



*PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN
Haematococcus pluvialis BAJO EFECTO DE FACTORES
DE ESTRÉS COMO ACETATO DE SODIO Y CLORURO
DE SODIO*

LAURA JOHANNA RODRIGUEZ ROMERO

Asesora: Dra. JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN Q.F. MSc. PhD.

Grupo Bioprocesos y Control

2019

INTRODUCCIÓN

La astaxantina es un carotenoide y antioxidante que tiene un gran interés biotecnológico de diferentes industrias como cosmética, farmacéutica y pecuaria



La acumulación de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* está relacionado con la evolución de diferentes etapas de la célula vegetativa a la aplanospora en su ciclo, pero esta transición solo se da cuando esta ha sido sometida a diferentes condiciones de estrés como alta irradianza y estrés salino por acetato de sodio y cloruro de sodio.

OBJETIVOS

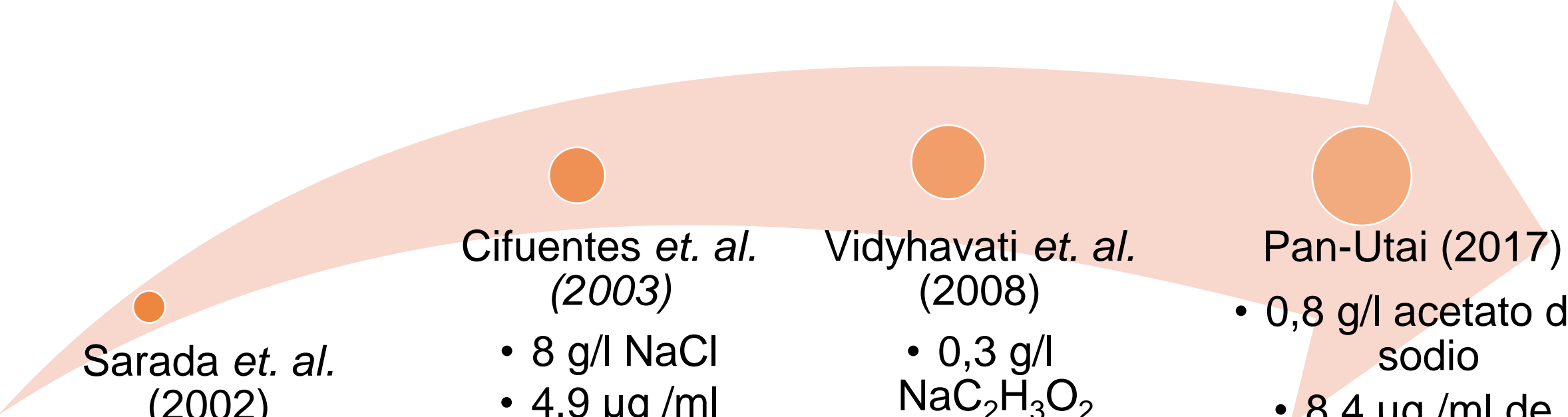
OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del acetato de sodio y cloruro de sodio sobre la producción de astaxantina en *H. pluvialis*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de *H. pluvialis* durante 56 días en un volumen de 400 ml
- Evaluar el cambio morfológico de *H. pluvialis* durante 56 días
- Determinar la concentración de clorofila y astaxantina durante 56 días bajo concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio

ANTECEDENTES

- 
- Sarada *et. al.*
(2002)
- 0,18 g/l $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$
 - 5 g/l NaCl
 - 11 μg /ml astaxantina

- Cifuentes *et. al.*
(2003)
- 8 g/l NaCl
 - 4,9 μg /ml astaxantina

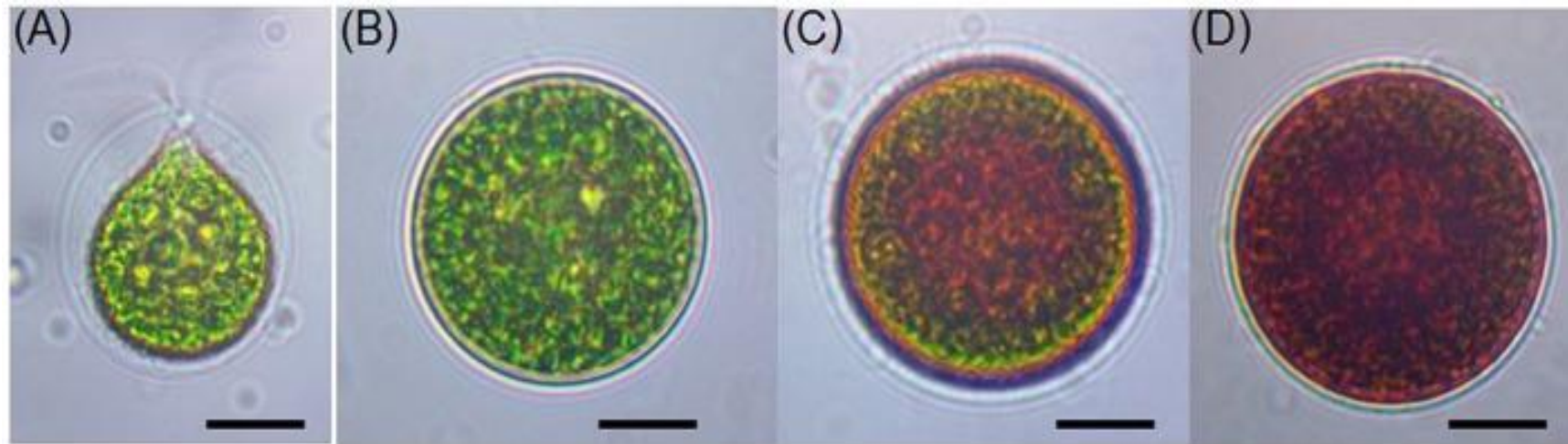
- Vidyhavati *et. al.*
(2008)
- 0,3 g/l $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$
 - 0,9 g/l de NaCl
 - 25 mg d^{-1} DW astaxantina

- Pan-Utai (2017)
- 0,8 g/l acetato de sodio
 - 8,4 μg /ml de astaxantina

MARCO TEÓRICO

Haematococcus pluvialis

Dominio	Eukaryota
Reino	Viridiplantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Haematococcaceae
Genero	Haematococcus
Especie	Pluvialis



