

Extracción de ficocianina para uso como colorante natural: optimización por metodología de superficie de respuesta

Y.A. Ruiz-Hernández¹, E. Garza-Valverde¹, J.M. Márquez-Reyes¹ y C. García-Gómez*¹.

¹ Universidad 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.

*celestino.garciagm@uanl.edu.mx

RESUMEN

La aplicación de *Spirulina maxima* para la formulación de alimentos utilizándola como pigmento ha aumentado en los últimos años por sus propiedades y beneficios a la salud. Además, es de interés la utilización de la ficocianina 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. En este estudio se utilizó un método de extracción en buffer de fosfatos con agitación como objetivo la optimización de los parámetros del proceso tales como pH, cantidad de biomasa y concentración de buffer para maximizar la concentración de ficocianina extraída, pureza y obtención de polvos de interés comercial, utilizando un análisis de superficie de respuesta. El estudio mostró que un incremento de la cantidad de biomasa y baja concentración de buffer de extracción potencializaba la producción de ficocianina, estos resultados dirigen hacia el uso de colorantes naturales en la industria alimentaria.

Palabras clave: Microalga, cianobacteria, ficocianina, extracción, pigmento.

ABSTRACT

The application of *Spirulina maxima* for food formulation using it as a pigment has increased in recent years due to its properties and health benefits. In addition, the use of phycocyanin is of interest for its anti-inflammatory, antioxidant and anticancer effects, acting directly on the reduction of oxidative stress, apoptosis and inflammatory processes in in vivo models. However, one of the problems with the use of phycocyanin in food is to optimize the extraction at maximum concentration and with good stability. In this study, an extraction method in phosphate buffer with agitation was used with the objective of optimizing process parameters such as pH, amount of biomass and buffer concentration to maximize the concentration of extracted phycocyanin, purity and obtaining powders of commercial interest, using a response surface analysis. The study showed that an increase in the amount of biomass and low concentration of extraction buffer potentiated the production of phycocyanin, these results lead to the use of natural colorants in the food industry.

Keywords: Microalgae, cyanobacteria, phycocyanin, extraction, pigment.

INTRODUCCIÓN

Ante la ola del movimiento de los super alimentos que lleva unos cuantos años, se ha hecho un enfoque en ellos para aplicarlos en la innovación y desarrollo de la industria alimentaria, un ejemplo de esto es la cianobacteria *Spirulina platensis*, la cual ha sido investigada por su aportación nutrimental, entre otros compuestos de interés. Esta microalga existe en el planeta desde unos tres mil quinientos millones de años antes del presente. Las variedades más conocidas son la *Spirulina máxima* y la *Spirulina platensis*. El alga se divide en dos cada 7 horas, en condiciones ideales teóricamente puede generar unos 15.000 kg/ha anuales de material seco, pero con tecnología apropiada los rendimientos mejoran (Ponce, 2013). La *Spirulina* tiene cualidades inmunológicas, antioxidantes, antiviral, protector contra el cáncer, retiene metales pesados por lo que es un antitóxico. Se ha demostrado que es un regulador contra la hiperglicemia y la hiperlipidemia (Belay, 2002).

Uno de los compuestos más importantes en *Spirulina platensis* son las proteínas, en su mayor parte son ficobiliproteínas, los cuales son pigmentos fotosintéticos, estas ficobiliproteínas se pueden clasificar en tres grupos principales: ficocianinas (C-PC), ficoeritrinas (C-PE) y aloficocianinas (C-APC) dependiendo del color y propiedades de absorbancia. Las c-ficocianinas son las que se encuentran en mayor medida (Antelo *et al.*, 2010). La extracción de ficobiliproteínas implica la ruptura celular y la liberación de estas proteínas desde el interior de la célula. Las paredes celulares de las criptofitas se rompen fácilmente, pero las de las cianobacterias son extremadamente resistentes (Zhejiang Binmei Biotecnología Co., Ltd, 2018). Las c-ficocianinas son un pigmento soluble en agua de color azul, además de ser utilizado como pigmento en la formulación de productos alimenticios ya que hay opciones limitadas para la obtención del color azul de manera natural, también se le ha dado mayor importancia y uso por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y actividad anticancerígenas (Chentir *et al.*, 2018; Fernández-Rojas, Hernández-Juárez, & Pedraza-Chaverri, 2014).

