

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Evaluación del uso de la tecnología de cambio de presión (PCT) y las condiciones de extracción sobre las propiedades tecnológicas y funcionales de las proteínas extraídas de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* para su potencial uso en la industria alimentaria

Elaborado por:
Andrea Carolina Morales (B64770)
Daniela Quintero Villalta (B55611)

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
Febrero, 2023

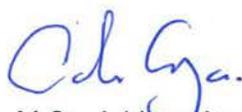
TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos.

Elaborado por:

Andrea Carolina Morales y Daniela Quintero Villalta

Aprobado por:



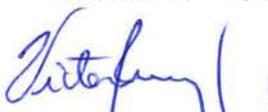
M.Sc. Adriana Araya Morice
Presidente del Tribunal



Ph.D. Patricia Esquivel Rodríguez
Directora del Proyecto



Ph.D. Ana Lucía Vásquez-Caicedo
Asesora del Proyecto



Ph.D. Víctor M. Jiménez García
Asesor del proyecto



Ph.D. Andrea Paola Irias Mata
Profesora designada

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo final de graduación fue posible gracias al apoyo de las profesoras Patricia Esquivel y Ana Lucía Vasquez-Caicedo, el profesor Victor Jimenez, el Instituto Fraunhofer, nuestras familias y amigos. Gracias al comité asesor y a nuestra directora de tesis, por habernos acompañado y guiado en cada etapa del proceso. Gracias por confiar en nosotras y habernos brindado esta gran oportunidad. La experiencia vivida y el conocimiento adquirido durante la realización del TFG fue invaluable. No solo nos impulsó a crecer profesionalmente, sino que también fue una experiencia inolvidable.

Agradecemos al Instituto Fraunhofer en Alemania, por abrirnos las puertas para realizar la presente investigación. Gracias a las personas que nos capacitaron y nos acompañaron durante el desarrollo de los experimentos y todas las pruebas preliminares.

Durante este TFG, el apoyo de nuestras familias fue constante. Gracias por ser fuente de motivación y tranquilidad al estar atentos/presentes incluso a pesar de la diferencia horaria. Nuestros amigos también nos acompañaron durante esta etapa, les agradecemos por haber estado con nosotras tanto cuando todo iba bien, como cuando no.

Por último, agradecemos a la CTFG por la oportunidad de realizar esta tesis entre dos. Tener dos puntos de vista a la hora de tomar decisiones hizo el proceso aún más enriquecedor.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

| | |
|--------------------------|---|
| AE | Actividad de emulsión |
| Ar | Argón |
| b | Intercepto |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| C | Concentración |
| CBP | Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse |
| Cn | Concentración |
| COV | Compuestos orgánicos volátiles |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| CRA | Capacidad de retención de agua |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| EE | Estabilidad de emulsión |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico |
| <i>et al</i> | Y otros |
| EtOH-BHT | Etanol-Butilhidroxitolueno |
| GRAS | Generalmente reconocido como seguro |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| IGB | Fraunhofer-Institute für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik |
| IU | Unidad Internacional |
| kDa | kiloDalton |
| m | Pendiente |
| N | Nitrógeno |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaHCO₃ | Bicarbonato de sodio |
| PCT | Tecnología de Cambio de Presión |
| PUFAs | Ácidos grasos poliinsaturados |
| RuDPCase | Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa |

| | |
|-----------------|---|
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio) |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| Tris-HCl | Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato |
| V | Volumen |
| °C | Grados Celsius |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| kPa | Kilopascal |
| L | Litro |
| ± | Más o menos |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |
| MPa | Megapascal |
| μL | Microlitro |
| mbar | Milibar |
| mL | Mililitro |
| min | Minuto |
| M | Molar (mol/L) |
| m/m | masa / masa |
| nm | Nanometro |
| % | Porcentaje |
| p | Probabilidad |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| x g | Fuerza centrífuga relativa (gravedad) |

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| 1. JUSTIFICACIÓN | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 2.1. Objetivo general | 21 |
| 2.2. Objetivos específicos | 21 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 22 |
| 3.1. Características generales de las microalgas | 22 |
| 3.2. Procesamiento de las microalgas | 22 |
| 3.2.1. Cultivo de las microalgas | 22 |
| 3.2.2. Cosecha de las microalgas | 24 |
| 3.3. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 25 |
| 3.3.1. Proteínas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 26 |
| 3.3.2. Lípidos y fucoxantina de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 27 |
| 3.4. Métodos de disrupción para la obtención de compuestos de interés de microalgas | 27 |
| 3.4.1. Molino de bolas | 27 |
| 3.4.2. Homogeneización a alta presión | 28 |
| 3.4.3. Sonicación | 29 |
| 3.4.4. Tratamientos enzimáticos | 29 |
| 3.4.5. Hidrólisis química y uso de solventes | 31 |
| 3.4.6. Descompresión explosiva | 32 |
| 3.4.7. PCT | 32 |
| 3.4.7.1. Factores que influyen sobre la PCT | 32 |
| 3.5. Proteínas | 34 |
| 3.5.1. Características generales de las proteínas | 34 |
| 3.5.2. Proteínas actualmente utilizadas en la industria alimentaria y el potencial uso de microalgas | 35 |
| 3.5.3. Métodos de extracción y purificación de proteínas de microalgas | 36 |
| 3.5.4. Cuantificación de proteínas | 38 |
| 3.6. Propiedades tecnofuncionales y fisicoquímicas de las proteínas | 38 |
| 3.6.1. Solubilidad | 39 |
| 3.6.2. Capacidad de retención de agua | 40 |
| 3.6.3. Actividad y estabilidad de emulsión | 40 |
| 3.6.4. Propiedades tecnofuncionales y fisicoquímicas de las proteínas de microalgas | 42 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| 4.1. Ubicación del estudio | 44 |
| 4.2. Materia prima | 44 |
| 4.3. Preparación de la biomasa | 44 |
| 4.4. PCT | 44 |
| 4.4.1. Diseño experimental | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5. Evaluación del cambio de pH de la biomasa sobre la solubilidad de las proteínas | 47 |
| 4.5.1. Pruebas preliminares para evaluar el efecto del cambio de pH en la biomasa luego de la PCT | 48 |
| 4.5.2. Efecto del cambio de pH de la biomasa luego de la extracción con la PCT | 48 |
| 4.5.3. Resuspensión del residuo y cambio de pH | 48 |
| 4.5.4. Diseño experimental | 50 |
| 4.6. Evaluación de las propiedades funcionales y tecnológicas | 51 |
| 4.6.1. Estándares | 51 |
| 4.6.2. Liofilización | 51 |
| 4.6.3. Diseño experimental | 51 |
| 4.7. Análisis estadístico de los datos | 51 |
| 4.8. Métodos de análisis | 52 |
| 4.8.1. Contenido de humedad | 52 |
| 4.8.2. Disrupción celular | 52 |
| 4.8.3. Solubilización de proteínas | 53 |
| 4.8.3.1. Método de Lowry | 53 |
| 4.8.4. Electroforesis en gel | 54 |
| 4.8.5. Propiedades funcionales y tecnológicas | 54 |
| 4.8.5.1. Solubilidad de las proteínas | 54 |
| 4.8.5.2. Capacidad de retención de agua (CRA) | 55 |
| 4.8.5.3. Actividad y estabilidad de las emulsiones | 55 |
| 4.8.6. Contenido de fucoxantina | 56 |
| 4.9. Distribución del trabajo | 57 |
| 4.10. Instituciones interesadas y financiamiento | 58 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 59 |
| 5.1. Uso de la tecnología de cambio de presión (PCT) para romper las células de <i>P. tricornutum</i> y extraer proteínas solubles | 59 |
| 5.1.1. Disrupción celular | 61 |
| 5.1.1.1. Efecto del número de ciclos sobre la disrupción celular | 63 |
| 5.1.1.2. Efecto del tipo de gas y la concentración de biomasa sobre la disrupción celular | 65 |
| 5.1.2. Solubilización de proteínas | 66 |
| 5.1.2.1. Efecto del número de ciclos sobre la solubilización de proteínas | 67 |
| 5.1.2.2. Efecto del tipo de gas sobre la solubilización de proteínas | 68 |
| 5.1.2.3. Efecto de la concentración de biomasa sobre la solubilización de proteínas | 69 |
| 5.1.3. Selección de las condiciones óptimas | 70 |
| 5.2. Efecto del cambio de pH para la extracción de proteínas solubles | 72 |
| 5.2.1. Pruebas preliminares para la determinación de las condiciones de temperatura para el cambio de pH | 72 |
| 5.2.2. Contenido proteico del extracto luego del cambio de pH a la biomasa y los | |

| | |
|---|------------|
| residuos | 75 |
| 5.2.2.1. Efecto del pH alcalino sobre las proteínas | 77 |
| 5.2.2.2. Efecto de la resuspensión del residuo sobre las proteínas | 77 |
| 5.2.2.3. Parámetros importantes sobre la solubilidad de las proteínas | 78 |
| 5.3. Análisis de las propiedades de los extractos seleccionados | 79 |
| 5.3.1. Electroforesis en gel | 80 |
| 5.3.2. Propiedades tecnofuncionales | 81 |
| 5.3.2.1. Solubilidad | 81 |
| 5.3.2.2. CRA | 85 |
| 5.3.2.3. AE | 89 |
| 5.3.2.4. EE | 90 |
| 5.3.3. Otras propiedades de los extractos | 93 |
| 6. CONCLUSIONES | 97 |
| 7. RECOMENDACIONES | 99 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |
| 9. ANEXOS | 113 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema metodológico para las muestras sometidas a la PCT y sus posteriores análisis y almacenamiento. 46
- Figura 2.** Diagrama de actividades para la evaluación del efecto del cambio de pH de la biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* sobre la solubilidad de proteínas. 50
- Figura 3.** Diagrama de la cámara de Neubauer utilizada para cuantificar las células y determinar la disrupción celular provocada por la PCT (en azul se enumeran los cinco cuadros cuyas células fueron cuantificadas). 52
- Figura 4.** Microscopía de la biomasa de *P. tricornutum* al 2,5% antes (izquierda) y luego (derecha) de dos ciclos de la PCT utilizando nitrógeno como gas de compresión. Ambas muestras se diluyeron 1:100 para su cuantificación en el microscopio (en verde se señalan algunas células íntegras y en rojo algunas células rotas o fragmentos celulares). 62
- Figura 5.** Disrupción celular promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a uno y dos ciclos de la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados. 64
- Figura 6.** Disrupción celular promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a la PCT utilizando distintos gases de compresión y diferentes concentraciones de biomasa. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. No se presentan las diferencias significativas debido a que se está analizando una interacción. 65
- Figura 7.** Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a uno y dos ciclos de la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados. 68
- Figura 8.** Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a la PCT variando el gas de compresión. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados. 69
- Figura 9.** Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter distintas concentraciones (baja: 2,24-2,76%; media: 4,85-4,93%; alta: 6,95-7,49%) de *P. tricornutum* a la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados. 70
- Figura 10.** Evaluación del efecto del cambio de pH a distintas temperaturas sobre la solubilización proteica de la biomasa de 2,24% de *P. tricornutum* luego de dos ciclos de PCT, utilizando argón como gas de compresión. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) para los distintos pH y temperaturas analizadas. 73
- Figura 11.** Esquema del procedimiento seguido para evaluar el efecto del cambio de pH en la muestra de biomasa de *P. tricornutum* al 2,24%, luego de dos ciclos de la PCT 76

usando argón como gas de compresión, y los porcentajes de proteína solubilizada obtenidos para cada muestra. Los números romanos identifican las muestras. En las anotaciones se presenta la cantidad de proteína solubilizada promedio con respecto a la proteína total en cada muestra junto con su desviación estándar. Los distintos colores de las anotaciones y las letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Figura 12. Distribución de los pesos moleculares de extractos de *P. tricornutum* luego de someterlos a electroforesis en gel (carriles: 1 y 11: estándar proteico (5-250 kDa). 2-4: muestra I. 5-7: muestra V. 8-10: muestra VI. 12: buffer de muestreo). 80

Figura 13. Promedio de la solubilidad, a tres valores de pH de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y tres muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a dos ciclos de la PCT utilizando argón como gas de compresión (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican diferencias significativas entre las proteínas solubilizadas ($p < 0,05$). 82

Figura 14. Promedio de la capacidad de retención de agua (CRA) a tres valores de pH de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). N.R. significa que no retiene agua. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). 86

Figura 15. Promedio de la AE a pH 7,0 de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Colores y letras distintos en las barras indican las diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). 89

Figura 16. Promedio de la EE a pH 7,0 de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Letras distintas sobre las barras y colores indican diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). 91

Figura 17. Sobrenadantes liofilizados de *P. tricornutum* luego de la PCT usando argón como gas de compresión, 2,24% de biomasa y dos ciclos, y el cambio de pH hasta 12 a 24,5°C. 94

Figura 18. Fases luego de la centrifugación de una muestra de *P. tricornutum* sometida a la PCT (usando argón como gas de compresión, 2,24% de biomasa y dos ciclos) y al cambio de pH a 12 a 45°C (como se detalla en la sección 4.5.1). Izquierda: residuo. Derecha: sobrenadante liofilizado. 95

Figura 19. Contenido promedio de fucoxantina (% m/m) en una muestra al 5% de biomasa de *P. tricornutum* liofilizada antes y después de ser tratada con uno o dos ciclos de la PCT utilizando argón y nitrógeno como gases de compresión y flujos de 75 g/min y 23 g/min, respectivamente (B: biomasa, S1: sobrenadante con un ciclo en la PCT, R1: residuo con un ciclo en la PCT, S2: sobrenadante con dos ciclos en la PCT, R2: residuo con dos ciclos en la PCT). Los distintos colores de las barras hacen referencia a las fracciones utilizadas, siendo amarillo la biomasa, verde oscuro el sobrenadante y verde claro el residuo, luego de la centrifugación. 96

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|-----|
| Cuadro I. Muestras preparadas para ser sometidas a la PCT. | 47 |
| Cuadro II. Distribución del análisis de datos y discusión de resultados. | 57 |
| Cuadro III. Concentración de las biomásas durante el tratamiento de la PCT, para la evaluación de los parámetros de esta tecnología en la obtención de proteína solubilizada de <i>P. tricornutum</i> . | 59 |
| Cuadro IV. Probabilidad asociada a los factores analizados durante la PCT de <i>P. tricornutum</i> para evaluar su efecto sobre la disrupción celular, obtenida a través de un ANOVA factorial. | 63 |
| Cuadro V. Probabilidad asociada a los factores analizados durante la PCT de <i>P. tricornutum</i> para evaluar su efecto sobre la solubilización de proteínas, obtenida a través de un ANOVA factorial. | 67 |
| Cuadro VI. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis del cambio de pH a distintas temperaturas de la biomasa de <i>P. tricornutum</i> con una concentración de 2,24% luego de dos ciclos de la PCT utilizando argón como gas de compresión, obtenida a través de un ANOVA factorial. | 73 |
| Cuadro VII. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis de la solubilidad de tres estándares y distintas fracciones de <i>P. tricornutum</i> , obtenidas luego de un ANOVA factorial. | 82 |
| Cuadro VIII. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis de la CRA de tres estándares y distintas fracciones de <i>P. tricornutum</i> , obtenidas luego de un ANOVA factorial. | 86 |
| Cuadro IX. Resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de los parámetros de proceso de la PCT sobre la disrupción celular. | 113 |
| Cuadro X. Resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de los parámetros de proceso de la PCT sobre la solubilización de proteínas. | 117 |
| Cuadro XI. Resultados obtenidos durante las pruebas preliminares para establecer las condiciones utilizadas durante el cambio de pH y la resuspensión del residuo. | 120 |
| Cuadro XII. Resultados obtenidos al determinar la solubilidad de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH. | 121 |
| Cuadro XIII. Resultados obtenidos al determinar la capacidad de retención de agua (CRA) de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH. | 122 |

| | |
|---|-----|
| Cuadro XIV. Resultados obtenidos al determinar la actividad y la estabilidad de emulsión de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH. | 123 |
| Cuadro XV. Resultados del contenido de proteína obtenidos durante el cambio de pH a 24,5°C, de los extractos seleccionados. | 124 |
| Cuadro XVI. Resultados obtenidos al evaluar la solubilidad de las proteínas como propiedad tecnofuncional de los extractos seleccionados. | 125 |
| Cuadro XVII. Resultados obtenidos al determinar la capacidad de retención de agua (CRA) de los extractos seleccionados. | 127 |
| Cuadro XVIII. Resultados obtenidos al determinar la actividad de emulsión (AE) y la estabilidad de emulsión (EE) de los extractos seleccionados. | 129 |
| Cuadro XIX. Contenido de fucoxantina (% m/m) para una muestra al 5% de biomasa de <i>P. tricornutum</i> liofilizada luego de ser tratada con la PCT utilizando argón y nitrógeno como gases de compresión y flujos de 75 g/min y 23 g/min para argón y solo 75 g/min para nitrógeno, analizando también 1 o 2 ciclos de la PCT, así también como la biomasa sin ser sometida previamente a la PCT. | 130 |

RESUMEN

Morales, Andrea Carolina

Quintero Villalta, Daniela

Evaluación del uso de la tecnología de cambio de presión (PCT) y las condiciones de extracción sobre las propiedades tecnológicas y funcionales de las proteínas extraídas de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* para su potencial uso en la industria alimentaria

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

Morales, A. y Quintero Villalta, D. 2023. 130 p: 19 il., 145 refs.

Se utilizó la tecnología de cambio de presión (PCT) para la disrupción celular y la extracción proteica de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Para ello, se evaluó el efecto de la concentración de biomasa (2,50%, 5,00% y 7,50%), el tipo de gas (argón y nitrógeno) y el número de ciclos (uno y dos). Se observaron diferencias significativas en la disrupción celular provocadas por el número de ciclos y la interacción entre el tipo de gas y la concentración de biomasa. En cambio, sólo el tipo de gas y la concentración de biomasa causaron diferencias significativas en la solubilización proteica. A partir de los resultados obtenidos, se definió que los mejores parámetros fueron argón, 2,24% y dos ciclos, con los cuales se obtuvo una disrupción celular promedio de $57 \pm 1\%$ y un promedio de $25,8 \pm 0,9\%$ de proteínas solubles.

A la biomasa tratada con las condiciones de PCT seleccionadas se le evaluó el efecto del cambio de pH, con el fin de aumentar la cantidad de proteína soluble extraída. Se evidenció que el aumento del pH solubilizó más proteínas, donde la muestra que sufrió dos extracciones sucesivas, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12 presentó un $45 \pm 1\%$ de proteína solubilizada. Este valor no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con la muestra extraída a pH 12, la cual tuvo un $36 \pm 3\%$.

Se realizó una electroforesis en gel para conocer más acerca de la distribución de pesos moleculares de los extractos. No obstante, no se obtuvieron buenos resultados, lo que se atribuyó a la falta de purificación de los extractos.

Por último, se evaluaron las propiedades tecnofuncionales de la biomasa sometida a la PCT utilizando 2,24% de biomasa, argón y dos ciclos, así como los dos extractos mencionados luego del cambio de pH. Estos tres se compararon contra estándares de proteínas actualmente empleadas en la industria alimentaria: concentrado de proteína de suero lácteo, aislado de soya y clara de huevo. En cuanto a la solubilidad, la muestra luego del tratamiento con la PCT tuvo resultados similares a los estándares, mientras que las muestras luego del cambio de pH sufrieron una reducción en su solubilidad. Con respecto a la capacidad de retención de agua (CRA), solo la muestra que se sometió a dos extracciones sucesivas (la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) presentó buenos resultados, aunque significativamente menores que los del estándar con mayor CRA (aislado de soya). La actividad de emulsión se vio favorecida luego del cambio de pH en los extractos y la estabilidad de emulsión para todos los extractos analizados fue similar a la del concentrado de proteína de suero.

Por lo anterior, los resultados muestran la potencial aplicación de los extractos de *P. tricornutum* en la industria alimentaria como fuente de proteína con propiedades tecnofuncionales. No obstante, a la hora de utilizarse en alimentos, otros factores como color y aroma deberán ser considerados.

1. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas son un componente indispensable en la dieta, ya que aportan aminoácidos, los cuales son importantes para el adecuado funcionamiento corporal. Además, proporcionan propiedades funcionales que pueden ayudar a que los productos alimenticios sean más atractivos para los consumidores, ya que influyen en algunas de sus características, como apariencia, sabor, aroma y textura (Nadathur *et al.*, 2017).

En 2017, la población mundial alcanzó los 7400 millones de personas, con lo que superó la cantidad que la tierra puede mantener de forma sostenible (Nadathur *et al.*, 2017). A medida que la población crece, la demanda de proteínas de los consumidores y las industrias también incrementa. Actualmente, en la industria alimentaria se utilizan proteínas de origen animal, especialmente de huevo o leche, tensoactivos sintéticos y soja (Bertsch *et al.*, 2021; Lafarga *et al.*, 2018). Hay muchas desventajas relacionadas con las fuentes tradicionales de proteínas animales. Estas presentan costos crecientes y un suministro limitado. Aparte, su obtención se ha asociado con un incremento en el cambio climático, el agotamiento del agua dulce, la pérdida de biodiversidad, algunos peligros relacionados a la salud humana, entre otros (Sá *et al.*, 2020).

Se han estudiado varias fuentes vegetales como suplementos proteicos, como las leguminosas (Sá *et al.*, 2020). Sin embargo, para su producción se utilizan fertilizantes, lo que puede conllevar a consecuencias indeseadas como la eutrofización con nitrógeno, lo cual provoca efectos indeseables en el medio ambiente como la proliferación de algas. Estos agroquímicos también liberan óxido nitroso, un gas con un potente efecto invernadero que contribuye al calentamiento del planeta (Nadathur *et al.*, 2017).

Dicho lo anterior, es importante crear nuevos sistemas alimentarios o rediseñar los existentes con fuentes de proteínas alternativas y sostenibles que puedan sustituir a las tradicionales (Nadathur *et al.*, 2017). Éstas deben acoplarse con los cambios en los hábitos alimenticios (como la dieta vegana) y con la preocupación por el medio ambiente, así como con aspectos religiosos y culturales (Bertsch *et al.*, 2021; Lafarga *et al.*, 2018). La producción de proteínas de bajo costo, de fácil suministro y que cumplan con las demandas medioambientales y sociales es un gran reto (Sá *et al.*, 2020). Una alternativa es el uso de biomasa verde (hojas, algas, microalgas y plantas acuáticas), debido a sus múltiples ventajas, como gran disponibilidad, alto rendimiento proteico por área y alta tasa de acumulación de proteínas (Schweiggert-Weisz *et al.*, 2020).

Dentro de estas biomasa verde se encuentran las diatomeas (filo Bacillariophyta), un tipo común de fitoplancton que promueve la productividad primaria marina (Xue *et al.*, 2015). Estos microorganismos pueden encontrarse en diferentes lugares con altas fluctuaciones de sal, especialmente cerca de la costa (Cui *et al.*, 2019), y tienen un alto impacto en los ciclos geoquímicos de carbono, nitrógeno, fósforo y silicio (Veith & Büchel, 2007). Son eucariotas unicelulares, fotoautótrofos y son responsables del 20% de la fijación global de carbono (Cui *et al.*, 2019). Las diatomeas son microalgas que representan una fuente natural de lípidos, vitaminas, pigmentos, antioxidantes y silicatos. Estas pueden utilizarse para generar biocombustibles y bioplásticos, los cuales son utilizados en aplicaciones biotecnológicas, alimentarias y de nanofabricación (Hempel *et al.*, 2011).

Phaeodactylum tricornutum es una especie de diatomea. Esta crece rápidamente y es capaz de sintetizar proteínas, carbohidratos, compuestos fenólicos, minerales y antibióticos, además de los metabolitos previamente mencionados. Su biomasa es rica en ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés), ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), y contiene un alto porcentaje del carotenoide fucoxantina (Akyil *et al.*, 2020). Actualmente, *P. tricornutum* se utiliza para la obtención de lípidos y pigmentos, y también contiene 49,0 g de proteína por cada 100 g de materia seca (Grossmann *et al.*, 2019b). Por lo tanto, es una fuente prometedora de proteínas y diferentes compuestos que pueden otorgar características beneficiosas a distintos alimentos. Adicionalmente, al ser una fuente de proteína carbono neutral y con un menor impacto ambiental, sería beneficioso utilizarla para sustituir a las tradicionales (Hempel *et al.*, 2011; Lafarga *et al.*, 2018).

Phaeodactylum tricornutum es capaz de crecer en varios medios acuosos, se adapta fácilmente al medio ambiente y tiene una alta productividad de biomasa (235 mg/L*día) (Megía-Hervás *et al.*, 2020). Esta microalga puede ser potencialmente cultivada a gran escala utilizando biorreactores. Su composición y productividad se ve afectada por la luz del día, el suministro de CO₂ y la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, el metabolismo de la microalga puede ser controlado para aumentar el rendimiento de la biomasa y acumular compuestos específicos (Megía-Hervás *et al.*, 2020).

P. tricornutum tiene una pared celular altamente silicificada, que se compone de un esqueleto silíceo formado por válvulas que están interconectadas por fajas de sílice. Esta estructura favorece la captación de nutrientes y brinda protección ante las condiciones ambientales. Sin embargo, la cantidad depende de las condiciones de cultivo y del morfotipo de las células debido a una diferencia en la síntesis de sílice (Branco-Vieira *et al.*, 2018).

Esta microalga puede presentar tres morfologías diferentes: fusiforme, ovalada y trirradial (Cui *et al.*, 2019). En condiciones de laboratorio, suele presentarse en forma ovalada o fusiforme (Haußmann, 2019). La pared celular de la morfología ovalada es cinco veces más fuerte (500 kPa) que las otras dos formas (100 kPa) (Cui *et al.*, 2019). Esta morfología tiene una envoltura con un contenido de aproximadamente 0,5% de silicato. En cambio, las células fusiformes tienen silicato principalmente en el citoplasma (Haußmann, 2019).

Para la extracción de proteínas de las microalgas hay que realizar una disrupción celular (Branco-Vieira *et al.*, 2020; Haußmann, 2019; Horst *et al.*, 2012). Algunos de los métodos que se han utilizado con este fin son: microondas, homogeneización a alta presión, molino de bolas, campos eléctricos pulsados, autoclavado, solución de NaCl al 10% y extracción con disolventes orgánicos asistida por enzimas (Grossmann *et al.*, 2019a; Horst *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Lamentablemente, algunos métodos no son adecuados para su escalamiento debido a sus altos costos o toxicidades (Cui *et al.*, 2021), mientras que otros solo son eficaces cuando se utilizan condiciones muy extremas, que afectan a las propiedades funcionales de las proteínas. De estas técnicas, la homogeneización a alta presión parece ser la mejor opción, ya que consigue valores muy altos de disrupción celular (Grossmann *et al.*, 2019a).

Una nueva alternativa para la disrupción celular es la tecnología de cambio de presión (PCT, por sus siglas en inglés, Pressure Change Technology). En este método, se satura un líquido con gas inerte (como nitrógeno o argón) durante un breve tiempo de retención, lo que permite que el gas se disuelva en el líquido y se difunda a través de las células (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2014). Posteriormente, la presión se reduce abruptamente a la presión atmosférica, lo que ocasiona que el gas se expanda rápidamente, y rompa las células (Bönsch *et al.*, 2007; Vollmer *et al.*, 2021).

Las presiones moderadas (de 25 a 50 MPa), las bajas temperaturas (de 5 a 40°C) y el uso de gas inerte (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2014; Vollmer *et al.*, 2021) de este método pueden ser condiciones útiles para lograr una extracción sin afectar las proteínas de las microalgas. Sin embargo, debido a que la estructura de la membrana celular de la muestra tiene un efecto sobre la eficacia de la disrupción celular (Bönsch *et al.*, 2007), se requiere una investigación más profunda para su aplicación en *P. tricornutum*.

Al utilizar PCT es importante tener en cuenta diferentes parámetros que influyen en la disrupción celular. Bönsch *et al.* (2007) concluyeron que la temperatura, la presión y la cantidad de gas disuelto afectan los resultados de esta tecnología. Además, Vollmer *et al.* (2021) informaron que un segundo ciclo de rompimiento celular reduce la cantidad de compuestos volátiles en el zumo de piña. El tipo de gas utilizado también debe considerarse, ya que éste tiene que ser capaz de solubilizarse en la matriz del alimento; esta propiedad varía entre distintos gases. Durante el proceso se podría utilizar nitrógeno, argón o dióxido de carbono. No obstante, en esta investigación se excluirá el dióxido de carbono debido a que puede disminuir el pH del líquido después de ser solubilizado (Biancavallo, 2018), lo que a su vez puede afectar la extracción de proteínas. Adicionalmente, Hörner (2020) ya ha analizado el uso de este gas en la PCT de la microalga *P. tricornutum*. Considerando toda la información anterior, se definió evaluar el efecto del tipo de gas, el número de ciclos y la concentración de biomasa al utilizar PCT para la extracción de proteínas de la microalga *P. tricornutum*.

Tras la disrupción de las células, es necesario extraer las proteínas de la matriz. Se podría utilizar el cambio de pH, debido a que la solubilidad de las proteínas cambia con el pH. Las proteínas de las microalgas son solubles en medios alcalinos, puesto que tienen una carga neta negativa que provoca repulsiones entre y dentro de las moléculas, lo que hace que interactúen con el agua (Cavonius *et al.*, 2015). Por lo tanto, se evaluará el efecto de distintas condiciones de pH alcalinos. A medida que el pH se aleja del punto isoeléctrico, la solubilidad aumenta debido al cambio de las cargas netas de las proteínas, lo que incrementa las fuerzas electrostáticas de estas últimas, por lo que una mayor cantidad de moléculas de agua puede interactuar con ellas (Pelegri & Gasparetto, 2005). Considerando que al aumentar el pH incrementa la proporción de proteínas solubles, se hará una extracción en pasos, re-suspendiendo el residuo obtenido, debido a que las fracciones pueden presentar propiedades diferentes.

Las proteínas pueden desnaturalizarse fácilmente y de forma irreversible, por lo que es útil emplear un método de extracción delicado como el cambio de pH. Debido a la ausencia de procesamiento térmico, este método de extracción favorece la conservación de las propiedades funcionales (Cavonius *et al.*, 2015). Adicionalmente, este método es

relativamente barato, escalable, tiene bajo costo y consumo energético (Cavonius *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2021).

Debido a las propiedades tecnológicas y funcionales de las proteínas mencionadas anteriormente, estas pueden actuar como modificadores de textura y agentes emulsificantes, ayudar a la absorción de agua y grasa y mejorar las propiedades de batido de los alimentos, lo que a su vez contribuye a la textura, el sabor y la aceptación de los productos por parte del consumidor (García-Vaquero *et al.*, 2017). Las microalgas son una fuente de proteínas con propiedades funcionales y tecnológicas promisorias, por lo que podrían permitir desarrollar productos alimenticios con diseños estructurales complejos. Estas propiedades incluyen características como la solubilidad, la formación de una emulsión, la capacidad de retención de agua, la formación de espumas y la formación de geles (Grossmann *et al.*, 2019b).

En cuanto a las propiedades tecnofuncionales, la solubilidad es extremadamente importante, ya que afecta otras características, como la capacidad de emulsión y de formación de espuma. En la industria alimentaria, se requiere que las proteínas tengan una alta solubilidad, especialmente cuando se utilizan en productos como aderezos, bebidas, dulces y coberturas (Benelhadj *et al.*, 2016; García-Vaquero *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, el pH influye directamente en la solubilidad de las proteínas (Raikos *et al.*, 2014), por lo que las condiciones de extracción pueden afectar sus propiedades tecnofuncionales.

Por otro lado, las propiedades emulsificantes son importantes al elaborar ciertos alimentos formulados, como análogos cárnicos y bebidas (García-Vaquero *et al.*, 2017). Esto se debe a su capacidad para evitar los mecanismos desestabilizadores que rompen o separan las emulsiones, ya que forman una cubierta viscoelástica alrededor de las gotas de aceite. Estas propiedades también están influenciadas por el pH (Raikos *et al.*, 2014). Se ha comprobado que algunas fracciones extraídas de microalgas estabilizan emulsiones y espumas debido a la presencia de proteínas con actividad superficial (Bertsch *et al.*, 2021).

Por último, la capacidad de retención de agua permite a ciertas moléculas retener agua contra la gravedad. Los aditivos que proporcionan estas propiedades se utilizan habitualmente en productos cárnicos, sopas, natillas y productos de panadería para mejorar la viscosidad, la frescura, el espesamiento o las características de manipulación (Raikos *et al.*, 2014).

Dado que muchos alimentos tienen ácidos dentro de sus formulaciones o sufren cambios de pH debido a fermentación, modificación del sabor y extensión de la vida útil, es importante considerar el efecto del pH sobre las propiedades tecnológicas y funcionales al estudiar la aplicación de las proteínas en la industria alimentaria (Grossmann *et al.*, 2019b).

En resumen, se desea analizar el efecto de la PCT y el posterior cambio de pH en la extracción de las proteínas de *P. tricornutum*. El primero será útil para romper las células y facilitar la liberación de proteínas, mientras que el segundo ayudará a aumentar su solubilidad. Teniendo en cuenta que las propiedades funcionales y tecnológicas de las proteínas dependen de sus características fisicoquímicas, y estas pueden variar según las condiciones de extracción (García-Vaquero *et al.*, 2017), se evaluarán las propiedades

tecnofuncionales de *P. tricornutum* tras utilizar los parámetros establecidos. Esto es importante ya que no hay muchos estudios que evalúen las propiedades tecnofuncionales de esta microalga en diferentes condiciones.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar el efecto de las condiciones de extracción de proteínas de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* utilizando la tecnología de cambio de presión (PCT) sobre la concentración, la disrupción celular y las propiedades funcionales y tecnológicas de las proteínas extraídas para la evaluación del potencial de la aplicación de esta tecnología en la industria.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la cantidad de ciclos, la concentración de biomasa y el gas al utilizar la PCT sobre la capacidad de extracción de proteínas de la microalga *P. tricornutum* para la recomendación de las condiciones en la aplicación de esta tecnología.
- Evaluar el efecto del pH sobre la concentración y las propiedades de las proteínas extraídas de la microalga *P. tricornutum* para la selección de condiciones de acidez en la aplicación de esta tecnología a nivel industrial.
- Evaluar las propiedades funcionales y tecnológicas (solubilidad, capacidad de retención de agua y actividad y estabilidad de emulsión) de extractos de proteínas seleccionados de la microalga *P. tricornutum* obtenidos utilizando la PCT para su potencial aplicación industrial.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Características generales de las microalgas

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos unicelulares, en el cual se pueden encontrar algas eucarióticas microscópicas y cianobacterias (Barka & Blecker, 2016; Matos, 2019). Éstas pueden acumular carbohidratos, proteínas, lípidos y otros compuestos de interés, como carotenoides, ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos, enzimas, vitaminas y minerales, gracias a su capacidad de utilizar energía solar, dióxido de carbono y nutrientes, así como compuestos inorgánicos como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y hierro (Matos, 2019). Por medio de la fotosíntesis, las microalgas son capaces de absorber el 20% del dióxido de carbono global y logran producir más del 20% del oxígeno generado en el mundo (Cui *et al.*, 2019).

Las tres clases de microalgas de mayor abundancia son las diatomeas (Bacillariophyceae), las algas verdes (Chlorophyceae) y las algas doradas (Chrysophyceae) (Matos, 2019). Las diatomeas evolucionaron hace aproximadamente 200 millones de años y son un tipo común de fitoplancton, el cual es la base de la alimentación de muchas especies marinas (Levitan *et al.*, 2019). Este tipo de microalga tiene un tamaño promedio de 10-200 μm y pueden ser de distintos morfotipos (fusiforme, trirradial y ovaladas), los cuales se desarrollan según las condiciones medioambientales (Cui *et al.*, 2019).

Las microalgas contienen aproximadamente 40-50% de proteína en sus células; sin embargo, estos porcentajes pueden variar según la especie y las condiciones de cultivo (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Al extraer las proteínas de las células y concentrarlas, se pueden obtener porcentajes de proteína mayores, de 60-89% en base seca (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

Las proteínas de microalgas se pueden utilizar como fuente de alternativas proteicas, debido a su bajo contenido de ácidos nucleicos y alto nivel de aminoácidos esenciales (Matos, 2019). No obstante, éstas deben ser catalogadas como “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS, por sus siglas en inglés) para poder utilizarse en alimentos. Distintas microalgas ya han sido catalogadas como GRAS (*Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *P. cruentum* y *C. cohnii*) (García *et al.*, 2017), pero otras como *P. tricornutum* todavía no presentan registros de esta clasificación (FDA, 2022). Aun así, esta última no produce toxinas, y ha sido utilizada comercialmente en acuicultura y suplementos alimenticios (Matos, 2019).

3.2. Procesamiento de las microalgas

Normalmente, las etapas de producción de microalgas son: crecimiento y cultivo, cosecha y eliminación de agua, disrupción celular para microalgas con paredes celulares rígidas, extracción de compuestos de interés, hidrólisis y separación (Matos, 2019; Soto-Sierra *et al.*, 2018). A continuación se detallan las dos primeras etapas.

3.2.1. Cultivo de las microalgas

La etapa de cultivo afecta directamente el rendimiento proteico que se obtiene al final del proceso y uno de sus objetivos es obtener un alto rendimiento proteico (g

proteína/g biomasa) y una alta productividad de biomasa (g biomasa/L de medio de cultivo) (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Las condiciones de cultivo pueden optimizarse para maximizar los valores anteriores.

Las microalgas pueden ser cultivadas tanto al aire libre como en el interior de un establecimiento, como estanques o fotobiorreactores. El último sistema mencionado tiene como ventajas la prevención de la evaporación, la reducción de contaminación, la disminución de pérdidas de CO₂, la replicación de las condiciones de cultivo y la flexibilidad en el diseño técnico. Sin embargo, dentro de las desventajas de este sistema se incluyen los altos costos de construcción, operación y mantenimiento (Matos, 2019). Por otro lado, aunque el uso de estanques al aire libre tenga costos menores, ciertas condiciones, como la temperatura, son difíciles de mantener (Silva Benavides *et al.*, 2013).

Los cultivos de microalgas pueden ser fotoautotróficos, heterotróficos o mixotróficos. En el primer caso, se utiliza la luz y el CO₂ para la biosíntesis de compuestos y, la acumulación de proteína en este sistema depende de la cantidad de nitrógeno presente. En cuanto al heterotrófico, éste no necesita luz, debido a que se emplea glucosa y glicerol como fuente de energía. Estos sistemas tienen por lo general bajos rendimientos proteicos y de productividades de biomasa, aunque pueden mejorar al agregar compuestos con carbono y nitrógeno (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Por último, el sistema mixotrófico utiliza fuentes orgánicas e inorgánicas para proveer sustratos y energía. Éste, al ser un sistema muy flexible, ha presentado buenos resultados de crecimiento, un ciclo de crecimiento más corto, menores pérdidas de biomasa durante períodos oscuros y una mejor productividad de lípidos y proteínas (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Adicionalmente, Cui *et al.* (2019) mencionan que el cultivo mixotrófico incrementa el contenido de ácidos grasos omega-3 en *P. tricornutum*.

