

**TEHNICILE CONTEMPORANE DE EXTRAGERE  
A ASTAXANTINEI DIN MICROALGA  
*HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS***

PLÎNGĂU ECATERINA

*Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, Republica Moldova*

Carotenoizii sunt compuși valoroși cu aplicați în diferite domenii, cum ar fi în produse farmaceutice, agenți de promovare a sănătății. Carotenoizii sunt produși fie prin sinteză chimică, fie naturali, obținuți din materia vegetală. Ficobiotehnologia este în topul tehnologiilor ecologice în ultimii ani, datorită eficienței economice și posibilității de dirijare a componenței biomasei microalgale printr-o selecție adecvată a condițiilor de cultivare. Sunt foarte actuale cercetările de modificare și optimizare a tehnicilor de extragere a pigmentilor în scopul obținerii unui produs natural cu impact minim asupra mediului înconjurător. Carotenoidul cu efect antioxidant superior este astaxantina, care poate fi obținută prin extragere din biomasa microalgei verzi *Haematococcus pluvialis*, drojdia *Phaffia rhodozyma* și unele specii de crustacee marine. Astaxantina obținută prin sinteză este mai puțin stabilă și cu o biodisponibilitate redusă [6, 14, 18].

Astaxantina natural este un amestec de izomeri *cis*- și *trans*-. Izomerii *trans*-pot fi ușor transformați în forma *cis*- la expunere temperaturilor crescute și iluminării. Microalga *Haematococcus pluvialis* conține 1,5-3% astaxantină [7, 21-23].

Astaxantina prezintă proprietăți antioxidante antiradiaționale și antiradicalice pronunțate și lipsa efectului pro-oxidant. Sunt rezumate câteva aplicații comerciale pentru astaxantina naturală în calitate de antioxidant. Astaxantina este propusă în calitate de remedii în tratamentul și profilaxia bolilor cardiovasculare și oftalmologie, produse cu efect reparator în afecțiuni cutanate și ca produs anti-aging [6, 18].

Utilizarea unei tehnici eficiente de extragere a astaxantinei constituie un moment crucial pentru potențiala utilizare comercială a antioxidantului. Extragerea astaxantinei din biomasa microalgei *Haematococcus pluvialis* poate fi realizată prin tehnica convențională cu aplicarea solvenților organici (acetona, hexan, acetonitril, eter dietilic, dimetilsulfoxid, metanol, etanol), extracție convențională combinată cu hidroliza acidă sau alcalină, extracție convențională direct în ulei vegetal, extracție cu CO<sub>2</sub> supercritic și extracție lichidă sub presiune [1, 2, 5, 7-9, 11, 15, 21-23]. Momentul slab al acestor tehnici este impactul solvenților asupra structurii astaxantinei și reducerea activității antioxidante ceea ce afectează stabilitatea carotenului [7, 21]. Pentru toate tehnicile enumerate au fost propuse variante de optimizare (variații de temperatură, presiune, durată) în scopul extragerii maximele a astaxantinei din biomasa algală.

Unica metodă biologică de extragere a astaxantinei prevede pretratarea enzimatică a aplanosporilor, dar care este costisitoare, voluminoasă în timp și care provoacă degradarea astaxantinei. Astfel, a fost propus un amestec de enzime format din: actinază, chitinază, fungază, funcelază, kitalază, pectinază, protează, proteinază și alte liaze care acționează timp de 24 ore la 37<sup>0</sup>C. Extractibilitatea astaxantinei a constituit 24% în cazul aplicării metodei date asupra biomasei native și 68% în cazul biomase tratate cu acetonă la temperatura de 40<sup>0</sup>C. Cantitatea astaxantinei de 6 mg/g biomasă a fost obținută din biomasa de *Haematococcus* tratată cu amestec 0,1% protează și 0,5% driselază la temperatura de 30<sup>0</sup>C timp de o oră [14].

