

*Artículo original*

**Optimización de condiciones de cultivo de *Scenedesmus obliquus* para maximizar la producción de componentes bioactivos de interés industrial**

**Luz M. Zapata<sup>ab\*</sup>, Mariana Jiménez-Veuthey<sup>a</sup>, Gina F. Vezzosi-Zoto<sup>a</sup>,  
Natalia A. Sacks<sup>a</sup>, Agustina Flores<sup>a</sup>, Patricia Zampedri<sup>a</sup>, Carolina Zampedri<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER)

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER), doble dependencia UNER-CONICET. Monseñor Tavella 1450-3200 – Concordia (Entre Ríos), Argentina

(\*Autor de correspondencia: [luzmarina.zapata@uner.edu.ar](mailto:luzmarina.zapata@uner.edu.ar))

**Resumen**

Se estudió el efecto de las concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , así como de la irradiancia sobre el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* para maximizar la producción de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales. La microalga autóctona, aislada del “Embalse Salto Grande” (Argentina), se cultivó en medio Allen & Arnon evaluando diferentes condiciones experimentales: 0,27-87,73 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ; 0-5,02 g  $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{L}$  e irradiancia 36,71-102,30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Las variables de respuesta fueron las concentraciones de fenoles totales, carotenoides totales y proteínas totales. El contenido de componentes bioactivos aumentó con el incremento de la irradiancia hasta alcanzar un máximo, luego valores mayores de este factor generaron disminución de los mismos. Los valores más altos de carotenoides totales y proteínas totales se obtuvieron a bajas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y altas concentraciones de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , mientras que para fenoles totales se requirieron altas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Las condiciones que maximizaron las concentraciones de carotenoides totales y proteínas totales fueron 0,69 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ; 5,02 g  $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{L}$  y 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ; y para fenoles totales, 87,73 g/L; 5,02 g/L y 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ; respectivamente. En esas condiciones se obtuvieron 410,34±34,38 mg  $\beta$ -caroteno/g; 5,95±0,22 mg ASB (albúmina de suero bovino)/g y 2,51±0,18 mg EAG (equivalentes de ácido gálico) /g. 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 utilizado como aditivo natural para formulación de alimentos.

**Palabras clave:** *microalga, optimización, carotenoides totales, fenoles totales, proteínas totales.*

*Article Info:* Received - 10 June 2020 // Accepted - 24 July 2020  
Handling Editor: F.G. Acién

©The Author(s) 2020. This article is published with open access by *Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*

## Optimization of *Scenedesmus obliquus* culture conditions to maximize the production of bioactive components of industrial interest

### Abstract

The effect of NaNO<sub>3</sub> and CH<sub>3</sub>COONa concentrations and irradiance on *Scenedesmus obliquus* microalgae culture was studied to enhance the production of total carotenoids, total proteins and total phenols. The native microalga from “Embalse Salto Grande” (Argentina), was cultivated in Allen & Arnon culture medium under different experimental conditions: 0.27-87.73 g NaNO<sub>3</sub>/L; 0-5.02 g CH<sub>3</sub>COONa/L and irradiance 36.71-102.30 μmol/(m<sup>2</sup>s). The response variables were the concentrations of total phenols, total carotenoids and total proteins. The content of bioactive components increased with the increase of the irradiance until reaching a maximum, then, the higher values of irradiance generated a decrease in them. The highest values of total carotenoids and total proteins were obtained at low concentrations of NaNO<sub>3</sub> and high concentrations of CH<sub>3</sub>COONa, while for total phenols high concentrations of NaNO<sub>3</sub> and CH<sub>3</sub>COONa were required. The experimental conditions that maximized the total carotenoids and total proteins concentrations were 0.69 g NaNO<sub>3</sub>/L; 5.02 g CH<sub>3</sub>COONa/L and 54.71 μmol/(m<sup>2</sup>s), respectively. While for total phenols concentration, the conditions were 87.73 g/L; 5.02 g/L and 45.04 μmol/(m<sup>2</sup>s). Under these conditions, 410.34 ± 34.38 mg β-carotene/g, 5.95 ± 0.22 mg BSA (bovine serum albumin)/g and 2.51 ± 0.18 mg GAE (galic acid equivalents)/g were obtained, respectively. In conclusion, the cultivation of *Scenedesmus obliquus*, under the indicated stress conditions represents an attractive biotechnological process for obtaining biomass rich in bioactive components with potential to be used as a natural additive for food formulation.

**Keywords:** *microalgae, optimization, total carotenoids, total phenols, total proteins.*

### 1. Introducción

En las últimas décadas, el suministro de alimentos constituye uno de los problemas más importante a nivel mundial debido al gran incremento de la población. Esta situación ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de alimentos y de nuevas tecnologías, como la biotecnología de algas, para resolver esta problemática (Çelekli *et al.*, 2008). La biotecnología de microalgas contribuye al desarrollo de la bioeconomía y a la mejora de la sustentabilidad del medio ambiente

(Vigani *et al.*, 2015; Benavente-Valdés *et al.*, 2016; Ación-Fernández *et al.*, 2018).

La mayor parte de la producción mundial de microalgas se destina al consumo humano, siendo el valor de mercado de los productos superior a los 10<sup>3</sup> millones de euros al año, lo que pone de manifiesto la importancia de este sector en el desarrollo a corto plazo de la biotecnología de microalgas (Ación-Fernández *et al.*, 2018). Las microalgas son consideradas como un super-alimento, ya que son una fuente natural de compuestos bioactivos y con beneficios nutricionales, tales como carotenoides, antioxidantes, proteínas ricas

en aminoácidos esenciales, lípidos y otros. Para ello, necesitan dióxido de carbono atmosférico, nitrógeno, fósforo y luz solar (Aburai *et al.*, 2015; Vigani *et al.*, 2015; Benavente-Valdés *et al.*, 2016; Acién-Fernández *et al.*, 2018). Estos microorganismos son una fuente nueva y prometedora de nutrientes, que pueden consumirse directamente, como *Chlorella*, *Spirulina*, o bien ser incorporados como aditivos a diferentes mezclas para incrementar las propiedades nutricionales y organolépticas de alimentos.

Las algas tienen la capacidad de modificar su tasa de crecimiento, como así también su composición bioquímica en condiciones fisicoquímicas variables (Abdul-Adel *et al.*, 2019). Se han utilizado diferentes estrategias de cultivo para mejorar la producción de biomasa y de diferentes compuestos bioactivos. Estas estrategias pueden clasificarse en dos grupos: nutricionales y físicas. Las primeras consisten en efectuar cambios en la composición de los medios de cultivo, mientras que las segundas implican modificaciones en las condiciones operativas de cultivo (Benavente-Valdés *et al.*, 2016). Las modificaciones nutricionales y operativas inducen una situación de estrés en los cultivos de microalgas, provocando cambios en la fisiología celular y en la composición bioquímica (Ördög *et al.*, 2012).

