final y la posibilidad de reutilizar el medio de cultivo (Singh et al. 2018). Para generar una adaptación previa se pueden realizar cultivos en lote secuencial. Sin embargo, existe falta de estudios que respalden esta información específicamente para la producción y cosecha de *H. pluvialis* (Mussagy 2022).

Las técnicas de cosecha convencional como: centrifugación, flotación, sedimentación por gravedad y filtración tienen las desventajas de consumir una gran cantidad de energía, tiempo, y no recuperar la totalidad de la biomasa de las microalgas (Li et al. 2020; Zeng et al. 2022). Entre los métodos que se destacan para la cosecha por su factibilidad técnica y rentabilidad económica son los basados en floculación, que se caracterizan por la formación de agregados celulares que sedimentan y se recuperan fácilmente. Cabe destacar que los métodos de floculación se basan en la estrecha relación de la célula con la interacción química de los agentes floculantes con los polisacáridos presentes en las células de las microalgas. (Matter et al. 2019; Poh et al. 2020). La autofloculación se destaca por ser una técnica simple y económica que se puede lograr ajustando la composición del medio de cultivo con diferentes tipos de sales inorgánicas que representan una mínima toxicidad (ejemplo, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>) (Alishah et al. 2019; Matter 2019; Zhu et al. 2020). De acuerdo a Nagappan et al. (2019) la autofloculación de las microalgas se incrementa a medida que se aumenta el nivel de estrés salino, lo que conduce a una mayor eficiencia en la recolección de la biomasa, asimismo, puede ser inducida por diversos factores, como un pH alcalino, el consumo del CO<sub>2</sub> por actividad fotosintética y la presencia de precipitados inorgánicos, siendo los medios de cultivo un factor crítico en el proceso de autofloculación (Beltrán-Rocha et al. 2021; Matter et al. 2019; Mubarak et al. 2019; Poh et al. 2020). Por las razones anteriores el presente estudio se enfoca en obtener evidencia de los efectos de la adaptación de *Haematococcus pluvialis* durante su cultivo en lotes secuenciales utilizando una solución nutritiva que podría generar estrés salino y facilitar la cosecha por autofloculación; evaluando además la producción de biomasa, contenido de lípidos, carotenoides y materia inorgánica en la biomasa generada.

## 2.-Material y Métodos

### 2.1 Material biológico

Quistes de *H. pluvialis* CIB68 adquiridos de la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Baja California Sur, México (CIBNOR).

### 2.2 Medios de cultivo

Para generar un estrés salino en *H. pluvialis* se empleó el medio experimental LC-Y (López-Chuken & Young 2010). A modo de comparación, se utilizó el medio control BBM (Stein 1973). A continuación, se detallan las formulaciones de ambos medios:

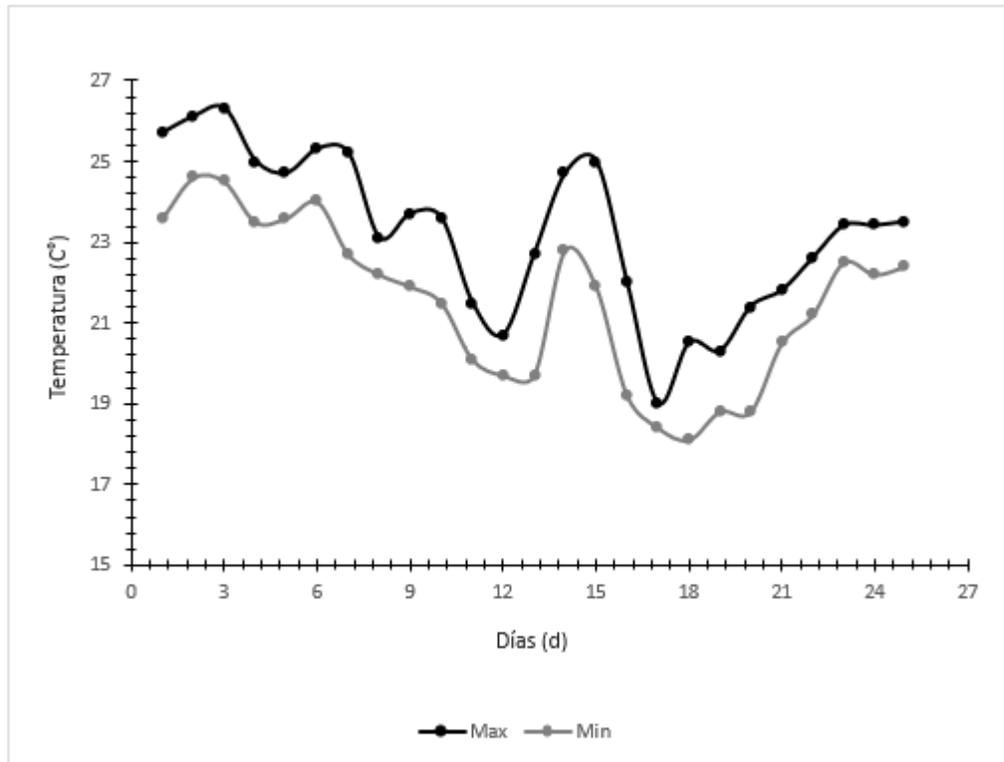
**Medio LC-Y (López-Chuken & Young 2010):** KNO<sub>3</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6,25 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 46 μM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 9,15 μM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 765 nM, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 320 nM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 15 nM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y Na<sub>2</sub>EDTA 20 μM.

**Medio BBM:** NaNO<sub>3</sub> 2.94 mM, NaCl 0.43 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.29 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.43 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 18.5 mM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.71 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.17 mM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.44 mM, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 320 mM, MoO<sub>3</sub> 1.57 mM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.179 mM y Na<sub>2</sub>.EDTA 55.3 mM.

### 2.3 Preparación del inóculo y cultivo en lotes para la reactivación y adaptación

Se utilizaron fotobiorreactores en columna de burbujeo con una capacidad de 2L para cultivar *H. pluvialis*. El volumen empleado fue de 1400 mL de los medios LC-Y y BBM respectivamente. Asimismo, para evitar pérdidas de volumen por evaporación se ajustó con agua desionizada durante el tiempo de cultivo.

Para la operación del fotobiorreactor se manejó aireación continua desde el fondo del fotobiorreactor a 0.2 vvm ( $\approx$  280 mL) con aire filtrado a 0.45μm (Millipore Millex-HV), fotoperiodo: 16:8 Luz:Oscuridad, flujo luminoso: 78 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y temperatura promedio de 22.3°C ± 2.1°C (Fig 11).



**Fig 11.-** Temperatura del cultivo del lote 3 de *H. pluvialis*.

Para la reactivación y adaptación de *H. pluvialis* se realizaron dos cultivos en lote secuenciales. El inóculo de *H. pluvialis* se estandarizó a 0.002% (equivalentes a 0.02g (Base Seca) /L). Se llevó a cabo una fase de adaptación previa en los lotes 1 y 2, donde se realizó la inoculación utilizando una concentración de 0.024 mg/mL. En el lote 1, se inoculó a partir de quistes, mientras que en el lote 2 se utilizó una inoculación a partir del cultivo reactivado del lote 1. Ambos lotes (1 y 2) tuvieron una duración final de 37 días. Para la evaluación del lote 3 (cultivo adaptado) se utilizó un inóculo de 0.06 mg/mL (utilizando biomasa del lote 2), la duración del lote 3 fue de 22 días al observar el inicio de la fase estacionaria.

#### **2.4 Determinación de floculación y producción de biomasa (peso seco)**

Se determinó el porcentaje de floculación al finalizar cada lote (1, 2 y 3) siguiendo la metodología establecida por Beltrán-Rocha et al. (2021). Para el análisis de floculación se tomaron 100 mL de cultivo previamente homogenizado en una probeta, se dejó reposar por 15 minutos para la sedimentación y posteriormente se tomaron alícuotas de 15 mL a 1/3 de altura de la probeta para ser filtrarlas y llevar a peso seco. Se calculó el porcentaje de floculación con la siguiente ecuación:  $(A/B) \times 100$ , donde A es el BS ( $\text{g L}^{-1}$ ) de la biomasa suspendida después del período de sedimentación y B es la biomasa total en BS ( $\text{g L}^{-1}$ ). El contenido de biomasa BS ( $\text{g L}^{-1}$ ) se determinó al finalizar el tiempo establecido de cada lote.

#### **2.5 Evaluación del cultivo de *H. pluvialis* (Lote 3) y análisis de biomasa**

Durante el cultivo se realizó un monitoreo diario del pH (Hach método 8156) y conductividad eléctrica (CE) (método Hach 8160). Asimismo, para determinar probables diferencias en el contenido de sales asimiladas en la biomasa de *H. pluvialis* (por el uso de distintos medios BBM y LC-Y) se enjuagó con agua desionizada y concentró la biomasa utilizando 3 ciclos de centrifugación a 4,500 rpm por 10 min., posteriormente se analizó el contenido de materia inorgánica (medido como el contenido de cenizas) método AOAC 942.05 (AOAC 1997).

