

# ATX PLUS: INDUSTRIAL VALIDATION OF A NEW BIOPROCESS FOR ASTAXANTHIN ACCUMULATION VIA NON-AUTOTROPHIC INDUCTION IN *HAEMATOCOCCUS LACUSTRIS* FOCUSED IN THE NUTRACEUTICAL INDUSTRY.

Landahur-Escalona, Chris<sup>1</sup>; Latorre-Castañeda, Mónica<sup>1</sup>; Pavón-Perez, Jessy<sup>1,4</sup>; Henríquez-Poblete, Adolfo<sup>1,3</sup>; Donoso-Youlton, Andrea<sup>1</sup>; Contreras-Perez, David<sup>2,3</sup>; Agurto-Muñoz, Cristian<sup>1,4</sup>

1. Grupo Interdisciplinario de Biotecnología Marina (GIBMAR). Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Biobío, Chile. 2. Laboratorio de Recursos renovables. Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Biobío, Chile. 3. Laboratorio de Oxidación Avanzada y Química Verde. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Biobío, Chile. 4. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CyTA), Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción, Concepción, Biobío, Chile

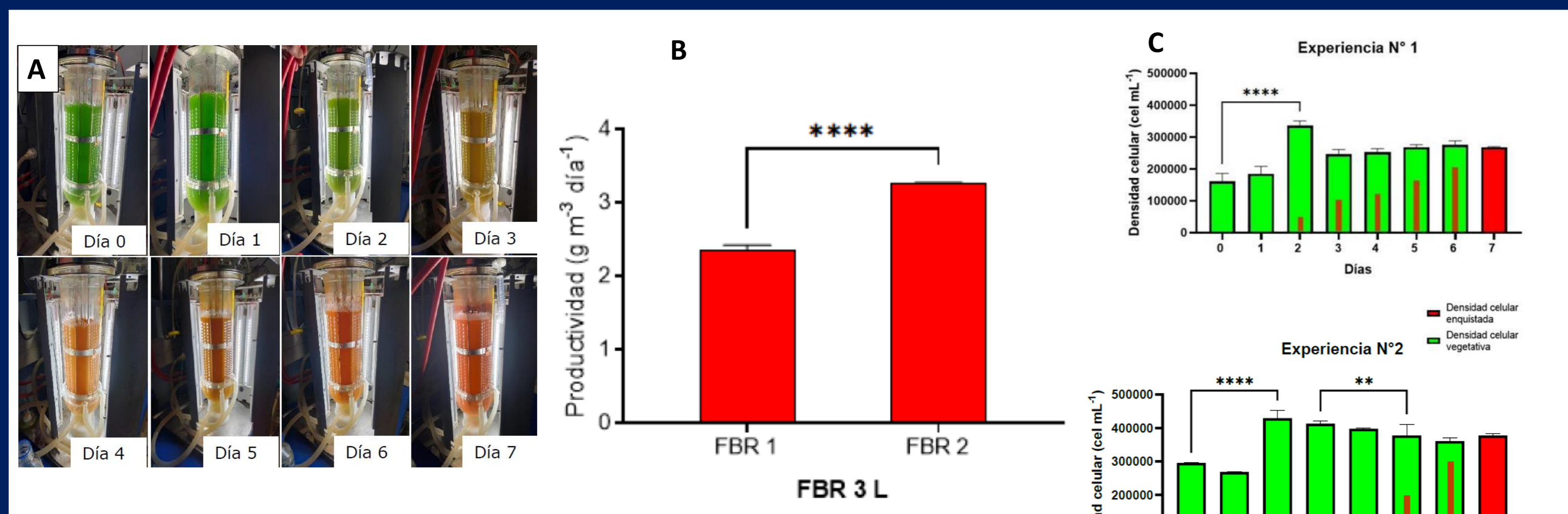


Fig. 1 Bioproceso de inducción de acumulación no autotrófico en FBR de 0,5 m<sup>3</sup> (izquierda), densidad celular de *H. lacustris* y contenido de ATX obtenida expresada en términos de productividad (g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (derecha).