La luz es uno de los factores más importantes durante el cultivo de las algas en ambientes fotoautotróficos y mixotróficos. Cuando hay luz, se favorece la fotosíntesis y el crecimiento de las microalgas. Sin embargo, si la intensidad de luz es muy fuerte, se irradia en forma de calor y ocurre la fotoinhibición, por lo que se reduce el crecimiento. Por otro lado, en la oscuridad predomina la respiración de las plantas y el crecimiento también se detiene. Por lo tanto, en los biorreactores debe existir una agitación eficiente, con el fin de brindar equitativamente la luz en la biomasa y evitar la acumulación de calor y oscuridad, aumentando así la productividad en la biomasa (Hörner, 2020).

Por otra parte, el carbono permite alcanzar una alta productividad de biomasa, lo cual está relacionado con una alta productividad proteica. Cabe destacar que las fuentes de carbono afectan el rendimiento final, por lo que es importante escoger la adecuada (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Por ejemplo, Soto-Sierra *et al.* (2018) mencionan que evidenciaron mayores productividades utilizando CO₂ o glucosa, en lugar de bicarbonato de sodio. Por otro lado, el fósforo está involucrado en el metabolismo de las células (ácidos nucleicos, adenosín trifosfato y membranas celulares) y se ha demostrado que está relacionado con la biosíntesis de proteínas. Por esta razón, es importante mantener una cantidad adecuada, mas no excesiva, de fósforo durante el cultivo de la microalga (Grossmann *et al.*, 2019a).

Otro de los factores de mayor importancia para la acumulación de proteína en las microalgas es la cantidad de nitrógeno disponible. Dependiendo de la fuente y la cantidad de nitrógeno, el contenido de proteína total va a variar en cada especie (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Grossmann *et al.* (2019a) mencionan que, cuando las microalgas crecen en un medio sin nitrógeno, la división celular desacelera, se producen menos proteínas y aumenta la cantidad de compuestos altos en energía como polisacáridos o lípidos. Haußmann (2019) especifica que la limitación de nitrógeno para las microalgas *Chlorella sorokiniana* y *Chlamydomonas reinhardtii* permite el almacenamiento de almidón en forma de gránulos, el cual puede alcanzar hasta el 50% y el 60% de su masa biodegradable, respectivamente. En cambio, la autora indica que *P. tricornutum* no produce almidón, sino crisolaminarina (β -1,3 glucanos) como fuente de almacenamiento.

3.2.2. Cosecha de las microalgas

Luego del cultivo de las microalgas, sus células deben ser cosechadas, lo que significa que se deben separar de su medio de cultivo (Singh y Patidar, 2018). Generalmente, la densidad de la biomasa es muy baja, por lo que se debe remover alrededor del 90% de agua durante el proceso de cosecha (Vandamme *et al.*, 2018). Por lo tanto, la cosecha comprende etapas de extracción y pasos posteriores como centrifugación o filtración (Grossmann *et al.*, 2019a), con el fin de obtener una biomasa más concentrada.

Algunas de las técnicas más comunes utilizadas para la cosecha de microalgas son: floculación, flotación, filtración y centrifugación. En cuanto a la floculación y la flotación, éstos son métodos que se emplean principalmente si la biomasa se utilizará para producir biocombustibles o restaurar la calidad del agua; mientras, la filtración y la centrifugación son mejores opciones para biomásas que se utilizarán en la producción de alimentos para consumo humano o animal (Singh y Patidar, 2018).

Argento *et al.* (2016) se enfocaron en la cosecha de *Spirulina* y recomendaron empezar con una pre-filtración, utilizando una malla de 30 micras, con el fin de eliminar el medio de cultivo (el cual se podría reutilizar) y evitar el uso excesivo de energía eléctrica en la etapa de filtrado. Luego, realizaron una filtración con agitación constante, con el fin de extraer completamente el medio de cultivo. Posteriormente, lavaron la microalga por medio de aspersión sobre una cinta transportadora con material poroso para remover por completo el medio de cultivo alcalino y evitar su presencia con el producto final. Por último, procedieron a secar la pasta obtenida, con el fin de venderla para su consumo directo. El secado fue por pulverización, ya que es rápido y eficiente, y esteriliza el producto.

Aun así, el secado también se podría realizar al sol, con tambores, por secado por atomización o liofilización (Argento *et al.*, 2016). Se ha reportado que el método utilizado impacta en la biodisponibilidad de la biomasa producida. Por ejemplo, se ha mencionado que el secado en tambores incrementa la utilización proteica neta y la digestibilidad en comparación con el secado al sol (García-Garibay *et al.*, 2014). Durante el secado también se deben considerar los costos. En este aspecto, se ha mencionado que el uso de tambores implica mayores costos de inversión y mantenimiento, en comparación con

el secado por atomización; no obstante, los costos energéticos de este último son más elevados (Costa *et al.*, 2019).

En cuanto al proceso de liofilización, éste busca separar el agua u otro solvente de una disolución realizando primero una congelación del producto húmedo y posteriormente una vaporización del hielo a baja presión. Este método de secado consiste en la eliminación del agua por sublimación (Huaraca, 2011). Grossmann *et al.* (2018) mencionaron que extractos proteicos liofilizados que no estén tan refinados pueden usarse sin una purificación adicional.

3.3. *Phaeodactylum tricornutum*

Dentro de las diatomeas, una de las más estudiadas es la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, cuyo genoma se ha secuenciado casi por completo. Esta diatomea es de rápido crecimiento (Cui *et al.*, 2019) y se ha reportado que puede cultivarse en sistemas abiertos o en fotobiorreactores, aunque en estos segundos se obtiene una mayor productividad, lo cual se cree que puede deberse a un mejor régimen de luz y oscuridad en los fotobiorreactores, que puede promover un uso más eficiente de la luz (Silva Benavides *et al.*, 2013). Adicionalmente, esta microalga puede crecer en un amplio rango de medios de cultivo, incluyendo agua marina o dulce; además, es tolerante a valores altos de pH y puede crecer con poca luz (Butler *et al.*, 2020).

En cuanto a la composición, según Matos *et al.* (2016), la biomasa deshidratada (a 45 ± 5 °C, por 24 h) de esta microalga contiene un 98,6% de materia seca, de la cual un 39% corresponde a proteína total, un 16,1% a cenizas, un 15,4% a carbohidratos totales, un 14,9% a lípidos totales y un 13,2% a fibra total. Además, *P. tricornutum* acumula aceites y crisolaminarina. Ésta produce compuestos como el carotenoide fucoxantina, lípidos, PUFAs, silicatos y ceramidas (Matos, 2019). También, tiene un bajo contenido de ácidos grasos saturados (alrededor de 28-29%) y contiene altas concentraciones de PUFAs omega-3, principalmente EPA y DHA (ácido docosahexaenoico) (Matos *et al.*, 2016).

Por su alto contenido de lípidos, ácidos grasos omega-3 y proteína de alta calidad, esta diatomea tiene un alto potencial para el desarrollo de productos de gran valor para la salud humana (Cui *et al.*, 2019). Adicionalmente, *P. tricornutum* contiene minerales, como calcio, potasio, sodio, azufre, magnesio, zinc, manganeso, cobre, y no presenta cantidades significativas de metales pesados tóxicos en 100 g de biomasa seca (Cui *et al.*, 2019).

Cabe destacar que en el estudio de Matos *et al.* (2016), mencionado durante la discusión de la composición de *P. tricornutum*, no se limitó ningún nutriente durante el cultivo. Este detalle es importante porque se ha demostrado que varios parámetros influyen sobre su composición. Por ejemplo, se ha reportado que la deficiencia de nitrógeno, provoca un incremento en la productividad de lípidos en detrimento de las proteínas (Tarazona Delgado *et al.*, 2021).

Además, se ha demostrado que la intensidad de luz, su espectro y el periodo de exposición a la luz afectan el metabolismo de esta microalga. Baja intensidad de luz propicia la acumulación de fucoxantina y EPA, mientras que a mayor intensidad de luz se logra acumular crisolaminarina y triacilglicerol. También, limitaciones de nitrógeno y

fósforo han demostrado incrementar exitosamente la acumulación de ciertos productos en la microalga (Butler *et al.*, 2020).

Por su parte, Cui *et al.* (2019) investigaron el efecto de distintos factores, como temperatura, luz, urea, pH, CO₂, fosfatos, nitrato y sal, en la composición de lípidos de la microalga *P. tricornutum*. La reducción de nitrógeno y fosfato del medio de cultivo, al igual que el aumento en la intensidad de luz, incrementaron el contenido de lípidos. Un mayor nivel de urea y CO₂ en el medio potenció el contenido de EPA; por su parte, disminuir la temperatura de 25°C a 15°C elevó el contenido de EPA y DHA.

Al igual que todas las diatomeas, esta microalga tiene una pared celular con sílica, la cual brinda protección ante condiciones ambientales y favorece la captación de nutrientes (Branco-Vieira *et al.*, 2018). Esta estructura se compone de un esqueleto silíceo y distintas válvulas interconectadas por sílica. En comparación con otras microalgas, *P. tricornutum* tiene menores concentraciones de este material, las cuales varían según el morfotipo (ovalada, fusiforme y trirradial) y las condiciones de cultivo (Francius *et al.*, 2008). Aun así, se ha logrado extraer sílica de la misma con el objetivo de utilizarla en aplicaciones energéticas potenciales (Branco-Vieira *et al.*, 2018).

En cuanto a las tres morfologías diferentes, las formas ovalada y fusiforme suelen presentarse en condiciones de laboratorio (Haußmann, 2019). La pared celular de la morfología ovalada es cinco veces más fuerte (500 kPa) que las otras dos formas (100 kPa) (Cui *et al.*, 2019). Esta morfología tiene una envoltura con un contenido de aproximadamente 0,5% de silicato. En cambio, las células fusiformes tienen silicato principalmente en el citoplasma (Haußmann, 2019).

3.3.1. Proteínas de *Phaeodactylum tricornutum*

Las proteínas constituyen uno de los principales atractivos de *P. tricornutum*. Branco-Vieira *et al.* (2018) cuantificaron el contenido total de proteínas en distintas fases de crecimiento de esta microalga y observaron que los niveles proteicos incrementaban en las últimas fases, las cuales corresponden a fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía. Estos mismos autores reportaron que las proteínas son las biomoléculas celulares de mayor abundancia presentes en la biomasa de esta microalga. Las proteínas constituyen aproximadamente un 30-60% de la biomasa celular total, cuando sus necesidades nutricionales han sido suplidas por completo.

Por otro lado, la calidad nutricional de estas proteínas también debe considerarse. Ésta depende de la composición de aminoácidos, su digestibilidad y su capacidad de absorción, por lo que, una proteína de alta calidad va a aportar todos los aminoácidos esenciales en las cantidades adecuadas (Haußmann, 2019). Haußmann (2019) evaluó las propiedades nutricionales de la microalga *P. tricornutum* y evidenció que las fracciones (luego de ser tratadas alcalinamente, a pH 12) contaban con todos los aminoácidos esenciales, obteniendo así: 18,7; 57,6; 96,7; 45,1; 22,4; 59,6; 125,4; 51,5 mg/g proteína de histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina y cisteína, valina, fenilalanina y tirosina, y treonina, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los de una proteína de referencia propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para cumplir los requerimientos de aminoácidos del ser humano. No obstante, la autora no pudo cuantificar el triptofano debido a una insuficiente cantidad de muestra.

3.3.2. Lípidos y fucoxantina de *Phaeodactylum tricornutum*

Además de las proteínas, otra macromolécula importante en esta diatomea son los lípidos, los cuales ayudan en la acumulación de energía en las células y a realizar otras funciones estructurales. Debido a la interesante composición lipídica de *P. tricornutum*, esta microalga se ha utilizado para la producción de biodiesel y para la obtención de compuestos de alto valor (Branco-Vieira *et al.*, 2018). Dentro de estos últimos se encuentran los carotenoides, los cuales son pigmentos liposolubles y pertenecen a los isoprenoides, ya que están formados por ocho unidades de isopreno (Harris *et al.*, 2009).

La fucoxantina es un tipo de carotenoide que se encuentra en los tilacoides de los cloroplastos de las microalgas. Éste ha demostrado tener beneficios en la salud, los que se deben a su actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena y preventiva ante la obesidad. *P. tricornutum* tiene un alto contenido de fucoxantina, entre 16,5-26,1 mg/g de materia seca (Derwenskus *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; Neumann *et al.*, 2019).

3.4. Métodos de disrupción para la obtención de compuestos de interés de microalgas

Para extraer los componentes de interés mencionados en las secciones anteriores, es necesario someter a las células de *P. tricornutum* a un proceso de disrupción celular debido a su pared celular silicificada (Günerken *et al.*, 2019). Este proceso también trae otros beneficios, como el aumento de la digestibilidad de los compuestos de algas. Por ejemplo, la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de *P. tricornutum* aumentó del 77% al 83% luego de someter las células a un proceso de disrupción usando un molino de bolas (Wild *et al.*, 2018). Lo anterior se relaciona con el rompimiento de la pared celular, la cual protege los compuestos e inhibe la acción de enzimas del tracto digestivo (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Para esto se han empleado diferentes tecnologías, las cuales incluyen molino de bolas, homogeneización a presión, campos eléctricos pulsantes, sonicación, tratamientos enzimáticos, hidrólisis química, descompresión explosiva y PCT (Doucha & Lívanský, 2008; Günerken *et al.*, 2019; Safi *et al.*, 2015, 2017).

3.4.1. Molino de bolas

Los molinos de bolas utilizan bolas de cerámica, vidrio, acero o zirconio para romper las células (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Las bolas y la biomasa a tratar se colocan en una cámara con un eje rotatorio en el centro. El eje contiene discos que le aportan energía cinética a las bolas, las cuales obtienen aceleración radial y ejercen fuerzas de cizalla sobre la muestra tratada (Doucha & Lívanský, 2008).

El uso de molinos de bolas forma restos pequeños de células. Éste se caracteriza por la dispersión (*scattering* en inglés), donde se rompen las células y se producen restos celulares y la liberación o la dispersión de organelas (Günerken *et al.*, 2019). Se ha reportado que el uso de esta tecnología tiene un alto potencial industrial para ser utilizado como método de disrupción de microalgas, especialmente porque alcanza valores de disrupción celular de hasta 98%, se requiere una cantidad de energía relativamente baja

y se pueden procesar altas concentraciones de biomasa (Soto-Sierra *et al.*, 2018). No obstante, los resultados dependen de parámetros como el tamaño de las bolas, el flujo y la densidad celular de la biomasa y el volumen de la cámara del equipo (Doucha & Lívanský, 2008).

Sin embargo, las fuerzas de cizalla elevadas y un tiempo de proceso extenso pueden traer problemas para la extracción de ciertos compuestos. Esto se debe a que, aunque se desea una alta fuerza de cizalla para lograr romper las células, cuando ésta es elevada, se provocan subidas en la temperatura, así como diferencias de presión. Estas dos últimas reducen la calidad de las biomoléculas termolábiles (Günerken *et al.*, 2019). Para reducir el efecto anterior existen molinos que controlan la temperatura al estar equipados con accesorios de enfriamiento. Por ejemplo, en el caso de la extracción de proteínas, se recomienda evitar que la temperatura supere los 35°C para evitar impactar la solubilidad y la funcionalidad de las mismas (Postma *et al.*, 2015).

Con respecto a la extracción de proteínas, Safi *et al.* (2015) reportaron que el molino de bolas fue el método más efectivo para la disrupción de la microalga *Chlorella vulgaris*, seguido por la homogeneización a alta presión, la hidrólisis química y por último, la sonicación. No obstante, los autores también mencionaron que el método de extracción también influye sobre la difusividad de los compuestos de interés, es decir la tasa en la que las moléculas salen de la membrana celular. En este estudio, la difusividad de las proteínas fue mayor para la hidrólisis química, seguida por el molino de bolas, la sonicación y por último, la homogeneización de alta presión.

Distintos autores han evaluado las condiciones empleadas al utilizar el molino de bolas (Doucha & Lívanský, 2008; Liu *et al.*, 2021; Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2015). Por ejemplo, Haußmann (2019) reportó que si se emplea el molino de bolas para extraer proteínas de microalgas, tiempos de residencia más largos permiten obtener mayores rendimientos.

3.4.2. Homogeneización a alta presión

Otra alternativa para llevar a cabo la disrupción celular es la homogeneización a alta presión. Esta se basa en la aplicación de presión sobre un pistón que ejerce fuerza sobre la biomasa y rompe rápidamente las células (Safi *et al.*, 2015).

Safi *et al.* (2017) utilizaron la homogeneización a alta presión para romper células y recuperar proteínas solubles de la microalga *Nannochloropsis gaditana*. Los autores reportaron una disrupción celular >90% luego de un ciclo a 1500 bar. Además, esta tecnología permitía obtener el mayor contenido de proteínas solubles recuperadas, en comparación con el uso de enzimas y ultra/diafiltración. Aun así, indicaron que es importante también considerar el gasto energético, el cual depende de factores como la concentración celular, el número de ciclos y la configuración del equipo. Esto último también fue mencionado por Haußmann (2019), quien reportó mayores rendimientos proteicos al utilizar un mayor diferencial de presión y más ciclos, así como una concentración de biomasa menor.

Por otro lado, Safi *et al.* (2015) indicaron que esta tecnología permite romper la mayoría de las células de la microalga *Chlorella vulgaris*, aunque algunas permanecían intactas, razón por lo cual reportaron una recuperación del 66% de las proteínas.

Adicionalmente, debido a la acción veloz del equipo, los compuestos de interés se difundían rápidamente. En cuanto a la disrupción de los cloroplastos, mencionaron que el molino de bolas daba mejores resultados.

En comparación con el molino de bolas, se ha reportado que la homogeneización a alta presión es mejor para la disrupción celular de tres microalgas: *C. sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *P. tricornutum*. La disrupción celular mayor se alcanzó utilizando una concentración del 5% de *C. reinhardtii*, en comparación con concentraciones de 10% y 15%. El efecto de la concentración se relaciona con la densidad energética; esta última depende de la concentración: cuando la concentración es menor, la densidad energética aumenta, y con ella, también la disrupción celular. Adicionalmente, se indicó que el uso de bajas concentraciones de biomasa eran favorables al utilizar este equipo. Esto confiere una desventaja en comparación con el molino de bolas, en el cual se pueden utilizar concentraciones de biomasa más elevadas (Haußmann, 2019).

3.4.3. Sonicación

La sonicación logra romper las paredes celulares al crear cavitación en la pared celular. Esta implica la formación de burbujas de vapor cuando la presión del líquido es menor a la de vapor. Cuando la presión es negativa, las burbujas aumentan su tamaño, pero cuando es positiva, éstas se comprimen y colapsan. En el caso de que las burbujas se formen cerca de la pared celular, cuando colapsan pueden provocar la ruptura de la pared celular, por la cual se podrían liberar compuestos intracelulares (Harun *et al.*, 2010).

Se ha descrito a la sonicación como un método que permite mejorar las extracciones de compuestos a partir de microalgas, con tiempos bajos, rendimientos altos, costos bajos o moderados, poca toxicidad y eficientes. No obstante, esta tecnología puede ser difícil de escalar (Mercer & Armenta, 2011) y aspectos como la composición de la pared celular afectan su efectividad (Safi *et al.*, 2015).

Safi *et al.* (2015) utilizaron satisfactoriamente la ultrasonicación para extraer compuestos de *C. vulgaris*. En el estudio se indica que se logra romper la pared celular y los cloroplastos, obteniendo un 9% de proteínas liberadas en base seca luego de 25 min.

3.4.4. Tratamientos enzimáticos

Los métodos mecánicos, como algunos de los descritos previamente, no son aptos para la extracción de compuestos termolábiles o sensibles a otras condiciones de procesamiento (como cambios de presión). Esto se debe a que pueden promover la oxidación y la desnaturalización de los compuestos, lo cual afecta su estabilidad (Günerken *et al.*, 2019; Vishwakarma & Malik, 2022). Además, al escalar los procesos, los métodos mecánicos tienden a requerir mucha energía (Günerken *et al.*, 2015).

Por lo tanto, se han desarrollado otros métodos, como el uso de enzimas. Éste es un método moderado que altera la pared celular e hidroliza las proteínas intracelulares, facilitando la extracción de componentes intracelulares (Echeverri *et al.*, 2019; Honjoh *et al.*, 2003; Safi *et al.*, 2017).

Al seleccionar las enzimas a utilizar, debe considerarse la composición y la complejidad de la pared celular del organismo al que se le quiere extraer compuestos. En el caso de las algas, se requiere emplear más de una enzima para lograr romper la pared celular (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha reportado que usar solo alcalasa, una proteasa, en muestras de microalgas como *N. gaditana* no es suficiente para liberar todas las proteínas. Los autores relacionan lo anterior con la composición de la pared celular, razón por la cual esta enzima no logra romperla por completo. Aun así, los extractos, incluso luego de someterlos a ultra y diafiltración, contenían un 24,8% de proteína solubilizada (Safi *et al.*, 2017). Entonces, podría ser útil considerar emplear diferentes enzimas, como carbohidrasas y peptidasas en combinación con la alcalasa utilizada en el estudio (Contreras *et al.*, 2019).

Honjoh *et al.* (2003) investigaron la disrupción de la pared celular de *C. vulgaris* al emplear distintas enzimas y lo lograron al emplear una mezcla de acromopeptidasa, celulasa, quitosanasa, glucoamilasa y glucanasa. Por otro lado, Zhang *et al.* (2022) reportaron que para extraer lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. requerían tratar a la misma con pectinasa, celulasa y xilanasa en ese orden para lograr recuperar el 100% de los lípidos. Para extraer lípidos de la microalga *Nannochloropsis oceanica* Chen *et al.* (2016) indicaron que el efecto de la celulasa sobre la disrupción celular era mayor que el de la proteasa y la lipasa.

Adicionalmente, se ha reportado que algunos métodos de extracción enzimática resultan en la completa disrupción celular, para recuperar un único compuesto valorizable, y que dañan otros componentes valorizables. Por esta razón, Vishwakarma & Malik (2022) desarrollaron un método para limitar el tiempo de hidrólisis para obtener una disrupción celular parcial que permitiera extraer lípidos de la microalga *Oocystis* sp. y las células mantuvieran cierta integridad para que fuera posible extraer otros compuestos útiles. Para conseguir lo anterior, emplearon las enzimas de tres fuentes fúngicas, donde las celulasas y amilasas fueron las principales responsables de la disrupción de la pared celular de la microalga. En cambio, para recuperar lípidos de la misma microalga, Maffei *et al.* (2018) reportaron que utilizar celulasa y mananasa combinadas incrementó el rendimiento de extracción de 40,8% a más de 73%.

Al utilizar enzimas en escala industrial el mayor factor disuasorio es el costo de las mismas. Por esta razón, se vuelve imprescindible encontrar las condiciones óptimas de procesamiento (tales como el pH, la temperatura y la concentración enzimática) para hacer el proceso más eficiente y maximizar la disrupción celular (Contreras *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Aparte, las mismas no son reutilizables; no obstante, el uso de enzimas inmovilizadas se ha estudiado para contrarrestar esta desventaja. Otros factores como la mayor duración del tratamiento en comparación con métodos mecánicos, la baja estabilidad de las enzimas y que muchas no son aptas para su uso en microalgas también constituyen obstáculos para esta metodología (Günerken *et al.*, 2015).

En cuanto a la extracción proteica, hay que considerar que utilizar proteasas permite obtener un hidrolizado proteico, debido a que las proteínas nativas se separan en péptidos más pequeños. Por lo tanto, si se busca extraer proteínas funcionales, no se recomienda emplear esta metodología, ya que aunque se hidrolizan las proteínas de la

pared celular y otros compuestos se liberan, las propiedades tecnofuncionales de las mismas cambian al romper los enlaces de las proteínas (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

3.4.5. Hidrólisis química y uso de solventes

La hidrólisis química también permite romper la pared celular al usar solventes. Este método no es tan efectivo para microalgas, ya que sus paredes celulares contienen celulosa, la cual no es tan sensible a estos solventes; por lo tanto, suele utilizarse más en bacterias (Lee *et al.*, 2012). No obstante, Safi *et al.* (2015) sometieron a *Chlorella vulgaris* a un tratamiento con NaOH 2 N por 2 h a 40°C, el cual debilitó la pared celular y permitió extraer las proteínas unidas a ella, así como proteínas citoplásmicas que se filtraban por las rupturas en ella. Sin embargo, el NaOH no lograba penetrar a los cloroplastos, lo cual también hubiera sido deseable, ya que algunas proteínas se localizan en su interior. Adicionalmente, los autores observaron que las células mantenían su forma globular luego del tratamiento, lo que también indicó que éste no logró degradar completamente la pared celular.

Se ha reportado el uso de distintos solventes para romper las células de diferentes microalgas, dentro de los que se incluyen: hexano a temperatura de ebullición para extraer lípidos de *N. oceanica* (Chen *et al.*, 2016), agua caliente y ácido sulfúrico como catalizador (Park *et al.*, 2014), así como bromuro de cetiltrimetilamonio para recuperar lípidos de *C. vulgaris* (Huang & Kim, 2013), ozono y peróxido de hidrógeno, en combinación e individualmente para tratar células de *Chlorella* sp. (Nguyen *et al.*, 2013), el surfactante no iónico Tergitol NP10 en combinación con sales de potasio para extraer carotenoides de la microalga *Dunaliella salina* (Pinheiro *et al.*, 2019), hidróxido de potasio asistido de ultrasonido para recuperar proteínas de *C. sorokiniana* y *C. vulgaris* (Phong *et al.*, 2018), peróxido de hidrógeno con sulfato de hierro (II) para extraer lípidos de *C. vulgaris* (Steriti *et al.*, 2014) y una mezcla de cloroformo:metanol en proporciones iguales para extraer lípidos de distintas microalgas, incluyendo *P. tricornutum* (Ryckebosch *et al.*, 2012).

Si se utiliza la hidrólisis química, se recomienda emplear solventes que, aparte de romper o penetrar la pared celular, tengan la misma polaridad del compuesto que se desea extraer y logren solubilizarlo (Mercer & Armenta, 2011). Adicionalmente, se ha reportado que la combinación del uso de solventes con otra metodología, como un tratamiento mecánico previo o el uso de temperaturas o presiones mayores a su punto de ebullición pueden favorecer positivamente la extracción (Cooney *et al.*, 2009; Mercer & Armenta, 2011).

Por ejemplo, Wu *et al.* (2017) obtuvieron la mayor extracción lipídica de la microalga *Nannochloropsis* sp. al combinar dos metodologías, ya que el rendimiento obtenido era mayor en comparación con los métodos individuales. Por lo tanto, optaron por una hidrólisis química seguida de una enzimática. Recuperaron un 90% de los lípidos de la microalga mencionada al emplear un pH de 10,5 durante 4 h a 110°C, para lo cual utilizaron una disolución de NaOH, seguido de un tratamiento enzimático utilizando 200 IU/g de celulasa, proteasa, lisozima y pectinasa a un pH de 4,5 y 50°C por 30 min.

3.4.6. Descompresión explosiva

Günerken *et al.* (2019) emplearon la descompresión explosiva para romper células de la microalga *Neochloris oleoabundans* y extraer carbohidratos, proteínas y lípidos. El proceso puede ser continuo o por lotes y consiste en someter a la biomasa a una alta presión con dióxido de carbono, donde el gas entra a las células. Luego, una reducción abrupta de la presión provoca que el gas se expanda y rompa las células. No obstante, el principal fenómeno causante de la disrupción celular es la reducción del pH que ocurre durante la solubilización del CO₂. Los autores reportaron que esta tecnología permite ser más energética y económicamente eficiente que el molino de bolas, si se utilizan las condiciones que permiten lograr la mayor disrupción celular. Adicionalmente, indicaron que distintos parámetros de proceso influyen sobre diferentes compuestos de interés. Por ejemplo, el uso de una presión menor dificultó la liberación de carbohidratos, mientras que un tiempo de contacto corto y una agitación baja redujeron la obtención de proteínas.

3.4.7. PCT

La PCT es un método similar a la descompresión explosiva. Ésta se basa en la saturación de un líquido con un gas inerte durante un tiempo de retención corto. En este periodo, el gas (argón, nitrógeno o dióxido de carbono) se disuelve en el líquido y puede difundirse a través de las células (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2014). Luego, la presión se reduce abruptamente hasta presión atmosférica. Esto provoca que el gas se expanda rápidamente y rompa las células (Bönsch *et al.*, 2007; Vollmer *et al.*, 2021).

Se ha indicado que este es un método de disrupción leve, debido a que utiliza presiones moderadas de 25 a 50 MPa y temperaturas bajas de 5 a 40 °C (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2014; Vollmer *et al.*, 2021). Por lo tanto, puede ser una alternativa que permita extraer las proteínas sin desnaturalizarlas.

La PCT se ha estudiado para emplearse en distintas aplicaciones, las que incluyen: evitar la formación de sabores indeseados (en inglés denominados *off-flavours*) en jugo de piña (Vollmer *et al.*, 2021), proporcionar una alternativa a la pasteurización tradicional de jugo de naranja (Aschoff *et al.*, 2016) y de piña (Biancavallo, 2018), reducir microorganismos relevantes para la industria alimentaria (Bönsch *et al.*, 2007) y romper las células de *P. tricornutum* usando dióxido de carbono supercrítico (Hörner, 2020).

3.4.7.1. Factores que influyen sobre la PCT

Distintos autores han reportado la influencia de ciertos factores sobre la eficacia de la disrupción celular lograda al emplear la PCT. Dentro de los factores importantes se encuentran las características de la biomasa sometida a este tratamiento. Bönsch *et al.* (2007) mencionaron el efecto de la estructura de la membrana celular, donde las células de bacterias Gram negativas son más sencillas de romper que las de levaduras y estas últimas que las de bacterias Gram positivas. La etapa de desarrollo del microorganismo también debe considerarse, ya que las células en fase estacionaria son más resistentes que aquellas en fase exponencial. Con respecto a esto, Biancavallo (2018) reportó que a medida que aumenta el desarrollo de los microorganismos, disminuye la reducción microbiana máxima alcanzada.

Adicionalmente, la concentración de la biomasa tratada influye en el grado de disrupción celular obtenido. Al comparar concentraciones de 5, 10 y 15% en la biomasa de *P. tricornutum*, la mayor disrupción celular se obtuvo con la concentración más baja. Este resultado se relaciona con la aglomeración de las células de esta microalga cuando incrementa la concentración, lo que impide que el gas se difunda a través de las células (Varona Iglesias *et al.*, s/f).

Por otro lado, parámetros del proceso como la presión, la temperatura y la cantidad de gas disuelto también afectan la disrupción celular. En el caso de la presión, se ha reportado que es el factor con el mayor efecto sobre la liberación de contenido celular, proteínas y carbohidratos, pero no de lípidos. Este resultado se debe a la relación entre una presión mayor y un aporte superior de energía por unidad de biomasa, así como una mayor intensidad de la descompresión (Günerken *et al.*, 2019). Se requiere que ésta sea de al menos 50 MPa para obtener una expansión rápida luego de la descompresión, ya que al utilizar presiones de 5-25 MPa se obtienen menores reducciones microbianas (Bönsch *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que la presión no afecta el contenido de carotenoides ni de vitamina C, ya que no se observaron diferencias en su contenido al tratar jugo de naranja a 25 MPa y 50 MPa (Aschoff *et al.*, 2016).

Aparte, la relación positiva entre la presión y la disrupción celular es más pronunciada a temperaturas más elevadas (Khosravi-Darani *et al.*, 2004). Según Bönsch *et al.* (2007) la temperatura es el parámetro más importante al llevar a cabo la PCT, para la cual reportaron que es mejor usar 40°C y 10°C en comparación con 25°C. Ésto lo relacionan con un cambio de la firmeza y un debilitamiento de la pared celular a 40°C (Aschoff *et al.*, 2016; Castro-Ferreira *et al.*, 2022). Por otro lado, a 10°C la solubilidad del gas incrementa, por lo que ambos efectos provocan un aumento en la disrupción celular (Aschoff *et al.*, 2016).

Otro parámetro importante es el número de ciclos. Éste podría relacionarse con el tiempo de retención o de procesamiento de otras tecnologías, ya que la PCT logra la disrupción celular debido a la descompresión y no al retener la biomasa bajo presión por un determinado tiempo (Biancavallo, 2018). Entonces, el número de ciclos se refiere a la cantidad de veces en que la biomasa se somete al proceso de cambio de presión, es decir cuando la muestra vuelve a pasar por el equipo, lo que implica que la biomasa sea sometida a otra descompresión. Por ejemplo, Lin *et al.* (1992) indicaron que un segundo ciclo de descompresión mejora la disrupción celular de levaduras y Biancavallo (2018) reportó que un segundo ciclo continúa reduciendo la carga microbiana de distintos jugos de frutas, y genera una mayor diferencia en el color de los mismos en comparación con el jugo fresco, debido a la reducción del tamaño de partícula.

El tipo de gas utilizado también es un factor importante. El gas debe poder solubilizarse en la matriz tratada durante la PCT. Se ha indicado que la ruptura celular se alcanza solo si el gas es absorbido por las células, por lo que Enomoto *et al.* (1997) reportaron que utilizar CO₂ u óxido nitroso como gas de compresión es mejor que usar argón o nitrógeno debido a que los dos primeros tienen una mayor solubilidad en agua. No obstante, este gas puede reducir el pH de la biomasa después de solubilizarse (Biancavallo, 2018), lo cual se debe a la interacción del CO₂ con el agua en la biomasa. El

gas se disocia y forma ácido carbónico y los iones hidronio reducen el pH de la solución durante la PCT; por lo tanto, se ha recomendado no utilizarlo para el tratamiento de microalgas para evitar afectar los compuestos valorizables, como los ácidos grasos omega-3 (Hörner, 2020). Entonces, al emplear otros gases, como nitrógeno, se debe considerar que la disrupción celular va a ser menor a la que se obtendría utilizando CO₂ con las mismas condiciones de proceso (Enomoto *et al.*, 1997).

Nitrógeno y argón se han empleado como gases de compresión durante la PCT de *P. tricornutum*. Los dos son útiles y puede seleccionarse uno según los requisitos del proceso. El argón permite extraer aproximadamente 6% más de clorofila a y proteínas y requiere menor energía de compresión que el nitrógeno, pero también es más caro que este último (Varona Iglesias *et al.*, s/f).

3.5. Proteínas

Como se mencionó previamente, la disrupción se lleva a cabo para promover la liberación y extracción de componentes de interés, dentro de los que se encuentran las proteínas.

3.5.1. Características generales de las proteínas

Las proteínas son macromoléculas presentes en todos los seres vivos e importantes para la dieta humana (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Están conformadas por cadenas de péptidos que forman estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias. La estructura primaria está compuesta por la cadena lineal de aminoácidos, mientras que la secundaria y la terciaria son producto de la interacción de distintas partes de la misma. Además, distintas cadenas pueden interactuar y formar una estructura cuaternaria (Aryee *et al.*, 2018).

La exposición a distintas condiciones, tales como pH, temperatura y solventes puede provocar la desnaturalización de las proteínas. Este proceso se caracteriza por cambios estructurales o conformacionales de las proteínas; no obstante, la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) no se ve afectada (Zhong & Sun, 2000). Normalmente, durante la desnaturalización aumentan las interacciones de los grupos hidrofóbicos con la superficie de la proteína (Aryee *et al.*, 2018).

Una característica importante de las proteínas es su carga neta, la cual puede ser positiva o negativa, según la protonación de los grupos funcionales de los aminoácidos y sus interacciones electrostáticas, y depende del pH de la matriz en la que se encuentren. Esta carga es cero en su punto isoeléctrico, que se caracteriza por la solubilidad proteica más baja en comparación con los valores a lo largo de la escala de pH (Aryee *et al.*, 2018; O'Flynn *et al.*, 2021).

Otra característica a considerar de esta macromolécula es el peso molecular. Analizar esta última ayuda a identificar cuáles proteínas están presentes y determinar si alguna de ellas sufrió desnaturalizaciones, agregaciones o interacciones con otros compuestos, lo cual se ve reflejado en un cambio en el peso molecular de las mismas. Adicionalmente, el peso molecular influye en algunas características de las proteínas, como la solubilidad y el rendimiento de precipitación (Castro-Ferreira *et al.*, 2022).

Para determinar el peso molecular de las proteínas es común utilizar electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) (Chaiklahan *et al.*, 2011), aunque también éste ha sido determinado por medio de cromatografía líquida de exclusión molecular (Chen *et al.*, 2019). Castro-Ferreira *et al.* (2022) emplearon la primera metodología. Para ello, utilizaron los extractos proteicos purificados, disueltos en agua desionizada con una concentración del 1% m/m. Posteriormente, llevaron a cabo la electroforesis utilizando un aparato de transferencia. Una vez separados los compuestos, colocaron el gel con un reactivo de tinción de proteínas y por último, compararon los pesos obtenidos con estándares que iban de 5 a 250 kDa, lo cual se aprecia por la formación de bandas en el gel. De esta forma, determinaron que las proteínas de *P. tricornutum* presentan pesos moleculares entre 20 y 40 kDa.

3.5.2. Proteínas actualmente utilizadas en la industria alimentaria y el potencial uso de microalgas

Las características mencionadas anteriormente determinan el uso de las proteínas en la industria alimentaria. Dentro de las más utilizadas actualmente se encuentran las proteínas de origen animal, especialmente de huevo o leche (Bertsch *et al.*, 2021; Lafarga *et al.*, 2018). No obstante, se han asociado distintas desventajas con las proteínas animales, especialmente el efecto de su producción y obtención sobre el cambio climático, el consumo de agua dulce y los costos crecientes de su producción (Sá *et al.*, 2020).

Una de las primeras alternativas a las proteínas tradicionales fue el uso de leguminosas. Sin embargo, también hay desventajas asociadas con su producción, donde el uso de fertilizantes es de las más preocupantes, debido a la liberación de óxido nítrico y la eutrofización (Nadathur *et al.*, 2017; Sá *et al.*, 2020). Esta última puede ocurrir cuando altas concentraciones de nitrógeno provenientes de fertilizantes llegan a cuerpos de agua (Sá *et al.*, 2020).

De esta forma, ha surgido el uso de biomásas verdes, tales como las microalgas, para sustituir a las proteínas mencionadas anteriormente. Éstas se acoplan a hábitos alimentarios actuales, como la preocupación por el medio ambiente, dietas vegetarianas y veganas, así como con aspectos religiosos y culturales (Bertsch *et al.*, 2021; Lafarga *et al.*, 2018). Además, estas biomásas tienen gran disponibilidad, alto rendimiento proteico por área y alta tasa de acumulación de proteínas (Schweiggert-Weisz *et al.*, 2020).

Otra ventaja del uso de microalgas es que pueden cultivarse en zonas no aprovechables en agricultura tradicional, como tierras no fértiles, utilizando agua marina (Waghmare *et al.*, 2016). Además, las microalgas tienen un alto contenido proteico, de alrededor de un 50%, y estas proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales y una baja alergenicidad (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

Para aprovechar el potencial asociado a las proteínas microalgales, éstas deben extraerse de la matriz en la que se encuentran y luego purificarse. Algunos métodos se presentan en la siguiente sección.