A. Célula vegetativa B. Célula Palmella verde C. Célula Palmella en transición a aplanospora D. Aplanospora

**Factores
que
promueven
el
crecimiento
de *H.
pluvialis***

Luz

Temperatura

Nitrógeno

Fósforo

Hierro

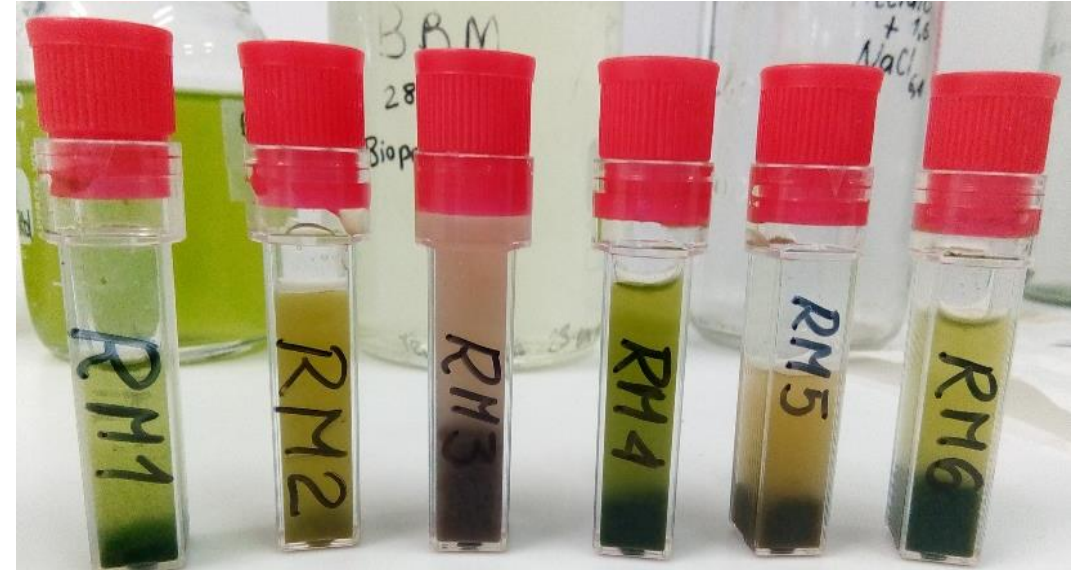
Metabolismo

Medio de
cultivo

Acetato de
sodio y cloruro
de sodio

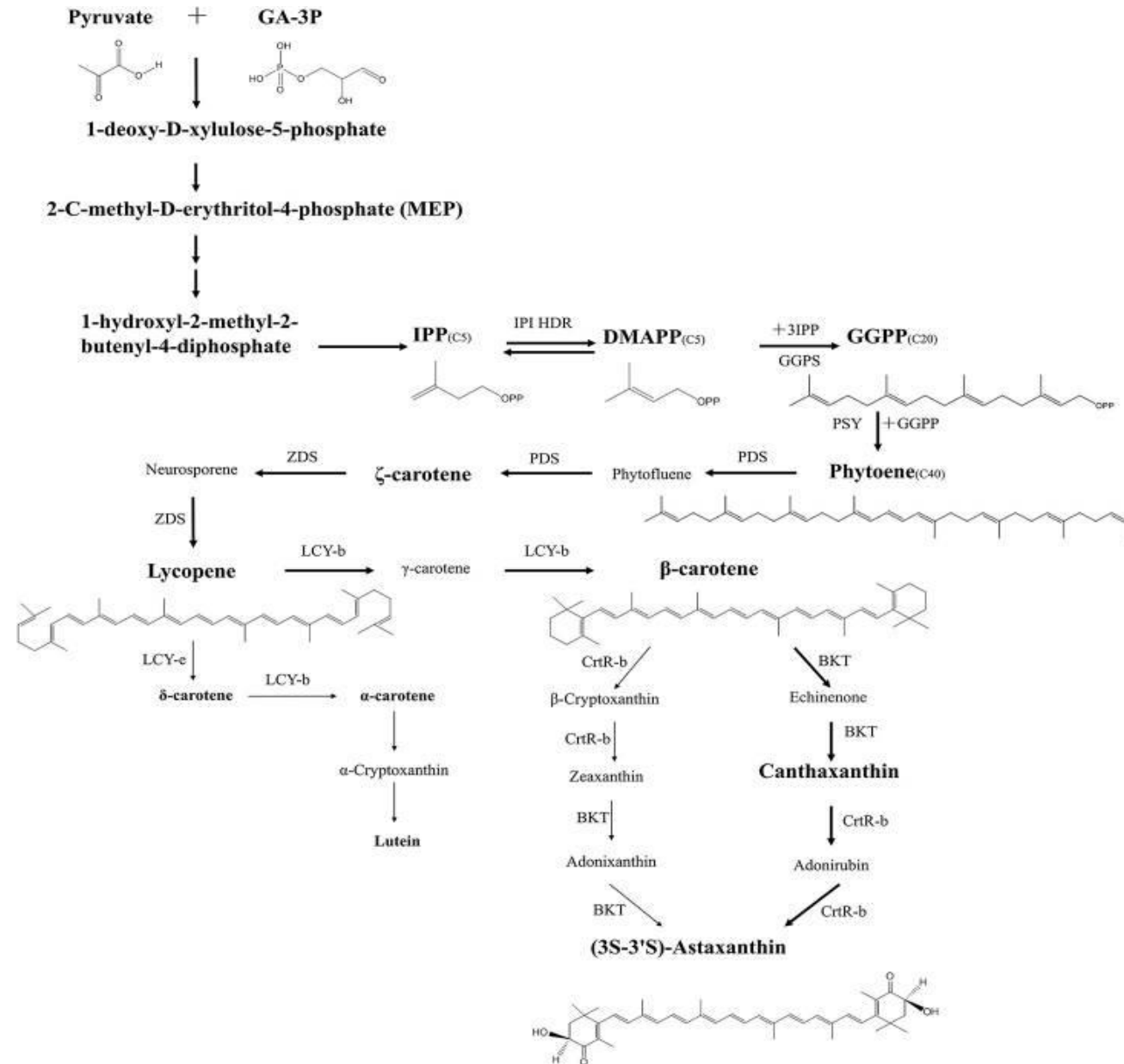


Factor de estrés



Factor de estrés

RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA



DISEÑO METODOLOGICO

FASE 1 Crecimiento de *Haematococcus pluvialis*

Medio RM, pH 6.8, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, agitación manual una vez al día durante 10 segundos, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradianza $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aire filtrado.

Cada medio estéril con el pH ajustado se adiciona en erlenmeyers de 500 ml hasta un volumen de 400 ml. Se sellan para garantizar esterilidad.

Se procede a adicionar el inoculo de la microalga (1×10^5 células./ml).

Toma de muestra por triplicado días establecidos en cabina de flujo laminar

Conservación de las muestras para su posterior estudio a 4 grados Celsius.

Se lleva control de ciclo luz/oscuridad y pH

Tiempo de estudio 56 días

Conteo celular en Cámara de Neubauer

Curva de crecimiento a partir de los resultados.

