

EFFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE NITRÓGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Espinaco Brenda Yanina.

Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos. FBCB

Área: Ciencias Biológicas.

Sub-Área: Biotecnología.

Grupo: X

Palabras claves: Microalgas, Astaxantina, Estrés celular.

INTRODUCCIÓN

El uso de microalgas ha crecido de manera importante en el último tiempo a causa de las diversas aplicaciones que estos organismos poseen, dentro de las cuales se destaca su uso en la industria alimentaria y farmacológica (Chu, 2012). Dicho interés se vincula con su capacidad de sintetizar compuestos tales como lípidos, pigmentos, polisacáridos y vitaminas (García Cubero, 2014). Dentro de los metabolitos de interés comercial aparece la astaxantina, pigmento que ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a su alto poder antioxidante. *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) es una especie de microalgas que ha sido reportada como uno de los principales productores naturales de dicho compuesto (Zhao y col., 2015). *H. pluvialis* presenta diferentes estadios celulares, determinados por las condiciones del ambiente en el que se encuentra. En estudios realizados por diferentes investigadores, se observa que cuando *H. pluvialis* es sometida a diferentes condiciones de estrés, se induce la formación de cistos en simultáneo con la síntesis de astaxantina (Kurmen y col., 2013). El cultivo de *H. pluvialis* presenta una serie de aspectos biológicos importantes que deben ser estudiados en detalle, a fin de lograr un proceso de producción de astaxantina sustentable, entre los que se destacan una velocidad crecimiento lento y un ciclo celular complejo.

El presente trabajo propone evaluar la influencia de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, sobre el crecimiento de la microalga y sobre la síntesis y acumulación de astaxantina bajo condiciones de estrés por luz.

METODOLOGÍA

Objetivos:

Objetivo general: Estudiar el proceso de producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*.

Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de la concentración inicial de nitrógeno sobre la etapa de crecimiento vegetativo de *H. pluvialis*.
- Evaluar el efecto de la concentración inicial de nitrógeno sobre la etapa de producción de astaxantina por *H. pluvialis*.

Materiales y métodos:

Proyecto: Beca de Iniciación a la Investigación Científica “Estudio de las condiciones de crecimiento de cultivos de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina”

Directores: Dr. Ignacio Niizawa, Dr. Guillermo Sihufe.

- **Medio de cultivo:** Se utilizó el medio de cultivo BBM modificado (Bolds' Basal Medium) sin vitaminas (Starr y Zeikus, 1993).
- **Microorganismo en estudio:** Se utilizó la cepa *Haematococcus pluvialis* FAUBA 57 obtenida de la Facultad de Agronomía – UBA.
- **Determinación de la biomasa microalgal:** Se estimó en base a la determinación de los sólidos suspendidos totales de una muestra del reactor. Para ello se tomó un volumen de muestra de 10 ml, el cual se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y se llevó a estufa a 80°C el tubo con el pellet hasta peso seco.
- **Determinación del contenido de nitrato de sodio:** La determinación del contenido de nitrato de sodio se realiza mediante espectrofotometría UV, midiendo la absorbancia del medio de cultivo sin microalgas a 220 nm (Collos y col., 1999).
- **Determinación del contenido de astaxantina:** Se realiza mediante espectrofotometría derivativa de primer orden. Se utilizó la metodología propuesta por Liu y col. (2011).
- **Diseño experimental:** Se realizaron 3 cultivos de *H. pluvialis*, cada uno con una concentración diferente de nitrato de sodio, conteniendo los cultivos 2N y 3N el doble y triple de la concentración de nitrato de sodio, respectivamente, que los cultivos con la concentración del medio BBM original (1N). En una primera etapa, los cultivos se mantuvieron agitados a baja velocidad con buzos magnéticos, aireados mediante el uso de bombas de pecera, filtrando el aire con filtros de nylon de 0,40 micras y en condiciones de baja intensidad de luz ($70 \mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Una vez consumida la fuente de nitrógeno de los cultivos con menor concentración inicial, se procedió a iniciar el estrés a todos cultivos trasladándolos a una cámara de crecimiento con alta intensidad de luz ($110 \mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El resto de las condiciones se mantuvieron constantes. Se realizaron tomas de muestra cada 48 horas, efectuándose mediciones de biomasa, astaxantina y de la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

RESULTADOS

Influencia de la concentración de nitrato en el medio sobre el crecimiento celular.

En la **Figura 1** puede observarse la producción de biomasa y el consumo de nitrógeno en el tiempo para los cultivos 1N, 2N y 3N. Al analizar el efecto de diferentes concentraciones de nitrato de sodio en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular, puede observarse que dicho crecimiento resultó similar para las diferentes concentraciones de nitrato de sodio estudiadas. Este resultado coincide con lo reportado por Orosa (2005), en el cual se evaluó el crecimiento celular en relación a diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno en el medio, encontrándose resultados similares para las diferentes concentraciones de nitrógeno utilizadas. A su vez, durante la etapa de crecimiento, la diferencia en la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, no generó diferencias en la velocidad de consumo del mismo, es decir que un mayor contenido de nitrato de sodio en el medio no generó una mayor utilización del mismo por parte de las células.

A partir de iniciado el estrés por luz (día 9) la velocidad en el consumo de nitrato disminuye tanto para el cultivo 2N como 3N, a la vez que la velocidad de producción de biomasa disminuye en todos los cultivos. Esto se debe posiblemente a una inhibición de la división celular como consecuencia del estrés celular producido.