3.5.3. Métodos de extracción y purificación de proteínas de microalgas

Se han desarrollado distintos métodos para la extracción de proteínas de la biomasa de microalgas, con el fin de mejorar su calidad proteica, digestibilidad y bioaccesibilidad (Acquah *et al.*, 2021). Se han realizado extracciones en medios acuosos, ácidos, alcalinos, seguidos por centrifugaciones, filtraciones, precipitaciones o cromatografía, con el fin de extraer las proteínas de distintas biomásas. Dentro de estos, los métodos más mecánicos y los enzimáticos pueden afectar la integridad de las proteínas extraídas debido a la liberación de proteasas que las hidrolizan (Matos, 2019) o porque provocan su desnaturalización (Grossmann *et al.*, 2019a).

Los tres métodos más utilizados para la extracción de proteínas, según Stone *et al.* (2015), son el de extracción alcalina en conjunto con precipitación isoeléctrica, extracción salina junto con diálisis y el de precipitación micelar. En el primer caso, se busca disolver la proteína en un medio alcalino y, una vez disuelta, se utiliza el sobrenadante para precipitar las proteínas según su punto isoeléctrico. El método de extracción salina solubiliza la proteína utilizando un tampón de sodio fosfato (pH 8,0) y 6,4% de KCl 1:10 y luego se realiza el proceso de diálisis al sobrenadante. Por último, establecen que el método de precipitación micelar busca extraer la proteína con una solución neutra de sal, por lo que las proteínas son precipitadas al reducir el contenido de sal formando micelas. Cabe destacar que en ese estudio se trabajó con proteínas de leguminosas.

La extracción general de proteínas suele tener dos grandes enfoques: purificación y refinación. En el primer caso, las proteínas son purificadas por métodos analíticos y en el segundo, se obtienen fracciones ricas en proteínas que no han sido altamente purificadas, por lo que los extractos contienen otros compuestos además de proteínas, como carbohidratos y minerales. Las operaciones para la obtención de los extractos de microalgas luego de la ruptura celular son: solubilización (aumentando el pH), centrifugación, purificación de la fracción soluble y secado; en cambio, para obtener extractos menos refinados luego de la ruptura celular basta con centrifugar la biomasa y secar las fracciones obtenidas: la soluble y la insoluble (Grossmann *et al.*, 2019a).

La purificación de los extractos se realiza para separar las proteínas de otros compuestos como carbohidratos o minerales (Grossmann *et al.*, 2019a). La purificación ayuda a mejorar su desempeño tecnofuncional, facilitar los análisis y remover los contaminantes (Castro-Ferreira *et al.*, 2022). Una de las técnicas que se pueden utilizar para lo anterior es utilizar su punto isoeléctrico, ya que en éste, la mayoría de las proteínas presentan baja solubilidad, por lo que precipitan y pueden ser separadas de otros componentes. Por ejemplo, las proteínas de las microalgas pueden ser precipitadas al llevar la biomasa a valores de pH de 3,5-4,5 y luego, al centrifugar la biomasa, se recuperan en el residuo (Grossmann *et al.*, 2019a).

Otra técnica de purificación es la filtración. Al filtrar la biomasa, se da una separación física de las proteínas de los demás componentes. Se han realizado estudios de separación de proteínas de las microalgas por medio de filtración; sin embargo, el rendimiento proteico fue bajo debido a la presencia de agregados proteicos luego de la ruptura celular o por complejos proteína-polisacáridos de mayor tamaño que se retenían en la membrana (Grossmann *et al.*, 2019a). Aun así, en la industria alimentaria,

se ha recomendado emplear esta técnica de filtración por membranas debido a que se requiere que las proteínas presenten buena solubilidad y funcionalidad (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

En el caso de los procesos de refinación, como se mencionó previamente, al utilizar una menor cantidad de pasos luego de la disrupción celular, se obtiene un extracto menos refinado que en la purificación, el cual por la misma razón, presenta un menor contenido proteico. Aun así, estos extractos pueden presentar buenas propiedades tecnofuncionales debido a la sinergia entre las proteínas y compuestos como carbohidratos o lípidos, lo cual puede ser beneficioso para la formulación de distintos productos alimenticios (Grossmann *et al.*, 2019a).

Barbarino y Lourenço (2005) evaluaron distintos métodos para la extracción de proteínas en macroalgas. Para la preparación de la muestra, tomaron 50-100 mL de biomasa en fase de crecimiento exponencial y la inocularon en 2 L de agua marina, la cual había sido previamente autoclavada. Luego, los cultivos preparados se centrifugaron para concentrar las células y se obtuvieron dos fases: un sobrenadante (parte acuosa) y un residuo (el precipitado). Éste último fue liofilizado para su extracción. En cuanto a los resultados, al emplear el homogeneizador Potter por 5 min permitió obtener concentraciones de proteína significativamente mayores. Además, se obtuvo mayor cantidad de proteína al utilizar un mayor volumen de agua (4,0 mL) y un tiempo de incubación de 12 h.

Adicionalmente, Barbarino y Lourenço (2005) realizaron la precipitación de proteínas empleando ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) al 25%. Este solvente se añadió a los sobrenadantes de microalgas obtenidos anteriormente, en concentraciones de 2,5:1 y 3,0:1 (TCA:sobrenadante), donde permanecieron por 30 min y sin agitación en un baño de hielo. Luego, se centrifugaron por 20 min a 4°C y el residuo se lavó nuevamente con TCA al 10% (4°C). Luego de una segunda centrifugación, los residuos fueron resuspendidos en TCA al 5% a temperatura ambiente en una proporción de 5:1 y se centrifugaron por 20 min a 15000 x *g* a 21°C. Los sobrenadantes fueron desechados y los residuos se almacenaron a -20°C. El precipitado proteico obtenido se suspendió en 2,0 mL de NaOH al 1,0 N para su cuantificación proteica por el método de Lowry, cuyos resultados indicaron que la precipitación utilizando 2,5:1 (TCA:sobrenadante) permite obtener mejores resultados.

Por otra parte, Haußmann (2019) utilizó el método de extracción alcalina para la recuperación proteica del residuo de la centrifugación. Primero, centrifugó la biomasa de microalgas, donde el residuo obtenido lo llevó a pH 12, y seguidamente precipitó las proteínas al ajustar el pH a 4. Se observó que los rendimientos de las proteínas mejoraron al aumentar el valor del pH. Los rendimientos proteicos fueron del 34% para *C. sorokiniana* y del 31% para *P. tricornutum* y *C. reinhardtii*. Adicionalmente, se evaluó el uso del tratamiento enzimático con proteasas en lugar de la extracción alcalina. La enzima alcalasa brindó los mayores rendimientos proteicos, los cuales fueron 37% para *C. sorokiniana*, 39% para *P. tricornutum* y 62% para *C. reinhardtii*.

3.5.4. Cuantificación de proteínas

Es común cuantificar las proteínas para evaluar y comparar distintos métodos de extracción y purificación. Según Barbarino y Lourenço (2005), algunos de los métodos más utilizados para la cuantificación de proteínas son: el método de cobre alcalino establecido por Lowry *et al.* (1951), el método de colorante azul brillante Coomassie descrito por Bradford (1976) y la determinación de proteínas bruta ($N \times 6,25$). Los primeros dos métodos utilizan espectrofotometría para la cuantificación. En el primer caso, se detectan los enlaces peptídicos por medio de una reacción catalizada por el cobre. En el segundo caso, el colorante azul brillante Coomassie se une a los residuos de proteína por medio de fuerzas Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. El reactivo de Folin utilizado en el análisis de Lowry interactúa con todos los enlaces peptídicos e inclusive con algunos aminoácidos, por lo que se ha reportado que la cuantificación de proteínas suele ser mayor que otros métodos, como el de Bradford. Ambas metodologías dependen de la composición de aminoácidos. Sin embargo, para la cuantificación de microalgas se recomienda el método de Lowry con el estándar albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) debido a su parentesco en composición de aminoácidos con las algas (Barbarino y Lourenço, 2005).

Por otro lado, el método de proteína bruta cuantifica el total de nitrógeno y este resultado se relaciona con el contenido proteico por medio de un factor, que normalmente tiene un valor de 6,25. Las algas tienen altas concentraciones de compuestos con nitrógeno no proteico (aminas, glucosaminas, ácidos nucleicos, material de membranas, pigmentos, entre otros), los cuales hacen que el factor $N \times 6,25$ no sea el adecuado, ya que sobreestiman el contenido actual de proteína (Barbarino y Lourenço, 2005). Matos (2019) indica que los factores N-proteína para especies específicas de microalgas se encuentran en un rango entre 3,06 y 5,95.

3.6. Propiedades tecnofuncionales y fisicoquímicas de las proteínas

Como se mencionó previamente, una de las razones por las cuales las proteínas son utilizadas en la industria alimentaria es por sus propiedades tecnofuncionales. Estas describen las propiedades de proteínas y otros nutrientes que son de gran interés en la formulación de alimentos (Barka & Blecker, 2016), ya que influyen en las propiedades fisicoquímicas del producto alimenticio (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Lo anterior ocurre por el potencial que tienen las proteínas de afectar características de los alimentos, tales como textura, viscosidad y palatabilidad, durante el procesamiento, la manipulación y el consumo de los mismos (Matos, 2019).

Las propiedades tecnofuncionales son determinadas según la estructura de proteínas, carbohidratos y lípidos y, las interacciones que pueden ocurrir entre estas moléculas (Soto-Sierra *et al.*, 2018; Suarez *et al.*, 2018). Por lo tanto, la funcionalidad depende de todas las biomoléculas y su capacidad para interactuar entre sí, por lo que extractos proteicos que no estén altamente purificados también podrían considerarse ingredientes funcionales (Suarez *et al.*, 2018). Aun así, Bertsch *et al.* (2021) mencionan que fraccionar y obtener un extracto soluble o un aislado proteico, mejora considerablemente la funcionalidad de las proteínas; sin embargo, presentan mayores esfuerzos de producción y menores rendimientos proteicos.

Las microalgas tienen grandes cantidades de biopolímeros, los cuales aportan interesantes propiedades tecnofuncionales (Castro-Ferreira *et al.*, 2022). Estas propiedades dependen de las características fisicoquímicas de los concentrados proteicos, como lo son el peso molecular, la composición de aminoácidos, la carga neta y la hidrofobicidad superficial (García-Vaquero *et al.*, 2017). Estas características se verán afectadas por las condiciones de extracción utilizadas, como el pH, así como por otros factores extrínsecos como el tiempo, la temperatura, y la interacción con otros componentes (Aryee *et al.*, 2018; García-Vaquero *et al.*, 2017).

Algunas de las propiedades de las proteínas que se han evaluado son la solubilidad, la capacidad de retención de agua y la capacidad de formación de emulsiones (Meinlschmidt *et al.*, 2016). A continuación, se profundiza en estas tres propiedades tecnofuncionales, todas de gran importancia en la industria alimentaria.

3.6.1. Solubilidad

La solubilidad proteica se define como la concentración de proteína que se encuentra en equilibrio en una solución saturada con una fase sólida (Grossmann *et al.*, 2019a). Ésta se puede ver afectada por factores como composición, secuencia, peso molecular, conformación, contenido de grupos polares y no polares de los aminoácidos, fuerza iónica, tipo de solvente, pH, temperatura y condiciones de procesamiento (Zayas, 1997).

Las proteínas con alta solubilidad tienen la capacidad de dispersar adecuadamente las moléculas proteicas o partículas, formando sistemas coloidales delicadamente dispersados (Zayas, 1997), lo cual proporciona estabilidad a largo plazo (Aryee *et al.*, 2018). La porción de nitrógeno presente en las estructuras químicas de las proteínas es considerada la fracción soluble bajo condiciones específicas (Zayas, 1997). Sin embargo, algunas proteínas son de naturaleza hidrofóbica o contienen enlaces disulfuro, lo que dificulta su solubilidad. La hidrofobicidad proteica se puede mejorar en un medio alcalino o desnaturizando las proteínas (Ursu *et al.*, 2014).

Como lo establece Zayas (1997), las proteínas tienen mayores aplicaciones industriales si cuentan con una alta solubilidad. La solubilidad proteica es una propiedad fundamental en los alimentos, ya que se relaciona con otras propiedades como la emulsión y la gelación, y evita la separación gravitacional o la turbidez en ciertos alimentos, como bebidas o alimentos líquidos (Aryee *et al.*, 2018; Grossmann *et al.*, 2019a).

Para cuantificar la solubilidad proteica de sobrenadantes de la biomasa de la microalga *Tetraselmis* sp. a distintos pH, Schwenzfeier *et al.* (2011) prepararon soluciones con concentraciones de 5 mg/mL en buffer de fosfatos a pH 7,6 y ajustaron el pH utilizando 0,1 M HCl o 0,1 M NaOH, con el fin de obtener valores finales de pH entre 2,5 y 8,5 con intervalos de 0,5 unidades. Una vez ajustado el pH, mantuvieron la muestra a 4 °C por 1 h para asegurar la completa precipitación y prevenir la actividad de las proteasas. Posteriormente, centrifugaron las muestras por 10 min a 4700 x g a 4 °C y cuantificaron la concentración proteica en los sobrenadantes. De esta forma, obtuvieron la solubilidad proteica al comparar la concentración de proteína en el sobrenadante con el pH ajustado

con la concentración inicial de proteína en el sobrenadante a pH 7,6 (la cual fue establecida como el 100% de solubilidad).

Aunque la forma en que solubilizan las fracciones varía, distintos autores cuantifican las proteínas en el sobrenadante luego de centrifugar una muestra y las comparan con las proteínas en la muestra inicial para obtener el valor de esta propiedad tecnofuncional, expresando la solubilidad como un porcentaje (Cavonius *et al.*, 2015; Pelegrine & Gasparetto, 2005; Raikos *et al.*, 2014).

3.6.2. Capacidad de retención de agua

Otra propiedad tecnofuncional importante es la capacidad de retención de agua (CRA), la cual se refiere a la habilidad de las proteínas para mantener el agua en su estructura tridimensional durante la aplicación de fuerzas, presión, centrifugación o calentamiento (Zayas, 1997). Ésta mide la cantidad total de agua que puede ser absorbida por gramo de proteína y depende de la interacción de las proteínas con el agua y otras moléculas (Aryee *et al.*, 2018).

Esta propiedad tecnofuncional se puede ver influenciada por factores intrínsecos de las proteínas como su conformación, composición de aminoácidos e hidrofobicidad superficial. Aun así, factores extrínsecos también tienen efectos importantes sobre la misma, por ejemplo una proteína puede ser desnaturalizada por calor, lo que puede generar pérdidas de solubilidad; sin embargo, puede mejorar su habilidad para absorber y retener el agua. Aparte, se ha demostrado que el efecto de la cocción y la precipitación por medio del punto isoelectrico mejora la CRA en harina de lentejas (Aryee *et al.*, 2018).

Esta propiedad es de gran importancia en los alimentos, ya que contribuye en la textura y el sabor de los mismos (Aryee *et al.*, 2018; Garcia-Vaquero *et al.*, 2017). Se desea que proteínas empleadas en productos viscosos, como embutidos, cremas, masas y productos horneados, tengan una buena CRA, con el fin de retener el agua sin que la proteína se solubilice, brindando engrosamiento y viscosidad. No obstante, proteínas con una CRA excesiva podrían deshidratar los demás componentes del producto (Garcia-Vaquero *et al.*, 2017).

Guil-Guerrero *et al.* (2004) evaluaron la CRA en la microalga *P. tricornutum*. Para ello, prepararon distintas concentraciones con la biomasa desengrasada, agua destilada y NaCl a diferentes condiciones de pH. Luego de centrifugarlas, cuantificaron la masa del precipitado y calcularon la CRA como gramos de agua absorbida por gramo de biomasa de microalga. En cuanto a los resultados obtenidos, identificaron que algunos parámetros, como el pH y la concentración de sal, afectan la CRA, ya que cuando incrementan, también aumenta la CRA.

3.6.3. Actividad y estabilidad de emulsión

Algunas proteínas tienen la capacidad de formar emulsiones, las cuales son mezclas de dos líquidos inmiscibles, donde uno forma gotas dispersas en el otro (Calero *et al.*, 2013). Éstas se caracterizan por un alto contacto interfacial, el cual es termodinámicamente inestable, debido a la tensión entre las dos fases inmiscibles. Para poder formarlas, es necesario aplicar un esfuerzo mecánico; sin embargo, éstas tienden a separarse de nuevo en sus fases individuales debido a fenómenos como la coalescencia

y la floculación (Bertsch *et al.*, 2021). No obstante, hay compuestos que tienen actividad emulsificante, lo que quiere decir que tienen la habilidad de establecer interacciones entre las fases inmiscibles (Suarez *et al.*, 2018).

Los emulsificantes son surfactantes que facilitan la formación de emulsiones y preservan su estabilidad con el tiempo (Padial-Domínguez *et al.*, 2020). La estabilidad se da cuando las moléculas de la superficie son solubles y se absorben en la interfaz, por lo que se forman estructuras alrededor de la superficie que logran disminuir la tensión superficial (Suarez *et al.*, 2018). En la industria alimenticia, por lo general se utilizan surfactantes sintéticos o proteínas de origen animal para lograr esta estabilidad (Bertsch *et al.*, 2021).

Las proteínas son comúnmente utilizadas como emulsificantes, ya que pueden estabilizar la interfase entre el aceite y el agua (Schwenzfeier *et al.*, 2013). Un buen emulsificante también ayuda a prevenir la oxidación lipídica; sin embargo, hay que considerar algunos factores como la cantidad de emulsificante que es absorbido en la interfaz y su estructura, con el fin de obtener la estabilidad de la emulsión y la estabilidad oxidativa de los lípidos que se encuentran presentes en la emulsión (Padial-Domínguez *et al.*, 2020).

Bertsch *et al.* (2021) llevaron a cabo la siguiente metodología para el análisis de las emulsiones. Para la preparación de las soluciones proteicas de la microalga *Tetraselmis suecica*, la liofilizaron, la disolvieron en agua destilada y ajustaron el pH de la disolución a 7. Luego, estudiaron la actividad superficial de la interfase aceite-agua de 5 mL de solución proteica al 0,1%, en la cual sumergieron una gota estática de 20 μ L de hexadecano anhidro y se registró la tensión superficial por 60 min. Una vez que el equilibrio fue alcanzado, incrementaron el volumen de la gota añadiendo 1 μ L de hexadecano anhidro por 5 veces en 10 segundos. De esta forma, se realizaban variaciones en el área superficial. Por último, se llevó a cabo el análisis de Fourier en los resultados de dilatación de la gota. Así, se evaluó la expansión y compresión periódica del área superficial de la gota, con el fin de obtener su módulo elástico, el cual es una medida de la estabilidad.

Los resultados obtenidos por Bertsch *et al.* (2021) señalan que las muestras analizadas recuperaron su tensión superficial original sin deformación apreciable, lo que indica un alto grado de estabilidad. Por lo tanto, de acuerdo con estos autores, las proteínas de las microalgas presentan estabilidades interfaciales comparables con proteínas animales o vegetales. Por lo tanto, concluyeron que las proteínas de microalgas tienen un gran potencial para reemplazar los surfactantes sintéticos y las proteínas animales utilizadas en la estabilización de emulsiones y espumas.

La actividad de emulsión (AE) también se define como la cantidad máxima de aceite que puede ser dispersado en una emulsión por una cantidad específica de proteína (Padial-Domínguez *et al.*, 2020). Ursu *et al.* (2014) analizaron la AE al solubilizar las proteínas de la microalga *C. vulgaris* en un medio alcalino (pH 12) con agitación constante. Para esto neutralizaron la fase acuosa y le añadieron 50 mL de aceite de canola constantemente hasta que ocurrió la inversión de fases, que es cuando decrece abruptamente la curva de la gráfica de conductividad versus volumen de aceite. La conductividad fue medida con un conductímetro, manteniendo siempre la temperatura en

23-25°C. Los resultados se expresaron como volumen de aceite que fue emulsificado por gramo de proteína.

3.6.4. Propiedades tecnofuncionales y fisicoquímicas de las proteínas de microalgas

La mayoría de estudios sobre las propiedades tecnofuncionales de microalgas se han realizado principalmente en tres géneros: *Spirulina*, *Chlorella* y *Tetraselmis* (Matos, 2019). Por ejemplo, Lafarga *et al.* (2019) evaluaron la CRA de estas microalgas e indicaron que se pueden emplear para espesar y proveer viscosidad a alimentos como sopas y salsas. Por su parte, Acquah *et al.* (2021) evidenciaron que las proteínas de estas microalgas han logrado reducir la pérdida de humedad, manteniendo la frescura de algunos alimentos, como productos horneados.

Debido al interés en las proteínas de estos microorganismos, distintos autores han realizado más estudios (Acquah *et al.*, 2021; Lucakova *et al.*, 2022), empleando además otros métodos para aprovechar las propiedades tecnofuncionales, como por ejemplo el cambio de pH. Dentro de ellos, Dai *et al.* (2020) analizaron las propiedades emulsificantes de fracciones insolubles de *Chlorella protothecoides* sometidas a una hidrólisis ácida. Por su parte, Ursu *et al.* (2014) reportaron que la actividad de emulsión de distintas muestras proteicas de *C. vulgaris* fue similar o mayor que las proteínas comerciales como caseinato de sodio y proteínas de soya.

En cuanto a la solubilidad, Schwenzfeier *et al.* (2011) mostraron tener un 100% de solubilidad a rangos de pH desde 6,0 hasta 8,5 para distintas muestras de *Tetraselmis* sp., mientras que por debajo de pH 6, la solubilidad disminuyó. Adicionalmente, Grossmann *et al.* (2019a) también mencionan estudios donde se concluye que las proteínas de microalgas poseen un perfil de solubilidad que es similar al de otras proteínas provenientes de alimentos y, por lo general, tienen una solubilidad mayor a valores de pH entre neutros y alcalinos.

Otros estudios, mencionados por Suarez *et al.* (2018), muestran que la proteína de la microalga *Tetraselmis* sp. (64% proteínas y 24% carbohidratos) se solubilizó completamente a un pH superior a 5,5, formó emulsiones y espuma estables a pH entre 5 y 7. También, se evaluaron extractos proteicos de *C. vulgaris*, los que presentaron una capacidad y estabilidad de emulsión mayor al aislado de soya y el caseinato de sodio. Los autores además mencionan que la emulsión y la formación de espuma son dependientes del pH, lo que se relaciona directamente con la solubilidad proteica.

Por otro lado, Guil-Guerrero *et al.* (2004) observaron que al incrementar el pH y la concentración de sal en la muestra, incrementaba también la CRA de tres microalgas: *P. cruentum*, *P. tricornutum* y *Nannochloropsis* spp. Adicionalmente, para un pH de 9 y una concentración de sal de 1 M, *P. tricornutum* presentó una CRA máxima de 4,5; mientras para la harina de soya, se obtuvo una CRA de 4,4. Lo anterior demostró una similitud de la microalga mencionada con la harina de soya, la cual se utiliza actualmente en la industria alimentaria.

Haußmann (2019) también evaluó las propiedades tecnofuncionales de tres microalgas: *C. sorokiniana*, *P. tricornutum* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Obtuvo buenos resultados para las propiedades de emulsión y formación de espuma, debido a que las microalgas presentaron comportamientos similares con los estándares de aislado de soya

y clara de huevo. Adicionalmente, la fracción de *C. reinhardtii* obtenida luego del tratamiento enzimático, presentó una alta solubilidad proteica (79-82%), mientras que para la proteína de soya ésta fue de aproximadamente 35%. También, se comprobó para casi todas las muestras que, al aumentar el pH, la solubilidad de las proteínas también incrementaba; con excepción de *P. tricornutum*, la cual presentó mayor solubilidad a pH 6,8 en lugar de 8,0.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del estudio

Los experimentos se realizaron en los laboratorios de Ingeniería y Biotecnología Interfacial del Instituto Fraunhofer (Fraunhofer-Institute für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB)), en Stuttgart, Alemania.

4.2. Materia prima

La microalga *Phaeodactylum tricornutum* se obtuvo del Centro Fraunhofer para Procesos Químicos y Biotecnológicos (Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP)), ubicado en Leuna, Alemania. Para efectos de este estudio, a la microalga como tal se le denomina biomasa. Ésta presentaba un contenido de sólidos de 22-23%.

4.3. Preparación de la biomasa

La biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* se cultivó en biorreactores al aire libre, con condiciones de nitrógeno limitado, se congeló después de su cultivo y se descongeló a temperatura ambiente antes de someterla a la PCT. La biomasa contenía aproximadamente un 23% de sólidos, por lo cual fue necesario diluirla para alcanzar las concentraciones seleccionadas para el tratamiento con la PCT (2,50%, 5,00% y 7,50%).

Para lo anterior, se cuantificó el contenido de sólidos totales en la biomasa y con la ecuación [1] se determinó el volumen de agua necesario para diluirla y alcanzar las concentraciones deseadas. Se utilizó una balanza de humedad para esta cuantificación. Se tomó 1 mL de la biomasa con una micropipeta y se añadió a una bandeja de secado de aluminio hasta obtener el resultado final. La medición se realizó por duplicado. Este valor se utilizó en conjunto con la ecuación [1], en la cual V_1 y C_1 corresponden al volumen y la concentración de la biomasa original y V_2 y C_2 al volumen y la concentración deseados.

$$V_1C_1 = V_2C_2 \quad [1]$$

Luego, la biomasa se diluyó con la cantidad determinada de agua destilada a una temperatura de 40°C, en la planta piloto, para su posterior extracción en el equipo de tecnología PCT. Se prepararon diluciones de la biomasa hasta alcanzar concentraciones de 2,50%, 5,00% y 7,50% para analizar el grado de disrupción celular y la solubilización proteica en cada muestra.

4.4. PCT

La biomasa de *P. tricornutum* se sometió a la PCT en el equipo diseñado para la planta piloto del área IGB del Instituto Fraunhofer, en Stuttgart, Alemania, y descrito por Vollmer *et al.* (2020). Se utilizó nitrógeno y argón como gases de compresión con una presión máxima de 50 MPa. Al usar nitrógeno se utilizó un flujo de gas de 75 g/min y al emplear argón 23 g/min, ya que fueron las condiciones que permitían obtener la mayor disrupción celular al tratar esta microalga en pruebas preliminares realizadas en el

Instituto Fraunhofer. Las muestras se sometieron a uno y dos ciclos. Se utilizaron las tres concentraciones de biomasa mencionadas anteriormente: 2,50%, 5,00% y 7,50%. Durante los experimentos, la temperatura de la muestra se mantuvo a 40°C y el flujo a 0,5 L/min.

Se tomaron tres muestras para cada tratamiento durante el procesamiento con la PCT: luego de 5 min, después de 30 min y al final de cada ciclo. También se tomó una muestra de la biomasa inicial (antes de someterla al PCT). A todas éstas se les determinó el grado de disrupción celular (sección 4.8.2) y luego se mantuvieron en el refrigerador a $10,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para analizar su contenido proteico utilizando el método de Lowry (sección 4.8.3.1) al día siguiente, con el objetivo de determinar la solubilización proteica (sección 4.8.3).

Aproximadamente 2,5 L de las muestras tratadas con la PCT se centrifugaron a $17696 \times g$ (10000 rpm) por 10 min a 20°C utilizando una centrifuga marca Beckman Coulter, modelo Avanti J-26 XP y un rotor JA-10 de la misma marca (California, Estados Unidos). El volumen restante de la biomasa se almacenó en congelación hasta su posterior análisis. Luego de centrifugar, por decantación se separaron los sobrenadantes de los residuos. Los primeros constituyeron la fase líquida superior y los segundos la fase sólida que precipitó durante la centrifugación. Los sobrenadantes se congelaron para luego liofilizarlos (sección 4.6.2.). En la figura 1 se muestra el esquema metodológico seguido para esta sección.

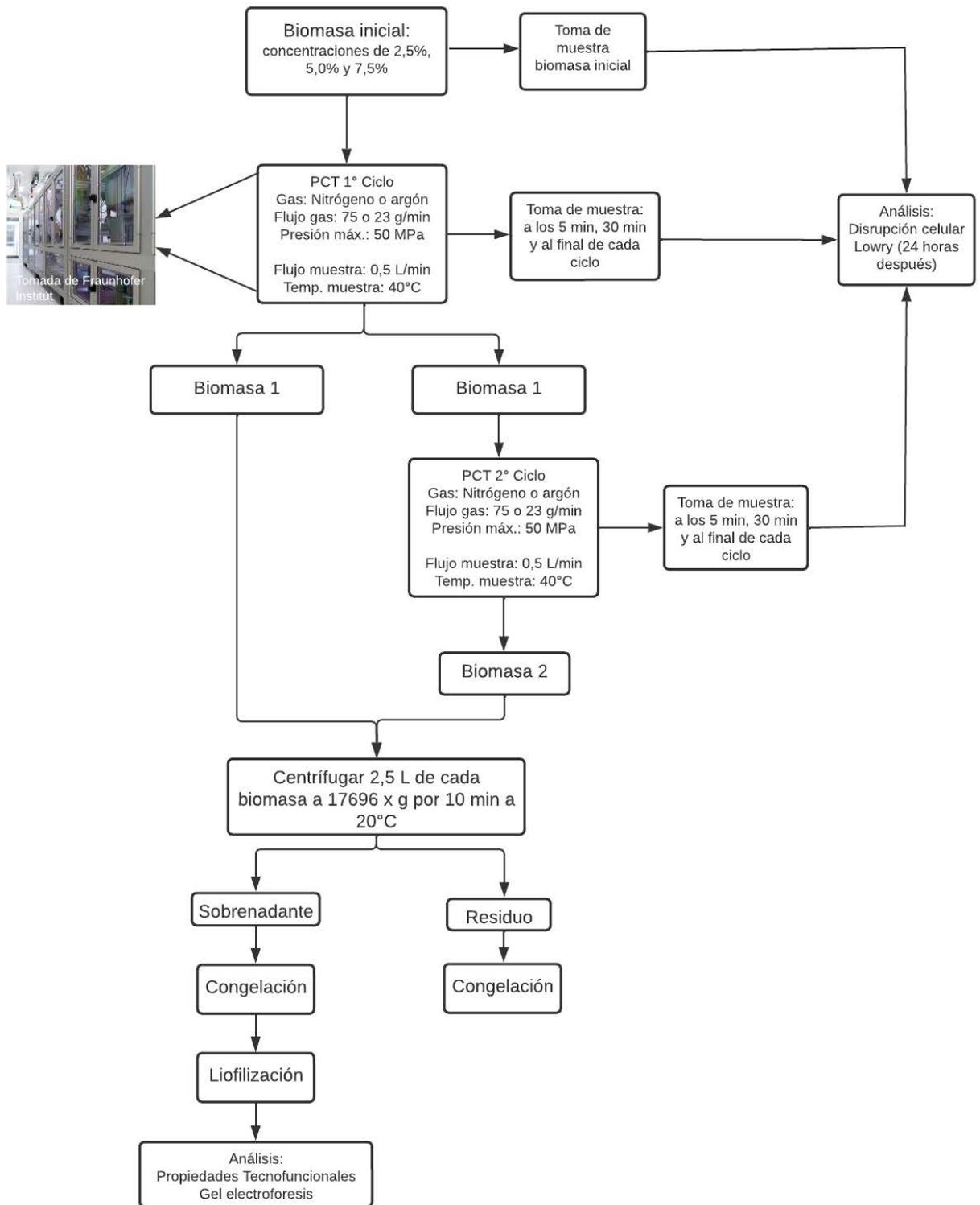


Figura 1. Esquema metodológico para las muestras sometidas a la PCT y sus posteriores análisis y almacenamiento.

4.4.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con un arreglo factorial 2*2*3, para un total de 12 tratamientos. Los factores analizados fueron: el número de ciclos de la muestra en la PCT con dos niveles (uno y dos ciclos), el tipo de gas con dos niveles (nitrógeno y argón) y tres concentraciones distintas de biomasa (2,50%, 5,00% y 7,50%). Las variables respuesta fueron la disrupción celular y el contenido de proteína en el sobrenadante (proteína solubilizada). Se tomaron tres muestras durante cada ciclo de la PCT. En el cuadro I se presentan los tratamientos evaluados.

Cuadro I. Muestras preparadas para ser sometidas a PCT.

| Tratamiento | Tipo de gas | Concentración de biomasa (%) | Número de ciclos |
|-------------|-------------|------------------------------|------------------|
| 1 | Argón | 2,50 | 1 |
| 2 | Argón | 2,50 | 2 |
| 3 | Argón | 5,00 | 1 |
| 4 | Argón | 5,00 | 2 |
| 5 | Argón | 7,50 | 1 |
| 6 | Argón | 7,50 | 2 |
| 7 | Nitrógeno | 2,50 | 1 |
| 8 | Nitrógeno | 2,50 | 2 |
| 9 | Nitrógeno | 5,00 | 1 |
| 10 | Nitrógeno | 5,00 | 2 |
| 11 | Nitrógeno | 7,50 | 1 |
| 12 | Nitrógeno | 7,50 | 2 |

4.5. Evaluación del cambio de pH de la biomasa sobre la solubilidad de las proteínas

Se evaluó el efecto del cambio de pH sobre la extracción proteica, para lo cual se seleccionó una muestra previamente sometida a una de las condiciones de la PCT. Para lo anterior, se consideró la muestra disponible que tuviera el mayor contenido de proteínas solubles, seleccionada según los resultados del objetivo específico 1. No obstante, antes de comenzar este análisis, se realizaron unas pruebas preliminares para determinar las condiciones a emplear.

4.5.1. Pruebas preliminares para evaluar el efecto del cambio de pH en la biomasa luego de la PCT

Para definir las condiciones a emplear en el estudio sobre el efecto del cambio de pH a la biomasa de *P. tricornutum* luego de ser sometida a dos ciclos de la PCT, se realizaron las pruebas preliminares descritas a continuación. Inicialmente, se descongeló la biomasa sometida a la PCT usando argón como gas de compresión y una concentración de microalga de 2,24%, ya que fue la que presentó la mayor cantidad de proteína solubilizada. Luego, ésta se dividió en nueve partes de 50 mL cada una. A tres de éstas no se les modificó el pH; no obstante, a las otras seis se les ajustó el pH a 8,85 y 12,0 utilizando NaOH 1 M, a tres temperaturas (4°C, 24,5°C y 45°C). Las primeras tres partes, a las cuales no se les cambió el pH, se incubaron a las temperaturas mencionadas durante la duración del proceso de cambio de pH para las otras muestras. Lo anterior se hizo con el fin de determinar cuáles condiciones permitían obtener la mayor cantidad de proteína solubilizada. Posteriormente, se realizó un ANDEVA para determinar si los resultados presentaban diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

4.5.2. Efecto del cambio de pH de la biomasa luego de la extracción con la PCT

Se evaluó el efecto del cambio de pH sobre la extracción proteica, para lo cual se seleccionó una muestra previamente sometida a una de las condiciones de la PCT. Para lo anterior, se consideró la muestra disponible que tuviera el mayor contenido proteico, seleccionada según los resultados del objetivo específico 1.

El día previo al análisis se descongeló la biomasa almacenándola en refrigeración. La biomasa se separó en tres partes de 50 mL cada una. Una de las muestras se utilizó para analizar la biomasa (a su pH nativo), a la segunda se le ajustó el pH a 10 y a la tercera a 12. Se definieron estos valores de pH debido a los resultados con mayor contenido de proteína, obtenidos en las pruebas preliminares. Las muestras se colocaron en un beaker sobre una plantilla con una velocidad de agitación constante y un baño de agua, manteniendo la temperatura de las muestras a $24,5 \pm 1,0$ °C. Se midió el pH inicial de cada muestra utilizando un pHmetro y luego se ajustó al pH deseado utilizando NaOH 1 M. En caso de que fuera necesario reducir el pH se empleó HCl 1 M. Se consideró que el pH alcanzó un valor estable cuando variaba $\pm 0,05$ en un lapso mínimo de 30 min. Esta primera estrategia de extracción permitió caracterizar todas las proteínas que son solubles a las condiciones de pH seleccionadas. Después de este primer ajuste de pH en las muestras, se centrifugó cada muestra a 10000 rpm durante 15 min a 24 °C (Beckman Coulter, modelo Avanti J-26 XP y rotor JA-10, California, Estados Unidos). Por decantación, el sobrenadante se separó del residuo. Este procedimiento se presenta esquemáticamente en la figura 2.

4.5.3. Resuspensión del residuo y cambio de pH

Los residuos obtenidos luego de la centrifugación, se resuspendieron en agua destilada a la concentración inicial de la biomasa (2,24%) y se ajustó su pH a 10 o 12. Para ello, el residuo obtenido al pH nativo de la biomasa se llevó a pH 10, y luego de centrifugar esta muestra, se llevó a pH 12. Esto mismo se realizó con el residuo obtenido de la biomasa a pH 10; luego de centrifugar, obtener el residuo y resuspenderlo en agua

destilada, se ajustó a pH 12. Todo lo anterior se hizo siguiendo las condiciones y materiales descritos en la sección 4.5.

Esta segunda estrategia de extracción permite obtener fracciones proteicas más definidas que se encontraban retenidas en la biomasa. Lo anterior implica que, en el primer caso (sección 4.5.2), se logra separar las proteínas que son solubles a pH nativo de las que se solubilizan en estas condiciones hasta pH 10. En el segundo caso (sección 4.5.3), se diferencian las proteínas solubles a pH 10 de las que se solubilizan en estas condiciones hasta pH 12. Esta extracción sucesiva permite obtener distintas fracciones proteicas para la identificación de extractos con propiedades funcionales y tecnológicas que puedan ser aprovechables en la industria alimentaria. Todos los sobrenadantes fueron almacenados en congelación antes de ser analizados.

En la figura 2 se encuentra el diagrama de las actividades realizadas para la extracción proteica por cambio de pH.