Un problema que enfrenta la extracción de ficocianina es las limitaciones que existen en los métodos de extracción ya que esto da origen a extractos con poca pureza y baja estabilidad en su almacenamiento y durante el procesamiento de los alimentos en los cuales se utiliza. La temperatura es vital para la extracción de ficocianina ya que esta modifica los compuestos que se encuentran de manera intracelular, por lo tanto esto influencia en la tasa de transferencia de masa de los compuestos intracelulares hacia el medio de extracción, la temperatura ideal para el mayor rendimiento en la extracción va de 30 a 50°C, a temperaturas más altas hay una disminución del rendimiento (Su, Liu, Yang, Syu, & Chiu, 2014). El pH tiene un efecto negativo si no se controla en los medios con los que se piensa extraer, ya que afecta la estructura de las proteínas presentes; un rango de pH reportado en el que las condiciones son óptimas para la microalga es de 6 a 7 (Su *et al.*, 2014; Vali Aftari, Rezaei, Mortazavi, & Bandani, 2015). Para controlar el pH del medio de extracción se usa generalmente una solución buffer como solvente dentro del rango de pH de estabilidad del pigmento. La solución buffer más común es a base de fosfato de sodio, la cual se ajusta a un pH entre 6 y 8 (Ilter *et al.*, 2018; Silveira *et al.*, 2007).

Existen diferentes métodos de extracción de ficocianina: ciclos de congelación y descongelación, mezclado y homogeneización, “bead milling”, homogeneización a alta presión, procesamiento a alta presión, ultrasonificación, microondas, campos de pulsos eléctricos, entre otros, este es un factor de mucha importancia ya que de esto depende la pureza y el rendimiento del resultado final.

El método de ciclos de congelación y descongelación consiste en que el líquido intracelular se congela y por consecuencia crece su volumen y se forman cristales de hielo, luego se contrae la célula mediante la descongelación; esto daña la membrana celular y por ende, cambia las condiciones de presión dentro y fuera de la célula (Acker & McGann, 2003; Roquebert & Bury, 1993).

Método de extracción simple que consiste en agitar la biomasa disuelta en el solvente de extracción, con eso se hacen cambios en la presión osmótica y con esto se induce a la muerte de las células que llega a la ruptura de la membrana celular, para esto se utilizan normalmente agitadores magnéticos o rotatorios (Chaiklahan, Chirasuwan, Loha, Tia, & Bunnag, 2011; *Silveira et al.*, 2007).

El aumento de la temperatura durante el mezclado y la homogeneización mejora el rendimiento de extracción pero promueve la disminución de la pureza del extracto (*Silveira et al.*, 2007).

Se basa en el paso de ondas ultrasónicas (frecuencias de 20 kHz a 10 MHz) a través del material biológico objetivo. La propagación de ondas ultrasónicas en cualquier medio da lugar a diversos fenómenos químicos y físicos, como agitación, cavitación, fuerzas de cizallamiento, ondas de choque y formación de radicales libres (Tiwari, 2015).