ANOVA 95%

(Niño, 2017)

TRATAMIENTOS

RM1	Medio RM normal / Control celular
RM2	Acetato de sodio 0,18 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionó el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM3	Acetato de sodio 1,6 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionó el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM4	Acetato de sodio 0,18 g/L y Cloruro de sodio 0,72 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM5	Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
RM6	Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L que se adicionaron desde el día 15 del estudio e iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

FASE 2 Cambios morfológicos celulares

Determinación de color, tamaño, viabilidad y morfología de las células



Vegetativa



Albina



Transición vegetativa a aplanospora



Aplanospora

FASE 3 Cuantificación de astaxantina y clorofila

1 ml de la muestra se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 min.



se retira el sobrenadante, al paquete celular se le adiciona 1 ml de metanol al 90%,



se calienta durante 10 min a 60 grados Celsius en baño serológico.



Se lee la absorbancia a 667 nm para clorofila y a 477 nm para astaxantina en espectrofotómetro



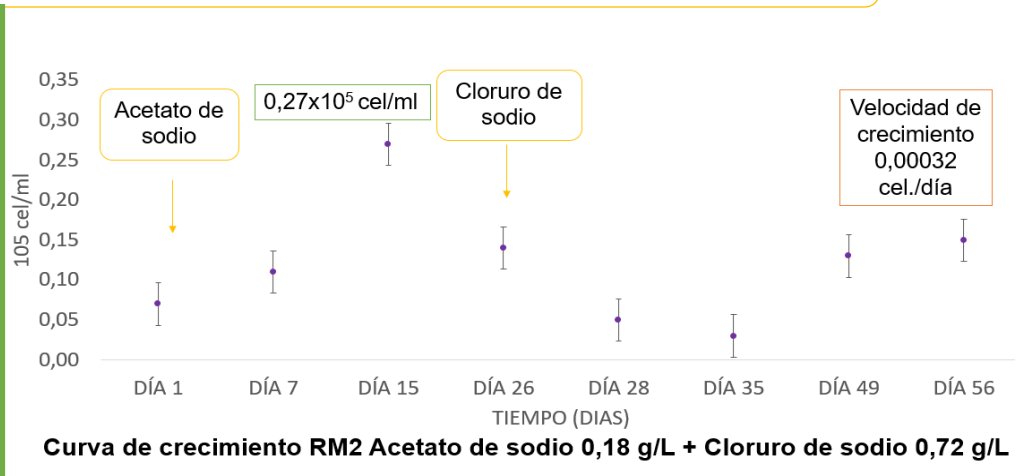
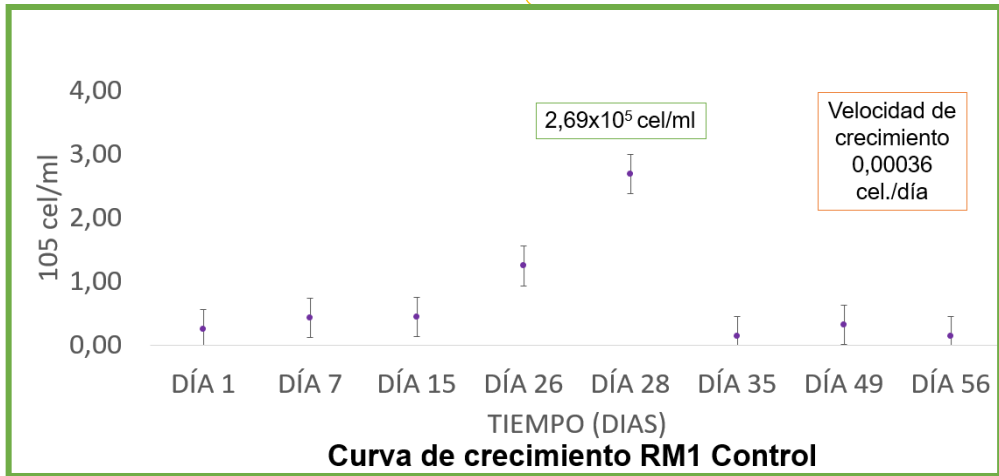
se hallaran las concentraciones utilizando la curva de calibración realizada para astaxantina y clorofila

ANOVA 95%

(APHA, 1992)

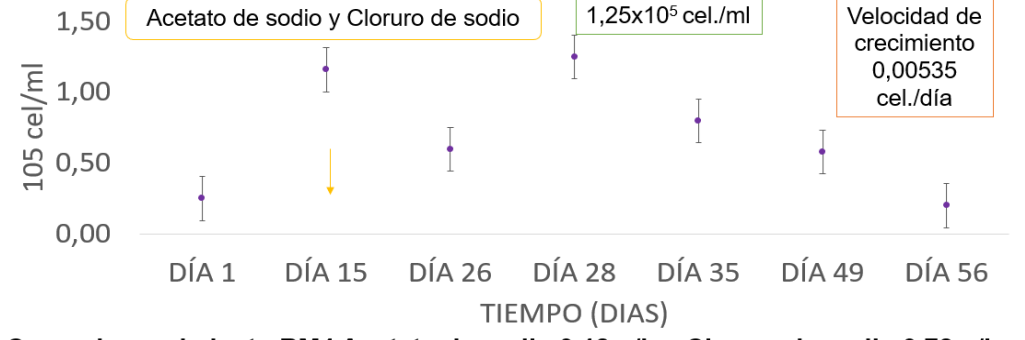
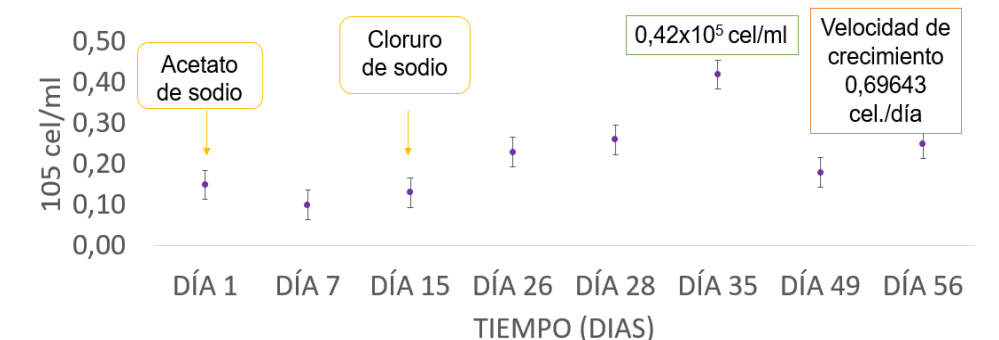
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE 1. Crecimiento de *Haematococcus pluvialis*

