

Eksperyment naukowy- ekstrakcja karotenoidów z mikroalg oraz badanie ich wpływu jako przeciwutleniacze na komórki skóry i zastosowanie w recepturach kosmetycznych przez studentów PW.



Koło Naukowe Biotechnologów "Herbion"

Projekt zgłaszany na Dużą Pulę Projektów Naukowych 2020.

Opiekun Koła Naukowego: dr hab., prof. PW Joanna Cieśla

Opiekunowie Eksperymentu Naukowego: dr Małgorzata Milner- Krawczyk, mgr inż. Anna Sobiepanek

WNIOSEK

Wstęp:

Mikroalgi (mikroglony), jednokomórkowe organizmy fotoautotroficzne są pierwotnymi producentami materii organicznej w środowisku wodnym lub wilgotnym. Za sprawą ich oryginalnych właściwości stanowią obecnie popularny obiekt badawczy dla naukowców z całego świata. Dzięki zawartości dużej ilości kwasów tłuszczowych wykorzystywane są m.in. w energetyce, a ich skład chemiczny zapewnia im szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, chemicznym, farmaceutycznym, medycznym oraz kosmetycznym. Mikroglony stanowią cenne źródło prawie wszystkich ważnych witamin, takich jak A, B1, B2, B6, B12, C, E, K, biotyna czy kwas foliowy. Część z tych związków jest wysoko cenionymi i szeroko wykorzystywanymi przeciwutleniaczami. W prawie wszystkich gatunkach glonów można znaleźć izomery witaminy E (tokoferol) oraz jej metaboliczne produkty pośrednie (1). Witamina E jest często wykorzystywana w kosmetykach chroniących przed wolnymi rodnikami i szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym.

Mikroalgi są jednym z głównych producentów karotenoidów. Karotenoidy w komórkach roślinnych pełnią ważną rolę - ich zadaniem jest m. in. ochrona chlorofilu przed nadmiernym natężeniem światła oraz przed wolnymi rodnikami tlenowymi (2). Z chemicznego punktu widzenia, karotenoidy to grupa związków będących organicznymi pochodnymi węglowodorów nienasyconych. Zbudowane są z jednostek izoprenowych i zawierają minimum 7 sprzężonych wiązań podwójnych, co czyni je efektywnymi fotoreceptorami. Karotenoidy nadają roślinom charakterystyczną żółto-pomarańczową barwę, która często jest maskowana przez chlorofil. Podzielić je można na dwie grupy: karoteny i ksantofile (3). Wśród karotenoidów 80% stanowi β -karoten będący prekursorem witaminy A.

Ze względu na szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, globalny rynek karotenoidów w 2016 roku szacowany był na 1,24 miliardy \$, a do 2021 ma wzrosnąć do 1,53 miliardów \$ (3). Związkom tym można przypisać szereg korzystnych dla człowieka właściwości, które są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetologii i farmacji.

Pozyskane ekstrakty z mikroalg występują najczęściej w kosmetykach nawilżających i regenerujących do skóry twarzy i ciała, ale także w kremach chroniących skórę i włosy przed promieniowaniem UV. Firma Exsymol S.A.M. produkuje kosmetyk Protulines z wyciągiem z *Arthrospira*, który ma potwierdzone działanie w naprawie wczesnych oznak starzenia skóry, napinaniu jej oraz zapobieganiu pojawianiu się rozstępów. Innym kosmetykiem o potwierdzonym działaniu jest Dermochlorella firmy Codif, zawierająca wyciąg z *Chlorella vulgaris*, który pomaga w syntezie kolagenu w skórze, regenerując w ten sposób tkankę i zapobiegając powstawaniu zmarszczek (4).

