

## Desarrollo de un medio de cultivo para potenciar la producción de componentes bioactivos en la microalga autóctona *Scenedesmus obliquus*

Zapata, Luz Marina<sup>1,2</sup>; Jiménez-Veuthey, Mariana<sup>1,2</sup>; Flores, Agustina Beatriz<sup>1</sup>; Sacks, Natalia Agustina<sup>1</sup>; Vezzosi-Zoto, Gina Fiorella<sup>1</sup>.

AUTORES: <sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), <sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER), doble dependencia UNER-CONICET.

ARK:<http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/t9bmfmbnl>

Contacto: [luzmarina.zapata@uner.edu.ar](mailto:luzmarina.zapata@uner.edu.ar)

### Resumen

Se estudió el efecto de fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio y urea) y de carbono (acetato de sodio y glucosa), así como el estrés salino (cloruro de sodio) sobre cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* que potencien la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales. Se empleó como medio de cultivo base Allen & Arnon y la microalga *Scenedesmus obliquus* autóctona del Embalse de Salto Grande.

Las condiciones experimentales que favorecieron la obtención de biomasa de microalga *Scenedesmus obliquus* rica en componentes bioactivos fueron: para carotenoides totales 0,24g urea/L; 3,68g glucosa/L y 54,71 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>s); proteínas totales 0,24g urea/L; 5,02g acetato de sodio/L y 54,71 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>s) y fenoles totales 31,00g urea/L; 3,68g glucosa/L y 45,04 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>s). La concentración de carotenoides totales obtenida fue 473,85 $\pm$ 11,00mg  $\beta$ -caroteno/g ms; de proteínas totales 7,09 $\pm$ 0,23mg ASB/g ms y de fenoles totales, 16,78 $\pm$ 0,84mg EAG/g ms. El estrés salino se desestimó ya que provocó una disminución de la concentración de los componentes de interés. De lo expuesto se concluye que el cultivo de *Scenedesmus obliquus*, bajo las condiciones de estrés señaladas, representa un proceso biotecnológico atractivo para la obtención de biomasa rica en componentes bioactivos con potencialidad para ser utilizada como aditivo natural en la formulación de alimentos.

**Palabras clave:** *Scenedesmus obliquus*, medio de cultivo, carotenoides totales, proteínas totales, fenoles totales.

### Objetivos propuestos y cumplidos

*Objetivo general:*

- Estudiar la capacidad de la microalga *Scenedesmus obliquus*, aislada del Embalse de Salto Grande, para producir sustancias con propiedades bioactivas.
- Desarrollar un medio de cultivo para que la microalga *Scenedesmus obliquus* maximice la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

*Objetivos específicos:*

- Estudiar en cultivo de *Scenedesmus obliquus* la influencia de las concentraciones de nitrato de sodio y de acetato de sodio, así como la irradiancia en la producción de carotenoides totales, fenoles totales y proteínas totales.
- Investigar el efecto de las fuentes de nitrógeno, nitrato de sodio y urea, en la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.
- Evaluar el efecto de las fuentes de carbono, acetato de sodio y glucosa, en la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.
- Estudiar el efecto del estrés salino, mediante la incorporación de cloruro de sodio, en la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

## **Marco teórico y metodológico (síntesis)**

### **Marco teórico**

Las microalgas son una fuente novedosa de diferentes metabolitos y productos, tales como ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes, colorantes, entre otros; los cuales son de interés para las industrias alimentaria, farmacéutica, cosméticas y otras (Barajas-Solano et al., 2020; Coulombier et al., 2020).

El estrés es una de las opciones tecnológicas para aumentar la producción de ciertos metabolitos en la biomasa microalgal. La limitación de nitrógeno o fósforo, los cambios en la incidencia lumínica, el pH y la salinidad pueden provocar un aumento de aceites, carbohidratos y otros compuestos bioactivos. (Araujo et al. 2020).

Sin embargo, distintos investigadores señalan que es importante ajustar las condiciones de cultivo y estudiar el efecto de ciertas variables como la luz, la salinidad y el pH, junto con la relación C/N para obtener condiciones adecuadas que estimulen en las células de microalgas la síntesis de moléculas de interés industrial (Araujo et al. 2020; Barajas-Solano et al., 2020).

En los últimos años, el diseño de medios de cultivo que se ajusten a las necesidades de la cepa a cultivar se ha vuelto cada vez más frecuente, como una alternativa a los medios tradicionales. Estos medios de cultivo están diseñados utilizando concentraciones específicas de macronutrientes, como nitrato de sodio, fosfato de potasio, acetato de sodio y micronutrientes para la producción de biomasa y la acumulación de metabolitos de interés industrial. Por ejemplo, las tensiones fisiológicas inducidas por la limitación de nitrógenos, la alta salinidad o la intensidad de luz extrema pueden iniciar la síntesis de algunos carotenoides (Araujo et al. 2020).

