

Evaluation Method of Removing the Lutein Obtained from Cell Disruption of the Microalgae *Haematococcus Pluvialis*

Laura Romero¹, Roberto Parra², and Ana Karen Martínez²

¹ Departamento de Química, ITESM, México, romero@itesm.mx

² Centro del Agua para América Latina y el Caribe y Centro de Calidad Ambiental, ITESM, México, r.parra@itesm.mx, karenmtze@hotmail.com

Abstract– Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of irreversible vision loss in North America and Europe; AMD destroys (macula luteal), which is the area of the retina that provides central vision needed to see clearly. Once the disease is in an advanced stage, treatment options are very limited. Several epidemiological studies report a correlation between AMD and low levels of lutein in (macula). Lutein is a carotenoid found in the (macula luteal); characterized by its powerful antioxidant effect and its capacity to filter blue light, thereby protecting from the harmful effects caused by free radicals. [3,4] Lutein cannot be synthesized within the body; therefore it can only be obtained by food intake. [2] The fact that this molecule is considered an active agent in the prevention of chronic diseases [3] caused the search of alternative sources for the obtaining of this high value compound. Microalgae represent an untapped source that offers possibilities for isolation of substances of interest with high value for health, food, cosmetic and biotechnological applications.

Haematococcus pluvialis microalga is characterized by the formation of a cell wall which is extremely rigid and resistant to mechanical and chemical treatments. These results in a significant reduce of carotenoid and Lutein bioavailability, accumulated within the cells. For this reason there is a need to perform cell rupture to optimize the efficiency of extraction from intracellular compounds. This study was evaluated by scanning electron microscopy and different methods to promote cell rupture of biomass. The efficiency of these methods was evaluated in terms of total carotenoid recovery, which was estimated by UV-Vis spectrophotometry.

Keywords— microalgae, cell disruption, Maematococcus pluvialis, AMD.

Digital Object Identifier (DOI): <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2015.1.1.277>

ISBN: 13 978-0-9822896-8-6

ISSN: 2414-6668

13th LACCEI Annual International Conference: “Engineering Education Facing the Grand Challenges, What Are We Doing?”
July 29-31, 2015, Santo Domingo, Dominican Republic

ISBN: 13 978-0-9822896-8-6

ISSN: 2414-6668

DOI: <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2015.1.1.277>

Evaluación del Método de Extracción de la Luteína Obtenida a Partir de la Ruptura Celular de la Microalga *Haematococcus Pluvialis*

Laura Romero^a, Roberto Parra^b Ana Karen Martínez^c

^aDepartamento de Química, ITESM, Monterrey, N.L. ^{b, c} Centro del Agua para América Latina y el Caribe y Centro de Calidad Ambiental, ITESM, Monterrey, N.L.

ABSTRACT

La degeneración macular asociada a la edad (AMD, por sus siglas en inglés) es la causa principal de la pérdida irreversible de la vista en Norteamérica y Europa; AMD destruye la mácula lútea, la cual es la zona de la retina que provee la visión central necesaria para ver claramente. Existen diversos estudios epidemiológicos que reportan una correlación entre AMD y los bajos niveles de luteína en la mácula. La luteína es un carotenoide encontrado en la mácula lútea; caracterizado por su potente poder antioxidante y su capacidad para filtrar la luz azul, protegiendo de esta manera, de los efectos perjudiciales que pueden causar los radicales libres. [3,4] La luteína no puede ser sintetizada dentro del cuerpo, por lo que solamente puede ser proporcionada mediante la ingesta alimentaria. [2] Las microalgas representan una fuente no explotada que ofrece posibilidades para el aislamiento de sustancias de interés y alto valor para la salud, alimentos, cosméticos y aplicaciones biotecnológicas. La microalga *Haematococcus pluvialis* se caracteriza por la formación de una pared celular sumamente rígida y resistente a ataques tanto mecánicos, como químicos; disminuyendo considerablemente la biodisponibilidad de los carotenoides y Luteína acumulados dentro de las células; por esta razón existe la necesidad de llevar a cabo su ruptura celular para poder optimizar la eficiencia de extracción de compuestos intracelulares. En este estudio se evaluó mediante Microscopía Electrónica de Barrido distintos procesos para promover la ruptura celular de la biomasa; la eficiencia de éstos fue evaluada en términos de la recuperación de carotenoides totales, la cual fue estimada mediante Espectrofotometría UV-Vis.