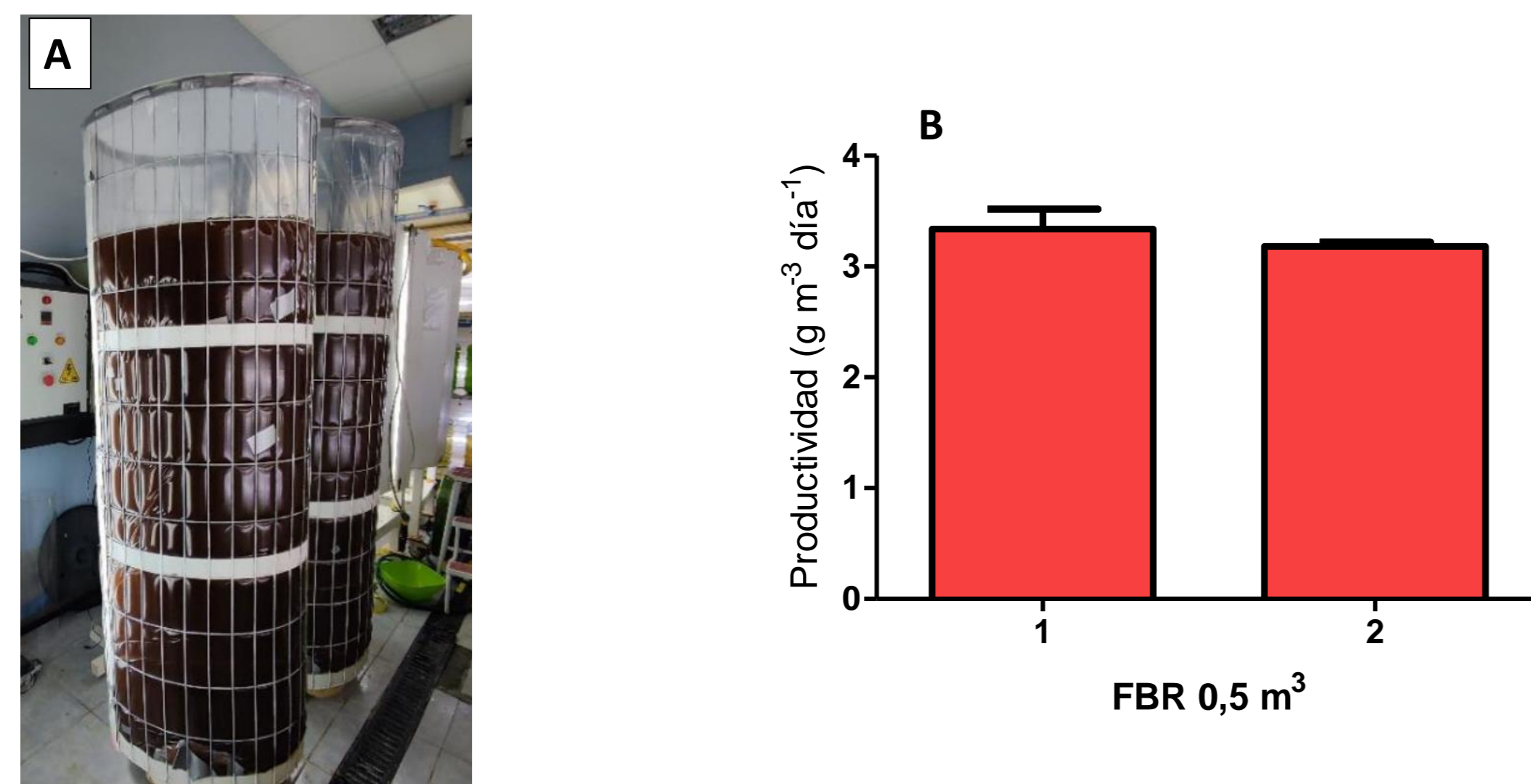


Fig. 2 Bioproceso de inducción de acumulación no autotrófico en FBR de 0,5 m<sup>3</sup> (izquierda) y contenido de ATX obtenida expresada en términos de productividad (g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (derecha).