A la fecha, muchas especies de microalgas como *Auxenochlorella protothecoides* (antes conocidos como *Chlorella protothecoides*), *Dunaliella salina*, *Scenedesmus almeriensis* y *Galdieria sulphuraria*, representan una fuente biotecnológica altamente potencial de carotenoides naturales (Aburai *et al.*, 2015; Asker y Awad, 2019). Por otra parte, se observó que las microalgas *Chlorella* y

*Arthrospira* acumulan proteínas de alta calidad, con perfiles de aminoácidos esenciales equilibrados y en cantidades similares a fuentes proteicas como los huevos y la soja (Caporgno y Mathys, 2018). Otros componentes bioactivos de interés son los compuestos fenólicos que forman parte del complejo mecanismo de defensa de las microalgas. Se observó que éstos son acumulados en respuesta a condiciones de estrés, como exposición a exceso de iluminación o radiación ultravioleta en cultivos de *Chlorella* sp. y *Cystoseira tamariscifolia* (Gómez *et al.*, 2016).

Varias microalgas y sus ingredientes derivados ya han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (Asker y Awad, 2019) y se han incorporado a alimentos como aditivos en productos de panificación, lácteos, pastas, geles, emulsiones y otros, con el fin de impartirles propiedades funcionales, antioxidantes y/o nutricionales (Caporgno y Mathys, 2018). Sin embargo, estos organismos requieren de condiciones óptimas de cultivo que deben conocerse para maximizar la obtención y/o acumulación de componentes de interés (Acién-Fernández *et al.*, 2018).

Por todo lo expuesto, se considera relevante el estudio de condiciones de cultivo que maximicen la obtención de componentes de interés a partir de microalgas, quedando por conocer cuál será el ritmo de incorporación de este tipo de tecnologías a los actuales sistemas de producción, lo que estará determinado por la velocidad con la que las actuales barreras técnicas y regulatorias puedan ir resolviéndose (Acién-Fernández *et al.*, 2018).

El propósito de este estudio fue investigar la influencia de las concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , así como de la irradiancia sobre el cultivo de microalga *Scenedesmus obliquus*, para potenciar la acumulación de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales y, además, determinar la combinación de esas variables que maximicen la obtención de los componentes bioactivos mencionados.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Microalga y medio de cultivo

Se trabajó con la microalga *Scenedesmus obliquus* (Fig. 1), aislada del Embalse Salto Grande (Argentina) en la ubicación  $30^\circ 59' 19.07''$  de latitud sur y  $57^\circ 54' 19.24''$  de latitud oeste (Jiménez-Veuthey *et al.*, 2018). La microalga se cultivó en modo batch en 12 columnas de burbujeo (fotobiorreactor) dentro de una cámara de cultivo (MGC - 400H, China) (Fig. 2). Para ello, se colocaron 200 mL de medio de cultivo Allen & Arnon (suplementado con nitrato de sodio) y 50 mL de inóculo de cepas de *Scenedesmus obliquus* en cada fotobiorreactor. La composición del medio de cultivo Allen & Arnon suplementado con nitrato de sodio fue, en mg/L: 850  $\text{NaNO}_3$ , 0,239  $\text{NaVO}_3$ ; 1,26  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 2,86  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1,81  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,222  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,079  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0403  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 124  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 117  $\text{NaCl}$ , 0,029 EDTA; 0,025  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 174  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Cada fotobiorreactor se mantuvo 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.



Figura 1. Microalga *Scenedesmus obliquus*.



Figura 2. Fotobiorreactores en cámara de cultivo.

### 2.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones de la cámara de cultivo en las que se llevaron a cabo los ensayos fueron: temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa del 65 % y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. Una vez alcanzada la fase estacionaria el cultivo se operó en modo semicontinuo, se modificaron la irradiancia y las concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  (fuente de nitrógeno) y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (fuente de carbono) del medio de cultivo original.

Para esto, se retiraron 50 mL del contenido de cada fotobiorreactor y se incorporaron 50 mL de soluciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  de acuerdo con el diseño experimental que se detalla en el apartado 2.4. También la irradiación se ajustó a los valores indicados. El volumen final de cada fotobiorreactor se mantuvo a 250 mL y el tiempo total de cultivo fue de 40 d.

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  $-90^\circ\text{C}$  (Heto Drywiner) hasta peso constante.

### 2.3. Determinaciones analíticas

Proteínas totales: se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando espectrofotómetro UV-Vis (HACH®, DR600) y estándar de albúmina de suero bovino (ASB) (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007). Las mediciones se realizaron a 750 nm. 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) a 450 nm 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) a 760 nm. Se usó ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g ms.

### 2.4. Diseño experimental

Se elaboró un diseño experimental con paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI Versión 16.1.11, en el que se consideraron los siguientes tres factores: concentración de  $\text{NaNO}_3$ , concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia. La región experimental de cada uno de los factores fueron 0,27 - 87,73 g/L; 0,00 - 5,02 g/L y 36,71 - 102,30 [ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ ], respectivamente. Como variables de respuesta se seleccionaron el contenido de los componentes bioactivos: carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales. Se trabajó con un diseño central compuesto de 2 bloques y 4 repeticiones del punto central que consistió en un total de 36 experiencias (Tabla 1).

### 2.5. Análisis del diseño experimental

Se utilizó la metodología superficie de respuesta para obtener la combinación de factores experimentales que maximicen las concentraciones de cada uno de los componentes bioactivos. Para ello, cada variable de respuesta se dividió en componentes lineal, cuadrática e interacciones, según se muestra en la Ecuación 1 (Montgomery, 2013).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

[Ecuación 1]

donde:  $y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  el coeficiente lineal,  $\beta_{ii}$ , coeficiente cuadrático;  $\beta_{ij}$ , coeficiente de interacciones,  $x_i$  y  $x_j$  son niveles de las variables independientes,  $k$  el número de factores experimentales y  $\varepsilon$  el error aleatorio.

Mediante análisis de varianza se estudiaron los factores experimentales e interacciones que tuvieron efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre cada una de las variables de respuesta y se excluyeron del análisis los factores e interacciones que no tuvieron influencia significativa en la respuesta. Se comprobó, además, la idoneidad de los modelos mediante el test de falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), coeficiente de determinación y estadístico de Durbin-Watson para comprobar la independencia de los residuos ( $p > 0,05$ ).

Para la optimización de múltiples respuestas se utilizó la función deseabilidad (Montgomery, 2013). Para ello se convirtió cada respuesta  $y_i$  en una función individual de deseabilidad  $d_i$ , la que toma valores entre 0 y 1. Cuanto más cerca estuvo la respuesta del valor ideal más próxima a 1 fue la función deseabilidad. Dado que el objetivo fue maximizar las variables respuestas, la ecuación de la función deseabilidad es la que se muestra a continuación.

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r & L \leq y \leq T \\ 1 & y > T \end{cases}$$

[Ecuación 2]

donde:  $T$  es el objetivo,  $L$  el límite mínimo y  $r$  el peso.