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of irreversible vision loss in North America and Europe; AMD destroys (macula luteal), which is the area of the retina that provides central vision needed to see clearly. Once the disease is in an advanced stage, treatment options are very limited. Several epidemiological studies report a correlation between AMD and low levels of lutein in (macula). Lutein is a carotenoid found in the (macula luteal); characterized by its powerful antioxidant effect and its capacity to filter blue light, thereby protecting from the harmful effects caused by free radicals. [3,4] Lutein cannot be synthesized within the body; therefore it can only be obtained by food intake. [2] The fact that this molecule is considered an active agent in the prevention of chronic diseases [3] caused the search of alternative sources for the obtaining of this high value compound.

Microalgae represent an untapped source that offers possibilities for isolation of substances of interest with high value for health, food, cosmetic and biotechnological applications.

Haematococcus pluvialis microalga is characterized by the formation of a cell wall which is extremely rigid and resistant to mechanical and chemical treatments. These results in a significant reduce of carotenoid and Lutein bioavailability, accumulated within the cells. For this reason there is a need to perform cell rupture to optimize the efficiency of extraction from intracellular compounds. This study was evaluated by scanning electron microscopy and different methods to promote cell rupture of biomass. The efficiency of these methods was evaluated in terms of total carotenoid recovery, which was estimated by UV-Vis spectrophotometry.

1. INTRODUCCIÓN

La degeneración macular asociada a la edad (AMD) es la causa principal de la pérdida irreversible de la vista en Norteamérica y Europa; esta enfermedad destruye la mácula lútea, la cual es la zona de la retina que provee la visión central necesaria para ver claramente. Una vez que la enfermedad está avanzada las opciones de tratamiento son muy limitadas. Existen diversos estudios epidemiológicos que reportan una correlación entre AMD y los bajos niveles de luteína en la mácula. [1,2].

La luteína es un carotenoide, perteneciente a la familia de las xantofilas, la cual está compuesta de 40 átomos de carbono y presenta en su estructura dobles enlaces conjugados y enlaces simples a lo largo de una cadena poliénica con anillos que contienen grupos hidroxilo en ambos lados, como se muestra en la

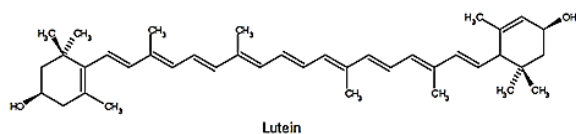


Fig. 1. Estructura química de la Luteína

Esta molécula es un carotenoide encontrado en la mácula lútea, caracterizado por su potente poder antioxidante y su capacidad para filtrar la luz azul, protegiendo así de los efectos perjudiciales que pueden causar los radicales libres. [3,4]. La luteína no es sintetizada dentro del cuerpo, por lo que solamente puede ser proporcionada mediante la ingesta

alimentaria; el hecho de que esta molécula sea considerada un agente activo en la prevención de enfermedades crónicas aumenta el interés por buscar fuentes alternativas para la obtención de este compuesto de alto valor.

Actualmente, los pétalos de la flor marigold (*Tagetes erecta L*) son utilizados para la producción comercial de luteína [5], sin embargo el contenido de esta xantofila en ella es extremadamente bajo, pues representa el 0.03% de su peso seco, [4] lo que hace que nuevas fuentes enriquecidas en luteína sean una alternativa interesante.

Recientemente, las microalgas

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones de Cultivo Microalgal

La cepa de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Biomex) utilizada en este estudio fue cultivada a temperatura ambiente en el medio de cultivo estéril BG-11, con un fotoperiodo 24:0, aireación constante y agitación en shaker a 150 rpm. El cultivo fue realizado en batch y escalado a 10 L. El crecimiento de la microalga fue monitoreado con un microscopio óptico. La biomasa microalgal centrifugada se congeló durante 24 horas, para posteriormente ser liofilizada a -85°C, 0.120 mBar durante 1 día. La biomasa liofilizada se almacenó en oscuridad y bajo ambiente de N₂ en un ultracongelador a -86°C para futuro uso.