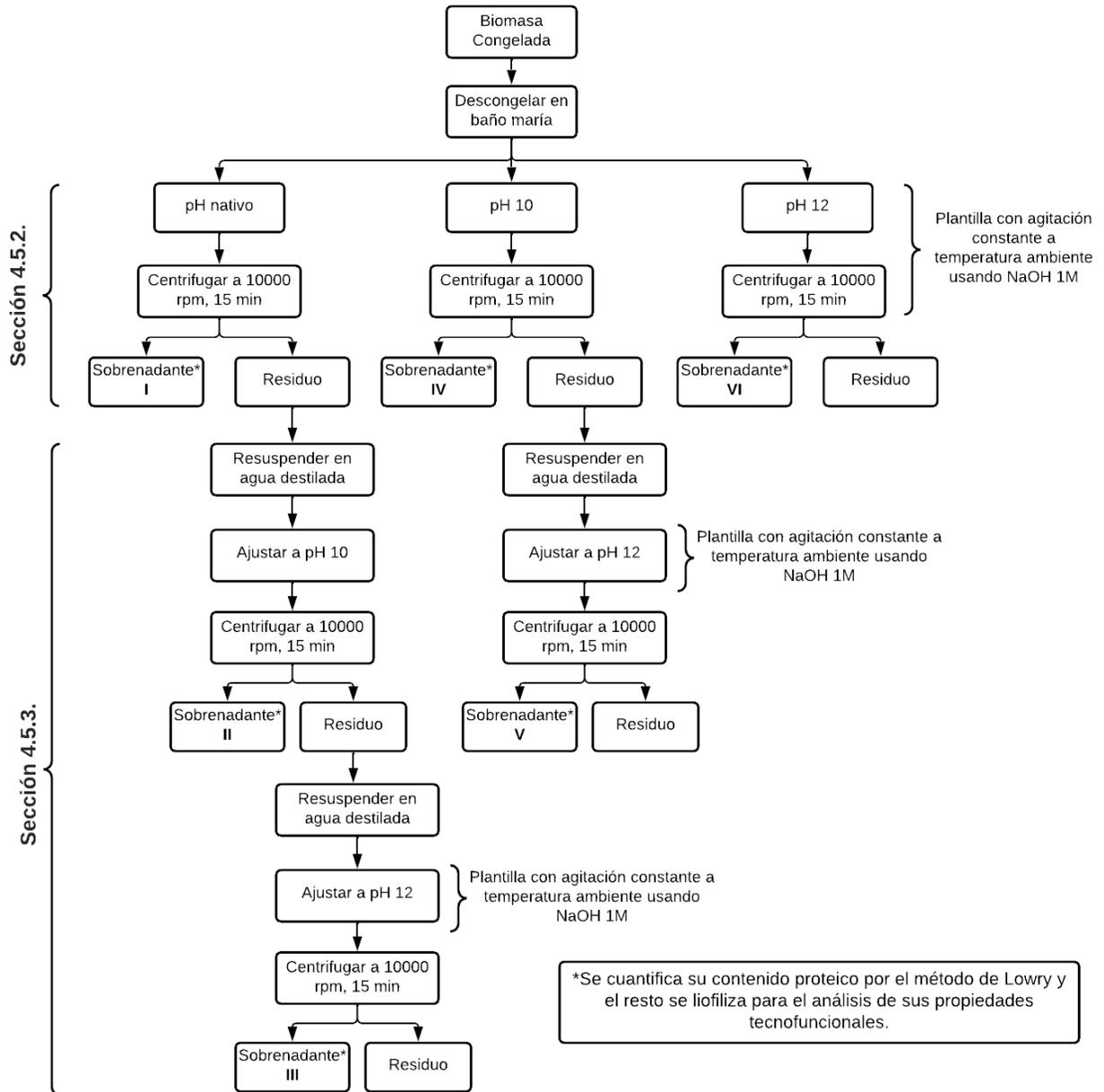


Figura 2. Diagrama de actividades para la evaluación del efecto del cambio de pH de la biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* sobre la solubilidad de proteínas.

4.5.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño unifactorial, con seis niveles que corresponden a los sobrenadantes I, II, III, IV, V y IV, como se muestra en la figura 2. La variable respuesta fue el contenido de proteínas solubilizadas. Se utilizaron las condiciones de extracción mediante PCT seleccionadas en el objetivo 1. Además, se realizaron dos repeticiones a cada pH.

Adicionalmente, se evaluó la distribución de los pesos moleculares de las proteínas en las dos muestras con los contenidos de proteína solubilizada más altos mediante electroforesis en gel.

4.6. Evaluación de las propiedades funcionales y tecnológicas

A la biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* tratada con las condiciones seleccionadas de la PCT y a los dos extractos proteicos que presentaron los mayores contenidos de proteína solubilizada luego del cambio de pH, se les evaluaron las siguientes propiedades funcionales y tecnológicas: solubilidad de las proteínas, capacidad de retención de agua y la capacidad y estabilidad de emulsión.

Antes del análisis, las muestras de la microalga fueron liofilizadas con las condiciones mencionadas en la sección 4.6.2. Los resultados obtenidos luego del análisis se compararon con estándares de proteínas actualmente utilizadas en la industria alimentaria.

4.6.1. Estándares

Se emplearon tres estándares para el análisis de las pruebas tecnofuncionales de los extractos. El estándar de proteína de suero (WPC, por sus siglas en inglés) (Naduria, Düren, Alemania) era 100% proteína de suero lácteo en polvo sin endulzar, donde un 77% era proteína pura. La proteína de soya aislada (Hanse&Pepper, Reinbek, Alemania) era 100% aislado proteico de soya, del cual un 90% era proteína. Por último, la clara de huevo en polvo (Sharkfood Nutrition, Steinbach-Hallenberg, Alemania) era un 100% clara de huevo pasteurizada. Ésta contenía un 82% de proteína.

4.6.2. Liofilización

Para el análisis de las propiedades tecnológicas y funcionales era necesario que las muestras estuvieran en estado sólido, por lo que se liofilizaron previo a estas pruebas. Para ello se utilizaron los equipos Lyovac (marca Finn Aqua, Düsseldorf, Alemania) y Zirbus (marca Mitsubishi, Bad Grund, Alemania). Las muestras se liofilizaron a una temperatura constante de -50°C y una presión de 0,04 mbar durante al menos 36 h.

4.6.3. Diseño experimental

Al analizar peso molecular, AE y EE se utilizó un diseño unifactorial con seis niveles, que corresponden a tres extractos proteicos seleccionados (a partir de los resultados obtenidos en el segundo objetivo específico) y tres estándares. Al evaluar solubilidad y CRA se usó un diseño factorial empleando el factor mencionado anteriormente y el pH. Este último contenía tres niveles (4, 6,8 y 8 para solubilidad y 4, 7 y 10 para CRA). Para todas las propiedades se llevó a cabo el análisis estadístico descrito en la sección 4.7 y de haber más de un factor, también se analizó la interacción entre los factores estudiados.

4.7. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los resultados se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. Se utilizó el software JMP Pro 15 y se analizaron los datos con un 5% de significancia. En caso de reportarse diferencias significativas, se compararon las medias mediante una prueba Tukey (<0,05). De existir interacciones, éstas se evaluaron gráficamente.

4.8. Métodos de análisis

4.8.1. Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad de las muestras se utilizó una balanza de humedad (OHAUS, modelo MB45, Nueva Jersey, Estados Unidos). Se colocó entre 0,500 g y 1,000 g de muestra en un plato de aluminio tarado. Luego, se utilizó un programa de secado manual a 105°C hasta que la masa de la muestra permaneciera constante. El valor obtenido se utilizó para verificar la concentración de la biomasa utilizada durante la PCT.

4.8.2. Disrupción celular

Para evaluar la disrupción de las células durante la PCT, las muestras se analizaron en el microscopio. Para preparar las muestras, se diluyó la biomasa mezclando 10 µL en 990 µL de agua destilada. Se colocaron 10 µL de la dilución en una cámara de Neubauer que se posicionó en el microscopio. Al observar el cuadro central, se contaron las células completas en los cinco cuadros de la línea diagonal de izquierda a derecha, tal como se muestra en la figura 3. Para esto, se cuantificaron las células que se encontraran dentro del cuadro y sobre las líneas superiores e izquierdas. Esta medición se realizó por triplicado.

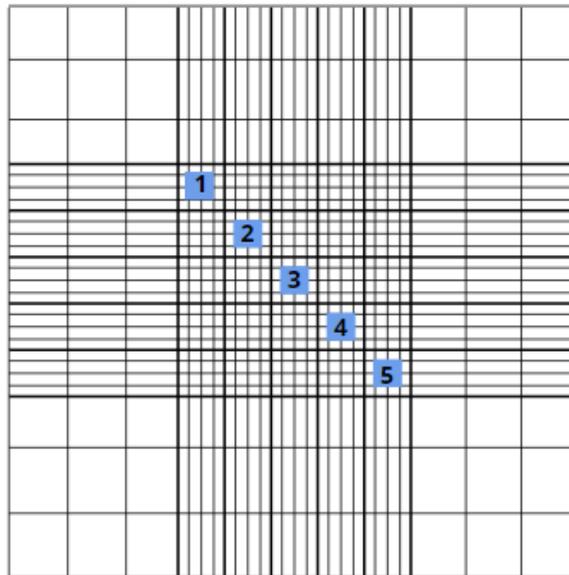


Figura 3. Diagrama de la cámara de Neubauer utilizada para cuantificar las células y determinar la disrupción celular provocada por la PCT (en azul se enumeran los cinco cuadros cuyas células fueron cuantificadas).

Las células completas observadas se sumaron y se promediaron. Con este valor se determinó el grado de disrupción celular al comparar el valor de la muestra contra la cantidad de células en la biomasa. Para lo anterior se utilizó la ecuación [2].

$$\text{Grado de disrupción} = \frac{(\text{Células en la muestra} - \text{Células en la biomasa})}{\text{Células en la biomasa}} \times 100\% \quad [2]$$

4.8.3. Solubilización de proteínas

Como se quiere evaluar la efectividad de la PCT y el efecto del cambio de pH en la extracción proteica, se cuantificó la solubilización de proteínas. Para el primer caso, se midió la concentración de proteínas en la biomasa antes de ser sometida a la PCT y se comparó con la concentración proteica en el sobrenadante de las muestras tomadas durante la PCT. En el segundo caso, se comparó la cantidad de proteínas en la biomasa luego de la PCT y del cambio de pH con la concentración proteica en el sobrenadante obtenido luego del cambio de pH.

Todas las muestras fueron homogeneizadas en un vórtex (IKA, Staufen, Alemania) y de todas se tomó 1 mL que se colocó dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Luego, aquellas que se tomaron durante la PCT (luego de 5 min, después de 30 min y al final de cada ciclo) se centrifugaron en una centrifuga (VWR, modelo MicroStar 12, Pensilvania, Estados Unidos) por 10 min a 13000 rpm y 20°C. Éstas se decantaron para separar el sobrenadante, el cual se colocó en otro tubo Eppendorf de 1,5 mL. Por último, se cuantificó el contenido de proteínas en las muestras utilizando el método de Lowry descrito en la sección 4.8.3.1 y se calculó la solubilización proteica empleando la ecuación [3].

$$\text{Solubilización de proteínas} = \frac{\text{Proteínas en el sobrenadante (mg/mL)}}{\text{Proteínas en la biomasa (mg/mL)}} \times 100\% \quad [3]$$

Este cálculo permitió determinar el porcentaje de proteínas en la biomasa que logra solubilizarse.

4.8.3.1. Método de Lowry

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se utilizó una metodología basada en la descrita por Lowry *et al.* (1951) con algunas modificaciones. Se prepararon diez estándares, de 0,025-0,25 mg/L, con BSA al 0,025%. Además, se prepararon dos blancos, los cuales consistían de agua desionizada. Adicionalmente, se prepararon dos soluciones: A y B. Para la solución A, se mezcló 1 mL de la solución 1 (1,56 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 100 mL de agua bidestilada) y 100 mL de la solución 2 (4,0 g de NaOH, 20 g de Na_2CO_3 , 0,27g de K-Na-Tartrato y 1000 mL de agua bidestilada). La solución B se preparó con reactivo Folin y agua bidestilada (1:1).

Se añadió 1 mL de solución A a 0,2 mL de cada estándar, muestra y blanco e inmediatamente después se agitaron usando un vórtex (IKA, Staufen, Alemania). Antes de continuar con los siguientes pasos, transcurrió un tiempo de reacción de 10 min. Luego se añadió 0,1 mL de la solución B a las muestras, estándares y blancos. Se esperó un tiempo de reacción de 30 min, agitando de vez en cuando. Posteriormente, se midió la absorbancia a 740,0 nm con un espectrofotómetro (Hitachi, modelo U-2900, Tokio, Japón). Las mediciones se realizaron por duplicado.

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se elaboró una curva de calibración, en la cual se relacionó la absorbancia de los estándares con la concentración de los mismos. De esta relación se determinó la ecuación de la recta usando Excel. Esta ecuación se utilizó para encontrar la concentración proteica en las

muestras empleando la absorbancia obtenida para cada una de ellas. La ecuación [4] es utilizada para calcular lo descrito anteriormente.

$$A = m (Cn) + b \quad [4]$$
$$Cn = \frac{A-b}{m}$$

En ésta, el intercepto (b) y la pendiente (m) de la ecuación de la recta de la curva de calibración se usan en conjunto con la absorbancia (A) obtenida durante la medición para determinar la concentración de proteínas (Cn) en la muestra.

4.8.4. Electroforesis en gel

Para analizar la distribución del peso molecular de las fracciones de proteínas solubles se llevó a cabo una electroforesis en gel SDS-Page, siguiendo el procedimiento descrito por Haußmann (2019) con algunas modificaciones. Las muestras liofilizadas se diluyeron usando buffer de muestreo (Laemmli sample buffer with 2-mercaptoethanol) para alcanzar una concentración proteica de aproximadamente 500 µg/mL. Estas diluciones se agitaron usando un vórtex (IKA, Staufen, Alemania) y se calentaron a 95°C por 10 min usando una plantilla Thermal Shake Lite (VWR, Pensilvania, Estados Unidos) para desnaturalizar y linealizar las proteínas. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su posterior análisis.

El buffer de corrida se preparó diluyendo 50 mL de buffer de corrida concentrado (SERVA Tris-Glycerine/SDS electrophoresis buffer, Heidelberg, Alemania) con 450 mL de agua desionizada. El gel (SERVA Gel TG PRIME 10% 12 sample wells, Heidelberg, Alemania) se lavó utilizando agua desionizada. El cassette se llenó con el buffer de corrida diluido. Dos carriles se llenaron con 5 µL de un estándar de proteína (PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), mientras que en los demás se colocaron 10 µL de las muestras. En el último carril se colocaron 10 µL del buffer de muestreo. Durante la elución se utilizó una corriente de 200 V y 69 mV. La corrida duró aproximadamente 1 h hasta que las muestras alcanzaron la zona final. Luego de terminar, el gel se sumergió en azul de Coomassie durante 1 h. Finalmente, el gel se sumergió en agua por 2 h.

4.8.5. Propiedades funcionales y tecnológicas

Se cuantificaron las siguientes propiedades tecnofuncionales de los extractos seleccionados: solubilidad, capacidad de retención de agua, actividad de emulsión y estabilidad de emulsión. Los resultados de las mismas se compararon estadísticamente (ver sección 4.6.3) con tres estándares de proteínas utilizadas actualmente en la industria alimentaria.

4.8.5.1. Solubilidad de las proteínas

Para cuantificar la solubilidad de los extractos de proteínas, se siguió el método utilizado por Haußmann (2019). En primer lugar, los extractos fueron liofilizados siguiendo la metodología descrita en la sección 4.6.2. Las proteínas liofilizadas se disolvieron en agua desionizada para conseguir una solución de 1,96% m/m. La solución madre se

distribuyó en viales y se ajustaron a diferentes pH con NaOH o HCl 1 M a 4,0, 6,8 y 8,0. Ésto se realizó con el fin de evaluar la solubilidad a distintas condiciones de acidez. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, con agitación constante. Luego, se tomó una alícuota de 1 mL para determinar el contenido total de proteínas. El resto de la solución se centrifugó a 10000 x *g* durante 15 min, usando una centrífuga (VWR, modelo MicroStar12, Pensilvania, Estados Unidos). Posteriormente, se cuantificó el contenido proteico en el sobrenadante y en la alícuota mediante el método de Lowry modificado descrito en la sección 4.8.3.1. La solubilidad de la proteína a un pH específico se calculó mediante la ecuación [5]:

$$\text{Solubilidad (g/100g)} = \frac{\text{Proteína soluble (g/L)}}{\text{Proteína total (g/L)}} \times 100 \quad [5]$$

Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.8.5.2. Capacidad de retención de agua (CRA)

Para determinar la CRA de los extractos proteicos, se utilizó el método descrito por Raikos *et al.* (2014). Se pesó 1 g de la muestra y se dispersó en 10 mL de tampón fosfato sódico (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) de 10 mmol/L (pH 4,0, 7,0 y 10,0) en tubos de centrifuga de 50 mL. No obstante, para los extractos sometidos al cambio de pH se pesaron 0,2-0,3 g de muestra y se dispersaron en 2-3 mL de tampón debido a la disponibilidad de muestra. Se utilizaron tampones con distintos valores de pH para evaluar la CRA de los extractos en distintas condiciones de acidez.

Posteriormente, se agitaron en una plantilla agitadora (modelo MTS 2, IKA, Staufen, Alemania) durante 30 min y se centrifugaron a 3250 x *g* durante 30 min utilizando una centrífuga (Beckman Coulter, modelo Avanti J-26 XP y rotor JA-25.50, California, Estados Unidos). Luego, el sobrenadante se descartó y se pesó la muestra. La CRA se calculó mediante la ecuación [6]:

$$CRA = \frac{m_{\text{tubo+precipitado}} - m_{\text{tubo+muestra}}}{m_{\text{muestra}}} \quad [6]$$

Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.8.5.3. Actividad y estabilidad de las emulsiones

Para determinar la actividad y la estabilidad de las emulsiones formadas por los extractos, se siguió el método descrito por Haußmann (2019). En primer lugar, se liofilizaron los extractos y después se disolvió la proteína liofilizada usando tampón Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 0,1 M (pH 7,0) para conseguir una solución al 2% m/m. Se tomaron 6 mL de la solución y se añadieron 2 mL de aceite de soja. Utilizando un Ultra-turrax (modelo T-25, IKA, Staufen, Alemania) a 24000 rpm durante 1 min, se emulsificaron las muestras. Inmediatamente después se tomaron 20 µL del fondo del tubo y se añadieron a una cubeta con 2 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% m/m. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hitachi, modelo U-2900, Tokio, Japón) a 500 nm. Después de 10 min, se volvieron a tomar 20 µL del fondo del tubo donde se realizó la

emulsión y se combinaron con SDS para volver a medir la absorbancia. Este procedimiento se repitió para preparar dos blancos, usando 6 mL del tampón sin la adición de proteína.

La actividad de emulsión (AE) se determinó mediante la fórmula [7], para la cual primero debe determinarse la turbidez, lo que se realizó con la ecuación [8]:

$$AE = \frac{2 \times \text{Turbidez [5]}}{(1 - \text{fracción lipídica [0,25]}) \times \text{concentración de proteína [20000 g/m}^3\text{]}} \quad [7]$$

$$\text{Turbidez} = \frac{2,303 \times A(500 \text{ nm}) \times \text{factor de dilución [100]}}{\text{recorrido óptico [0,01 m]}} \quad [8]$$

Además, la estabilidad de emulsión (EE) se calculó mediante la fórmula [9], para la cual se requirió determinar primero la AE de la muestra inicial (0) y luego de 10 min:

$$EE(\%) = \frac{AE_{10 \text{ min}}}{AE_0} \times 100 \quad [9]$$

Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.8.6. Contenido de fucoxantina

Por último, se cuantificó el contenido de fucoxantina como complemento a la investigación. Para ello, se analizaron las muestras de biomasa al 5%, que fueron tratadas con la PCT siguiendo el procedimiento establecido en el Instituto Fraunhofer, utilizando los gases N₂ y Ar, con un flujo de 75 g/min para N₂ y 23 g/min para Ar. Las fracciones de la biomasa al 5% analizadas fueron el residuo y el sobrenadante, luego de la centrifugación a 13000 rpm por 15 min (luego de uno o dos ciclos en la PCT) y también, se analizó la biomasa completa sin ser tratada en la PCT. Estas fracciones fueron previamente liofilizadas antes del análisis.

Para la cuantificación de fucoxantina, se midió (19-21) mg de muestra liofilizada y se colocó en tubos de centrifuga de 15 mL con 1 g adicional de bolas de vidrio de circonio. Luego, se agregó 1,5 mL de EtOH-BHT (250 mg EtOH/L BHT) a los tubos. Los tubos se colocaron en el molino de bolas (Bertin Technologies, modelo Precellys, Maryland, Estados Unidos) utilizando el programa 3 para realizar la digestión mecánica. Posteriormente, los tubos se colocaron en una centrifuga (Thermo Fisher Scientific, modelo Heraeus Multifuge, Massachusetts, Estados Unidos) y se centrifugaron a 13000 rpm por 3 min. El sobrenadante obtenido fue decantado en un tubo centrifuga de 15 mL. Nuevamente se realizó la extracción agregando 1 mL de EtOH-BHT al residuo y centrifugando a las mismas condiciones. Esta extracción se repitió cuatro veces hasta que se obtuvo un volumen final de 5 mL de sobrenadante. Luego, se centrifugó una vez más el sobrenadante a 4000 rpm por 10 min. Se filtró (tamaño de poro: 0,45 µm) 1,0 mL de cada muestra a viales (de vidrio color ámbar y capacidad máxima de 2 mL), se colocó su tapa y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis por HPLC, siguiendo la metodología mencionada por Derwenskus *et al.* (2020). La cromatografía se llevó a cabo por fase reversa utilizando una columna Supelcosil Suplex pkB-100 (Sigma-Aldrich,

Missouri, Estados Unidos) y un detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, modelo Waters G1315C, California, Estados Unidos). Se empleó un gradiente binario con un flujo de 1 mL/min y se inyectaron 20 µL de las muestras diluidas cinco veces. La fase móvil A estaba constituida por metanol/acetronitrilo/2-propanol (54/44/2, V/V/V) y la B por fase móvil A/agua (85/15, V/V). La elusión comenzó con 40% A, el cual incrementó luego a 80% a los 10 min y a 100% desde los 20 min hasta los 28 min. Luego, de 29 a 36 min el gradiente se utilizó 40% A y 60% B. La fucoxantina se detectó a un tiempo de retención de 4,96 min a 450 nm y su concentración en las muestras se determinó al comparar los resultados contra una curva de calibración preparada con un estándar de grado analítico (Sigma-Aldrich, número 16337, Missouri, Estados Unidos).

4.9. Distribución del trabajo

Ambas autoras trabajaron en conjunto en la ejecución de todos los objetivos, debido al tiempo limitado para analizar las muestras frescas para evitar el efecto de los ciclos de congelación y descongelación. No obstante, los resultados obtenidos fueron repartidos entre ellas para su posterior análisis y discusión. La división del trabajo se detalla en el cuadro II.

Cuadro II. Distribución del análisis de datos y discusión de resultados.

| Objetivo | Encargada del análisis de datos y discusión |
|--|--|
| Evaluar el efecto de la cantidad de ciclos, concentración de biomasa y tipo de gas al utilizar la tecnología PCT sobre la capacidad de extracción de proteínas de la microalga <i>P. tricornutum</i> para la recomendación de las condiciones en la aplicación de esta tecnología. | Andrea Carolina Morales |
| Evaluar el efecto del pH sobre la concentración y las propiedades de las proteínas extraídas de la microalga <i>P. tricornutum</i> para la selección de condiciones de acidez en la aplicación de esta tecnología a nivel industrial. | Daniela Quintero Villalta |
| Evaluar las propiedades funcionales y tecnológicas (solubilidad, capacidad de retención de agua y actividad y estabilidad de emulsión) de extractos de proteínas seleccionados de la microalga <i>P. tricornutum</i> obtenidos utilizando la tecnología PCT para su potencial aplicación industrial. | Andrea Carolina Morales Daniela Quintero Villalta |

4.10. Instituciones interesadas y financiamiento

Este trabajo final de graduación se llevó a cabo con el financiamiento del Instituto Fraunhofer de Alemania, el cual proporcionó la biomasa de *P. tricornutum* y los reactivos químicos, así como los equipos y las instalaciones necesarias.

Adicionalmente, esta colaboración fue posible gracias al financiamiento de la Baden-Württemberg Stiftung. Esta organización apoyó a ambas estudiantes brindándoles una beca durante 11 meses.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el estudio se dividen en tres secciones: la primera detalla el uso de la PCT y su efecto sobre la disrupción celular y la solubilización proteica (5.1), la segunda abarca el efecto del cambio de pH sobre la extracción de proteínas solubles (5.2) y la tercera, cubre todo lo relacionado con el análisis de las propiedades de los extractos seleccionados.

5.1. Uso de la tecnología de cambio de presión (PCT) para romper las células de *P. tricornutum* y extraer proteínas solubles

Una vez descongelada la biomasa, ésta se preparó para realizar la disrupción celular por medio de la PCT. Para lo anterior, la biomasa se diluyó con agua a 40°C. Sin embargo, en la planta piloto no se tenían las condiciones para cuantificar el volumen del agua, por lo que la concentración exacta de la biomasa se determinó mediante cuantificación de la humedad, como se describe en la sección 4.8.1. En el cuadro III se muestran las concentraciones reales de biomasa utilizadas durante los distintos tratamientos sometidos a la PCT.

Cuadro III. Concentración de las biomásas durante el tratamiento de la PCT, para la evaluación de los parámetros de esta tecnología en la obtención de proteína solubilizada de *P. tricornutum*.

| Tratamiento | Gas de compresión | Concentración de biomasa deseada (%) | Ciclo | Concentración de biomasa obtenida (%) |
|-------------|-------------------|--------------------------------------|-------|---------------------------------------|
| 1 | Argón | 2,50 | 1 | 2,24 |
| 2 | Argón | 2,50 | 2 | |
| 3 | Argón | 5,00 | 1 | 4,93 |
| 4 | Argón | 5,00 | 2 | |
| 5 | Argón | 7,50 | 1 | 6,95 |
| 6 | Argón | 7,50 | 2 | |
| 7 | Nitrógeno | 2,50 | 1 | 2,76 |
| 8 | Nitrógeno | 2,50 | 2 | |
| 9 | Nitrógeno | 5,00 | 1 | 4,85 |
| 10 | Nitrógeno | 5,00 | 2 | |
| 11 | Nitrógeno | 7,50 | 1 | 7,49 |
| 12 | Nitrógeno | 7,50 | 2 | |

Luego de la determinación de la concentración de la biomasa, se procedió con la disrupción celular mediante uno o dos ciclos de PCT utilizando argón o nitrógeno como gas de compresión, tal como se indica también en el cuadro III.

Se observó que la viscosidad de la biomasa aumentaba con la concentración de la microalga. No obstante, esta característica no presentó un obstáculo durante la PCT. Aun así, si se quisiera incrementar aún más la concentración de microalga durante el tratamiento, este debería ser un factor a tomar en cuenta, ya que podría ser necesaria una bomba más potente para asegurar el flujo de la microalga a través de las tuberías y evitar bloqueos en la válvula de descompresión. Esto podría también incurrir en un consumo energético mayor, ya que se requeriría más energía para bombear la solución.

Lo anterior debería considerarse porque tratar una biomasa más concentrada puede ser más favorable, debido a que se requiere una menor energía por biomasa seca, tal y como lo reportaron Hörner (2020) y Liu *et al.* (2021) al tratar a *P. tricornutum* con CO₂ usando PCT y *C. vulgaris* utilizando un molino de bolas, respectivamente. Adicionalmente, utilizar una biomasa más concentrada implica un menor tiempo de proceso (Liu *et al.*, 2021), lo que también se traduce a menores costos durante el procesamiento. No obstante, aunque por los factores mencionados es más favorable trabajar con concentraciones más elevadas, podría haber limitaciones dependiendo de la configuración de la planta procesadora. Por ejemplo, con la bomba con la que actualmente está equipada la instalación utilizada, no sería posible tratar una biomasa más concentrada, por lo que se necesitaría invertir en una bomba más potente. Por otra parte, es posible que el inyector de la PCT se bloquee al utilizar concentraciones muy elevadas (Hörner, 2020).

Varona Iglesias *et al.* (s/f) describieron la formación de aglomeraciones de células de *P. tricornutum* al incrementar su concentración, lo cual también afectaba la efectividad de la PCT al romper las células, debido a que las aglomeraciones otorgaban cierta protección a la microalga contra la descompresión. Por lo tanto, al utilizar la PCT industrialmente, se recomendaría comparar los beneficios de emplear concentraciones más elevadas contra la configuración del equipo para determinar los parámetros óptimos de proceso.

Relacionado con lo anterior, también se ha reportado que la desnaturalización de proteínas puede provocar obstrucciones en el equipo (Günerken *et al.*, 2019), lo cual puede ser promovido por altas temperaturas. Por esta razón y para evitar la degradación de otros componentes, como ácidos grasos insaturados y carotenoides, es importante controlar la temperatura de la biomasa y evitar que suba. No obstante, para maximizar la disrupción celular, tampoco debería bajar de los 40°C establecidos. Para controlar la temperatura, se utilizó agua a 40°C para diluir la biomasa de *P. tricornutum*. Aún así, debido a los altos volúmenes de biomasa procesados y la duración del tratamiento, esto pudo no haber sido suficiente, ya que durante la PCT, aunque la temperatura se monitoreó, ésta no se podía controlar. Por lo tanto, se recomendaría evaluar otras opciones para controlar la temperatura de la biomasa y asegurar que se mantenga en el valor deseado.

En cuanto a los gases de compresión utilizados, ambos son inertes, por lo que se evita el efecto de acidificación mencionado que ocurre al emplear CO₂. Por otra parte,

ambos presentan propiedades distintas que deben considerarse. Como se mencionó en la sección 4.4, se requiere de un flujo de gas mayor para el nitrógeno que para el argón, de 75 g/min y 23 g/min, respectivamente, debido a que estas condiciones fueron las que permitieron obtener la mayor disrupción celular al tratar esta microalga en pruebas preliminares realizadas en el Instituto Fraunhofer. Por lo tanto, durante el mismo tiempo de proceso, se empleó una menor cantidad de argón en comparación con la de nitrógeno. No obstante, este segundo tiene un precio menor, por lo que sería importante comparar el costo final de la cantidad necesaria de ambos gases antes de aplicar esta tecnología a nivel industrial.

Por último, considerando que la descompresión es la que permite romper las células, un segundo ciclo podría alterar la pared celular de aquellas que no fueron afectadas por el primero. Por lo tanto, se evaluó la efectividad que tendría un segundo pasaje por la PCT. Al igual que como se mencionó al comparar los gases de compresión, al implementar esta tecnología industrialmente habría que evaluar la relación costo-beneficio entre el posible incremento en la disrupción celular y con él, el potencial aumento de los componentes de interés extraídos, y el costo económico de llevarlo a cabo.

Concluida la PCT se determinó la disrupción celular por medio de microscopía (sección 4.8.2) y la solubilización proteica a través del método de Lowry (sección 4.8.3.1). En las secciones 5.1.1 y 5.1.2 se presentan los resultados obtenidos.

5.1.1. Disrupción celular

La medición de la disrupción celular permite evaluar la efectividad de la PCT sobre el rompimiento de las células de *P. tricornutum*. Quebrar estas últimas implica romper la pared celular, lo cual potencia la migración de los componentes intracelulares hacia el exterior, y con ello, facilita la extracción de compuestos valorizables (Günerken *et al.*, 2019; Soto-Sierra *et al.*, 2018). Este efecto puede observarse a través de la microscopía. En la figura 4 se presentan capturas de pantalla durante el análisis de una de las muestras.

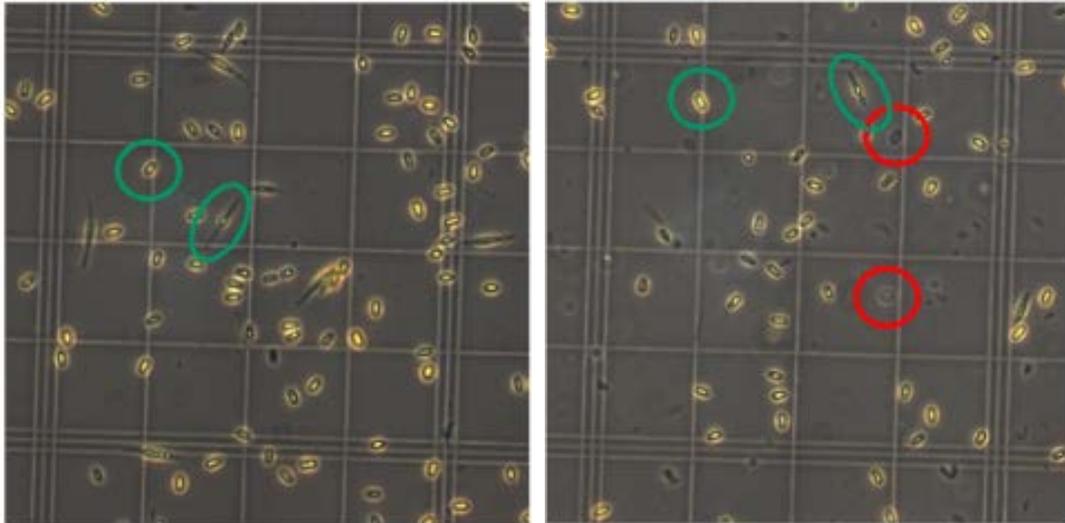


Figura 4. Microscopía de la biomasa de *P. triornutum* al 2,5% antes (izquierda) y luego (derecha) de dos ciclos de la PCT utilizando nitrógeno como gas de compresión. Ambas muestras se diluyeron 1:100 para su cuantificación en el microscopio (en verde se señalan algunas células íntegras y en rojo algunas células rotas o fragmentos celulares).

Como se puede observar en la figura 4, las células que se ven enteras y rodeadas de un halo amarillo verdoso son las células íntegras de la microalga (señaladas en verde). Luego de la PCT, también se observan células rotas o fragmentos celulares (señalados en rojo), los cuales no se cuantificaron durante el análisis microscópico descrito en la sección 4.8.2.

Adicionalmente, cabe mencionar que solo se observaron dos morfologías de las tres reportadas para *P. triornutum*. En la figura 4, de los dos grupos de células señaladas en verde, las que están más a la derecha son fusiformes, mientras que las otras dos son ovaladas. Lo anterior pudo ser causado por la cepa de microalga empleada, ya que algunas se caracterizan por tener una predominancia de células triradiales, mientras que en otras cepas sobresalen los otros dos morfotipos (Martino *et al.*, 2007).

No obstante, también se ha reportado que ciertas características de los cultivos influyen sobre la morfología. Si se presentan condiciones de estrés, se promueve la transformación de las células triradiales hacia formas ovaladas y fusiformes. Estas últimas también transfiguran a la morfología ovalada cuando las condiciones de cultivo no son óptimas, lo que ocurre por ejemplo en condiciones de baja salinidad o temperaturas bajas. Adicionalmente, en cultivos en fase estacionaria, la proporción de células morfológicamente ovaladas incrementa sin importar la composición del cultivo inicial (Martino *et al.*, 2007). La microalga empleada para el estudio actual pudo haber sido afectada por estos factores, ya que la misma se desarrolló en condiciones con bajo nitrógeno.

La predominancia de la morfología ovalada conlleva un reto para la disrupción celular, ya que se ha reportado que las formas fusiformes y triradiales no contienen paredes celulares silicificadas (Martino *et al.*, 2007). Por lo tanto, si se emplea ácido silícico durante el cultivo de *P. triornutum*, sus células producen la estructura que les

otorga una mayor dureza. Francius *et al.* (2008) reportaron un módulo de Young de aproximadamente 500 kPa para las células ovaladas y alrededor de 100 kPa para las otras dos morfologías.

Se realizó un análisis factorial para evaluar estadísticamente el efecto de los tres factores analizados; las probabilidades asociadas a cada uno de ellos se presentan en el cuadro IV.

Cuadro IV. Probabilidad asociada a los factores analizados durante la PCT de *P. tricornutum* para evaluar su efecto sobre la disrupción celular, obtenida a través de un ANOVA factorial.

| Factor | Probabilidad asociada (p) |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Número de ciclos (C) | 0,0128 ^a |
| Tipo de gas (G) | 0,6389 |
| Concentración de biomasa (Cn) | 0,6428 |
| C*G | 0,5770 |
| C*Cn | 0,0625 |
| G*Cn | 0,0184 ^a |
| C*G*Cn | 0,8869 |

^a Hay diferencias significativas asociadas al factor ($p < 0,05$).

5.1.1.1. Efecto del número de ciclos sobre la disrupción celular

En la figura 5 se compara la disrupción celular provocada por uno y dos ciclos de la PCT.

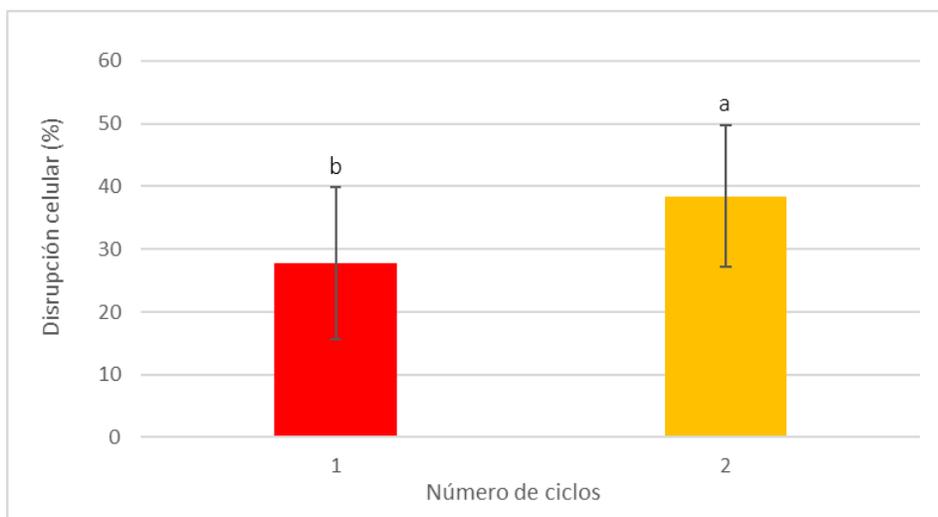


Figura 5. Disrupción celular promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a uno y dos ciclos de la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados.

El análisis estadístico indica que someter a la biomasa de la microalga a un segundo ciclo de la PCT incrementa significativamente la disrupción celular. Este resultado concuerda con lo esperado, debido a que un segundo ciclo somete a la biomasa a un proceso de cambio de presión adicional. Biancavallo (2018) indicó una reducción adicional en el recuento total aerobio de jugo de naranja luego de un segundo ciclo, lo que implica un mayor rompimiento celular.

En cuanto a *P. tricornutum*, Varona Iglesias *et al.* (s/f) obtuvieron un incremento lineal en la disrupción de las células y los cloroplastos al estudiar el efecto de uno a tres ciclos usando un 2,5% de biomasa, nitrógeno y 45°C. Hörner (2020) también reportó un aumento en la disrupción celular obtenida usando CO₂ supercrítico al incrementar paulatinamente el número de ciclos desde uno hasta cinco. La mayor diferencia parece haber sido provocada por el cuarto ciclo, con un aumento de 6 a 8% para distintas condiciones de proceso.

De esta forma, podría ser útil evaluar al menos un ciclo adicional en las tres concentraciones de biomasa analizadas, ya que éste podría incrementar aún más la disrupción celular. Sin embargo, como se mencionó previamente, habría que considerar también el aumento en el uso energético y el costo de operación que conllevaría un ciclo extra.

Por otro lado, se observa una desviación estándar amplia para ambos tratamientos (ver figura 5). Esto se relaciona con el efecto de las otras variables, como la interacción entre número de ciclos y concentración de biomasa, la cual fue apenas no significativa $p=0,0625$). Adicionalmente, no puede pasarse por alto la interacción de concentración de biomasa y gas de compresión, que también afectó significativamente la disrupción celular, y se analiza a profundidad en la siguiente sección (5.1.1.2).