**Tabla 1.** Diseño experimental.

Bloque	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	Irradiancia [μmol/(m <sup>2</sup> s)]
1	18,00	4,00	50,00
1	44,00	5,02	69,50
1	18,00	1,00	50,00
1	44,00	2,50	69,50
1	44,00	2,50	69,50
1	18,00	4,00	89,00
1	44,00	2,50	69,50
1	44,00	2,50	36,71
1	70,00	4,00	89,00
1	44,00	2,50	102,30
1	44,00	2,50	69,50
1	70,00	1,00	89,00
1	44,00	0,00	69,50
1	87,73	2,50	69,50
1	0,27	2,50	69,50
1	18,00	1,00	89,00
1	70,00	1,00	50,00
1	70,00	4,00	50,00

2	18,00	4,00	50,00
2	44,00	5,02	69,50
2	18,00	1,00	89,00
2	44,00	2,50	69,50
2	44,00	2,50	69,50
2	18,00	4,00	89,00
2	44,00	2,50	69,50
2	44,00	2,50	36,71
2	70,00	4,00	89,00
2	44,00	2,50	102,30
2	44,00	2,50	69,50
2	70,00	1,00	89,00
2	44,00	0,00	69,50
2	87,73	2,50	69,50
2	0,27	2,50	69,50
2	18,00	1,00	50,00
2	70,00	1,00	50,00
2	70,00	4,00	50,00

## 2.6. Validación de los resultados del diseño experimental

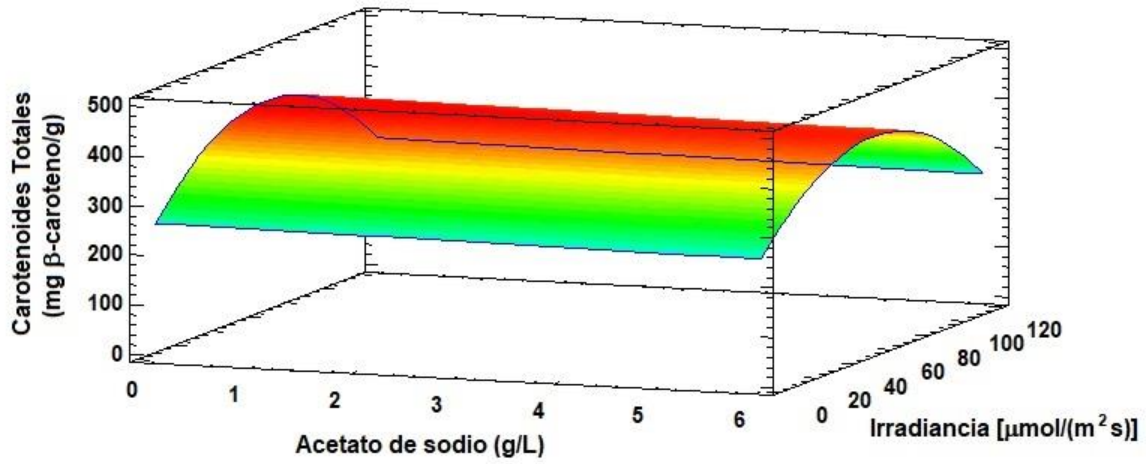
Con el fin de validar los resultados obtenidos en el análisis del diseño experimental, se llevaron a cabo ensayos experimentales por cuadruplicado con los valores de los factores que maximizaron la concentración de los componentes bioactivos. A continuación se compararon los valores predichos obtenidos para cada variable de respuesta en el diseño experimental y los resultados alcanzados experimentalmente.

## 3. Resultados y Discusión

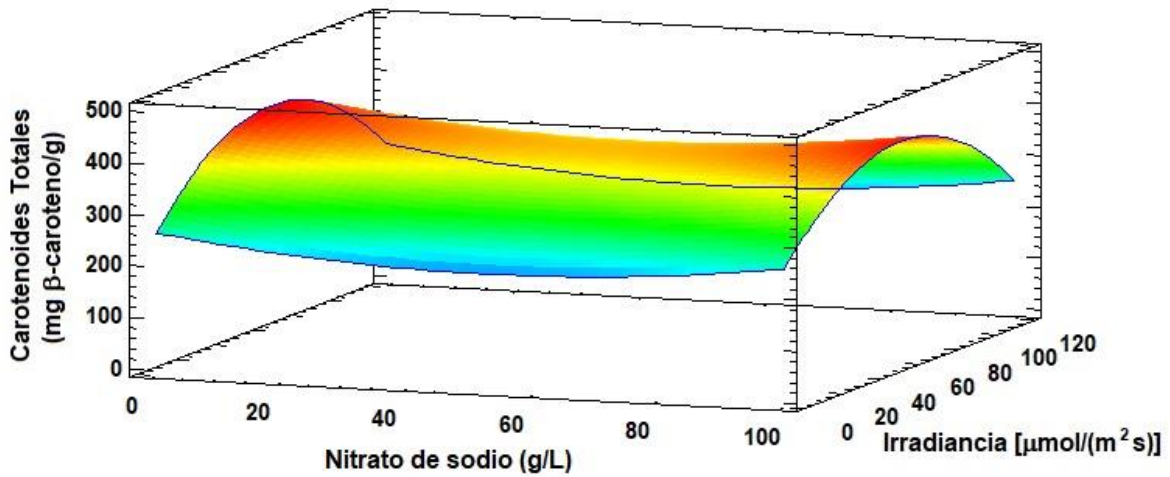
### 3.1. Efecto de los factores experimentales en la concentración de carotenoides totales

Las figuras 3, 4 y 5 muestran cómo fue la variación de los carotenoides totales en función de las variables experimentales cuando una de ellas se mantuvo en el valor óptimo. El contenido de carotenoides

totales varió entre  $244,08 \pm 38,88$  y  $385,43 \pm 0,42$  mg  $\beta$ -caroteno/g ms. El análisis estadístico señaló que tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta carotenoides totales la concentración de  $\text{NaNO}_3$  y la irradiancia en sus componentes lineal y cuadrática y la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  en su componente cuadrática. Los carotenoides totales aumentaron con el incremento de la irradiancia hasta los  $60,24 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , luego, mayores incrementos de este factor experimental provocó disminución de la concentración de esta variable de respuesta. Adicionalmente, la concentración más alta de carotenoides totales se obtuvo cuando al medio de cultivo se incorporó  $5,02 \text{ g/L}$  de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y  $0,27 \text{ g/L}$  de  $\text{NaNO}_3$ . La combinación de factores experimentales que maximizó la concentración de carotenoides totales se muestra en la Tabla 2. El valor óptimo obtenido en el análisis del diseño fue  $422,04 \text{ mg } \beta\text{-caroteno/g ms}$ .