2.2 Ruptura Celular

En este trabajo se utilizaron 4 tratamientos diferentes para romper la pared celular de las células microalgales: autoclave, baño de ultrasonido, tip sonicator y beadbeater. En cada experimento se utilizó 100 mg de biomasa previamente liofilizada, a la cual se le agregó 10 mL de agua desionizada (Milli-Q) para la obtención de una solución microalgal.

En el tratamiento de autoclave (Yamato SQ500) se expuso la solución a una temperatura de 121°C y una presión de 1 atm por 30 minutos.

Para el tratamiento de beadbeater (Precellys 24) la solución se agregó a una matriz de lisado con 1 esfera de vidrio de 4 mm y esferas de cerámica de 1.4 mm (MP Biomedicals), el tratamiento se llevó a cabo por 3 ciclos de duración de 30 segundos cada uno, a una velocidad de 6500 rpm y un tiempo de espera entre ciclos de 5 segundos.

En el tratamiento de baño de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner AS7240AT) la solución fue expuesta a las ondas de presión de ultrasonido durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El último tratamiento evaluado fue mediante un Tip Sonicator (Branson 250), en el cual la muestra se encuentra en contacto directo con el ultrasonido al utilizar una micropunta con una amplitud en la señal de 50% durante 2 minutos, con pulsos cada 20 segundos y tiempos de espera de 15 segundos entre cada uno.

Para mantener una temperatura baja y evitar que la muestra se degradara, se utilizó un baño de hielo. Una vez efectuada cada una de las pruebas de ruptura celular, se centrifugaron las muestras y se desechó el sobrenadante, debido a que los carotenoides son hidrofóbicos.

2.3 Microscopía Electrónica de Barrido

Las muestras de biomasa procesada fueron secadas después de cada uno de los tratamientos, posteriormente se llevó a cabo un recubrimiento con cobre (Denton Vacuum

Desk V) y fueron analizadas utilizando un voltaje de 5 kV en el microscopio electrónico de barrido (Phenom ProX) en modo de electrones retrodispersivos.

2.4 Extracción Solvente Orgánico

Se le agregó a la biomasa 5 mL de hexano como solvente orgánico de extracción. Se agitó en vortex durante 5 minutos y se volvió a centrifugar para recuperar el extracto sin partículas microalgales. Cada uno de los extractos fue concentrado a una temperatura de 50°C y flujo de N₂ (ThermoScientific) y fueron analizados posteriormente en un espectrofotómetro de placas.

2.5 Carotenoides Totales

Se realizaron barridos dentro de un rango de $\lambda=350-600$ nm en el espectrofotómetro de placas (FLUOstar Omega) de los extractos concentrados y de diluciones 1/10 y 1/100 utilizando hexano como solvente de aforación. Para la cuantificación de carotenoides totales se tomó la $\lambda_{\max}=450$ y el $\epsilon_{\text{hexano}}=0.2592$

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{\text{Abs}_{450} \times D}{\epsilon} \times F$$

2.6 Hidrólisis Alcalina

La hidrólisis alcalina se lleva a cabo con el objetivo de eliminar las clorofilas y los lípidos que interfieren en la evaluación espectrofotométrica de carotenoides y xantófilas, además de hidrolizar los ésteres de luteína para la obtención de su forma libre. En este estudio, se optimizaron las condiciones de saponificación, al evaluar en una muestra de luteína esterificada (Solanum/Lut-SEN-021111) 3 diferentes condiciones de hidrólisis.

En la hidrólisis Sarkar se pesaron 100 mg de luteína esterificada, se le agregó 1 mL de metanol y 1 mL de una solución 0.5 M KOH metanólica, a una temperatura de 50°C por 30 minutos, después se diluye la muestra con 10 mL de

agua desionizada (Milli-Q) y se extrae con 10 mL de hexano, se toma el extracto con una pipeta pasteur y se lava con 10 mL de agua desionizada. El extracto obtenido se lleva a sequedad con flujo de N_2 y posterior a ello se afora a 1 mL con una solución hexano-acetona (80:20).

El mismo procedimiento se repitió, cambiando únicamente la solución de hidrólisis; en la hidrólisis Weissenberg se utilizó 1 mL de una solución al 5% de KOH en MeOH y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente, durante toda la noche. La tercera hidrólisis (Méndez) consistió del uso de 1 mL de una solución al 10% de KOH en metanol.