Przykładowo fukoksantyna występująca m.in. w mikroalgach *Cylindrotheca closterium* ma bardzo duży potencjał w zastosowaniu jako przeciwutleniacz (5). Może wpływać również pośrednio na metabolizm komórek, poprzez zmiany w ilościach produkowanych białek (6). Ważna ścieżka zastosowań karotenoidów wiąże się z ich wykorzystaniem w terapiach nowotworowych. Są zaangażowane w istotne mechanizmy komórkowe, bowiem wpływają na apoptozę oraz proliferację komórek (3). W terapiach tych jednym z najbardziej obiecujących karotenoidów jest β -karoten i fukoksantyna. β -karoten wykazuje także właściwości antyangiogenne, co między innymi oznacza, że redukuje powstawanie unaczynienia guzów nowotworowych (7). Ponadto astaksantyna i fukoksantyna obniżają ciśnienie krwi, co wpływa ochronnie na układ krwionośny. Fukoksantyna wykazuje również aktywności biologiczne pomocne w zwalczaniu chorób związanych ze stylem życia, takich jak otyłość czy cukrzyca, ma właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i ochronne w stosunku do wątroby (8) Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem karotenoidów w walce z przewlekłą chorobą oczu - zwyrodnieniem plamki żółtej (AMD). Udowodniono, że mieszanka β -karotenu z witaminą C i E oraz cynkiem spowalnia rozwój choroby oraz poprawia ostrość widzenia (9). Jedną z bardziej zaskakujących właściwość karotenoidów jest ich potencjalny udział w walce z otyłością (fukoksantyny m.in. poprawia spalania tłuszczów) (9). Mikroalga *Dunaliella* jest głównym źródłem pozyskiwania β -karotenu, jednego z częściej używanych antyoksydantów (10). W kosmetykach β -karoten ogranicza wpływ wolnych rodników, które powodują sukcesywne starzenie się komórek skóry (3). Karotenoidy są używane bardzo często jako naturalne pigmenty w kosmetykach kolorowych takich jak: cienie, kredki czy szminki (11).

W naszym projekcie skupimy się głównie na optymalizacji metod pozyskiwania ekstraktów karotenoidowych z mikroalg, zbadaniu właściwości antyoksydacyjnych pozyskanych ekstraktów na hodowlach komórkowych oraz praktycznym wykorzystaniu wybranego ekstraktu w formułacjach kosmetycznych.

Zadanie badawcze:

Projekt będzie podzielony na następujące etapy: [1] hodowla mikroalg w skali do 400 ml, [2] ekstrakcja karotenoidów z komórek mikroalg, [3] badanie wpływu wyizolowanych ekstraktów na różne właściwości komórek skóry oraz [4] wykorzystanie wybranego ekstraktu przy pilotażowej produkcji różnego typu kosmetyków.

Do projektu wybrano następujące gatunki mikroalg: *Dunaliella tertiolecta* (Rys. 1A), *Cylindrotheca closterium* (1B), *Rhodomonas maculata* (1C).

Komórki *Dunaliella tertiolecta* przyjmują barwę zieloną, mają kształt sferyczny i około 10 μm długości. Komórki *Cylindrotheca closterium* mają wrzecionowaty kształt, długość od 30 do 50 μm i barwę pomarańczową. Ostatni wybrany do badań gatunek - *Rhodomonas maculata* ma owalny kształt, długość 10-20 μm i przyjmuje różne zabarwienie w zależności od dostępności składników odżywczych. Zabarwienie może się zmieniać od brązowo/czerwonego poprzez żółty do zielonego.

Badania wstępne do projektu zostały przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków. Optymalizacja hodowli mikroalg w skali laboratoryjnej została przeprowadzona przez Adrianę Zalewską podczas badań do pracy inżynierskiej („Wpływ modyfikacji podłoża na adhezję wybranych komórek alg”, promotor: dr hab. inż. Tomasz Kobiela, prof. PW; opiekun naukowy: mgr inż. Anna Sobiepanek). Następnie dla uzyskanej biomasy mikroalg zastosowano metodę izolacji karotenoidów z mikroorganizmów opracowaną przez dr Małgorzatę Milner-Krawczyk oraz mgr inż. Annę Sobiepanek. Wykonano analizę UV/VIS dla uzyskanych ekstraktów mikroalg (Rys 2 A, B, C), która potwierdziła występowanie 3 pików charakterystycznych dla związków z grupy karotenoidów (Rys 3).