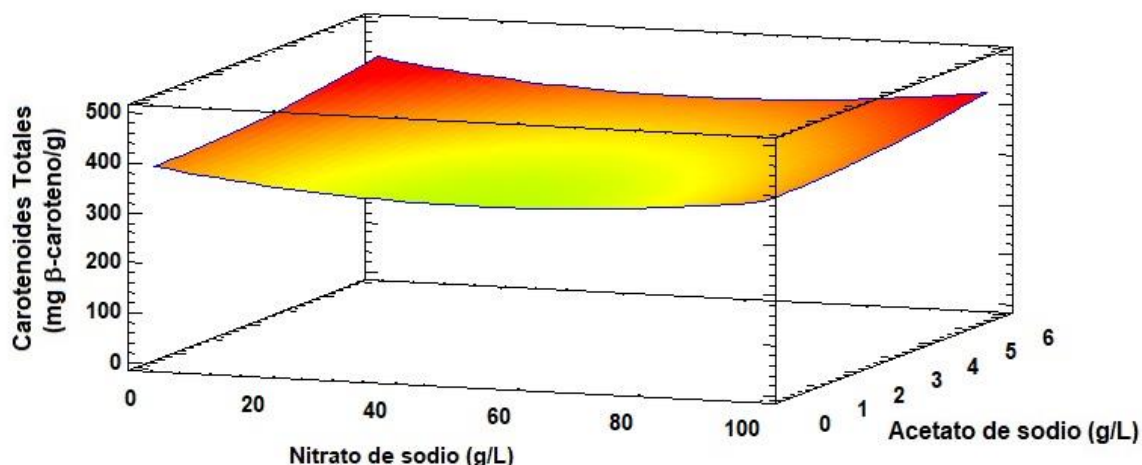


**Figura 3.** Contenido de carotenoides totales en función de la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia para una concentración de  $\text{NaNO}_3$  de 0,27 g/L.



**Figura 4.** Contenido de carotenoides totales en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  e irradiancia para una concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  de 5,02 g/L.





**Figura 5.** Contenido de carotenoides totales en función de las concentración de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  para una irradiancia de  $60,24 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ .

**Tabla 2.** Combinación de factores experimentales que maximizó la concentración de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales

Factor experimental	Carotenoides totales	Proteínas totales	Fenoles totales
$\text{NaNO}_3$ (g/L)	0,27	0,69	87,73
$\text{CH}_3\text{COONa}$ (g/L)	5,02	5,02	5,02
Irradiancia [ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ ]	60,24	54,71	45,04

La acumulación de carotenoides provocado por la baja concentración o deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo también fue observada por otros investigadores (Fábrega *et al.*, 1998), quienes en cultivo de *Haematococcus pluvialis* alcanzaron concentraciones de astaxantina de 49,5 mg/mL en condiciones de deficiencia de nitrógeno, intensidad de luz de 40 y 230  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$  y tiempos de cultivo de 12 d. Dado que valores más altos de astaxantina fueron obtenidos para baja y alta intensidad de luz, estos autores concluyeron que fue el efecto de estrés de deficiencia de nitrógeno lo que provocó el incremento de este carotenoide. En un estudio realizado por Dammak *et al.* (2018) con microalga

*Tetraselmis* sp. con 1,17 mM de nitrato de sodio y 0,054 mM de fosfato diácido de sodio obtuvieron un contenido de carotenoides de 0,3 mg/g.

La concentración de carotenoides alcanzada en la presente investigación fue muy superior a la publicada por los autores antes mencionados, lo que podría deberse a aspectos señalados por Fábrega *et al.* (1998), quienes indican que si los cultivos no se mantienen el tiempo suficiente, no se detecta ningún efecto de limitación de nitrógeno u otro tipo de estrés en la acumulación de carotenoides. Cabe recordar que el tiempo de cultivo para cada experiencia fue de 40 d. Por lo tanto, la limitación de nutrientes esenciales en el

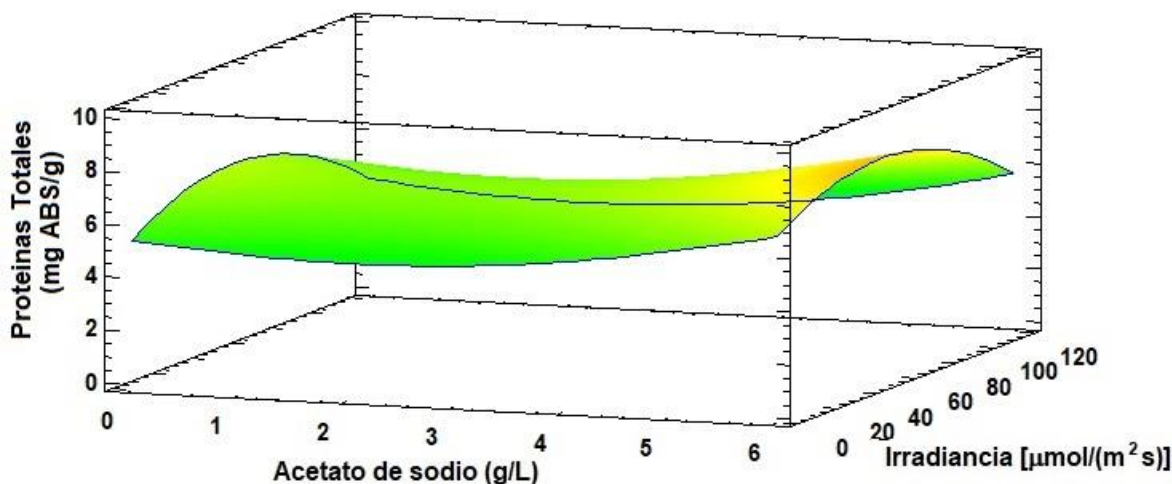
medio de cultivo, como el nitrógeno, y tiempos prolongados derivó en un aumento del contenido de metabolitos de interés; lo que constituye una estrategia tecnológica escalable a cultivos de mayor volumen (Benavente-Valdés *et al.*, 2016).