Hidroliza alcalină prevede utilizarea alcaliilor în extragerea astaxantinei ceea ce poate provoca degradarea ei ireversibilă cu formarea de astacenă, iar extractibilitatea astaxantinei putea atinge 85% doar în cazul aplicării regimului de autoclavare [24]. A fost propusă utilizarea amestecului de NaOH cu metanol care ar preveni degradarea astaxantinei prin saponificare [6]. A fost efectuat un studiu al utilizării acizilor organici (citric, acetic, formic) în concentrația de 2N în hidroliza acidă a ciștilor. Recuperarea astaxantinei a fost determinată în intervalul de la 3,4% la 19,4% [20]. Prin aplicarea hidrolizei acide în combinație cu temperatura au fost recuperate 94% astaxantină. Tehnica propusă prevede pretratarea ciștilor cu 0,1N acid clorhidric la temperatura de 90<sup>0</sup>C timp de 10 min și extragerea astaxantinei în acetonă, etanol sau uleiuri vegetale [13, 14]. Cu toată eficiența tehnicilor extragerii convenționale, condițiile de producere industriale au impus simplificarea etapelor de extragere a astaxantinei prin reducerea volumelor mari de solvenți și a duratei procesului de extragere [17].

În cercetările de obținere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis*, prin tehnica extragerii cu dioxid de carbon supercritic, sunt utilizate uleiurile de olive și floarea soarelui [9]. Uleiul de floarea soarelui s-a dovedit a fi cel mai favorabil pentru parametrii selectați cu eficiența extracției de 36,36%. Pentru obținerea astaxantinei prin utilizarea extragerii cu dioxid de carbon supercritic, în mod obligator este prezent solventul organic sau un amestec de solvenți organici, ceea ce minimizează din biodisponibilitatea preparatelor obținute. Extractele obținute prin procedeul dat reprezintă un amestec de compuși biologic activi, ca de exemplu acizii grași în cazul biomasei de *Haematococcus*, care modifică esențial nu numai componența preparatelor dar și domeniile de aplicare [19]. Metoda extragerii astaxantinei cu dioxid de carbon supercritic este utilizată de companiile producătoare de preparare în baza astaxantinei naturală (Fuji Chemical Industry Co., Ltd, Toyama, Japonia).

Cea mai mare recuperare raportată de astaxantină din *Haematococcus pluvialis* a fost de 91,8%, obținută prin tehnica extragerii cu dioxid de carbon supercritic în condițiile presiunii de 30 MPa și a temperaturii de 60<sup>0</sup>C cu 10% etanol în calitate

de solvent [13]. Etanol un calitate de solvent facilitează o mai mare solubilitate a astaxantinei [2, 11].

Utilizarea tehnicii de extragere cu dioxid de carbon supercritic este considerată cea mai eficientă. O concentrație optimă de etanol în CO<sub>2</sub> supercritic determină randamentul cel mai ridicat al carotenoidului [11]. Concentrația optimă de etanol în extracția luteinei din *Scenedesmus sp.* a fost de 20% cu recuperarea a 76,65% pigment la presiunea de 40 MPa și temperatura de 70°C, în timp ce pentru extracția de astaxantină din *Haematococcus pluvialis* cu CO<sub>2</sub> a fost aplicat doar 5% etanol, obținându-se cel mai mare randament al astaxantinei de 77,9% la temperatura de 70°C și presiunea de 40 MPa [10].

Prezența etanolului în calitate de solvent în extragerea cu CO<sub>2</sub> supercritic, creșterea temperaturii poate avea în unele cazuri un efect negativ asupra structurii astaxantinei obținute din biomasa de *Haematococcus pluvialis* deoarece etanolul favorizează oxidarea [2]. Diferite au fost, de asemenea, temperatura și presiunea optimală pentru extracția β-carotenului și a zeaxantinei din *Synechococcus sp.*, datorită solubilităților lor diferite în amestecul de CO<sub>2</sub>-etanol. Temperatura pentru extracția β-carotenului a fost de 40°C la presiunea sub 20 MPa CO<sub>2</sub> și 5% etanol, în timp ce pentru zeaxantină temperatura și presiunea optimală au fost de 60°C și 20 MPa [3].