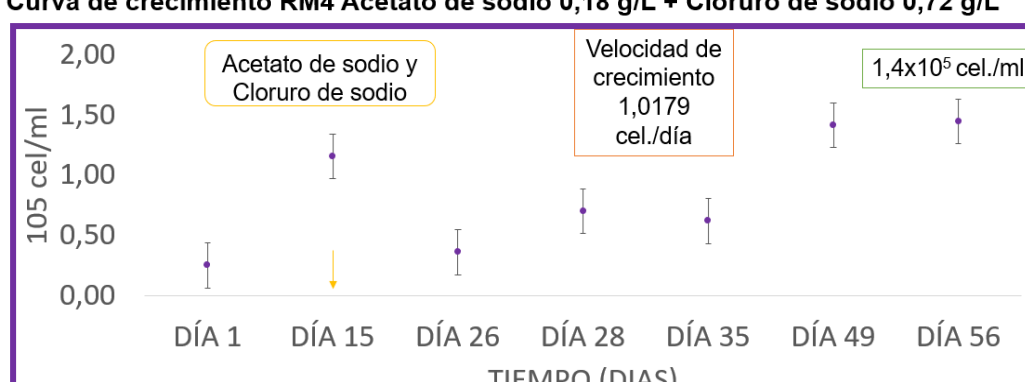
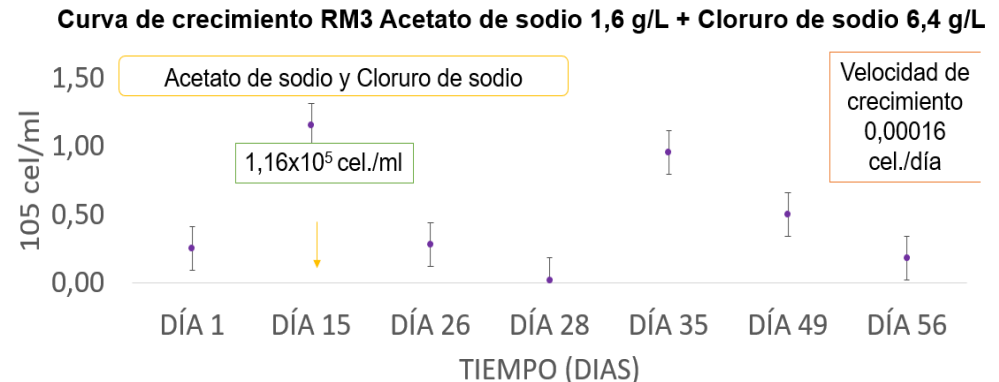


ANOVA
[F=22,47; p=0,025; gl=5]

Orosa (2005)
2,5 g/l NaC₂H₃O₂
1,1 x10⁵ cél./ml



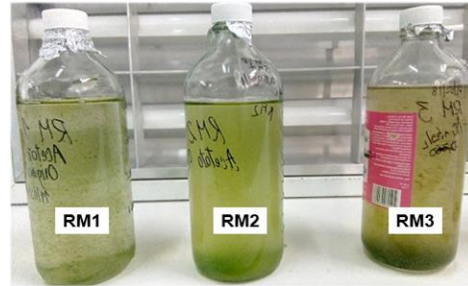
Cifuentes (2003)
8 g/l NaCl
0,7 x10⁵ cél./ml



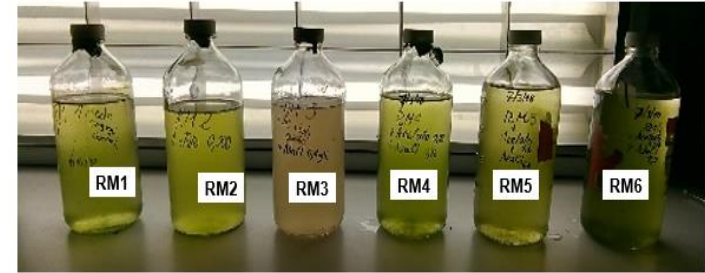
Goksan (2010)
1 g/l NaC₂H₃O₂
AM 4,2 x10⁵ cél./ml
TM 2,4 x10⁵ cél./ml