Para el estudio de biomasa, se cuantificaron los lípidos con relación a los pigmentos utilizando Pv, basándose en la metodología de Mishra et. al. (2014). En este método, el PV reacciona con los lípidos presentes, generando un color rosa característico. La cantidad de lípidos se pudo medir de manera precisa al analizar la intensidad de este color mediante espectrofotometría a 522 nm.

## 2.6 Evaluación de los carotenoides totales

La cantidad total de carotenoides fue determinada mediante espectrofotometría UV-Vis con Beckman DU-650, como se menciona en el estudio realizado por Vo et al. (2017). Se tomó 1 mL del extracto hexánico y se midió la absorbancia a 480 nm. Para la cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$mg \text{ Caroteno}/g = (A \times V \times 10^4) / (A^{cm^{-1}} \times 100 \times g)$$

Donde: A = Absorbancia 480 nm

V = Volumen del extracto

$$A^{cm^{-1}} = 2500$$

g = Gramos de muestra

## 2.7 Análisis de lípidos

La cantidad de lípidos totales fue determinada por el método propuesto por Anschau et al. (2015). En un tubo de ensayo, se añadieron 40 µL del extracto hexánico y 400 µL de ácido sulfúrico concentrado. Tras agitar en un vortex durante 30 segundos, el tubo se colocó en un baño maría y se mantuvo a ebullición durante 10 minutos. Luego, se retiró del baño maría y se enfrió en un baño de agua durante 10 minutos adicionales.

Se agregaron 1000 µL de fosfovainillina al tubo, seguido de una agitación en vortex por 30 segundos. La muestra se incubó a 37°C durante 15 minutos y posteriormente se leyó en un

espectrofotómetro a 530 nm. Para la construcción de la curva de calibración, se siguió el mismo procedimiento, utilizando aceite de canola Sigma-Aldrich cat. 46961 como estándar.

## **2.8 Evaluación de la materia inorgánica (Prueba de cenizas)**

Se emplearon tres crisoles de porcelana previamente calcinados y ajustados a peso constante. En cada uno de ellos, se depositó una muestra seca de 1 gramo, distribuyendo tres muestras para medio BBM y otras tres muestras de igual peso para medio LC-Y. Posteriormente, cada crisol se introdujo en una mufla y se sometió a una calcinación a 550°C durante 12 horas. Tras este proceso, los crisoles se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se trasladaron a un desecador para eliminar cualquier residuo de humedad. Una vez que los crisoles con las muestras calcinadas estuvieron completamente secos, se procedió a pesarlos nuevamente para determinar el peso de los crisoles con la ceniza resultante. El contenido de ceniza (%) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = 100((A - B) / C)$$

Donde A: Peso del crisol con la muestra (g), B: Peso del crisol con la ceniza (g), C: Peso inicial de la muestra (g)

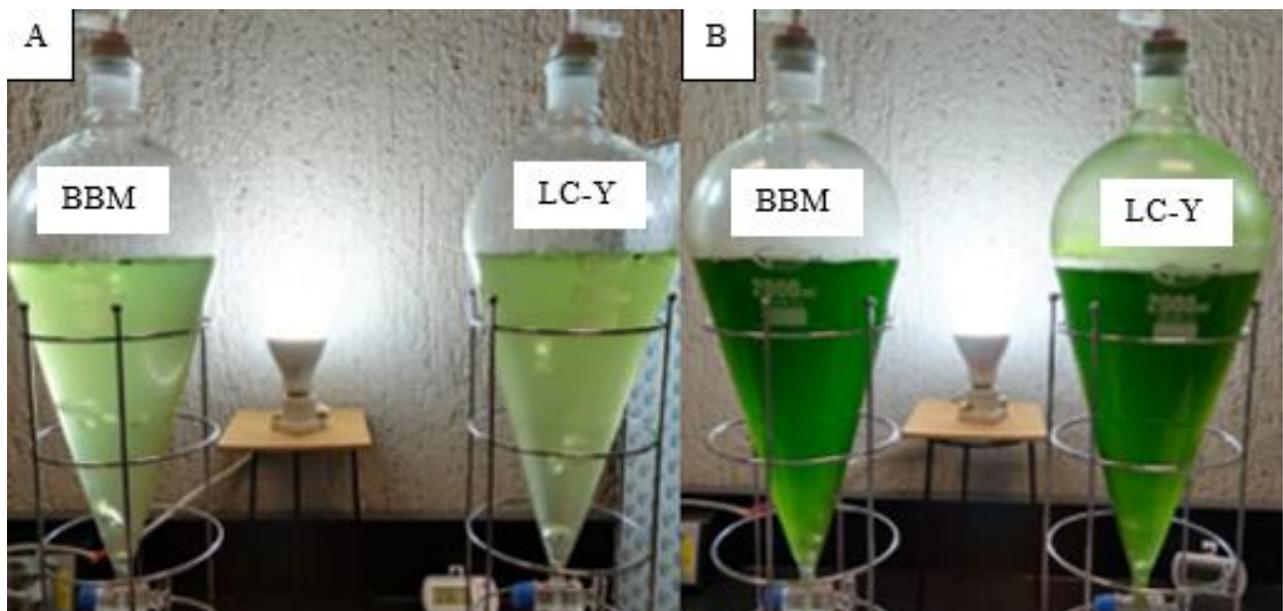
## **2.9 Análisis Estadístico**

Los efectos del porcentaje de floculación y la producción de biomasa en *H. pluvialis* fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró significativo un nivel de  $\alpha = 0.05$ . Los análisis se realizaron utilizando el software SPSS v.23.

### 3.-Resultados

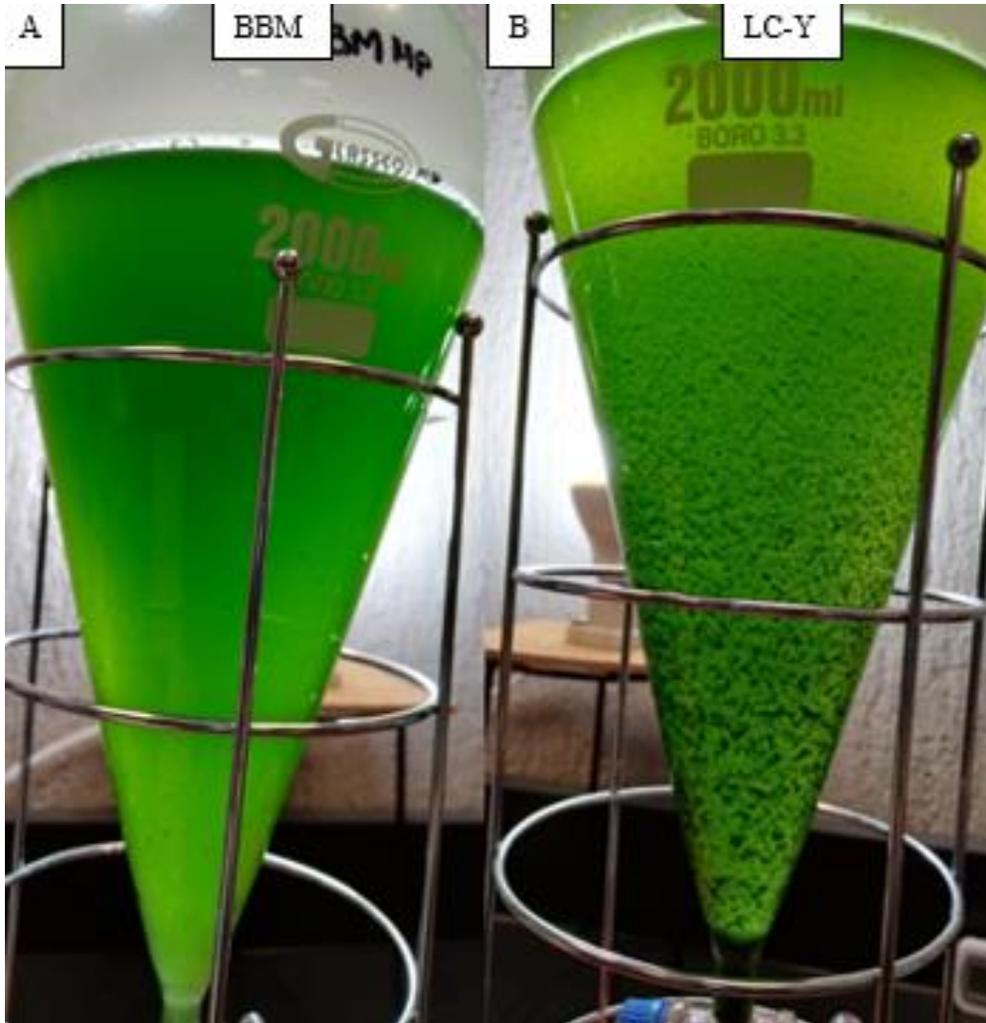
#### 3.1 Comparación visual de floculación en medios BBM y LC-Y

Se llevó a cabo una comparación visual de los cultivos del lote 3 de *H. pluvialis* con el fin de identificar la presencia o ausencia de flóculos en el medio de cultivo. Esta observación preliminar permitió una evaluación cualitativa de la presencia de floculación de *H. pluvialis*



en el lote 3, mediante comparaciones visuales directas entre los distintos tratamientos (Fig 12 y Fig 13).