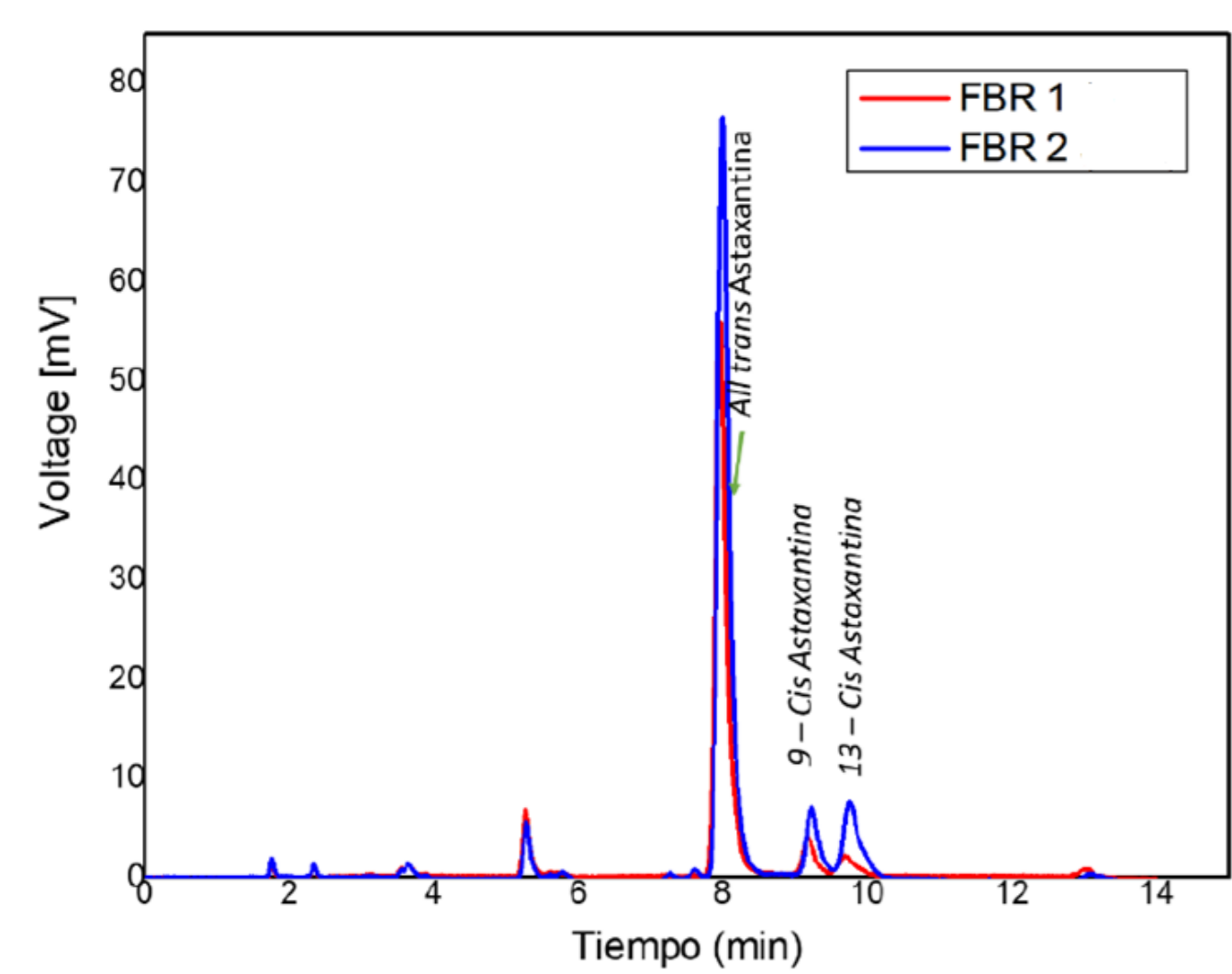


Fig. 3 Cromatograma de la ATX obtenida de las experiencias del bioproceso de inducción en FBRs de 0,5 m<sup>3</sup>

