

Optimización para la extracción de ficocianina de la cianobacteria *Spirulina maxima*

Sada-Borrego Carlos^{1*}, García-Gómez Celestino¹, Guajardo-Barbosa Claudio², Márquez-Reyes Julia¹, Nápoles-Armenta Juan¹, Beltrán-Rocha Julio¹.

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Av. Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda el Canadá, C.P. 66050, General Escobedo, Nuevo León, México.

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Calle Pedro de Alba, Niños Héroes, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C.P. 66450.

* carlos.sadab@uanl.edu.mx

RESUMEN

El uso de *Spirulina maxima* para la formulación de alimentos funcionales ha aumentado en los últimos años por sus propiedades y beneficios a la salud. Además, es de interés la utilización de la ficocianina de *S. maxima* por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos, actuando directamente en la reducción del estrés oxidativo, la apoptosis y los procesos inflamatorios en modelos in vivo. Sin embargo, uno de los problemas del uso de la ficocianina en alimentos es optimizar la extracción a una máxima concentración y con una buena estabilidad (Jaeschke, 2021), ya que las metodologías existentes consumen mucho tiempo y no proporcionan una materia prima con una buena concentración, haciendo que el proceso de extracción sea costoso y laborioso. En este trabajo se propuso trabajar con un método de extracción en buffer de fosfatos con agitación (Li, 2020) por su sencillez, teniendo como objetivo la optimización de los parámetros del proceso (temperatura, pH, agitación, cantidad de solvente y tiempo) para maximizar la concentración de ficocianina extraída, utilizando el método de superficie de respuesta. Posteriormente se hizo una validación del punto óptimo para confirmar la consistencia en las concentraciones obtenidas con lo predicho por el modelo.

Palabras clave: Espirulina, ficocianina, extracción, temperatura, superficie de respuesta.

ABSTRACT

The use of *Spirulina maxima* in the formulation of functional foods has risen in recent years due to its beneficial properties in human health. Moreover, the use of phycocyanin from *S. maxima* is of interest because of its anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic activities, acting directly in reducing oxidative stress, apoptosis and inflammatory processes in live models. Nonetheless, one of the problems of its application in food is the optimization of extraction by maximizing concentration and stability, since current methodologies are time-consuming and do not yield enough concentration, making the process costly and demanding. In this work, an extraction method based in phosphate buffer was proposed, due to its simplicity, with the goal of optimizing process parameters (temperature, pH, agitation, solvent ratio and time) in order to maximize extracted phycocyanin concentration, using response surface methodology. Subsequently, the optimal conditions were validated in order to confirm consistency between predicted data and real concentrations.

Key words: Spirulina, phycocyanin, extraction, temperature, response surface.

INTRODUCCIÓN

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria, también conocida como *Arthrospira*, popularmente reconocida en el mundo de los alimentos saludables como un suplemento alto en proteína con uso en la alimentación humana. Se caracteriza por un alto contenido de proteína (50-70% peso seco), conteniendo todos los aminoácidos esenciales, aunque cantidades reducidas de metionina, cisteína y lisina, siendo por ello inferior a proteínas animales como el huevo y la leche, pero muy superior a la mayoría de las proteínas vegetales. Dentro de estas proteínas se encuentra la ficocianina, que es de mucho interés en la actualidad por sus propiedades funcionales en el organismo. La ficocianina forma parte de la familia de las ficobiliproteínas, que son pigmentos presentes en cianobacterias y que forman complejos que absorben la luz. Las ficobiliproteínas están conformadas por un heterodímero de unidades α y β , cada uno de los cuales se forma por uno, dos o tres cromóforos llamados bilinas. Dentro de las ficobiliproteínas se encuentran los tipos ficoeritrinas, ficocianinas, alloficocianinas y ficoertrocianinas. En la *S. maxima*, el tipo de mayor importancia es la ficocianina, específicamente del tipo C-ficocianina, la cual se compone de dos subunidades α y β con una conformación hexamérica. (Morancais, 2018).

Actualmente, el uso de *S. maxima* como fuente alternativa de proteína goza de alta popularidad, debido en parte al aumento de personas en el mundo que siguen dietas libres o reducidas en consumo de proteína de origen animal. Por ejemplo, a nivel global se estima que el 22% de los consumidores intentan reducir su consumo de carne, mientras que en Latinoamérica este porcentaje es del 21% (IPSOS, 2018). En México, el porcentaje de personas que siguen dietas vegetarianas, flexitarianas y veganas es de 19%, 15% y 9%, respectivamente (Nielsen, 2016). Adicionalmente, el mercado de alimentos funcionales a nivel mundial tiene un valor de 161.49 millones USD, con un crecimiento anual proyectado del 7.9% (Grand View Research, 2019).