**Fig 12.-Monitoreo del cultivo en Lote 3 de *H. pluvialis*.** A) Día 0 de cultivo. B) Día final del cultivo (22 días) de *H. pluviales*.



**Fig 13.-** Comparación visual del desarrollo de *H. pluvialis* en los medios de cultivo (BBM y LC-Y). A) Medio de cultivo BBM. B) Medio de cultivo LC-Y.

### 3.2 Producción de biomasa y floculación de *H. pluvialis*

Los resultados revelaron diferencias significativas entre los medios de cultivo BBM y LC-Y en cuanto a la producción de biomasa y el porcentaje de floculación en los tres lotes de cultivo de *H. pluvialis* estudiados. Específicamente, con el medio BBM, no se obtuvo una cantidad mayor de 0.44g/L de biomasa (peso seco) en ningún lote, mientras que con el medio LC-Y, la producción se mantuvo superior a 0.53 g/L en todos los lotes. De igual forma, se observó que el porcentaje de floculación en el medio BBM disminuyó constantemente en cada lote subsiguiente (61%, 41%, y 21%, respectivamente). Cabe destacar que, en el tercer lote de cultivo, el medio LC-Y indicó un mayor porcentaje de floculación, alcanzando un valor del 61.75%, en comparación con el 21.31% obtenido con el medio BBM (Tabla 7). Asimismo, se destacó que para realizar cosechas parciales en los cultivos con el medio LC-Y, solo era necesario detener la aireación para que la biomasa floculara.

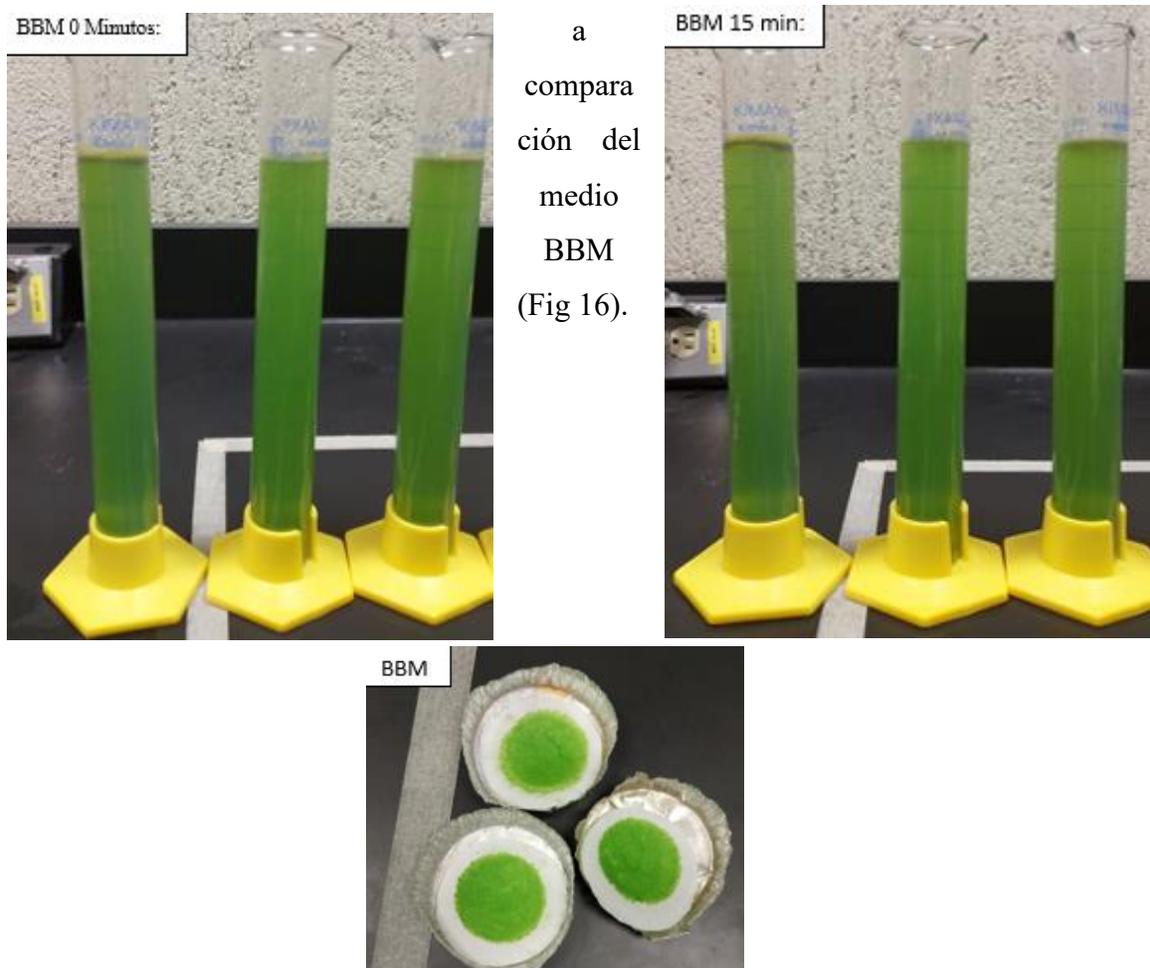
**Tabla 7.** Resultados de floculación y producción de *H. pluvialis* para los medios BBM y LC-Y durante su cultivo en lote secuenciales.

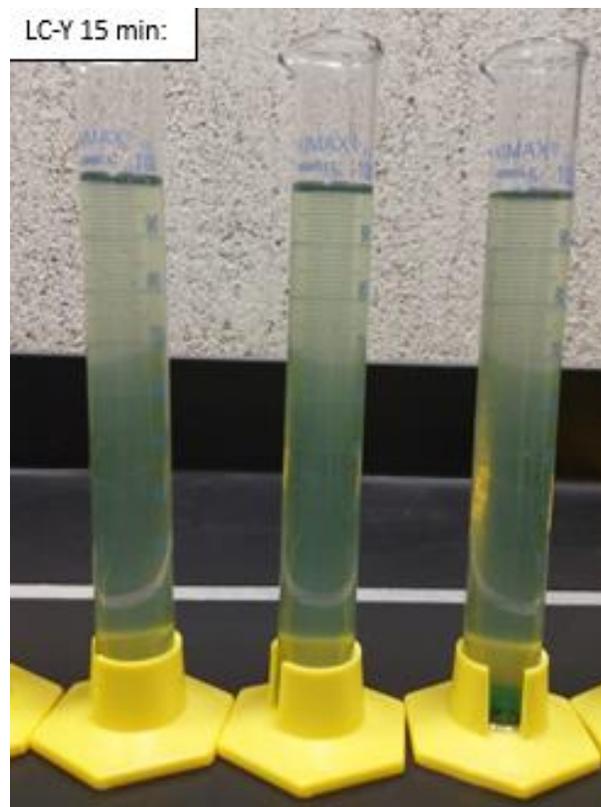
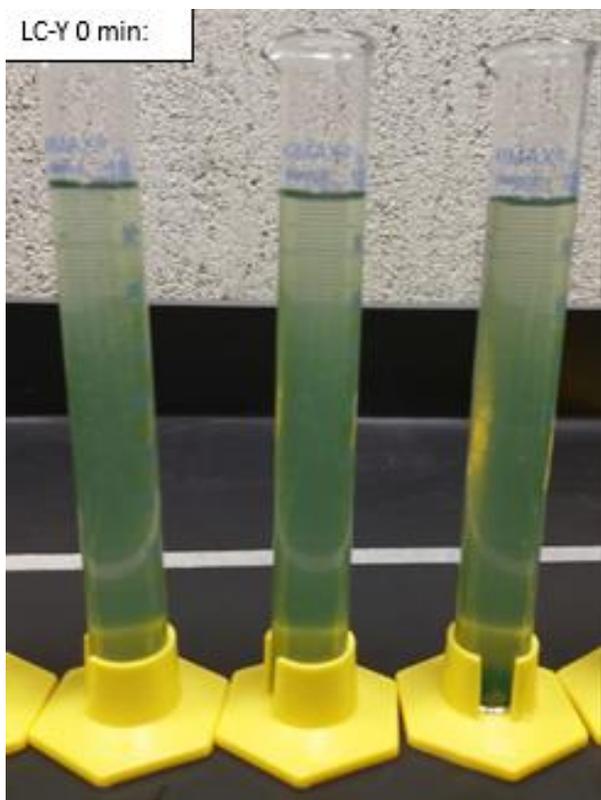
Medio	Lote	Biomasa (g peso seco /L)	Floculación (%)
BBM	1	0.44 ± 0.05 <sup>b</sup>	61.36 ± 3.21 <sup>ab</sup>
	2	0.39 ± 0.16 <sup>b</sup>	41.03 ± 1.21 <sup>c</sup>
	3	0.41 ± 0.02 <sup>b</sup>	21.31 ± 2.46 <sup>d</sup>
LC-Y	1	0.62 ± 0.13 <sup>ab</sup>	77.42 ± 4.56 <sup>a</sup>
	2	0.78 ± 0.06 <sup>a</sup>	54.12 ± 1.82 <sup>bc</sup>
	3	0.54 ± 0.03 <sup>ab</sup>	61.75 ± 4.79 <sup>ab</sup>

Promedio ± EE (error estándar). Diferentes letras indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