FASE 2. Cambios morfológicos macroscópico

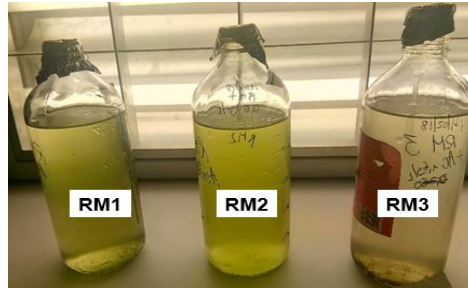
DIA 1



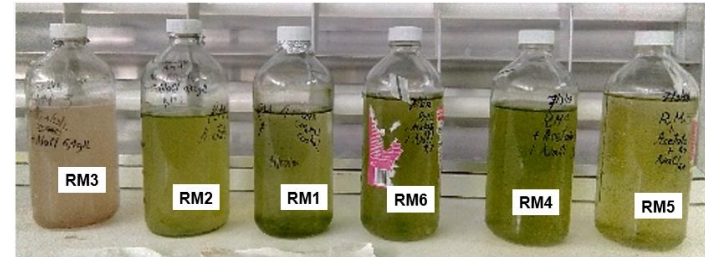
DIA 28



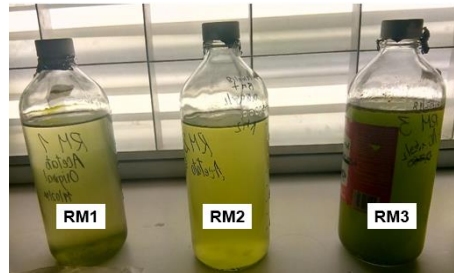
DIA 7



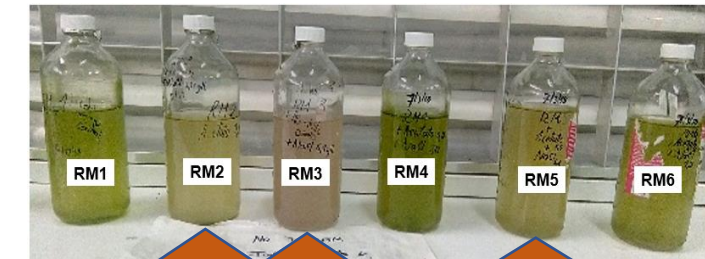
DIA 35



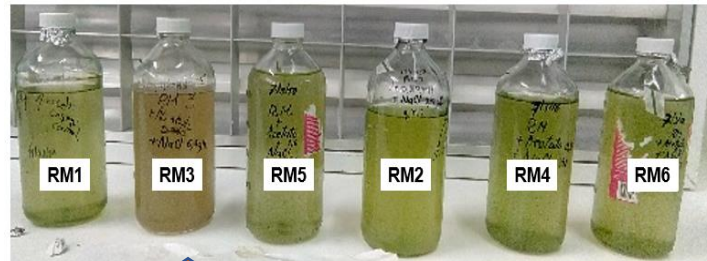
DIA 15



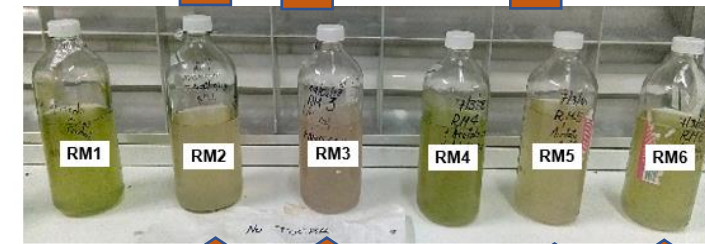
DIA 49



DIA 26



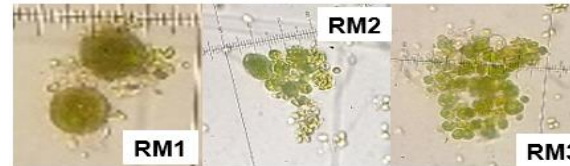
DIA 56



FASE 2

Cambios morfológicos microscópico

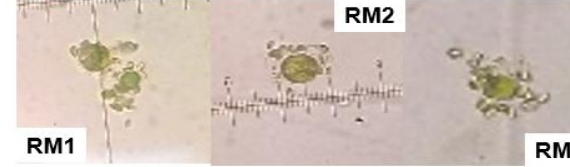
DIA 1



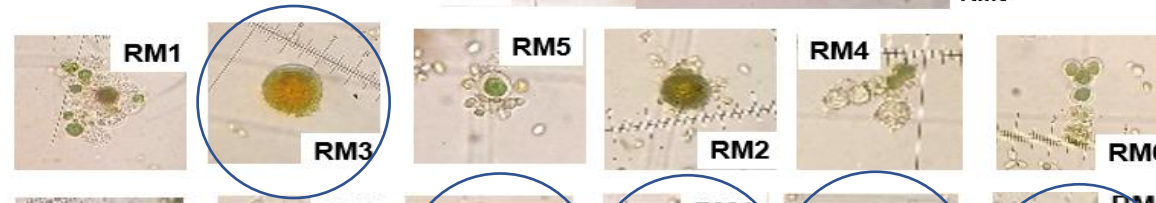
DIA 7



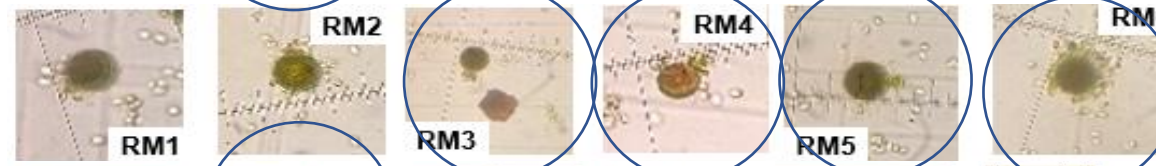
DIA 15



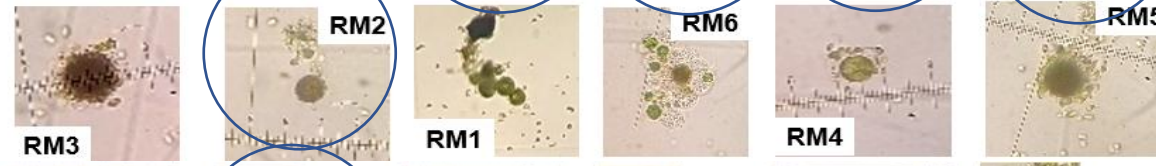
DIA 26



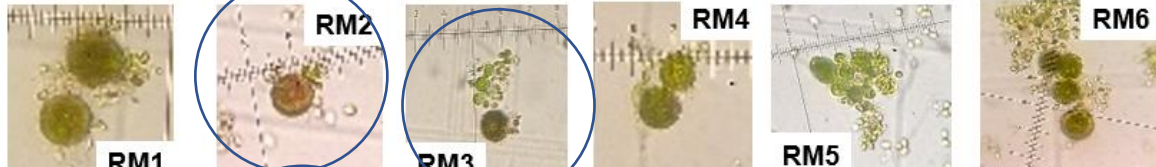
DIA 28



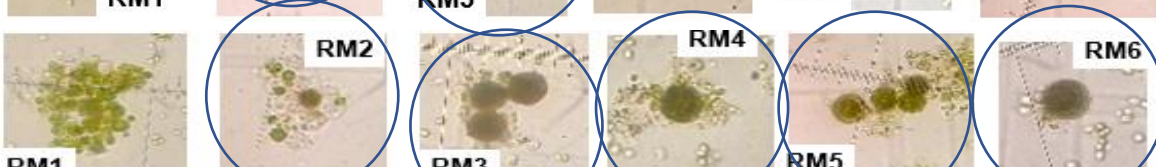
DIA 35



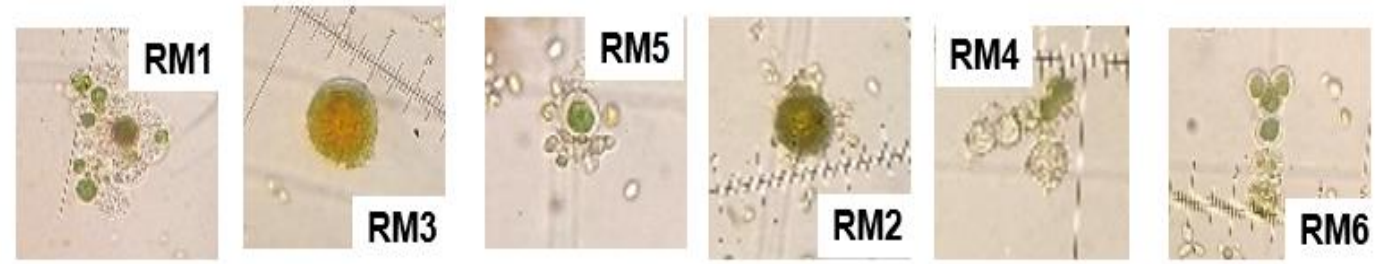
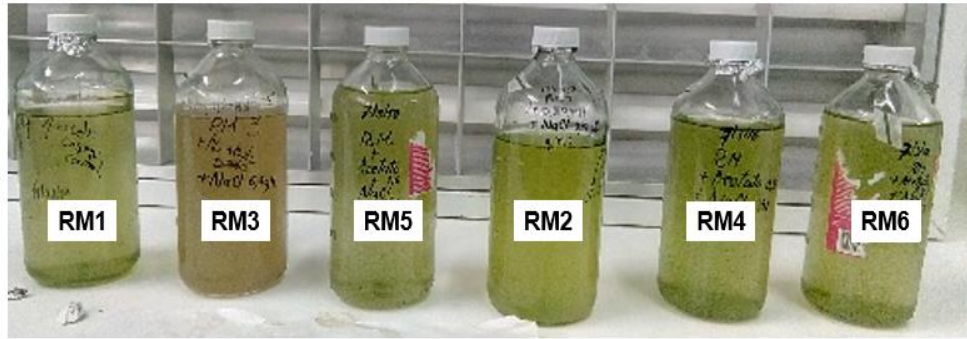
DIA 49