La ficocianina extraída de la *S. maxima* puede ser utilizada en la formulación de alimentos debido a sus propiedades funcionales entre las que se encuentran antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos, actuando directamente en la reducción del estrés oxidativo, la apoptosis y los procesos inflamatorios en modelos in vivo (Mysliwa, 2017).

Existen diversos métodos de extracción para la ficocianina a partir de *S. maxima* u otras cianobacterias, pero en su mayoría tienen desventajas de nivel bajo de pureza y baja estabilidad en el almacenamiento (Pez, 2021). Por lo anterior, es interesante evaluar un método sencillo y económico de extracción, evaluando la recuperación del pigmento y su estabilidad en almacenamiento para su uso como ingrediente alimentario.

El presente trabajo consiste en la optimización de los parámetros de un método de extracción de ficocianina a partir de espirulina, obteniendo con ello el punto en el cual se maximiza la concentración de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapas del experimento

El experimento se divide en las siguientes partes:

La primera consistió en optimizar los parámetros de extracción (temperatura, tiempo, pH, agitación, cantidad de solvente) para maximizar la concentración de ficocianina extraída.

Extracción en las condiciones óptimas para confirmar que las concentraciones reales se aproximan a las predichas por la metodología de superficie de respuesta.

Optimización de la extracción de ficocianina

Para la etapa de extracción se partió de espirulina seca (*Spirulina maxima*) obtenida de un supermercado local. El procedimiento de extracción se basó en el descrito por Ying et al, utilizando un buffer de fosfatos, en este caso KH₂PO₄, ajustado a cierto pH, y donde se dispersó una cantidad determinada de muestra (espirulina seca) y se sometió a una agitación, tiempo y temperatura (Cuadro 1). Una vez obtenido el extracto, se midió absorbancia a 562, 615 y 652 nm para determinar la cantidad de ficoeritrocianina (PE), C-ficocianina (CPC) y allo-ficocianina (APC), así como las ficocianinas totales (TPC) presentes en el mismo (Choi, 2018). La cantidad de cada una de ellas (mg/ml) se determinó por medio de las siguientes fórmulas:

$$CPC = (A_{615nm} - 0.474A_{652nm})/5.34$$

$$APC = (A_{652nm} - 0.208A_{615nm})/5.08$$

$$PE = (A_{562nm} - 2.41CPC - 0.849APC)/9.62$$

$$TPC = CPC + APC$$

Todos los datos se analizaron por medio del método de superficie de respuesta, utilizando el software Design-Expert versión 13.

Cuadro 1: Condiciones experimentales para la extracción de ficocianina

	Mín.	Punto central	Máx.
T (C)	10	25	40
Agitación (RPM)	0	100	200
Relación muestra:solvente	1	3	5
Tiempo (min)	5	15	25
pH	6	8	10

Confirmación de los datos predichos por el modelo

Se llevó a cabo la extracción en las condiciones óptimas arrojadas por el modelo de superficie de respuesta. En éstas se llevó a cabo la medición de absorbancia para determinar la concentración de ficocianinas y se compararon contra las concentraciones predichas por el mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que la producción de biomasa aumentó con el incremento de la concentración de bicarbonato de sodio. En la Fig. 2 s

Extracción de ficocianina

El punto óptimo al que se maximiza la extracción de ficocianinas totales es a 40°C, 146 rpm, 25 min, pH 7.8 y una relación muestra-solvente de 1:5 (imagen 1). La concentración predicha en el extracto a estas condiciones es de 0.378 mg/mL de ficocianina. Por otro lado, el punto óptimo de extracción de C-ficocianina es a 40°C, 151 rpm, 24.8 min, pH 7.7 y relación muestra-solvente de 1:5, con una concentración predicha de 0.249 mg/mL. El modelo obtenido (cuadro 2) logra explicar en buena medida la concentración de ficocianina basada en las variables mencionadas ($R^2=0.8671$). Como puede observarse en las imágenes 2 y 3, los datos obtenidos en la experimentación se ajustan de buena manera al dato predicho y se mantienen cercanos a éste.