Cuando se utiliza ultrasonido (US) para mejorar la extracción de compuestos intracelulares, la cavitación acústica es la principal fuerza impulsora. El paso de ondas ultrasónicas induce la formación de zonas de compresión y rarefacción, que provocan la formación de burbujas en los líquidos. El volumen de estas burbujas disminuye y aumenta durante los ciclos de las olas hasta su colapso. Este fenómeno se conoce como cavitación acústica. El colapso de las burbujas de cavitación promueve altas temperaturas localizadas (hasta 5000 K) y presiones (hasta 50 MPa) a nivel microscópico; Las turbulencias, las colisiones y la agitación también son consecuencia de este fenómeno. Por lo tanto, la cavitación contribuye al adelgazamiento de la membrana celular y la ruptura celular, aumentando las tasas de extracción (Tiwari, 2015). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue realizar una optimización de la extracción y precipitación de PC teniendo en cuenta la cantidad, pureza y precipitación utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para elevar simultáneamente la pureza y la concentración del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cianobacteria *Spirulina máxima* fue obtenida en polvo de la empresa Orgánicos Monterrey y preservada a temperatura ambiente. Para extraer PC de las células de *Spirulina máxima*, se añadió diferentes cantidades de la biomasa seca, concentración de tampón de fosfato de potasio y con pH variantes, en un sistema agitación orbital, en la tabla 1 se presenta los niveles estudiados en este trabajo. Después de cada corrida experimental la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min y se separó el sobrenadante azul, es decir, el extracto crudo de ficocianina (PC). Este extracto fue posteriormente precipitado con citrato de sodio al 5% y 10%, fue además sometido a un secado a 40°C por 24 horas, al finalizar este tiempo fue disuelto en agua para conocer el grado de precipitación de la ficocianina. La absorción se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo-Scientific-Evolution-200). Los valores más altos de absorción de luz (λ_{max}) de PC, ficoeritrina y proteínas totales (proteínas contaminantes) fueron 618, 652 y 280 nm, respectivamente). 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 13.

Tabla 1. Rango de niveles de variables.

Variables Independientes	Factor	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
pH	A	6	8	10
Biomasa (mg)	B	0.2	0.4	0.6
Concentración de buffer (mM)	C	3	5	7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos para las variables de respuesta analizadas, una distinción entre ellas es mostrada por medio de un análisis estadístico de metodología de superficie de respuesta mostrada a en las secciones posteriores.

Tabla 2. Diseño experimental con variables de respuesta.

Experimento	A	B	C	PC (mg mL ⁻¹)	Pureza	PC (mg mL ⁻¹), polvo 5%	PC (mg mL ⁻¹), polvo 10%
1	8	0.2	500	0.032	0.040	0.062	0.084
2	8	0.4	300	0.041	0.049	0.063	0.076
3	8	0.4	300	0.165	0.226	0.146	0.103
4	8	0.4	300	0.129	0.227	0.092	0.156
5	8	0.6	500	0.271	0.285	0.241	0.354
6	8	0.4	300	0.303	0.422	0.239	0.203
7	6	0.4	500	0.338	0.467	0.257	0.334
8	10	0.2	300	0.456	0.521	0.368	0.473
9	6	0.4	100	0.429	0.595	0.345	0.385
10	8	0.6	100	0.518	0.647	0.412	0.550
11	8	0.4	300	0.549	0.676	0.411	0.448
12	10	0.4	100	0.531	0.679	0.252	0.372
13	8	0.2	100	0.601	0.696	0.378	0.517
14	6	0.2	300	0.557	0.732	0.432	0.394
15	6	0.6	300	0.620	0.778	0.289	0.495
16	10	0.4	500	0.624	0.801	0.438	0.526
17	10	0.6	500	0.773	0.824	0.691	0.729

