

PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS Y EVALUACIÓN DE POSIBLES APLICACIONES

Ibañez, Manuel^{AB}

^AGrupo de Innovación en Ingeniería de Bioprocesos – GiiB - CONICET
^BFacultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: Microalga, Pigmento, Bioreactor.

Trabajo realizado en el Marco de las Becas de Innovación Tecnológica de la
Fundación del Nuevo Banco Santa Fe.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las microalgas han sido estudiadas como fuente de Metabolitos de alto valor agregado para la salud de humanos y animales (1,2) como nutracéuticos. Además, tienen aplicaciones comerciales en alimentos funcionales, drogas, cosméticos de uso terapéutico, y otros. Los principales metabolitos reportados y las especies que los producen son: β -caroteno de *Dunaliella salina*; Astaxantina de *Haematococcus pluvialis*; alginatos de *Sargassum sinicola*; Fucoxantina de *Undaria pinnatifida*; ácidos grasos insaturados y triglicéridos de *Chlorella vulgaris*; Luteína de *Scenedesmus quadricauda*(3); Alto contenido en producción de proteínas a partir de tratamiento de efluentes orgánicos por parte de *Golenkinia radiata*(4), entre otros.

Estos metabolitos están vinculados a una alta tasa de comercialización en el mercado. Se espera que el mercado de productos de pigmentos aumentará un 6% anualmente hasta llegar a US\$ 19,5 mil millones en 2019(5) y se espera que el mercado de los ácidos grasos omega-3 logre alcanzar US \$ 7.320 millones en 2020(6).

Como medio para asegurar el suministro de estos metabolitos, las microalgas representan una opción sostenible ya que las mismas no compiten por el uso de tierras agrícolas. Pueden crecer fácilmente usando el agua que no es apta para el consumo humano y también reducen los niveles de dióxido de carbono producidos por las actividades humanas dado su metabolismo autotrófico (7). Sin embargo, un obstáculo para producir metabolitos de algas es el costo económico y ambiental asociado con sus procesos convencionales de extracción y purificación. Estas técnicas generan muchos residuos peligrosos, altas temperaturas y son muy demandantes de tiempo y energía, que contribuyen a la degradación de los metabolitos.

En cuanto a la obtención y reducción de los niveles de CO₂ (g) en el medioambiente, existen muchos métodos empleados para la captura de dióxido de carbono desde emisiones gaseosas complejas: absorciones físicas, absorciones químicas, separaciones criogénicas en membranas y adsorción. Dentro de los métodos de elección, uno de los más empleados y estudiados es el uso de aminas orgánicas en solución acuosa capaces de formar complejos estables con el mencionado gas de efecto invernadero y retenerlo en grandes cantidades para su posterior disposición (9). En seres autótrofos se han desarrollado mecanismos evolutivos que permiten hablar de biosecuestro de dióxido de carbono para optimizar el acceso a los sustratos correspondientes de Rubisco, la enzima principal encargada de realizar la fotosíntesis a través del rol de la enzima Anhidrasa Carbónica (10).

Las microalgas crecen 100 veces más rápido que las plantas terrestres, teniendo una eficiencia de conversión de energía solar en energía química de 10 a 50 veces mayor (11). Las mismas

Proyecto: "Producción de microalgas como materia prima para biorefinería: astaxantina y betacarotenos, bioenergía, alimentación" Proyecto de Investigación Plurianual (PIP). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (2017, CONICET).

Director del proyecto: Prof. Horacio A. Irazoqui. PhD.

Director del becario/tesista: Prof. Miguel J. Heinrich. PhD.

contienen en su estructura cerca de un 50% de carbono, por lo que la producción de una tonelada de biomasa necesitaría un total de 1.83 toneladas de CO₂ (12). Si bien diversos autores señalan que el factor determinante para el crecimiento de microalgas en un medio de cultivo adecuado, es la luz (7), ciertamente no puede ser ignorada la gran cantidad de carbono disuelto que demandan estos microorganismos para su desarrollo óptimo.

El concepto de biorrefinería implica el encadenamiento de distintas etapas productivas al que concurren tecnologías y conocimientos muy diversos. En rasgos generales, estas etapas son: a) la producción de insumos provenientes de la biomasa (masa celular de microorganismos competentes que puedan ser capaces de producir sustancias químicas a partir de reacciones biológicas que ocurren en un medio de crecimiento adecuado); b) la producción de productos intermediarios a través de procesos integrados de tipo fisicoquímico y biológico; c) la producción de bio-productos (nuevos o tradicionales) basados en la conversión de los productos intermediarios.

