

“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE CULTIVO DE MICROALGAS HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS”.

Rodrigo Leonardi, Ignacio Niizawa, Horacio Irazoqui.
Grupo de Ingeniería e Innovación en Bioprocesos (GIIB)
Operaciones y Procesos Biotecnológicos (UNL, FCB)
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (Intec)
Ciencias Biológicas-Biotecnología

INTRODUCCIÓN

La Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) es un oxi-carotenoide que pertenece al grupo de las xantofilas. En la actualidad es considerada un metabolito de alto valor agregado utilizado para la coloración-pigmentación de truchas y salmónidos, agente estimulante inmunológico, antioxidante, etc. Su producción puede ser de origen biológico (algas, levaduras, crustáceos) o por síntesis química.

Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) es considerada como la mejor fuente natural de Astaxantina, acumulando hasta el 4% de su peso seco (Boussiba, 2000) como pigmento.

H.pluvialis posee un ciclo celular complejo con distintas formas celulares dependiendo de los factores del cultivo (Elliot, 1934). Se distinguen claramente tres formas, una forma verde flagelada ovalada (célula vegetativa), una forma esférica sin flagelos y verde que se (palmella), y otra forma esférica sin flagelos y roja (aplanospora) (Santos, 1984). La acumulación del pigmento ocurre durante la transformación desde el estado vegetativo (fase verde) a aplanospora (fase roja). Los factores que inducen la acumulación de Astaxantina son temperatura, intensidad lumínica, concentración de nutrientes, pH, especies reactivas de oxígeno, etc (Judith Elena Camacho Kurmen, 2013).

OBJETIVOS

1. Seleccionar y poner a punto una técnica de cuantificación de rutina del contenido de Astaxantina de *H.pluvialis* a través de una medición espectrofotométrica (Espectrofotometría derivativa de primer orden).
2. Poner a punto una técnica de referencia para la cuantificación del contenido de Astaxantina de *H.pluvialis* por RP-HPLC.
3. Comprobar la producción de Astaxantina por *H.pluvialis* y caracterizar sus estadios de crecimiento (fase vegetativa verde, fase palmella verde, fase aplanospora roja y estados intermedios entre ellos).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Cepa: *H.pluvialis* FAUBA 57, adquirida del cepario de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Medio de cultivo: BBM modificado sin vitaminas. Se adaptó *H.pluvialis* a crecer sin la presencia de vitaminas, mediante repiques periódicos en medio BBM modificado.

Medición de Astaxantina por espectrofotometría derivativa de 1° orden

Procesamiento de la biomasa de *H.pluvialis*: etapas de la metodología propuesta

1) Muestra: rango de 2 a 12 µg/ml de Astaxantina en el volumen final del extracto a medir. El contenido medio de Astaxantina en *H.pluvialis* es 2-4% peso seco.

2) Disrupción de clorofilas: eliminación de pigmentos que pueden dar interferencia. Se utiliza una solución de NaOH al 5% en metanol al 30% y esferas de vidrio, se agita en vortex y se elimina el sobrenadante (guarda el pellet, donde queda la Astaxantina).

3) Extracción: acetato etilo-etanol fue elegido como solvente de extracción (Liu X.J, 2011). Se extrae hasta que el pellet pierda significativamente el color rojizo.

4) Hidrólisis de los ésteres de Astaxantina: obtención de Astaxantina libre. Se utiliza NaOH 1M en metanol (40°C, 50 min). Luego se neutraliza el extracto con HCl 1M.

5) Determinación del perfil de absorción del extracto: barrido espectral 400 a 700 nm. A partir del espectro de orden cero se obtiene la derivada primera del espectro (1°orden).

6) Determinación del contenido de Astaxantina en la muestra de microalgas: se toma el valor de $dA/d\lambda$ a 432 +/- 1 nm (promedio). Se calcula la concentración de Astaxantina en el extracto a partir de la siguiente expresión (ver más adelante la obtención de los parámetros de la ecuación a través de la realización de la curva de calibrado):

$$C_{ast} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = \frac{\left(\frac{dA}{d\lambda}_{prom} + 9.02E^{-4} \right)}{2.19E^{-3}} \quad (1)$$

El porcentaje (%) de Astaxantina en la biomasa inicial de *H.pluvialis* se calcula a partir de:

$$C_{ast} [\%] = 100 * \frac{\left(C_{ast} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] V_{extracto} [ml] \right)}{biom_{Haem} [\mu g]} \quad (2)$$

Curva de calibrado de Astaxantina para espectrofotometría derivativa 1°orden

Se preparó una solución madre de Astaxantina a partir del estándar DRE-CA10307000 (100 mg). El patrón fue realizado utilizando una solución de acetato de etilo/etanol (1:1) como solvente (112 µg/ml). Se generaron una serie de diluciones para obtener una curva de calibrado.