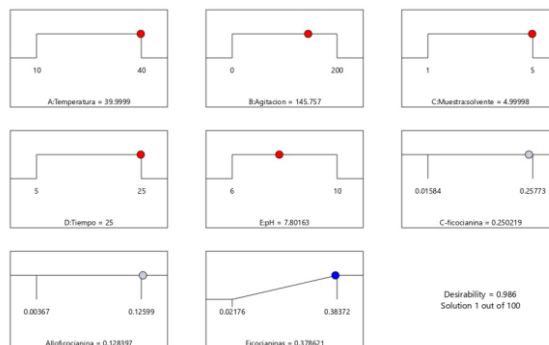


Imagen 1. Condiciones donde se maximiza la extracción de ficocianina.

Cuadro 2. Tabla de ANOVA, donde A=Temperatura, B=Agitación, C=Muestra:solvente, D=Tiempo y E=pH.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrada	Valor F	Valor p
Modelo	0.0345	20	0.0017	7.83	<0.0001
A	0.0029	1	0.0029	12.99	0.0014
B	0.0001	1	0.0001	0.4547	0.5065
C	0.0157	1	0.0157	71.09	<0.0001
D	0.0006	1	0.0006	2.51	0.1263
E	0.0001	1	0.0001	0.4963	0.4879
AB	0.0003	1	0.0003	1.24	0.2756
AC	1.44x10-8	1	1.44x10-8	0.0001	0.9936
AD	3.33x10-6	1	3.33x10-6	0.0151	0.9032
AE	0.0001	1	0.0001	0.4163	0.5249
BC	3.5x10-6	1	3.5x10-6	0.0159	0.9008
BD	0.0000	1	0.0000	0.0839	0.7746
BE	8.28x10-7	1	8.28x10-7	0.0038	0.9516
CD	0.0019	1	0.0019	8.75	0.0068
CE	1.96x10-8	1	1.96x10-8	0.0001	0.9926
DE	2.12x10-7	1	2.12x10-7	0.0010	0.9755

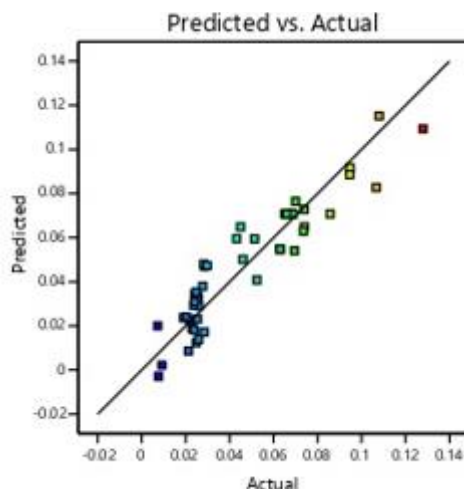


Imagen 2. Gráfica de datos predichos vs reales

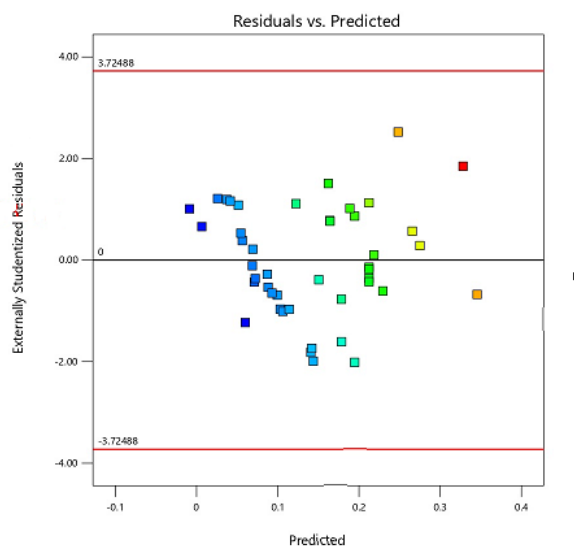


Imagen 3. Gráfica de residuales

Comparativamente, el resultado óptimo de la extracción planteada (0.378 mg/mL de ficocianina y 0.249 mg/mL de C-ficocianina) es menor a otro tipo de extracciones donde se involucra un paso previo que facilita la extracción. Por ejemplo, se ha encontrado que la disrupción celular por medio de pulsos electromagnéticos ayuda a aumentar el rendimiento de la extracción (Li, 2020). También se han propuesto otros métodos para mejorar la extracción como una molienda previa, ultrasonido y ciclos de congelación-descongelación (Jaeschke, 2021). Los rendimientos obtenidos con las extracciones mencionadas varían entre los 5 y 150 mg/mL de C-ficocianina, por lo que este tipo de pasos previos serían necesarios para obtener un ingrediente con una concentración suficiente para ser utilizado como materia prima para la elaboración de otros alimentos, especialmente alimentos funcionales, donde la funcionalidad (antioxidante) está dada directamente por la cantidad de ficocianina añadida.