El nitrógeno es uno de los elementos importantes de la composición de las células de microalgas y juega un papel vital en su metabolismo. Las fuentes de nitrógeno que las microalgas pueden absorber y utilizar incluyen fuentes de nitrógeno inorgánico (amonio, nitrato y nitrito) y fuentes de nitrógeno orgánico (urea, caseína y aminoácidos). Los tipos y concentraciones de la fuente de nitrógeno tienen un efecto significativo en el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas. Asimismo, cada especie de microalga tiene diferentes requisitos en cuanto al tipo y concentración de las fuentes de nitrógeno (Feng et al., 2020).

Además de la fuente de nitrógeno, estos microorganismos fotosintéticos necesitan para su crecimen-

to de una fuente de carbono y de energía lumínica. Sin embargo, como respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismos (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, fotoheterotrófico).

Dependiendo del tipo de metabolismo utilizado por las microalgas para su crecimiento, la fuente de carbono puede ser orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras), o inorgánica (CO<sub>2</sub>). Fotoautotróficamente, las microalgas utilizan la luz como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis; heterotróficamente, las microalgas en ausencia de luz utilizan solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía; mixotróficamente, utilizan carbono orgánico e inorgánico como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico. Por su parte los cultivos fotoheterotróficos se diferencian de los anteriores en que requieren de luz para la incorporación del carbono orgánico (Arias-Peñaranda et al., 2013).

Los componentes de interés en la presente investigación fueron los compuestos bioactivos: carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Los carotenoides son una amplia familia de isoprenoides que contienen una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo de la molécula, responsable del color y de las propiedades de absorción de estos compuestos (Fernández-Cordero, 2013). La mayoría de los carotenoides se conocen como antioxidantes y tienen un rol importante en la protección contra el daño oxidativo (Aburai et al., 2015).

Los compuestos fenólicos, diversos en estructura y función, son sintetizados por microalgas al final de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria (Robbins, 2003). Las propiedades químicas de los polifenoles en términos de disponibilidad de los hidrógenos fenólicos, como hidrogeno-donantes inhibidores de radicales, predice su actividad antioxidante (Ulloa-Mercado, 2011).

Las microalgas constituyen, además, una fuente importante de proteínas de alto valor biológico con posibles aplicaciones en nutrición humana. Actualmente existe un gran interés con respecto a las proteínas de microalgas ya que poseen secuencia de aminoácidos que forman péptidos bioactivos con gran potencial terapéutico en la salud humana (Plaza del Moral, 2010; Ramírez-Mérida et al., 2015).

Por lo expuesto, es que la industria alimentaria emplea una amplia gama de microalgas, por presentar un alto contenido en fibra, minerales, vitaminas, compuestos antioxidantes y diferentes aminoácidos. En los últimos años, el énfasis ha pasado de la cosecha silvestre a la agricultura y el cultivo controlado para producir nuevos compuestos a gran escala (Ramírez-Carmona et al., 2013). Actualmente las microalgas son comercializadas como alimento natural o suplemento en la alimentación del ser humano; se venden frecuentemente en las presentaciones de tabletas, cápsulas y líquidos. También son incorporadas en pastas, bocadillos, dulces en barra y en bebidas, ya sea como suplemento nutricional o como fuente de colorante natural para estos alimentos (Gómez et al., 2016).

### **Microalga, medio de cultivo y condiciones operacionales**

En la presente investigación se empleó la microalga *Scenedesmus obliquus*, aislada en el Laboratorio de Análisis de Metales en Alimentos y Otros Sustratos (LAMAS) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL), de agua recolectada del Embalse Salto Grande (Argentina) en la ubicación 30 ° 59 '19,07 "de latitud sur y 57 ° 54' 19,24 " de latitud oeste (Jiménez-Veuthey et al., 2018).

Para la obtención de biomasa microalgal se empleó el medio de cultivo estándar Allen & Arnon (Arnon et al. 1974), ya que es adecuado para el crecimiento de especies de microalga de agua dulce y ha sido diseñado para conseguir altos crecimientos celulares. La composición se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo Allen & Arnon.

Componentes	Concentración (mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	Según diseño experimental
NaVO <sub>3</sub>	0,239
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,26
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0403
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	124
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15
NaCl	117
EDTA	0,029
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174

Los cultivos se llevaron a cabo en columnas de burbujeo (fotobiorreactores), los que fueron colocados dentro de una cámara de cultivo (MGC - 400H, China). En cada fotobiorreactor se colocaron 200 mL de medio de cultivo Allen & Arnon y 50 mL de inóculo de cepas de *Scenedesmus obliquus*, los que se mantuvieron bajo agitación inyectando aire a una velocidad de 0,2 v/v/min para mantener el cultivo de manera homogénea y evitar la aglomeración de partículas.

Las condiciones de la cámara de cultivo en las que se llevaron a cabo los ensayos fueron: temperatura de  $25 \pm 1$  °C, humedad relativa del 65 % y fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria, donde se modificaron las condiciones experimentales según el ensayo abordado, con el fin de provocar condiciones de estrés a las microalgas y de esta forma evaluar su capacidad de producir los componentes bioactivos de interés. Los ensayos finalizaron cuando se alcanzó el tiempo de cultivo de 40 días.