Medición de Astaxantina por RP-HPLC-Curva de calibración por RP-HPLC

La obtención de la curva de calibrado para la cuantificación de Astaxantina por RP-HPLC, fue realizada utilizando las mismas diluciones del patrón de Astaxantina. Ensayo por duplicado. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Fase móvil: metanol/acetonitrilo/agua 85:10:5
- Temperatura de columna: 40°C
- Volumen de inyección: 100 µL
- Columna: VARIAN Microsorb MV 300-5 C18 - 250x4,6mmx1/4"
- Detector: Waters 2487 de absorbancia
- Longitud de onda de lectura: 480 nm.

Caracterización del ciclo de vida de *H.pluvialis*

Determinación de clorofilas totales (Chl): extracción con etanol 99,5, disrupción celular con volitas de vidrio y medición espectrofotométrica a 649 nm y 665 nm (Ritchie 2008).

Determinación de proteínas (Prot): Bradford modificado (Bradford, 1976) (Coomasie Blue G-250, buffer de lisis (Cynthia Victoria González López, 2010), disrupción celular). La técnica se puso a punto con biomasa de *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*; y se utilizó en *H.pluvialis*. Se basó en una determinación "Kjeldahl", y un factor de 5,9 (gr Prot/gr Nitrógeno) para corroborar los resultados (validación).

Determinación de Astaxantina: método espectrofotométrico derivativo de primer orden.

RESULTADOS

Cuantificación de Astaxantina por Espectrofotometría derivativa de 1° orden

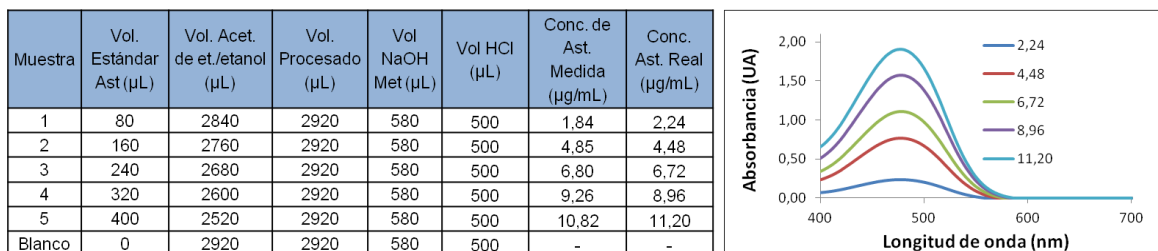


Figura (1). a) Estándares de Astaxantina preparados para la obtención de una curva de calibrado. b) Espectro de orden cero de los estándares de Astaxantina.

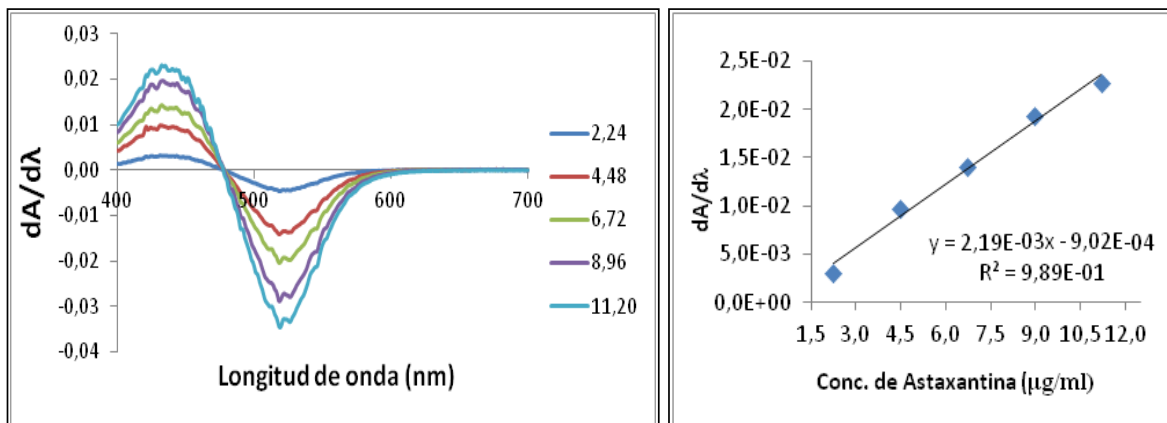


Figura (2). a) Derivada del espectro de orden cero de los estándares de Astaxantina. b) Regresión lineal efectuada entre el valor de $dA/d\lambda$ entre 431-433 y la concentración de los estándares.

Es posible observar en la Figura (2a) que existe un máximo de respuesta en la región de 525 nm; sin embargo, de acuerdo a lo reportado en esta región del espectro la derivada del espectro de absorción de las clorofilas también presenta un máximo, por lo que para evitar posibles interferencias se trabaja en la región de los 432 nm.

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNL
14 y 15 de Octubre de 2015, SANTA FE.

De esta manera, se grafica el valor promedio de dA/dλ entre 431-433 nm en función de la concentración de Astaxantina de las diluciones preparadas a partir de la solución madre del patrón (Figura (2b)).

