

SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO A NIVEL LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA *Spirulina (Arthrospira maxima)* Y CUANTIFICACION DE LOS NUTRACÉUTICOS.

*^aQuintero Rodríguez, E., ^bArredondo Vega, B.O., ^aFlores Tavizón E., ^bVirgen Félix, M., ^bBarrera Domínguez, E., ^bCarballo Verduzco, M. G. y ^aMaldonado Macías A. A.

^a Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Instituto de Ingeniería y Tecnología. Departamento de Ingeniería Ambiental. Avenida del Charro 610 Nte. Col. Partido Díaz. Ciudad Juárez, Chihuahua. México. *polyqro@gmail.com

^b Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. Carretera a San Juan de la Costa, El Comitán. La Paz, Baja California Sur, México.

RESUMEN:

Para el cultivo y obtención de biomasa de *Spirulina maxima* se han reportado varios medios de cultivo. El objetivo del trabajo fue seleccionar el medio de cultivo que generara mayor rendimiento de biomasa y concentración de nutraceuticos en *Spirulina maxima*. El trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la Paz Baja California Sur, México. La cepa de *Spirulina maxima* se cultivó durante 9 días por duplicado en condiciones contraladas de laboratorio en los medios Zarrouk y Schlösser. Se determinó la concentración celular diaria mediante lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro SPECTRONIC 20 GENOSYS. La biomasa de *Spirulina maxima* se cosechó por centrifugación en la centrifuga BECKMAN y se secó por sublimación en la liofilizadora LABCONCO para su posterior análisis. Al sexto día se obtuvo el mayor rendimiento de biomasa en el medio Schlösser (9.98mg/mL) que en el medio Zarrouk (6.78mg/L). La concentración de proteínas fue mayor en el medio Schlösser (74%) que en el medio Zarrouk (37%), así como la ficocianina y carotenos totales, seleccionando el medio Schlösser como el más adecuado para el cultivo a nivel laboratorio.

Palabras clave: *Spirulina maxima*, medio de cultivo, nutraceuticos.

ABSTRACT:

There are several culturing mediums in the literature for *Spirulina maxima* cyanobacteria reproduction. The aim of this study was to select the culture medium that increases reproduction and concentration of nutraceutical constituents of *Spirulina maxima*. Using a design of experiments for comparison of means by Duncan with a significance level of 5 % in the Center for Biological Research of the Northwest located in La Paz, Baja California Sur, México. One *Spirulina maxima* UTEX strain was inoculated into the culturing mediums Schlösser and Zarrouk with duplicate tests, watching her growth for 9 days. Concentration was measured daily using absorbance readings in the spectrophotometer SPECTRONIC 20 GENOSYS. *Spirulina maxima* biomass Centrifuge BECKMAN was concentrated and dried by sublimation in the lyophilizer LABCONCO for further analysis. The sixth day, the highest rate of reproduction of 6.78mg/mL in the medium Zarrouk and 9.9mg/mL was observed in the Schlösser medium. The protein concentration was 74% in the Schlösser medium vs 37% in the Zarrouk medium also concentrations of phycocyanin and carotenoids were higher in the Schlösser medium. Finally the Schlösser medium was selected as the most suitable culture medium for laboratory conditions.

Keys Words: *Spirulina maxima*, culturing medium, nutraceutical components.

Área: Nutrición y nutraceuticos

INTRODUCCIÓN

En la literatura (Andersen R.A., 2005) se exponen varios medios de cultivo para diversas microalgas. Los procedimientos de preparación, composición y proporción de nutrientes y condiciones ambientales varían resultando en ocasiones inconsistentes. El presente trabajo pretende elegir de entre los medios de cultivo Zarrouk (1996) y Schlösser (1982) el medio que genere mayor reproducción y concentración de los componentes nutraceuticos como; proteínas y los pigmentos carotenos y ficocianina de la cianobacteria *Spirulina maxima*. La *Spirulina maxima* es una de las 50 especies de microalgas que actualmente se explotan por sus propiedades nutritivas y farmacológicas que mejoran la calidad de vida humana y animal (Habib et al., 2008). La explotación de microalgas se origina en Alemania por la carencia de alimentos y como fuente de combustible durante la segunda guerra mundial en los años 40s (Albarracin, 2007).

