

Selección de cepas de microalgas y cianobacterias con potencial para la producción de pigmentos naturales

ROXANA OLVERA-RAMÍREZ

Laboratorio de Fisiología Vegetal
Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás
Apartado Postal 256, 11340 México, D.F.

ROSA OLIVIA CAÑIZARES-VILLANUEVA y ELVIRA RÍOS-LEAL

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN
Miguel Othón de Mendizábal No. 485, Col. Nueva Industrial Vallejo
07700, México, D. F.

OLVERA-RAMÍREZ, R., R. OLIVIA CAÑIZARES-VILLANUEVA y E. RÍOS-LEAL, 2000. Selección de cepas de microalgas y cianobacterias con potencial para la producción de pigmentos naturales. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., 46(1):77-82.

RESUMEN: El presente trabajo se orienta a la búsqueda de fuentes naturales de pigmentos que puedan encontrar aplicación en diversas industrias (e.g. alimentos, cosméticos, productos químicos para análisis, etc.). Mediante el cultivo de diferentes microalgas y cianobacterias, empleando medios de cultivo sintéticos y diversos sistemas de cultivo, se extrajeron y se cuantificaron los pigmentos: β caroteno, ficocianina y astaxantina, encontrándose valores similares y en algunos casos superiores a los reportados en la literatura para estas especies. Los resultados permitieron la selección de cepas que resultan promisorias para la producción de esos pigmentos. Las especies de agua dulce, además de *Spirulina*, resultaron ser mejores productoras que las especies marinas para la producción de los pigmentos de interés.

Los pigmentos principales de la mayoría de las algas son las clorofilas verdes y los carotenoides amarillos, rojos y anaranjados que constituyen del 0.5 al 5% del peso seco de la célula (Parsons, 1961; Ben Amotz *et al.*, 1982). Cada especie de alga puede tener entre 5 y 10 carotenoides diferentes; el β caroteno o provitamina A, es un constituyente común de la fracción carotenoides de las algas. Las algas verdes tienen la concentración más elevada de este compuesto. Las cianobacterias, las algas rojas y las criptomonadales contienen además de clorofila, ficoeritrinas rojas ligadas a proteínas que son solubles en agua, y/o ficocianinas de color azul.

Actualmente el mercado de los pigmentos se enfoca a los carotenos, las xantofilas y a las melaninas, considerando las fuentes, ventajas y desventajas con respecto a la

El trabajo fue financiado por el proyecto DEPI 964166 y por la fundación Ricardo J. Zevada a través del proyecto 59/87.

contraparte sintética (Becker, 1994). Entre los principales carotenoides cuyo uso está legalmente permitido en los alimentos por la mayoría de los países, están el β caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, rodoxantina, capaxantina, bixina y crocetina, que se obtienen de bacterias, hongos, plantas y de microalgas (Goodwin, 1992).

Los cetocarotenoides naranja-rojo (e.g. astaxantina) son de más valor económico que los carotenoides amarillos. Entre las principales fuentes naturales de astaxantina está la microalga *Haematococcus pluvialis* que tiene la capacidad de acumularla en altas concentraciones (2 a 5% en base seca) (Borowitzka *et al.*, 1991), lo que permite establecer un precio elevado de venta del alga que justifica una inversión considerable en el proceso de producción, incluyendo la cosecha y procesamiento.

Las principales fuentes de ficobiliproteínas son la cianobacteria *Spirulina* sp y la alga roja *Porphyridium cruentum* (Borowitzka, 1988). Tanto la ficocianina como la ficoeritrina pueden ser utilizadas como pigmentos de origen natural para alimentos, medicinas y en la industria de cosméticos.

Basados en los antecedentes mencionados, nos planteamos como objetivo determinar el contenido de β -caroteno, astaxantina y ficocianina en la biomasa de microalgas y cianobacterias, con el fin de proponerlas como fuentes naturales para la obtención de estos compuestos de utilidad como aditivos alimenticios.

Se utilizaron las siguientes cepas de microalgas: *Tetraselmis chui* e *Isochrysis galbana*, ambas marinas de amplia utilización como alimento en la actividad de acuicultura, además de *Scenedesmus obliquus* y *Haematococcus pluvialis*, todas ellas del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CINVESTAV-IPN y las cianobacterias *Calothrix* sp y *Spirulina* sp pertenecientes al cepario de microalgas del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la ENCB-IPN.