### 3.3 Resultados de floculación y peso seco de *H. pluvialis*

Se permitió un período de inactividad de 15 minutos en las probetas para observar la formación de flóculos en el fondo. Mientras que en el medio de cultivo BBM no se pudo observar a simple vista ningún efecto de floculación, el medio LC-Y mostró una acumulación de flóculos en el fondo de la probeta, a su vez, al observar la floculación a través de las membranas se denotaba la desaturación de color en los poros que presentaban el medio LC-Y, lo cual, es indicativo de que el medio floculo LC-Y obtuvo mayor floculación (Fig 14 y 15), asimismo, al observar las muestras de peso seco el medio LC-Y exhibía una saturación cromática más pronunciada





**Fig 14.-**  
Floculación en el cultivo de *H. pluvialis* con medio BBM.



**Fig 15.-** Floculación en el cultivo de *H. pluvialis* con medio LC-Y.



**Fig 16.-** Peso seco en el cultivo de *H. pluvialis* con medio BBM y LC-Y.

### 3.4 pH y conductividad eléctrica

El comportamiento de pH durante el cultivo de *H. pluvialis* en el lote 3, tanto el medio BBM como LC-Y experimentaron un aumento natural pH, con un valor inicial y máximo de  $6.04 \pm 0.40$  a  $8.10 \pm 0.40$  para BBM y de  $5.90 \pm 0.44$  a  $8.02 \pm 0.44$  para LC-Y respectivamente (Fig 17). Por otro lado, la CE disminuyó para ambos medios de cultivo, con valores iniciales y finales de  $75.27 \pm 0.23$  mS/m a  $70.57 \pm 0.41$  mS/m para el medio BBM representando una disminución del 6.24% (121mS/m) y de  $229.67 \pm 1.45$  mS/m a  $193 \pm 0.94$  mS/m para el medio LC-Y equivalente a una disminución del 15.72% (36.14mS/m). Aunque la CE presentó variaciones, las concentraciones se mantuvieron relativamente estables (Fig 18).

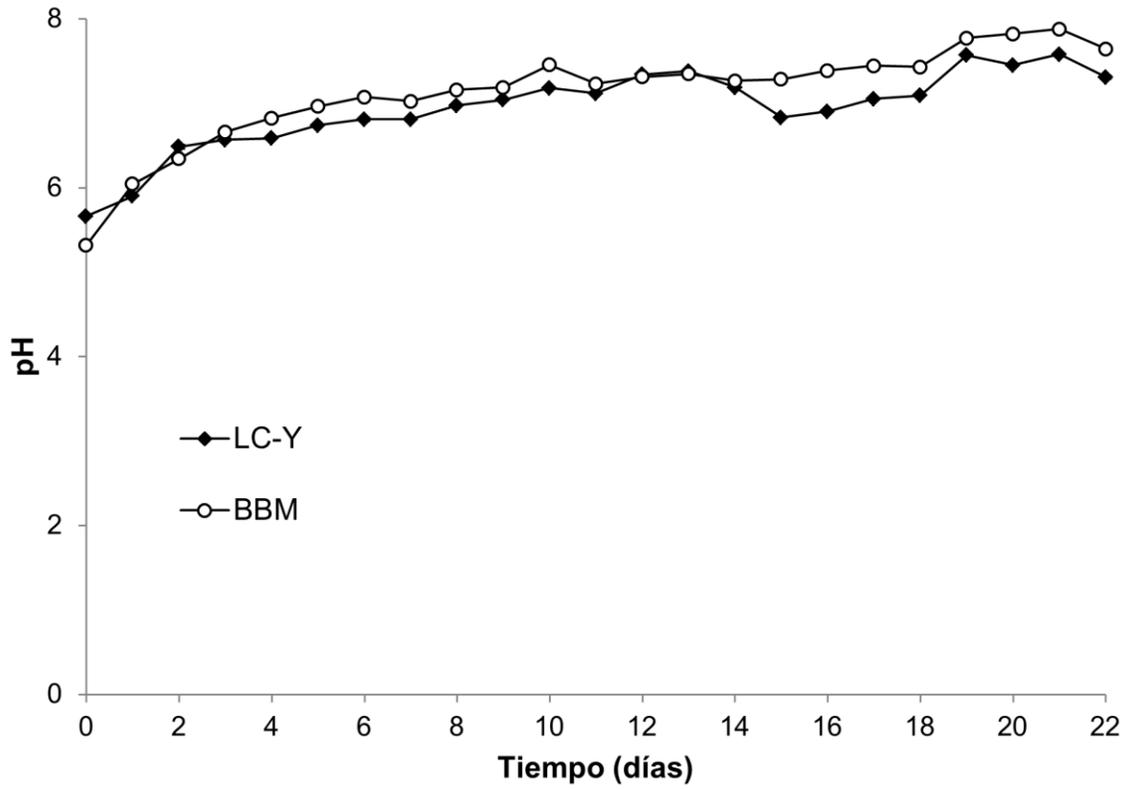
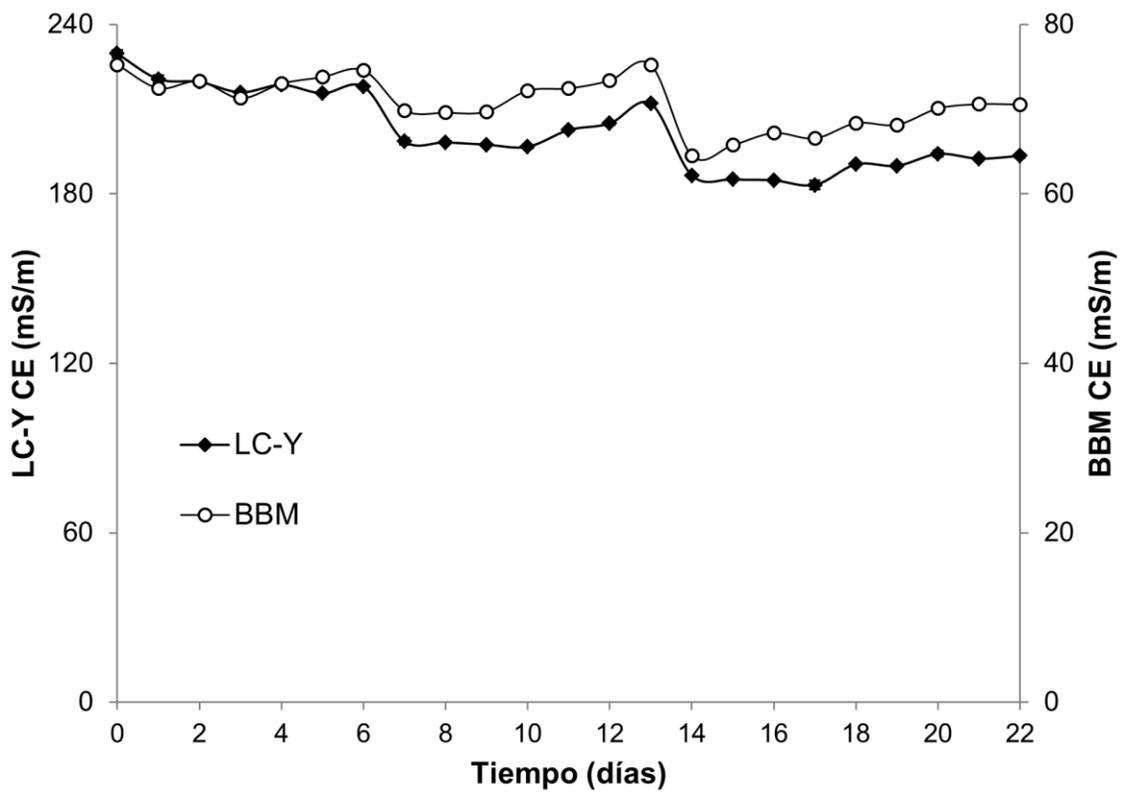


Fig 17.- Cinética de pH (lote 3) durante el cultivo de *H. pluvialis*. Promedio  $\pm$  EE (error estándar). Círculo blanco indica la cinética de pH para el medio BBM y círculo negro es la cinética de pH para el medio LC-Y respectivamente.



**Fig 18.-** Cinética de C.E (lote 3) de *H. pluvialis*. Círculo blanco indica medio BBM. Círculo negro indica medio LC-Y respectivamente.

### 3.5 Contenido de materia inorgánica, lípidos y pigmentos en biomasa de *H. pluvialis*

En la comparación entre los medios LC-Y y BBM, se observaron diferencias en materia inorgánica, contenido de lípidos, clorofila b y carotenoides de la biomasa de *H. pluvialis* obtenida (Tabla 8). El porcentaje de materia inorgánica fue mayor en el medio LC-Y en comparación con el medio BBM. Por otro lado, el contenido de lípidos fue superior en el medio BBM. En cuanto a los pigmentos, se encontró que el contenido de clorofila A era similar en ambos medios, mientras que la clorofila B era mayor en el medio BBM. Además, los carotenoides presentaron una mayor concentración para el medio BBM.