O tehnică promițătoare de utilizare a CO<sub>2</sub> supercritic este aplicarea uleiului vegetal în calitate de solvent. Beneficiile acestei metode constau în solubilitatea mai mare a astaxantinei în amestecul de ulei vegetal/CO<sub>2</sub> în comparație cu etanol/CO<sub>2</sub> și posibilitatea de a evita etapa de înlăturare ulterioară a solventului, deoarece carotenul poate rămâne în produsele uleioase vegetale [9]. Cantitatea optimă de solvent ulei vegetal a fost de 10%, rezultând cu recuperarea a 96% astaxantină la temperatura de 70°C și presiunea CO<sub>2</sub> de 40 MPa [9]. Uleiul vegetal a crescut extractibilitatea astaxantinei.

Extracția asistată de microunde a carotenoizilor este puțin investigată. Parametrii principali în extracția asistată de microunde sunt puterea microundelor, mediul reactant, durata acțiunii, temperatura și tipul peretelui celular microalgal [16]. În cazul aplicării uleiului vegetal în calitate de mediu reactant împreună cu microunde, poate fi omisă etapa de înlăturare a solventului [21].

Nu toți autorii sunt adepții etanolului, care este considerat a fi prietenos mediului și omului, în calitate de solvent în tehnicile de extragere a astaxantinei. Au fost comparate tehnicile de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis* cu utilizarea ultrasunetului și a microundelor. Pentru ambele variante a fost stabilită eficiența acetonei în calitate de solvent în recuperarea astaxantinei în comparație cu solvenții ca metanolul, etanolul și acetonitrilul. Tehnica de extragere a astaxantinei asistată de microunde la temperatura de 75°C timp de 5 minute a favorizat extragerea a 74% astaxantină în acetonă [4].

La extragerea astaxantinei cu microunde etanolul poate fi înlocuit cu uleiuri vegetale. Beneficiul acestei tehnici este în a omite etapa de înlăturare a solventului. Extracțiile au fost efectuate într-un extractor cu microunde la 300 W timp de 5 minute utilizând 500 ml ulei vegetal pentru 100 g biomasă algală. Aceeași probă de ulei vegetal a fost utilizată pentru 11 extrageri. În final, concentrația de astaxantină din uleiul vegetal a fost de 2,1% [9].

Tehnicile de extragere a astaxantinei cu utilizarea de microunde și a ultrasunetului au fost aplicate pe scară largă în obținerea unei varietăți de compuși biologic activi, inclusiv carotenoizii. Aceste tehnici sunt cost-eficiente și au impact negativ minimal asupra mediului. Cu toate acestea, există puține rapoarte privind efectele lor asupra stabilității acestor compuși. Unele studii au stabilit că cuptorul cu microunde a indus izomerizarea astaxantinei, iar procentul de izomerizare crește în paralel cu durata procesului de tratare a biomasei cu microunde. Un efect similar a fost determinat și în cazul aplicării tehnicilor de prelucrare a biomasei cu ultrasunet. Rezultatele prezentate au pus în evidență necesitatea optimizării tehnicilor aplicate în dependență de materia primă utilizată și produsul final obținut [10].

Tehnicile de extragere a carotenoizilor din biomasa algală s-au dezvoltat în ultimii ani sub eforturi intense de cercetare, deoarece carotenoizii au mai multe aplicații ca agenți de fortificare a sănătății și prezintă proprietăți antioxidante și anticancerigene. Deși carotenoizii sintetici sunt relativ ieftini și ușor de preparat, cele naturale sunt mai stabile și conțin izomerii biologic activi doriți.

*Concluzii.* Tehnica extragerii convenționale a carotenoizilor din biomasa algelor necesită cantități mari de solvenți, câteva etape de extragere și timpi de extracție, prin urmare câteva metode alternative de extragere, cum ar fi extragerile asistate cu ultrasunete și microunde, precum și extragerea în condiții presurizate și cu gaze supercritice, facilitează mult tehnologiile de producere a substanțelor biologic active. Cele mai avantajoase sunt tehnicile, în rezultatul aplicării cărora corelarea dintre randamentul procesului de extragere a pigmentilor și activitatea antioxidantă este una pozitivă.