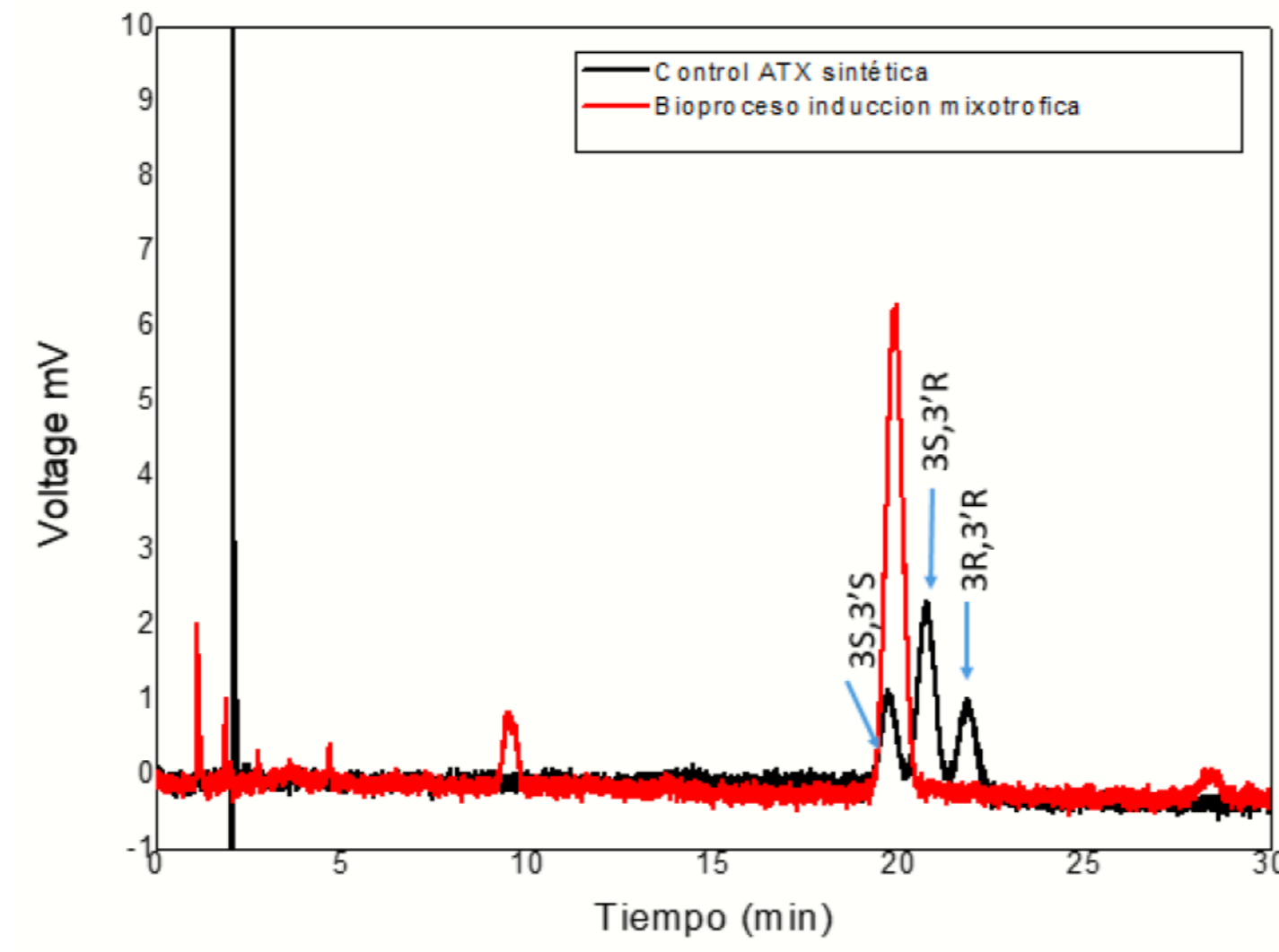


Fig. 4 Cromatogramas de estereoisómeros de ATX. Comparación entre el estándar de ATX y las experiencias en FBRs de 0,5 m<sup>3</sup>.