### 3.2. Efecto de los factores experimentales en la concentración de proteínas totales

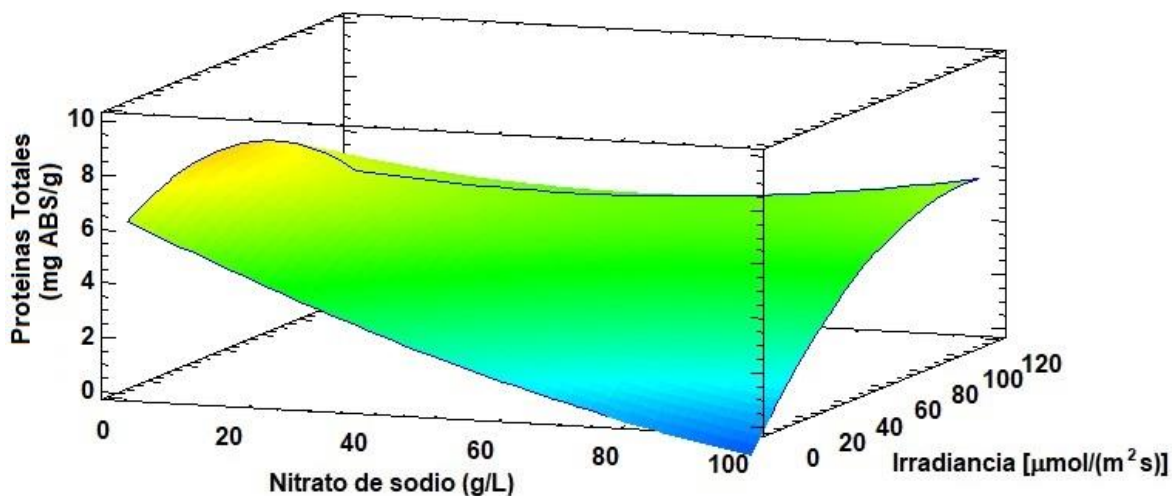
La concentración de proteínas varió en el rango de  $2,80 \pm 0,26$  -  $7,58 \pm 0,36$  mg ASB/g ms.

Los tres factores experimentales, concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia en sus componentes lineal y cuadrática, como así también las

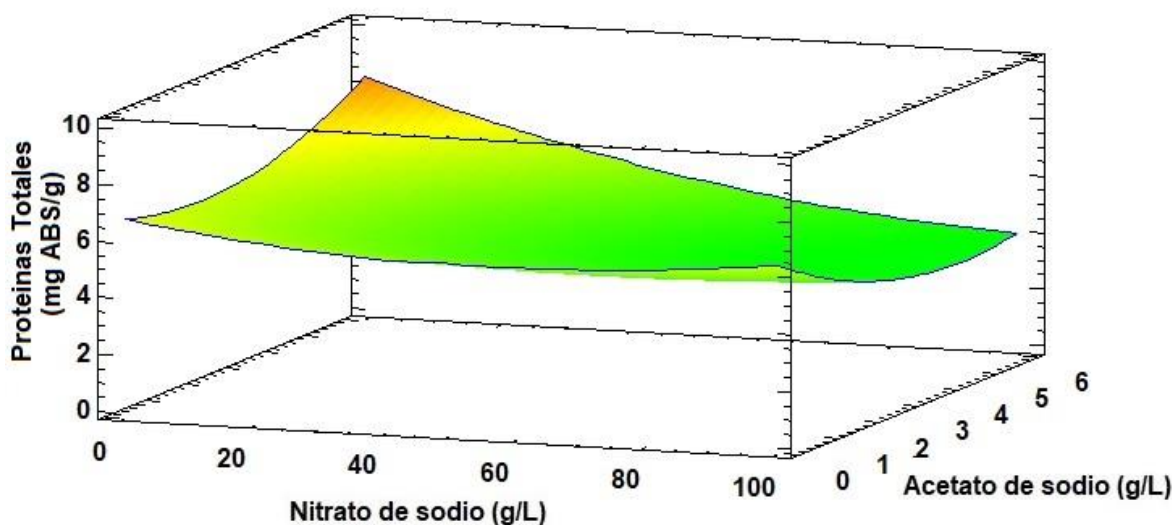
interacciones  $\text{NaNO}_3\text{-CH}_3\text{COONa}$  y  $\text{NaNO}_3\text{-irradiancia}$ , mostraron influencia significativa en la variable respuesta. Los valores más altos de proteínas se obtuvieron para bajas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y altas concentraciones de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Asimismo, esta variable aumentó con el incremento de la irradiancia hasta los  $54,71 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ , luego valores más altos de este factor derivó en menor concentración de proteínas (Figs. 6, 7 y 8). En la Tabla 2 se muestra la combinación de factores experimentales que maximizó la concentración de proteínas, cuyo valor óptimo fue  $7,34$  mg ASB/g ms.



**Figura 6.** Contenido de proteínas totales en función de la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia para una concentración  $\text{NaNO}_3$  de  $0,69$  g/L.



**Figura 7.** Contenido de proteínas totales en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  e irradiancia para una concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  de 5,02 g/L.



**Figura 8.** Contenido de proteínas totales en función de las concentración de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  para una irradiancia de 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ .

Quevedo *et al.* (2008) estudiaron la capacidad de la microalga *Scenedesmus* sp. para producir proteínas en medio de cultivo con 0,139 g/L de nitrógeno, fotoperiodo 12:12 h luz/oscuridad, intensidad lumínica

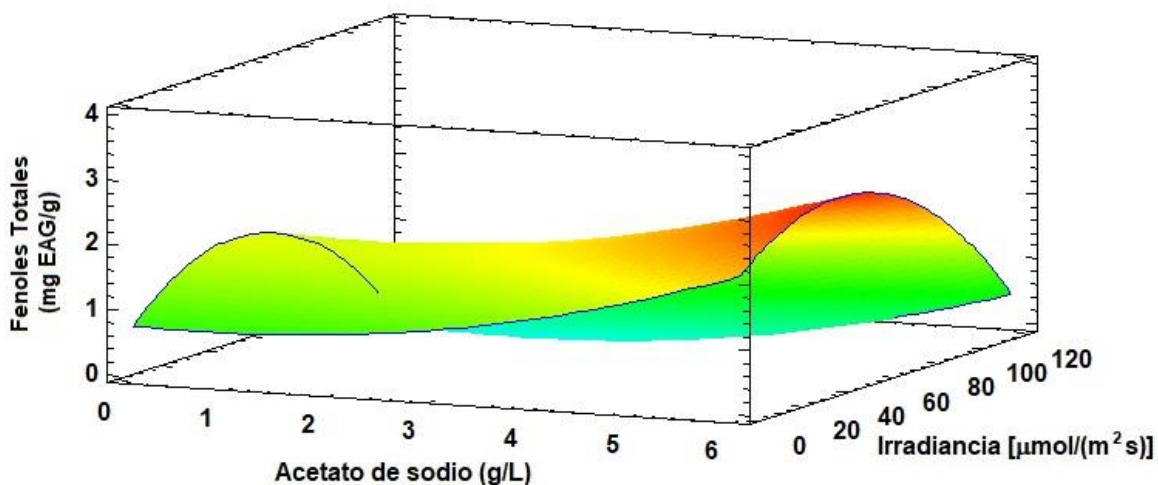
de 12  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$  y tiempo de cultivo de 40 d; obteniendo una concentración de proteínas de 138,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; valor que se corresponde con 0,41 mg/g ms. Se puede observar que la concentración de proteínas

alcanzada por los autores antes mencionados, fue 18 veces menor que la obtenida en la presente investigación en la que se trabajó con una concentración similar de nitrógeno (0,69 g/L de  $\text{NaNO}_3$  se corresponde con 0,114 g/L de nitrógeno) e igual tiempo de cultivo de 40 d; pero con fotoperiodo 16:8 h luz:oscuridad e irradiancia 54,71  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ .

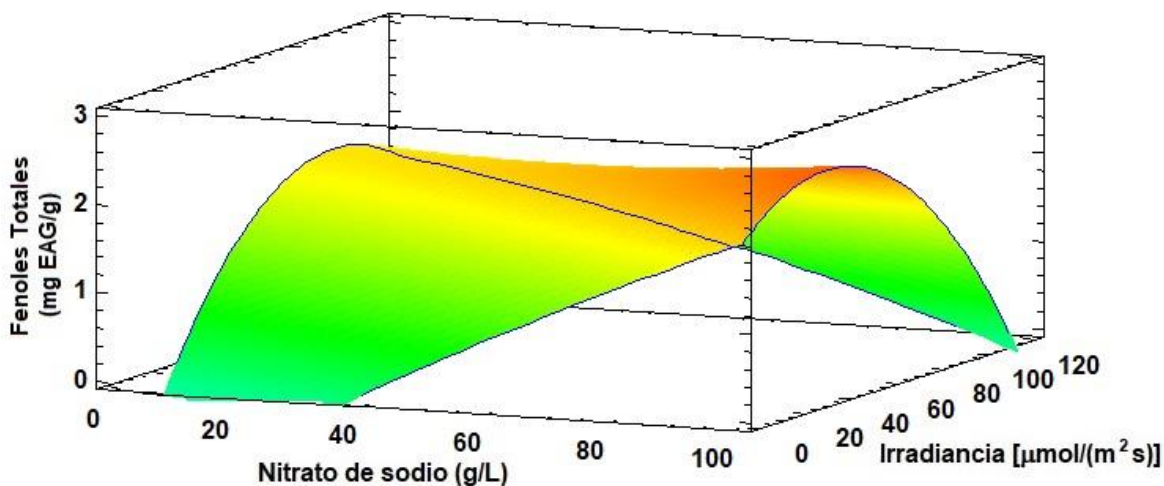
### 3.3. Efecto de los factores experimentales en la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles totales varió en el rango de  $0,92 \pm 0,04$  -  $2,34 \pm 0,12$  mg EAG/g ms. Para esta variable de respuesta, tuvieron un efecto significativo la concentración de  $\text{NaNO}_3$  en su componente lineal, la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e

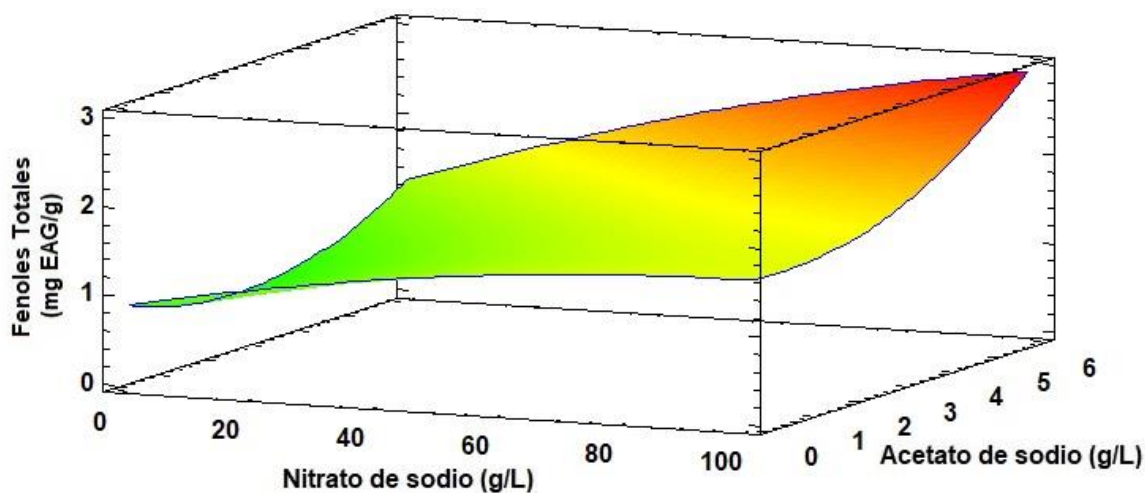
irradiancia en sus componentes lineal y cuadrática y la interacción  $\text{NaNO}_3$ -irradiancia. A medida que se trabajó con medios de cultivos con más altas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  se obtuvo mayor concentración de fenoles totales, mientras que esta variable de respuesta aumentó con el incremento de la irradiancia hasta los 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s})$ , luego disminuyó cuando los medios de cultivo fueron expuestos a valores más elevados de irradiancia (Figs. 9, 10 y 11). Se puede observar en la Tabla 2 la combinación de factores experimentales que maximizó la concentración de fenoles totales, la que se correspondió con el valor óptimo 2,31 mg EAG/g ms.



**Figura 9.** Contenido de fenoles totales en función de la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia para una concentración de  $\text{NaNO}_3$  de 87,73 g/L.



**Figura 10.** Contenido de fenoles totales en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  e irradiancia para una concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  de 5,02 g/L.



**Figura 11.** Contenido de fenoles totales en función de las concentración de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  para una irradiancia de 45,04  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ .

Estudios publicados (Gómez *et al.*, 2016) con las microalgas *Dunallia tertiolecta* y *Tetraselmis chuii* cultivadas, durante 8 días, en medio estándar F/2 de Guillard y Ryther ( $\text{NaNO}_3$ : 75 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 5 g/L,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ : 30 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :

3,5 g/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ : 4,36 g/L, metales trazas y vitaminas) en recipientes de vidrio transparente y de plástico azul con una irradiancia de 274,2  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , alcanzaron un máximo de fenoles totales de 1,54 y 1,52 mg EAG/g. Estas

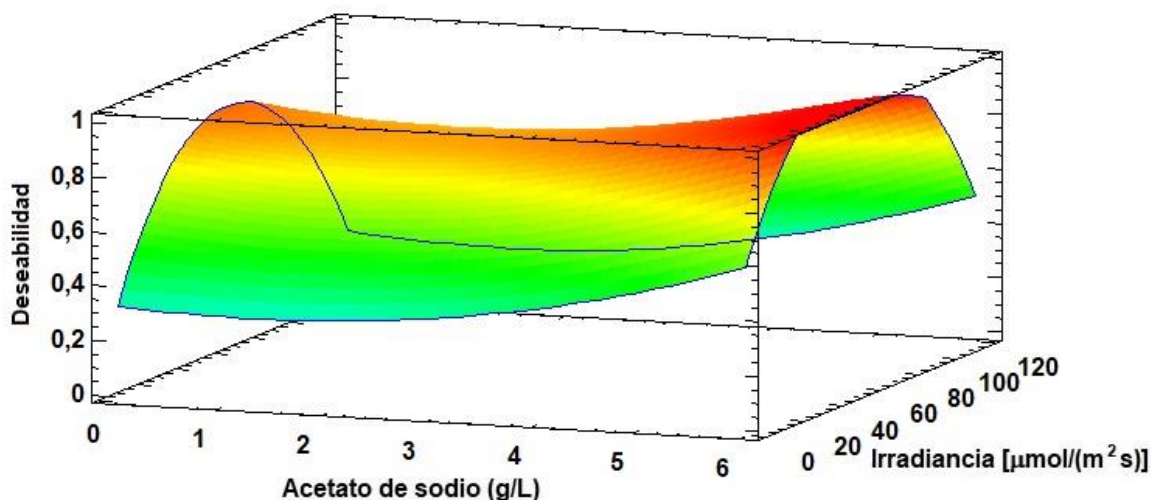
concentraciones de fenoles totales se correspondieron para las microalgas *Dunallia tertiolecta* cultivada en recipiente de vidrio transparente, lo que posibilitó el mayor paso de luz y para *Tetraselmis chunii*, cultivada en recipientes de plástico azul, lo que redujo la posibilidad de paso de luz. Para ambos casos, los valores de fenoles totales alcanzados en la presente investigación fueron un 40 % superior a los publicados por Gómez *et al.* (2016).