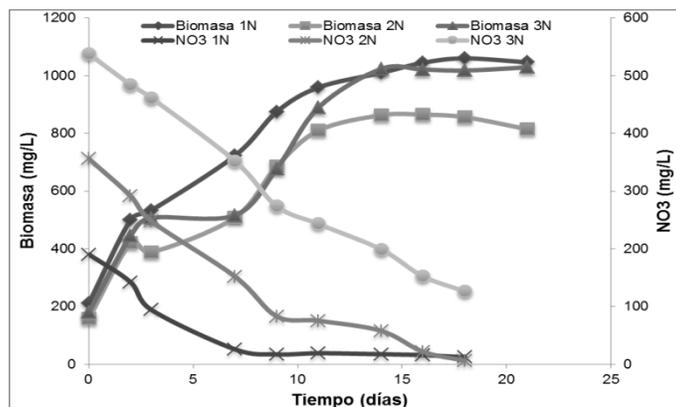


Figura 1: Producción de biomasa y consumo de nitrato en el tiempo para los cultivos 1N, 2N y 3N.

Influencia de la concentración de nitrato de sodio en el medio de cultivo sobre la producción de astaxantina durante un estrés inducido por alta intensidad de luz.

A partir del inicio del estrés por luz en los distintos cultivos, el contenido de astaxantina intracelular comienza a incrementarse. Es posible observar que los cultivos que son sometidos a condiciones de estrés por luz sin nitrato de sodio presente en el medio en dicho momento, comienzan a sintetizar el pigmento en forma más rápida, a la vez que acumulan un porcentaje mayor del mismo, alcanzando valores de aproximadamente 2% a los 10 días. Por su parte, en los cultivos que contienen nitrato de sodio en el medio al comenzar dicha etapa, la producción de astaxantina resulta más lenta, acumulando porcentajes menores (Figura 2).

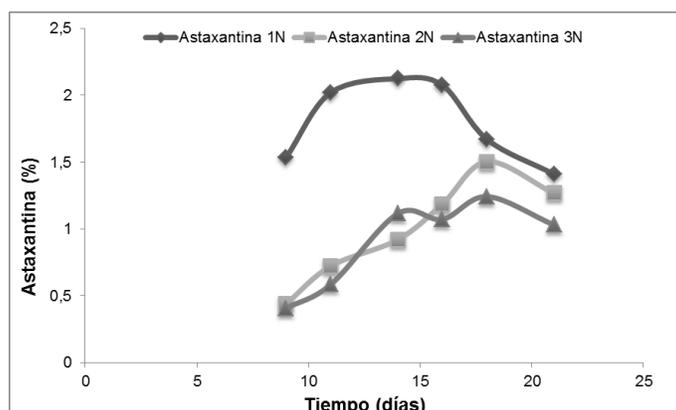


Figura 2: Producción de astaxantina en el tiempo para los cultivos 1N, 2N y 3N.

La mayor acumulación de astaxantina en aquellos cultivos sometidos a estrés por luz bajo condiciones de limitación de nitrógeno, puede deberse posiblemente a una mayor sensibilidad por parte de las células al exceso de luz al carecer de nitrógeno en el medio. Scibilia y col. (2015), analizaron en su trabajo el efecto de altas intensidades de luz y limitación de nitrógeno sobre las propiedades fotosintéticas de las células de *H. pluvialis*. Los resultados obtenidos en dicho trabajo sugieren que la limitación de nitrógeno conduce a modificaciones en las membranas fotosintéticas, y alteran el funcionamiento de los

sistemas implicados en la fotosíntesis. La molécula de astaxantina actúa protegiendo a las células frente al daño oxidativo generado ante condiciones adversas como altas intensidades de luz (Han, 2013). De esta forma, bajo carencia de nitrógeno las células presentarían una mayor susceptibilidad frente a la fotoinhibición causada por un exceso de luz, lo cual conduciría a una mayor síntesis de astaxantina.

CONCLUSIONES

La velocidad de consumo de nitrato de sodio durante la primera fase del ensayo fue similar para todos los cultivos, por lo que se puede concluir que un mayor contenido de este nutriente en el medio no genera un mayor consumo de nitrógeno o una mayor producción de biomasa en los mismos. Por su parte, la presencia de nitrato de sodio en el medio durante la inducción del estrés por luz no favorece el estrés celular, lo cual influye finalmente en la síntesis de astaxantina, reportándose mayores concentraciones del pigmento en los cultivos que son estresados por luz y no poseen nitrato de sodio en el medio.

Los resultados alcanzados son muy interesantes en función de obtener información acerca de las variables que más influyen en el crecimiento de *H. pluvialis* y en la posterior producción del pigmento astaxantina.

BIBLIOGRAFÍA

- **Chu W.**, 2012. Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*, 6(1), S24-S37.
- **Collos Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.**, 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 11(2), 179-184.
- **García Cubero R.**, 2014. Producción de biomasa de microalgas rica en hidratos de carbono acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla. España. 196p.
- **Han D., Li Y., Hu Q.**, 2013. Biology and Comercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Oxford, Blackwell Publ., pp. 388-405.
- **Kurmen C., Elena J., González G., Klotz B.**, 2013. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 94-104.
- **Liu X., Wu Y., Zhao L., Xiao S., Zhou A., Liu X.**, 2011. Determination of astaxanthin in *haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1752-1757.
- **Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J.**, 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), 373-378.
- **Scibilia L., Girolomoni L., Berteotti S., Alboresi A., Ballottari M.**, 2015. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170-181.
- **Starr R., Zeikus J.**, 1993. UTEX—the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin 1993 List of Cultures 1. *Journal of phycology*, 29(s2), 1-106
- **Zhao Y., Shang M., Xu J., Zhao P., Li T., Yu X.**, 2015. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry*, 50(12), 2072-2077.