



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ÓPTIMOS PARA EL CRECIMIENTO DE
Haematococcus pluvialis
Y LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA

Investigadores:

Gómez Varela Luisa Fernanda

Díaz Sánchez Juan Camilo

Orozco Carvajal María Isabel

Grado académico: Noveno semestre de Bacteriología y Laboratorio clínico

Contacto:

isaorozco93@gmail.com

miorozco@unicolmayor.edu.co

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
Bogotá D.C. Colombia



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Resumen

El *Haematococcus pluvialis* es una micro alga de gran importancia debido a la capacidad que tiene para la producción de astaxantina, pigmento que es utilizado en las industrias farmacéutica, alimenticia y la acuicultura; sin embargo, la obtención de éste caroteno a escala industrial tiene un costo elevado en comparación con la astaxantina sintética, por lo que se encuentra en estudio la evaluación y experimentación de diversos medios de cultivo que permitan optimizar su crecimiento y la acumulación de astaxantina, mediante la evaluación de condiciones como intensidad de luz, el ciclo luz/oscuridad, los efectos del nitrógeno, el fosforo, el acetato y otros minerales, la concentración de CO₂, la temperatura, el pH, la cantidad de biomasa producida, la cantidad de astaxantina acumulada y composición del medio, entre otros, todo esto con el fin de determinar cuáles son los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento que permiten obtener una cantidad considerable y adecuada de biomasa y un depósito conveniente de astaxantina;

La revisión bibliográfica permitió valorar la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y se llegó a la conclusión que los medios de cultivo donde se presenta un óptimo crecimiento de la microalga y una buena acumulación de astaxantina son: el medio OHM, el medio RM y el medio BBM.

Palabras claves: *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, medios de cultivo, medio OHM, medio BBM, medio RM, acuicultura, pigmento, carotenoide.

Abstract

The *Haematococcus pluvialis* is a microalgae with great importance, for their capacity for producing astaxanthine, pigment used in pharmaceutical, food and



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

aquaculture industries, but at industrial scale production for this carotene is too costly compared with the synthetic one; for that reason, studies be reached to evaluate and test of different culture media that permit growth optimization and astaxanthine accumulation, by evaluating conditions as light intensity, light/dark cycles, effect of nitrogen, phosphorus, acetate, minerals, CO₂ concentration, temperature, pH, produced biomass, cumulated astaxanthine amount and culture media composition, etc., to determine what are the best culture medias and growing conditions for obtaining appreciable and adequate biomass amounts and a good quantity of astaxanthine.

The bibliographic review allows to evaluate the culture media composition and the growing conditions of *Haematococcus pluvialis* and they conclude that the culture medias where have higher microalgae growth of microalgae and good astaxanthine accumulation are OHM, RM and BBM media.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthine, culture media, OHM media, BBM media, RM media, aquaculture, pigment, carotenoid.

Introducción

Las microalgas son microorganismos con un elevado uso en la industria, debido a la capacidad que poseen para producir y/o acumular pigmentos carotenoides de importancia; sin embargo, la capacidad de crecimiento es muy limitada ya que su tasa de crecimiento es baja y además porque éstos pigmentos son acumulados por lo general cuando se le proporciona al microorganismo algunas condiciones de estrés al medio de crecimiento; éstos microorganismos crecen en la naturaleza utilizando la luz solar, la cual permite impulsar procesos celulares para la asimilación de nutrientes que son proporcionados en la naturaleza como el dióxido



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

de carbono que es tomado del aire, los nitratos y los sulfatos que están disueltos en el agua y pequeñas cantidades de iones metálicos; es por esto que es difícil realizar el cultivo en el laboratorio, ya que para que el crecimiento sea óptimo y la producción de pigmentos sea eficaz, se le debe proporcionar los nutrientes adecuados para que el microorganismo tenga las mismas o al menos las condiciones similares a las que tiene en la naturaleza.