Por todo lo antes mencionado, es que como grupo de investigación perteneciente al Área de Ingeniería de las Reacciones y Reactores del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL-CONICET), proponemos el diseño, la construcción, puesta en marcha y optimización de un Foto-bioreactor automatizado de 30L de capacidad, montado en las instalaciones de la planta piloto de INTEC "Ing. Carlos A. Ravera" (PTLC - CCT - CONICET). Este nuevo reactor es una prueba de concepto de un reactor escalable para producción, y se prevé que la ejecución de la construcción produzca no solo un aporte de conocimientos científico-tecnológicos, sino que brinde la posibilidad de instaurar el mercado de producción y comercialización de Bioproductos a nivel regional y local.

METODOLOGÍA

Cepa y medio de cultivo

Se seleccionó una cepa aislada en Buenos Aires, Argentina, para evaluar la viabilidad de un proceso de producción de astaxantina en una región cercana, evitando así posibles incompatibilidades de cepas adaptadas a diferentes condiciones climáticas. De esta manera, la cepa *H. pluvialis* FAUBA 57 fue adquirida de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

El medio de cultivo empleado en este estudio fue el una versión modificada del medio BBM (9), Los inóculos en estadio vegetativo fueron cultivados en seis matraces Erlenmeyers de 1 L conteniendo 200 ml de medio BBM modificado en cámara de cultivo bajo 70 μmol de fotones/m².s⁻¹ a temperatura ambiente (entre 24-28 ° C), sin agitación, aireación y control de pH. Después de 3 semanas, las células (ahora en fase de aplanospora) se centrifugaron a baja velocidad y se usaron para inocular el FBR.

Determinación de la biomasa

La concentración de biomasa de algas se siguió durante el desarrollo del crecimiento midiendo la cantidad de sólidos suspendidos totales; Se centrifugaron 20 ml de la muestra a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el sedimento se lavó una vez con agua destilada y se secó a 80°C durante 12 horas.

Cuantificación de nitrato

La concentración de nitrato (NO₃) remanente en el medio se determinó mediante espectrofotometría UV, midiendo la absorbancia del sobrenadante del cultivo a 220 nm (10).

Condiciones de Cultivo

EL FBR empleado fue un bio-reactor comercial INFORS-HT automatizado modelo "Labfors 3"

de 3.0 L de volumen útil.

Ensayos anteriores de éste mismo grupo efectuados en Erlenmeyers bajo iluminación continua mostraron resultados prometedores en cuanto a la capacidad de la microalga de propagarse en mayores escalas.

En primera instancia se calculó la radiación por unidad de volumen que alcanza a un FBR cerrado de 30 L sometido a iluminación solar para cada hora y día de un año típico. Para ello se utilizó un modelo de intercambio de energía radiante (11,12) y datos de radiación solar para la ciudad de Santa Fe. Se adoptó que la luz solar tiene una composición (75% luz directa-25% luz difusa).

Con el objetivo de alcanzar esos niveles de radiación en el reactor INFORS se diseñó un módulo de iluminación octogonal, que consiste en un diseño de 8 placas de aluminio que en su interior se encuentran revestidas por LEDs de perfil de emisión Blanco Frío. El módulo se encuentra conectado a un controlador programable que permite configurar variaciones en la cantidad de luz a diferentes tiempos (Ver anexo de Scalling up y construcción de la lámpara).

El FBR INFORS-HT fue operado a 25°C, con un flujo de 1L/min de aire filtrado, sin control de pH y pO₂, en condiciones no axénicas. Se consideró prefijar un valor de agitación mecánica correspondiente a 50 rpm, para igualar los coeficientes volumétricos de transferencia de gases medidos tanto en los matraces erlenmeyers previamente como en el mismo reactor INFORS HT (datos no incluidos). La elección de estas condiciones de operación se debe a que se deseaba conocer la evolución natural del cultivo. Se realizó la propuesta de evaluar dos perfiles de iluminación. El primero consiste en iluminación simulando el perfil de un día típico de verano (datos no mostrados); involucra el ciclo de luz-oscuridad natural. El restante es luz continua correspondiente al valor de la mitad del máximo alcanzado en el día típico.

Para realizar el muestreo, se tomaron alícuotas de 60 mL del reactor a intervalos de 48 hs con reposición de nuevo medio BBM modificado pero sin NaNO₃, ajustando la fuerza iónica del mismo con NaCl en su lugar. Todos los ensayos fueron desarrollados hasta la desaparición total de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. La composición de la biomasa en términos de las formas celulares fue realizada por conteo en cámara de Neubauer.