5.1.1.2. Efecto del tipo de gas y la concentración de biomasa sobre la disrupción celular

Ni el tipo de gas ni la concentración de biomasa generaron de manera individual diferencias significativas en la disrupción celular ($p=0,6389$ y $p=0,6428$, respectivamente). No obstante, sí hubo un efecto significativo de la interacción de ambos factores ($p=0,0184$), lo cual indica que la concentración de la biomasa afecta la disrupción celular diferentemente según el tipo de gas, y viceversa. En la figura 6 se presenta el efecto de esta interacción sobre la disrupción celular.

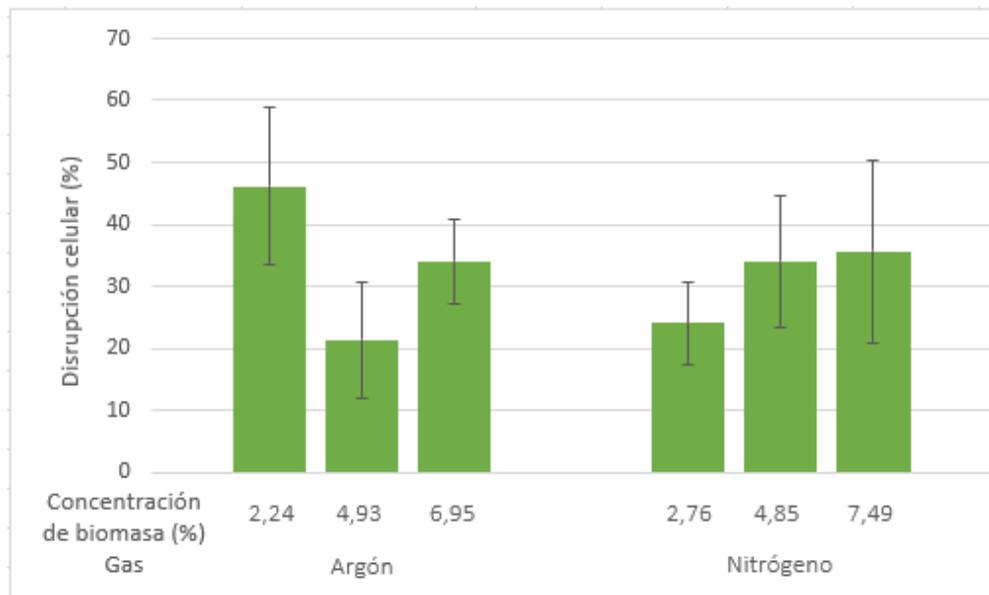


Figura 6. Disrupción celular promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a la PCT utilizando distintos gases de compresión y diferentes concentraciones de biomasa. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. No se presentan las diferencias significativas debido a que se está analizando una interacción.

Hörner (2020) indicó que el efecto de la concentración de biomasa de *P. tricornutum* sobre la disrupción celular depende del gas de compresión y la técnica utilizada, lo cual coincide con lo obtenido en este caso. El primer aspecto mencionado puede estar relacionado con las diferentes propiedades atribuidas a los gases. Una característica crucial es la solubilidad. El argón tiene una solubilidad en agua mayor que el nitrógeno (Unternehmensberatung Babel, s/f), la cual podría incrementar la disrupción celular, ya que facilitaría la penetración del gas en las células. Con respecto a esto, Varona Iglesias *et al.* (s/f) lograron extraer alrededor de un 6% más de proteínas y clorofila-a usando argón en comparación con nitrógeno al someter a *P. tricornutum* a la PCT. Por otro lado, Espinasse *et al.* (2008) obtuvieron valores similares de inactivación utilizando argón y nitrógeno durante el tratamiento de levaduras usando 150 MPa por 24 h y la descompresión a 75 MPa/s. En cambio, al emplear helio no obtuvieron ninguna inactivación. Esto lo atribuyeron a que el helio es cuatro veces menos soluble en aceites orgánicos que los otros dos gases, además de difundir más rápido de la célula, por lo que tiene un menor efecto sobre la disrupción celular. No obstante, aunque el argón sea dos

veces más soluble que el nitrógeno, los autores reportaron que la disrupción celular obtenida al emplear los dos gases fue comparable.

Adicionalmente, los valores de disrupción celular más altos para ambos gases son mayores o comparables con el valor máximo reportado para esta microalga por Hörner (2020). En su estudio, la mayor disrupción celular obtenida fue de 34,98%, la cual se obtuvo luego de cinco ciclos de dióxido de carbono supercrítico como gas de compresión. Esto implica que el argón y el nitrógeno son buenas alternativas para sustituir al primer gas, el cual, aparte de proporcionar una menor disrupción celular de *P. tricornutum*, también provoca un aumento en la acidez de la biomasa, lo cual, como se mencionó previamente, no es favorable para la extracción de ciertos compuestos, tales como proteínas.

Por otro lado, en la literatura se han mencionado resultados diversos al evaluar el efecto de la concentración de biomasa. Liu *et al.* (2021) reportaron que esta variable no afectaba la tasa de disrupción celular de *C. vulgaris* lograda al utilizar un molino de bolas. En cambio, al utilizar CO₂ supercrítico durante la PCT de *P. tricornutum*, Hörner (2020) obtuvo que la disrupción celular aumentaba con la concentración, siendo mayor al utilizar 2,5% de biomasa, en comparación con emplear 0,5% y 1,5%. Por otro lado, Varona Iglesias *et al.* (s/f) reportaron una relación negativa entre la disrupción celular y la concentración de biomasa al someter a *P. tricornutum* a la PCT, donde el valor más elevado lo obtuvieron al usar 5% y la disrupción celular era menor al utilizar 15% y 10%. Este resultado lo atribuyeron a la formación de aglomeraciones de células de *P. tricornutum* al incrementar su concentración, lo cual afecta la efectividad de la PCT al romper las células porque dificulta la difusión del gas durante el proceso.

Este último comportamiento mencionado por Varona Iglesias *et al.* (s/f) era lo que se esperaba obtener en el estudio actual, ya que adicionalmente, considerando que la tasa de alimentación de gas fue constante durante los tratamientos, a medida que aumenta la concentración de biomasa, hay más células en solución. Esto significa que se difunde una menor cantidad de gas en el interior de cada célula, el cual, a su vez, generaría una menor presión interna durante la descompresión, y con ella la disrupción celular obtenida también sería menor.

5.1.2. Solubilización de proteínas

Al analizar la solubilización de proteínas, se comparó la cantidad de éstas en muestras de la biomasa con su presencia en muestras del sobrenadante. Luego de obtener los resultados, se realizó un análisis factorial para evaluar estadísticamente el efecto de los tres factores analizados durante la PCT; las probabilidades asociadas a cada uno de ellos se presentan en el cuadro V.

Cuadro V. Probabilidad asociada a los factores analizados durante la PCT de *P. tricornutum* para evaluar su efecto sobre la solubilización de proteínas, obtenida a través de un ANOVA factorial.

| Factor | Probabilidad asociada (p) |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Número de ciclos (C) | 0,3068 |
| Tipo de gas (G) | 0,0235 ^a |
| Concentración de biomasa (Cn) | <0,0001 ^a |
| C*G | 0,9508 |
| C*Cn | 0,7503 |
| G*Cn | 0,1031 |
| C*G*Cn | 0,9549 |

^a Hay diferencias significativas asociadas al factor ($p < 0,05$).

Es importante considerar que las proteínas no se solubilizan en su totalidad debido a que algunas se encuentran embebidas en la pared celular, y como ésta es muy rígida, puede ser difícil que se liberen (Scholz *et al.*, 2014). Adicionalmente, algunas proteínas son insolubles, por lo que permanecen en el residuo luego de la centrifugación (Safi *et al.*, 2017).

Las muestras tomadas luego de someter la microalga a la PCT presentaron 0,97-4,50 mg/mL de proteínas solubles. Para *P. tricornutum*, se han reportado aproximadamente 500 mg/mL de proteínas en extractos proteicos luego de una disrupción celular utilizando homogeneización a alta presión seguida de una precipitación utilizando etanol y acetona (Grossmann *et al.*, 2019b). Esta diferencia entre el valor obtenido por los autores mencionados y el estudio actual lleva a pensar que es posible realizar operaciones posteriores a la disrupción celular para incrementar la cantidad de proteína solubilizada; en el estudio actual se optó por un cambio de pH (ver sección 5.2).

En las siguientes secciones se analiza el efecto de las tres variables analizadas sobre la solubilización proteica: número de ciclos, tipo de gas y la concentración de biomasa. Como se presentó en el cuadro V, solo el gas de compresión y la concentración de biomasa fueron factores que provocaron un efecto significativo en la cantidad de proteína solubilizada en las muestras ($p < 0,05$). En cambio, el número de ciclos y las interacciones entre los factores no provocaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

5.1.2.1. Efecto del número de ciclos sobre la solubilización de proteínas

En la figura 7 se presenta la comparación de la solubilización proteica obtenida luego de uno y dos ciclos de la PCT.

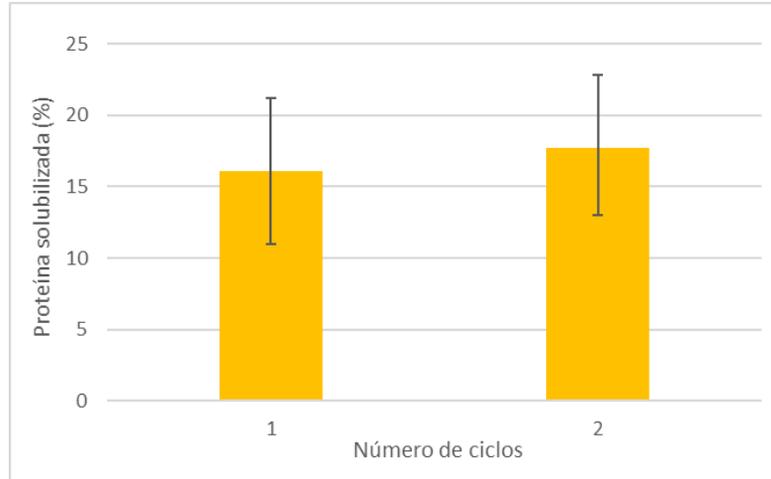


Figura 7. Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a uno y dos ciclos de la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar.

Como se observa en la figura 7 y se mencionó anteriormente, el número de ciclos no provocó diferencias significativas en la solubilización de proteínas ($p=0,3068$). En forma contrastante, Varona Iglesias *et al.* (s/f) reportaron que la extracción de proteínas aumentaba casi al doble al someter a *P. tricornutum* a un segundo ciclo de PCT y llegaba a casi un 100% con un tercer ciclo. Ursu *et al.* (2014) también reportaron un incremento en la solubilización proteica al aumentar el número de ciclos durante el tratamiento de *C. vulgaris* por un disruptor celular que trabaja con presiones de (1 y 2,7) kbar.

De acuerdo con lo presentado en el cuadro IV, se esperaba que el número de ciclos tuviera un efecto significativo sobre la solubilización proteica, ya que la ruptura celular aumentó con el número de ciclos. Entonces, se había planteado la hipótesis de que la ruptura celular también contribuyera a liberar más proteínas solubles. No obstante, al romper más células, incrementa la cantidad de fragmentos celulares en suspensión. Esto implica que también es posible que, aunque se liberen más proteínas, éstas pueden interactuar con esos fragmentos celulares y precipitar con el residuo luego de la centrifugación (Liu *et al.*, 2021). Debido a la metodología seguida para determinar el porcentaje de proteínas solubles (ver sección 4.8.3), aquellas que permanezcan en el residuo no son cuantificadas. Por lo tanto, aunque se rompieron más células después de un segundo ciclo a través de la PCT, si se busca aumentar el contenido de proteínas solubilizadas se debe recurrir a otras técnicas. En este caso, se utilizó el cambio de pH, cuyos resultados pueden observarse en la sección 5.2.

5.1.2.2. Efecto del tipo de gas sobre la solubilización de proteínas

En la figura 8, se presenta la comparación entre los resultados obtenidos con los dos gases utilizados durante la PCT.

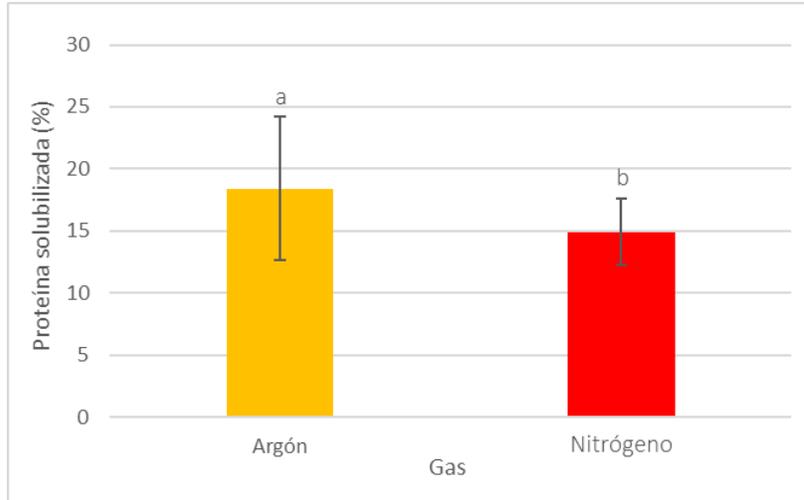


Figura 8. Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter a *P. tricornutum* a la PCT variando el gas de compresión. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados.

El uso de argón como gas de compresión permitió obtener significativamente más proteínas solubilizadas en comparación con el nitrógeno ($p = 0,0235$). Este resultado coincide con lo reportado por Varona Iglesias *et al.* (s/f), en cuyo estudio recuperaron aproximadamente un 6% más de proteínas de *P. tricornutum* luego de una PCT usando argón, en comparación con nitrógeno.

El resultado concuerda con lo esperado, ya que, como se mencionó previamente, el argón tiene una mayor solubilidad que el nitrógeno (Unternehmensberatung Babel, s/f), lo que debería conducir a una disrupción celular mayor, que a su vez facilita la liberación de proteínas intracelulares. Sin embargo, como se comentó anteriormente (secciones 5.1.1.2 y 5.1.1.3), este efecto no fue evidente al analizar las muestras con el microscopio debido a una interacción con el factor concentración de biomasa.

5.1.2.3. Efecto de la concentración de biomasa sobre la solubilización de proteínas

En la figura 9 se encuentra la comparación de la solubilización proteica obtenida al modificar la concentración de la biomasa sometida a la PCT.

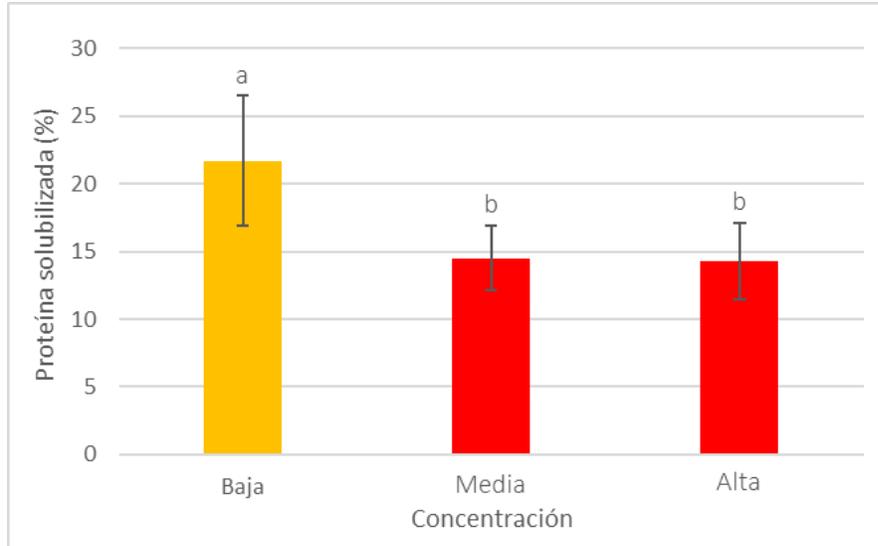


Figura 9. Porcentaje de proteína solubilizada promedio obtenida al someter distintas concentraciones (baja: 2,24-2,76%; media: 4,85-4,93%; alta: 6,95-7,49%) de *P. tricornutum* a la PCT. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos analizados.

Utilizar una concentración de biomasa baja permitió obtener significativamente ($p < 0,0001$) un mayor porcentaje de proteína solubilizada. Esto lleva a pensar que la concentración de biomasa afecta a la cantidad de proteína que se desprende de las células durante la PCT. Lo anterior podría relacionarse con que al haber una mayor concentración, hay una menor cantidad de gas que entra en cada célula durante la compresión. Con ella, se reduce la presión ejercida por el gas durante la descompresión, lo que lleva a un menor rompimiento de las células y con éste, una menor salida de proteínas. No obstante, según lo mencionado durante el análisis de la disrupción celular, se observó una interacción entre los factores concentración de biomasa y tipo de gas, y no pudo identificarse una tendencia clara para ninguno de los dos gases.

Otro factor que pudo haber causado una menor cantidad de proteína solubilizada es el incremento de la viscosidad. Al aumentar la concentración de la biomasa en suspensión, también se eleva la viscosidad de la misma, especialmente por una mayor presencia de fragmentos celulares luego de la disrupción. Cuando la viscosidad es mayor, se limita la solubilización proteica, lo cual ocurre debido a las interacciones entre las proteínas y el material suspendido. Esta interacción provoca que, durante la centrifugación, las proteínas migren al residuo (Liu *et al.*, 2021). Por lo tanto, aunque la PCT podría haber liberado más proteínas al incrementar la concentración de la biomasa, éstas fueron retenidas en el residuo y no cuantificadas durante el análisis de Lowry al medir proteínas.

5.1.3. Selección de las condiciones óptimas

Para seleccionar las condiciones de la PCT a emplear en las siguientes secciones, se analizaron los resultados obtenidos para la disrupción celular y la

solubilización proteica. En el caso de la primera, es difícil seleccionar un único tratamiento (ver figuras 5 y 6), lo que puede relacionarse con la alta variación en la disrupción celular de ciertas muestras, especialmente de la muestra con una concentración de 7,49% tratada con un ciclo de nitrógeno. Para reducir esta desviación, se recomendaría aumentar el número de repeticiones. Esto permitiría identificar aquellos valores atípicos y, si fuera necesario, eliminarlos antes de realizar el análisis estadístico. Debido a una baja cantidad de repeticiones, relacionadas con el uso de muchos recursos para llevar a cabo los experimentos, no se puede asegurar a qué se debe la desviación en los resultados. No obstante, en casi todos los tratamientos, la desviación de la disrupción celular es mayor en el primer ciclo (ver cuadro IX en anexos). Esto podría indicar una falta de estandarización de las condiciones del tratamiento, asociada al mayor volumen de biomasa tratada, ya que, al llevar a cabo el segundo ciclo, se trató aproximadamente la mitad de la biomasa sometida durante el primer ciclo. Esta posible fuente de variación es intrínseca a la toma de muestra necesaria para llevar a cabo análisis posteriores descrita en la sección 4.4. Cabe aclarar que si la PCT se empleara industrialmente, no se observaría esta diferencia entre los ciclos, ya que si se llevaran a cabo dos ciclos, toda la biomasa tratada con el primero se sometería de igual forma al segundo.

Cabe mencionar que se mantuvo un riguroso control sobre los parámetros de proceso, incluyendo la presión, la temperatura, el flujo de gas y el flujo de biomasa en distintos puntos del equipo durante la PCT. Por lo tanto, no se esperaba obtener una variación tan alta en los parámetros de disrupción celular. Aun así, no se observó ninguna tendencia relacionada con ella como para encontrar la fuente de variación.

En los resultados presentados en la figura 6, no se observó una tendencia muy clara. En el caso del argón, parece más ventajoso emplear una concentración de 2,24%. Aunque la disrupción obtenida parece ser comparable con la resultante al usar 6,95%, se logran romper más células que utilizando 4,93%. Por otro lado, en el caso del nitrógeno, se obtienen resultados similares con las tres concentraciones, por lo que se recomendaría emplear la biomasa más concentrada con el objetivo de reducir el tiempo de proceso. Sin importar el gas de compresión utilizado, para ambos se seleccionaría llevar a cabo dos ciclos para maximizar la disrupción celular (ver figura 5).

Por otro lado, para la solubilización proteica no se vio la influencia del número de ciclos (ver figura 7), mientras que es evidente que el uso de argón como gas de compresión y bajas concentraciones de *P. tricornutum* permiten obtener la mayor cantidad de proteínas solubilizadas (ver figuras 8 y 9).

Al analizar la solubilización de proteínas, también se vuelve importante la difusividad. Esta propiedad se refiere a la facilidad con que las moléculas salen de las células al difundirse a través de la membrana. Puede ocurrir que, aunque las células estén rotas, la liberación de ciertas moléculas se dificulte debido a su baja difusividad. Esta propiedad depende del método de disrupción utilizado, donde factores como la velocidad de disrupción son importantes para garantizar una buena difusividad. Aunque se ha reportado que la difusividad no se comporta de la misma forma que la disrupción celular (Safi *et al.*, 2015), al emplear argón, utilizar la concentración más baja permitió maximizar tanto la disrupción celular como la proteína solubilizada. Este comportamiento

puede deberse a la rápida disrupción que ocurre durante la PCT debido al paso de la biomasa comprimida a través de la válvula de descompresión, la cual promueve la difusividad de las proteínas (Safi *et al.*, 2015).

Si el único objetivo fuera maximizar la cantidad de proteína soluble extraída de *P. tricornutum*, se recomendaría utilizar un ciclo de argón como gas de compresión para tratar una biomasa con una concentración de 2,24%. Esto porque realizar un segundo ciclo no produce cambios significativos en la solubilización proteica, mas sí utiliza una mayor cantidad de recursos. En el presente estudio, considerando también los resultados obtenidos durante el análisis de la disrupción celular (sección 5.1.1), se optó por continuar la investigación con la muestra de 2,24% sometida a dos ciclos de PCT usando argón.

Aun así, considerando que la mayor solubilización proteica obtenida se encuentra alrededor del 26%, se procedió a realizar un cambio de pH con el objetivo de incrementar este valor. La modificación de las condiciones de acidez podría ayudar a solubilizar ciertas proteínas que no logran solubilizarse luego de la disrupción celular, tales como las que se encuentran embebidas en la pared celular (Scholz *et al.*, 2014), como las que son naturalmente insolubles (Safi *et al.*, 2017).

5.2. Efecto del cambio de pH para la extracción de proteínas solubles

Luego de la disrupción celular por medio de la PCT y la cuantificación de su solubilidad proteica, se procedió a analizar el cambio de pH, con el fin de solubilizar una mayor cantidad de proteínas. Este cambio se realizó en la biomasa con una concentración de 2,24% luego de dos ciclos en la PCT utilizando argón como gas de compresión. Esta muestra fue seleccionada para determinar el efecto del pH sobre la concentración de proteínas solubles para su extracción, debido a los resultados obtenidos al analizar la disrupción celular y la solubilización proteica (ver sección 5.1.3).

5.2.1. Pruebas preliminares para la determinación de las condiciones de temperatura para el cambio de pH

Con el fin de definir las mejores condiciones de temperatura y pH para la extracción de proteínas en la biomasa de la microalga, se realizaron las pruebas preliminares, variando la biomasa a tres valores de pH (nativo, 8,85 y 12) y a tres temperaturas (4°C, 24,5°C y 45°C). Al obtener los resultados, se realizó un análisis factorial para evaluar estadísticamente el efecto de ambos factores (pH y temperatura); las probabilidades asociadas a cada uno de ellos se presentan en el cuadro VI. Posteriormente, en la figura 10, se presenta la comparación de las distintas condiciones de cambio de pH sobre la concentración relativa de proteína solubilizada.

Cuadro VI. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis del cambio de pH a distintas temperaturas de la biomasa de *P. tricornutum* con una concentración de 2,24% luego de dos ciclos de la PCT utilizando argón como gas de compresión, obtenida a través de un ANOVA factorial.

| Factor | Probabilidad asociada (p) |
|----------------|---------------------------|
| Temperatura | 0,0014 ^a |
| pH | <0,0001 ^a |
| Temperatura*pH | 0,0053 ^a |

^a Hay diferencias significativas asociadas al factor ($p < 0,05$).

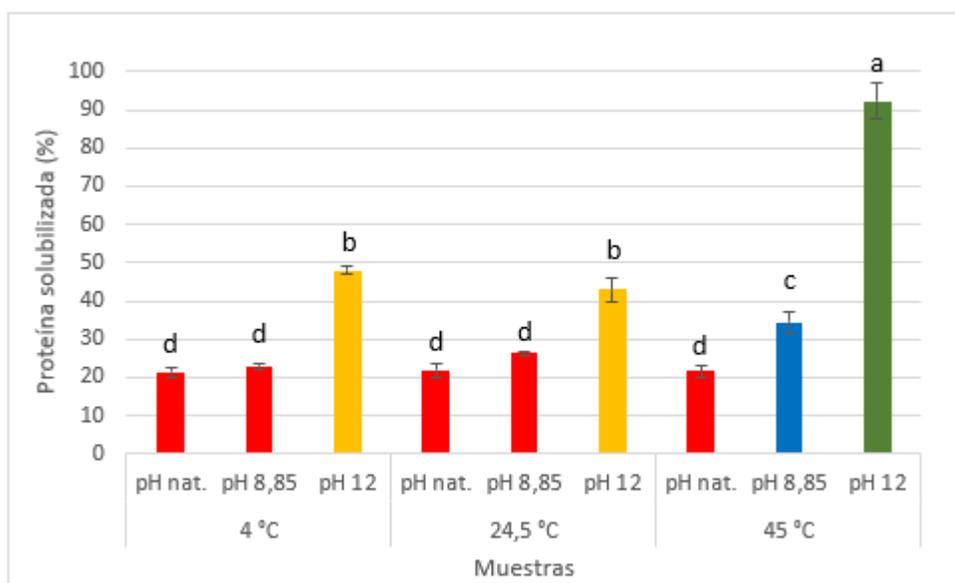


Figura 10. Evaluación del efecto del cambio de pH a distintas temperaturas sobre la solubilización proteica de la biomasa de 2,24% de *P. tricornutum* luego de dos ciclos de PCT, utilizando argón como gas de compresión. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) para los distintos pH y temperaturas analizadas.

Como se muestra en la figura 10, someter la biomasa a pH 12 permitió obtener la mayor solubilidad proteica, siendo ésta de un 47,9%, 43,1% y 92,2% para las temperaturas de 4°C, 24,5°C y 45°C, respectivamente. Aunque se buscaba maximizar este resultado, es importante considerar que al aumentar la temperatura o alcanzar valores extremos de pH, las proteínas pueden desnaturalizarse. Adicionalmente, la extracción resultante de las altas temperaturas (alrededor de 60°C) puede causar que la desnaturalización proteica sea irreversible, lo que evita que la proteína regrese a su conformación original (Palmer y Wingfield, 2004). Ésta impacta los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas en la estabilización de las proteínas con los carbohidratos y en la conformación, afectando sus propiedades tecnofuncionales (Castro-Ferreira *et al.*,

2022). Este hecho es especialmente importante considerando que los extractos analizados no se purificaron. Adicionalmente, la desnaturalización disminuye la solubilidad proteica en comparación con la proteína nativa (Pelegrine y Gasparetto, 2005), lo cual es indeseable para este estudio.

Debido a las repercusiones negativas mencionadas en el párrafo anterior relacionadas con las altas temperaturas y la desnaturalización de proteínas, se decidió evaluar una temperatura moderada, ya que podría incrementar la solubilidad de las proteínas durante la extracción sin provocar los efectos negativos indicados. Además, se evaluaron las propiedades tecnofuncionales de estas proteínas, las cuales no se vieron afectadas por el uso de la temperatura más elevada (ver cuadros XII, XIII y XIV en anexos).

A pesar de contener la mayor cantidad relativa de proteína soluble, la muestra extraída a pH 12 y 45°C presentó un olor muy fuerte. Adicionalmente, era irritante al entrar en contacto con la piel. Esto no es deseable en muestras que se están evaluando para su potencial uso en la industria alimentaria, ya que deben ser inocuas. Por lo tanto, para evitar la desnaturalización de proteínas y tomando en consideración la inocuidad de los extractos, la energía utilizada para mantener la temperatura de los baños de agua donde se encontraban las muestras y que no se vieron diferencias significativas entre 4°C y 24,5°C, se optó por seguir trabajando a 24,5°C para el resto del análisis de cambio de pH.

Con respecto al pH, es importante considerar el punto isoeléctrico, donde las cargas de las proteínas se cancelan y se minimiza la interacción con el agua, por lo que son más insolubles (Cavonius *et al.*, 2015). A pH 4 es donde la solubilidad del nitrógeno (la cual se relaciona inversamente con la agregación de las proteínas) de la harina desengrasada de *P. tricornutum*, es la mínima (Chronakis y Madsen, 2011). Debido a ello, fue que se escogieron valores superiores de pH para realizar la extracción, con el fin de no estar en el punto isoeléctrico donde todas las proteínas iban a quedar retenidas en el residuo.

Por otro lado, la selección de los pH alcalinos se tomó debido a que a mayores valores de pH, aumenta la solubilidad de las proteínas, ya que favorecen las cargas netas negativas en las mismas, lo cual hace que se incremente la repulsión electrostática entre las moléculas. También, aumenta la interacción de éstas con el agua, por lo que se da la hidratación de los residuos con carga (Cavonius *et al.*, 2015; Massia *et al.*, 2018). Sin embargo, para los análisis de la sección 5.2.2, se optó por sustituir el pH de 8,85 por pH 10, con el fin de solubilizar una mayor cantidad proteica sin alcanzar pH tan altos.

Por último, considerando que se empleó NaOH para controlar el pH de las biomásas, se decidió realizar la re-extracción del residuo para recuperar las proteínas que hubieran quedado posiblemente retenidas debido a la floculación ya que, como lo mencionan Rojo-Cebreros *et al.* (2016), esta base es utilizada en la floculación de microalgas, debido a que alcalinizar la biomasa desestabiliza la carga superficial de las células, hace que se aglomeren y floculen.

5.2.2. Contenido proteico del extracto luego del cambio de pH a la biomasa y los residuos

En la figura 11, se presentan los resultados obtenidos al cuantificar la proteína solubilizada de las fracciones luego del cambio de pH de la muestra con 2,24% de biomasa después de someterla a dos ciclos de PCT utilizando argón como gas de compresión, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.5, con el fin de extraer una mayor cantidad de proteínas solubles. Se calculó el porcentaje de proteína solubilizada como se detalla en la sección 4.8.3. y 4.8.3.1, comparando la proteína total de la biomasa con la presente en los sobrenadantes de las fracciones.

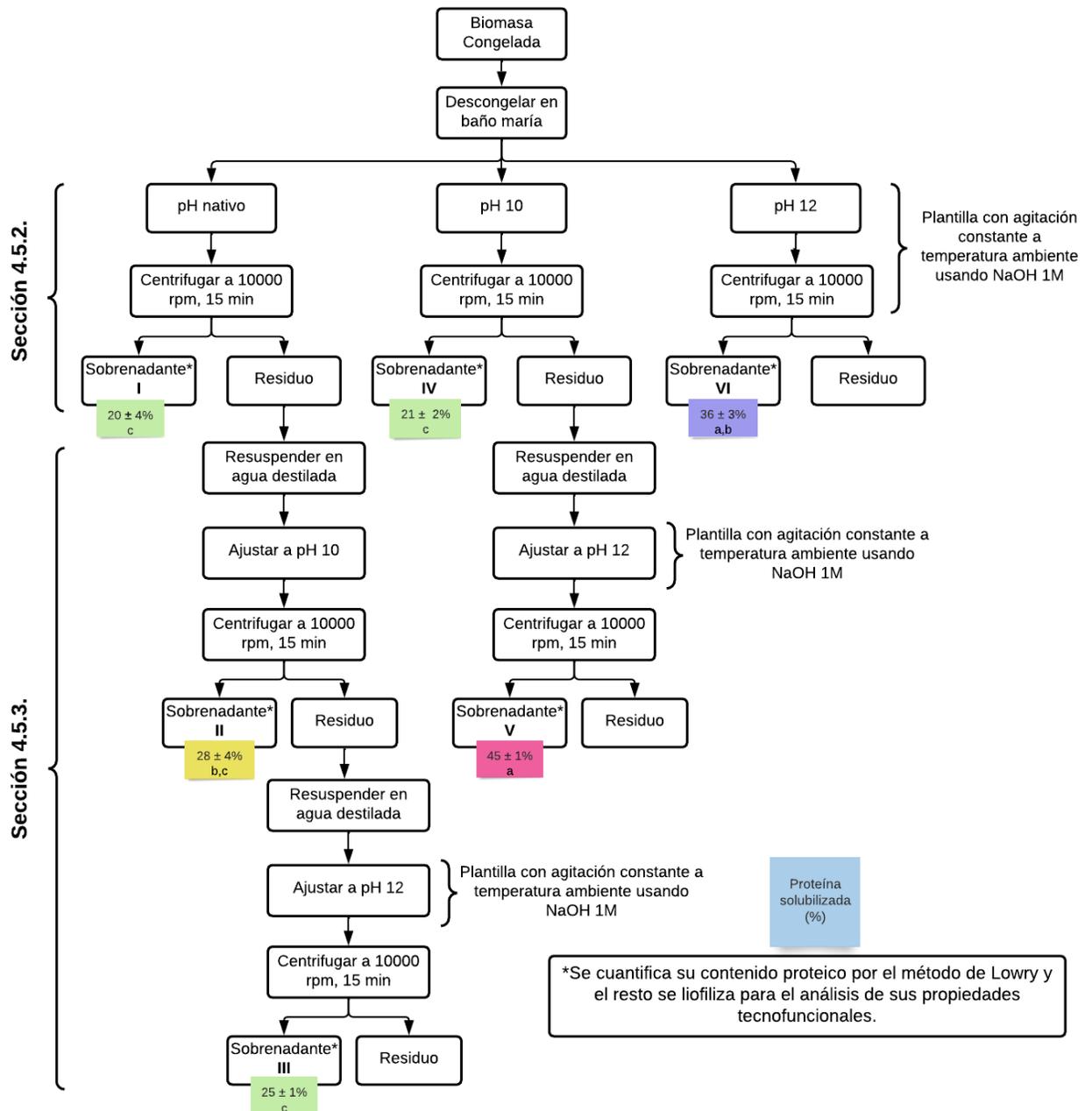


Figura 11. Esquema del procedimiento seguido para evaluar el efecto del cambio de pH en la muestra de biomasa de *P. tricornutum* al 2,24%, luego de dos ciclos de la PCT usando argón como gas de compresión, y los porcentajes de proteína solubilizada obtenidos para cada muestra. Los números romanos identifican las muestras. En las anotaciones se presenta la cantidad de proteína solubilizada promedio con respecto a la proteína total en cada muestra junto con su desviación estándar. Los distintos colores de las anotaciones y las letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

5.2.2.1. Efecto del pH alcalino sobre las proteínas

Tal como se muestra en la figura 11, se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína solubilizada entre las muestras analizadas ($p=0,0005$) durante la evaluación del efecto del cambio de pH. Lo anterior se evidenció en los resultados, donde al utilizar el pH 12, se obtuvo un contenido significativamente mayor de proteína solubilizada, como se puede observar para las muestras V y VI, lo cual era lo esperado según lo que se mencionó en la sección 5.2.1. Soto-Sierra *et al.* (2018) también reportaron que la solubilidad proteica de los concentrados de proteína de las algas es mayor en condiciones de pH alcalinos que neutrales, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, con excepción de la muestra III. Lo anterior se analiza con mayor detalle en la sección 5.2.2.2.

En un estudio realizado por Grossmann *et al.* (2019b) se analizó la solubilidad de la fracción proteica de la microalga *P. tricornutum* que precipita luego de centrifugar la biomasa sometida a una disrupción celular. Se reportó que a pH 12 su solubilidad fue mayor, mientras que a valores de pH menores hubo una fuerte agregación y una baja solubilidad. Esto lo relacionaron con la reducción en la repulsión electrostática, lo cual incrementa las interacciones proteína-proteína y favorece la hidrofobicidad de las mismas. Lo anterior se ve reflejado en los extractos V y VI en comparación con la muestra I, la cual se encontraba a pH nativo.

Por otro lado, en vez de solubilizarse, las proteínas pueden formar aglomerados y flocular. La floculación de proteínas ocurre cuando los agentes altamente alcalinos incrementan el pH y desestabilizan su carga superficial (Rojo-Cebreros *et al.*, 2016), provocando que se puedan encontrar en el residuo, razón por la cual es importante recuperar esas proteínas. Esto se explicará con mayor detalle en la sección 5.2.2.2.

Cabe destacar que al utilizar valores de pH más elevados, la proteína se podría ver afectada. Lee *et al.* (2007) reportaron que la calidad de las proteínas disminuyó al aumentar el pH, puesto que la estructura de la proteína se desnaturaliza conforme el pH se aleja del punto isoeléctrico de la misma. También, en el mismo estudio indicaron que condiciones severas (alto pH y temperatura) deterioran la calidad de las proteínas. Por lo tanto, a pesar del incremento en la solubilidad proteica, es importante verificar su calidad por medio de las pruebas tecnofuncionales. Éstas se evaluaron en la sección 5.3.

5.2.2.2. Efecto de la resuspensión del residuo sobre las proteínas

De acuerdo a lo obtenido (ver figura 11), la muestra con la mayor cantidad de proteína solubilizada fue la V. Modificar las condiciones del solvente, como lo es alterar el pH de la disolución, favorece que las proteínas presenten cambios en su solubilidad y es útil para su purificación (Burgess, 2009). Para la muestra V, la resuspensión del residuo se realizó únicamente una vez, teniendo la oportunidad de extraer las proteínas que habían precipitado previamente. Sin embargo, la muestra III presentó una menor cantidad de proteína luego de la segunda resuspensión. Esto se puede deber a que en esa muestra ya se había realizado la extracción dos veces, por lo que las proteínas pudieron haberse separado previamente y no haber tantas remanentes para la tercera extracción.

Como se mencionó previamente, el utilizar NaOH para tratar las muestras puede ocasionar que las proteínas floculen o precipiten, debido a que este agente alcalino

participa en la floculación de las mismas o puede alcanzar también el punto isoeléctrico favoreciendo su precipitación (Cavonius *et al.*, 2015; Rojo-Cebreros *et al.*, 2016). Esa base anteriormente ha sido utilizada en la producción de concentrados de microalgas debido a estas características. Al observar los resultados obtenidos, es posible que las proteínas hayan presentado cierto grado de floculación luego de utilizar el NaOH para incrementar el pH, lo que hace que se retengan en el residuo y no se solubilizan. Cabe destacar que la floculación depende de distintos factores, como las características propias de las proteínas, la cantidad de agente floculante, el tiempo de exposición, la concentración celular y el tipo de microalga (Rojo-Cebreros *et al.*, 2016). Por lo tanto, al cambiar las condiciones de extracción de las proteínas, la floculación se pudo presentar en algunas muestras y en otras no.