Tabla I: Resumen comparativo de la capacidad antioxidante de la ATX de *H. lacustris* obtenida del control autotrófico y del bioproceso de inducción mixotrófico

Cultivos	EPR - DPPH	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC
Estándar ATX	Integrated EPR signal intensity (% from control) (n=4)	µM Trolox Equivalente (n=4)	µM Trolox Equivalente (n=4)	µM Trolox Equivalente (n=4)	µM Trolox Equivalente (n=4)
FBR 1	46,381±7,79	132,939±8,46	91,90±5,9	473 ±5,29	405±12,81
FBR 2	19,861±10,77	118,61±12,82	180,05±1,19	474,33±2,66	374,98±3,47
FBR 2	29,388±8,848	141,93±12,40	185,28±12,86	429,22±27,57	386,31 ±3,65

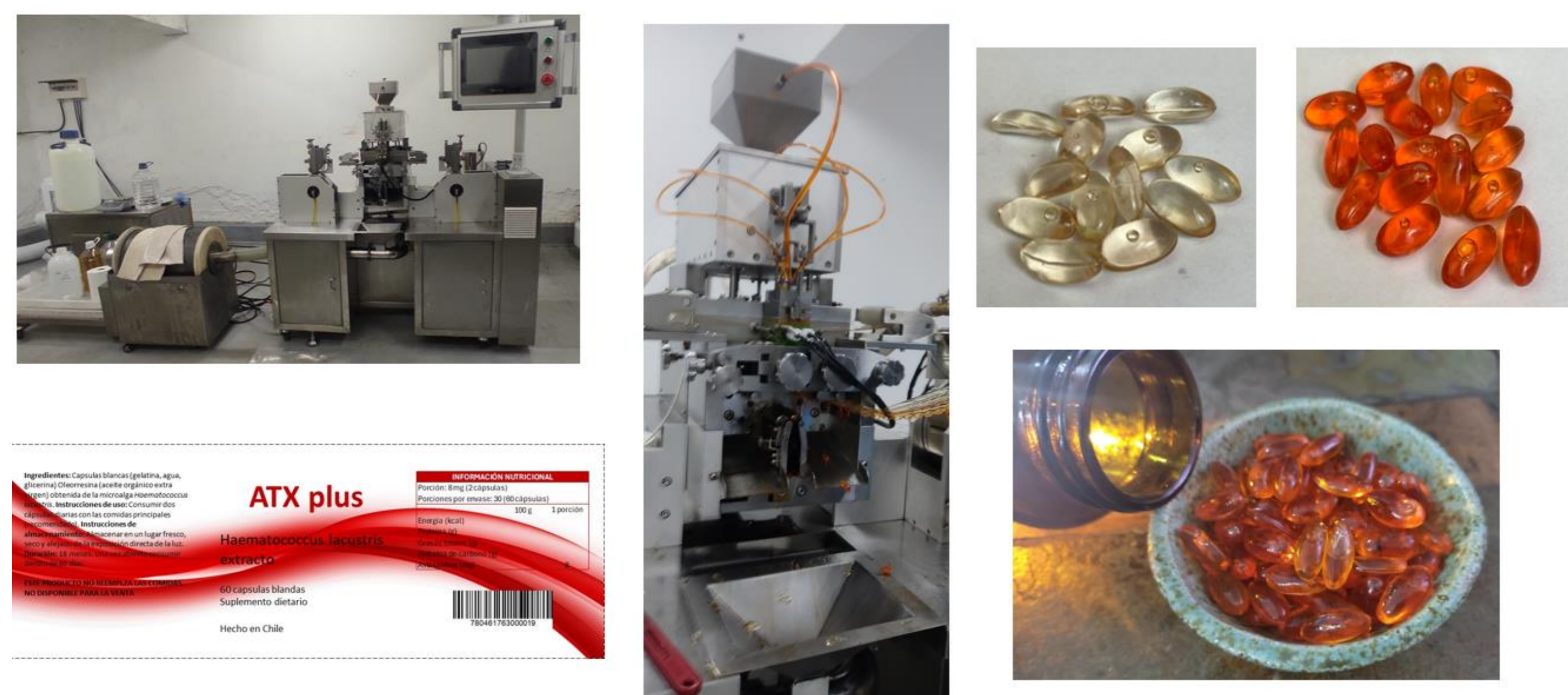


Fig. 5. Primeros prototipos de cápsulas blandas tipo softgel de astaxantina, obtenidas a partir de la oleoresina extraída de la biomasa obtenida tras el bioproceso de inducción desarrollado y validado a 0,5 -1m<sup>3</sup>