Para el cultivo de las microalgas marinas se emplearon las formulaciones de Miquel-Matue (Alfonso y Leal, 1981) y f/2 de Guillard (Guillard y Ryter, 1962) preparados con agua de mar filtrada y esterilizada por UV; para *Scenedesmus obliquus* se empleó el medio de Bristol modificado (Soeder y Hegewald, 1988); para *Calothrix* sp y *H. pluvialis* se utilizó el medio mineral BG-11 (Rippka, 1988), además del mismo BG-11 modificado para la producción de astaxantina que denominamos medio de inducción, en el cual agregamos una fuente de carbono orgánico y se varió el contenido de nitrógeno, y para *Spirulina* sp se empleó el medio mineral de Zarrouk (1977).

Las algas fueron cultivadas utilizando matraces Erlenmeyer de 2 l y garrafones de vidrio Pyrex de 20 l de capacidad, en condiciones de esterilidad. Para las cianobacterias se emplearon bolsas de polietileno con 8 l de medio de cultivo (Martínez y Espinosa, 1994). Las condiciones de incubación fueron: 28°C para las clorofíceas y 30°C para las cianobacterias, iluminación y aireación continuas, con excepción de *H. pluvialis* en donde se aplicó un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Una vez que los cultivos se encontraban en la fase de crecimiento exponencial (5-6 d), la biomasa algal se cosechó por centrifugación y la de cianobacterias por filtración a través de papel Whatman No. 1. En todos los casos la biomasa se secó por liofilización.

La extracción de β caroteno se realizó de acuerdo con la técnica de Craft (1992), a partir de la biomasa liofilizada, empleando metanol y éter etílico. En el extracto obtenido se determinó el contenido del pigmento utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) bajo las siguientes condiciones: detector de UV a 445 nm, columna Spherisorb C8, 5 μ m, 250 x 4.6 mm; fase móvil: metanol-agua hexano (94:5:1), flujo 0.7 ml/min.

Para la determinación de ficobiliproteínas, la biomasa se resuspendió en regulador de acetatos; *Calothrix* sp se rompió por sonicación o por agitación con perlas de vidrio, y para *Spirulina* sp se utilizó un método enzimático que emplea lisozima (Boussiba & Richmond, 1979); el extracto crudo se centrifugó y el sobrenadante se leyó a las siguientes absorbancias: 650, 620 y 565 nm; la ficocianina se cuantificó de acuerdo con las ecuaciones de Bennet y Bogorad (1973).

A partir de la biomasa de *H. pluvialis*, se extrajo la astaxantina con dimetilsulfóxido de acuerdo a Boussiba y Vonshak (1991); la determinación se realizó por CLAR, utilizando un detector de UV a 445 nm, columna Spherisorb C8, 5 μ m, 250 x 4.6 mm, fase móvil: metanol-agua-hexano (94:5:1) y flujo 0.6 ml/min. El pigmento se cuantificó por estandarización externa.

TABLA I. Contenido de β caroteno en las microalgas y cianobacterias estudiadas.

Especie	Medio de cultivo	Concentración de β caroteno (μ g/g)*
<i>Isochrysis galbana</i>	Miquel-Matue	55.75
<i>Isochrysis galbana</i>	f/2 Guillard	9.82
<i>Tetraselmis chui</i>	Miquel-Matue	602.23
<i>Tetraselmis chui</i>	f/2 Guillard	7.2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Bristol modificado	1747.35
<i>Calothrix</i> sp.	BG-11(50% nitrógeno)	3309.3
<i>Calothrix</i> sp.	BG-11 (100% nitrógeno)	500.0

* en base seca

En la tabla I se presentan los resultados de la extracción de β caroteno de las diferentes biomásas.

En esta tabla se observa que para las microalgas marinas *I. galbana* y *T. chui* el contenido de β caroteno estuvo influido por el medio de cultivo empleado, siendo más efectivo para la acumulación del pigmento el medio de Miquel-Matue. Para las especies de agua dulce, se encontró un alto contenido de β caroteno en *S. obliquus* (1,747.35 μ g/g) y en el caso de la cianobacteria *Calothrix* sp la disminución en la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo tuvo un efecto marcado en la producción de este

pigmento obteniéndose una concentración de 3,309.3 $\mu\text{g/g}$, cuando la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo se redujo en un 50%.