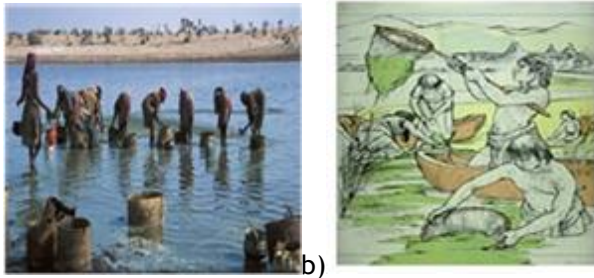


Figura 1.1 Cultivo de *Spirulina*. a) Lago Chad, África. b) Lago de Texcoco, México.
Fuente: a) N. Di Ruscio.com b) The diets of the aztecs.

1.1 *Spirulina maxima*

La *Spirulina maxima* fué descubierta en 1940 por el Ficólogo Francés P. Dangeard en el lago Chad del sur de África a la que llamaban “dihé”. En crónicas prehispánicas se narra que los aztecas la consumían y recogían un cieno verde del lago de Texcoco al que denominaban “tecuilatl” (excremento de piedra) (Ramírez y Olvera, 2006). En 1960 es redescubierta por el Biólogo Jean Leonard y el instituto Francés del petróleo investiga la *Spirulina maxima* determinando el contenido de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos insaturados, minerales y vitaminas.

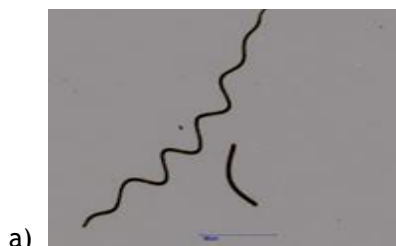


Figura 2.1 *Spirulina maxima*.
Mic. Electrónico (10x)

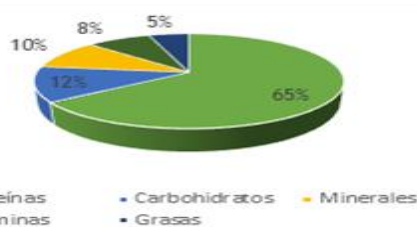


Figura 3.1 Componentes de *Spirulina maxima*.
Fuente: Spiral Spring. 2011.

Fuente:

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria azul-verde, fotosintética, autótrofa en forma de espiral (Fig.2.1) que mide entre 5 y 500 μm , del género *Arthrospira* y las

especies *Spirulina maxima* y *Spirulina platensis*. Se reproduce en estanques y lagos naturales y artificiales con elevada alcalinidad a temperaturas entre 15°C y 35°C, con un pH entre 8.5 y 11.5 (Habib et al., 2008). La *Spirulina maxima* es reconocida por la FDA en 1981 como alimento nutritivo (Gershwin, 2008), (Fig. 3.1). El consumo de *Spirulina maxima* favorece el control y tratamiento de alergias, hiperglucemia, hiperlipidemia y lesiones cardiovasculares (Deng and Chow, 2010), actúa como neuroprotector, antiviral, hepatoprotector y estimula el sistema inmunológico contra procesos degenerativos como el cáncer y el VIH. Por sus propiedades nutritivas y farmacológicas la *Spirulina maxima* es considerada un alimento nutracéutico (Cortés et al., 2005). Su inocuidad alimentaria se confirma en (Chamorro et al., 2002, 2008).

1.2 Componentes nutracéuticos de *Spirulina maxima*.

La capacidad nutracéutica de la *Spirulina maxima*, se debe al contenido de biomoléculas activas como proteínas (60-75 %), pigmentos antioxidantes como ficocianina y β -caroteno y vitaminas como la vitamina B₁₂ que contribuyen a mejorar la calidad de vida del ser humano. La *Spirulina* constituye la mejor fuente de vitamina B₁₂ (Habib et al 2008). El consumo de vitamina B₁₂ favorece la nutrición, digestión, respiración y circulación así como el control corporal de la temperatura y previene la anemia (Ramírez y Olvera, 2006). La ficocianina y el β -caroteno son pigmentos de la cianobacteria *Spirulina*. La ficocianina es una biliproteína localizada en los ficobilisomas de la *Spirulina* que junto a la ficoeritrina y aloficocianina, actúa como antioxidante, hepatoprotector, además estimula el sistema inmunológico y se utiliza como biomarcador (Oliveira et al., 2009). El β -caroteno es un pigmento liposoluble precursor de la vitamina A (provitamina "A"), es antioxidante, favorece el desarrollo ocular y previene enfermedades coronarias, la artritis y el cáncer, además tiene acción antiviral y hepatoprotectora (Ramírez y Olvera, 2006).

