

PROGRAMA DE APOYOPARA LA FORMACIÓN DE DOCENTES-INVESTIGADORES

Nombre del programa de posgrado: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Nombre de la Institución: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Vinculación a Proyectos I+D: PVCT18-103

Nombre del beneficiario: María Rebeca Dejesús Prieto Garcete

Vinculación docencia, tutoría o centro de investigación: INIDEP Mar del Plata-Argentina

Publicaciones realizadas durante el programa: 1

Título de tesis: Caracterización proximal, perfil lipídico e hidrólisis proteica de *Arthrospira platensis*

RESUMEN

En la actualidad, las microalgas han ganado un gran interés, ya que son fuente de importantes sustancias naturales y producen biomateriales que presentan diversas aplicaciones industriales. Se han analizados tres cepas de diferentes orígenes geográficos de *Arthrospira sp.* La *Arthrospira platensis* aislada de Laguna Capitán del chaco Paraguayo fue cultivada en fotobiorreactor tipo batch con medio Zarrouk en condiciones de 24 hs luz, 0,45 vvm e intensidad lumínica de 12.500 lm durante 75 días que generó un rendimiento de 5,82 gramos de biomasa por litro de cultivo. Las determinaciones realizadas para evaluar la composición proximal de las cepas fueron humedad, cenizas, proteínas y lípidos de acuerdo con los métodos oficiales (AOAC, 1990). Los lípidos fueron analizados por el método de Bligh y Dyer (1959) y el perfil de ácidos grasos fue evaluado mediante cromatografía gaseosa, para la cepa de *Arthrospira platensis* de origen Paraguayo se obtuvieron los valores de porcentaje de proteínas un 67,40%, grasas totales 5,69%, humedad 20,02% y cenizas 9,11%. Las cepas fueron sometidas a hidrólisis enzimática con tres proteasas comerciales Alcalase 2,4 L, Flavourzyme y una pepsina inmovilizada proveída por PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) de la ciudad de Tucumán, Argentina. Se analizaron la solubilidad y el peso molecular de los hidrolizados, en donde la solubilidad de la *Arthrospira platensis* fue de 33,864 mg/ml hidrolizada con Alcalase 2,4 L, los pesos moleculares variaron de 5kDa hasta 30 kDa con las tres proteasas. De acuerdo a la bibliografía se puede inferir que estos péptidos tienen un alto poder antioxidante y podrían tener actividad biológica para en tratamiento de diversas afecciones crónicas como la presión alta, inflamación intestinal y obesidad. También se ha detectado la presencia de ácidos grasos esenciales de acuerdo con el perfil lipídico, por lo que esta microalga podría ser utilizada como suplemento alimenticio o complemento nutricional.

Objetivo General

- Caracterizar químicamente la biomasa de cepas de *Arthrospira sp.* y estudiar hidrólisis enzimática de las mismas y su perfil lipídico.

Objetivos Específicos

- Obtener biomasa de *Arthrospira platensis* en condiciones controladas de cultivo
- Determinar la composición proximal de tres cepas de microalgas *Arthrospira platensis*.
- Realizar la hidrólisis proteica con tres proteasas diferentes de tres cepas de microalgas *Arthrospira sp.*
- Determinar el peso molecular de los péptidos resultantes de la hidrólisis proteica de tres cepas de microalgas *Arthrospira sp.*
- Determinar el perfil lipídico de las cepas *Arthrospira sp*

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

El aporte de este trabajo fue caracterizar mediante el análisis proximal de macronutrientes, una cepa de *Arthrospira platensis* del chaco paraguayo que aún no ha sido estudiada. Además se realizó la hidrólisis de ésta, utilizando diferentes proteasas y se evaluó los pesos moleculares de los péptidos generados y también, estas determinaciones también fueron realizadas sobre otras cepas de *Arthrospira sp* de diferentes orígenes geográficos.

METODOLOGIA

Biomasa

Para realizar este trabajo se utilizaron tres cepas de microalgas, una cepa comercial *Arthrospira sp* de argentina, y una cepa *Arthrospira sp* de origen chilena que fue donada por el INIDEP (Instituto Nacional de Desarrollo Pesquero) de Mar del Plata-Argentina. La *Arthrospira platensis* nativa del Paraguay fue aislada del Chaco paraguayo e identificada molecularmente por Villalba et al., (2018). La *Arthrospira platensis* de origen paraguayo, fue cultivada en el laboratorio de biotecnología ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción. Las condiciones de cultivo se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología de Huarachi et al. (2015) con ligeras modificaciones, con fotoperiodo de 24 horas luz a una temperatura de 25°C ± 2°C con un pH 9 en medio de cultivo Zarrouk



Figura 1. *Arthrospira platensis* nativa del Paraguay.