Finalizada cada experiencia, el cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 min (Boeco C-28, Alemania). Después de eliminar los sobrenadantes, el sedimento celular se liofilizó a -90 °C (Heto Drywiner) hasta peso constante.

En la microalga deshidratada se cuantificó el contenido de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

### **Efecto de la concentración de nitrato de sodio, acetato de sodio e irradiancia en la producción de componentes bioactivos**

Con estos ensayos se buscó estudiar la influencia de las concentraciones de nitrato de sodio, acetato de sodio e irradiancia en la producción de componentes bioactivos y obtener la combinación de estos factores experimentales que maximicen la obtención de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Con software STATGRAPHICS Centurión XV se obtuvo un diseño experimental central compuesto 2<sup>3</sup>+estrella, de 2 bloques con 4 repeticiones del punto central y cuyo orden de los experimentos fue

completamente aleatorizado. Los factores experimentales y la región experimental fueron los que se mencionan a continuación:

- Concentración de nitrato de sodio: 0,85 – 75 g/L.
- Concentración de acetato de sodio: 0 – 5 g/L.
- Irradiancia: 180 – 1500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

Las variables respuestas fueron: concentración de carotenoides totales, concentración de proteínas totales y concentración de fenoles totales.

Con la metodología superficie de respuesta se obtuvo la combinación de factores experimentales que maximizó las concentraciones de cada uno de los componentes bioactivos.

A partir de estos ensayos se trabajó en lo sucesivo con los valores de las variables estudiadas que maximizaron la obtención de dichos componentes bioactivos.

### ***Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de componentes bioactivos***

Se compararon dos fuentes de nitrógeno: nitrato de sodio y urea, donde la concentración de nitrógeno fue la equivalente a la obtenida como óptima en el diseño experimental señalado precedentemente.

Se realizaron dos ensayos:

- Se preparó el cultivo Allen & Arnon según se señaló en la Tabla 1, donde la fuente de nitrógeno fue nitrato de sodio en la concentración obtenida como óptima en el diseño experimental.

- Igual que el ensayo anterior pero la fuente de nitrógeno fue urea. Se calculó la cantidad de nitrógeno contenida en la concentración de nitrato de sodio óptima y se incorporó esa cantidad de nitrógeno en forma de urea al medio de cultivo de Allen & Arnon.

Periódicamente se registró la densidad poblacional y las concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Luego de estas experiencias se siguió trabajando con la fuente de nitrógeno que permitió obtener la mayor concentración de los componentes bioactivos de interés.

### ***Efecto de la fuente de carbono en la producción de componentes bioactivos***

Se estudiaron dos fuentes de carbono, acetato de sodio y glucosa.

Se realizaron dos ensayos:

- Se preparó el medio de cultivo Allen & Arnon y se incorporó acetato de sodio como fuente de carbono en la concentración obtenida como óptima en el diseño experimental.

- Igual que el ensayo anterior pero la fuente de carbono fue glucosa, cuya cantidad incorporada se correspondió con la cantidad equivalente de carbono contenido en el acetato de sodio del ensayo anterior.

Periódicamente se registró la densidad poblacional y las concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Luego de estas experiencias se siguió trabajando con la fuente de carbono que permitió obtener la mayor concentración de los componentes bioactivos de interés.

### ***Efecto del estrés salino***

Se investigó el efecto del estrés salino, mediante la incorporación de cloruro de sodio, en la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

Se realizan dos ensayos.

- Se preparó medio de cultivo Allen & Arnon y se incorporaron las fuentes de nitrógeno y carbono que posibilitaron la obtención de las concentraciones más altas de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

- Igual que el ensayo anterior, pero, además se adicionó 17,55 g/L de cloruro de sodio con el propósito

de generar condiciones de estrés salino a la microalga.

Periódicamente se tomarán muestras de cultivo y se evaluó: densidad poblacional y concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales.

De esta forma se seleccionaron las mejores condiciones de cultivo para la obtención de los componentes bioactivos señalados.

### **Técnicas analíticas**

Densidad poblacional: se realizó el conteo celular del cultivo en cámara de Neubauer utilizando microscopio de Óptico Leica, DMLS (Copia et al., 2012).

Proteínas totales: se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando espectrofotómetro UV-Vis (Hach, DR600, Alemania) y estándar de albúmina de suero bovino (ASB) (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007). Los resultados se expresan en mg ABS/g de materia seca (ms).

Carotenoides totales: se midieron por método espectrofotométrico usando espectrofotómetro UV-Vis (Hach, DR600, Alemania) y  $\beta$ -caroteno como estándar. Los resultados se expresan en mg  $\beta$ -caroteno/g ms (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007; Cerón et al., 2007).

Fenoles totales: se determinó por reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Copia et al., 2012) utilizando espectrofotómetro (HACH DR600, Alemania). Se usó ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g ms.