Un análisis de varianza (ANOVA) mostro que los datos estadísticos presentan alta correlación estadística ($p\text{-value} < 0.0001$) para las variables de respuesta analizadas. La figura 1 muestra el efecto encontrado en las dos variables independientes más significativas, en este caso pH y la cantidad de biomasa utilizada. Las gráficas de superficie mostraron que al incrementar la concentración de la biomasa aumentaba la cantidad de ficocianina obtenida y la pureza. Por su parte al incrementar el pH se observó una disminución significativa de las variables de respuesta analizadas. La obtención de polvos de precipitados de ficocianina es de interés comercial debido a la presentación la cual la hace más atractiva para la utilización en diversos productos alimenticios. El estudio de precipitación con sal de citrato de sodio mostro que el utilizar un 10% en masa es una opción recomendada para la precipitación de este pigmento natural, como se observa en la Figura 2, al utilizar un 10% en masa de citrato de sodio se obtiene una concentración de ficocianina de 0.6 mg mL^{-1} comparado con un 0.5 mg mL^{-1} al utilizar el 5% de citrato de sodio, este comportamiento es obtenido al incrementar la concentración de biomasa y utilizar un pH cercano al neutro.

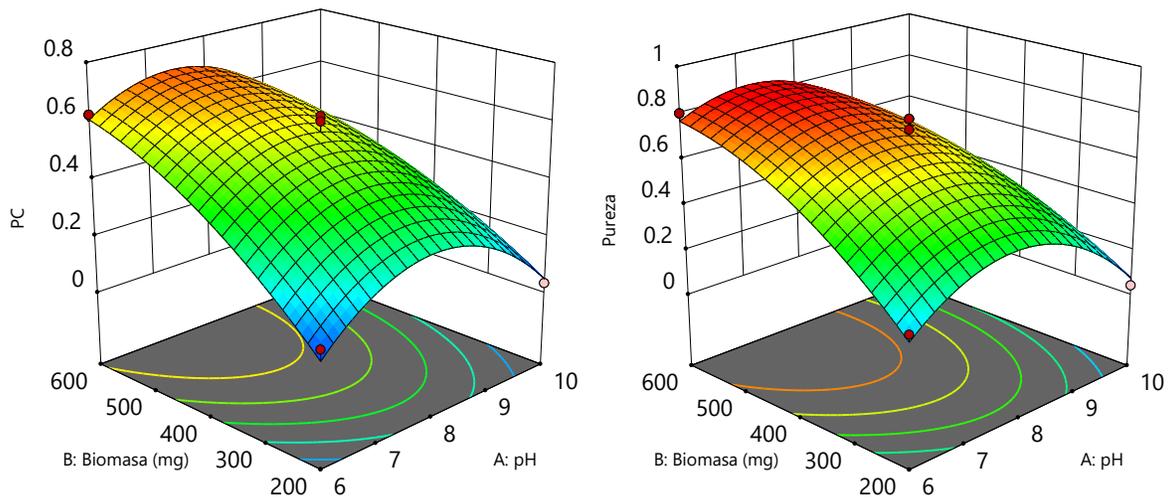


Figura 1. Efecto de la concentración de biomasa y el pH: izquierda) PC, derecha) pureza.