Tomando en cuenta lo anterior, para la muestra IV, se requiere una mayor cantidad de base para pasar de pH nativo a pH 10, lo cual puede implicar un mayor tiempo de exposición con el agente floculante y además, debe terminar el efecto tampón provocado por las proteínas para poder incrementar el pH. Al haber un mayor tiempo de exposición, las proteínas son más susceptibles a la floculación. Por otro lado, al resuspender el residuo y ajustar el pH a 12, como se hizo con la muestra V, no se requiere de tanta cantidad de NaOH y el tiempo de exposición es menor, lo que favorece que las proteínas no se retengan en el residuo y se solubilice una mayor cantidad.

5.2.2.3. Parámetros importantes sobre la solubilidad de las proteínas

Se ha evidenciado que modificar el pH de la biomasa y la concentración de sal antes de someterla a la PCT, puede incrementar la solubilidad de las proteínas. Como lo indican Tanger *et al.* (2020), la solubilidad de las proteínas se puede aumentar al agregar sal a la biomasa. También mencionan que en estudios pasados se evidenció que el método de extracción de proteínas con sal puede disminuir el grado de desnaturalización proteica en la proteína proveniente de harina de arvejas.

Tanger *et al.* (2020) obtuvieron un mayor rendimiento al realizar la extracción alcalina y en segundo lugar, con la extracción salina. Además, Soto-Sierra *et al.* (2018) mencionan que la extracción de proteínas se maximiza cuando la disrupción celular se realiza bajo condiciones alcalinas (pH 8-10). Por ende, previo a someter la biomasa a la PCT, se podría ajustar su pH a valores más alcalinos con el fin de obtener una mayor cantidad de proteínas luego de la disrupción. También, Khosravi-Darani *et al.* (2004) reportaron que el pretratamiento con 0,4% m/m de NaOH a las células de la bacteria *Ralstonia eutropha* permitió una disrupción celular completa al someterla un par de veces al cambio de presión utilizando CO₂ supercrítico, por lo que también sería de gran interés evaluar su eficiencia en la biomasa de microalgas.

Adicionalmente, Ursu *et al.* (2014) mencionan que al incrementar el pH a 12 previo a someter a la biomasa a altas presiones fue donde se mantuvo la solubilización proteica más alta. También afirman que el tratamiento con altas presiones es extremadamente eficiente y al aumentar el número de ciclos, la solubilización proteica es incluso mayor. Por lo que, combinar tratamientos mecánicos y químicos favorece la solubilización proteica y hasta se podría llegar a solubilizar un 98% del contenido total de proteína en la microalga (Ursu *et al.*, 2014). Sin embargo, como se mencionaba en las

secciones anteriores, al incrementar el pH utilizando agentes altamente alcalinos, se podría favorecer la floculación de las proteínas. Para evitar este efecto, es importante no alcanzar el punto isoeléctrico o pH óptimo de floculación de las proteínas en las microalgas (Rojo-Cebreros *et al.*, 2016).

Otro parámetro importante a considerar es el almacenamiento de la biomasa previo a los análisis. Varona Iglesias *et al.* (s/f) establecen que el grado de disrupción celular disminuye con el tiempo de almacenamiento a 7°C. A pesar de no reportar la razón por la cual eso ocurre, sus resultados lo respaldan. Es posible que las proteínas en la biomasa se vean afectadas durante el almacenamiento, logrando un menor contenido de proteína solubilizada una vez tratada la muestra con la PCT. Considerando este efecto, se debe reflexionar sobre el almacenamiento de la biomasa y su influencia en la obtención de compuestos de interés. Por lo tanto, sería recomendable no almacenar la biomasa por un tiempo prolongado.

La biomasa fue almacenada en congelación y fue descongelada el mismo día que se realizaban los análisis. Al congelarse se forman cristales de hielo, que según su tamaño y posición, van a influir en el deterioro de la estructura de la célula vegetal. Cuando los cristales son grandes, debido a una lenta congelación, pueden penetrar la membrana celular y romperla (Millán *et al.*, 2007), favoreciendo la posible solubilización de proteínas y extrayendo otros compuestos del interior de la célula. Por lo que, para analizar únicamente el efecto de la PCT sobre la solubilidad proteica y el cambio de pH, se recomendaría no almacenar la biomasa previamente. No obstante, es una técnica para aumentar el contenido proteico extraído sin utilizar mayor cantidad de químicos y tiempo de proceso.

Por último, es importante considerar en qué estado se encuentra la muestra a analizar. Bien es claro, que en este estudio se midió la biomasa directamente, aunque en otros casos es común analizar las muestras liofilizadas. De ser así, es importante considerar el efecto que éste podría generar en la extracción de proteínas. Según Barbarino y Lourenço (2005), las muestras liofilizadas tienden a ser más difíciles de extraer. Lo anterior debido a que la liofilización es una técnica para ayudar a preservar las muestras, lo cual hace que sea más complejo la extracción de proteínas. No obstante, los autores sugieren resolver este problema homogeneizando la muestra liofilizada con un homogeneizador Potter.

Posteriormente, se analizaron distintas propiedades de los extractos, las cuales se presentan en las siguientes secciones.

5.3. Análisis de las propiedades de los extractos seleccionados

Según los resultados obtenidos para la solubilización proteica de los extractos luego de someterlos al cambio de pH (sección 5.2), se seleccionaron las muestras V y VI para continuar con su análisis. A estos dos extractos y al obtenido con las condiciones seleccionadas para la PCT (sección 5.1) se les analizó la distribución de los pesos moleculares. También, se analizaron tres propiedades tecnofuncionales. Los resultados se presentan en las secciones siguientes.

5.3.1. Electroforesis en gel

Las muestras mencionadas se analizaron por medio de electroforesis en gel. En la figura 12 se muestra el gel obtenido.

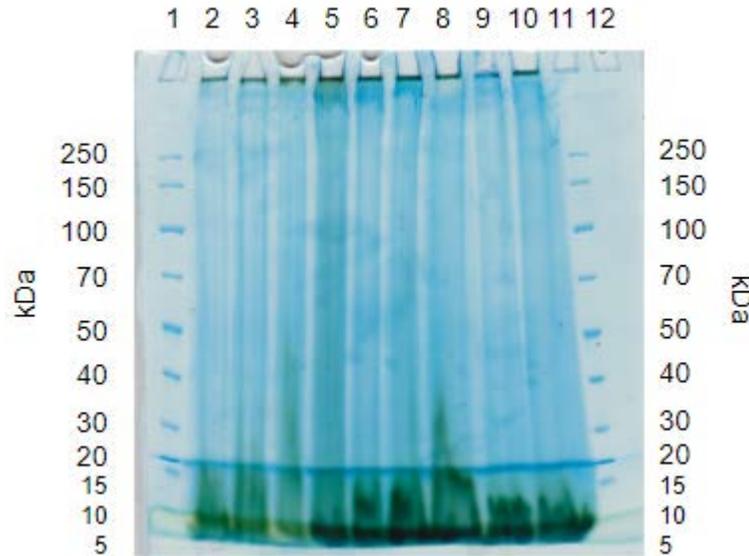


Figura 12. Distribución de los pesos moleculares de extractos de *P. tricornutum* luego de someterlos a electroforesis en gel (carriles: 1 y 11: estándar proteico (5-250 kDa). 2-4: muestra I. 5-7: muestra V. 8-10: muestra VI. 12: buffer de muestreo).

En la figura 12 es difícil distinguir bandas claras, especialmente porque los carriles están completamente teñidos. Relacionado a esto, Castro-Ferreira *et al.* (2022) también reportaron la presencia de un halo azul continuo a través del gel al analizar distintos extractos de *P. tricornutum*. Los autores asociaron este efecto a la presencia de sales en las muestras. Como los extractos analizados en el presente estudio no fueron purificados, este mismo efecto pudo haber afectado la elusión de la electroforesis.

Aun así, Castro-Ferreira *et al.* (2022) reportaron la presencia de cinco bandas definidas para distintos extractos de *P. tricornutum*: dos alrededor de 40 kDa, dos cerca de 30 kDa y una por debajo de 20 kDa. Por otro lado, Stack *et al.* (2018) mencionaron la presencia de distintas bandas, pero indicaron que eran menos claras en comparación con las de otras microalgas. Este efecto fue incluso más prominente cuando las muestras habían sido sometidas a una extracción acuosa y alcalina, similar a la realizada en los extractos analizados (muestras V y VI). Los autores atribuyeron este efecto a cantidades elevadas de carbohidratos o lípidos; estos primeros los evidenciaron debido a una banda cercana a los 100 kDa, la cual puede indicar la presencia de polisacáridos unidos a la matriz.

Debajo de 20 kDa se observa un área con color verde intenso para todas las muestras. Esta pudo haber sido provocada por los complejos de absorción de luz en la microalga estudiada, tales como fucoxantina y clorofila. Estos complejos proteicos tienen pesos moleculares de 17-23 kDa (Castro-Ferreira *et al.*, 2022; Devaki & Grossman, 1993; Stack *et al.*, 2018).

También se observa una gran cantidad de proteínas pequeñas, acumuladas en la parte superior del gel (ver figura 12). Relacionándolo con la intensidad del color, esta parece ser mayor en las dos muestras sometidas al cambio de pH (carriles del 5 al 10). Este efecto podría relacionarse con la hidrólisis parcial de las proteínas en las muestras, la cual afecta sus pesos moleculares. Lo anterior puede darse durante una larga exposición de las muestras V y VI a condiciones alcalinas (Rodríguez-Restrepo *et al.*, 2020). Este efecto podría haberse reducido al emplear buffers durante los cambios de pH, debido a que durante la extracción, el pH no se mantenía estable.

Como la mala elución de las muestras se atribuye a la insuficiente purificación de los extractos, debería considerarse la posibilidad de tratarlos con operaciones posteriores para separar a las proteínas de otros componentes de las muestras. Esto permitiría concentrar las proteínas para obtener un mejor resultado durante la electroforesis. Castro-Ferreira *et al.* (2022) lograron lo anterior usando etanol por 2 h a -20°C . Este tratamiento aumenta el contenido de carbohidratos y proteína, mientras reduce el de las sales.

Otra alternativa para purificar los extractos sería modificar el pH de los mismos hasta alcanzar el punto isoeléctrico. Ésto haría que las proteínas precipiten y podrían recuperarse luego de una centrifugación, como detallaron Cavonius *et al.* (2015), Haußmann (2019) y Ursu *et al.* (2014). Aunque este proceso se llevó a cabo como una prueba preliminar, considerando que las proteínas se vuelven insolubles, se optó por no utilizarlo, ya que el potencial industrial incrementa cuando éstas son solubles.

5.3.2. Propiedades tecnofuncionales

Las propiedades tecnofuncionales de las muestras seleccionadas liofilizadas se compararon contra tres estándares: concentrado de proteína de suero (WPC, por sus siglas en inglés), aislado de soya y clara de huevo. Éstos se seleccionaron debido a que los derivados de soya y productos animales son prevalentes en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales y tecnofuncionales (Lafarga *et al.*, 2018). Dentro de ellos, extractos de suero lácteo son unos de los estabilizantes más usados en la industria por sus propiedades emulsificantes y espumantes; estas últimas las comparten con las proteínas de huevo, debido a que ambos logran estabilizar emulsiones y espumas (Bertsch *et al.*, 2021). Por su parte, el aislado de soya se utiliza ampliamente por su alto contenido de proteínas, sabor neutral y propiedades emulsificantes (O'Flynn *et al.*, 2021).

5.3.2.1. Solubilidad

La primera propiedad tecnofuncional evaluada fue la solubilidad de los extractos, siguiendo la metodología indicada en la sección 4.8.5.1. Inicialmente, se realizó un análisis factorial para evaluar la significancia de las muestras y el pH. Las probabilidades asociadas a estos últimos se presentan en el cuadro VII. Aparte, la comparación de la solubilidad entre las muestras se presenta en la figura 13. Cabe aclarar que las condiciones de pH se utilizaron según la metodología seguida por Haußmann (2019), cuyos valores se adecúan a las condiciones de acidez más comunes en alimentos.

Cuadro VII. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis de la solubilidad de tres estándares y distintas fracciones de *P. tricornutum*, obtenidas luego de un ANOVA factorial.

| Factor | Probabilidad asociada (p) |
|------------|---------------------------|
| Muestra | <0,0001 ^a |
| pH | <0,0001 ^a |
| Muestra*pH | <0,0001 ^a |

^a Hay diferencias significativas asociadas al factor ($p < 0,05$).

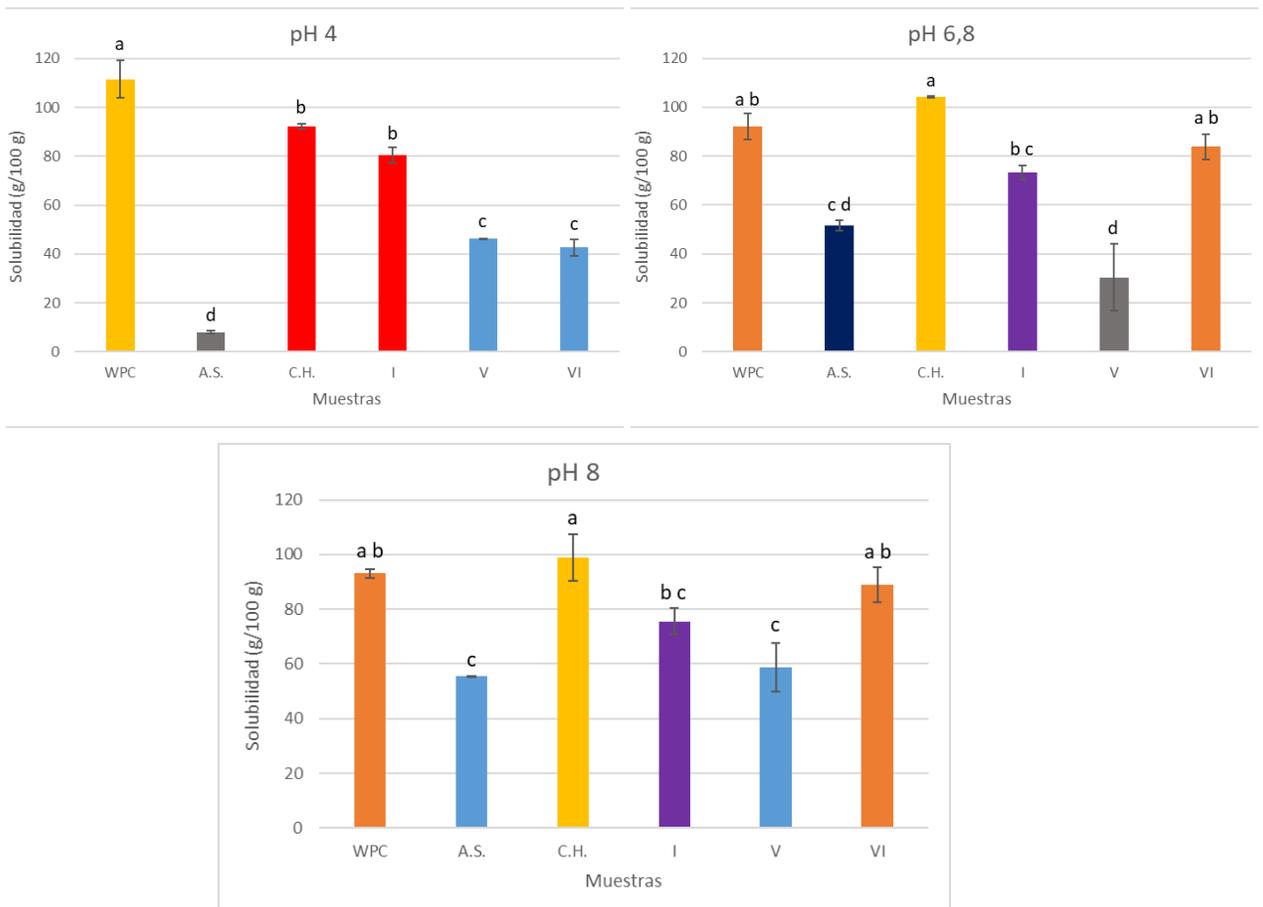


Figura 13. Promedio de la solubilidad, a tres valores de pH de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y tres muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a dos ciclos de la PCT utilizando argón como gas de compresión (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Los distintos colores de las barras y las letras indican diferencias significativas entre las proteínas solubilizadas ($p < 0,05$).

Los resultados presentados en la figura 13 muestran que en las tres condiciones de pH, al menos uno de los extractos proteicos de *P. tricornutum* presenta solubilidad comparable con mínimo uno de los dos estándares que presentaron valores mayores: el concentrado de suero lácteo y la clara de huevo. Éste es un resultado deseable, ya que en la industria alimentaria se busca emplear proteínas con altas solubilidades, especialmente en productos como bebidas, dulces, coberturas y aderezos (Benelhadj *et al.*, 2016; Garcia-Vaquero *et al.*, 2017). Aparte, esta propiedad influye sobre otras características, como la capacidad de emulsión y la formación de espumas y geles (Grossmann *et al.*, 2019b). Adicionalmente, considerando que las proteínas suelen adicionarse en polvo, sus aplicaciones en la industria dependen de su interacción con el agua, ya que deben rehidratarse antes de ser utilizadas (Guil-Guerrero *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la evaluación de esta propiedad tecnofuncional indica el potencial uso de extractos de *P. tricornutum* luego de la PCT. Sin embargo, el comportamiento de la solubilidad de cada uno de ellos ante los diferentes pH varió considerablemente. A pH 8, no hubo diferencias significativas entre la biomasa inicial y ambas muestras luego del cambio de pH. Por el contrario, a pH 4 la alcalinización de la biomasa redujo significativamente la solubilidad. En el pH intermedio, solo la muestra tratada con dos cambios de pH consecutivos presentó una solubilidad significativamente menor que la microalga inmediatamente después de la PCT. Esta variación en su comportamiento puede relacionarse con las diferencias en metodologías de extracción. Al ser aisladas en distintas condiciones, se extraen diferentes proteínas, cuyas características propias van a afectar directamente el comportamiento de la fracción.

Inicialmente, se esperaba que el cambio de pH incrementara la solubilidad proteica de la fracción. Con respecto a esto, Guil-Guerrero *et al.* (2004) evaluaron la solubilidad de la biomasa desgrasada de *P. tricornutum* a valores de pH de 2 a 12. A pH 12, donde obtuvieron el mayor valor, reportaron un 75% de solubilidad. Este resultado es comparable con lo obtenido para la muestra I y el extracto VI a los dos valores de pH mayores, aunque solo con la muestra I a pH 4.

No obstante, el cambio de pH realizado durante la extracción de las muestras mantiene o reduce la solubilidad de los extractos, lo cual se observó con las muestras VI y V, respectivamente. Por lo tanto, si se busca un extracto de *P. tricornutum* con una solubilidad comparable a proteínas utilizadas en la industria alimentaria y con valores estables a través de distintas condiciones de pH, no se recomienda realizar un cambio de pH luego de la PCT. De esta forma, se recomienda utilizar las proteínas de esta microalga a su pH nativo, el cual se encontraba entre 5,5 y 5,8.

Al observar la figura 13, se nota que algunas muestras presentaron valores superiores a 100 g/100 g. Lo anterior se debe posiblemente a limitaciones de la cuantificación proteica mediante el método de Lowry, de allí la importancia de la comparación entre estándares, ya que se puede sobrecalcular el contenido de proteínas por la presencia de interferencias. Esto mismo les ocurrió a Abdollahi y Undeland (2018) al comparar la solubilidad de proteínas de subproductos de tres pescados contra diversos estándares proteicos al emplear el método de Lowry para cuantificar proteínas.

Debido a la naturaleza del análisis de Lowry, distintas sustancias pueden interferir en la cuantificación de proteínas al aumentar la absorbancia o al inhibir la reacción de los

reactivos empleados. Lo primero provoca una sobreestimación y lo segundo, una subestimación de la proteína en la muestra (Barbarino & Lourenço, 2005).

Se han desarrollado diferentes métodos para evitar el efecto de las interferencias sobre la cuantificación. Uno de estos involucra el uso de ácido tricloroacético (Barbarino & Lourenço, 2005). Clayton *et al.* (1988) reportaron que el uso de este compuesto permite precipitar las proteínas y separarlas de otros componentes celulares. Otro beneficio de emplear este reactivo es que permite separar las proteínas de los aminoácidos libres, cuantificando solo las primeras. Por otro lado, se ha recomendado el uso de una proteína estándar presente en las muestras. Por ejemplo, Nguyen & Harvey (1994) indicaron que emplear ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa (RuDPCase) como estándar en el método de Lowry permite obtener resultados más confiables al cuantificar proteínas en algas. Los autores lo justifican argumentando que esta proteína está presente en todos los organismos fotoautótrofos y porque compone el 15% de las proteínas en los cloroplastos. Adicionalmente, debido a sus propiedades, se comporta diferente a la BSA durante el análisis de Lowry, y se indica que las proteínas en distintas algas (incluyendo una diatomea) se comportan más parecido a la RuDPCase que a la BSA (Nguyen y Harvey, 1994). Por lo tanto, se recomendaría continuar los análisis con ligeras modificaciones al método empleado durante la cuantificación proteica.

Aun así, en cuanto a los estándares analizados, las solubilidades obtenidas varían un poco con respecto a las reportadas en la literatura. Por ejemplo, para un aislado de soya, Abdollahi y Undeland (2018) reportaron las siguientes solubilidades para pH 4, 7 y 8: <5%, 25% y 50%, respectivamente, donde todos los valores son menores que el estándar analizado en el presente estudio. Estas diferencias pueden deberse a los procesos de producción utilizados para elaborarlos, así como a su composición (O'Flynn *et al.*, 2021). Las proteínas de soya tienen solubilidades muy bajas alrededor de su punto isoeléctrico (Grossmann *et al.*, 2018), así como en valores de pH cercanos al neutro. Además, se ha indicado que precisamente la principal desventaja relacionada a su uso en la industria alimentaria es su poca solubilidad, la cual aumenta en ambientes ligeramente ácidos o básicos, debido a una disociación de sus unidades (O'Flynn *et al.*, 2021). En cambio, a través de las condiciones de pH evaluadas, la solubilidad de las proteínas de *P. tricornutum*, sin ser sometidas a un cambio de pH, se mantiene bastante constante, en valores entre 70 y 80 g/100 g, lo que podría otorgarle una ventaja sobre las proteínas de soya.

Por otro lado, para proteínas de suero lácteo, Abdollahi y Undeland (2018) reportaron valores de solubilidad de aproximadamente 97% a pH 4 y 82% a pH 7 y 8, ligeramente distintos a los valores obtenidos en el presente análisis y presentados en la figura 13. Aunque el punto isoeléctrico de las proteínas de suero lácteo sea alrededor de 4,5 (Pelegri y Gasparetto, 2005), se ha reportado que éstas tienen altas solubilidades incluso alrededor de su punto isoeléctrico debido a que presentan una carga superficial alta y una hidrofobicidad superficial baja (Grossmann *et al.*, 2018). Por lo tanto, aunque los valores obtenidos para estos estándares disten ligeramente de los encontrados en la literatura, éstos muestran la tendencia esperada.

En cuanto a la clara de huevo, la solubilidad determinada fue mayor a la reportada por otros autores, los cuales obtuvieron entre 80 y 85% de solubilidad para pH 4, 7 y 8

(Abdollahi y Undeland, 2018). Esto implica que, los extractos de *P. tricornutum* igual presentan solubilidades comparables con las de este estándar proteico.

Por otra parte, como muestra el análisis estadístico presentado en el cuadro VII, el pH al que se evaluó la solubilidad también presentó un efecto significativo ($p < 0,0001$). Diversos autores han reportado la dependencia de la solubilidad de las proteínas con el pH, debido a los cambios en las interacciones de las proteínas que hacen que la solubilidad aumente con el pH luego de sobrepasar el punto isoeléctrico (Benelhadj *et al.*, 2016; Garcia-Vaquero *et al.*, 2017; Raikos *et al.*, 2014). La razón por la que se obtuvo una interacción significativa entre los factores muestra y pH ($p < 0,0001$) puede estar relacionada al punto isoeléctrico, ya que varía entre proteínas.

Para *P. tricornutum*, Grossmann *et al.* (2019b) reportaron un aumento en la solubilidad de las proteínas con el pH, donde el valor más alto se observó a pH 6. Los autores también indicaron que su comportamiento era diferente al de las proteínas utilizadas en la industria, tales como las de guisante y la caseína, debido a que en los extractos proteicos de esta microalga no se observó un único punto isoeléctrico (donde la solubilidad es igual a cero), sino un rango isoeléctrico. Lo anterior lo relacionan con una gran diversidad en las proteínas presentes en los extractos de esta microalga. Esta variedad podría justificar el comportamiento distinto que se observó para las fracciones luego del cambio de pH que se mencionó anteriormente.

Grossmann *et al.* (2018) reportaron que la alta solubilidad de extractos de esta microalga, incluso en valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico, puede deberse a una alta carga superficial y una hidrofobicidad superficial baja. Esta última genera bajas fuerzas hidrofóbicas de atracción, las cuales provocan la agregación de proteínas relacionada con el punto de menor solubilidad.

Otra posible causa de los altos valores de solubilidad obtenidos es la poca purificación que se le dio a la microalga luego de la PCT, lo que posibilita la presencia de polisacáridos en el extracto. Estos carbohidratos pueden formar complejos solubles con las proteínas, mejorando la solubilidad de las mismas (Grossmann *et al.*, 2018, 2019b).

Como se ve en los resultados presentados en la figura 13, se obtuvo una alta solubilidad para las muestras de *P. tricornutum* incluso en valores de pH bajos. Esto puede relacionarse con una alta proporción de aminoácidos hidrofílicos, los cuales aumentan las interacciones entre la proteína y el agua (Grossmann *et al.*, 2019b). Con respecto a esto, Grossmann *et al.* (2019b) reportaron un índice de hidrofiliidad mayor para los extractos solubles de esta microalga en comparación con los de *C. sorokiniana* y *N. oceanica*. Esto implica que *P. tricornutum* efectivamente presenta una alta proporción de aminoácidos hidrofílicos. Debido a esta propiedad favorable, su utilización en la industria alimentaria parece promisoría.

5.3.2.2. CRA

Posteriormente, a la muestra obtenida luego de someterla a la PCT con las condiciones seleccionadas (argón, dos ciclos y 2,24% de biomasa) y a las dos muestras elegidas luego del cambio de pH (V y VI) se les evaluó la CRA siguiendo el procedimiento indicado en la sección 4.8.5.2. Se realizó un análisis estadístico factorial para evaluar el efecto de las muestras y el pH sobre esta propiedad tecnofuncional. Las probabilidades

asociadas a estos últimos se presentan en el cuadro VIII. Además, en la figura 14 se presenta la comparación de la solubilidad entre las muestras.

Cuadro VIII. Probabilidad asociada a los factores estudiados durante el análisis de la CRA de tres estándares y distintas fracciones de *P. tricornutum*, obtenidas luego de un ANOVA factorial.

| Factor | Probabilidad asociada (p) |
|------------|---------------------------|
| Muestra | <0,0001 ^a |
| pH | 0,0712 |
| Muestra*pH | <0,0001 ^a |

^a Hay diferencias significativas asociadas al factor ($p < 0,05$).

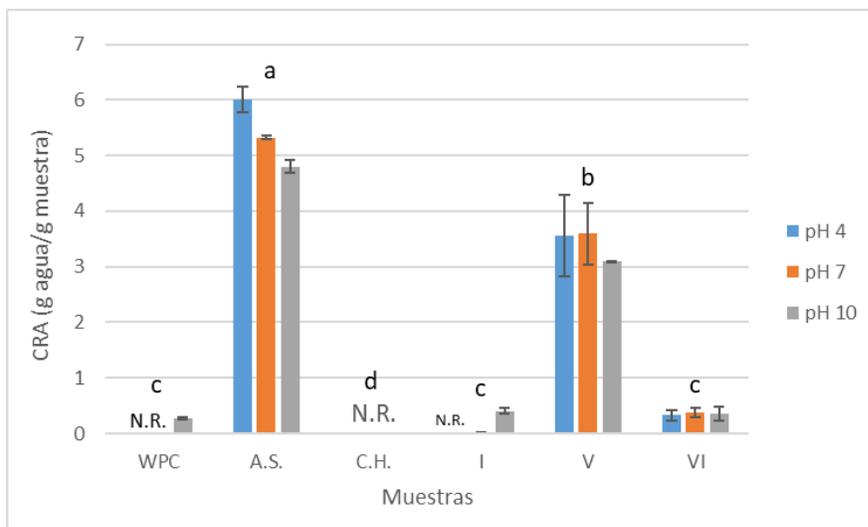


Figura 14. Promedio de la capacidad de retención de agua (CRA) a tres valores de pH de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). N.R. significa que no retiene agua. Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Como puede verse claramente en la figura 14, el aislado de soya es el estándar con la mayor capacidad de retención de agua; a éste le sigue la muestra V. Esta última podría tener una menor CRA que el estándar mencionado debido a una menor cantidad de aminoácidos polares en sus cadenas proteicas, los cuales son más afines a las moléculas de agua (Zayas, 1997). Mohsen *et al.* (2009) y Haußmann (2019) reportaron la proporción de aminoácidos por gramo de proteína para el aislado de soya y extractos proteicos de *P. tricornutum* (una fracción soluble y otra extraída alcalinamente a partir del

residuo), respectivamente. Comparando sus resultados, es claro que el aislado de soya contiene una mayor proporción de aminoácidos polares, donde resaltan los contenidos más elevados de lisina y ácido glutámico, los cuales contienen cadenas laterales iónicas que logran retener más moléculas de agua (Zayas, 1997).

Algunos de los resultados reportados al analizar esta propiedad tecnofuncional fueron negativos o iguales a cero. Éstos se reportaron en la figura 14 como N.R., ya que eso significa que las muestras no consiguieron retener agua. Lo anterior puede deberse a que las muestras analizadas se solubilizan en agua y, dado que el sobrenadante se elimina después de la centrifugación (ver sección 4.8.5.2), también se desecha cierta cantidad de la muestra. Lafarga *et al.* (2019) analizaron la CRA de tres microalgas y reportaron que *Tetraselmis* sp. lograba retener la menor cantidad de agua en comparación con las otras dos, lo cual relacionaron con su alto contenido de sales, las cuales se disolvieron en agua durante la cuantificación de esta propiedad tecnofuncional. Por su parte, Chen *et al.* (2019) mencionaron la baja solubilidad como una de las posibles razones de una CRA más elevada al estudiar el comportamiento de proteínas de tres microalgas. Lo mismo reportaron Waghmare *et al.* (2016) al analizar proteínas de la microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos para la propiedad tecnofuncional anterior y presentados en la sección 5.3.2.1, donde el aislado de soya presentó la menor solubilidad en agua (ver figura 13). Lo mismo ocurrió con la muestra V, la cual presenta una CRA más elevada, en comparación con las otras muestras, a pesar de que presentó la solubilidad más baja.

Al comparar la CRA de microalgas contra estándares, Guil-Guerrero *et al.* (2004) no reportaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la CRA de la harina de *P. tricornutum* y la de la harina de soya, cuyos valores se encuentran entre (2 y 4) g agua/g biomasa para diferentes valores de pH. Sin embargo, cabe destacar que los autores utilizaron una biomasa desgrasada, así como un método ligeramente distinto para cuantificar la CRA.

Guil-Guerrero *et al.* (2004) indicaron en el mismo estudio que la harina de *Porphyridium cruentum* presentó una CRA significativamente mayor que la harina de soya. Esto lo atribuyeron a contenidos elevados de polisacáridos capsulares en la biomasa liofilizada. El mismo comportamiento podría haberse visto para las muestras analizadas después de la PCT, considerando que la pared celular de *P. tricornutum* contiene un alto contenido de glucuronamida (Butler *et al.*, 2020) y que su biomasa se cultivó limitando la disponibilidad de nitrógeno, lo que se ha reportado que aumenta las concentraciones de los polisacáridos mencionados anteriormente en otras diatomeas (Fresnedo & Serra, 1992; Staats *et al.*, 2000). No obstante, este comportamiento todavía no ha sido analizado para *P. tricornutum*.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la CRA causadas por el pH ($p = 0,0712$). Raikos *et al.* (2014) reportaron lo mismo para harinas de distintas fuentes vegetales. En cambio, Guil-Guerrero *et al.* (2004) sí indicaron la influencia de este parámetro sobre la propiedad tecnofuncional estudiada. Su efecto podría relacionarse con la solubilidad, ya que el pH sí afecta esta última propiedad (Benelhadj *et al.*, 2016; Garcia-Vaquero *et al.*, 2017; Raikos *et al.*, 2014). Adicionalmente, cambios de pH pueden modificar la conformación proteica, especialmente los sitios donde se dan las

interacciones con las moléculas de agua. Por lo tanto, al aumentar la polaridad y la carga proteica, también incrementa la cantidad de agua retenida (Benelhadj *et al.*, 2016). Al igual como ocurrió con la evaluación de la solubilidad (ver sección 5.3.2.1), la interacción del factor muestra con el pH sí fue significativo ($p < 0,0001$), lo cual también probablemente se deba a la conformación única de las proteínas en las muestras, la cual, tal y como se ha mencionado previamente, afecta su comportamiento ante cambios en la acidez del entorno.

Es importante considerar que la PCT rompe las células, promoviendo la liberación de todos los compuestos intracelulares. Como no se realizó ningún procedimiento adicional para aislar las proteínas posterior al cambio de pH, las propiedades tecnofuncionales caracterizan la fracción, y no únicamente a las proteínas extraídas. Entonces, otros componentes, como polisacáridos y carbohidratos, también son responsables de la CRA de los extractos (Acquah *et al.*, 2021; Devi & Venkataraman, 1984). Por lo tanto, para asegurar que la CRA de los extractos se deba a la acción de las proteínas, puede ser conveniente realizar una operación que permita aislar y concentrar a las proteínas; aunado a esto, se ha reportado que aumentar la concentración proteica podría incrementar la CRA (Raikos *et al.*, 2014). La ultra o la diafiltración podrían ser útiles para lograr lo anterior (Safi *et al.*, 2017).

Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos y presentados en la figura 14, se recomendaría tratar a *P. tricornutum* con PCT usando las condiciones seleccionadas y dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12 para obtener un extracto que funcione como una alternativa a las proteínas actualmente utilizadas en alimentos para retener agua.

Aun así, para emplear extractos proteicos de *P. tricornutum* en la industria alimentaria será importante considerar la aplicación objetivo. Esto porque un extracto con una CRA alta tendrá una baja solubilidad proteica. En ciertos productos alimenticios, como bebidas, crema batida (*whipped toppings*), aderezos y confites, se busca que las proteínas tengan una alta solubilidad (Chandi & Sogi, 2007). Además, una alta solubilidad puede ser deseable en alimentos donde los extractos proteicos tengan funciones emulsificantes o gelificantes, debido al impacto de la solubilidad sobre estas otras dos propiedades tecnofuncionales (Grossmann *et al.*, 2019b). No obstante, hay que tomar en cuenta que cuando las proteínas tienen bajas CRA, éstas pueden ser más sensibles a la humedad durante el almacenamiento (Haque *et al.*, 2016). Por otro lado, los extractos que tengan valores de CRA más elevados, podrán emplearse en productos como productos horneados y cárnicos por su efecto en la textura de los mismos, y en otros como sopas y salsas, debido a su capacidad de espesarlos (Acquah *et al.*, 2021).

Relacionado con lo anterior, también podría evaluarse la posibilidad de combinar un extracto con una alta solubilidad con uno que tenga una CRA elevada. Esto podría proveer una fracción con valores intermedios en ambas propiedades. No obstante, la investigación de Guidi *et al.* (2022) reportó que, al combinar proteínas vegetales con distintas propiedades se obtienen mezclas con mejores, iguales o peores características tecnofuncionales que aquellas de los extractos originales.

5.3.2.3. AE

La siguiente prueba tecnofuncional analizada fue la AE. En la figura 15 se presentan los resultados de esta propiedad tecnofuncional de los extractos seleccionados, las muestras de Ar 2,5%, V y VI, y los estándares analizados.

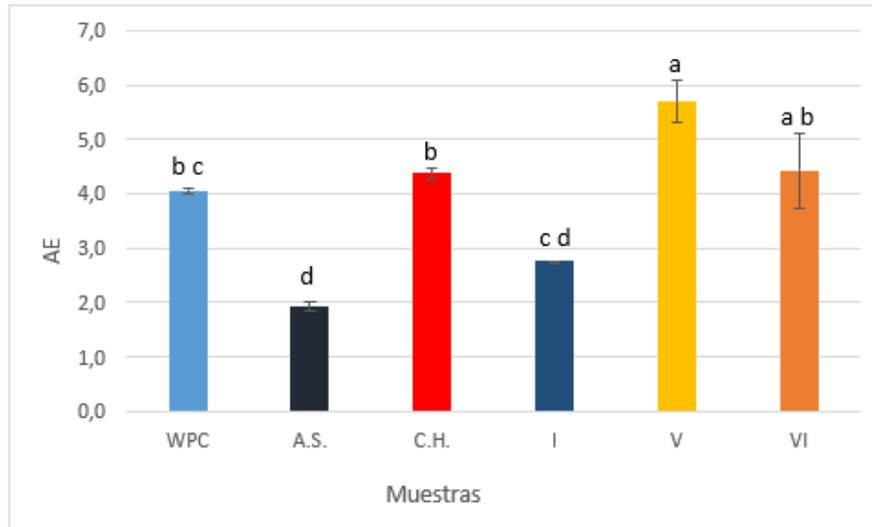


Figura 15. Promedio de la AE a pH 7,0 de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Colores y letras distintos en las barras indican las diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

La AE indica la máxima cantidad de aceite que las proteínas pueden emulsificar (Padial-Domínguez *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en cuanto a la AE presentaron diferencias significativas entre las muestras analizadas ($p < 0,0001$). En la figura 15 se observa que la muestra V tuvo diferencias significativas con todos los estándares demostrando una mayor AE, y esta misma muestra y la VI presentaron mejores resultados que el estándar de aislado de soya. Según los resultados, las fracciones luego del ajuste de pH (V, VI) lograron emulsificar una mayor cantidad de aceite que la muestra sin ajustar (Ar 2,5%), lo cual significa que tienen la capacidad de estabilizar la interface entre el aceite y el agua (Schwenzfeier *et al.*, 2013). Ésto debido a que a valores de pH superiores al punto isoeléctrico de la proteína generan interacciones entre ella y los polisacáridos, los cuales presentan cargas opuestas, formando complejos coacervados, facilitando la emulsión de aceite en agua (Calero *et al.*, 2013; Sánchez, 2020).