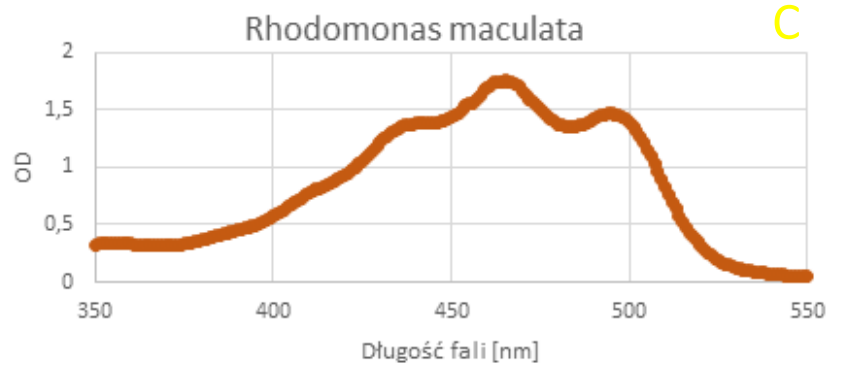
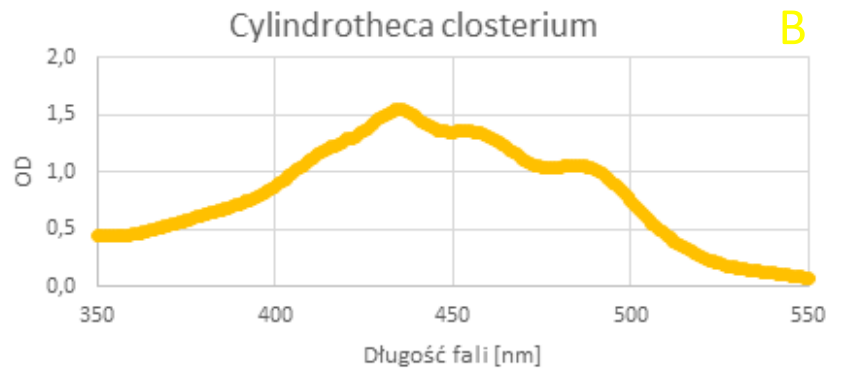
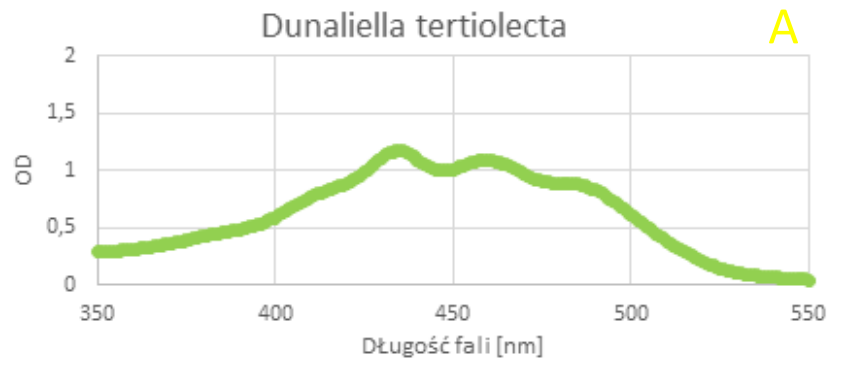
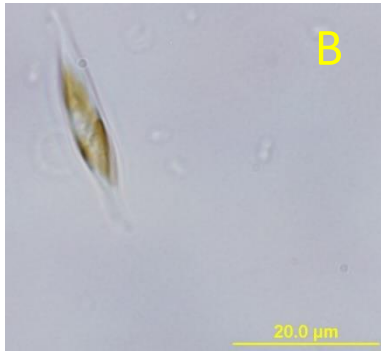
Dotychczasowe badania zostały przeprowadzone w skali 50 ml hodowli. Podczas pierwszego etapu projektu zostanie powiększona skala hodowli mikroalg do 400 ml. W celu uzyskania większej ilości biomasy.

