

# UCUENCA

**Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Determinación de contenido proteico de microalgas como fuentes alimentarias  
alternativas**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Bioquímico  
Farmacéutico


**Autores:**

Diana Paola Flores Vizñay

Cristian Andrés Palta Jara

**Director:**

Silvia Johanna Ortiz Ulloa

ORCID:  0000-0002-7171-7135

**Cuenca, Ecuador**

2023-10-30

## Resumen

El aumento descontrolado de población, los impactos ambientales, el cambio climático y la intensificación agrícola han incrementado la demanda global alimentaria. Esto ha creado la necesidad de buscar alternativas alimentarias como las microalgas, las cuales son fuentes proteicas que podrían mejorar el valor nutricional de los alimentos convencionales. Sin embargo, debido a su compleja estructura morfológica, es necesario explorar métodos que faciliten la ruptura de su pared y membrana celular para la extracción de las proteínas intracelulares. En el presente estudio se evaluaron dos tipos de tratamientos de las muestras, con y sin hidrólisis para conseguir una destrucción de las células microalgales que permita la liberación de las proteínas. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford y se describió el perfil de aminoácidos mediante HPLC. El proceso de hidrólisis mejoró notablemente la extracción proteica y la determinación del perfil de aminoácidos, ya que redujo las interferencias de matriz en los cromatogramas y permitió una mejor cuantificación de cada aminoácido. El contenido proteico determinado fue 0,89 mg/g en *Chlorella vulgaris*, 7,50 mg/g en *Nannochloropsis sp.*, 50,10 mg/g en *Spirulina platensis*, 1,69 mg/g en una posible especie de *Hapalosiphon*. Además, se analizaron dos especies no identificadas y codificadas como MAAL 29 (1,14 mg/g) y MAAL 32 (9,49 mg/g). *Spirulina platensis* y MAAL 32 fueron las microalgas con mejor potencial proteico. Estos resultados podrán utilizarse para evaluar la posibilidad de que las microalgas se conviertan en fuente de alimentos, aditivos o suplementos nutritivos.

*Palabras clave:* microalgas, compuestos proteínicos, aminoácidos



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

Uncontrolled population growth, environmental impacts, climate change and agricultural intensification have increased global food demand. This has created the need to look for food alternatives such as microalgae, which are protein sources that could improve the nutritional value of conventional foods. However, due to their complex morphological structure, it is necessary to explore methods that facilitate the rupture of their cell wall and membrane for the extraction of intracellular proteins. In the present study, two types of sample treatments were evaluated; with and without hydrolysis to achieve a destruction of the microalgal cells that allows the release of the proteins. Subsequently, the proteins were quantified by Bradford's method and the amino acid profile was described by HPLC. The hydrolysis process significantly improved the protein extraction and the determination of the amino acid profile, since it reduced matrix interferences in the chromatograms and allowed a better quantification of each amino acid. The protein content determined was 0.89 mg/g in *Chlorella vulgaris*, 7.50 mg/g in *Nannochloropsis sp.*, 50.10 mg/g in *Spirulina platensis*, 1.69 mg/g in a possible *Hapalosiphon* species. In addition, two unidentified species were analyzed and coded as MAAL 29 (1.14 mg/g) and MAAL 32 (9.49 mg/g). *Spirulina platensis* and MAAL 32 were the microalgae with the best protein potential to be scaled up. These results can be used to evaluate the possibility of microalgae as source of food, additives or nutritional supplements.