El pH tiene un papel muy importante en la formación de estos complejos puesto que favorece la ionización de los grupos funcionales e influye en la interacción electrostática entre los compuestos cargados (Sánchez, 2020). Según Sánchez (2020), la unión de las macromoléculas al asociarse atrapa al disolvente entre los bucles, favoreciendo la homogeneización con la fase oleosa (Calero *et al.*, 2013). Esta puede ser la razón por la cual las muestras V y VI, las cuales fueron extraídas a un pH de 12,

presentaron mejores resultados de AE. Además, según Ebert *et al.* (2019), al realizar el cambio de pH, las proteínas sufren cambios estructurales, los cuales pueden resultar en un incremento en la hidrofobicidad superficial y en cambiar el comportamiento de adsorción en la fase oleosa. También, Abdollahi y Undeland (2018) afirman lo anterior, ya que al aumentar la hidrofobicidad superficial, se aumenta la AE, lo cual se ve reflejado para las muestras V y VI en comparación con la muestra I.

Cabe destacar que las muestras analizadas no fueron purificadas previamente, por lo que contaban con distintos componentes como minerales, lípidos y polisacáridos aniónicos (Ebert *et al.*, 2019). En cambio, los estándares son aislados proteicos y presentaban un contenido proteico mayor en comparación con las muestras de microalga analizadas. El concentrado de suero lácteo contenía un 77% de proteína, seguido por la clara de huevo con 82% y el aislado de soya con 90%. Como mencionan Schwenzfeier *et al.* (2013), al formarse los complejos entre proteínas y polisacáridos se podrían combinar los atributos de emulsión de ambos compuestos, incrementando así su habilidad de emulsión.

El comportamiento descrito anteriormente se podría reflejar en los resultados de la figura 15, donde el aislado de soya, con un mayor contenido proteico tuvo la menor AE. Esto debido a que, al estar más purificada, no contaba con tantos polisacáridos para formar los complejos mencionados. En cuanto a los estándares WPC y la clara de huevo no presentaron diferencias significativas debido a su contenido proteico similar. Por otro lado, para las muestras V y VI es posible que se haya favorecido la formación de estos complejos ya que fueron sometidas a un mayor pH, en comparación con la muestra I que se encontraba a pH nativo; y cómo se mencionó anteriormente, la fuerza electrostática es la que estabiliza la formación de estos compuestos, por lo que alterar el pH y aumentar la fuerza iónica, favorece la formación y estabilidad de estos compuestos (Schwenzfeier *et al.*, 2013).

5.3.2.4. EE

Al utilizar proteínas como agentes emulsificantes, no solo es importante analizar la AE, sino también la estabilidad de la dispersión formada. Esta última es uno de los parámetros de mayor importancia en la industria alimentaria, ya que establece la vida útil de ciertos productos (Sánchez, 2020).

Como se observa en la figura 16, en esta prueba también se observaron diferencias significativas entre las muestras ($p=0,0146$). En este caso, la muestra justo después de la PCT (I) presentó una EE comparable con el estándar WPC y las muestras V y VI. Además, estas últimas muestras mencionadas no presentaron diferencias con el estándar de aislado de soya y éste no presentó diferencias con el estándar de clara de huevo.

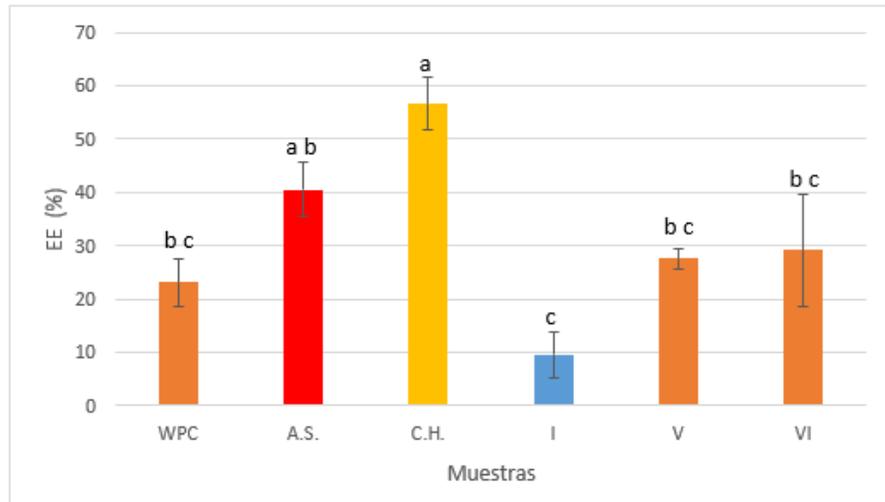


Figura 16. Promedio de la EE a pH 7,0 de tres estándares proteicos (WPC: concentrado de suero lácteo; A.S.: aislado de soya; C.H.: clara de huevo) y muestras de 2,24% de biomasa de *P. tricornutum* sometidas a la PCT a 40°C utilizando argón como gas de compresión y dos ciclos (I: pH nativo; V: obtenida luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12; VI: pH 12). Los promedios se presentan con sus respectivas desviaciones estándar. Letras distintas sobre las barras y colores indican diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

Según Haußmann (2019), las proteínas son capaces de estabilizar las emulsiones de aceite en agua, debido a su carácter anfifílico donde forman películas homogéneas con las gotas de aceite y permanecen dispersas en el agua. Además, en este estudio se menciona que la velocidad de difusión de las proteínas con el aceite afecta la eficiencia de la emulsión. Parámetros como la temperatura, el pH, el peso molecular y la fuerza iónica pueden afectar la velocidad de difusión (Haußmann, 2019). Para las muestras analizadas, variar el pH influyó en la estabilidad de la emulsión aumentándola, en comparación con la proteína nativa.

La película interfacial es la que estabiliza la emulsión al disminuir la tensión superficial (Prada & Cobos, 2021). Sin embargo, el pH de la fase acuosa puede disminuir la estabilidad e incrementar la tensión superficial (Sánchez, 2020). Sánchez (2020) indica que a pH bajo se producen emulsiones de agua en aceite y a pH alto, de aceite en agua. Por lo tanto, esto explica la obtención de mejores resultados para las muestras V y VI en comparación con la muestra I, la cual se encontraba a su pH nativo. No obstante, un estudio realizado por Ebert *et al.* (2019) indica que *P. tricornutum* contiene diversos cationes multivalentes, los cuales pueden interactuar con los grupos de carga negativa de las proteínas, especialmente a valores altos de pH, lo cual puede interrumpir la emulsión. Lo anterior no se evidenció con claridad en este estudio ya que los análisis de emulsión se realizaron utilizando un tampón de fosfatos a pH 7,0.

Ebert *et al.* (2019) mencionan que las emulsiones estabilizadas con proteínas de *P. tricornutum* son propensas a desestabilizarse a pH diferentes a 7. Esto se debe al mayor tamaño de diámetro de las partículas, lo cual disminuye la carga y la solubilidad de

las proteínas y las expone parcialmente a las gotas de aceite, ocasionando la desestabilización. Sin embargo, Padial-Domínguez *et al.* (2020) indican que a valores de pH lejanos del punto isoeléctrico de las proteínas, se presentan estabilidades de emulsión mayores. Esto se puede observar en las muestras V y VI donde presentan mejores estabilidades que la muestra I, la cual se encontraba a un pH más cercano del punto isoeléctrico de las proteínas de las microalgas, el cual ronda entre pH de 3,5 y 4,5 (Grossmann *et al.*, 2019a).

Por otro lado, para garantizar una emulsión estable, se necesitan altas cantidades de proteína de esta microalga, de al menos 3,7%, puesto que no todas son absorbidas en la interfaz y ésta es la que interactúa y retrasa la desestabilización (Ebert *et al.*, 2019). Schröder *et al.* (2017) también indican que a mayores concentraciones de la proteína (2-4%), la EE aumenta debido a un incremento ligero en la viscosidad de la fase continua. Estas razones justifican la EE más baja de la muestra I y más alta para los estándares analizados, los cuales presentaban mayores contenidos proteicos (ver sección 4.6.1) en comparación con las muestras de *P. tricornutum* analizadas.

Los resultados obtenidos de los estándares concuerdan con los presentados por Padial-Domínguez *et al.* (2020), donde el aislado de soya presenta mejor EE que el WPC. En cuanto al estándar de huevo, Prada y Cobos (2021) indican que éste es capaz de adsorberse y formar una película en la interfaz, estabilizando la emulsión. En cambio, los péptidos pequeños (<5 kDa) de las proteínas de WPC forman películas interfaciales débiles en emulsiones aceite en agua (Schröder *et al.*, 2017). Padial-Domínguez *et al.* (2020) mencionaron que péptidos grandes de proteína de alrededor de 2 kDa mejoran las propiedades emulsificantes de los hidrolizados debido a su capacidad de desenvolverse en la interfase aceite-agua. También, en su estudio indican que estos péptidos tienen residuos hidrofóbicos e hidrofílicos que interactúan con las gotas de aceite en la fase acuosa respectivamente, lo cual hace que la EE aumente debido a sus efectos estéricos.

Los comportamientos anteriores se vieron evidenciados en la figura 16 para ambos estándares, donde la clara de huevo presentó una estabilidad significativamente mayor que la del estándar WPC. Es posible que las muestras V y VI presentaran un peso molecular menor que el estándar de clara de huevo [el cual es de aproximadamente de 40 kDa (Abdollahi y Undeland, 2018)] y mayor que el de WPC, ya que para las muestras de microalgas, como se muestra en la sección 5.3.1, presentaron pesos de alrededor de 20 kDa. Ursu *et al.* (2014) lograron obtener una EE del 79% a partir de proteínas de la microalga *C. vulgaris*. Sin embargo, se indica que hubo presencia de proteínas de alto peso molecular o agregados proteicos de alrededor de 670 kDa, lo cual explica este fenómeno anteriormente analizado.

Schröder *et al.* (2017) establecen que la EE se ve influenciada por la formación de la película viscoelástica interconectada en la interfaz con el aceite y por el tamaño de la gota de aceite, donde las gotas más pequeñas forman emulsiones más estables (Sánchez, 2020). Por su parte, Ebert *et al.* (2019) indican que la EE depende de las interacciones electrostáticas y covalentes de los componentes del medio y las proteínas en la interfaz. Como se mencionó anteriormente, las muestras no fueron purificadas previo a los análisis, por lo que contenían otros compuestos que pudieron influir en la estabilidad de la emulsión.

Las emulsiones formadas con proteínas provenientes de *P. tricornutum*, como lo mencionan Schwenzfeier *et al.* (2014), permanecen estables luego de siete días de almacenamiento, por lo que sería de gran interés evaluar la estabilidad de las emulsiones obtenidas en este estudio a través del tiempo. Adicionalmente, investigaciones mencionadas por Acquah *et al.* (2021) confirman que las proteínas de las microalgas son capaces de formar emulsiones estables a cambios de pH, además de soportar altas concentraciones de sal.

5.3.3. Otras propiedades de los extractos

Además de las propiedades mencionadas hasta ahora, se observaron otras características de los extractos que deben ser tomadas en cuenta al considerar su posible uso en la industria alimentaria.

Todos los extractos presentaron aromas a pescado o marino, los cuales eran más intensos en las muestras cuyo pH se había aumentado, especialmente en aquellas tratadas a pH 12. En un principio, lo anterior se atribuye a las características intrínsecas de la microalga; no obstante, también se ha demostrado que el uso de la PCT reduce la cantidad de compuestos volátiles en jugo de piña (Vollmer *et al.*, 2021). Esto sería deseable en este caso; sin embargo, incluso luego de someter la biomasa a la PCT se percibía el aroma mencionado. Por lo tanto, se recomendaría estudiar distintos métodos que permitan reducir estos aromas. Se ha reportado que los mismos pueden ser causados por compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos pueden reducirse al darle un tratamiento a la biomasa, el cual provoque su evaporación (Fu *et al.*, 2021). Adicionalmente, podrían modificarse ciertas condiciones de cultivo para reducir la concentración de estos compuestos en la biomasa. Por ejemplo, Milovanović *et al.* (2015) reportaron que al adicionar nitrógeno en el medio de cultivo, se reducían los COV en cepas de *Nostoc* y *Anabaena*. Considerando que en el estudio actual se utilizó biomasa cultivada en condiciones de nitrógeno limitado, podría ser útil incrementar la concentración de este nutriente durante el crecimiento de *P. tricornutum*. Como se ha reportado que limitar el nitrógeno también desfavorece la producción de proteínas en esta microalga (Alipanah *et al.*, 2015), esta modificación durante el cultivo de la misma podría provocar simultáneamente una reducción de los COV y una mayor acumulación de proteínas.

Adicionalmente, los extractos liofilizados presentaban colores verdes o marrones, como puede observarse en la figura 17. Esta característica de los extractos también debe considerarse al utilizarlos en alimentos. Se ha reportado la formación de tonalidades verdes o amarillas indeseables en los alimentos a los que se les adicionan extractos de microalgas. Es difícil evitar estas coloraciones en los extractos proteicos, ya que los pigmentos suelen estar enlazados con los complejos proteicos que captan la luz, por lo que suelen coextraerse con las proteínas (Grossmann *et al.*, 2019a). Además, se ha estudiado la relación entre el color y la percepción del sabor de las personas, donde se ha indicado que las percepciones visuales (específicamente el color) pueden modificar la apreciación del sabor de los alimentos. Lo anterior se observa principalmente en la identificación de los sabores (Spence *et al.*, 2010). Por lo tanto, para evitar la modificación del color en los productos al emplear extractos de *P. tricornutum* podría ser

útil investigar sobre diferentes formas para encapsularlos o enmascararlos dentro de las formulaciones.



Figura 17. Sobrenadantes liofilizados de *P. tricornutum* luego de la PCT usando argón como gas de compresión, 2,24% de biomasa y dos ciclos, y el cambio de pH hasta 12 a 24,5°C.

Es importante destacar que durante las pruebas preliminares se sometió a la biomasa a distintas condiciones de pH (nativo, pH 10 y pH 12) y temperaturas (4, 24,5 y 45)°C, como se detalla en la sección 4.5.1. En el tratamiento más severo (pH 12 y 45° C) se observó en el residuo una coloración anaranjada, resultando el sobrenadante liofilizado en una coloración más verde en lugar de marrón (ambos se presentan en la figura 18). Lo anterior se puede atribuir a la extracción de carotenoides, los cuales, al ser liposolubles, permanecieron en el precipitado. Además, el sobrenadante liofilizado presentó un olor pungente y era corrosivo al tacto. Lo anterior debido a que, cuando la muestra entraba en contacto con la piel, provocaba irritación en esta última, así como una sensación resbalosa. Era necesario lavar con abundante agua y jabón para reducir esa sensación.



Figura 18. Fases luego de la centrifugación de una muestra de *P. tricornutum* sometida a la PCT (usando argón como gas de compresión, 2,24% de biomasa y dos ciclos) y al cambio de pH a 12 a 45°C (como se detalla en la sección 4.5.1). Izquierda: residuo. Derecha: sobrenadante liofilizado.

P. tricornutum contiene fucoxantina, la cual se puede encontrar entre 16,5 y 26,1 mg/g de materia seca (Neumann *et al.*, 2019). Este carotenoide se encuentra unido con la clorofila; este complejo presenta una absorbancia desplazada hacia las coloraciones rojizas, en longitudes de onda de 460-570 nm (Veith & Büchel, 2007). Además, las microalgas contienen entre 20 y 50% de lípidos, los cuales se podrían acumular en hasta un 80% de su peso seco bajo condiciones de estrés (Mayer *et al.*, 2019). Esta microalga contiene ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, donde el EPA es el predominante (Mayer *et al.*, 2019). Estos componentes mencionados son los que pudieron permanecer en el residuo luego de su extracción a las condiciones anteriormente indicadas. Lo anterior puede relacionarse especialmente con su hidrofobicidad, razón por la cual tienen una mayor afinidad por los restos celulares producidos por la PCT, en comparación con el agua, por lo que permanecen en el residuo después de la centrifugación (Günerken *et al.*, 2019). Con respecto a esto, Varona Iglesias *et al.* (s/f) indicaron que la mayor parte del EPA de *P. tricornutum* permanece en el residuo luego de la disrupción celular con la PCT.

Considerando lo anterior, se cuantificó la fucoxantina presente en el sobrenadante y el residuo de la biomasa de *P. tricornutum* al 5%, tratada con la PCT utilizando N₂ y Ar como gases de compresión con flujos de gas de 75 g/min y 23 g/min, respectivamente, al igual que la biomasa sin tratar, con el fin de determinar un aproximado de la cantidad de fucoxantina presente en la muestra de *P. tricornutum* luego de la disrupción celular. En la figura 19 se presentan los resultados obtenidos luego de seguir el procedimiento descrito en la sección 4.8.6. Cabe destacar que este análisis fue llevado a cabo por otra área de trabajo del Instituto Fraunhofer y no fue posible realizar un análisis estadístico, por lo que se presentan solamente los resultados finales para utilizarse únicamente con fines ilustrativos.

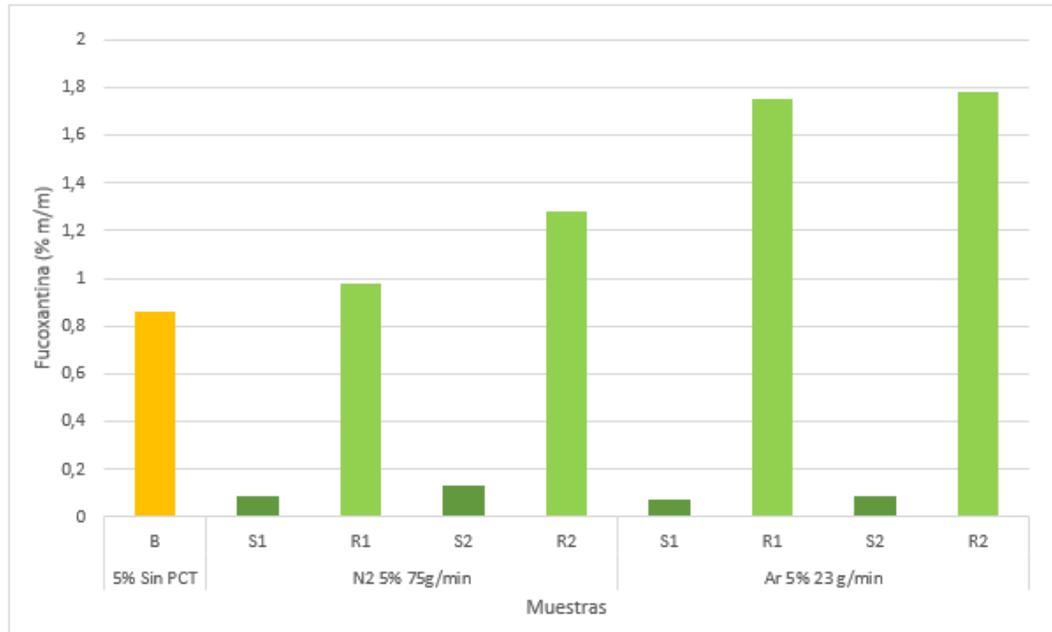


Figura 19. Contenido promedio de fucoxantina (% m/m) en una muestra al 5% de biomasa de *P. tricornutum* liofilizada antes y después de ser tratada con uno o dos ciclos de la PCT utilizando argón y nitrógeno como gases de compresión y flujos de 75 g/min y 23 g/min, respectivamente (B: biomasa, S1: sobrenadante con un ciclo en la PCT, R1: residuo con un ciclo en la PCT, S2: sobrenadante con dos ciclos en la PCT, R2: residuo con dos ciclos en la PCT). Los distintos colores de las barras hacen referencia a las fracciones utilizadas, siendo amarillo la biomasa, verde oscuro el sobrenadante y verde claro el residuo, luego de la centrifugación.

Como se observa en la figura 19, el contenido de fucoxantina fue mayor en el residuo que en el sobrenadante, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente, con respecto a su solubilidad y presencia en los extractos. Adicionalmente, estas observaciones indican la posibilidad de combinar la extracción proteica con la de otros compuestos de interés. De esta forma, podrían aprovecharse otras fracciones de la microalga y valorizarse. Un concepto similar de biorefinería ha sido evaluado por Cui *et al.* (2021), quienes estudiaron la posibilidad de extraer proteínas y ácidos grasos omega-3 de *P. tricornutum* para su uso en alimentación humana o animal.

6. CONCLUSIONES

- ❖ Al utilizar la PCT, emplear argón como gas de compresión permite extraer más proteínas solubles de la microalga *P. tricornutum* que el uso de nitrógeno, aunque no supone un incremento en la disrupción celular.
- ❖ Un aumento de la concentración de la biomasa sometida a la PCT se refleja en una menor extracción de proteínas solubles, a pesar de no provocar diferencias significativas en la disrupción celular.
- ❖ El número de ciclos no provoca diferencias significativas en la extracción de proteínas solubles, aunque sí tiene una relación positiva con la disrupción celular.
- ❖ Para maximizar la disrupción celular de *P. tricornutum* se recomienda usar dos ciclos de la PCT.
- ❖ Para extraer la mayor cantidad de proteína soluble de esta microalga utilizando la PCT se recomienda someter la biomasa con una concentración del 2,24% a un único ciclo empleando argón como gas de compresión, debido a menores costos de operación si se compara con dos ciclos empleando las mismas condiciones.
- ❖ Se utiliza una temperatura de 24,5°C para realizar el cambio de pH, ya que con esta temperatura no implica un gran gasto energético y evita que la proteína se desnaturalice más fácilmente.
- ❖ La resuspensión de las fracciones proteicas y su cambio de pH a uno más alcalino permite obtener una mayor cantidad de proteína solubilizada.
- ❖ Una segunda reextracción del residuo, incrementando el pH, mejora la solubilización proteica.
- ❖ Al emplear la electroforesis en gel, no se obtiene una buena elución al analizar la distribución de los pesos moleculares de las proteínas de la microalga luego de la PCT y el cambio de pH, lo que se relacionó con una insuficiente purificación de los extractos.
- ❖ Los extractos de la microalga luego de la PCT presentan solubilidades comparables con estándares actualmente utilizados en la industria. No obstante, cambiar su pH reduce su solubilidad.
- ❖ Solo realizando un cambio de pH luego de someter la biomasa de *P. tricornutum* a la PCT se logra que ésta retenga agua. Los mejores resultados se obtienen al llevar a cabo dos extracciones sucesivas, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12, aunque su CRA es significativamente menor que la del aislado de soya. No obstante, el resultado demuestra el potencial uso de esta microalga en la industria.
- ❖ Los extractos de la microalga, luego del cambio de pH, evidencian tener actividades de emulsión mejores o iguales que los estándares de WPC y clara de huevo. La muestra luego de la PCT presentó similitudes con el estándar WPC y aislado de soya.
- ❖ La estabilidad de emulsión de todos los extractos de la microalga analizados fue similar al estándar WPC; sin embargo, la clara de huevo presentó la mayor estabilidad de todas muestras.

- ❖ Luego de analizar las propiedades tecnofuncionales de los extractos, se confirma su potencial aplicación en la industria alimentaria como fuente de proteína y aditivo con propiedades tecnofuncionales.
- ❖ Se evidenció la concentración de fucoxantina en el residuo luego de tratar la biomasa con la PCT.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Los parámetros de la PCT que se recomienda utilizar a partir de los resultados obtenidos se seleccionaron con respecto a la disrupción celular y el contenido de proteína solubilizada. No obstante, otros factores como costo, uso de energía e impacto ambiental deberían ser considerados al utilizar esta tecnología industrialmente. En el caso de que los extractos proteicos que quisieran utilizarse en la industria alimentaria, también se hace indispensable el análisis de su inocuidad.
- ❖ Durante el tratamiento con la PCT también se recomienda analizar otros posibles métodos para asegurar que la temperatura de la biomasa se mantenga en 40°C, ya que en pruebas preliminares no presentadas se encontró que este parámetro permite maximizar la disrupción celular y evitar la desnaturalización proteica.
- ❖ Estudiar diferentes métodos para controlar el aroma característico de los extractos de *P. tricornutum*.
- ❖ Al limitar el nitrógeno en el cultivo de la microalga *P. tricornutum*, se favorece la producción de lípidos y se limita la síntesis de proteínas, por lo que sería interesante evaluar el contenido proteico de esta microalga no limitando este compuesto en su producción, ya que podría aumentar el contenido proteico sin necesidad de considerar otro tratamiento como lo es el cambio de pH.
- ❖ Separar las proteínas del resto de los componentes de las muestras al cuantificar las proteínas utilizando el método de Lowry. Esto puede lograrse al emplear TCA. Adicionalmente, sería útil repetir las mediciones empleando RuDPCase como estándar durante las mediciones.
- ❖ Purificar los extractos de *P. tricornutum* para obtener mejores resultados al analizar la distribución de pesos moleculares.
- ❖ Se puede considerar ajustar el pH de la biomasa a uno más alcalino antes de someterla a la PCT, al igual que añadir sal a la biomasa con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína solubilizada. Tanger *et al.* (2020) en su estudio, cuantificaron la cantidad de proteína proveniente de harina de arvejas, por lo que sería conveniente intentarlo con microalgas, ya que el tamaño de las proteínas y su carga puede ser diferente y por ende, su solubilidad también.
- ❖ Al ajustar el pH de la biomasa, podría ser útil emplear buffers, lo que reduciría el tiempo de permanencia de la microalga en el ambiente alcalino, disminuyendo la posibilidad de que las proteínas se desnaturalicen y otros componentes en los extractos sufran reacciones de deterioro.
- ❖ Una vez que se da la disrupción celular con la PCT, es preferible no almacenar la muestra durante un tiempo prolongado en congelación para evitar que el grado de disrupción celular disminuya.
- ❖ Combinar los extractos obtenidos luego de ajustar el pH para evaluar el comportamiento de la proteína solubilizada y sus propiedades tecnofuncionales.
- ❖ Realizar futuras evaluaciones del extracto proteico liofilizado, para conocer el efecto de su pH sobre la acidez de los alimentos.

- ❖ Estudiar la estabilidad y las propiedades de los extractos proteicos de *P. tricornutum* en distintos alimentos que son sometidos a tratamientos térmicos y otras barreras de conservación, tales como fermentación, congelación y secado.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., & Undeland, I. (2018). Structural, functional, and sensorial properties of protein isolate produced from salmon, cod, and herring by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 11(9), 1733–1749. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2138-x>
- Acquah, C., Ekezie, F.-G., & Udenigwe, C. C. (2021). Potential applications of microalgae-derived proteins and peptides in the food industry. En *Cultured Microalgae for the Food Industry*. (Eds. Lafarga, T. & Acién, 6., pp. 97–126). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821080-2.00011-3>
- Akyıl, S., İltter, I., Koç, M., Demirel, Z., Erdoğan, A., Dalay, M. C., & Kaymak-Ertekin, F. (2020). Effects of extraction methods and conditions on bioactive compounds extracted from *Phaeodactylum tricornutum*. *Acta Chimica Slovenica*, 67(4), 1250-1261. <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6157>
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M., & Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6281–6296. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv340>
- Argento, F., Sempere, C., & van Lierde, F. (2016). *Factibilidad técnica y económica de la producción de Spirulina*. Instituto Tecnológico de Buenos Aires.
- Aryee, A., Agyei, D., & Udenigwe, C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. *Proteins in Food Processing*, 27–45. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100722-8.00003-6>
- Aschoff, J. K., Knoblauch, K., Hüttner, C., Vásquez-Caicedo, A. L., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). Non-thermal pasteurization of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juices using continuous Pressure Change Technology (PCT): A proof-of-concept. *Food and Bioprocess Technology*, 9(10), 1681–1691. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1754-6>
- Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Barka, A., & Blecker, C. (2016). Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. 20(3), 427–436. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.13132>
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., & Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. *Food Chemistry*, 194, 1056–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.133>
- Bertsch, P., Böcker, L., Mathys, A., & Fischer, P. (2021). Proteins from microalgae for the stabilization of fluid interfaces, emulsions, and foams. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 326–342. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.014>
- Biancavallo, S. (2018). *Continuous pressure change technology (PCT) for the non-thermal pasteurization of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) fruit juices* [Tesis de Máster]. Universität Hohenheim.
- Bönsch, K., Wecks, M., Ondruschka, J., & Staudt, R. (2007). The effect of a new Pressure Change Technology (PCT) on microorganisms: An innovative concept for food

- safety. *Chemical Engineering & Technology*, 30(6), 755–757. <https://doi.org/10.1002/ceat.200600402>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Freitas, M. A. V., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Biotechnological potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biorefinery processes. *Fuel*, 268, 117357. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117357>
- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Freitas, M. A. V., Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. (2018). *Phaeodactylum tricornutum* derived biosilica purification for energy applications. *Energy Procedia*, 153, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.020>
- Burgess, R. (2009). *Chapter 20 Protein Precipitation Techniques*. *Methods in Enzymology*, 463, 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2)
- Butler, T., Kapore, R. V., & Vaidayanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A diatom cell factory. *Trends in Biotechnology*, 38(6), 606–622. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023>
- Calero, N., Muñoz, J., & Guerrero, A. (2013). Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. *Grasas y Aceites*, 64(1), 15–21. <https://doi.org/doi:10.3989/gya.070812>
- Castro-Ferreira, C., Gomes-Dias, J. S., Ferreira-Santos, P., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Rocha, C. M. R. (2022). *Phaeodactylum tricornutum* extracts as structuring agents for food applications: Physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 124, 107276. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107276>
- Cavonius, L. R., Albers, E., & Undeland, I. (2015). pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. *Algal Research*, 11, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.022>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, 102(14), 7159–7164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.067>
- Chandi, G. K., & Sogi, D. S. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.018>
- Chen, L., Li, R., Ren, X., & Liu, T. (2016). Improved aqueous extraction of microalgal lipid by combined enzymatic and thermal lysis from wet biomass of *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresource Technology*, 214, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.031>
- Chen, Y., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao, F., Zhao, J., Zheng, Y., & Zhu, J. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. *Food Hydrocolloids*, 96, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.025>
- Chronakis, I. S., & Madsen, M. (2011). 14—Algal proteins. En G. O. Phillips & P. A.

- Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 353–394). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.353>
- Clayton, J. R., Dortch, Q., Thoresen, S. S., & Ahmed, S. I. (1988). Evaluation of methods for the separation and analysis of proteins and free amino acids in phytoplankton samples. *Journal of Plankton Research*, 10(3), 341–358. <https://doi.org/10.1093/plankt/10.3.341>
- Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459–477. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040>
- Cooney, M., Young, G., & Nagle, N. (2009). Extraction of bio-oils from microalgae. *Separation & Purification Reviews*, 38, 291–325.
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 292, 121946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121946>
- Cui, Y., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., & Schenk, P. M. (2021). Development of a *Phaeodactylum tricornutum* biorefinery to sustainably produce omega-3 fatty acids and protein. *Journal of Cleaner Production*, 300, 126839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126839>
- Cui, Y., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2019). *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food Chemistry*, 297, 124937. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.06.004>
- Dai, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). Emulsifying properties of acid-hydrolyzed insoluble protein fraction from *Chlorella protothecoides*: Formation and storage stability of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 108, 105954. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105954>
- Derwenskus, F., Metz, F., Gille, A., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Schließmann, U., & Hirth, T. (2018). Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricornutum* biomass using subcritical liquids. *GCB Bioenergy*, 11(1), 335–344. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12563>
- Derwenskus, F., Schäfer, B., Müller, J., Frick, K., Gille, A., Briviba, K., Schmid-Staiger, U., & Hirth, T. (2020). Coproduction of EPA and fucoxanthin with *P. tricornutum* – A promising approach for up- and downstream processing. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1780–1789. <https://doi.org/10.1002/cite.202000046>
- Devaki, B., & Grossman, A. R. (1993). Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Research*, 21(19), 4458–4466. <https://doi.org/10.1093/nar/21.19.4458>
- Devi, M. A., & Venkataraman, L. V. (1984). Functional properties of protein products of mass cultivated blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Food Science*, 49(1), 24–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13660.x>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of

- Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008(81), 431–440.
- Ebert, S., Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Emulsifying properties of water-soluble proteins extracted from the microalgae *Chlorella sorokiniana* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Food & Function*, 10(2), 754–764. <https://doi.org/doi:10.1039/c8fo02197j>
- Echeverri, D., Romo, J., Giraldo, N., & Atehortúa, L. (2019). Microalgae protoplasts isolation and fusion for biotechnology research. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 101–112. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80248>
- Enomoto, A., Nakamura, K., Nagai, K., Hashimoto, T., & Hakoda, M. (1997). Inactivation of food microorganisms by high-pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(7), 1133–1137.
- Espinasse, V., Perrier-Cornet, J.-M., Marecat, A., & Gervais, P. (2008). High gas pressure effects on yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 729–738. <https://doi.org/10.1002/bit.21954>
- FDA. (2022). GRAS Notices. https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=phaeodactylum%20tricornutum
- Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., & Dufrêne, Y. F. (2008). Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1344–1356. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01551.x>
- Fresnedo, O., & Serra, J. L. (1992). Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*, 28(1992), 786–793.
- Fu, Y., Chen, T., Chen, S. H. Y., Liu, B., Sun, P., Sun, H., & Chen, F. (2021). The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.050>
- García, J., de Vicente, M., & Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1017–1024. <https://doi.org/DOI:10.1111/1751-7915.12800>
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., & Bárzana, E. (2014). SINGLE CELL PROTEIN | The Algae. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 425–430). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00309-8>
- García-Vaquero, M., López-Alonso, M., & Hayes, M. (2017). Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himantalia elongata* (Linnaeus) S. F. Gray. *Food Research International*, 99, 971–978. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.023>
- Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). Production of protein-rich extracts from disrupted microalgae cells: Impact of solvent treatment and

- lyophilization. *Algal Research*, 36, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.011>
- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019a). Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(17), 2961–2989. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1672137>
- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019b). Solubility of extracted proteins from *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Nannochloropsis oceanica*: Impact of pH-value. *LWT - Food Science and Technology*, 105, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.040>
- Guidi, S., Formica, F. A., & Denkel, C. (2022). Mixing plant-based proteins: Gel properties of hemp, pea, lentil proteins and their binary mixtures. *Food Research International*, 161, 111752. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111752>
- Guil-Guerrero, J. L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J. C., Campra-Madrid, P., & Reboloso-Fuentes, M. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*, 65(4), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.014>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & Elst, K. (2019). Disruption of microalgae with a novel continuous explosive decompression device. *Algal Research*, 39, 101376. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.001>
- Haque, Md. A., Timilsena, Y. P., & Adhikari, B. (2016). Food Proteins, Structure, and Function. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03057-2>
- Harris, E. H., Stern, D. B., & Witman, G. B. (Eds.). (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00059-9>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Haußmann, H. (2019). *Untersuchung des Zellaufschlusses und der Gewinnung von Proteinen mit funktionellen Eigenschaften am Beispiel der Mikroalgen Chlorella sorokiniana, Phaeodactylum tricornutum und Chlamydomonas reinhardtii* [Tesis de Máster]. Universität Stuttgart.
- Hempel, F., Lau, J., Klingl, A., & Maier, U. (2011). Algae as protein factories: Expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, 6(12), e28424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028424>
- Honjoh, K., Suga, K., Shinohara, F., Maruyama, I., Miyamoto, T., Hatano, S., & Iio, M. (2003). Preparation of protoplasts from *Chlorella vulgaris* K-73122 and cell wall regeneration of protoplasts from *C. vulgaris* K-73122 and C-27. *Journal of the*

- Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 47(2), 257–266.
<https://doi.org/10.5109/4494>
- Hörner, A. (2020). *Evaluation of the application of Pressure Change Technology (PCT) for cell disruption of Phaeodactylum tricornutum using supercritical CO₂* [Tesis de Máster]. Universität Stuttgart.
- Horst, I., Parker, B. M., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2012). Treatment of *Phaeodactylum tricornutum* cells with papain facilitates lipid extraction. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 40–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.033>
- Huang, W.-C., & Kim, J.-D. (2013). Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 149, 579–581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.095>
- Huaraca, A. (2011). *Evaluación nutritiva y nutracéutica de la frutilla (Fragaria vesca) deshidratada por el método de liofilización y comparación con la obtenida por deshidratación en microondas* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1994/1/56T00302.pdf>
- Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S. A., & Yamini, Y. (2004). Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(R-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1757–1765. <https://doi.org/10.1021/bp0498037>
- Kim, S. M., Jung, Y.-J., Kwon, O.-N., Cha, K. H., Um, B.-H., Chung, D., & Pan, C.-H. (2012). A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(7), 1843–1855. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9602-2>
- Lafarga, T., Acién-Fernández, F. G., Castellari, M., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. *LWT - Food Science and Technology*, 111, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.037>
- Lafarga, T., Álvarez, C., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2018). Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 98, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.033>
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Lee, H., Htoon, A., Uthayakumaran, S., & Paterson, S. (2007). Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. *Food Chemistry*, 102(4), 1199–1207.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.008>
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1), S75–S77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
- Levitan, O., Chen, M., & Dai, W. (2019). Structural and functional analyses of

- photosystem II in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 116(35), 17316–17322. <https://doi.org/10.1073/pnas.190672611>
- Lin, H. M., Yang, Z., & Chen, L. F. (1992). An improved method for disruption of microbial cells with pressurized carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 8(2), 165–166. <https://doi.org/10.1021/bp00014a012>
- Liu, S., Gifuni, I., Mear, H., Frappart, M., & Couallier, E. (2021). Recovery of soluble proteins from *Chlorella vulgaris* by bead-milling and microfiltration: Impact of the concentration and the physicochemical conditions during the cell disruption on the whole process. *Process Biochemistry*, 108, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.021>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lucakova, S., Branyikova, I., & Hayes, M. (2022). Microalgal proteins and bioactives for food, feed, and other applications. *Applied Sciences*, 12(9), 4402. <https://doi.org/10.3390/app12094402>
- Maffei, G., Bracciale, M. P., Broggi, A., Zuurro, A., Santarelli, M. L., & Lavecchia, R. (2018). Effect of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the structural properties of *Nannochloropsis* microalgae. *Bioresource Technology*, 249, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.062>
- Martino, A. D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43(5), 992–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x>
- Massia, A., Reinaldo, C., & Vieira, J. (2018). High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 187–194.
- Matos, Â. (2019). *Chapter 3 - Microalgae as a potential source of proteins*. En C. M. Galanakis, (Ed.), *Proteins: Sustainable source, processing and applications* (pp. 63-96). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00003-9>
- Matos, Â., Feller, R., Siegel, E., Vladimir, J., Furigo, A., Bianchini, R., & Sebastiao, E. (2016). Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 963–972.
- Mayer, C., Come, M., Ulmann, L., Chini, G., Faraloni, C., Nazih, H., Ouguerram, K., Chénais, B., & Mimouni, V. (2019). Preventive effects of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*, used as a food supplement, on risk factors associated with metabolic syndrome in Wistar rats. *Nutrients*, 11(5), 1069.
- Megía-Hervás, I., Sánchez-Bayo, A., Bautista, L. F., Morales, V., Witt-Sousa, F. G., Segura-Fornieles, M., & Vicente, G. (2020). Scale-up cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* to produce biocrude by hydrothermal liquefaction. *Processes*, 8(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/pr8091072>
- Meinlschmidt, P., Ueberham, E., Lehmann, J., Schwiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2016). Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy

- protein isolate. *Food Chemistry*, 205, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.016>
- Mercer, P., & Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(5), 539–547. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000455>
- Millán, E., Restrepo, L. P., & Narváez, C. E. (2007). Efecto del escaldado, de la velocidad de congelación y de descongelación sobre la calidad de la pulpa congelada de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaught). *Agronomía Colombiana*, 25(2), 333–338.
- Milovanović, I., Mišan, A., Simeunović, J., Kovač, D., Jambrec, D., & Mandić, A. (2015). Determination of volatile organic compounds in selected strains of Cyanobacteria. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/969542>
- Mohsen, S. M., Fadel, H. H. M., Bekhit, M. A., Edris, A. E., & Ahmed, M. Y. S. (2009). Effect of substitution of soy protein isolate on aroma volatiles, chemical composition and sensory quality of wheat cookies. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1705–1712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01978.x>
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., & Marchal, L. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology*, 196, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>
- Nadathur, S., Wanasundara, J. P. D., & Scanlin, L. (2017). *Sustainable Protein Sources*. Elsevier Science & Technology. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03542-3>
- Neumann, U., Derwenskus, F., Flister, V.F., Schmid-Staiger, U., Hirth, T., & Bischoff, S.C. (2019). Fucoxanthin, a carotenoid derived from *Phaeodactylum tricorutum* exerts antiproliferative and antioxidant activities in vitro. *Antioxidants*, 8(6), 183. <https://doi.org/10.3390/antiox8060183>
- Nguyen, R. T., & Harvey, H. R. (1994). A rapid micro-scale method for the extraction and analysis of protein in marine samples. *Marine Chemistry*, 45(1–2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0304-4203(94)90087-6)
- Nguyen, T. L., Lee, D. J., Chang, J. S., & Liu, J. C. (2013). Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.017>
- O'Flynn, T. D., Hogan, S. A., Daly, D. F. M., O'Mahony, J. A., & McCarthy, N. A. (2021). Rheological and solubility properties of soy protein isolate. *Molecules*, 26(10), 3015. <https://doi.org/10.3390/molecules26103015>
- Padial-Domínguez, M., Espejo-Carpio, J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. (2020). Optimization of the emulsifying properties of food protein hydrolysates for the production of fish oil-in-water emulsions. *Foods*, 9(5), 636. <https://doi.org/doi:10.3390/foods9050636>
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2004). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 38, 6.3.1-6.3.18. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s38>
- Park, J.-Y., Oh, Y.-K., Lee, J.-S., Lee, K., Jeong, M.-J., & Choi, S.-A. (2014).