2.7 Condiciones Cromatográficas

Los extractos saponificados se pasaron a viales ámbar para HPLC, utilizando como blanco la solución de hexano-acetona (80:20). La separación y cuantificación de cada muestra se llevó a cabo mediante fase normal utilizando un detector UV a $\lambda=476$ nm (Agilent Technologies 1200), se usó una columna de 3 μ m de sílica (Phenomenex-Luna). La fase móvil binaria consistió n-hexano:acetona 82:18 (v/v) con una elución isocrática a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. Se utilizó como detector UV a una $\lambda=476$ nm. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μ L. Para la cuantificación de luteína en la muestra se utilizó un estándar de luteína Sigma Aldrich (CAS 127-40-2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró obtener un cultivo purificado de la microalga *Haematococcus pluvialis* después de 45 días. El crecimiento microalgal se monitoreó utilizando un microscopio óptico, donde se puede distinguir la división celular y formación de nuevas células. Se obtuvieron micrografías de la biomasa tratada con cada uno de los tratamientos de ruptura celular. En la muestra control (sin tratamiento) se observa que la morfología de las células, es esférica y que existe una tendencia a aglomerarse unas con otras (Fig. 1).

En cuanto a las células tratadas con baño de ultrasonido (Fig. 2), se puede observar que algunas células se encuentran rotas, debido a la presión efectuada por cavitación,

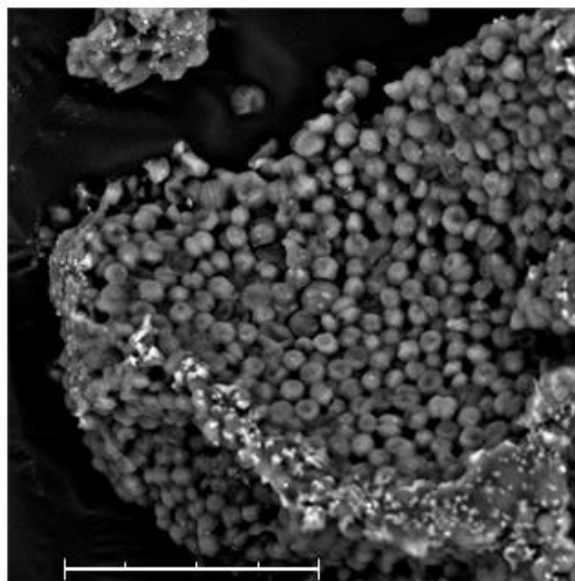


Fig. 1. Micrografía electrónica de barrido de las células de la microalga *Haematococcus pluvialis* (control), tomada a 20 μ m

sin embargo la mayoría se encuentran intactas; debido a que el baño de ultrasonido fue eficiente en algunas células.

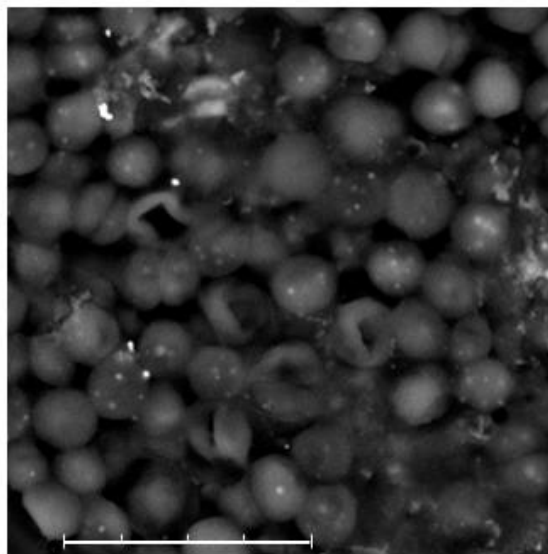


Fig. 2. Micrografía electrónica de barrido de las células de la microalga *Haematococcus pluvialis* después de tratamiento de baño de ultrasonido, tomada a 8 μ m

Se probó el efecto que tendría un sonicador de punta, (Fig. 3) el cual se encuentra en contacto directo con la muestra, sin embargo la micrografía de este tratamiento muestra degradación en la superficie y no hay presencia de ruptura celular.