## AGRADECIMIENTOS:

Se agradece a la Agencia Nacional de Investigación y desarrollo de Chile (ANID) por el financiamiento otorgado a través del proyecto ID181-1059 "Desarrollo de un nuevo Bioproceso de acumulación de astaxantina vía inducción no autotrófica en *Haematococcus lacustris* para la industria nutracéutica", CONICYT-FONDECUIP EQM180201(2018-2021). Unidad modular de extracción de fluidos supercríticos y subcríticos para compuestos bioactivos. Una herramienta versátil para el uso multidisciplinario en las ciencias fundamentales y aplicadas, proyecto IT21-0058 "ATX PLUS: Validación industrial de un nuevo bioproceso de acumulación de astaxantina vía inducción no autotrófica en *Haematococcus lacustris* para la industria nutracéutica" y a la beca de doctorado nacional año 2021, ID: 598055.

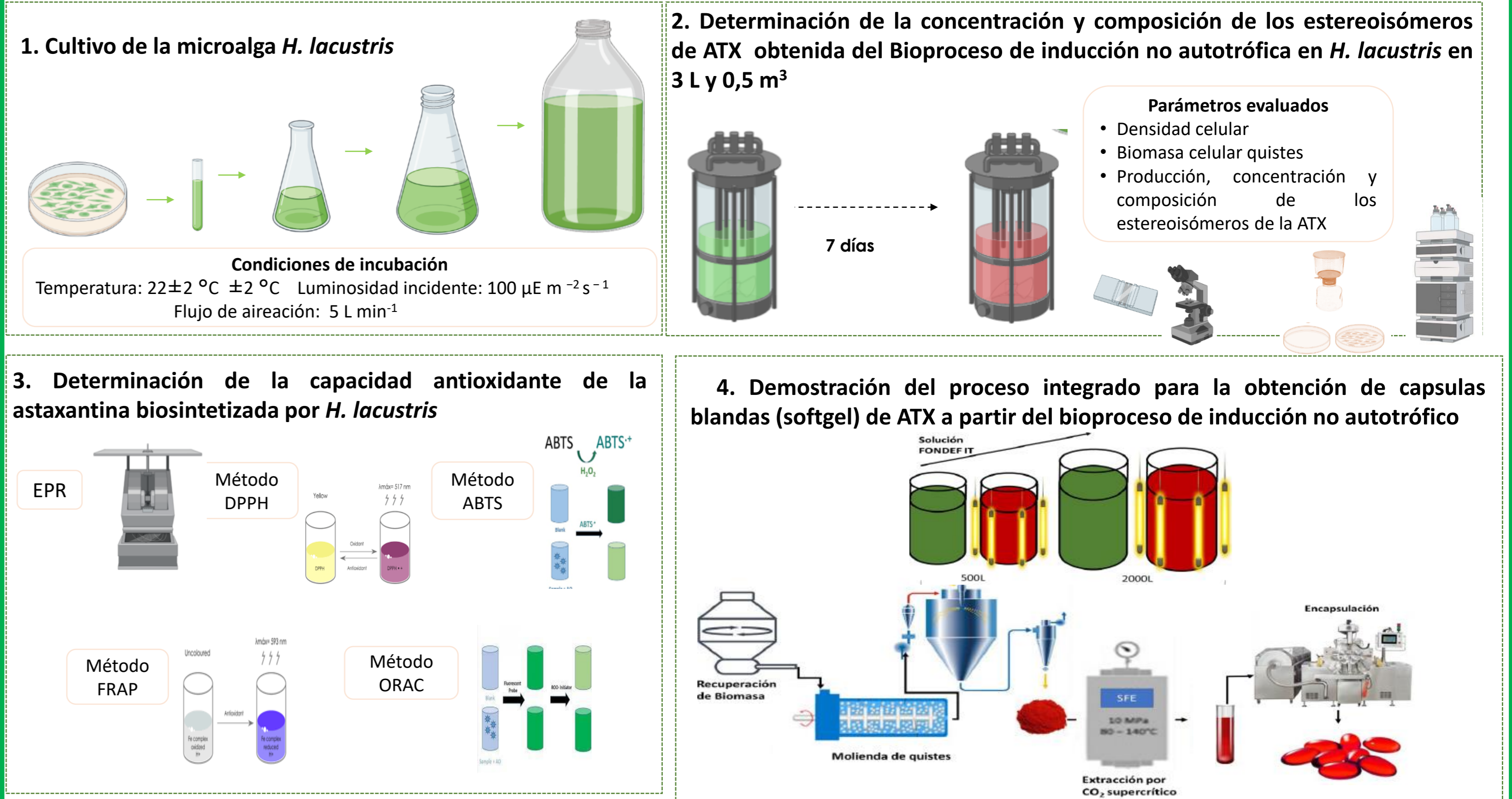
## ABSTRACT

Astaxanthin (ATX) is a carotenoid biosynthesized by the green microalga *Haematococcus lacustris*. It is used as a food, nutraceutical, and pharmaceutical product due to its high antioxidant power, sunscreen properties, triglyceride reduction, and its contribution to treatments against aging and chronic inflammations, generating a high demand. In Chile, the natural production of this carotenoid occurs under autotrophic conditions. However, the major disadvantage of this process is the high production costs resulting in low productivities (<0.18 g ATX·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>) and low astaxanthin content (<2%), which fail to meet the global demand for ATX. Therefore, in the FONDEF ID181-10259 project, non-autotrophic induction parameters were evaluated and selected to enhance ATX accumulation in two strains of *H. lacustris*, leading to the development of a new non-autotrophic inductive bioprocess for ATX production. This process showed a productivity of 3.14 g ATX·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> (17.4 times the ATX productivity) compared to the average annual industrial productivity. Additionally, as verified through analytical and functional techniques, the bioprocess did not affect the composition of ATX stereoisomers, nor its antioxidant capacity (CAO). Currently, in the FONDEF IT2110058 project, the bioprocess is being optimized and scaled up to an industrial level at 0.5 and 2 m<sup>3</sup> to validate and integrate it into the productive chain of the nutraceutical industry, producing softgel capsules of ATX under GMP conditions

## INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son moléculas que contribuyen al sistema de defensa antioxidante biológico para proteger a las células de los efectos nocivos de la oxidación y prevenir el estrés oxidativo. Entre los antioxidantes naturales, los carotenoides (carotenos y xantófilas) son agentes de protección contra el daño producido por las especies reactivas, generando un rol preventivo frente a las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), retrasando el envejecimiento y la degeneración macular, modulando la respuesta inmune y modificando procesos inflamatorios (1). La ATX es un pigmento carotenoide (C40) liposoluble de la familia de las xantófilas, que se conoce químicamente como 3,3'-dihidroxi-β, β-caroten-4,4'-diona. Entre las fuentes naturales de ATX, la biosintetizada por la microalga verde *H. lacustris* (2) es de mayor calidad debido a los isómeros que produce (3S, 3'S). Además, está clasificada como "nuevo alimento", por la FSA, reconocida como "GRAS" por la FDA y su uso está autorizado por la EMA (3), sin embargo, esta microalga presenta una baja productividad de ATX, debido a factores como un lento crecimiento, baja concentración celular y alta susceptibilidad a daños hidrodinámicos. En la actualidad, la producción de ATX natural se realiza a través del cultivo e inducción de *H. lacustris* bajo condiciones autotróficas (usando nutrientes inorgánicos, luz y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono inorgánico), requiriendo grandes extensiones de terreno, prolongados tiempos de cultivo (21 a 27 días) e inducción de acumulación de ATX (15-45 días) y elevados costos en operación que no satisfacen la demanda mundial. Por esta razón, el proyecto Fondef ID181-10259, tuvo como objetivo el desarrollo, implementación, optimización y escalamiento a nivel piloto de un nuevo bioproceso de inducción de acumulación de ATX por vía no autotrófica para aumentar la producción de ATX en sólo 7 días. Actualmente, en el proyecto Fondef IT211-0058 se está validando a escala industrial (0,5 y 2 m<sup>3</sup>) el bioproceso desarrollado y la integración del mismo en la cadena productiva industrial para la elaboración de cápsulas blandas (softgel) como producto final. Con la tecnología desarrollada y validada se generará un bajo impacto ambiental, alta productividad de ATX, periodos cortos de inducción (7 días) en condiciones controladas, sin variabilidad estacional e independencia geográfica.