El *Haematococcus pluvialis* es una microalga que tiene la capacidad de producir el pigmento astaxantina, el cual es un agente antioxidante altamente efectivo que tiene una diversidad de usos a nivel de las industrias cosmética, alimenticia y farmacéutica; debido al alto costo de producción de éste pigmento de forma sintética y la dificultad de obtención en crecimiento en medios artificiales, se quiere optimizar su producción a nivel natural; por lo anterior el grupo de trabajo realizó una revisión bibliográfica sobre los medios de cultivo que permiten un mejor crecimiento de la micro alga y la producción natural de astaxantina, además de valorar los factores que influyen en el mantenimiento del microorganismo in vitro como la intensidad de luz, la temperatura, el aporte de dióxido de carbono, el efecto del nitrógeno, el fósforo y otros minerales; así mismo, se quiso indagar sobre algunos de los mecanismos de generación de estrés que permitan optimizar el proceso de crecimiento de la microalga y la acumulación del metabolito.

Metodología

Se realizó una revisión bibliográfica de material escrito en los años 1998 a 2014, en los que se buscó información sobre los medios de cultivo en los que se ha cultivado el *H. pluvialis* en las mejores condiciones y se compilaron en una tabla resumen que contienen las características necesarias para el crecimiento y la producción de astaxantina, de esta manera se logró obtener un análisis



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

multicriterio de los medios de cultivo más utilizados y los que favorecen el crecimiento y la obtención del pigmento.

Los artículos científicos se seleccionaron con un criterio investigativo y experimental para revisar los medios de cultivo que son más utilizados en el crecimiento del *Haematococcus pluvialis* y aquellos que permiten la obtención de una buena concentración de astaxantina, a fin de hacer un aporte a futuras investigaciones en bioprocesos.

Los parámetros revisados en cada uno de los artículos fueron: nombre del medio de cultivo, pH, temperatura, intensidad de luz, necesidad de CO₂, nitrógeno, producción de biomasa y producción de astaxantina; como producto se planteó la siguiente tabla resumen:

Resultados

MEDIO	pH	T°	LUZ	CO ₂	NITRÓGENO	BIOMASA	ASTAXANTINA	REFERENCIA
M1	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D de 39W</i> con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	Ausencia de nitrógeno			Ramírez Daniel,2013
BBM	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D de 39W</i> con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	3,28x10-3 M,	Al doble de nutrientes y irradiación de 2500 μmol/m ² 3g/L	En concentración de sal 0,025% - 0,0100% de 4,5 y 5 μg/mL A 5 y 6,5μg/mL A 5500 lux 34μg/ml	Ramírez Daniel,2013
		25 ± 1 °C		2%				
F1	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D de 39W</i> con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	3,28x10-3 M,			Ramírez Daniel,2013
BG-11	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D de 39W</i> con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	3,28x10-3 M,			Ramírez Daniel,2013
		7 – 8	20 - 25,5°C	Iluminación continua intensidad 30μmolm-2 s-1.	1,5% v/v	0, 0.375, 0.75, y 1.5 g L ⁻¹		Wang, J. 2013.
		>8	25° C	Lámparas estándar blanco frío fluorescente. (18 W) 75 μmolphotons m-2 s-1	-	NaNO3 1500 mg/L		Imamoglu, E. 2007
BG-11 Modificado	>8	25° C	Lámparas estándar blanco frío fluorescente. (18 W) 75 μmolphotons m-2 s-1	-	NaNO3 1500 mg/L			Imamoglu, E. 2007
RM	>8	25° C	Lámparas estándar blanco frío fluorescente. (18 W)	-	NaNO3 300 mg/L			Imamoglu, E. 2007