- Acid-catalyzed hot-water extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 153, 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.065>
- Pelegri, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- Phong, W. N., Show, P. L., Le, C. F., Tao, Y., Chang, J.-S., & Ling, T. C. (2018). Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>
- Pinheiro, N., Assunção, P., Rodríguez, A., Sanromán, M. Á., & Deive, F. J. (2019). Surfactant-assisted disruption and extraction for carotenoid production from a novel *Dunaliella* strain. *Separation and Purification Technology*, 223, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.04.083>
- Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, 184, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Prada, Y., & Cobos, D. (2021). Evaluación del efecto tecnológico de la albúmina de huevo en polvo como estabilizante en un helado de crema. *Ciencia Unisalle*. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/734
- Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Science & Nutrition*, 2(6), 802–810. <https://doi.org/10.1002/fsn3.143>
- Rodríguez-Restrepo, Y. A., Ferreira-Santos, P., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Valorization of rice by-products: Protein-phenolic based fractions with bioactive potential. *Journal of Cereal Science*, 95, 103039. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103039>
- Rojó-Cebreros, A. H., Morales-Plascencia, M. E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., & Medina-Jasso, M. A. (2016). Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: Eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 662–670. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-1>
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1903-z>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Safi, C., Frances, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P.-Y. (2015). Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Research*, 8, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002>
- Safi, C., Olivieri, G., Campos, R. P., Engelen-Smit, N., Mulder, W. J., van den Broek, L. A.

- M., & Sijtsma, L. (2017). Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. *Bioresource Technology*, 225, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.068>
- Sánchez, E. (2020). *Estabilidad de complejos coacervados aislado de proteína de suero de leche - goma arábiga* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M. C., & Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell*, 13(11), 1450–1464. <https://doi.org/10.1128/EC.00183-14>
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73, 129–140. <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodhyd.2017.06.001>
- Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Bader-Mittermaier, S., & Osen, R. (2020). Food proteins from plants and fungi. *Current Opinion in Food Science*, 32, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.08.003>
- Schwenzfeier, A., Helbig, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2013). Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.002>
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., Eppink, M. H. M., & Gruppen, H. (2014). Effect of charged polysaccharides on the techno-functional properties of fractions obtained from algae soluble protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 35, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.019>
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 102(19), 9121–9127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>
- Silva Benavides, A. M., Torzillo, G., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, 54, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.016>
- Singh, G., & Patidar, S. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36, 175–192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Spence, C., Levitan, C. A., Shankar, M. U., & Zampini, M. (2010). Does food color influence taste and flavor perception in humans? *Chemosensory Perception*, 3(1), 68–84. <https://doi.org/10.1007/s12078-010-9067-z>
- Staats, N., Stal, L. J., & Mur, L. R. (2000). Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: Effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249(1), 13–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00166-0)

- Stack, J., Gouic, A. V. L., Tobin, P. R., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., & Fitzgerald, R. J. (2018). Protein extraction and bioactive hydrolysate generation from two microalgae, *Porphyridium purpureum* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Food Bioactives*, 1, 153–165. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.1134>
- Steriti, A., Rossi, R., Concas, A., & Cao, G. (2014). A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 164, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.056>
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>
- Suarez, E., van Leeuwen, J., Safi, C., Sijtsma, L., van den Broek, L. A. M., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & van den Berg, C. (2018). Techno-Functional properties of crude extracts from the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7831–7838. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01884>
- Tanger, C., Engel, J., & Kulozik, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107, 105949. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105949>
- Tarazona Delgado, R., Guarieiro, M. dos S., Antunes, P. W., Cassini, S. T., Terreros, H. M., & Fernandes, V. de O. (2021). Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga *Picocystis salinarum*. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02462-8>
- Unternehmensberatung Babel. (s/f). *Löslichkeit von Gasen in Wasser*. <https://www.unternehmensberatung-babel.de/industriegase-lexikon/industriegase-lexikon-n-bis-z/ostwald-koeffizient/gase-geloest-in-wasser.html>
- Ursu, A.-V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>
- Vandamme, D., Gheysen, L., Muylaert, K., & Foubert, I. (2018). Impact of harvesting method on total lipid content and extraction efficiency for *Phaeodactylum tricornutum*. *Separation and Purification Technology*, 193, 362–367.
- Varona Iglesias, S., Vásquez-Caicedo, A. L., & Schmid-Staiger, U. (s/f). *Zellaufschluss von Algen mittels Druckwechseltechnologie*. Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB.
- Vásquez-Caicedo, A. L., Massot, A., Maupeu, J., & Klingner, E. (2014). *High pressure stabilization of wines: Impact of pressure change technology on wine quality*. 37th OIV Congress, Argentina. http://www.preservewine.igb.fraunhofer.de/images/content/media_centre/Poster%20OIV_Mendoza_AnaLuciaVasquezCaicedo.pdf
- Veith, T., & Büchel, C. (2007). The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs)

- as light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(12), 1428–1435. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.09.004>
- Vishwakarma, R., & Malik, A. (2022). Partial enzymatic cell wall disruption of *Oocystis* sp. for simultaneous cultivation and extraction. *Separation and Purification Technology*, 293, 121107. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121107>
- Vollmer, K., Santarelli, S., Vásquez-Caicedo, A.L., Varona Iglesias, S., Frank, J., Carle, R., Staingass, C.B. (2020). Non-thermal processing of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr) juice using continuous pressure change technology (PCT): Effects on physical traits, microbial loads, enzyme activities, and phytochemical composition. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 1833-1847. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02520-y>
- Vollmer, K., Czerny, M., Vásquez-Caicedo, A. L., Varona Iglesias, S., Frank, J., Carle, R., & Steingass, C. B. (2021). Non-thermal processing of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice using continuous pressure change technology (PCT): HS-SPME-GC–MS profiling, descriptive sensory analysis, and consumer acceptance. *Food Chemistry*, 345, 128786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128786>
- Waghmare, A. G., Salve, M. K., LeBlanc, J. G., & Arya, S. S. (2016). Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 3, 16. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
- Wild, K. J., Steingaß, H., & Rodehutschord, M. (2018). Variability in nutrient composition and in vitro crude protein digestibility of 16 microalgae products. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1306–1319. <https://doi.org/10.1111/jpn.12953>
- Wu, C., Xiao, Y., Lin, W., Li, J., Zhang, S., Zhu, J., & Rong, J. (2017). Aqueous enzymatic process for cell wall degradation and lipid extraction from *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 223, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.063>
- Xue, J., Niue, Y., Huang, T., Yang, W., Liu, J., & Li, H. (2015). Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metabolic Engineering*, 27, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.10.002>
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag.
- Zhang, Y., Kang, X., Zhen, F., Wang, Z., Kong, X., & Sun, Y. (2022). Assessment of enzyme addition strategies on the enhancement of lipid yield from microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 177, 108198. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108198>
- Zhong, Z. K., & Sun, X. S. (2000). Thermal behavior and nonfreezing water of soybean protein components. *Cereal Chemistry Journal*, 77(4), 495–500. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.4.495>

9. ANEXOS

Cuadro IX. Resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de los parámetros de proceso de la PCT sobre la disrupción celular.

| Parámetros de proceso de la PCT | | | Muestra | Células | Cuantificación celular (células/mL) | Disrupción celular (%) |
|---------------------------------|------------------------------|-------|-------------|---------|-------------------------------------|------------------------|
| Gas de compresión | Concentración de biomasa (%) | Ciclo | | | | |
| Argón | 2,24 | - | Biomasa | 221 | 1021666667 | - |
| | | | | 188 | | |
| | | | | 204 | | |
| | | 1 | 5 min | 144 | 670000000 | 34 |
| | | | | 136 | | |
| | | | | 122 | | |
| | | 1 | 30 min | 140 | 705000000 | 31 |
| | | | | 142 | | |
| | | | | 141 | | |
| | | 1 | 55 min | 126 | 613333333 | 40 |
| | | | | 117 | | |
| | | | | 125 | | |
| | | 2 | 5 min | 84 | 451666667 | 56 |
| | | | | 94 | | |
| | | | | 93 | | |
| | | 2 | 30 min | 90 | 433333333 | 58 |
| | | | | 81 | | |
| | | | | 89 | | |
| 2 | Final | 99 | 428333333,3 | 58 | | |
| | | 87 | | | | |
| | | 71 | | | | |
| Argón | 4,93 | - | Biomasa | 252 | 2503333333 | - |

| | | | | | | |
|-------|------|---|---------|-----|------------|----|
| | | | | 252 | | |
| | | | | 247 | | |
| | | 1 | 5 min | 230 | 2373333333 | 5 |
| | | | | 236 | | |
| | | | | 246 | | |
| | | 1 | 30 min | 195 | 2000000000 | 20 |
| | | | | 201 | | |
| | | | | 204 | | |
| | | 1 | Final | 207 | 2060000000 | 18 |
| | | | | 211 | | |
| | | | | 200 | | |
| | | 2 | 5 min | 147 | 1746666667 | 30 |
| | | | | 181 | | |
| | | | | 196 | | |
| | | 2 | 30 min | 198 | 1863333333 | 26 |
| | | | | 195 | | |
| | | | | 166 | | |
| | | 2 | Final | 153 | 1766666667 | 29 |
| | | | | 195 | | |
| | | | | 182 | | |
| Argón | 6,95 | - | Biomasa | 492 | 2440000000 | - |
| | | | | 504 | | |
| | | | | 468 | | |
| | | 1 | 5 min | 300 | 1403333333 | 42 |
| | | | | 272 | | |
| | | | | 270 | | |
| | | 1 | 30 min | 377 | 1820000000 | 25 |

| | | | | | | |
|-----------|------|---|---------|-----|------------|----|
| | | | | 353 | | |
| | | | | 362 | | |
| | | 1 | 55 min | 341 | 1676666667 | 31 |
| | | | | 337 | | |
| | | | | 328 | | |
| | | 2 | 5 min | 351 | 1740000000 | 29 |
| | | | | 332 | | |
| | | | | 361 | | |
| | | 2 | 30 min | 296 | 1461666667 | 40 |
| | | | | 311 | | |
| | | | | 270 | | |
| | | 2 | Final | 287 | 1535000000 | 37 |
| | | | | 336 | | |
| | | | | 298 | | |
| Nitrógeno | 2,76 | - | Biomasa | 225 | 1018333333 | - |
| | | | | 205 | | |
| | | | | 181 | | |
| | | 1 | 5 min | 159 | 845000000 | 17 |
| | | | | 176 | | |
| | | | | 172 | | |
| | | 1 | 30 min | 153 | 806666667 | 21 |
| | | | | 155 | | |
| | | | | 176 | | |
| | | 1 | 55 min | 171 | 818333333 | 20 |
| | | | | 166 | | |
| | | | | 154 | | |
| | | 2 | 5 min | 142 | 685000000 | 33 |

| | | | | | | |
|-----------|--------|-----|-----------|-----|------------|----|
| | | | | 129 | | |
| | | | | 140 | | |
| | | 2 | Final | 138 | 725000000 | 29 |
| | | | | 152 | | |
| | | | | 145 | | |
| Nitrógeno | 4,85 | - | Biomasa | 365 | 1856666667 | - |
| | | | | 367 | | |
| | | | | 382 | | |
| | | 1 | 5 min | 307 | 1441666667 | 22 |
| | | | | 273 | | |
| | | | | 285 | | |
| | | 1 | 30 min | 254 | 1356666667 | 27 |
| | | | | 279 | | |
| | | | | 281 | | |
| | | 1 | Final | 258 | 1210000000 | 35 |
| | | | | 234 | | |
| | | | | 234 | | |
| | | 2 | 5 min | 239 | 1196666667 | 36 |
| | | | | 253 | | |
| | | | | 226 | | |
| 2 | 30 min | 180 | 936666667 | 50 | | |
| | | 201 | | | | |
| | | 181 | | | | |
| Nitrógeno | 7,49 | - | Biomasa | 335 | 1445000000 | - |
| | | | | 275 | | |
| | | | | 257 | | |
| | | 1 | 5 min | 188 | 1096666667 | 24 |

| | | | | | | |
|--|--|---|--------|-----|------------|----|
| | | 1 | 30 min | 234 | 1060000000 | 27 |
| | | | | 236 | | |
| | | | | 214 | | |
| | | 1 | Final | 216 | 560000000 | 61 |
| | | | | 206 | | |
| | | | | 108 | | |
| | | 2 | 5 min | 112 | 975000000 | 33 |
| | | | | 116 | | |
| | | | | 185 | | |
| | | 2 | 30 min | 197 | 966666667 | 33 |
| | | | | 203 | | |
| | | | | 185 | | |
| | | 2 | 30 min | 191 | 966666667 | 33 |
| | | | | 204 | | |
| | | | | 185 | | |

Cuadro X. Resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de los parámetros de proceso de la PCT sobre la solubilización de proteínas.

| Parámetros de proceso de la PCT | | | Muestra | Concentración proteica (mg/mL)* | Solubilización proteica (%) |
|---------------------------------|------------------------------|-------|---------|---------------------------------|-----------------------------|
| Gas de compresión | Concentración de biomasa (%) | Ciclo | | | |
| Argón | 2,24 | - | Biomasa | 6,19 | - |
| | | | | 6,52 | |
| | | 1 | 5 min | 1,56 | 25,49 |
| | | | | 1,68 | |
| | | 1 | 30 min | 1,64 | 26,44 |
| | | | | 1,72 | |
| | | 1 | Final | 1,62 | 25,89 |
| | | | | 1,67 | |

| | | | | | |
|-------|-----------|------|-----------|-------|-------|
| | | 2 | 5 min | 1,63 | 26,51 |
| | | | | 1,74 | |
| | | 2 | Final | 1,65 | 26,04 |
| | | | | 1,66 | |
| | | 2 | Combinado | 1,57 | 24,94 |
| | | | | 1,60 | |
| Argón | 4,93 | - | Biomasa | 16,49 | - |
| | | | | 16,93 | |
| | | 1 | 5 min | 1,91 | 10,55 |
| | | | | 1,62 | |
| | | 1 | 30 min | 1,95 | 12,00 |
| | | | | 2,06 | |
| | | 1 | Final | 1,91 | 11,70 |
| | | | | 2,00 | |
| | | 2 | 5 min | 2,28 | 13,96 |
| | | | | 2,38 | |
| 2 | Final | 2,36 | 14,24 | | |
| | | 2,40 | | | |
| 2 | Combinado | 2,35 | 14,21 | | |
| | | 2,40 | | | |
| Argón | 6,95 | - | Biomasa | 18,81 | - |
| | | | | 20,19 | |
| | | 1 | 5 min | 3,12 | 16,64 |
| | | | | 3,37 | |
| | | 1 | 30 min | 3,12 | 15,49 |
| | | | | 2,92 | |
| 1 | 55 min | 3,29 | 16,46 | | |

| | | | | | |
|-----------|-------|------|-----------|-------|-------|
| | | | | 3,13 | |
| | | 2 | 5 min | 3,31 | 18,10 |
| | | | | 3,75 | |
| | | 2 | 30 min | 3,29 | 16,44 |
| | | | | 3,12 | |
| | | 2 | Combinado | 3,13 | 16,31 |
| | | | | 3,23 | |
| Nitrógeno | 2,76 | - | Biomasa | 7,35 | - |
| | | | | 7,27 | |
| | | 1 | 5 min | 1,21 | 16,48 |
| | | | | 1,20 | |
| | | 1 | 30 min | 1,22 | 16,42 |
| | | | | 1,18 | |
| | | 1 | 55 min | 1,23 | 16,55 |
| | | | | 1,19 | |
| | | 2 | 5 min | 1,29 | 17,72 |
| | | | | 1,30 | |
| 2 | Final | 1,19 | 16,28 | | |
| | | 1,19 | | | |
| Nitrógeno | 4,85 | - | Biomasa | 12,50 | - |
| | | | | 12,28 | |
| | | | | 13,14 | |
| | | 1 | 5 min | 1,90 | 15,19 |
| | | | | 1,94 | |
| | | 1 | 30 min | 1,92 | 15,38 |
| | | | | 1,97 | |
| | | 1 | Final | 2,04 | 16,50 |

| | | | | | |
|-----------|------|---|---------|-------|-------|
| | | | | 2,13 | |
| | | 2 | 5 min | 2,15 | 17,56 |
| | | | | 2,29 | |
| | | 2 | Final | 2,27 | 18,03 |
| | | | | 2,29 | |
| Nitrógeno | 7,49 | - | Biomasa | 24,17 | - |
| | | | | 21,21 | |
| | | 1 | 5 min | 2,08 | 9,25 |
| | | | | 2,12 | |
| | | 1 | 30 min | 2,71 | 12,15 |
| | | | | 2,80 | |
| | | 1 | Final | 2,63 | 11,60 |
| | | | | 2,63 | |
| | | 2 | 5 min | 2,85 | 12,66 |
| | | | | 2,90 | |
| | | 2 | Final | 2,73 | 12,08 |
| | | | | 2,75 | |

*Este valor es para los sobrenadantes de las muestras, excepto para las biomazas antes de someterlas a la PCT, a las cuales se les evaluó la proteína total.

Cuadro XI. Resultados obtenidos durante las pruebas preliminares para establecer las condiciones utilizadas durante el cambio de pH y la resuspensión del residuo.

| Temperatura (°C) | pH | Solubilidad proteica promedio (%) |
|------------------|--------|-----------------------------------|
| 4 | Nativo | 21,31 |
| | 8,85 | 22,82 |
| | 12 | 47,92 |
| 24,5 | Nativo | 21,86 |
| | 8,85 | 26,26 |

| | | |
|----|--------|-------|
| | 12 | 43,07 |
| 45 | Nativo | 21,61 |
| | 8,85 | 34,37 |
| | 12 | 92,24 |

Cuadro XII. Resultados obtenidos al determinar la solubilidad de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH.

| pH | Frac. | Rep. | Extracción a 4°C | | Extracción a 24,5°C | | Extracción a 45°C | |
|-----|-------|------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | | Contenido proteína (mg/mL) | Proteína solubilizada (%) | Contenido proteína (mg/mL) | Proteína solubilizada (%) | Contenido proteína (mg/mL) | Proteína solubilizada (%) |
| 4,0 | B | 1 | 2,21 | 60,98 | 3,23 | 41,81 | 0,56 | -34,50 ^a |
| | S | | 1,35 | | 1,35 | | -0,19 | |
| | B | 2 | 2,20 | 62,26 | 3,23 | 46,41 | 0,78 | 39,21 |
| | S | | 1,37 | | 1,50 | | 0,31 | |
| | B | 3 | 2,36 | 62,46 | 3,61 | 39,95 | 0,85 | 63,05 |
| | S | | 1,47 | | 1,44 | | 0,53 | |
| 6,8 | B | 1 | 3,35 | 69,36 | 3,40 | 80,61 | 0,48 | -12,44 ^a |
| | S | | 2,32 | | 2,74 | | -0,06 | |
| | B | 2 | 2,28 | 98,07 | 3,42 | 81,03 | 1,20 | 111,64 |
| | S | | 2,24 | | 2,77 | | 1,34 | |
| | B | 3 | 2,50 | 90,97 | 3,24 | 89,84 | 1,33 | 107,73 |
| | S | | 2,27 | | 2,91 | | 1,43 | |
| 8,0 | B | 1 | 3,22 | 92,59 | 3,63 | 84,48 | 0,39 | 73,47 |
| | S | | 2,99 | | 3,07 | | 0,29 | |
| | B | 2 | 2,57 | 97,89 | 3,29 | 96,06 | 1,42 | 116,64 |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|------|-------|------|-------|------|--------|
| | S | | 2,51 | | 3,16 | | 1,65 | |
| | B | 3 | 2,64 | 91,81 | 3,38 | 86,27 | 0,90 | 167,27 |
| | S | | 2,43 | | 2,92 | | 1,50 | |

^a Los valores no se consideraron en la cuantificación, debido a que estaban fuera de la curva de calibración.

Frac.: Fracción, Rep.: Repetición, B: biomasa, S: sobrenadante.

Cuadro XIII. Resultados obtenidos al determinar la capacidad de retención de agua (CRA) de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH.

| Muestra | pH | Masa (g) | | | CRA |
|---------|----|----------|----------------|----------------|---------|
| | | Tubo | Tubo + muestra | Tubo + residuo | |
| 4 °C | 4 | 16,0360 | 16,2394 | 16,2237 | -0,0772 |
| | | 15,4472 | 15,6473 | 15,6497 | 0,0120 |
| | | 15,6051 | 15,8057 | 15,8111 | 0,0269 |
| | 7 | 15,5649 | 15,7660 | 15,7364 | -0,1472 |
| | | 15,5925 | 15,7928 | 15,7884 | -0,0220 |
| | | 15,5950 | 15,7949 | 15,8174 | 0,1126 |
| | 10 | 15,5449 | 15,7468 | 15,7397 | -0,0352 |
| | | 15,5747 | 15,7753 | 15,7951 | 0,0987 |
| | | 15,5266 | 15,7280 | 15,7639 | 0,1783 |
| 24,5 °C | 4 | 15,5863 | 15,8869 | 15,9602 | 0,2438 |
| | | 15,6977 | 15,8980 | 15,9853 | 0,4358 |
| | | 16,0700 | 16,3719 | 16,4672 | 0,3157 |
| | 7 | 15,6129 | 15,9149 | 16,0260 | 0,3679 |
| | | 15,5966 | 15,7989 | 15,8937 | 0,4686 |
| | | 15,6734 | 15,9750 | 16,0648 | 0,2977 |
| | 10 | 15,5826 | 15,8851 | 15,9655 | 0,2658 |

| | | | | | |
|-------|----|---------|---------|---------|---------|
| | | 15,7008 | 15,9027 | 16,0041 | 0,5022 |
| | | 15,8304 | 16,1319 | 16,2208 | 0,2949 |
| 45 °C | 4 | 15,5568 | 15,7592 | 15,7031 | -0,2772 |
| | | 15,5223 | 15,8280 | 15,8185 | -0,0311 |
| | | 15,6679 | 15,9724 | 15,9154 | -0,1872 |
| | 7 | 15,8012 | 16,0021 | 15,9595 | -0,2120 |
| | | 15,7091 | 16,0099 | 15,9410 | -0,2291 |
| | | 15,5997 | 15,9027 | 15,9008 | -0,0063 |
| | 10 | 15,7641 | 15,9666 | 15,8835 | -0,4104 |
| | | 15,6300 | 15,9324 | 16,1535 | 0,7312 |
| | | 15,8429 | 16,1436 | 15,9133 | -0,7659 |

Cuadro XIV. Resultados obtenidos al determinar la actividad y la estabilidad de emulsión de los extractos analizados en las pruebas preliminares para determinar las condiciones de pH y temperatura a emplear durante el cambio de pH.

| Muestra | Masa muestra (g) | Abs 500nm | | T 0 min | T 10 min | AE 0 min | AE 10 min | EE (%) |
|-----------------|------------------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|-----------|--------|
| | | Abs 0 min | Abs 10 min | | | | | |
| pH 12 4°C | 0,1003 | 1,165 | 0,942 | 26829,950 | 21694,260 | 3,577 | 2,893 | 123,67 |
| | 0,1008 | 1,112 | 0,905 | 25609,360 | 20842,150 | 3,415 | 2,779 | 122,87 |
| | 0,1010 | 1,002 | 0,834 | 23076,060 | 19207,020 | 3,077 | 2,561 | 120,14 |
| pH 12 24,5°C | 0,1001 | 1,372 | 1,315 | 31597,160 | 30284,450 | 4,213 | 4,038 | 104,34 |
| | 0,1001 | 1,342 | 1,267 | 30906,260 | 29179,010 | 4,121 | 3,891 | 105,92 |
| | 0,1001 | 1,323 | 1,258 | 30468,690 | 28971,740 | 4,062 | 3,863 | 105,17 |
| pH 12 45°C | 0,1011 | 1,440 | 1,355 | 33163,200 | 31205,650 | 4,422 | 4,161 | 106,27 |

| | | | | | | | | |
|--|--------|-------|-------|-----------|-----------|-------|-------|--------|
| | 0,0999 | 1,699 | 1,625 | 39127,970 | 37423,750 | 5,217 | 4,990 | 104,55 |
| | 0,1001 | 1,524 | 1,507 | 35097,720 | 34706,210 | 4,680 | 4,627 | 101,13 |

AE: actividad de emulsión, EE: estabilidad de emulsión, Abs: absorbancia, T: turbidez.

Cuadro XV. Resultados del contenido de proteína obtenidos durante el cambio de pH a 24,5°C, de los extractos seleccionados.

| Muestra | Repetición | Fracción | Contenido proteína (mg/mL) | Proteína solubilizada (%)* |
|---|------------|----------|----------------------------|----------------------------|
| I (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión a pH nativo) | 1 | B | 7,21 | 22,75 |
| | | S | 1,64 | |
| | 2 | B | 6,94 | 16,67 |
| | | S | 1,20 | |
| II (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión a pH nativo luego de una extracción a pH 10) | 1 | B | 9,17 | 24,94 |
| | | S | 1,80 | |
| | 2 | B | 7,80 | 29,99 |
| | | S | 2,16 | |
| III (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión a pH nativo luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) | 1 | B | 16,96 | 25,74 |
| | | S | 1,85 | |
| | 2 | B | 17,07 | 23,68 |
| | | S | 1,71 | |
| IV (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión extraída a pH 10) | 1 | B | 5,44 | 22,48 |
| | | S | 1,62 | |
| | 2 | B | 5,99 | 20,07 |
| | | S | 1,45 | |
| V (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas | 1 | B | 11,03 | 44,67 |

| | | | | |
|---|---|---|------|-------|
| de compresión luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) | | S | 3,22 | |
| | 2 | B | 9,96 | 46,12 |
| | | S | 3,32 | |
| VI (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión, extraída a pH 12) | 1 | B | 6,01 | 34,06 |
| | | S | 2,45 | |
| | 2 | B | 6,00 | 37,69 |
| | | S | 2,72 | |

B: biomasa, S: sobrenadante.

Cuadro XVI. Resultados obtenidos al evaluar la solubilidad de las proteínas como propiedad tecnofuncional de los extractos seleccionados.

| Muestra | pH | Proteínas en biomasa (mg/mL) | Proteínas en sobrenadante (mg/mL) | Solubilidad (%) |
|-----------------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Concentrado de suero lácteo (WPC) | 4,033 | 10,61 | 12,41 | 116,89 |
| | 3,998 | 11,71 | 12,41 | 106,02 |
| | 6,778 | 12,28 | 10,85 | 88,35 |
| | 6,802 | 12,05 | 11,57 | 96,01 |
| | 8,006 | 12,31 | 11,32 | 91,99 |
| | 7,977 | 12,71 | 11,98 | 94,26 |
| Aislado de soya (A.S.) | 3,972 | 8,23 | 0,70 | 8,50 |
| | 4,012 | 8,31 | 0,64 | 7,64 |
| | 6,740 | 12,11 | 6,08 | 50,16 |
| | 6,782 | 12,36 | 6,58 | 53,24 |
| | 8,001 | 15,79 | 8,78 | 55,64 |
| | 7,984 | 16,03 | 8,90 | 55,54 |
| Clara de huevo (C.H.) | 3,974 | 18,19 | 16,93 | 93,03 |
| | 4,068 | 19,10 | 17,48 | 91,53 |
| | 6,766 | 19,58 | 20,37 | 104,04 |

| | | | | |
|---|-------|-------|-------|--------|
| | 6,756 | 17,85 | 18,65 | 104,47 |
| | 8,013 | 19,29 | 20,24 | 104,94 |
| | 7,956 | 20,72 | 19,27 | 92,99 |
| I (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión) | 4,015 | 2,92 | 2,28 | 78,07 |
| | 4,008 | 2,69 | 2,23 | 82,74 |
| | 6,794 | 3,06 | 2,30 | 75,29 |
| | 6,799 | 3,11 | 2,21 | 71,16 |
| | 7,921 | 3,02 | 2,18 | 72,12 |
| | 7,951 | 2,89 | 2,28 | 78,93 |
| V (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) | 3,991 | 5,36 | 2,49 | 46,42 |
| | 4,000 | 5,62 | 2,60 | 46,22 |
| | 6,816 | 5,19 | 1,08 | 20,84 |
| | 6,848 | 5,25 | 2,11 | 40,07 |
| | 8,053 | 6,23 | 3,27 | 52,55 |
| | 8,162 | 6,10 | 3,97 | 65,13 |
| VI (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión, extraída a pH 12) | 4,105 | 3,23 | 1,35 | 41,81 |
| | 4,057 | 3,23 | 1,50 | 46,41 |
| | 3,956 | 3,61 | 1,44 | 39,95 |
| | 6,816 | 3,40 | 2,74 | 80,61 |
| | 6,888 | 3,42 | 2,77 | 81,03 |
| | 6,860 | 3,24 | 2,91 | 89,84 |
| | 8,025 | 3,63 | 3,07 | 84,48 |
| | 8,252 | 3,29 | 3,16 | 96,06 |
| | 8,138 | 3,38 | 2,92 | 86,27 |

Cuadro XVII. Resultados obtenidos al determinar la capacidad de retención de agua (CRA) de los extractos seleccionados.

| Muestra | pH | Masa (g) | | | CRA |
|-----------------------------------|----|----------|----------------|----------------|---------|
| | | Tubo | Tubo + muestra | Tubo + residuo | |
| Concentrado de suero lácteo (WPC) | 4 | 15,6097 | 16,6100 | 16,5546 | -0,0554 |
| | | 15,5550 | 16,5567 | 16,5096 | -0,0470 |
| | 7 | 15,6513 | 16,6529 | 16,5966 | -0,0562 |
| | | 15,6833 | 16,6885 | 16,6354 | -0,0528 |
| | 10 | 16,0495 | 17,0503 | 17,3440 | 0,2935 |
| | | 15,4821 | 16,4826 | 16,7499 | 0,2672 |
| Aislado de soya (A.S.) | 4 | 15,5906 | 16,5938 | 22,6644 | 6,0512 |
| | | 15,6414 | 16,6445 | 22,8644 | 6,2007 |
| | | 16,1055 | 17,1071 | 22,8696 | 5,7533 |
| | 7 | 15,8528 | 16,8534 | 22,1467 | 5,2901 |
| | | 15,6995 | 16,7004 | 22,0517 | 5,3465 |
| | | 15,5065 | 16,5067 | 21,8302 | 5,3224 |
| | 10 | 15,5813 | 16,5826 | 21,2552 | 4,6665 |
| | | 15,6058 | 16,6066 | 21,4811 | 4,8706 |
| | | 15,6071 | 16,6079 | 21,4800 | 4,8682 |
| Clara de huevo (C.H.) | 4 | 15,8382 | 16,8406 | 16,4666 | -0,3731 |
| | | 15,5553 | 16,5555 | 16,2144 | -0,3410 |
| | | 16,0786 | 17,0790 | 16,6457 | -0,4331 |
| | 7 | 15,6410 | 16,6420 | 16,3075 | -0,3342 |
| | | 15,7689 | 16,7693 | 16,3542 | -0,4149 |
| | | 15,6350 | 16,6395 | 16,1853 | -0,4522 |
| | 10 | 15,5913 | 16,5934 | 16,1661 | -0,4264 |
| | | 15,5950 | 16,5965 | 16,2390 | -0,3570 |

| | | | | | |
|---|----|---------|---------|---------|---------|
| | | 15,6104 | 16,6113 | 16,2707 | -0,3403 |
| I (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión) | 4 | 15,4960 | 16,4991 | 16,3710 | -0,1277 |
| | | 15,6111 | 16,6138 | 16,5590 | -0,0547 |
| | 7 | 15,5712 | 16,5733 | 16,6009 | 0,0275 |
| | | 15,6989 | 16,6994 | 16,7032 | 0,0038 |
| | 10 | 15,7284 | 16,7326 | 17,1715 | 0,4371 |
| | | 15,6304 | 16,6332 | 16,9979 | 0,3637 |
| V (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) | 4 | 15,5571 | 15,7582 | 16,5790 | 4,0816 |
| | | 15,8009 | 16,0015 | 16,8010 | 3,0390 |
| | 7 | 15,7634 | 15,9642 | 16,5850 | 3,9855 |
| | | 16,0353 | 16,2354 | 16,8435 | 3,2067 |
| | 10 | 15,5648 | 15,7636 | 16,4011 | 3,0916 |
| | | 15,5470 | 15,7491 | 16,3762 | 3,1029 |
| VI (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión, extraída a pH 12) | 4 | 15,5863 | 15,8869 | 15,9602 | 0,2438 |
| | | 15,6977 | 15,8980 | 15,9853 | 0,4358 |
| | | 16,0700 | 16,3719 | 16,4672 | 0,3157 |
| | 7 | 15,6129 | 15,9149 | 16,0260 | 0,3679 |
| | | 15,5966 | 15,7989 | 15,8937 | 0,4686 |
| | | 15,6734 | 15,9750 | 16,0648 | 0,2977 |
| | 10 | 15,5826 | 15,8851 | 15,9655 | 0,2658 |
| | | 15,7008 | 15,9027 | 16,0041 | 0,5022 |
| | | 15,8304 | 16,1319 | 16,2208 | 0,2949 |

Cuadro XVIII. Resultados obtenidos al determinar la actividad de emulsión (AE) y la estabilidad de emulsión (EE) de los extractos seleccionados.

| Muestra | Masa muestra (g) | Abs 500nm | | T 0 min | T 10 min | AE 0 min | AE 10 min | EE (%) |
|---|------------------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|-----------|--------|
| | | Abs 0 min | Abs 10 min | | | | | |
| Concentrado de suero lácteo (WPC) | 0,1001 | 1,309 | 0,262 | 30146,270 | 6033,860 | 4,020 | 0,805 | 20,015 |
| | 0,0999 | 1,335 | 0,349 | 30745,050 | 8037,470 | 4,099 | 1,072 | 26,142 |
| Clara de huevo (C.H.) | 0,1004 | 1,400 | 0,841 | 32242,000 | 19368,230 | 4,299 | 2,582 | 60,071 |
| | 0,1004 | 1,447 | 0,769 | 33324,410 | 17710,070 | 4,443 | 2,361 | 53,144 |
| Aislado de soya (A.S.) | 0,0999 | 0,645 | 0,238 | 14854,350 | 5481,140 | 1,981 | 0,731 | 36,899 |
| | 0,0996 | 0,612 | 0,270 | 14094,360 | 6218,100 | 1,879 | 0,829 | 44,118 |
| I (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión) | 0,0997 | 0,901 | 0,059 | 20750,030 | 1358,770 | 2,767 | 0,181 | 6,548 |
| | 0,1005 | 0,899 | 0,114 | 20703,970 | 2625,420 | 2,761 | 0,350 | 12,681 |
| V (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT usando argón como gas de compresión luego de dos extracciones, la primera a pH 10 y la segunda a pH 12) | 0,0999 | 1,765 | 0,463 | 40647,950 | 10662,890 | 5,420 | 1,422 | 26,232 |
| | 0,1001 | 1,946 | 0,564 | 44816,380 | 12988,920 | 5,976 | 1,732 | 28,983 |
| VI (biomasa de 2,24% de <i>P. tricornutum</i> sometida a 2 ciclos de PCT) | 0,1000 | 1,602 | 0,349 | 36894,060 | 8037,470 | 4,919 | 1,072 | 21,785 |
| | 0,1003 | 1,281 | 0,468 | 29501,430 | 10778,040 | 3,934 | 1,437 | 36,534 |

| | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| usando argón como gas de compresión, extraída a pH 12) | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

AE: actividad de emulsión, EE: estabilidad de emulsión, Abs: absorbancia, T: turbidez.

Cuadro XIX. Contenido de fucoxantina (% m/m) para una muestra al 5% de biomasa de *P. tricornutum* liofilizada luego de ser tratada con la PCT utilizando argón y nitrógeno como gases de compresión y flujos de 75 g/min y 23 g/min para argón y solo 75 g/min para nitrógeno, analizando también 1 o 2 ciclos de la PCT, así también como la biomasa sin ser sometida previamente a la PCT.

| Muestra | Fracción | Fucoxantina (% m/m) |
|----------------|----------|---------------------|
| 5% Sin PCT | B | 0,86 |
| N2 5% 75g/min | S1 | 0,09 |
| | R1 | 0,98 |
| | S2 | 0,13 |
| | R2 | 1,28 |
| Ar 5% 23 g/min | S1 | 0,07 |
| | R1 | 1,75 |
| | S2 | 0,09 |
| | R2 | 1,78 |
| Ar 5% 75 g/min | S1 | 0,08 |
| | R1 | 1,15 |
| | S2 | 0,26 |
| | R2 | 1,38 |

B: biomasa, S1: sobrenadante con un ciclo en la PCT, R1: residuo con un ciclo en la PCT, S2: sobrenadante con dos ciclos en la PCT, R2: residuo con dos ciclos en la PCT.