1.3 Cultivo de *Spirulina maxima*

La *Spirulina maxima* se cultiva desde 1960s. En los 70s se reactivó el cultivo de *Spirulina maxima* en el Lago de Texcoco en el sistema Caracol en el estado de México (Belay, 2008), procesándola hasta inicios de los 90s. En la actualidad, la *Spirulina maxima*, se cultiva en diversos países como Israel, USA, Holanda, Japón, Cuba, Chile, Ecuador, ya sea en cuerpos de aguas naturales o artificiales, en sistemas tipo estanques abiertos en condiciones ambientales los que utilizan paletas giratorias. El medio de cultivo además de los nutrientes es alcalino y con moderada salinidad. La *S. maxima* se ha cultivado a temperaturas desde 15°C hasta 40°C. Las nuevas tecnologías de cultivo utilizan fotobiorreactores para el control de factores contaminantes con mayor aprovechamiento de nutrientes (Belay, 2008).

En Preisig y Andersen (2005) se hace una revisión histórica desde Moore en 1903 de los métodos básicos para formular medios de cultivo, mencionando que el cultivo de microalgas se inicia a fines de 1800 y principios de 1900. Diferentes medios de cultivo se han desarrollado desde entonces, algunos medios se exponen en Andersen et al., (2005).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa de *Spirulina maxima* (UTEX LB2342) que se mantiene en el Cepario del Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en la Paz, Baja California Sur, México. Se eligieron los medios de cultivos Zarrouk (1996), (Sarada et al., 1999) y el medio Schlösser (1982) para el cultivo de *S. máxima* en condiciones de laboratorio.

Tabla I-2. Nutrientes de los medios de cultivo Zarrouk y Schlösser.

Medio (g/lit)	NaHCO ₃	K ₂ HPO ₄	NaNO ₃	NaCl	MgSO ₄ .7H ₂ O	FeSO ₄ .7H ₂ O	K ₂ SO ₄	CaCl ₂ .2H ₂ O	EDTA	PIV+Chu	Vit B12
Zarrouk *	16.8	0.5	2.5	1.0	0.2	0.01	1.0	0.04	0.08		
Schlösser **	13.61	0.5	2.5	1.0	0.20	4.03	1.0	0.04		6.0+1 (ml)	1 ml

La proporción de las sales utilizadas como nutrientes en los medios de cultivo Zarrouk y Schlösser se muestran en la Tabla I-2. Las soluciones PIV y Chu pueden consultarse en (Andersen, 2005), p: 444-445.

La cepa de *Spirulina maxima* se inoculó en los medios de cultivo en condiciones de laboratorio durante nueve días. Al final del período se determinó el contenido de proteínas, ficocianina y carotenos totales. Se aplicó el diseño de experimentos de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia del 5% y se realiza un análisis de rangos múltiples. El proceso se llevó a cabo con los pasos siguientes:

Paso 1. Se pesaron los nutrientes para cada medio de cultivo por duplicado (Tabla I-2).

Agregando 500 mL de agua destilada a un matraz de 2L y se fueron disolviendo las sales con agitación moderada en dos matraces por separado para evitar insolubilidad de sales. En el medio Schlösser se agrega solución PIV a un matraz y solución Chu al segundo matraz.

Paso 2. Las dos soluciones se esterilizaron en autoclave por 20 min a una presión de 15 lb/in² para evitar el desarrollo de microorganismos contaminantes.

Paso 3. Las soluciones esterilizadas se llevan a la campana de flujo laminar someténdolas durante 10 min a luz ultravioleta. Para el medio Schlösser la vitamina B12 se agrega a uno de los matraces después de esterilizar con luz ultravioleta.

Paso 4. Las soluciones se combinan en un solo matraz de 5L y se agregan 200 mL de inóculo de la cepa de *S. maxima*.

Paso 5. A cada matraz con el cultivo se le coloca aireación continua moderada, fotoperiodo luz: oscuridad 12:12 h, intensidad luminosa de 3500 flux con lámparas Philips tubulares de 2m, pH 9.8. El cultivo se mantuvo durante 9 días.

Paso 6. Se toman lecturas de absorbancia diariamente en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20 GENYSIS, a las siguientes absorbancias: 480, 510 y 667 nm.

Paso 7. La biomasa de *S. maxima* se cosecha por centrifugación en una centrífuga refrigerada (Beckman GPS) a 2500 rpm/15 min/10°C,

Paso 8. La biomasa de *S. maxima* se liofiliza en la liofilizadora LABCONCO durante 2 a 4 días.