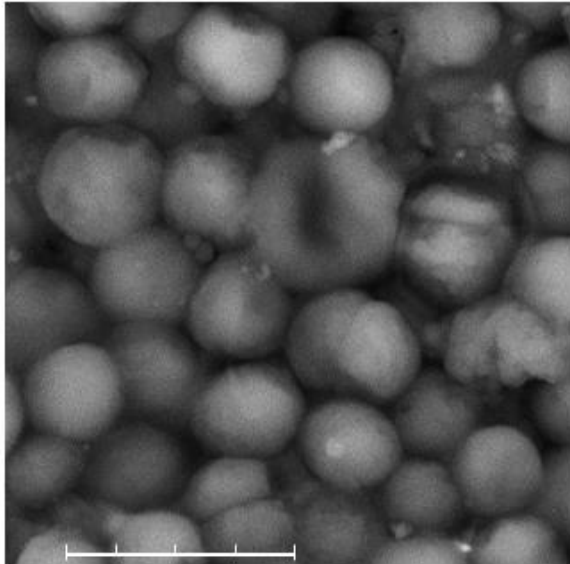


Fig. 3. Micrografía electrónica de barrido de las células de la microalga *Haematococcus pluvialis* después de tratamiento de Tiop Sonicador de punta, tomada a 4 μm

En el caso del homogenizador celular (Fig. 4) utilizando como matriz de lisado perlas de cerámica y 1a de vidrio se pueden observar perlas de cerámica y alrededor el vidrio roto, lo que muestra un tratamiento mecánico muy intenso, además de que a diferencia de las otras micrografías es la única donde no hay presencia de células microalgales.

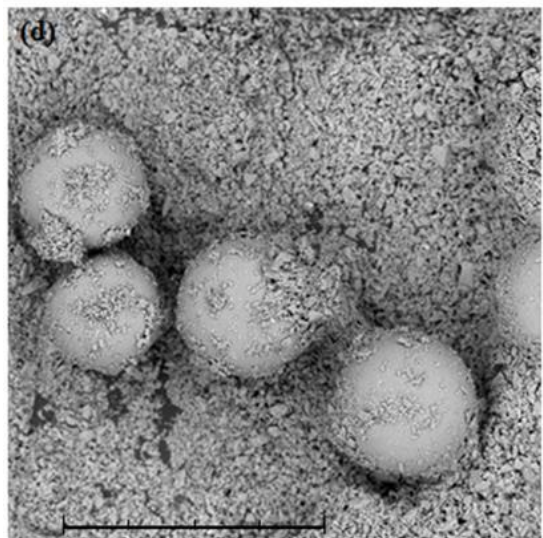


Fig. 4. Micrografía electrónica de barrido de las células de la microalga *Haematococcus pluvialis* después de tratamiento de homogenizador celular, tomada a 10 μm .

En las células expuestas a 121°C en el autoclave (Fig. 5) se observó, al igual que en el sonicador de punta una degradación en la superficie, sin embargo no hubo ruptura

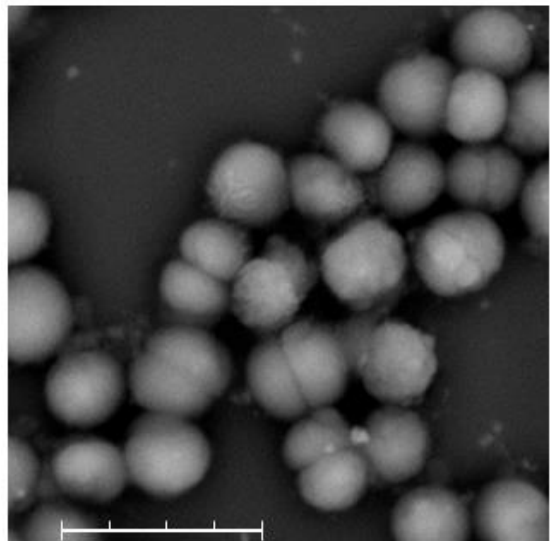


Fig. 5. Micrografía electrónica de barrido de las células de la microalga *Haematococcus pluvialis* autoclavadas a $T= 121^{\circ}\text{C}$, $P= 1 \text{ atm}$, tomada a 4 μm

Los espectros de absorción de los extractos obtenidos (Fig. 6) concuerdan con lo visto en las micrografías, donde se determinó que el mejor tratamiento fue el homogenizador celular, seguido del baño de ultrasonido al presentar los mayores valores de absorbancia.