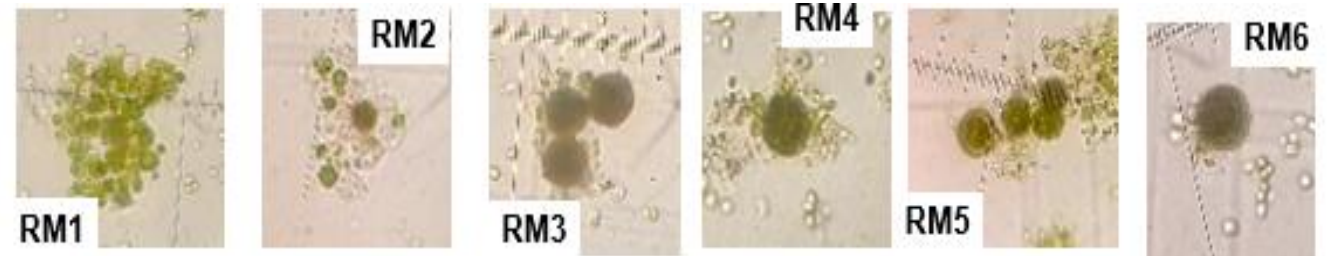
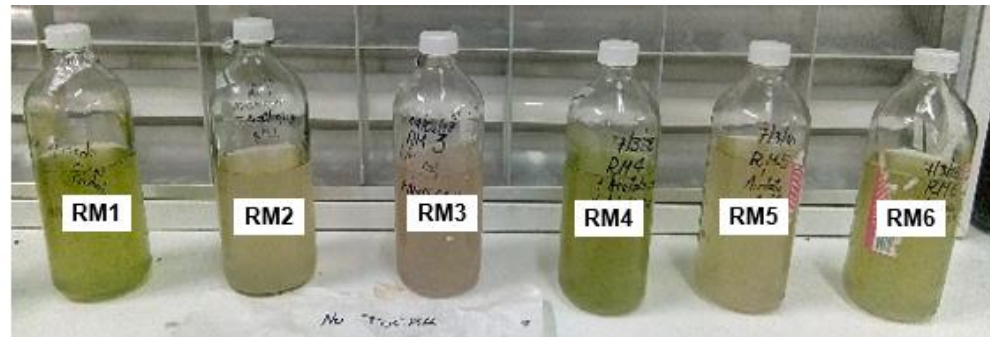
DIA 56