### **Referințe bibliografice:**

1. Aravena RI., del Valle J. Effect of microalgae preconditioning on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. 10th Int Conf Supercrit Fluids, USA, (2012).
2. Bustamante A., Roberts P., Aravena Rand, del Valle J. M. Supercritical extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using ethanol-modified CO<sub>2</sub>, experiments and modelling. 11 Int Conf Eng Food, Athens, Greece, (2011).

3. Cardoso L. C., Serrano C. M., Rodríguez M. R., Martínez de la Ossa E. J., Lubián, L. M. Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology. *Am. J. Anal. Chem.* 2012, 3: 877–83. 10.
4. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk, and Prasert Pavasant. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 2011, 46: 64–70.
5. Jaime L., Rodriguez-Meizoso I., Cifuentes A. et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Lwt-food Sci Techn*, 2010, 43:105-115.
6. Jian-Ping Yuan, Juan Peng, Kai Yin, Jiang-Hai Wang. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55:150–165. ACCESS
7. Judith RD., Dragull K., Tang CS., Li QL. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal Chim Acta*, 2004, 501:175-81.
8. Kang CD., Sim SJ. Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. *Biotechn Progr*, 2007, 23:866-871.
9. Krichnavaruk S., Shotipruk A., Goto M., Pavasant P. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Biores Techn*, 2008, 99:5556-5560.
10. Liyan Zhao, Guanghua Zhao, Fang Chen, Zhengfu Wang, Jihong Wu, And Xiaosong Hu. Different Effects of Microwave and Ultrasound on the Stability of (*all E*)-Astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54:8346–8351.
11. Machmudah S., Shotipruk A., Goto M., Sasaki M., Hirose T. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as entrainer. *Ind EngnChem Res*, 2006, 45 :3652-3657.
12. Mendes-Pinto M., et al. In: Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.*, 2001, 13:19-24.
13. Miscu V. Solubilitatea astaxantinei în diferite tipuri de uleiuri vegetale alimentare. *Buletinul Academiei de Științe, Științele vieții, Chișinău*, 2009, 1(307):128-134.
14. Miscu V., Rudi L., Cepoi L., Chiriac T., Cojocari A., Rudic V. Activitatea antioxidantă și antiradicalică a extractului etanolic de astaxantină. *Buletinul Academiei de Științe, Științele vieții, Chișinău*, 2009, 3(309):127-136.
15. Nobre B., Marcelo F., Passos R. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur Food Res Techn*, 2006, 223:787-790.

16. Pasquet V., Cherouvier JR., Farhat F. et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Proc Biochem*, 2011, 46 :59-67.
17. Poojary Mahesha M., Barba Francisco J., Aliakbarian Bahar, Donsi Francesco, Pataro Gianpiero, Dias Daniel A., Juliano Pablo. Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Mar. Drugs* 2016, 14:214-250.
18. Ranga Rao Ambati, Siew Moi Phang, Sarada Ravi, Ravishankar Gokare Aswathanarayana. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications. *Mar. Drugs* 2014, 12:128-152.
19. Santoyoa S., et al. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42:1213-1218.
20. Sarada R., Vidhyavathi R., Usha D., Ravishankar GA. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Agr Food Chem*, 2006, 54:7585-7588.
21. Splinter S., Pare JJR., Kadali S. Method for direct extraction and concentration of natural-derived active compounds. US patent 2013/0338234 A1 (2013).
22. Thana P., Machmudah S., Goto M. et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Biores Techn*, 2008, 99:3110-3115.
23. Valderrama JO., Perrut M., Majewski W. Extraction of astaxanthin and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J Chem Engn Data*, 2003, 48:827-830.
24. Yuan Jian-Ping, Chen Feng. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 2000, 68:443-448.