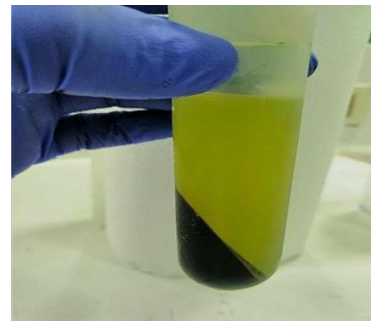


Figura 2. Biomasa de *Arthrospira platensis* cosechada

Análisis proximal

Para la caracterización de las cepas se utilizó 1 g en peso seco de biomasa. La humedad se cuantificó mediante desecación en estufa a temperatura de 105°C hasta peso constante (AOAC, 952.08; 1990) y también las cenizas se determinaron por 25 calcinación en mufla a 550°C de temperatura, hasta la obtención de cenizas blancas y peso constante (AOAC, 938.08; 1990). Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl usando el factor de conversión 6,25 (AOAC, 24.027; 1984). Se realizó la determinación de grasas por el método de Randall (AOAC, 1990).

Proceso de hidrólisis

La hidrólisis proteica de las cepas de *Arthrospira sp* se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Lisboa et al., (2016) y Martínez et al., (2015) con modificaciones menores. Para las hidrólisis enzimáticas se emplearon enzimas comerciales líquidas que fueron Alcalase 2,4 L, Flavourzyme y una pepsina inmovilizada, desarrollada en el PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) de la ciudad de Tucumán Argentina

Electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para identificar los tamaños de los péptidos generados por la digestión enzimática se realizó una corrida de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La misma se llevó a cabo usando una relación de acrilamida / bisacrilamida (37, 5: 1) de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (1970).

Perfil lipídico

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de las cepas se llevó a cabo mediante metilación alcalina en frío de los mismos y posterior cromatografía gaseosa (ISO 12966-2:2011).

RESULTADOS

Análisis proximal

Los valores proporcionan una información bioquímica rigurosa que detalla las bondades de las cepas analizadas y ayuda a decidir las posibles aplicaciones a las cuales podrían ser destinadas.

Composición de proximal de cepas de *Arthrospira sp*

	<i>Arthrospira platensis.</i>	<i>Arthrospira sp. argentina</i>	<i>Arthrospira sp. chilena</i>
Proteínas totales	67,40	63,55	73,69
Grasas totales	5,69	3,11	6,85
Humedad	20,02	9,11	6,37
Cenizas	9,11	7,43	6,31

Los valores de la tabla están expresados en porcentajes

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

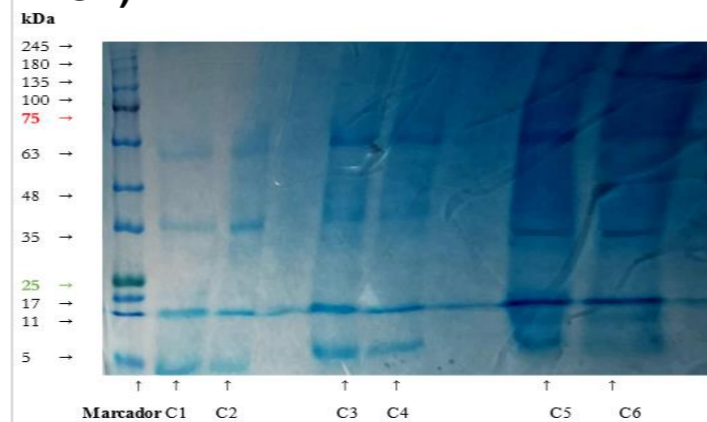


Figura 3. Gel SDS-PAGE de *Arthrospira platensis*

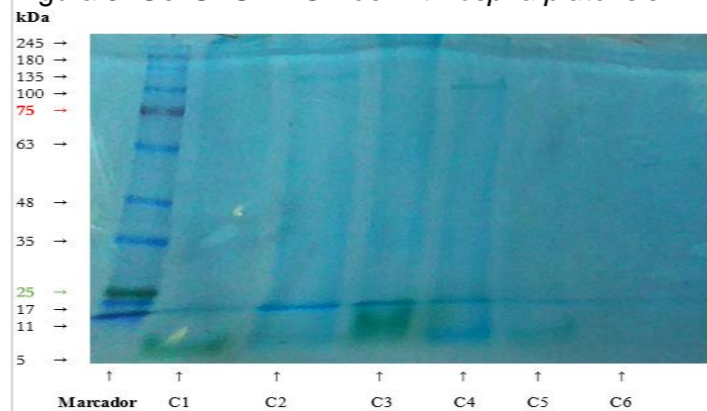


Figura 4. Gel SDS-PAGE de *Arthrospira sp* de origen argentino.