**Tabla 8.-** Contenido mineral, de lípidos y pigmentos en la biomasa de *H. pluvialis*.

Medio	% Materia inorgánica BS (cenizas)	mg lípidos/g BS	Clorofila A (mg/g BS)	Clorofila B (mg/g BS)	Carotenoides (mg/g BS)
<b>BBM</b>	9.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	351.2 ± 16.40 <sup>a</sup>	285.4 ± 0.25 <sup>a</sup>	71.2 ± 0.21 <sup>a</sup>	89.4 ± 0.67 <sup>a</sup>
<b>LC-Y</b>	21.5 ± 2.0 <sup>a</sup>	157.1 ± 6.44 <sup>b</sup>	286.8 ± 0.60 <sup>a</sup>	50.4 ± 1.16 <sup>b</sup>	77.6 ± 0.65 <sup>b</sup>

Promedio ± EE (error estándar). Diferentes letras indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

## 4.-DISCUSIÓN

### 4.1 Producción de biomasa y floculación de *H. pluvialis*

La concentración de biomasa de *H.pluvialis* obtenida concordó con los hallazgos previos. Por ejemplo, Fernando et al. (2021) reportaron que, bajo sus condiciones de cultivo, utilizando diversas concentraciones de efluente de fabricación de aceite de palma, lograron una concentración de biomasa de  $0.52 \pm 0.01$  g/L para *H. pluvialis*. En nuestro estudio, mediante la implementación de un enfoque de cultivo en lote secuencial para generar adaptación y utilizando el medio LC-Y que promueve el estrés salino, obtuvimos una producción de biomasa de  $0.54 \pm 0.03$  g/L (lote 3) para *H. pluvialis*.

Cabe destacar que, en comparación con el medio BBM, el uso del medio LC-Y resultó en un incremento del 24% en la producción de biomasa, lo que sugiere que el medio LC-Y puede ser más propicio para la producción de biomasa. Asimismo, debemos de considerar que al presentarse la autofloculación esto podría facilitar la separación de las células en el medio de manera más rápida y sencilla, lo que a su vez reduciría los costos y el tiempo asociados con los métodos convencionales de cosecha. (Amorim et al. 2021; Matter et al. 2019). Tras una adaptación previa a los medios de cultivo, se obtuvo una eficiencia de floculación del  $61.75 \pm 4.79\%$  en *H. pluvialis* utilizando el medio LC-Y. Estos resultados cuentan con un impacto similar a los reportados por por Zhao et al. (2019). En el estudio, se investigó la mejora de la floculación mediante el cocultivo de dos especies de microalgas, *Desmodesmus* sp. y *Monoraphidium* sp. El cocultivo logró una alta eficiencia de floculación de hasta el 85.33%.

Es crucial resaltar que nuestros hallazgos se enfocaron exclusivamente en el cultivo individual de *H. pluvialis*, en el cual el medio de cultivo indujo condiciones de estrés y promovió la formación de floculación como una estrategia de adaptación, además, es importante reconocer que la composición y concentración de nutrientes en el medio de cultivo, incluyendo las fuentes de nitrógeno y minerales, pueden ejercer una influencia significativa en la eficiencia de la autofloculación, como se ha documentado en estudios previos. Por ejemplo, se ha observado que la eficiencia de autofloculación de la especie

*Chlorococcum* sp. mejora considerablemente (63% al 84%) al incrementar la concentración de amonio de 10 a 50 mg/L (Matter et al. 2019).

Este enfoque de floculación presenta implicaciones significativas en la optimización del proceso de producción de biomasa en microalgas, destacando su potencial para mejorar la eficiencia y rentabilidad del proceso. Los mayores porcentajes de floculación obtenidos en el medio de cultivo LC-Y en comparación con el medio BBM (Tabla 7) se atribuyen probablemente a la interacción entre la alta conductividad eléctrica presente en LC-Y y las cargas negativas en las células. Esta interacción contrarresta la repulsión electrostática, fomentando la adhesión y agregación de las células, lo que resulta en una mayor formación de flóculos (Matter et al. 2019).

Es importante destacar que las microalgas tienen la habilidad de adaptarse a diferentes condiciones de cultivo, lo que les podría permitir mejorar la producción de biomasa y la eficiencia en floculación. Algunos ejemplos de medios de cultivo en los que han demostrado aumentar la producción de biomasa son: f/2, Zarrouk's, Bristol, Bold Basal Modificados, BG-11, Watanabe's y NORO (Matter et al. 2019; Verma et al. 2020; Radice et al. 2022).

Los resultados del lote 1, indicaron efectos indirectos al estrés el cual aumentó los porcentajes de floculación de *H. pluvialis*. Se ha reportado que el estrés puede reducir el contenido proteico hasta un 14%, y, tras la germinación de los quistes, las células experimentan cambios en su morfología y características celulares, como, por ejemplo, una posible disminución en los contenidos de ácidos linoleico y araquidónico, por lo que estos cambios podrían contribuir a un aumento en la eficiencia de la floculación (Jannel et al. 2020; Matter et al. 2019).

Esto podría explicar por qué en el lote 1, utilizando el medio BBM, se obtuvieron porcentajes de floculación de hasta el 61.36%. Sin embargo, en los lotes 2 y 3, se observó una disminución en la floculación, alcanzando únicamente un máximo del 21.31 % en el lote 3. La adaptabilidad de *H. pluvialis* a diferentes medios de cultivo puede ser un factor crucial en la eficiencia de la floculación. Lo anterior es importante al interpretar los porcentajes de floculación, especialmente si no se ha realizado un re-cultivo o adaptación

previa. En tal caso, podría considerarse valores erróneos en la eficiencia de la floculación debido al letargo de *H. pluvialis* y falta de adaptación previa.

#### **4.2 pH y conductividad eléctrica en el cultivo de *H. pluvialis***

Los valores de pH durante el cultivo indicaron aumentos para ambos medios (BBM y LC-Y) (Fig 17). Los incrementos en los valores de pH posiblemente se produjeron al consumo de CO<sub>2</sub>, durante la fotosíntesis de las microalgas, y a la liberación de oxígeno el cual se disocia en el agua e indica que hubo desarrollo activo del cultivo (Teng et al. 2023). Por otro lado, aunque la autofloculación generalmente se produce dentro de un rango específico de pH (pH ácido entre 3.5 y 4.0, y pH básico entre 9.5 y 12.5), las presentes condiciones de estudio indicaron que el pH no fue un factor asociado a la floculación de *H. pluvialis*. Es importante destacar que modificar a altas o bajas concentraciones de pH con ácidos y bases pueden ser letales para las microalgas, además, es fundamental señalar que manejar estos extremos de pH es impráctico en la mayoría de los casos, ya que requiere un control preciso y constante que suele ser difícil de mantener a lo largo del tiempo. Por lo tanto, es esencial considerar alternativas más viables y sostenibles para el cultivo y mantenimiento de microalgas (Matter et al. 2019; Putri et al. 2020).

En cambio, se encontró que la conductividad eléctrica del medio de cultivo tomó un papel fundamental en la floculación, debido a que el contenido iónico fue un factor clave, que mantuvo en estrés *H. pluvialis* (Matter et al. 2019; Figler et al. 2019; Babiak y Krzemińska 2021). Al observar la Figura 18, se indica que posiblemente hubo un efecto de adsorción-desorción de iones en las cargas eléctricas presentes en el medio de cultivo LC-Y.

El comportamiento de la conductividad eléctrica es un fenómeno complejo que puede influir en el comportamiento de las microalgas, donde, las microalgas están expuestas a un medio con alta conductividad eléctrica, se produce una mayor presencia de iones disueltos en el entorno cercano a las células (Figler et al. 2019; Babiak y Krzemińska 2021). Estos iones pueden adsorberse en la superficie de las microalgas debido a las cargas eléctricas

presentes en la membrana celular. Las cargas eléctricas presentes en la membrana celular de *H. pluvialis* desempeñan un papel crucial en la interacción con iones en su entorno. Estos iones tienen la capacidad de adsorberse en la superficie de las microalgas, aprovechando las cargas eléctricas presentes en su membrana celular (Md et al. 2023; Su et al. 2023). La composición de la pared celular de *H. pluvialis* es particularmente relevante en este contexto, ya que consta de varias capas, principalmente compuestas de proteínas en la etapa verde y polisacáridos en la etapa roja. Además, se ha observado que las paredes celulares contienen biopolímeros alifáticos, los cuales se les atribuye la resistencia a los compuestos químicos. Los polisacáridos, en particular, pueden tener una carga neta negativa debido a los grupos funcionales que contienen, como los grupos carboxilo. Esta carga negativa puede atraer a los iones metálicos positivos presentes en el medio circundante hacia la superficie de la célula, facilitando así su adsorción (Md et al. 2023; Venckus et al. 2023). Además, estos polisacáridos pueden formar complejos con iones metálicos a través de interacciones de tipo quelato, lo que podría aumentar aún más la capacidad de la célula para retener estos iones en su entorno inmediato. Por otro lado, se ha demostrado que la membrana celular de *H. pluvialis* alberga varias proteínas que pueden transportar selectivamente iones metálicos dentro y fuera de la célula (por ejemplo, ATPasas de tipo P) (Manishaa 2023; Md et al. 2023). Esta capacidad sugiere una regulación activa del contenido de iones dentro de la célula, lo que podría ser especialmente beneficioso en entornos con altas concentraciones de iones metálicos, como en presencia de medios con alta conductividad eléctrica (Venckus et al. 2023; Su et al. 2023), aunado a esto, su adsorción de iones puede afectar la interacción entre las células y su entorno, lo que a su vez puede tener implicaciones en la floculación y otras propiedades de las microalgas, como, por ejemplo, alteraciones en su composición lipídica (Alishah et al. 2019; Matter et al. 2019; Babiak y Krzemińska 2021), cabe resaltar que, el medio LC-Y presentó mayor reducción de la conductividad eléctrica, lo cual se tiene reportado que puede modificar las características de la biomasa.