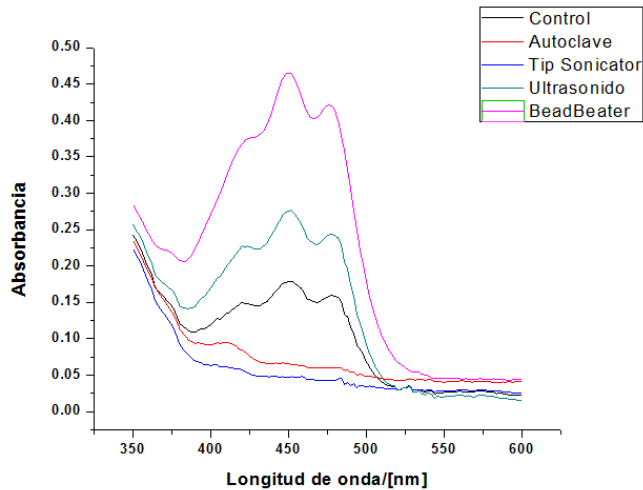


Fig. 6. Espectros de Absorción de Extractos de *Haematococcus pluvialis* después de distintos tratamientos de ruptura celular

Una comparación del contenido total de carotenoides obtenidos entre los diferentes procesos se muestra en la Figura 7.

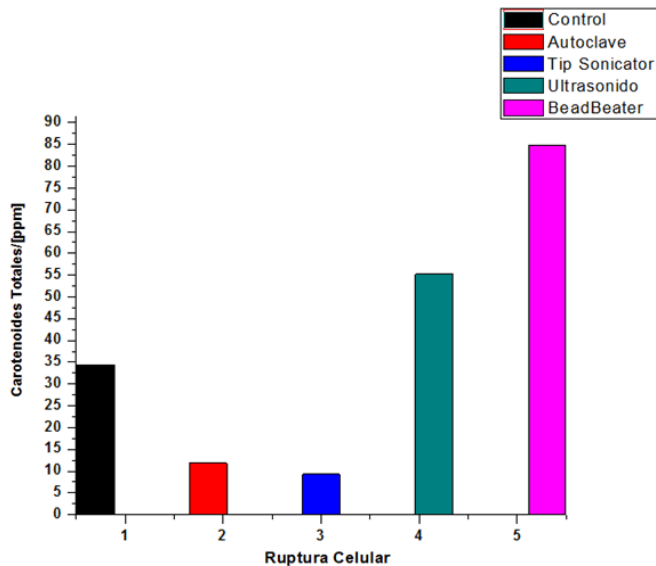


Fig. 7. Comparación del contenido de carotenoides totales en extractos con diferentes tratamientos de ruptura celular

Las diferentes metodologías de hidrólisis realizadas (Sakar, Weissenberg y Méndez) se muestran en los cromatogramas de las figuras 8, 9 y 10,

Como se puede observar en el cromatograma de la figura 9, la hidrólisis más eficiente es la del proceso Weissenberg que se llevó a cabo con KOH, dejando la reacción por 12 horas (Fig. 10)