DIA 26

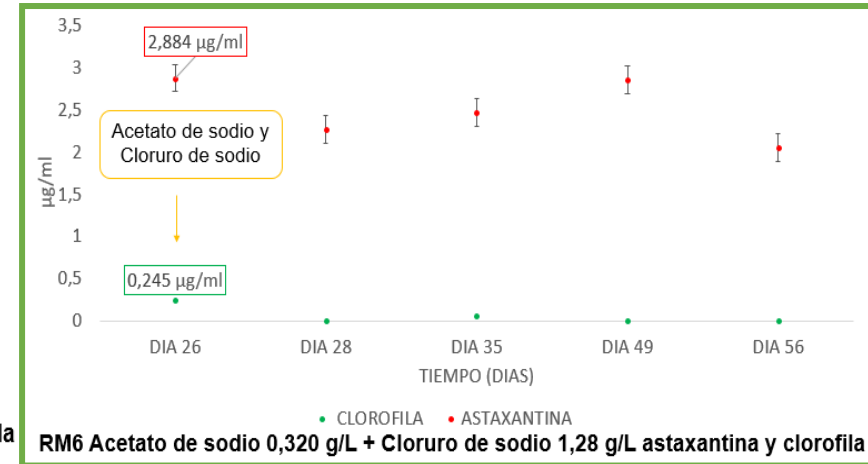
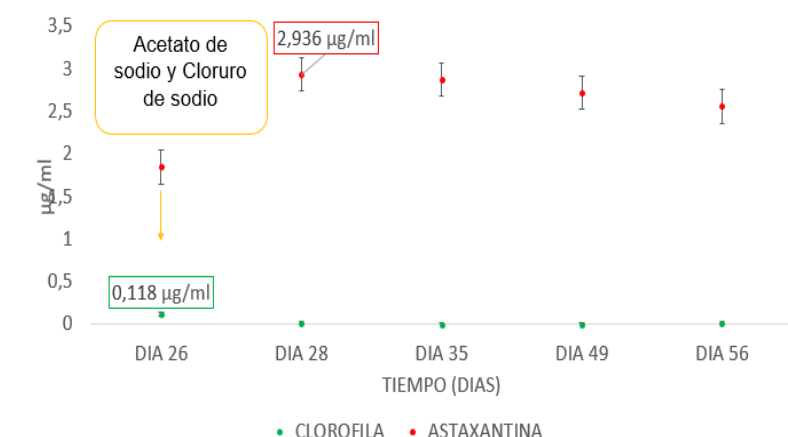
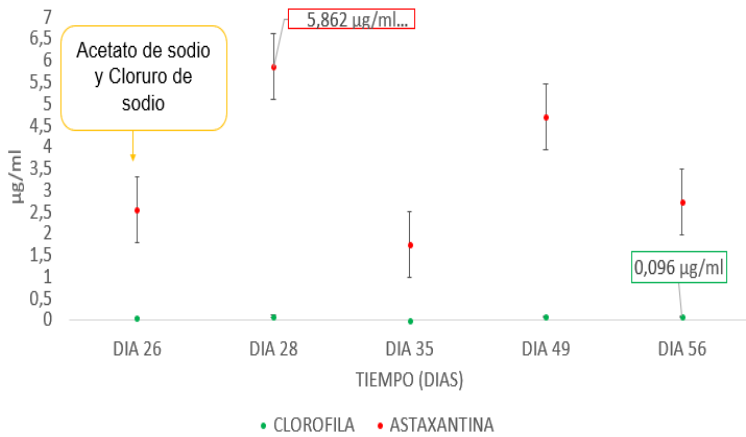
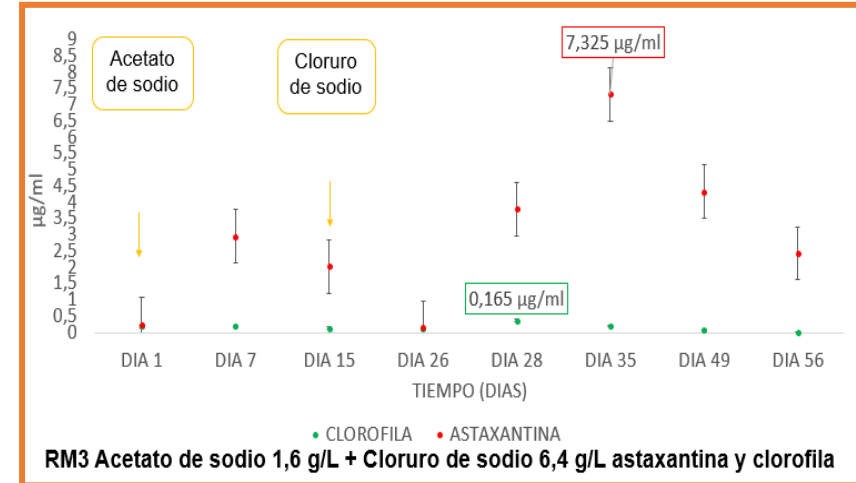
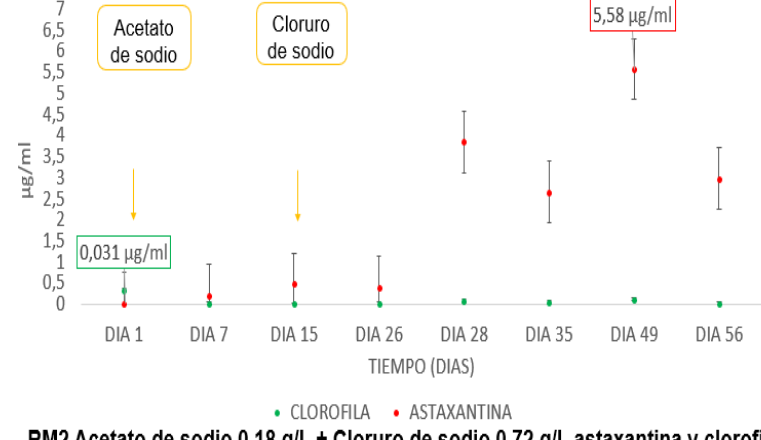
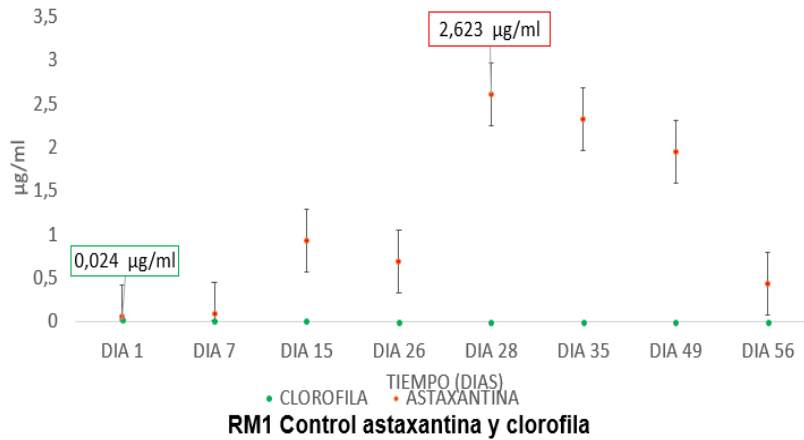


DIA 56



Jeon *et al.* (2008)

FASE 3. Cuantificación de astaxantina y clorofila



ANOVA (95%) CLOROFILA
[F=4,307; p=0,003; gl=5]

Hoang *et. al.*(2011)
He *et. al.* (2018)

Sarada (2002)
0,1 g/l NaC₂H₃O₂
5 g/l NaCl
11 µg /ml
astaxantina

Cifuentes
(2003)
8 g/l NaCl
4,9 µg /ml
astaxantina

Pan-Utai (2017)
0,8 g/l NaC₂H₃O₂
8,4 µg /ml de
astaxantina

ANOVA (95%) ASTAXANTINA
[F=1,687; p=0,165; gl=5]

Vidyhavati *et. al.* (2008)

	Crecimiento celular máximo (x10 ⁵ cel/ml)	Día de máximo crecimiento celular	P < 0,005	Concentración máxima de astaxantina (µg /ml)	Día de máxima concentración de astaxantina	P<0,005	Concentración máxima de clorofila (µg/ml)	P<0,005
RM1 Control	2,69	28	0,025	2,623	28	0,165	0,024	0,003
RM2	0,27	15		5,580	49		0,131	
RM3	0,42	35		7,325	35		0,165	
RM4	1,25	28		5,862	28		0,098	
RM5	1,16	15		2,936	28		0,118	
RM6	1,45	56		2,884	26		0,245	

CONCLUSIONES

El tratamiento donde se observan más rápido y en mayor cantidad las diferentes etapas de vegetativa a aplanospora es el medio RM3 desde el día 26

el tratamiento RM6 fue donde se presentó la mayor concentración de clorofila en el día 26 con una concentración de clorofila de 0,245 $\mu\text{g/ml}$

El mayor recuento celular se obtuvo en el tratamiento RM6 y fue de $1,45 \times 10^5$ células/ml, donde se utilizó acetato de sodio en una concentración de 0,320 g/L y cloruro de sodio en una concentración de 1,28 g/L que se adicionaron desde el día 15 del cultivo

En este estudio se comprobó el efecto del uso de sales como acetato de sodio y cloruro de sodio combinados con luz alta $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un ciclo 20h luz/4 h oscuridad porque estresaron la microalga y produjeron astaxantina.

La mayor concentración de este carotenoide fue de 7,3 $\mu\text{g/ml}$ de astaxantina en el tratamiento RM3 donde se utilizaron las concentraciones de 1,6 g/L de acetato de sodio que se adiciono al principio del estudio y 6,4 g/L de cloruro de sodio que se adiciono en el día 15 del estudio combinado con luz alta $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

RECOMENDACIONES

Experimentar con diferentes irradianzas de luz

Evaluar los genes que se expresan cuando la microalga es sometida a estrés salino

Hacer escalamiento del cultivo utilizando los factores de estrés que produjeron mayor cantidad del colorante astaxantina en este estudio

DIVULGACIÓN

- ❖ SIMPOSIO INTERNACIONAL “APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE VANGUARDIA EN LA SALUD Y LA CIENCIA” – UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA. 24 de mayo de 2019, UCMC.