**Keywords:** microalgae, protein compounds, amino acids



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>9</b>
<b>Agradecimiento.....</b>	<b>11</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Marco teórico .....</b>	<b>16</b>
1.1. Microalgas y cianobacterias.....	16
1.1.1. Definición de microalgas y cianobacterias.....	16
1.1.2. Ejemplos y aplicaciones de microalgas y cianobacterias.....	17
1.1.2.1. Spirulina platensis.....	18
1.1.2.2. Chlorella vulgaris .....	18
1.1.2.3. Nannochloropsis sp. ....	19
1.1.3. Condiciones de cultivo .....	19
1.1.4. Calidad nutricional de las microalgas .....	20
1.1.5. Calidad proteica de microalgas .....	21
1.2. Métodos de extracción y separación proteica .....	22
1.2.1. Métodos no mecánicos .....	23
1.2.1.1. Shock osmótico .....	23
1.2.1.2. Métodos químicos.....	23
1.2.1.3. Pretratamiento enzimático .....	24
1.2.1.4. Método con detergentes .....	24
1.2.2. Métodos mecánicos .....	24
1.2.2.1. Molienda con perlas.....	24
1.2.2.2. Extracción por homogeneización a alta velocidad.....	25
1.2.2.3. Extracción por homogeneización a alta presión hidrostática .....	25
1.2.2.4. Ultrasonicación .....	25
1.2.2.5. Extracción asistida por irradiación de microondas .....	25
1.2.2.6. Pulso con campos eléctricos.....	26
1.3. Determinación de proteínas y aminoácidos .....	26
1.3.1. Aminoácidos .....	26
1.3.2. Método de Bradford .....	28
1.3.3. Análisis de aminoácidos.....	29
1.3.3.1. Análisis de aminoácidos por HPLC .....	29
1.3.3.2. Análisis de aminoácidos por cromatografía de gases (GC).....	30
1.3.3.3. Análisis de aminoácidos por espectrometría de masas.....	30

<b>2. Metodología.....</b>	<b>31</b>
2.1. Tipo de diseño de investigación.....	31
2.2. Material de estudio .....	31
2.3. Extracción, cuantificación de proteínas y análisis de aminoácidos.....	31
2.3.1. Materiales, reactivos y equipos .....	31
2.3.2. Extracción de proteínas.....	33
2.3.3. Precipitación de proteínas .....	33
2.3.4. Hidrólisis de la biomasa .....	34
2.3.5. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	34
2.3.5.1. Preparación del reactivo de Bradford.....	34
2.3.5.2. Solución patrón y curva de calibración.....	34
2.3.5.3. Procedimiento de microensayo .....	35
2.3.6. Análisis de aminoácidos por HPLC-FLD .....	36
2.3.6.1. Preparación de las muestras .....	36
2.3.6.2. Curvas de calibración .....	36
2.3.6.3. Procedimiento.....	37
2.3.7. Análisis de datos .....	37
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>39</b>
3.1. Extracción de proteínas .....	39
3.2. Cuantificación de la proteína total.....	41
3.3. Cuantificación de aminoácidos por HPLC-FLD .....	43
<b>4. Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>56</b>
4.1. Conclusiones .....	56
4.2. Recomendaciones .....	56
<b>Referencias .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>66</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructuras de aminoácidos esenciales.....	<b>27</b>
<b>Figura 2.</b> Cromatogramas de muestras de microalgas y cianobacterias hidrolizadas y no hidrolizadas.....	<b>51</b>
<b>Figura 3.</b> Aminoácidos prevalentes determinados de las muestras no hidrolizadas. ....	<b>53</b>
<b>Figura 4.</b> Aminoácidos prevalentes determinados de las muestras hidrolizadas .....	<b>54</b>

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1:</b> Valor teórico de aminoácidos según la FAO/WHO de distintos alimentos.....	<b>27</b>
<b>Tabla 2:</b> Preparación de curva de calibración de Bradford .....	<b>35</b>
<b>Tabla 3:</b> Tiempos de retención promedio con desviación estándar (DE) de los estándares de aminoácidos.....	<b>36</b>
<b>Tabla 4:</b> Concentraciones de proteína de muestras de microalgas y cianobacterias .....	<b>42</b>
<b>Tabla 5:</b> Perfil de aminoácidos de muestras de microalgas y cianobacterias no hidrolizadas ...	<b>44</b>
<b>Tabla 6:</b> Perfil de aminoácidos de muestras de microalgas y cianobacterias hidrolizadas .....	<b>45</b>

**Índice de anexos**

<b>Anexo A.</b> Procedimiento de extracción y precipitación proteica de muestras de microalgas y cianobacterias.....	<b>66</b>
<b>Anexo B.</b> Procedimiento de hidrólisis de microalgas y cianobacterias.....	<b>67</b>
<b>Anexo C.</b> Absorbancias de estándares de albúmina de suero bovina (BSA) .....	<b>68</b>
<b>Anexo D.</b> Curva de calibración de estándares de albúmina de suero bovina (BSA) .....	<b>68</b>
<b>Anexo E.</b> Procedimiento de cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	<b>69</b>
<b>Anexo F.</b> Curvas de calibración de estándares de aminoácidos.....	<b>70</b>
<b>Anexo G.</b> Áreas de las diferentes concentraciones de estándares de aminoácidos utilizadas para construir las curvas de calibración .....	<b>73</b>
<b>Anexo H.</b> Programación para la derivatización en el automuestreador del HPLC.....	<b>74</b>
<b>Anexo I.</b> Gradiente de fases móviles en relación con el tiempo de análisis .....	<b>74</b>
<b>Anexo J.</b> Contenido proteico total de especies de microalgas y cianobacterias . .....	<b>75</b>
<b>Anexo K:</b> Parámetros cromatográficos del método HPLC-FLD para la determinación de aminoácidos.....	<b>76</b>