### **Síntesis de resultados y conclusiones**

Se señaló en la metodología que inicialmente la microalga *Scenedesmus obliquus* se mantuvo en medio de cultivo Allen & Arnon sin condiciones de estrés hasta alcanzar la fase estacionaria, que se correspondió con un tiempo de cultivo de 15 días. En estas condiciones la concentración de carotenoides totales fue  $37,36 \pm 2,21$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms; de proteínas totales  $0,45 \pm 0,01$  mg ASB/g ms y de fenoles totales  $0,68 \pm 0,04$  mg EAG/g ms.

A partir del día 15 se generaron condiciones de estrés en el cultivo microalgal, modificando las condiciones experimentales según el correspondiente ensayo experimental. En la Figura 1 se muestra la secuencia de los ensayos experimentales realizados.

### **Efecto de la concentración de nitrato de sodio, acetato de sodio e irradiancia en la producción de componentes bioactivos (Ensayo 1)**

Se llevaron a cabo 36 corridas experimentales correspondientes a diferentes combinaciones de los factores: concentración de nitrato de sodio, concentración de acetato de sodio e irradiancia. Las variables de respuesta fueron las concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales. Dado que la combinación de factores experimentales para maximizar las concentraciones de los dos primeros componentes bioactivos fue similar, se utilizó la función deseabilidad para obtener las condiciones óptimas, siendo los resultados los siguientes:

- Concentración de nitrato de sodio: 0,69 g/L
- Concentración de acetato de sodio: 5,02 g/L
- Irradiancia:  $54,71 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$

En esas condiciones se obtuvieron:  $410,34 \pm 34,38$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms y  $5,95 \pm 0,22$  mg ASB/g ms.

Las condiciones óptimas que maximizaron la concentración de fenoles totales, alcanzando una concentración de  $2,51 \pm 0,18$  mg EAG/g ms, fueron:

- Concentración de nitrato de sodio: 87,73 g/L
- Concentración de acetato de sodio: 5,02 g/L
- Irradiancia:  $45,04 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$

Estas experiencias permitieron obtener condiciones experimentales que incrementaron sustancialmente el contenido de componentes bioactivos en la biomasa microalgal.

Los resultados muestran que la diferencia más relevante en las condiciones experimentales para maximizar la obtención de dichos componentes fue la concentración de nitrato de sodio. Para carotenoides totales y proteínas totales se requirieron bajas concentraciones de nitrato de sodio, mientras que para fenoles totales, altas concentraciones de este analito. También otros autores observaron que la síntesis de carotenoides se vio favorecida por las condiciones limitadas de nitrógeno (López-Elías et al., 2013; Aburai et al.; 2015). Probablemente por ello, las concentraciones más altas de carotenoides totales se obtuvieron a partir del día 26, cuando el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo se fue agotando.

A continuación se realizaron estudios adicionales orientados a incrementar aún más las concentraciones de componentes bioactivos.

### **Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de componentes bioactivos (Ensayos 2 a 5)**

Tomando como base el medio de cultivo Allen & Arnon modificado, según los resultados señalados precedentemente, se compararon dos fuentes de nitrógeno: nitrato de sodio y urea.

Para carotenoides totales y proteínas totales la concentración óptima de nitrato de sodio fue 0,69 g/L; lo que corresponde a una concentración de nitrógeno de 0,11 g/L. El equivalente de nitrógeno en urea corresponde a 0,24 g/L. Por lo tanto, se realizaron dos ensayos:

- Ensayo 2: se utilizó 0,69 g/L de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno y,
- Ensayo 3: se reemplazó, en el medio de cultivo, el nitrato de sodio por 0,24 g/L de urea.

Para fenoles totales el contenido óptimo de nitrato de sodio fue 87,73 g/L; esto es 14,45 g de nitrógeno y 31,00 g/L de urea. Por consiguiente, se llevaron a cabo dos ensayos:

- Ensayo 4: se utilizó 87,73 g/L de nitrato de sodio y,
- Ensayo 5: se añadió 31,00 g/L de urea.

Las condiciones experimentales que permitieron superar las concentraciones de los componentes bioactivos obtenidas en el Ensayo 1 son las siguientes (Tabla 2):

- Carotenoides y proteínas totales: 0,24 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Fenoles totales: 31,00 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio e irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

Para los tres componentes bioactivos la urea resultó mejor fuente de nitrógeno que el nitrato de sodio, obteniéndose en esas condiciones: 471,16 $\pm$ 10,40 mg  $\beta$ -caroteno/g ms; 7,07 $\pm$ 0,11 mg ASB/g ms y 5,44 $\pm$ 0,04 mg EAG/g ms. En consecuencia, esta fuente de nitrógeno incrementó, respecto del nitrato de sodio, 29,72 % el contenido de carotenoides totales; 15,58 %, el contenido de proteínas totales y 212,64 %, el contenido de fenoles totales.

Al igual que en el presente estudio, los autores López-Elías et al. (2015) obtuvieron en cultivos de *Chaetoceros muelleri* cultivadas con dos fuentes de nitrógeno: nitratos y urea; que al emplear urea como fuente de nitrógeno las proporciones de proteínas obtenidas fueron un 23,74 % más alta que cuando emplearon nitratos. Esto pone de manifiesto que distintas fuentes de nitrógeno tienen diferentes efectos en los índices fisiológicos de las microalgas, debido a que estas asimilan las diferentes fuentes de nitrógeno de diferente forma (Feng et al., 2020).