PRODUCTION OF ASTAXANTHIN IN *Haematococcus pluvialis* UNDER THE EFFECT OF STRESS FACTORS SUCH AS SODIUM ACETATE AND SODIUM CHLORIDE

Laura Johanna Rodríguez Romero
Bioprocesses and control group

INTRODUCTION
The astaxanthin is a carotenoid and antioxidant that has a great biotechnological uses in different industries such as cosmetics, pharmaceuticals, nutraceutical and foodtech. The accumulation of astaxanthin in the microalgae *H. pluvialis* happens when this microalgae is submitted to different stress conditions. The aim of this project is promote the saline stress with different concentrations of sodium acetate and sodium chloride to find the optimal concentrations used to increase the production of astaxanthin.

METHODOLOGY
Phase 1 Growth of *Haematococcus pluvialis*
Culture of microalgae
Medium: RM1, pH 6.5, cycle light/darkness 15h/9h, temperature 20±2°C, agitation once a day during 10 seconds, lighting with white fluorescent lamps, irradiance 70 µE m⁻² s⁻¹.

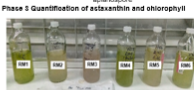
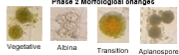


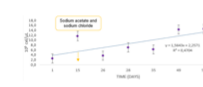
Table summary of treatments

Treatment	NaAc (g/L)	NaCl (g/L)	Chlorophyll (µg/L)	Astaxanthin (µg/L)	pH
RM1	0	0	1000	1.000	6.5
RM2	0.320	0	1000	1.000	6.5
RM3	0.320	0.320	1000	1.000	6.5
RM4	0.320	0.320	1000	1.000	6.5
RM5	0.320	0.320	1000	1.000	6.5
RM6	0.320	0.320	1000	1.000	6.5

CONCLUSION
The treatment RM6, where was used sodium acetate 0.320 g/L and sodium chloride 0.320 g/L, added the day 10 to the microalgae culture (end of the exponential phase). The culture had a growth of 1.45x10⁸ cells/mL. Statistically was observed significant differences between the treatments (p<0.05, p<0.025, p<0.01).

REFERENCES
Gokhan T, Ali I, Gulnar S. (2010) An alternative approach to the traditional microalgae culture of *Haematococcus pluvialis* Flixov (Chlorophyta). J Microalgal Biomass 2009, 1275-82
He B, He L, Dong M, Li J, Wang K, Ding Y, Gong X. (2018) Transcription Analysis of *Haematococcus pluvialis* Astaxanthin Induction by High Light Intensity. Antiox and Fat 19(1) Mol Sci 7(19)

RESULTS
Phase 1 Growth of *Haematococcus pluvialis*
Growth Curve of treatment RM6 with sodium acetate 0.320 g/L and sodium chloride 0.320 g/L.



Phase 1 Growth of *Haematococcus pluvialis* (x10⁸ cells/mL)

DAY	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6
DAY 1	0.25	0.27	0.31	0.25	0.25	0.25
DAY 7	0.41	0.33	0.35	0.35	0.35	0.35
DAY 15	0.45	0.37	0.33	1.16	1.36	1.16
DAY 20	1.25	0.14	0.21	0.60	0.28	0.36
DAY 25	2.68	0.26	0.36	1.25	0.81	0.30
DAY 35	0.15	0.83	0.42	0.80	0.96	0.62
DAY 45	0.21	0.13	0.31	0.18	0.50	0.42
DAY 55	0.15	0.15	0.25	0.20	0.18	0.45



PRODUCTION OF ASTAXANTHIN IN *Haematococcus pluvialis* UNDER THE EFFECT OF STRESS FACTORS SUCH AS SODIUM ACETATE AND SODIUM CHLORIDE

LAURA JOHANNA RODRIGUEZ ROMERO
Bioprocesses and control group

2019

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

XV Jornada de Internacionalización de la Facultad de Ciencias de la Salud, Simposio Internacional "Aplicación de la Tecnología de Vanguardia en la Salud y la Ciencia" y VI Encuentro de Egresados

PROFESORES INVITADOS EXTRANJEROS
 Gabriela Salamone: IMEX-CONICET- Facultad de Medicina- UBA
 Marianela Candolfi: Facultad de Medicina- UBA
 Cristian Layton, Universidad Autónoma del Estado de México
 François Fay, Université Paris-Sud,
 Fernando Gómez-Baquero, EEUU

Fechas: Del 20 al 24 de mayo de 2019
ENTRADA LIBRE

VER AGENDA

- ❖ IV CONGRESO INTERNACIONAL Y VIII INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN – DESARROLLO RURAL Y SOSTENIBILIDAD DESDE LA INNOVACIÓN Y EL EMPRENDIMIENTO – UNIVERSIDAD AGRARIA. 26 de abril de 2019.

REFERENCIAS

- Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N. (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol Res.*36(3-4),343-57 doi:
- Domínguez-Bocanegra AR, Guerrero Legarreta I, Martínez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. (2004) Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* 92(2),209-14
- Goksan T, Ak I, Gokpinar S. (2010) An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *J Microbiol Biotechnol.* 20(9),1276-82
- Huang JC, Chen F, Sandmann G. (2006) Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol.*122(2),176-85
- Orosa M, Franqueira D, Cid A. Abalde J. (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.*96(3),373-8
- Pan-Utai W, Parakulksuksatid P, Phomkaivon N. (2017) Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*12,152-158
- Richmond A. (2013). *Handbook of microalgal Mass culture*. Inglaterra, Reino Unido:Wiley Balckwell
- Sarada R, Tripathi U, Ravishankar G. (2002) Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry.* 37,623–627
- Shah M, Liang Y, Cheng J, Daroch M. (2016) Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci,*7,531
- Shuehi O, Morita A, Ohnuki S, Hirata A, Sekida S, Okuda K, Ohya Y, Kawano S. (2018). Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci Rep,*8,5617
- Su Y, Wang J, Shi M, Niu X, Yu X, Gao L, Zhang X, Chen L, Zhang W. (2014) Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *170,522-529*
- Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. (2008) Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *59(6),1409-18*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

A la Dra Judith Elena Camacho Kurmen quien asesoro este trabajo de grado.

Al grupo Bioprocesos y control por los recursos para realizar la parte experimental.

A los jurados por tomarse el tiempo de leer mi trabajo de grado