## Dedicatoria

A mi papi Jonás Flores quien ha sido ejemplo de trabajo honesto, a mi mami Rosa Vizñay quien con su amor, cuidados y consejos ha sido ese rayito de luz desde mi niñez hasta la actualidad. Sé que ustedes anhelan esto tanto como yo, han sido testigos de cada paso, me han acompañado en triunfos y derrotas. Encuentren en estas letras una forma de expresar mi retribución por el apoyo brindado.

A mi hermana, Elizabeth Flores por alegrar momentos y convertirse en mi “asesora de imagen”. A mi sobrino Panchito Peralta quien con su dulzura y nobleza ha sido capaz de apaciguar situaciones difíciles.

A mis abuelitos, Antonio Vizñay y Lolita Nieves, a quienes admiro porque en vida fueron el fiel retrato de humildad, perseverancia y fe. A Juan Diego por su cariño incondicional.

A todos aquellos amigos quienes hicieron ameno este camino académico.

**Diana**

**Dedicatoria**

Con mucho amor para Sonia y Alberto, mis padres, mi guía, mi todo, lo mejor de mi vida, sin ellos no existiría la persona en la que me he convertido. Ustedes que no veían la hora de verme realizado y yo de hacerlos sentir orgullosos.

A toda mi familia, especialmente aquella que yace en el exterior. A mis tíos Mario y Polivio quienes siempre estuvieron prestos a brindarme su apoyo incondicional, gracias por todos sus años de sacrificio, por no desmayar, porque nunca se olvidaron de nosotros, este también es su logro, este también es el fruto de su esfuerzo.

**Andrés**

### **Agradecimiento**

Al Padre Dios quien con su amor infinito y por medio de Cristo Jesús me ha conducido en el sendero de la vida, me ha impulsado a no desmayar frente a dificultades y me ha proporcionado salud y sabiduría para enmendar defectos y pulir virtudes.

A la Universidad de Cuenca, a la Facultad de Ciencias Químicas, al Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias, a compañeros, amigos y docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia; de manera especial a la Dra. Johana Ortiz, tutora del trabajo de titulación, por la guía y conocimientos impartidos. Le agradezco por corregir todos aquellos errores de tesis, con paciencia y constancia. Al BqF. Jorge Saquicela por el acompañamiento para realizar este trabajo. Le agradezco por el tiempo que se tomó para instruirme en el manejo del equipo HPLC.

A Andrés, gracias por el compromiso y esfuerzo mutuo.

**Diana**

### **Agradecimiento**

Quiero agradecer a Dios por permitirme disfrutar de mi familia, por fortalecer y corregir mi actitud. A mis compañeros y docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia. A mis mejores amigos Axel, Miguel y Emilia, por su lealtad, buena compañía y por convertirse en mi familia, los llevo conmigo para siempre. A la Dra. Johana Ortiz por su tutela, paciencia y confianza depositada en nosotros. A nuestro tutor y amigo Jorge Saquicela, por la alegría y carácter positivo con el que siempre guío nuestro trabajo de titulación. A Gisela por acompañarme con su amor. A todas esas personas que con su travesía lograron ser luz y compañía en los buenos y malos momentos durante esta etapa de mi vida.

A Diana por su compromiso, responsabilidad y entrega compartida.

**Andrés**

## Introducción

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos, se estima que comprenden 200.000 especies, la mayoría de ellas no han sido estudiadas ni comercializadas. Constituyen un gran medio de explotación como fuente de proteínas sostenibles para la alimentación humana. El contenido de proteínas varía entre especies; muchas de ellas pueden contener del 40-60 % de proteína de la materia seca. Las especies de microalgas y cianobacterias que han sido empleadas como proteínas alimentarias y suplementos dietéticos son *Chlorella sp.*, *Scenedesmus obliquus* y *Arthrospira sp.* La mayoría de especies contienen una cantidad suficiente de aminoácidos esenciales (Wang et al., 2021).