RESULTADOS

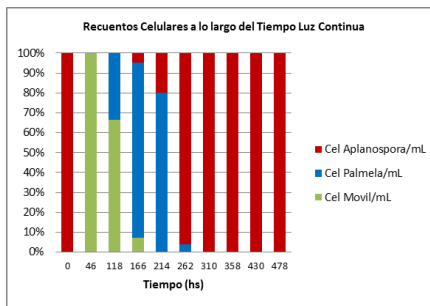
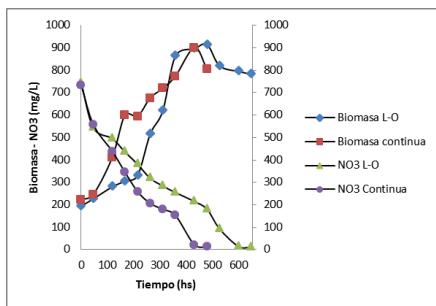
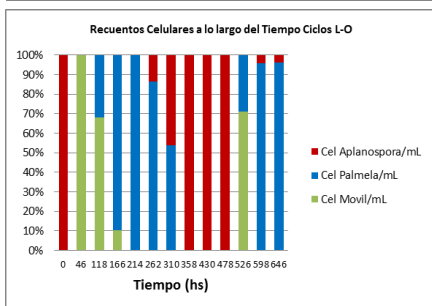


FIGURA 3.

(Arriba-izquierda) Progresión en el tiempo del



desarrollo de Biomasa y fuente de Nitrógeno para cada condición ensayada, Luz Continua o Ciclos de Luz – Oscuridad. (Arriba-Derecha/Abajo-izquierda). Recuentos celulares de cada estadio celular en el tiempo para cada una de las condiciones ensayadas.

En la figura 3 puede observarse el comportamiento diferencial de cada cultivo frente a las condiciones de iluminación. Cabe aclarar que en el cambio inicial desde la forma de aplanospora a vegetativa no se observan diferencias en cuanto a las condiciones planteadas, lo que permite inferir que dicho fenómeno no dependería en principio de las condiciones de iluminación. Luego de producirse el switch a la etapa vegetativa, se observa que dicho

estadio posee una duración en tiempo mayor en las condiciones de fotoperiodo respecto a la condición de iluminación continua. Los valores de velocidad de crecimiento de biomasa (r_x) resultaron ser 0,518 mg X/L.h y 0,641 mg X/L.h respectivamente. En dicho lapso, la aparición de células palmella se hizo más evidente, notándose tanto en los recuentos como en las observaciones macroscópicas de la pigmentación del cultivo, que lentamente fue tornándose cada vez más rojizo. El comienzo del estrés se encuentra marcado por un aumento de la velocidad de crecimiento r_x adquiriendo valores de 1,5 mg X/L.h para el cultivo iluminado de manera continua y 0,805 mg X/L.h para el cultivo iluminado mediante ciclos L-O. Finalmente tras dicho crecimiento abrupto, en el caso de las condiciones de iluminación continua, el cultivo prosiguió aumentando su biomasa con un nuevo valor r_x de 2,03 mg X/L.h, en donde ya todas las células correspondían a aplanosporas. En el caso del cultivo en condiciones de fotoperiodo, la velocidad de crecimiento se estabilizó en un valor de 0,693 mg X/L.h en estadio de aplanospora. Si se observa en la figura 4, la condición de estrés trae aparejada una disminución en la velocidad de consumo de Nitrógeno en forma de NO_3 para cada una de las condiciones de manera similar, en contraste con la etapa vegetativa, donde el consumo de la fuente de nitrógeno es más pronunciado producto de la necesidad de sintetizar clorofila de manera activa. A las 120 horas de transcurrido dicho evento, el pH en el medio de cultivo correspondiente a la condición de fotoperiodo comenzó a descender hasta oscilar entre valores 8,6-9,6, y dicho descenso trajo aparejado la aparición de nuevas células Palmella y Vegetativas desde el estadio Aplanospora. En otras palabras, hacia el final de la experiencia y ya acabándose el nitrógeno del medio, la cepa volvió a reactivarse y durante las siguientes 270 hs no hubo signos retornar al estrés, de forma coincidente con la desaparición de iones NO_3 . El valor máximo de concentración de biomasa desarrollado por cada condición es de 902 mg X/L para la condición de luz continua y 915 mg X/L para la condición de fotoperiodo.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró plantear la premisa de cultivar una cepa de *H. pluvialis* aislada de la provincia de Buenos Aires, Argentina bajo diferentes condiciones de iluminación en un reactor FBR INFORS simulando condiciones a las que podría estar sometido un reactor de mayor volumen iluminando el mismo con luz solar.

REFERENCIAS

- Mata TM, Martins AA and Caetano NS, Microalgae for biodiesel production and other
Heinrich, J. M., Niizawa, I., Botta, F. A., Trombert, A. R., & Irazoqui, H. A. (2012). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production I: Method and parameters for radiation field simulation. *Photochemistry and Photobiology*, 88, 938–951.
- Heinrich, J. M., Niizawa, I., Botta, F. A., Trombert, A. R., & Irazoqui, H. A. (2012). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production II: Experimental Validation of a radiation field simulator based on a Monte Carlo algorithm. *Photochemistry and Photobiology*, 88(12), 952–960.