W drugim etapie skupimy się na dostosowaniu opracowanej wcześniej metody izolacji karotenoidów z mikroorganizmów do wybranych gatunków mikroalg. Każdy z wybranych gatunków należy do innej grupy ewolucyjnej, co wiąże się między innymi z różnicami w budowie komórek. Proponowane metody ekstrakcji tych barwników wykorzystują wytrząsanie z rozpuszczalnikami organicznymi, sonikację lub mechaniczną dezintegrację komórek z wykorzystaniem szklanych kulek. Uzyskane ekstrakty będą badane spektrofotometrycznie oraz za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

Kolejnym etapem będzie przeprowadzenie badań wpływu uzyskanych ekstraktów karotenoidów na różne właściwości komórek skóry. Do badań wykorzystamy różne typy ludzkich komórek skóry, głównie linie keratynocytów HaCaT oraz fibroblastów BJ. Wpływ ekstraktów będzie sprawdzany zarówno na komórkach nietraktowanych jak i poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego. Analiza stanu komórek traktowanych ekstraktami będzie obejmowała ocenę morfologii, aktywności metabolicznej, integralności błony cytoplazmatycznej oraz zawartości wolnych rodników na terenie cytoplazmy.

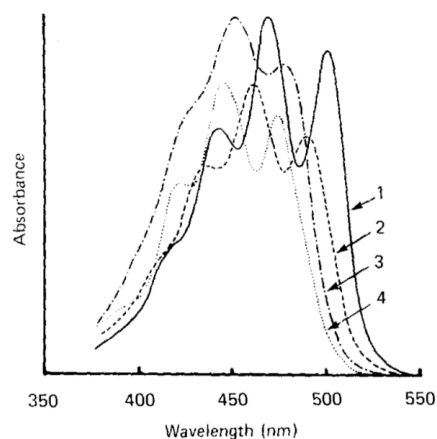
Ocena morfologiczna komórek zostanie przeprowadzona na podstawie obserwacji mikroskopowych prowadzonych zarówno w świetle widzialnym z zastosowaniem kontrastu fazowego jak i mikroskopii fluorescencyjnej. Do oceny cytotoksyczności ekstraktów zostanie wykorzystanych kilka testów biologicznych. Test MTT zostanie wykorzystany do oceny aktywności metabolicznej dehydrogenazy mitochondrialnej. Z kolei test LDH będzie stosowany do badania integralności błony komórkowej poprzez wykrywanie uwalnianej z komórek dehydrogenazy mleczanowej. Zostanie także przeprowadzone ilościowe oznaczenie wolnych rodników tlenowych przy użyciu diocjanu dichlorodihydrofluoresceiny. Na podstawie uzyskanych wyników zostanie wybrane jedno stężenie dla każdego ekstraktu karotenoidów do zbadania właściwości mechanicznych komórek za pomocą metody AFM oraz określenia zmian w cytoszkieletcie aktynowym poprzez barwienie fluorescencyjne.

Ostatnim etapem projektu będzie przygotowanie dwóch receptur kosmetycznych zawierającej ekstrakty z mikroalg oraz zbadanie skuteczności działania przygotowanego kosmetyków poprzez badania sensoryczno-hedonistyczne, sensoryczno-jakościowe oraz instrumentalną oceną efektów nawilżania.



Rysunek 1 Zdjęcia obrazujące różne gatunki mikroalg wybrane jako obiekty badawcze w projekcie: *Dunaliella tertiolecta* (A), *Cylindrotheca closterium* (B), *Rhodomonas maculata* (C).

Rysunek 2 Wykresy przedstawiające widmo spektrofotometryczne ekstraktów *Dunaliella tertiolecta* (A), *Cylindrotheca closterium* (B) i *Rhodomonas maculata* (C) w zakresie od 350 nm do 550 nm.