### **4.3 Análisis de biomasa de *H. pluvialis***

Las diferencias en la composición química de los medios de cultivo pueden afectar a la composición final de la biomasa de microalgas. Por ejemplo, la presencia o ausencia de nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio y carbono orgánico, así como sus diferentes concentraciones, pueden tener un impacto beneficioso (en la composición lipídica) (Alishah et al. 2019; Marinho et al. 2021; Tripathi et al. 1999). En este caso, el medio BBM se destaca por su composición más completa con micronutrientes y oligoelementos, como hierro y cobalto, que son esenciales para el crecimiento y la producción de pigmentos y lípidos. En contraparte el medio LC-Y se enfoca más en macronutrientes como nitrógeno, hierro, fósforo y potasio, junto con minerales. (López-Chuken et al. 2010; Tripathi 1999; Prabhu et al. 2021).

Nuestros resultados muestran que la composición del medio LC-Y utilizado para cultivar microalgas puede influir en la concentración de materia inorgánica en la biomasa. En particular, *H. pluvialis* cultivada en el medio LC-Y mostró una mayor concentración de materia inorgánica, alcanzando un valor de 21.5%. Esto se debe a la capacidad de la especie para asimilar nutrientes en su forma iónica disuelta (Dolganyuk et al. 2020; Fernando et al. 2021). Cabe destacar que el porcentaje de materia inorgánica en *H. pluvialis* varía (1-15%) (Tibbetts et al. 2018).

Cabe mencionar que el alto contenido de materia inorgánica en la biomasa de *H. pluvialis* del lote 3 (Tabla 8) puede indicar la presencia de metales biodisponibles (Jannel et al. 2020; Fernando et al. 2021), lo que podría tener implicaciones importantes en uso industrial, por ejemplo, en la obtención de biofertilizantes, suplementos para la salud y alimentos para animales. (Ali et al. 2021; Sukarni et al. 2014). De igual forma esto es corroborado por

Chugh et al. (2022) quienes informaron que la biomasa de microalgas que contiene metales biodisponibles como el hierro y el cobalto puede ser más efectiva en la producción de biocombustibles o tratamientos para fitorremediación mediante la hidrólisis enzimática. En el presente estudio, se evidenció que el medio LC-Y exhibió una disminución en la producción de lípidos y pigmentos por célula, registrando una reducción del 29.77% en la concentración de clorofila B y una disminución del 55.26% en los lípidos, en comparación con el medio BBM como referencia. No obstante, es importante destacar que el medio LC-Y se destacó por su capacidad para generar mayores cantidades de biomasa, mientras que aún contenía una cantidad significativa de estos compuestos.

En vista de que el medio LC-Y demostró un mayor rendimiento en la producción de biomasa, se plantea la posibilidad de que pueda rivalizar o incluso superar al medio BBM en términos de la producción de lípidos y pigmentos, que son de relevancia en industrias como la alimentaria y la cosmética (Beltrán-Rocha et al. 2021; Cezare-Gomes et al. 2019; López-Chuken et al. 2010. Además de lo anterior, Borowiak et al. (2022) ha informado que el contenido de lípidos en las microalgas puede variar considerablemente, oscilando entre el 20% y el 60% de la biomasa seca, dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento.

Asimismo, Yin et al. (2023) ha reportado que en la etapa de células quísticas de *H. pluvialis*, los porcentajes típicos de constituyentes incluyen carbohidratos en el rango del 36% al 40%, lípidos de 32% a 40%, proteínas de 17% a 25%, y carotenoides de 2% a 5%.

## 5.-CONCLUSIONES

En este estudio, se encontró que el cultivo en lotes secuenciales utilizando el medio LC-Y favoreció la adaptabilidad de *H. pluvialis*. El medio LC-Y, caracterizado por una alta conductividad eléctrica (229 mS/m), induce estrés salino en la microalga, lo que promueve la autofloculación y una producción de biomasa de fácil cosecha. Estos resultados sugieren que el uso del medio LC-Y facilitaría la cosecha parcial de la microalga en cualquier momento del cultivo. Además, la composición del medio LC-Y, además de aumentar la floculación, podría promover la concentración de materia inorgánica en la biomasa. Finalmente, los componentes minerales en la biomasa podrían considerarse compuestos bioactivos biodisponibles junto con los pigmentos, convirtiendo a *H. pluvialis* en una materia prima prometedora para la obtención de productos como biofertilizantes y suplementos nutraceúticos.

## 6.-PERSPECTIVAS

Los resultados de esta investigación serán de suma importancia tanto para la comunidad científica como para la industria. Proporcionarán conocimientos esenciales para mejorar la eficiencia de floculación de *H. pluvialis*, lo que potencialmente se puede extrapolar a otras especies de microalgas. Este avance puede revolucionar la producción de biomasa, ofreciendo oportunidades para la obtención de compuestos de interés comercial de manera más eficiente y sostenible. Además, estos hallazgos tienen el potencial de influir en el desarrollo de estrategias innovadoras y rentables a escala comercial en sectores tan diversos como la alimentación, la salud y la biotecnología. Esto marca el comienzo de una nueva era de posibilidades en la explotación de microalgas para abordar desafíos globales y satisfacer las demandas de un mundo en constante evolución. Se cuentan perspectivas como:

1. **Mejora en la floculación a escala industrial:** La eficacia del medio LC-Y para incrementar la floculación de *H. pluvialis* en entornos de laboratorio ha sido ampliamente demostrada. Este hallazgo no solo indica un potencial considerable para su implementación en sistemas de cultivo a gran escala, sino que también sugiere la posibilidad de evaluar su efectividad en otras especies de microalgas fotoautótrofas, como por ejemplo con *Chlorella vulgaris*, ampliando así su aplicación y validando su rendimiento en diferentes contextos.
2. **Aumento en la producción de biomasa en distintas microalgas:** El medio LC-Y también se asoció con un aumento en la producción de biomasa en comparación con el medio BBM, además de poder realizar múltiples comparaciones con distintos medios de cultivo al BBM, también se tendría que verificar si aumenta la producción de biomasa de manera eficiente en otras microalgas, como, por ejemplo, con *Scenedesmus obliquus*
3. **Adaptabilidad a diferentes medios de cultivo:** Se podría realizar un análisis comparativo de diversas microalgas para evaluar su adaptabilidad al medio LC-Y. Se

espera que las condiciones de alta salinidad en este medio favorezcan la adaptación de las microalgas, lo que podría resultar en una mejora en su producción. Este enfoque permitiría identificar las especies de microalgas más adecuadas para el cultivo en el medio LC-Y, optimizando así el rendimiento y la eficiencia de los cultivos.

## 7.-REFERENCIAS

1. Ablon G. (2021). Nutraceuticals. *Dermatologic Clinics*, 39(3), 417-427.
2. Ahmad I, Abdullah N, Koji I, Yuzi A, Muhammad SE. (2021). Evolution of photobioreactors: a review based on microalgal perspective. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1142, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
3. Akizuki, S, Kishi M, Cuevas-Rodríguez G, Toda T. (2020). Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules. *Water research*, 171, 115445.
4. Ali S, Peter AP, Chew KW, Munawaroh HSH, y Show PL. (2021). Resource recovery from industrial effluents through the cultivation of microalgae: A review. *Bioresource technology*, 337, 125461.
5. Alishah Aratboni H, Rafiei N, Garcia-Granados R, Alemzadeh A, y Morones-Ramírez JR. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-17.
6. Amorim ML, Soares J, Coimbra JSJR, Leite MDO, Albino LFT, Martins MA. (2021). Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976-2002.
7. Ampofo J, Abbey L. (2022). Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. *Foods*, 11(12), 1744.

8. Anschau A, Caruso C, Kuhn R, Franco T. (2017). Validation of the sulfo-phosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 34. 19-27. 10.1590/0104-6632.20170341s20140222
9. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1997. *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International, Gaithersburg.
10. Babiak W, Krzemińska I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, 14(13), 4007.
11. Bafundo KW, Johnson AB, Mathis GF. (2020). The effects of a combination of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* on *Eimeria* spp. in broiler chickens. *Avian Diseases*, 64(3), 300-304.
12. Beecher GR. (2024). Evolution of food composition knowledge in the United States from its beginning. *Journal of Food Composition and Analysis*, 126, 105802.
13. Beltrán-Rocha JC, Guajardo-Barbosa C, Rodríguez-Fuentes H, Reyna-Martínez GR, Osornio-Berthet L, García-Martínez M, y López-Chuken UJ. (2021). Some implications of natural increase of pH in microalgae cultivation and harvest by autoflocculation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(5), 836-842.
14. Borowiak D, Krzywonos M. (2022). Bioenergy, biofuels, lipids and pigments—Research trends in the use of microalgae grown in photobioreactors. *Energies*, 15(15), 5357.
15. Carbone DA, Pellone P, Lubritto C, Ciniglia C. (2021). Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds. *Antibiotics*, 10(6), 746.
16. Casella P, Iovine A, Mehariya S, Marino T, Musmarra D, y Molino A. (2020). Smart method for carotenoids characterization in *Haematococcus pluvialis* red phase and evaluation of astaxanthin thermal stability. *Antioxidants*, 9(5), 422.