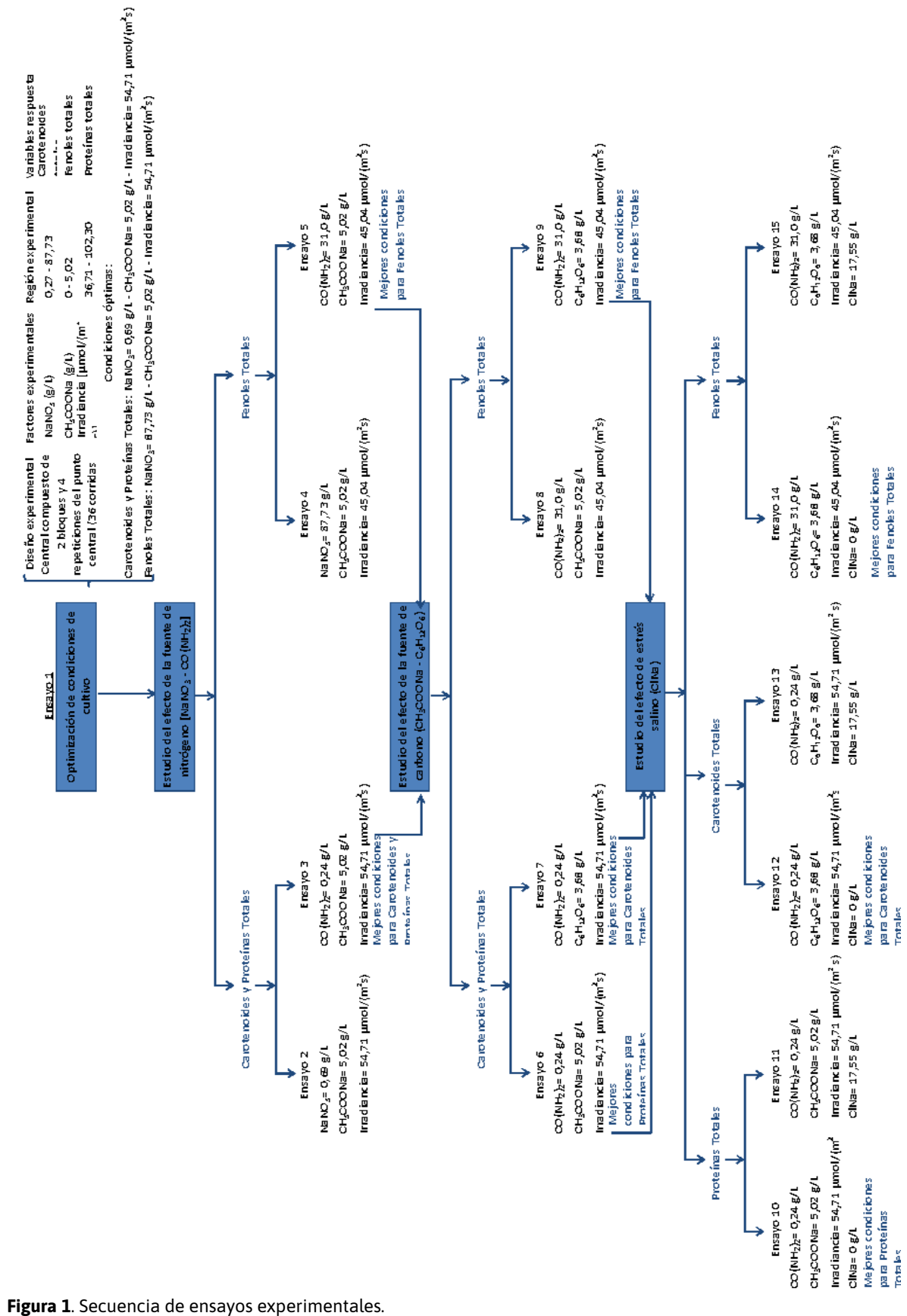


Figura 1. Secuencia de ensayos experimentales.