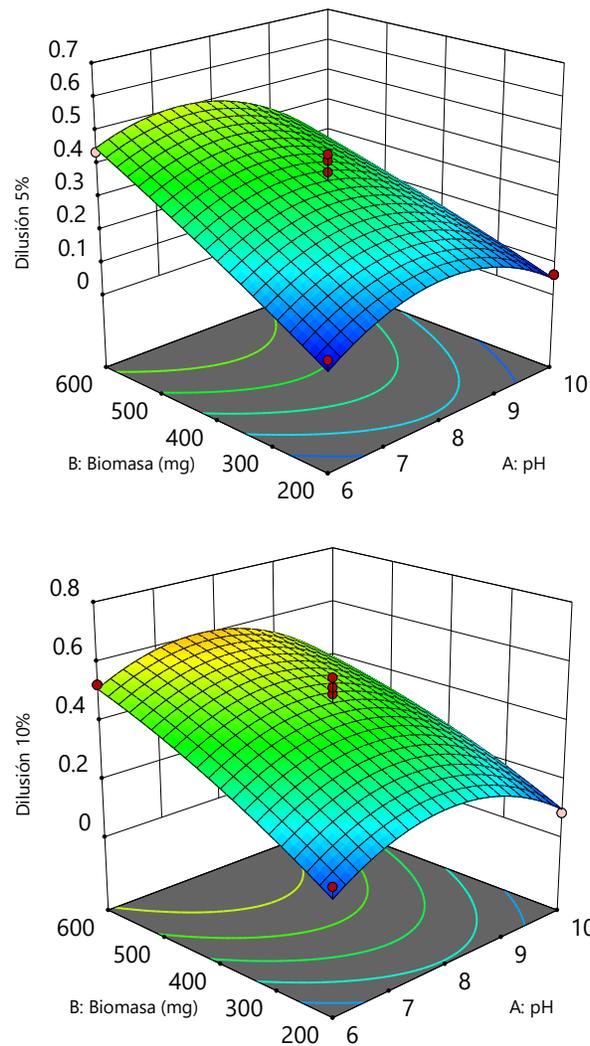


Figura 2. Efecto de la concentración de biomasa y el pH: izquierda) polvo al 5%, derecha) polvo al 10%.

Un análisis de optimización de las variables dependientes en el rango y las variables de respuesta maximizadas mostró valores optimizados de las variables del proceso, en este caso se obtuvo con un pH= 7.83, cantidad de biomasa=600 mg y concentración de buffer=100 mM una cantidad de ficocianina extraída=0.78 mg mL⁻¹, pureza= 0.86, precipitación en polvo de 5%= 0.67, precipitación en polvo de 10%= 0.72.

CONCLUSIÓN

PC es una proteína azul de origen natural con varias aplicaciones en alimento. Este estudio presentó un análisis sobre la optimización de PC en extracto y precipitado usando RSM. En base al modelo RSM obtenido, los factores más significativos sobre la pureza y concentración de PC fueron los niveles de pH y cantidad de biomasa. Además, el alto nivel de cantidad de biomasa y bajo pH confirmó consistentemente que el método propuesto podría aumentar significativamente la pureza y concentración de la PC. La fuerte relación entre estas variables operacionales en la extracción de PC podría servir como una herramienta útil para analizar la calidad de PC en alimentos y otros productos. En conclusión, el método presentado en este trabajo podría considerarse eficiente en términos tanto de cantidad como de calidad de la PC obtenida para su comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

- Acker, J. P., & McGann, L. E. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology*, *46*(2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00025-7).
- Antelo, F. S., Anschau, A., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2010). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *21*(5), 921–926. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532010000500022>
- Belay, A. (2002). The potential application of *Spirulina* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *JANA*, *5*: 27-48
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, *47*(4), 659–664. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.01.010>.
- Chentir, I., Hamdi, M., Li, S., Doumandji, A., Markou, G., & Nasri, M. (2018). Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. *Algal Research*, *35*, 395–406. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.09.013>.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, *11*, 375–392. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.10.011>.
- Ilter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, *70*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2018.04.007>.
- Ponce-López, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: *Spirulina* a bajo costo. *Idesia (Arica)*, *31*(1), 135-139. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292013000100016>
- Roquebert, M. F., & Bury, E. (1993). Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *9*(6), 641–647. <https://doi.org/10.1007/BF00369571>.
- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V., & Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, *98*(8), 1629–1634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>.
- Su, C. H., Liu, C. S., Yang, P. C., Syu, K. S., & Chiu, C. C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, *123*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.026>.

- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.04.013>.
- Vali Aftari, R. O. C. and P. of *S. platensis* C.-P. A. C. S. on M.-A. and U.-A. E. M., Rezaei, K., Mortazavi, A., & Bandani, A. R. (2015). The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3080–3091. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12573>.
- Zhejiang Binmei Biotecnología Co., Ltd. (2018). Extracción de C-Ficocianina de la biomasa húmeda de *Spirulina Platensis* - Conocimiento - Zhejiang Binmei Biotechnology Co., Ltd. <http://www.binmeibio-es.com/info/c-phycocyanin-extraction-from-spirulina-platen-23885015.html>