17. Cezare-Gomes EA, Mejia-da-Silva LDC, Pérez-Mora LS, Matsudo MC, Ferreira-Camargo LS, Singh AK, y de Carvalho JCM. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 602-634.
18. Chai WS, Chew CH, Munawaroh HSH, Ashokkumar V, Cheng CK, Park YK, y Show, PL. (2021). Microalgae and ammonia: a review on inter-relationship. *Fuel*, 303, 121303.
19. Chugh M, Kumar L, Shah MP, Bharadvaja N. (2022). Algal Bioremediation of heavy metals: An insight into removal mechanisms, recovery of by-products, challenges, and future opportunities. *Energy Nexus*, 100129.
20. Coesel SN, Baumgartner AC, Teles LM, Ramos AA, Henriques NM, Cancela L, Varela JCS. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10, 602-611.
21. Condori MAM, Condori MM, Gutierrez MEV, Choix FJ, García-Camacho F. (2024). Bioremediation potential of the *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae in explosives production effluents. *Science of The Total Environment*, 920, 171004.
22. Dai Z, Wang H, Liu J, Zhang H, Li Q, Yu X, Yang C. (2023). Comparison of the effects of *Yucca saponin*, *Yucca schidigera*, and *Quillaja saponaria* on growth performance, immunity, antioxidant capability, and intestinal flora in broilers. *Animals*, 13(9), 1447.
23. Daneshvar E, Ok YS, Tavakoli S, Sarkar B, Shaheen SM, Hong H, Bhatnagar A. (2021). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource technology*, 329, 124870.
24. Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Prosekov A, Ivanova S, Katsarov D, Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1153.

25. Elisabeth B, Rayen F, Behnam T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 41(4), 457-473.
26. El-Sheekh, MM, Abd Al-Halim MA, Mohammed SA. (2023). Algae processing by plasma discharge technology: A review. *Algal Research*, 70, 102983.
27. European Food Safety Authority (EFSA). (2021). Outcome of the consultation with Member States and EFSA on the basic substance application for approval of *Yucca schidigera* extract to be used in plant protection as fungicide and bactericide in arable crops, (leaf) vegetables crops, fruit crops, head brassica crops and seed potatoes (Vol. 18, No. 11, p. 6940E).
28. Fábryová T. (2021). Phytochemical analysis and biological activity of the alga *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella sp.*
29. Fernando JSR, Premaratne M, Dinalankara DMSD, Perera GLNJ, Ariyadasa TU. (2021). Cultivation of microalgae in palm oil mill effluent (POME) for astaxanthin production and simultaneous phycoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105375.
30. Figler A, B-Béres V, Dobronoki D, Márton K, Nagy SA, Bácsi I. (2019). Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. *Water*, 11(12), 2527.
31. Fleurence J. (2021). *Microalgae: From future food to cellular factory*. John Wiley & Sons.
32. Gobi S, Gobi K, Lee KT, Vadivelu V. (2021). Self-flocculation of enriched mixed microalgae culture in a sequencing batch reactor. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 26595-26605.
33. González M, Rodríguez L. (2023). Diversidad de clorofilas en microalgas: adaptación a diferentes condiciones luminosas y ambientales. *\*Revista de Biología Marina y Oceanografía\**, 30(2), 45-56.

34. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
35. Hata N, Ogbonna JC, Hasegawa Y, Taroda H, Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, 13, 395-402.
36. Hazen TE. (1899). The life history of *Sphaerella lacustris* (*Haematococcus pluvialis*). *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 6(3), 211-246.
37. Horwitz W. (2010). Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.
38. Imamoglu E, Sukan FV, Dalay MC. (2007). Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 1(3).
39. Jannel S, Caro Y, Bermudes M, Petit T. (2020). Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 789.
40. Kassem A, Abbas L, Coutinho O, Opara S, Najaf H, Kasperek D, Tiquia-Arashiro S. (2023). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14.
41. Khanra S, Mondal M, Halder G, Tiwari ON, Gayen K, Bhowmick TK. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and bioproducts processing*, 110, 60-84.

42. Kholssi R, Lougraimzi H, Moreno-Garrido I. (2023). Effects of global environmental change on microalgal photosynthesis, growth and their distribution. *Marine Environmental Research*, 184, 105877.
43. Khoo KS, Lee SY, Ooi CW, Fu X, Miao X, Ling TC, Show PL. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 288, 121606.
44. Kumar G, Huy M, Bakonyi P, Bélafi-Bakó K, Kim SH. (2018). Evaluation of gradual adaptation of mixed microalgae consortia cultivation using textile wastewater via fed batch operation. *Biotechnology Reports*, 20, e00289.
45. Lafarga T, Clemente I, Garcia-Vaquero M. (2020). Carotenoids from microalgae. In *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 149-187). Academic Press.
46. Lancheroz-Díaz AG, Díaz-Barrera LE, Camacho-Kumern JE. (2021). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L. 64-83.
47. Lawal IM, Soja UB, Hussaini A, Saleh D, Aliyu M, Noor A, Jagaba AH. (2023). Sequential batch reactors for aerobic and anaerobic dye removal: a mini-review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 100547.
48. Lee JY, Yu BS, Chang WS, Sim SJ. (2023). A strategy to maximize astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* in a cost-effective process by utilizing a PBR-LGP-PBR array (PLPA) hybrid system using light guide panel (LGP) and solar cells. *Bioresource Technology*, 376, 128902.
49. Lee SA, Lee N, Oh HM, Ahn CY. (2021). Stepwise treatment of undiluted raw piggery wastewater, using three microalgal species adapted to high ammonia. *Chemosphere*, 263, 127934.
50. Li S, Hu T, Xu Y, Wang J, Chu R, Yin Z, Zhu L. (2020). A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: mechanisms, performances,

influencing factors and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110005.

51. Liaquat F, Khazi MI, Bahadar A, He L, Aslam A, Liaquat R, Li J. (2023). Mixotrophic cultivation of microalgae for carotenoid production. *Reviews in Aquaculture*, 15(1), 35-61.

52. Liber, J. A., Bryson, A. E., Bonito, G., & Du, Z. Y. (2020). Harvesting microalgae for food and energy products. *Small Methods*, 4(10), 2000349.

53. López-Chuken UJ, Young SD. 2010. Modelling sulphate-enhanced cadmium uptake by *Zea mays* from nutrient solution under conditions of constant free  $Cd^{+2}$  ion activity. *Journal of Environmental Sciences*, 22: 1080-1085.

54. Lu S, Li Y, Liu X, Cheng G, Yuan Z, Wu F. (2023). Influence of Light Irradiation on Nitrification in Microalgal–Bacterial Systems for Treating Wastewater. *Processes*, 11(12), 3453.

55. Ma GQ, Li LH, Hong Y, Yu MR. (2023). Cultivation of *Haematococcus pluvialis* in source-separated urine for biomass production and astaxanthin accumulation. *Algal Research*, 69, 102945.

56. Marinho YF, Malafaia CB, de Araújo KS, da Silva TD, dos Santos APF, de Moraes, LB, Gálvez AO. (2021). Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*, 29, 757-778.

57. Marinho YF, Malafaia CB, De Araújo KS, Da Silva TD, Dos Santos APF, De Moraes, LB, & Gálvez AO. (2021). Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*, 29, 757-778.

58. Matter IA, Bui VKH, Jung M, Seo JY, Kim YE, Lee YC, Oh YK. (2019). Flocculation harvesting techniques for microalgae: A review. *Applied Sciences*, 9(15), 3069.
60. Manishaa Sri M. (2023). Impact of titanium dioxide nanoparticles on the nutritional composition of *Haematococcus pluvialis* (Doctoral dissertation, UTAR).
61. Menegazzo ML, Gelinski JMLN, Fonseca GG. (2021). Evaluation of methods of biomass recovery and lipid extraction for microalgae. In *Phycobiotechnology* (pp. 215-250). Apple Academic Press.
62. Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park MS, Yang JW. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.
63. Montgomery DC, Peck EA, Vining GG. (2021). Introduction to linear regression analysis. John Wiley & Sons.
64. Moraes DLBS, Mota GCP, dos Santos EP, Campos CVFDS, da Silva BAB, Olivera Gálvez A, de Souza Bezerra R. (2023). *Haematococcus pluvialis* cultivation and astaxanthin production using different nitrogen sources with pulse feeding strategy. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
65. Moreira JB, Kuntzler SG, Bezerra PQM, Cassuriaga APA, Zapparoli M, da Silva JL V, de Moraes MG. (2022). Recent advances of microalgae exopolysaccharides for application as bioflocculants. *Polysaccharides*, 3(1), 264-276.
66. Moreno-Garcia L, Adjallé K, Barnabé S, Raghavan GSV. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
67. Mousavi M, Mehrzad J, Najafi MF, Zhiani R, Shamsian SAA. (2022). Nitrate and ammonia: Two key nitrogen sources for biomass and phycocyanin production by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 34(5), 2271-2281.