**Tabla 2.** Concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales obtenidas en los ensayos experimentales.

Ensayo	Factores experimentales	Carotenoides totales		Proteínas totales		Fenoles totales	
		Condiciones experimentales	Concentración (mg $\beta$ -caro/g ms)	Condiciones experimentales	Concentración (mg ASB/g ms)	Condiciones experimentales	Concentración (mg EAG/g ms)
Inicio (15d)	Medio de cultivo	Allen & Arnon	37,36 $\pm$ 2,21	Allen & Arnon	0,45 $\pm$ 0,01	Allen & Arnon	0,68 $\pm$ 0,04
Optimización (ensayo 1)	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	0,69	410,34 $\pm$ 34,38 (26 d)	0,69	5,95 $\pm$ 0,22 (26 d)	87,73	2,51 $\pm$ 0,18 (26 d)
	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	5,02		5,02		5,02	
	Irradiancia [ $\mu$ mol/(m <sup>2</sup> s)]	54,71		54,71		45,04	
Fuente de N (ensayo 2-5)	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	-	471,16 $\pm$ 10,40 (26-40 d)	-	7,07 $\pm$ 0,11 (33-40 d)	-	5,44 $\pm$ 0,04 (33-40 d)
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,24		0,24		31,00	
	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	5,02		5,02		5,02	
	Irradiancia [ $\mu$ mol/(m <sup>2</sup> s)]	54,71		54,71		45,04	
	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	0,69	407,64 $\pm$ 17,71 (18 d)	0,69	5,45 $\pm$ 0,27 (18 d)	-	1,74 $\pm$ 0,36 (26-40 d)
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-		-		87,73	
	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	5,02		5,02		5,02	
	Irradiancia [ $\mu$ mol/(m <sup>2</sup> s)]	54,71		54,71		45,04	
Fuente de C (ensayo 6-9)	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	-	473,85 $\pm$ 11,00 (18-40 d)	-	7,09 $\pm$ 0,23 (33-40 d)	-	16,78 $\pm$ 0,84 (40 d)
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,24		0,24		31,00	
	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	-		5,02		-	
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	3,68		-		3,68	
	Irradiancia [ $\mu$ mol/(m <sup>2</sup> s)]	54,71	54,71	45,04			
	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	-	465,09 $\pm$ 15,27 (18 d)	-	5,71 $\pm$ 0,21 (18-26 d)	-	4,65 $\pm$ 0,33 (18 d)
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,24		0,24		31,00	
	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	5,02		-		5,02	
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-		3,68		-	
	Irradiancia [ $\mu$ mol/(m <sup>2</sup> s)]	54,71		54,71		45,04	
Estrés salino (ensayo 10-15)	ClNa (g/L)	0	473,07 $\pm$ 11,39 (18-40 d)	0	7,09 $\pm$ 0,23 (33-40 d)	0	16,78 $\pm$ 0,84 (40 d)
		17,55	461,36 $\pm$ 12,80 (18 d)	17,55	5,05 $\pm$ 0,30 (18-26 d)	17,55	14,66 $\pm$ 0,87 (33 d)

Entre paréntesis figuran los tiempos de cultivo, en días, a los que se logró la concentración máxima de componente bioactivo señalada en la tabla para cada uno de los ensayos.

**Efecto de la fuente de carbono en la producción de componentes bioactivos (Ensayos 6 a 9)**

Se ensayaron las fuentes de carbono acetato de sodio y glucosa, por lo que el medio de cultivo Allen & Arnon se continuó modificado, atendiendo a los resultados de los Ensayos 1 a 5.

Referido a la fuente de carbono, en el Ensayo 1 se obtuvo que la concentración de acetato de sodio que permitió maximizar las concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales fue 5,02 g/L. Esa concentración se corresponde con 1,47 g/L de carbono y con 3,68 g/L de glucosa. Por lo que para seleccionar la mejor fuente de carbono se llevaron a cabo cuatro ensayos, los dos primeros para carotenoides totales y proteínas totales y los dos segundos para fenoles totales.

- Ensayo 6: 0,24 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 7: 0,24 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 8: 31,00 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio e irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 9: 31,00g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa e irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

El contenido de proteínas totales obtenido en el Ensayo 6 fue  $7,09 \pm 0,23$  mg ASB/g ms, no observándose diferencias significativas con los resultados obtenidos en el Ensayo 3 ( $7,07 \pm 0,11$  mg ASB/g ms). Sin embargo, el contenido de este componente fue 24,17 % menor cuando se empleó glucosa como fuente de carbono (Ensayo 7).

La concentración de carotenoides totales alcanzada en el Ensayo 7, en el que se empleó glucosa, fue  $473,85 \pm 11,00$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms; mientras que con acetato de sodio se obtuvo al día 18 de cultivo  $465,09 \pm 15,27$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms y luego fue disminuyendo hasta concentraciones de  $362,09 \pm 18,77$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms. Cuando las microalgas emplean glucosa como fuente de carbono, ésta es transformada en piruvato, el cual, a través de la ruta 2-C-metil-d-eritroil-4 fosfato (MEP) producen isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato, precursores de carotenoides (Fernández-Cordero, 2013; Zhou et al., 2020). Estos resultados son de interés, ya que el  $\beta$ -caroteno es una de las formas precursoras de vitamina A y un pigmento antioxidante potente que puede utilizarse como suplemento alimenticio, o bien en cosmética o farmacéutica (Marino et al., 2020).

Las condiciones experimentales del Ensayo 9 resultaron más favorables para la obtención de fenoles totales, alcanzando una concentración de  $16,78 \pm 0,84$  mg EAG/g ms.

Por lo tanto, para carotenoides totales y fenoles totales la mejor fuente de carbono fue glucosa, en una concentración de 3,68 g/L; mientras que para proteínas totales la mejor fuente de carbono fue acetato de sodio a 5,02 g/L.