La producción de astaxantina con *Haematococcus pluvialis* fue de 7 mg/g en base seca en el medio de inducción y de 0.03 mg/g en el medio testigo. Los resultados de producción de ficocianina, que es un pigmento predominante en cianobacterias, se resumen en la tabla II.

TABLA II. Contenido de ficocianina en las cianobacterias estudiadas.

Especie	Medio de cultivo	Ficocianina (mg/g)*
<i>Calothrix</i> sp	BG-11 (0%N)	60.4
<i>Calothrix</i> sp	BG-11 (50%N)	23.2
<i>Calothrix</i> sp	BG-11 (100%N)	46.2
<i>Spirulina</i> sp	Zarrouk	66.3

*extracto crudo

Como se observa en esta tabla, el contenido de ficocianina dependió de la cepa empleada y de las condiciones de cultivo. Para *Calothrix* sp, el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo fue determinante; en ausencia de este nutriente se obtuvo 30% más ficocianina que en el cultivo testigo (BG-11, 100%N), lo que demuestra la eficiencia en la fijación de nitrógeno de esta cepa; los valores encontrados para la cepa de *Spirulina* sp son comparables a los encontrados para *Calothrix* sp.

Los mayores valores en la producción de β caroteno se encontraron en *Calothrix* sp (3.3 mg/g). Márquez *et al.*, 1995, informa que *Spirulina platensis* contiene 5.43 mg/g, de carotenoides totales, resultado que es superior al encontrado en nuestro estudio; sin embargo, en los datos de estos autores se incluyen también cantaxantina, equinenona, mixoxantina y zeaxantina. En el presente trabajo, con la cepa de *Calothrix* sp, los resultados fueron obtenidos en medios de cultivo que contienen una menor cantidad de nitrógeno que el medio original por lo que resulta relevante desde el punto de vista económico. En el caso de la ficocianina, se encontraron valores similares entre las cepas de *Spirulina* sp y *Calothrix* sp que resultan ser comparables con los informados en la literatura. Aunque los resultados obtenidos con estas cepas en recipientes de 8 l resultaron alentadores, es necesario continuar los estudios en fotobiorreactores que permitan controlar el proceso para lograr una biomasa de calidad uniforme y eventualmente proponer su escalamiento para su explotación comercial. El medio de inducción empleado para el cultivo de *H. pluvialis* demostró ser más adecuado que el BG-11 sin modificar para la producción de astaxantina. Actualmente se continúan los estudios de propágación de *H. pluvialis* a mayores volúmenes de cultivo.

Los resultados anteriores permiten concluir que las cepas de microalgas y cianobacterias estudiadas resultan potencialmente importantes para su explotación como fuentes naturales de los pigmentos β caroteno, ficocianina y astaxantina. El presente estudio aporta información para trabajos posteriores sobre la utilización de las cepas que resultaron ser adecuadas para la producción de pigmentos, además de que permitió establecer las metodologías para el cultivo masivo de las cepas estudiadas, así como para la extracción y cuantificación de los pigmentos de interés. Se considera necesario llevar a cabo experimentos en donde se incorporen estos pigmentos algales como aditivos alimenticios y se comparen sus resultados con los que brindan los aditivos sintéticos.

De manera colateral y con la intención de disminuir los costos de los procesos de separación de los pigmentos estudiados, actualmente nos encontramos implementando la técnica de fluidos supercríticos. Esta técnica ha recibido atención en los últimos años y se considera una alternativa importante a los métodos de separación convencionales, su uso se ha extendido a las industrias de alimentos (Rizvi *et al.*, 1986; Dziezak, 1986) y farmacéuticas (Bruno *et al.*, 1993). En la literatura se menciona la aplicación de la técnica de fluidos supercríticos para la extracción de bioproductos a partir de microalgas y plantas (Méndes, *et al.*, 1995). Esta técnica puede utilizar cromatografía de gases o de líquidos empleando CO_2 como la fase móvil y detectores de ionización de flama, ultravioleta o de masas. Este último detector ofrece mayor información en cuanto a la estructura molecular del compuesto eluido. Entre las ventajas que presenta la técnica de cromatografía con fluidos supercríticos es que no utiliza solventes de extracción, lo que permite ahorrarlos y evita la contaminación, además de que los compuestos no se deterioran y su recuperación es excelente.