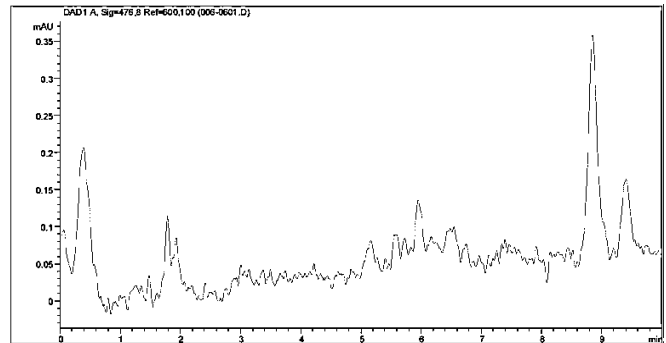


Fig. 8. Cromatograma de la luteína hidrolizada mediante la metodología Sarkar

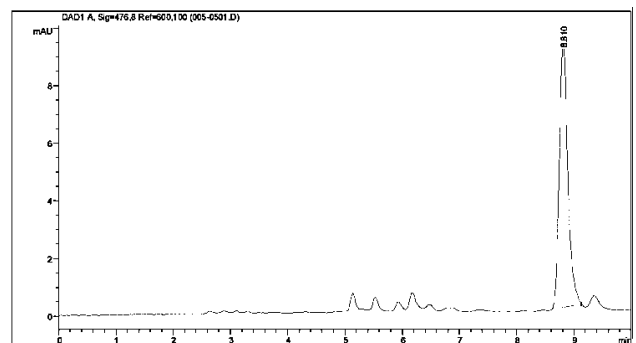


Fig. 9. Cromatograma de la luteína hidrolizada mediante la metodología Weissenberg

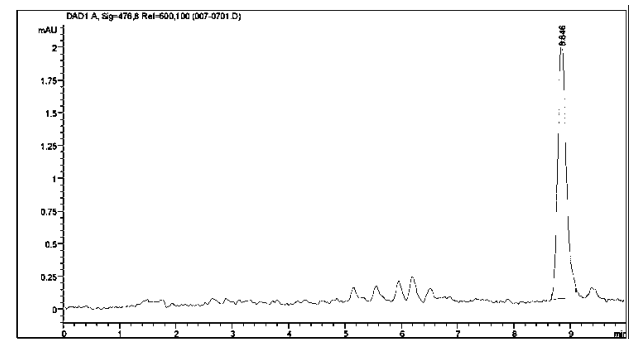


Fig. 10. Cromatograma de la luteína hidrolizada mediante la metodología Méndez

La Tabla 1 nos presenta un resumen de la estimación de Carotenoides totales en Extracto de la microalga.

Tabla 1Estimación de Carotenoides Totales en Extractos de *Haematococcus pluvialis*

	Absorbancia 450	Promedio	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa	Carotenoides totales/ppm
Control					
1	0.171				
2	0.179	0.178	0.006	3.321	34.336
3	0.183				
Autoclave					
1	0.057				
2	0.066	0.061	0.004	7.260	11.767
3	0.060				
Tip Sonicator					
1	0.046				
2	0.047	0.048	0.002	4.026	9.259
3	0.050				
Ultrasonido					
1	0.299				
2	0.276	0.286	0.012	4.163	55.169
3	0.282				
BeadBeater					
1	0.424				
2	0.465	0.440	0.022	5.118	84.877
3	0.429				

4. CONCLUSIONES

Se determinó que el homogenizador celular fue el tratamiento más eficiente para la ruptura celular de la microalga *Haematococcus pluvialis*, permitiendo una extracción de más de 2 veces con respecto a la muestra control.

Los tratamientos de sonicador de punta y autoclave degradan la pared celular y la mayoría de los carotenoides presentes en ella, debido a temperaturas altas alcanzadas.

La hidrólisis más eficiente en la muestra fue la hidrólisis de Weissenberg,

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado por Biotecnología Mexicana de Microalgas (Biomex)

REFERENCIAS

- [1] Krinsky, N; Landrum, J; Bone, R “Biological Mechanisms of the Protective Role of Lutein and Zeaxanthin in the eye” *Annu. Rev. Nutr* **2003**, 23, 171-201.
- [2] Davies, N; Morland, A “Macular Pigments: their characteristics and putative role” *Progress in Retinal and Eye Research* **2004**, 23, 533-559.
- [3] García, M; Moreno, J; Manzano, J; Florencio, F; Guerrero, M “Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor” *Journal of Biotechnology* **2005**, 115, 81-90.
- [4] Cerón, M; Campos, I; Sánchez, J; Ación, F; Molina, E; Fernández, J “Recovery of Lutein from Microalgae Biomass: Development of a Process for

Scenedesmus almeriensis Biomass” *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 11761-11766.

[5] Chang, J; Chan, M; Ho, S; Lee, D “Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N” *Biochemical Engineering Journal.* **2013**, 78, 24-31.

13th LACCEI Annual International Conference: “Engineering Education Facing the Grand Challenges, July 29-31, 2015, Santo Domingo, Dominican Republic