Paso 9. Se determina la concentración de proteínas y los pigmentos carotenos y ficocianina de acuerdo a los protocolos especificados en el Manual de Métodos y Herramientas Analíticas (Arredondo Vega y Voltolina, 2007).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de *S. maxima* duró 9 días, sin embargo al sexto día para ambos medios de cultivo, se obtuvo el siguiente rendimiento: en el medio Schlösser de 9.98 mg/mL y en el medio Zarrouk de 6.78 mg/mL. El contenido de proteínas fue de 74% en el medio Schlösser mientras que en el medio Zarrouk 37%. La concentración de los pigmentos carotenos totales y ficocianina fueron mayores en el medio de cultivo Schlösser.

Tabla I-3. Concentración promedio de *Spirulina maxima* en cada medio de cultivo.

Medio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zarrouk (g/ml)	0.001	0.0011	0.00149	0.00167	0.00177	0.00678	0.00497	0.0045	0.00429
Schlösser (g/ml)	0.0015	0.00157	0.00173	0.00182	0.00421	0.00998	0.00673	0.0061	0.0057

La tabla I-3, muestra el promedio de las concentraciones de *Spirulina maxima*.

Tabla II-3 Composición de nutrientes en el medio Schlösser.

Medio	Proteínas %	Carbohidratos %	Lípidos %	Cenizas %
Schlösser	74	9	11	6

La composición de nutrientes, se muestra solo para el medio Schlösser en la tabla II-3.

Tabla III-3 Contenido de pigmentos en la biomasa de *S. maxima*.

Carotenos	0.32 %
Ficocianina	28 mg/mL

La Tabla III-3 expone los pigmentos carotenos y ficocianina de *S. maxima* en medio Schlösser.

CONCLUSIONES

En el medio Schlösser se obtuvo mayor rendimiento de biomasa de *Spirulina maxima* con mayor contenido de proteínas y de los pigmentos carotenos totales y ficocianina, comprobándose la importancia que la selección del medio de cultivo, a nivel de laboratorio, tiene en la capacidad nutracéutica de la *Spirulina maxima*.

Agradecimientos

Laboratorio de Microalgas del CIBNOR. A los proyecto de investigación de la Dra. Arredondo Vega, claves AC0.2 y 935-0: “Productos de alto valor agregado de microalgas y cianobacterias” a las estudiantes de licenciatura Elena Barrera y Mitzu Carballo por el apoyo y compartir los resultados generados de su servicio social.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Albarracin Isabel. 2007. Microalgas potenciales productoras de biodiesel. En: La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Simposio Electrónico Internacional XV, Argentina: pp. 1-16.
2. Andersen R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press: China, pp. 1-326.
3. Arredondo Vega, BO, Voltolina D. 2007. Manual de Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. CIBNOR. La Paz B. C. Sur. México. pp. 31-68
4. Belay Amha. 2008. Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Assurance. In: Spirulina in Human Nutrition and Health Gershwin ME and Belay A (eds).CRC-Press: USA, pp. 2-23.
5. Chamorro CG, Barrón BL, Vázquez SJ. 2008. Toxicologic Studies and Antitoxic Properties of Spirulina. In: Spirulina in Human Nutrition and Health Gershwin ME and Belay A (Eds).CRC-Press: USA, pp. 27-44.
6. Chamorro G, Salazar M, Araujo KG, Dos Santos CP, Ceballos G, Castillo LF. 2002. Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52:232-240.
7. Cortés M, Chiralt A, Puente L. 2005. Alimentos Funcionales: Una Historia Con Mucho Presente y Futuro. Vitae vol.12 no.1:5-14.
8. Deng R, Chow TJ. 2010. Hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. Cardiovascular Therapeutics, 28:e33–e45.
9. Desmorieux H, Decaen N. 2005. Convective Drying of Spirulina. In Thin layer. Journal of Food Engineering 66 (4):497-503.
10. Gershwin ME, Belay A. 2008. Spirulina in Human Nutrition and Health. CRC Press: USA, pp. 1-34.
11. Habib M, Parvin M, Huntington T, Hasan M. 2008. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals ad fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No.1034. Rome, pp 1-22.
12. Oliveira G, Duarte H, Moraes K, Crexi T, Pinto A. 2010. Optimization of Spirulina platensis convective drying: evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. International Journal of Food Science and Technology 45:1572–1578.
13. Preisig H.N. and Andersen R.A. 2005. Historical Review of Algal Culturing Techniques. In: Algal Culturing Techniques, Andersen R.A. (ed). Elsevier Academic Press. China, pp.1-12.
14. Ramírez ML, Olvera RR. 2006. Uso tradicional y actual de Spirulina sp. (Arthrospira sp). Interciencia Vol.31 No 9:657-663.
15. Sarada R, Pillai Manoj G, Ravishankar GA. 1999. Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry 34:795-801.