### 3.4. Condiciones experimentales que maximizaron las concentraciones de los componentes bioactivos

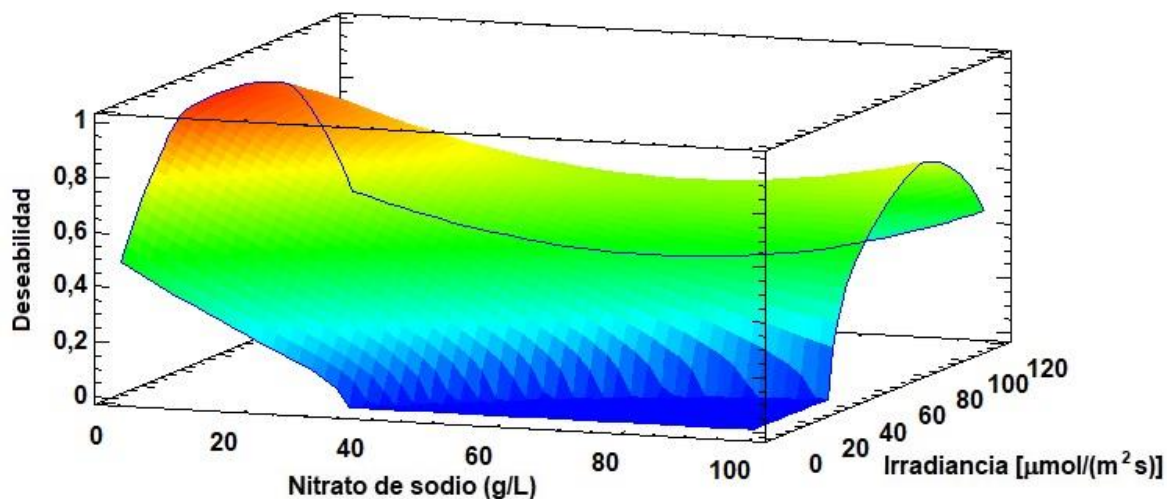
De lo expuesto anteriormente, se puede observar que las condiciones experimentales que permitieron maximizar la obtención de carotenoides totales y proteínas totales fueron similares, las que se correspondieron con bajas

concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ , altas concentraciones de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y valores intermedios de irradiancia. Sin embargo, para maximizar la concentración de fenoles totales se requirieron altas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$ . En consecuencia, se decidió, por un lado, tomar en cuenta la combinación de factores experimentales obtenida anteriormente (Tabla 2) para maximizar la concentración de fenoles totales; y por otro, obtener con la función deseabilidad la combinación de factores experimentales que maximicen las concentraciones de carotenoides totales y proteínas simultáneamente.

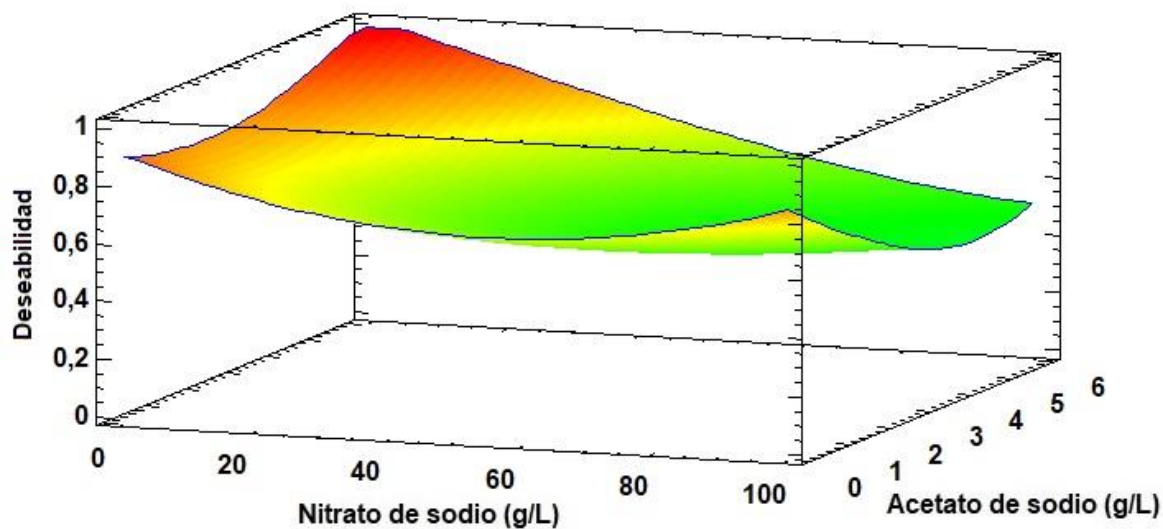
La función deseabilidad mostró valores más elevados para las concentraciones más altas ensayadas con acetato de sodio, concentraciones bajas de  $\text{NaNO}_3$  y valores intermedios de irradiancia (Figs. 12, 13 y 14).



**Figura 12.** Deseabilidad en función de la concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  e irradiancia para una concentración de  $\text{NaNO}_3$  de 0,69 g/L.



**Figura 13.** Deseabilidad en función de la concentración de  $\text{NaNO}_3$  e irradiancia para una concentración de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  de 5,02 g/L.



**Figura 14.** Deseabilidad en función de las concentración de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{CH}_3\text{COONa}$  para una irradiancia de  $54,71 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ .

En la Tabla 3 se muestra la combinación de factores experimentales que maximizó simultáneamente las concentraciones de carotenoides totales y proteínas totales. En las condiciones señaladas, las concentraciones óptimas de los componentes bioactivos señalados fue 419,91 mg  $\beta$ -

caroteno/g ms y 7,34 mg ASB/g ms; respectivamente. El valor de la función de deseabilidad fue 0,95; lo que señala que la combinación de factores experimentales obtenida es adecuada para maximizar estas variables de respuesta (Montgomery, 2013).