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

HONG-KONG	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D</i> de 39W con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	Ausencia de nitrógeno			Ramírez Daniel,2013
M6	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D</i> de 39W con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%				Ramírez Daniel,2013
OHM	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D</i> de 39W con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	3,28x10-3 M,			Ramírez Daniel,2013
					4Mm	Relacionada con nitrógeno remanente en cultivo a renovación del 20% 5,8 mg/l dia	Dominguez et al.,2006	
Z8	7,0	25 ± 0,5 °C	Lámparas fluorescentes marca <i>SylvaniaDaylight F48T12/D</i> de 39W con una intensidad luminica de 5000 ± 50 lux	0.51%	Ausencia de nitrógeno			Ramírez Daniel,2013
Bristol	6,0	25° ± 2 °C	Densidad de flujo de fotones (PFD) de 35 mmol m-2 s-1, fotoperiodo de 16: 8 (L: D).	-	Tres fuentes: Nitrato de sodio, cloruro de amonio, y urea concentraciones de 2,9 mM.		Privación de nitrógeno Aumento luz 2,0-4,9 mg/l 15-25,9pg/cell	Cifuentes, A. 2003
		20° ± 2 °C	Lámparas fluorescentes SYLVANIA 40W/F40T12/ D DAYLIGHT. Luz continua densidad de flujo fotónico de 59 µE m-2s-1	Sin suministro	Nitratos NO ₃ Suficiencia y Ausencia		En fase estacionaria Expuesta a campo magnético 15 horas 1,3 pg/cel ⁻¹	Gómez, L. 2009
Bristol selectivo Con agitación	6,0	Controlada de 25°C	Un fotoperiodo de 12 hrs. luz-12 hrs. oscuridad	-	0,25, 0,50, 0,75 ,1,0, 1,25 y 1,5 g/L		Al día 18 con iluminación roja Concentración superior a 0,74mg/L	Sosa,2009 Salazar, Gonzales et al, 2003
Bristol suplementado	-	22 ± 1 °C	Bajo dos PFD continua diferentes: 20 y 85 µmol m-2 s-1 (suministrada por lámparas fluorescentes de luz diurna fresco)	-	-	Condiciones autotróficas (5,6 mg l ⁻¹ Condiciones mixotróficas (con 2mM acetato) (10,8 mg l ⁻¹)	Condiciones autotróficas (95,6 pg/cél ⁻¹) Condiciones mixotróficas (con 2mM acetato) (297 pg cél ⁻¹)	González, M. 2009
F/2 Sin Nitrógeno	8,3 7	14 -15 °C	Luz solar, luz UV-vis, oscuridad	-	-			Sosa,2009
F/2	7,7-8,2	14 -15 °C	Luz solar, luz UV-vis, oscuridad	-	-			Sosa,2009
Fortilizante folicular (QF)	7,7-8,2	14 -15 °C	Luz solar, luz UV-vis, oscuridad	-	-			Sosa,2009
Medio Basal	6,8	20°C	Lámpara fluorescente 12 horas luz – 15 klx	-	Ausencia de nitrógeno		Estrés con acetato 50pg/cel en 5 días	Kobayashi, M. 1993
		22°C	12 horas luz 20 µmol Photons L65W / 25S lámparas blancas universales.				11,4mg/g peso en seco 48 horas	Steinbrenner, J. 2006
	6,0 8,0 9,0	25± 1 °C	Luz continúa. Intensidad 1,5 klux		Nitrato de calcio, de potasio, de amonio y de sodio al 10%.	Estrés por nitrógeno 0,75g/L	Estrés por nitrógeno 3,70 mg/l	Sarada, R. 2002. Vidhyavathi, R 2008. Vidhyavathi, R. 2009
Medio experimental	-	25°C	Iluminación por luces fluorescentes con una irradiancia de 30 / ~ E m -2 s-1	-	Nitrato de potasio 0,20gr x L		Estrés por acetato 10,071 mg/L ⁻¹	Xiandi, G. 1998.
C-Medium Adicionado con acetato de sodio 10mM	8	25°C	Iluminación continúa. Intensidad 250 µmol/m2/s.	El acetato de sodio es fuente de carbono	Nitrato de potasio KNO ₃	1,85g/L a 28°C por 10días iluminación constante	3,5% w/w a 28°C por 8, 10 y 12 días iluminación constante	Wan, M, 2014
FAB		28°C		1,5%	NaNO ₃ 1,0g/l			Dominguez, A. 2004
BAR		28°C	Dos tipos: Iluminación continua y 12h luz / 12h oscuridad. Intensidad 345 µmolphoton m ⁻² s ⁻¹	1,5%	NaNO ₃ 0,25g/l		Con iluminación continua y estrés por acetato 98mg/g	Dominguez, A. 2004