Cuantificación de Astaxantina por RP-HPLC

Se puede observar de la Figura (3ª) Alrededor de los 5 y de los 6 minutos, aparecen dos picos cuya intensidad responde directamente a la concentración de patrón. Es posible observar en la gráfica que el aumento de ambas áreas es lineal frente al aumento de la concentración del patrón de Astaxantina.

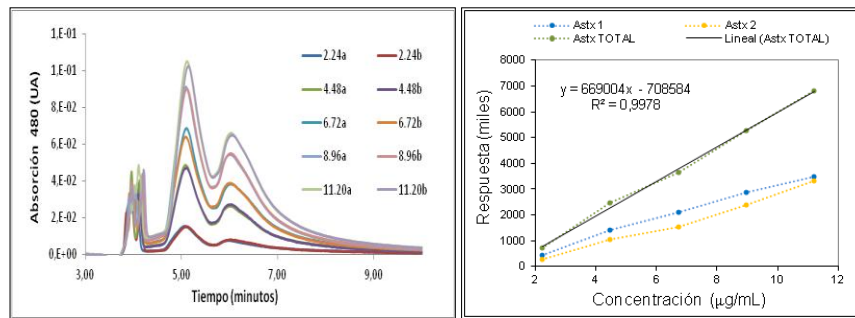


Figura (3). a) Respuesta del sensor óptico a 480 nm función del tiempo de retención de los estándares de Astaxantina. b) Regresión lineal efectuada con las áreas de los picos presentes en la Figura (3a).

Es posible observar en la Figura (3a) que el valor resultante de la sumatoria de ambas áreas de los picos es lineal frente al aumento de la concentración del patrón de Astaxantina. La concentración de Astaxantina responde a la siguiente expresión matemática:

$$C_{ast} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = \frac{Area_{astx1+astx2} + 708584}{66904} \quad (3)$$

Caracterización del ciclo de vida de *H.pluvialis*

La Tabla (1) muestra el contenido de clorofilas totales, proteínas totales y Astaxantina respecto a la biomasa de los diferentes estadios que componen el ciclo de vida de *H.pluvialis*.

Estado	% Chl	% Prot	% Astax
Vegetativo (Verde Flagelada)	1,8	17,2	-
Intermedio (Verde Palmella)	0,9	19,7	-
Enquistado (Aplanospora Roja)	0,3	25,3	2,85-3,07

Tabla (1). Contenido de proteínas, clorofilas y Astaxantina en la biomasa de *H.pluvialis*.

El contenido de clorofilas totales respecto a la biomasa disminuye al pasar del estado vegetativo (verde flagelada-Palmella) al enquistado (aplanospora). El contenido de proteínas totales tiene el comportamiento opuesto (mayor en estado enquistado). Los

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNL
14 y 15 de Octubre de 2015, SANTA FE.

porcentajes de proteína calculados con la técnica puesta a punto basada en Bradford se encuentran en el rango de proteínas citados para *H.pluvialis* (Cyanotech, 1999). El porcentaje de Astaxantina medio correspondiente a cultivos en estado estresado se encuentra entre los valores citados en el ámbito científico (Cyanotech, 1999).

CONCLUSIONES

- ✓ La técnica espectrofotométrica permite la determinación de Astaxantina partiendo de biomasa de *H.pluvialis*, es específica para Astaxantina, evadiendo conflictos dados por otros pigmentos como carotenoides, carotenos y clorofilas; requiere muy poca biomasa. La cuantificación no lleva costo económico alguno (si se la compara con el RP-HPLC) y no involucra gran consumo de tiempo, ni equipamiento complejo, adaptándose perfectamente a la rutina de laboratorio.
- ✓ El ajuste obtenido por RP-HPLC sirve de método de referencia/validación de la técnica espectrofotométrica.
- ✓ El porcentaje de clorofilas es menor en el estado de aplanospora.
- ✓ El porcentaje de proteínas es mayor en el estado de aplanospora.
- ✓ El porcentaje de Astaxantina en cultivos rojos supera el 3% en peso seco de la biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Boussiba (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol Plant* 108: 111–117
- Cyanotech (1999). A Technical Review of *Haematococcus* Algae
- Elliot A.M. (1934). Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Arch. Protistenk.* 82:250-272.
- Liu X.J., Wu Y.H., Zhao L.C., Xiao S.Y., Zhou A.M Liu X. (2011), “Determination of Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by First-Order Derivative Spectrophotometry”. *Journal of AOA C International.* 94(6): 1752-1757
- Judith Elena Camacho Kurmen (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* under different stress conditions. *Print version* ISSN 1794-2470, Nova vol.11 no.19 Bogotá Jan./June 2013
- Ritchie, R. J. (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115–126.
- Santos M.F. and J.F. Mesquita (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales). 1. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia* 49: 215-228
- Cynthia Victoria González López, María del Carmen Cerón García, Francisco Gabriel Acién Fernández (2010). “Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass”. *Bioresource Technology* 101 7587–7591