**Efecto del estrés salino (Ensayos 10 a 15)**

Seleccionadas las mejores fuentes de nitrógeno y carbono para la obtención de los componentes bioactivos en estudio, se realizaron nuevos ensayos con la hipótesis de que un estrés salino en el cultivo microalgal provoca un incremento de dichos componentes. Se plantearon seis ensayos:

- Ensayo 10: 0,24 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio, ausencia de cloruro de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 11: 0,24 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio, 17,55 g/L de cloruro de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 12: 0,24 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, ausencia de cloruro de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 13: 0,24 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, 17,55 g/L de cloruro de sodio e irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 14: 31,00 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, ausencia de cloruro de sodio e irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .
- Ensayo 15: 31,00 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, 17,55 g/L de cloruro de sodio e irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

Todos los ensayos en los que se incorporó cloruro de sodio dieron como resultado una disminución de los componentes bioactivos, por lo tanto la hipótesis fue rechazada y se desestimó la incorporación de esta sal al medio de cultivo. Estos resultados no coinciden con lo observado por Sui et al. (2019), quienes señalaron que el cloruro de sodio (2 mol/L) favoreció el crecimiento celular de la microalga *Dunaliella salina*, como así también la cantidad de proteínas. Esta diferencia en los resultados se atribuyó a que *Dunaliella salina* crece en ambientes con altas concentraciones de sal, mientras que *Scenedesmus obliquus* es una microalga de agua dulce.

### Conclusiones

Los estudios planteados en el presente proyecto de investigación permitieron diseñar un medio de cultivo y obtener condiciones experimentales que favorecieron la obtención de biomasa de microalga *Scenedesmus obliquus* rica en componentes bioactivos. Para los estudios planteados, la urea resultó mejor fuente de nitrógeno; y la glucosa fue la mejor fuente de carbono para carotenoides totales y fenoles totales, mientras que el acetato de sodio resultó mejor fuente de carbono para proteínas totales.

Las siguientes condiciones experimentales posibilitaron la obtención de biomasa de microalga *Scenedesmus obliquus* rica en componentes bioactivos:

Carotenoides totales. Medio de cultivo Allen & Arnon enriquecido con: 0,24 g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ,  $25 \pm 1$  °C, 65 % de humedad relativa, inyección de aire de 0,2 v/v/min y fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad.

Proteínas totales. Medio de cultivo Allen & Arnon enriquecido con: 0,24 g/L de urea; 5,02 g/L de acetato de sodio, irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ,  $25 \pm 1$  °C, 65 % de humedad relativa, inyección de aire de 0,2 v/v/min y fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad.

Fenoles totales. Medio de cultivo Allen & Arnon enriquecido con: 31,00g/L de urea; 3,68 g/L de glucosa, irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ,  $25 \pm 1$  °C, 65 % de humedad relativa, inyección de aire de 0,2 v/v/min y fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad.

De esta forma se alcanzaron concentraciones de carotenoides totales  $473,85 \pm 11,00$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms; de proteínas totales  $7,09 \pm 0,23$  mg ASB/g ms y de fenoles totales,  $16,78 \pm 0,84$  mg EAG/g ms.

De lo expuesto se concluye que la microalga *Scenedesmus obliquus* autóctona del Embalse de Salto Grande, aislada en el Laboratorio LAMAS-FCAL, es capaz de producir en condiciones adecuadas sustancias con propiedades bioactivas. Estos resultados constituyen un paso relevante en vistas a la realización de estudios de escalado para la obtención de biomasa microalgal que pueda ser incorporada en alimentos con el fin de otorgarle propiedades funcionales.

### Indicadores de producción

#### Publicaciones

Zapata, Luz Marina; Jiménez-Veuthey, Mariana; Vezzosi-Zoto, Gina Fiorella; Sacks, Natalia Agustina; Flores, Agustina; Zampedri, Patricia; Zampedri, Carolina. Optimización de condiciones de cultivo de *Scenedesmus obliquus* para maximizar la producción de componentes bioactivos de interés industrial. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. Artículo en prensa, aceptado para su publicación.

- Luz Marina Zapata; Mariana Jimenez-Veuthey; Patricia Andrea Zampedri; Agustina Beatriz Flores; Carolina Ayelen Zampedri; Guillermina Chabrillon. Effect of light stress and concentrations of nitrogen and carbon in the production of phytonutrients in the microalga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). Journal of Algal Biomass Utilization: JABU. 2020 vol.11 n°1. P 9-22. eissn 2229-6905

### **Presentaciones a congresos nacionales**

“Efecto del estrés lumínico y de las concentraciones de nitrógeno y carbono en el cultivo de microalgas *Scenedesmus obliquus* para la producción de proteínas”. III Congreso de Bromatología y Nutrición – CByN. Septiembre 2019.

“Producción de compuestos fenólicos a partir del estrés de cultivo de microalgas *Scenedesmus obliquus*”. III Congreso de Bromatología y Nutrición – CByN. Septiembre 2019.

### **Presentaciones a congresos internacionales**

“Efecto de las concentraciones de nitrógeno y carbono en el cultivo de microalgas *Scenedesmus obliquus* para la producción de carotenoides totales”. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos & XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Noviembre 2019.