©The Author(s) 2020. This article is published with open access by *Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*

**Tabla 3.** Combinación de factores experimentales que maximizó simultáneamente la concentración de carotenoides totales y proteínas

Factor experimental	Valor óptimo
NaNO <sub>3</sub> (g/L)	0,69
CH <sub>3</sub> COONa (g/L)	5,02
Irradiancia [ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ ]	54,71

### 3.5. Validación de los resultados del diseño experimental

Posteriormente, se trabajó en la validación del diseño realizando ensayos en las condiciones experimentales señaladas en la Tabla 2 para fenoles totales y en la Tabla 3 para carotenoides totales y proteínas totales. En la Tabla 4 se pueden observar los valores predichos obtenidos para cada

variable de respuesta en el diseño experimental y los resultados alcanzados experimentalmente. Para carotenoides totales y fenoles totales se puede observar que los valores óptimos estuvieron comprendidos dentro de los rangos experimentales correspondientes, mientras que para proteínas, el valor experimental fue 20 % más bajo que el valor predicho.

**Tabla 4.** Concentraciones de componentes bioactivos obtenidos con el diseño experimental (valores predichos) y valores experimentales.

Valores	Carotenoides totales (mg $\beta$ -caroteno/g ms)	Proteínas (mg ASB/g ms)	Fenoles totales (mg EAG/g ms)
<b>Predicho</b>	419,91	7,34	2,31
<b>Experimentales</b>	410,34 $\pm$ 34,38	5,95 $\pm$ 0,22	2,51 $\pm$ 0,18

Las concentraciones de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales obtenidas experimentalmente fueron superiores a los publicados en la literatura consultada. Estos resultados, sumado al rápido crecimiento celular y a la simplicidad de requerimientos nutricionales de las microalgas, constituyen una potencial base biotecnológica para la obtención de metabolitos de alto valor biológico (Del Campo *et al.*, 2007).

## 4. Conclusiones

La presente investigación brinda información referida a la influencia de los factores experimentales evaluados que fueron las concentraciones de NaNO<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>COONa, así como la irradiancia, sobre la obtención de carotenoides totales, proteínas totales y fenoles totales en cultivos de microalga *Scenedesmus obliquus*. En la región experimental estudiada, los tres factores experimentales tuvieron un efecto significativo en las variables respuestas. El contenido de componentes bioactivos aumentó con el incremento de la irradiancia hasta alcanzar



un máximo, luego valores mayores de este factor derivaron en la obtención de cultivos con menores concentraciones de componentes bioactivos. Los valores más altos de carotenoides totales y proteínas se obtuvieron cuando se trabajó con concentraciones bajas de nitrato de sodio y altas de acetato de sodio, mientras que para fenoles totales se requirieron altas concentraciones de nitrato de sodio y acetato de sodio. La combinación de factores experimentales que permitió maximizar el contenido de carotenoides totales y proteínas fue: 0,69 g/L de  $\text{NaNO}_3$ , 5,02 g/L de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y una irradiancia de  $54,71 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ ; mientras que para fenoles totales, las mejores condiciones fueron  $87,73 \text{ g/L}$  de nitrato de sodio,  $5,02 \text{ g/L}$  de acetato de sodio y  $45,04 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$  de irradiancia. En las condiciones señaladas, se logró alcanzar  $410,34 \pm 34,38 \text{ mg } \beta\text{-caroteno/g ms}$ ;  $5,95 \pm 0,22 \text{ mg ASB/g ms}$  y  $2,51 \pm 0,18 \text{ mg EAG/g ms}$ . Por lo expuesto anteriormente, 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 utilizado como aditivo natural para formulación de alimentos.

## 5. Reconocimientos

Esta investigación fue llevada a cabo con financiamiento de la Universidad Nacional de Entre Ríos en el marco del proyecto de investigación PID-UNER 8100 "Obtención de componentes con propiedades bioactivas a partir de cultivos de microalga *Scenedesmus obliquus*".

*Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.*

## 6. Referencias

- Abdul-Adel, E., Saleh, M.M., Salman, J. M. 2019. Production of photosynthesis pigments by *Spirulina platensis* under different NaCl concentrations. *Plant Arch.* 19(2): 3254-3258.
- 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 Res.* 8: 30-36.
- Acién-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J. M., Molina-Grima. E. 2018. Contribución de las microalgas al desarrollo de la bioeconomía. *Mediterr. Econ.* 31: 309-332.
- Arredondo-Vega, B.O., 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.
- Asker, D., Awad, T.S. 2019. Isolation and characterization of a novel lutein-producing marine microalga using high throughput screening. *Food Res. Int.* 116: 660-667.

- Benavente-Valdés, R.J., Aguilera, C., Contreras-Esquivel, J.C., Méndez-Zavala, A., Montañez, J. 2016. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in *Chlorophyceae* species. *Biotechnol. Rep.* 10: 117-125.
- Caporgno, M.P., Mathys, A. 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Nutr. Food Sci. Technol.* 5: 1-10.
- Çelekli, A., Balci, M., Bozkurt, H. 2008. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresour. Technol.* 99(18): 8742-8747.
- Cerón, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G., Molina, E. 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(5): 1112-1119.
- 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 Am. J. Aqua. Res.* 40(1): 113-123.
- Dammak, M., Hadrich, B., Barkallah, M., Hentati, F., Ben-Hlima, H., Pichon, C., Denis, M., Fendri, I., Michaud, P., Abdelkafi, S. 2018. Modelling *Tetraselmis* sp. growth-kinetics and optimizing bioactive-compound production through environmental conditions. *Bioresour Technol.* 249: 510-518.
- Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M.G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(6): 1163-1174.
- Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D. G., Lamela, T., Otero, A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* 20(6): 623-626.
- Gómez, A.L., López, J.A., Rodríguez, A., Fortiz, J., Martínez, L.R., Apolinar, A., Enríquez, L.F. 2016. Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación. *Latin Am. J. Aqua. Res.* 44(1): 137-143.
- Jiménez-Veuthey, M., Vidal, M.N., Cabrera, C., Páramo, J., Bertoni, M., Bordet, H.F., Andrade-Belgeri, M.S., Flores, M.L., Zapata, L.M. 2018. A simple, efficient and economical method for isolation of *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyceae*) from freshwater sample (Embalse Salto Grande, Argentina). *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 20(2): 6-12.
- Montgomery, D.C. 2013. Response surface methods and designs. In: *Design and analysis of experiments*. 8<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons Inc. Pp.478-523.

- Ördög, V., Stirk, W.A., Bálint, P. Van Staden, J., Lovász, C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 24: 907-914.
- Quevedo, C., Morales, S.P., Acosta, A. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae.* 15(1): 25-31.
- Samkhaniyani, F., Najafpour, G.D., Ardestani, F. 2017. Evaluation of effective nutritional parameters for *Scenedesmus* sp. microalgae culturing in a photobioreactor for biodiesel production. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 14(5): 1037-1046.
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., Enzing, C. 2015. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci. Technol.* 42(1): 81-92.