## METODOLOGÍA:



## RESULTADOS:

En la fig. 1 y 2 se observa el bioproceso de inducción no autotrófico desarrollado para la producción de ATX a partir de *H. lacustris* en 3 L y 0,5 m<sup>3</sup>. En cuanto al análisis estadístico, en la fig. 1B se aprecian diferencias altamente significativas entre las productividades obtenidas en las experiencias. Estas diferencias son consistentes, ya que como se observa en la fig. 1C una mayor densidad celular, genera una mayor productividad de ATX. En el caso de las experiencias (fig. 2A) de bioproceso en 0,5 m<sup>3</sup>, como se observa en la fig. 2B no hay diferencias significativas, generando productividades promedio de 3,26 g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

En la fig. 3 se pueden observar los cromatogramas resumen de las corridas en fase normal para identificar los isómeros geométricos y cuantificar isómero all-trans. En la fig. 4 se aprecia que no existen cambios en los isómeros ópticos de la ATX obtenida desde *H. lacustris*, destacándose que el isómero óptico presente en un 100% correspondía a 3S,3'S. Con respecto a los análisis de capacidad antioxidante (CA) realizados a la ATX obtenida tras el bioproceso de inducción desarrollado y validado a una escala semi-comercial, en la tabla 1 se puede apreciar que en el análisis por EPR-DPPH se obtuvo una mayor CA de la ATX obtenida de las experiencias en FBRs de 0,5 m<sup>3</sup>, con respecto al estándar de ATX y en los otros 4 análisis (DPPH, ABTS, FRAP y ORAC) no se encontraron diferencias significativas (Bonferroni; Tukey (P > 0,05)). Finalmente, como se puede apreciar en la fig. 5, se ha logrado obtener los primeros prototipos de cápsulas blandas tipo softgel con ATX a partir de la biomasa de *H. lacustris*.

## CONCLUSIÓN:

Se desarrolló exitosamente un bioproceso de inducción no autotrófico de acumulación de ATX en *H. lacustris* (Solicitud de patente nacional ante INAPI:202102361), (Solicitud PCT/CL2021/050083), (Solicitud de patente nacional en España N°202490017) y (Solicitud de patente nacional en México N°2024/4351) que incrementa al menos 17 veces las productividades obtenidas para la industria tradicional autotrófica en Chile, en tan sólo 7 días.

Se determinó que el escalamiento entre 0,5 y 2 m<sup>3</sup> del bioproceso no generó cambios en el perfil de isómeros ópticos (3S,3'S) y geométricos (all-trans) y se comprobó que la capacidad antioxidante de la ATX obtenida del bioproceso se mantiene o supera al estándar de ATX en los ensayos ejecutados (EPR, ORAC, DPPH, FRAP, ABTS).

Se han obtenido a la fecha, los primeros prototipos de cápsulas blandas tipo softgel de ATX (4 mg) en Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: [1] Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., Heredia, F. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 54:2. [2] Nakada, T. & Ota, S. (2016). What is the correct name for the type of *Haematococcus* Flot. *Taxon*. 65: 343-348. doi.org/10.12705/652.11. [3] Guerin, M., Huntley, M.E., Olazola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 5:210-216. doi: 10.1016/S0176-7799(03)00078-7.