Por otro lado, la composición de las ficocianinas es de aproximadamente 66% C-ficocianina y 34% alloficocianina, comparado con otros métodos donde se obtiene hasta un 89% de C-ficocianina en las extracciones (Li, 2020). Esta diferencia puede deberse tanto a la especie utilizada para la extracción

como las condiciones específicas en las que se hizo la misma. Además, la distinta composición de las ficocianinas extraídas puede impartirle características distintas a dicho extracto, ya que la alloficocianina tiene una mayor termoestabilidad, siendo estable hasta 60 minutos a 60 grados centígrados (Gysi, 1979), mientras que la C-ficocianina empieza a degradarse a partir de los 47 grados y a 60 grados centígrados por 15 minutos, tiene una degradación de alrededor del 30% (Chaiklahan, 2012).

El comportamiento de la extracción fue altamente dependiente de la temperatura y la agitación, donde la zona de mayor concentración de ficocianina se encuentra a las mayores temperaturas usadas y entre 100 y 200 rpm. Por otro lado, la relación entre la temperatura y cantidad de solvente es muy directa, ya que la concentración de ficocianina extraída aumenta a medida que aumenta la temperatura y la cantidad de solvente, quedando el punto máximo de la interacción en la máxima temperatura y la máxima cantidad de solvente.

Estas interacciones son consistentes con resultados obtenidos en otras investigaciones, donde se ha encontrado que el mayor rendimiento en la extracción de ficocianina se encuentra entre 30 y 50 grados centígrados, y donde la cantidad de solvente y el tiempo tienden a mejorar la extracción, aun sin ser una relación proporcional y que disminuye a medida que aumentan estos factores (Su, 2014).

Extracción en condiciones óptimas

Una vez determinadas las condiciones óptimas para aumentar la concentración de ficocianina extraída, se procedió a hacer una nueva extracción con un resultado de 0.37 mg/mL de ficocianina. Este dato es consistente con la predicción del modelo, alejada solamente un 2% del valor previsto en el mismo.

CONCLUSIÓN

A pesar de que el proceso de extracción optimizado ofrece una maximización de la concentración de ficocianina en el extracto en un tiempo relativamente corto (25 min), para llevar a cabo una aplicación industrial se necesitaría aplicar un método que aumente el rendimiento de la extracción y permitiendo de esta manera proponer un método efectivo y económicamente viable que promueva el uso de este ingrediente en la formulación de alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- IPSOS. (2018). Nuevas tendencias alimentarias a nivel mundial. Obtenido de: www.ipsos.com
- Nielsen. (2016). 8 de cada 10 mexicanos afirma seguir algún tipo de dieta restrictiva. Obtenido de: www.nielsen.com
- Grand View Research. (2019). Functional foods market size, share and trend analysis report. Obtenido de: www.grandviewresearch.com
- Morançais, M., Mouget, J.-L., & Dumay, J. (2018). Proteins and Pigments. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 145–175. doi:10.1016/b978-0-12-811405-6.00007-4
- Pez Jaeschke, D., Rocha Teixeira, I., Damasceno Ferreira Marczak, L., & Domeneghini Mercali, G. (2021). Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314.
- Jaeschke, D., Rocha, I., Damasceno, L. & Domeneghini, G. (2021). Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143(2021), 110314.

Mysliwa, B., Solymosi, K. (2017). Phycobilins and phycobiliproteins used in food industry and medicine. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 17:13(2017), 1173-1193.

Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M. & Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin – A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence on processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science*, 00(2020), 0.

Wu, H., Wang, G., Xiang, W., Li, T. & Hui, H. (2016). Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, 19(2016), 2349-2362.

Zhou, Z., Liu, L., Chen, X. Factors that affect antioxidant activity of C-phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*. 29(3), 313-322.

Colla, L., Bertol, C., Ferreria, D., Bavaresco, J., Costa, J., Bertolin, T. Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. *Brazilian Journal of Biology*. 77(2), 332-339.

Su, C., Liu, C., Yang, P., Syu, K., Chiu, C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, 123, 64-68.