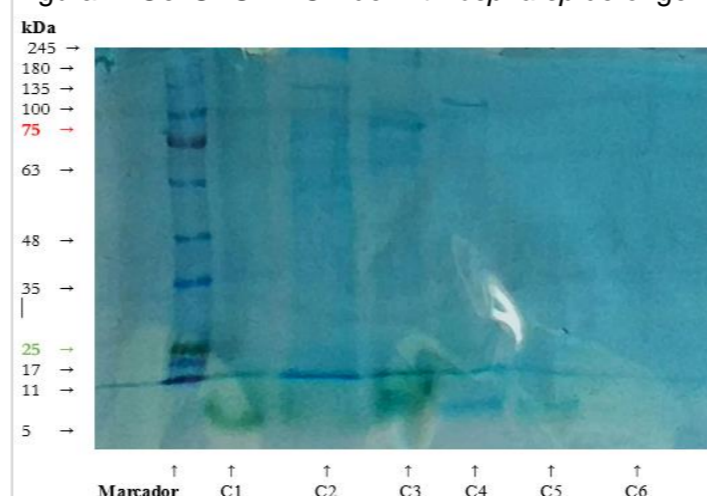


Figura 5. Gel SDS-PAGE de *Arthrospira sp* de origen chileno.

De acuerdo con el genoma de *Arthrospira platensis* y el estudio proteómico se han identificado 593 secuencias de proteínas (Chang et al., 2017; Matallan et al 2014), las diez proteínas más abundantes representan el 26,2% de las proteínas totales identificadas, las cuales están relacionadas con el sistema fotosintético. De acuerdo con un análisis in silico de digestión con pepsina se han identificado 78 posibles péptidos con actividad biológica como regular la presión arterial, actividad antioxidante, actividad antibacteriana y regulador de los niveles de azúcar en sangre. (Li et al., 2020), los tamaños de los péptidos bioactivos pueden variar desde 440 Da a mayores a 10 kDa. De acuerdo con el reporte de Li et al., (2020), y las bandas observadas en las figuras 3, 4 y 5, se puede inferir la posible presencia de péptidos con dichas actividades.

Perfil Lipídico

En este reporte se registra que la cepa *Arthrospira platensis* en las condiciones de cultivo utilizadas, produce ácidos grasos de carácter esencial como el 18:2n6, linoleico (ω-6) en un 5,95%; 18:3n3, γ -linolenico (ALA) en un 1,66 %; 18:3n6, γ -linolenico (GLA) en un 1,89%; 20:5n3, eicosapentanoico (EPA) en un 4,10% y 22:6n3, decosahexaenoico (DHA) en un 3,12%, lo que concuerda con los reportes de Santos et al., (2018); El et al., (2018) y Licett et al (2014). De la misma manera, la alta concentración del 16:00, ácido palmítico en un 10, 69% concuerda con los reportes de El et al., (2018) y Nicolai et al., (2019). La alta producción de este ácido graso es característico en esta especie y se evidencia en las otras dos cepas estudiadas (Golmakani et al., 2012).

CONCLUSIÓN

Para la cepa de *Arthrospira platensis* de origen Paraguayo objeto estudio de este trabajo se obtuvieron los siguientes valores: porcentaje de proteínas 67,40%, grasas totales 5,69%, humedad 20,02% y cenizas de 9,11 %. Las cepas fueron sometidas a hidrólisis enzimática con tres proteasas comerciales Alcalase 2,4 L, Flavourzyme y una pepsina inmovilizada proveída por PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) de la ciudad de Tucumán Argentina. Se analizó el peso molecular de los hidrolizados, siendo para la *Arthrospira platensis* con Alcalase 2,4 L, y los pesos moleculares variaron de 5kDa hasta 30 kDa con las tres proteasas. Estos resultados indicarían la presencia de péptidos de diferentes pesos moleculares post hidrólisis respecto a la muestra original, que de acuerdo a la bibliografía se puede inferir que tienen un alto poder antioxidante y podrían tener actividad biológica para el tratamiento de diversas afecciones crónicas como la presión alta, inflamación intestinal y obesidad. También se ha detectado la presencia de ácidos grasos esenciales, destacándose el Eicosapentanoico (EPA) Decosahexaenoico (DHA) de acuerdo con el perfil lipídico de cada cepa. Estos resultados sugieren que esta microalga podría ser utilizada como suplemento alimenticio o complemento nutricional.

VISIÓN Y PLANES FUTUROS

En base a los análisis realizados en este trabajo se recomienda continuar la línea de investigación referida a la composición química y nutricional de la cepa de *Arthrospira platensis* de origen Paraguayo. Ampliar el perfil bioquímico de la cepa de en cuanto al contenido de aminoácidos, acrecentaría el conocimiento de la fracción proteica de la muestra y sus potenciales propiedades.

“Este programa de posgrado fue cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT con recursos del FEEI”