68. Mubarak M, Shaija A, Suchithra TV. (2019). Flocculation: An effective way to harvest microalgae for biodiesel production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(4), 103221.
69. Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine drugs*, 18(9), 459.
70. Mussagy CU, Pereira JF, Santos-Ebinuma VC, Pessoa Jr A, y Raghavan V. (2023). Insights into using green and unconventional technologies to recover natural astaxanthin from microbial biomass. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(32), 11211-11225.
71. Muylaert K, Bastiaens L, Vandamme D, Gouveia L. (2017). Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, 113-132.
72. Md Nadzir, S, Yusof N, Nordin N, Kamari A, Yusof MZM. (2023). A review of microalgal cell wall composition and degradation to enhance the recovery of biomolecules for biofuel production. *Biofuels*, 14(9), 979-997.
73. Nagappan S, Devendran S, Tsai PC, Dahms HU, Ponnusamy VK. (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252, 339-349.
74. Occhipinti PS, Russo N, Foti P, Zingale IM, Pino A, Romeo FV, Caggia C. (2024). Current challenges of microalgae applications: exploiting the potential of non-conventional microalgae species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(7), 3823-3833.
75. Olguín EJ, Sánchez-Galván G, Arias-Olguín II, Melo FJ, González-Portela RE, Cruz L, Adessi A. (2022). Microalgae-based biorefineries: Challenges and future trends to produce carbohydrate enriched biomass, high-added value products and bioactive compounds. *Biology*, 11(8), 1146.

76. Panis G, Carreon JR. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal research*, 18, 175-190.
77. Parvathy AJ, Das BC, Jifiriya MJ, Varghese T, Pillai D, Rejish Kumar VJ. (2023). Ammonia induced toxico-physiological responses in fish and management interventions. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 452-479.
78. Peter AP, Koyande AK, Chew KW, Ho SH, Chen WH, Chang JS, Show PL. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111852.
79. Poh ZL, Kadir WNA, Lam MK, Uemura Y, Suparmaniam U, Lim JW, y Lee KT. (2020). The effect of stress environment towards lipid accumulation in microalgae after harvesting. *Renewable Energy*, 154, 1083-1091.
80. Prabhu A, Gadgil M. (2021). Trace metals in cellular metabolism and their impact on recombinant protein production. *Process Biochemistry*, 110, 251-262.
81. Putri DS, Sari DA, Zuhdia LD. (2020). Flocculants optimization in harvesting freshwater microalgae *Haematococcus pluvialis*. *J Kim Ris*, 5, 49-54.
82. Radice RP, Sansone M, D'Arienzo G, Scopa A, Martelli G. (2022). Bioremediation of Crude Oil by *Haematococcus Pluvialis*: A Preliminary Study. *Processes*, 10(12), 2472.
83. Rammuni MN, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Attalage RA. (2019). Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. *Food chemistry*, 277, 128-134.
84. Ranaweera SA, Liyanagamage VU, White MG. (2023). Effects of millet on calcium oxalate crystal growth and dissolution. *Journal of Medicinal Plants Research*, 17(3), 64-81.

85. Salbitani G, S. (2021). Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability*, 13(2), 956.
86. Schüller LM, Santos T, Pereira H, Duarte P, Katkam NG, Florindo C, Varela JC. (2020). Improved production of lutein and  $\beta$ -carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis sp.* CTP4. *Algal Research*, 45, 101732.
87. Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531.
88. Shao Y, Gu W, Jiang L, Zhu Y, Gong A. (2019). Study on the visualization of pigment in *Haematococcus pluvialis* by Raman spectroscopy technique. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
89. Siddiki SYA, Mofijur M, Kumar PS, Ahmed SF, Inayat A, Kusumo F, Mahlia TMI. (2022). Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel*, 307, 121782.
90. Singh G, Patidar SK. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, 217, 499-508.
91. Souza RLM, Viana WKR, Moreira MSM, Soares AA, Lisboa V, Vidigal RCD, Matias JFN. (2020). Technological innovations in the cultivation of *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Sistemas & Gestão*, 15(3), 223-234.
92. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
93. Stachowiak B, Szulc P. (2021). Astaxanthin for the food industry. *Molecules*, 26(9), 2666.
94. Stein J. (1973). *Handbook of phycological methods*, 448 pp. Cambridge University Press, London.

95. Su W, Xu W, Su W. (2023). One-Pot, Water-Based Disruption of Cell Walls and Astaxanthin Extraction from *Haematococcus pluvialis* by Mechanochemistry. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 11(13), 5023-5031.
96. Suh IS, Joo HN, Lee CG. (2006). A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. Journal of Biotechnology, 125(4), 540-546.
97. Sukarni, Sudjito, Hamidi N, Yanuhar U, Wardana ING. (2014). Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. International Journal of Energy and Environmental Engineering, 5, 279-290.
98. Sun XM, Ren LJ, Zhao QY, Ji XJ, Huang H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. Biotechnology for biofuels, 11, 1-16.
99. Sung YJ, Sim SJ. (2022). Multifaceted strategies for economic production of microalgae *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin via direct conversion of CO<sub>2</sub>. Bioresource technology, 344, 126255.
100. Teng Z, Zheng L, Yang Z, Li L, Zhang Q, Li L, Song L. (2023). Biomass production and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* in large-scale outdoor culture based on year-round survey: Influencing factors and physiological response. Algal Research, 103070.
101. Tibbetts SM. (2018). The potential for ‘next-generation’, microalgae-based feed ingredients for salmonid aquaculture in context of the blue revolution. Microalgal biotechnology, 151.
102. Tran NAT, Seymour JR, Siboni N, Evenhuis CR, Tamburic B. (2017). Photosynthetic carbon uptake induces autoflocculation of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. Algal research, 26, 302-311.

103. Tripathi U, Sarada R, Rao SR, Ravishankar GA. (1999). Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197-199.
104. Trivedi J, Aila M, Bangwal DP, Kaul S, Garg MO. (2015). Algae based biorefinery—how to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307.
105. Vandamme D, Foubert I, Fraeye I, Meerschaert B, Muylaert K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource technology*, 105, 114-119.
106. Venckus P, Endriukaitytė I, Čekuolytė K, Gudiukaitė R, Pakalniškis A, Lastauskienė E. (2023). Effect of biosynthesized silver nanoparticles on the growth of the green microalga *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin synthesis. *Nanomaterials*, 13(10), 1618.
107. Verma R, Kumari KK, Srivastava A, Kumar A. (2020). Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104149.
108. Vo T, Tran S, Nguyen P, Mai T. (2017). Growth, carotenoid production, antioxidant capacity and lipid accumulation of *Haematococcus sp.* under different light intensities. *American Journal of Plant Biology*, 2(4), 142-147.
109. Vo T, Tran S, Nguyen P, Mai T. (2017). Growth, carotenoid production, antioxidant capacity and lipid accumulation of *Haematococcus sp.* under different light intensities. *American Journal of Plant Biology*, 2(4), 142-147.
110. Wang J, Wang Y, Wu Y, Fan Y, Zhu C, Fu X, Mou H. (2022). Application of Microalgal Stress Responses in Industrial Microalgal Production Systems. *Marine Drugs*, 20(1), 30.

111. Yang HE, Yu BS, Sim SJ. (2023). Enhanced astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* strains induced salt and high light resistance with gamma irradiation. *Bioresource Technology*, 372, 128651.
112. Yin S, Jin W, Xi T, Zhou X, He Z, Meng X, Li X. (2024). Factors affect the oxygen production of *Chlorella pyrenoidosa* in a bacterial-algal symbiotic system: Light intensity, temperature, pH and static magnetic field. *Process Safety and Environmental Protection*, 184, 492-501.
113. Yin Z, Wang M, Zeng M. (2023). Novel Pickering emulsion stabilized by natural fiber polysaccharide-protein extracted from *Haematococcus pluvialis* residues. *Food Hydrocolloids*, 134, 108048.
114. Zeng S, Lu Y, Pan X, Ling X. (2022). A Novel Bioflocculant Produced by MCCC1113: Optimization of Fermentation Conditions by Response Surface Methodology and Evaluation of Flocculation Performance when Harvesting Microalgae. *Polish Journal of Microbiology*, 71(3), 341-351.
115. Zhang C, Liu J, Zhang L. (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(5), 1205-1211.
116. Zhao F, Xiao J, Ding W, Cui N, Yu X, Xu JW, Zhao P. (2019). An effective method for harvesting of microalga: Coculture-induced self-flocculation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 100, 117-126.
117. Zia-Ul-Haq M. (2021). Historical and introductory aspects of carotenoids. *Carotenoids: structure and function in the human body*, 1-42.
118. Zielinski AAF, del Pilar Sanchez-Camargo A, Benvenuti L, Ferro DM, Dias JL, Ferreira SRS. (2021). High-pressure fluid technologies: Recent approaches to the production of natural pigments for food and pharmaceutical applications. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 850-869.