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Conclusiones

- Después de la revisión y el análisis del material bibliográfico se encontraron un buen número de medios de cultivo que garantizan el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*, aunque no en todos se establecen de manera clara las condiciones para su desarrollo; por lo anterior y acorde a los parámetros valorados se concluye que los medios de cultivo reúnen mejores condiciones para el cultivo de la micro alga son los medios de: RM, OHM y BBM.
- En la revisión de los componentes de los medios de cultivo en los que se obtiene un crecimiento óptimo del *Haematococcus pluvialis*, se observó que la fuente de nitrógeno es el Nitrato de sodio, concentración que se puede plantear como una variable a manipular como mecanismos de generación de estrés para aumentar la producción de astaxantina.
- Otro factor que puede ser modificado de manera experimental como mecanismo de generación de estrés, es la intensidad lumínica que aplicada al cultivo en crecimiento de *Haematococcus pluvialis*.
- Con base en la revisión realizada, se recomienda hacer estudios experimentales con los que se puedan establecer las condiciones óptimas para aumentar la producción del pigmento astaxantina.
- Ésta revisión bibliográfica se hizo con el propósito de establecer un medio de cultivo con las condiciones apropiadas para proporcionar un crecimiento óptimo de *H. pluvialis* y de ésta manera aportar a la creación de un



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

biocentro en la Universidad Colegio de Cundinamarca donde se promueva el desarrollo de investigaciones en bioprocesos de las microalgas y sus beneficios.

Bibliografía

1. Ramírez Landines M. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo *airlift*. (tesis de grado MAGISTER) . Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 2013
2. Domínguez A, Fábregas J, Otero J. Algas España: Sociedad Española de Ficología. 2006.
3. Sosa Lima A. cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, en lote y fotobiorreactor para la producción de carotenoides (tesis de grado especialización). México D.F. universidad autónoma metropolitana. 2009.
4. Salazar M, Monrroy O, Beristain R, Cuevas F, Mendoza Carlos. Cultivo continuo de *Hematococcus pluvialis* en quimiostato. Universidad autónoma metropolitana.
5. González A, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions, Universidad de Concepción, 2003.
6. Brinda, R. Sarada, R. Sandesh Kamath, B. Ravishankar. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects. Plant Cell Biotechnology Department, Central Food Technological Research Institute. 2004.
7. Mark Harker & Andrew J. Young (1995) Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis*, European Journal of Phycology. Feb 2007; 30:3, 179-187.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

8. Kobayashi, M. Tohhide, k. Shiro, N. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. Applied and Environmental Microbiology. Mar 1993;59:3, p. 867-873.
9. Steinbrenner, J. Sandmann, G. Transformation of the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, Dic 2006; 72:12 p. 7477-7484.
10. Cifuentes, A. González, M. Vargas, S. Hoeneisen, M. González, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotowstrain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Biological Research. Chile, 2003; 36, 343-357,
11. Gonzalez, M. Cifuentes, A. Gómez, P. Growth and total carotenoid content in four Chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. Gayana botánica. Chile, 2009. 66:1, 58 – 70.
12. Imamoglu, E. Vardar, F. Sukan, M. Dalay, C. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. International Journal of Natural and Engineering Sciences. Bornova, Izmir 2007. 1 (3): 05-09.
13. Xiandi, G. Feng, C. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochemistry. 1998. 33:4. 385-391.
14. Sarada, R. Tripathi, U. Ravishankar, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry. 2002; 32. 623–627.
15. Vidhyavathi, R. Sarada, R. Aswathanarayana, G. Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. Enzyme and Microbial Technology. 2009; 45: 88–93.

16. Vidhyavathi, R. Venkatachalam, L. Sarada, R. Aswathanarayana, G. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. Journal of Experimental Botany. 2008; 59:6. 1409–1418.

17. Wang, J. Sommerfeld, M. Lu, C. Hu, Q. Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. Algae. 2013; 28(2): 193-202.

18. Gómez, L. Menéndez, J. Álvarez, I. Flores, I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. Biotecnología Vegetal. Abril - junio, 2009; 9:2. 105 – 117.

19. Wan, M, Zhang, J. Hou, D. Fan, J. Li, Y. Huang, J. Wang, J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource Technology. 2014: 167. 276–283.

20. Dominguez, A. Guerrero, I. Martinez, F. Tomasini, A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 2004: 92. 209–214.