SUMMARY

Microalgae and cyanobacteria are able to produce and accumulate significant amounts of pigments when cultured under the proper conditions. In the present study microalgae and cyanobacteria were cultured in different volumes and were grown under controlled conditions of light, air supply and temperature, in mineral media. Media formulations were compared in order to select the best one for pigment production, using microalgae as well as cyanobacteria. Pigment production was assessed by HPLC, and spectrophotometry, and results were compared with those for other cyanobacteria and microalgae, and it was concluded that the strain of *Calothrix* sp has advantages over other cyanobacteria and microalgae.

BIBLIOGRAFÍA

- ALFONSO, E. y S. LEAL, 1981. Influencia de diferentes factores en el volumen celular de algas planctónicas en cultivo. *Rev. Invest. Mar. Univ.*, La Habana, Cuba, 2:43-45.
- BEN AMOTZ, A., A. KATZ and M. AVRON, 1982. Accumulation of β carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 18:529-537.
- BENNET, A. and L. BOGORAD, 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.*, 58:419-422.
- BECKER, E. W., 1994. Microalgae Biotechnology and Microbiology, pp 9-41. Cambridge University Press, Cambridge

- BOROWITZKA, M. A., 1988. Vitamins and the fine chemicals from micro-algae, pp 153-196 In: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka M. A. & L. J. Borowitzka (eds.), Cambridge University Press. Cambridge.
- BOROWITZKA, M. A., J. M. HUISMAN AND A. OSBORN, 1991. Culture of the astaxantin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.*, **3**:295-304.
- BOUSSIBA, S. and A. RICHMOND, 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from blue-green algae *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*, **120**:155-159.
- BOUSSIBA, S. & A. VONSHAK, 1991. Astaxantin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.*, **32**(7):1077-1082.
- BRUNO, J., C. A. N. CASTRO, J. F. P. HAMEL & A. M. F. PALAVRA, 1993. Supercritical fluid extraction of biological products, pp 303-354. In: *Recovery Processes for Biological Materials*, Eds. J. F. Kennedy & J. M. S. Cabral. J. Wiley & Sons, Chichester.
- CRAFT, N. E., 1992. Carotenoid reversed-phase HPLC. *Methods in Enzymol.*, **123**:185-205.
- DZIEZAK, J. D., 1986. Innovative separation process finding its way into the food industry. *Food Technol.*, **40**(6):66-69.
- GOODWIN, T. W., 1992. Distribution of carotenoids. *Methods in Enzymol.*, **123**:167-172.
- GUILLARD, R. & J. H. RYTER, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana*. Husted and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran ("F" medium). *Can. J. Microbiol.*, **8**:229-239.
- MÁRQUEZ, F. J., N. NISHIO, S. NAGAI and K. SASAKI, 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **62**:159-164.
- MARTÍNEZ, J. F. and F. ESPINOSA, 1994. A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags, *J. Appl. Phycol.*, **6**:423-425.
- PARSONS, T. R., 1961. On pigment composition of eleven species marine phytoplankton. *J. Fish. Res. Bd., Canada*, **18**:1017-1025.
- RIPPKA R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymol.*, **167**:3-27.
- RIZVI, S. S. H., J. A. DANIELS, A. L. BENADO & J. A. ZOLLWEG, 1986. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. *Food Technol.*, **40**(7):57-64.
- SOEDER, C. J. and E. HEGEWALD, 1988. *Scenedesmus*, pp 59-84. In: Borowitzka M.A. and L. J. Borowitzka (eds). *Microalgal Biotechnology*, Cambridge University, Press. Cambridge.
- ZARROUK, G., 1977. Contribution à l'étude d'une cyanophyceae: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*, (Satch et Gardner) Geitler, Thèse doctoral, Université de Paris, France.



Recibido: febrero del 2000. Aceptado: mayo del 2000.