Rysunek 3 Widmo adsorpcji wybranych karotenoidów (1) likopen, (2) γ -karoten, (3) β -karoten, (4) α -karoten, na podstawie (12)

Efekty:

Zwieńczeniem projektu będzie wytypowanie ekstraktu karotenoidów uzyskanego z mikroalg o najlepszych właściwościach przeciwutleniających wobec komórek skóry oraz zastosowanie go w recepturach kosmetycznych.

Projekt niesie ze sobą korzyść naukową, dydaktyczną oraz promocyjną. Karotenoidy są niezwykle wartościowymi związkami o potwierdzonym działaniu przeciwnowotworowym, przeciwzapalnym, jak również antyangiogennym, są też jedne z najsilniejszych poznanych naturalnych antyoksydantów. Synteza chemiczna karotenoidów jest procesem mało wydajnym oraz szkodliwym dla środowiska, dlatego też duże zainteresowanie wzbudza poszukiwanie nowych źródeł pozyskiwania tych związków. Mikroalgi są obecnie postrzegane jako dobre i wydajne źródło tych bioaktywnych metabolitów dla przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego. W projekcie zostaną przebadane trzy szczepy mikroalg, których hodowla zostanie wprowadzona na stałe na Wydziale Chemicznym PW.

Projekt umożliwi jego członkom zaplanowanie oraz przeprowadzenie eksperymentu naukowego zawierającego wszystkie etapy; od przeglądu literaturowego poprzez przeprowadzenie badań laboratoryjnych, analizę wyników, praktyczne wykorzystanie wyników badań oraz podsumowanie projektu. W trakcie projektu uczestnicy będą mieli możliwość poszerzenia swojej wiedzy o jednym z najbardziej obiecujących mikroorganizmów – mikroalgach, które ze względu na duże możliwości wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu stają się niezwykle obiecującym obiektem współczesnych badań. W trakcie prowadzenia eksperymentów studenci będą mieli możliwość prowadzenia hodowli mikroalg (różniące się w swej specyfice w stosunku do standardowych hodowli mikrobiologicznych), hodowli linii komórek skóry oraz ich analizy. Zapoznają się również z wieloma technikami badawczymi, w tym wysoko zaawansowanymi, jak np. mikroskopia sił atomowych. Nowym doświadczeniem dla realizujących projekt będzie przygotowanie receptury kosmetycznej. Uzyskane wyniki pozwolą na promocję badań, prowadzonych przez studentów Politechniki Warszawskiej, podczas różnorodnych konferencji naukowych (Intercollegiate Biotechnology Symposium 'Symbioza') oraz spotkań naukowych (Konik, Piknik Naukowy, Festiwal Nauki).

Bibliografia:

1. Becker W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. W: Handbook of Microalgal Culture John Wiley & Sons, Ltd; 2007.s. 312–51.
2. Esteban R, Martínez B, Fernández-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI. Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. Eur J Phycol. maj 2009;44(2):221–30.
3. Sathasivam R, Ki J-S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. Mar Drugs. styczeń 2018;16(1).
4. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng. luty 2006;101(2):87–96.
5. Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, i in. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. J Agric Food Chem. październik 2007;55(21):8516–22.
6. Miyashita K. Function of marine carotenoids. Forum Nutr. 2009;61:136–46.
7. Guruvayoorappan C, Kuttan G. Beta-carotene inhibits tumor-specific angiogenesis by altering the cytokine profile and inhibits the nuclear translocation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells. Integr Cancer Ther. wrzesień 2007;6(3):258–70.
8. Zhang H, Tang Y, Zhang Y, Zhang S, Qu J, Wang X, i in. Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. Evid-Based Complement Altern Med ECAM. 2015 [cytowane 15 grudzień 2019];2015.
9. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim Biophys Acta. 30 maj 2005;1740(2):101–7.
10. Fazeli, Reza M., Tofighi H., Samadi N., Jamalifar H, Fazeli A.R. Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (lake urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & WT) under stress conditions.(2006).
11. Hamed I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016;15(6):1104–23.
12. Britton G. General carotenoid methods. W: Methods in Enzymology. Academic Press; 1985 [cytowane 9 styczeń 2020]. s. 113–49. (Steroids and Isoprenoids Part B; t. 111).