### **Bibliografía**

- ABURAI N, Sumida D, Abe K. (2015). Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, 8: 30-36.
- ARAUJO GS, Silva JWA, Viana CA, Fernandes FAN. (2020). Effect of sodium nitrate concentration on biomass and oil production of four microalgae species. *International Journal of Sustainable Energy*, 39(1): 41-50 <https://doi.org/10.1080/14786451.2019.1634568>
- ARIAS-PEÑARANDA MT, Martínez-Roldán AJ, Cañizares-Villanueva RO. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta biológica Colombiana*, 18(1), 43-68. ISSN electrónico 1900-1649. ISSN impreso 0120-548X. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/32832/40207>
- ARNON DI, McSwain BD, Tsujimoto HY, Wada K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim Biophys Acta* 357: 231-245.
- ARREDONDO-VEGA BO, Voltolina D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México: *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*. pp.27-34; 49-57.
- BARAJAS-SOLANO AF, Guarín-Villegas E, Remolina-Páez LM, Bermúdez-Castro JP, Mogollón-Londoño SO, Contreras-Roperó JE, García-Martínez JB. (2020). Effect of Carbon/Nitrogen ratio on the production of microalgae-based carotenoids. *Ingeniería y Competitividad*, 22(1): 8686. DOI: 10.25100/iyc.v22i1.8686
- COPIA J, Gaete H, Zúñiga G, Hidalgo M, Cabrera E. (2012). Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1): 113-123.
- COULOMBIER N, Nicolau E, Le Déan L, Antheaume C, Jauffrais T, Lebouvier N. (2020). Impact of Light Intensity on Antioxidant Activity of Tropical Microalgae. *Mar. Drugs*, 18(2), 122. <https://doi.org/10.3390/md18020122>
- FENG P, Xu Z, Qin L, Asraful-Alam M, Wang Z, Zhu S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology*, 301, 122762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122762>
- FERNANDEZ-CORDERO B. (2013). Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/15631/E\\_TD\\_PROV43.pdf?sequence=1](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/15631/E_TD_PROV43.pdf?sequence=1)

- GOMES AMA, Sampaio PL, Ferrão-Filho AS, Magalhães VL, Marinho MM, Pimentel de Oliveira AC, Barbosa dos Santos V, Domingos P, Oliveira Azevedo SMF. (2009). Florações de cianobacterias tóxicas em uma lagoa costeira hipereutrófica do Rio de Janeiro/RJ (Brasil) e suas consequências para saúde humana. *Oecol. Bras.*, 13(2): 329-345.
- JIMÉNEZ-VEUTHEY M, Vidal MN, Cabrera C, Páramo J, Bertoni M, Bordet HF, Andrade-Belgeri MS, Flores ML, Zapata LM. (2018). A simple, efficient and economical method for isolation of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) from freshwater sample (Embalse Salto Grande, Argentina). *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*. 20(2): 6-12.
- LÓPEZ-ELÍAS JA, González-Vega R, Márquez-Ríos E, Torres-Arreola W. (2015). Efecto de la concentración y fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas de cultivos masivos de la microalga *Chaetoceros muelleri*. *International Journal of Experimental Botany*, 84: 331-337.
- MARINO T, Casella P, Sangiorgio P, Verardi A, Ferraro A, Hristoforou E, Molino A, Musmarra D. (2020). Natural Beta-Carotene: a Microalgae Derivate for Nutraceutical Applications. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 103-108. DOI:10.3303/CET2079018
- PLAZA DEL MORAL M. (2010). Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas. Tesis doctoral. Universidad Autonoma de Madrid.
- RAMÍREZ-CARMONA NE, Rendón-Castillón L, Vélez-Salazar Y. (2013). Microalgas para la industria alimenticia. Colombia: Editorial Universidad Pontificia Bolivariana.
- ROBBINS, R.J. 2003. Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.
- SUI Y, Vlaeminck SE. (2018). Effects of salinity, pH and growth phase on the protein productivity by *Dunaliella salina*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(4), 1032-1040. doi:10.1002/jctb.5850
- ULLOA-MERCADO RG. (2011). Inducción de productos bioactivos en la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- ZHOU W, Lu Q, Han P, Li J. (2020). Chapter 3 Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design, en *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 31-50. Publisher: Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00003-5

**PID 8100**

**Denominación del Proyecto**

Obtención de componentes con propiedades bioactivas a partir de cultivos de microalga *Scenedesmus Obliquus*

**Directora**

ZAPATA Luz Marina

**Co-director:**

CASTAGNINI Juan Manuel

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ciencias de la Alimentación - UNER

**Contacto**

[zapatam@fcal.uner.edu.ar](mailto:zapatam@fcal.uner.edu.ar)

**Integrantes del proyecto**

Docentes: Jiménez-Veuthey Mariana, Quinteros Carlos Fabio, Cecilia Cabrera, Carlier Evelin, Chacón Carolina (colaboradora).

Becarios: Agustina Beatriz Flores (becaria de formación); Sacks Natalia Agustina (becaria CIN), Vezzosi Soto Gina Fiorella (becaria CIN)

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

22/03/2018 y 21/03/2020.

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N°292/21 (22/04/2021)