El estilo de vida occidental, el incremento de la población y la alimentación a base de productos de origen animal han introducido nuevas enfermedades y desafíos que amenazan a la seguridad alimentaria, en todo el mundo (Eilam et al., 2023). Estudios sugieren que la producción mundial de alimentos da lugar al 30 y 34 % de las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero. Las tecnologías usadas para intensificar la agricultura van a dejar de ser opciones sostenibles, pues implican alteraciones de hábitats naturales, riesgos para la biodiversidad, desertificación para la producción ganadera, deforestación y daño a ecosistemas acuáticos y terrestres por el uso de fertilizantes químicos (Wang et al., 2021). Como fruto de la exacerbación del cambio climático, surge la inseguridad alimentaria, pues para el año 2050 disminuirá los rendimientos de los principales cultivos en un 17 % y aumentará los precios de mercado en un 20 % (Hasegawa et al., 2018).

En Ecuador, el 6,4 % de la población nacional presenta un consumo inadecuado de proteína. De este se destaca como poblaciones con consumos no acorde a las recomendaciones sugeridas, a la población indígena (10,4 %), adultos entre 51 y 60 años (19,9 %), población de la Sierra rural (10,9 %), mujeres (7,3 %) y hombres (5,5 %) en general. Además, en Ecuador, los alimentos que más contribuyen al consumo diario de proteínas son el arroz y el pollo. Sin embargo, el valor biológico de la proteína de arroz es inferior en comparación a otros alimentos. Así, el hecho de que el arroz sea el alimento que más aporta a la ingesta de proteína, se explica por la excesiva cantidad de arroz que se consume diariamente, mas no porque este alimento sea una buena fuente de proteína (ENSANUT, 2013).

En este contexto, es necesario buscar fuentes alternativas, que respondan a la necesidad del consumidor sobre la selección de productos nutritivos y sostenibles. Entre la variedad de

opciones se hallan sustitutos a base de plantas, proteínas unicelulares de levadura, carne cultivada a partir de células madre satélite de músculo esquelético e insectos (Gómez-Luciano et al., 2019). Ciertamente, las microalgas constituyen una potencial alternativa, pues su contenido proteico es comparable con alimentos como la carne de ave, huevos y pescados (Kusmayadi et al., 2021). Incluso, se ha manifestado que las proteínas de microalgas juegan un papel esencial contra las modernas epidemias de obesidad y diabetes; por lo que deben ser considerados alimentos del futuro (Ramos-Romero et al., 2021). En la actualidad, la mitad de proteínas y péptidos, del mercado mundial procede de plantas terrestres. Además, se espera que para el año 2054, sean sustituidas por proteínas derivadas de microalgas (Eilam et al., 2023).

Un factor limitante en la introducción de aminoácidos de microalgas domésticas en la producción de suplementos dietéticos es la ausencia de información sobre la composición de aminoácidos y el escaso conocimiento de sus propiedades. Las ventajas de los aminoácidos de microalgas sobre los aminoácidos sintéticos obtenidos por conversiones enzimáticas aplicadas en la ingeniería de proteínas tanto para humanos como para ganado, son salubridad, fácil digestibilidad y baja toxicidad (Andreeva et al., 2021). Las observaciones anteriores señalan la necesidad evaluar el contenido proteico de distintas especies, que han sido previamente cultivadas en condiciones específicas. Esto, como punto de partida para posteriores investigaciones en donde se plantee diversos enfoques como la asociación de microalgas con otras fuentes proteicas, integración en formulaciones de alimentos. Además, es útil como foco de interés de las propiedades funcionales, partiendo de los hallazgos del perfil de proteínas.

## Objetivos

### Objetivo General

- Determinar el contenido proteico de distintas microalgas como fuente alternativa proteica.

### Objetivos Específicos

- Determinar el contenido proteico total y la composición de aminoácidos de las microalgas y cianobacterias cultivadas in vitro *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis sp.*, *Spirulina platensis*, posible *Hapalosiphon* y dos especies sin identificar (MAAL 29 y MAAL 32).
- Establecer similitudes y diferencias en la composición proteica entre los tipos de microalgas y cianobacterias evaluadas.
- Establecer similitudes y diferencias en la composición de aminoácidos entre microalgas y cianobacterias hidrolizadas y no hidrolizadas.

## 1. Marco teórico

### 1.1. Microalgas y cianobacterias

#### 1.1.1. Definición de microalgas y cianobacterias

Las microalgas son microorganismos eucarióticos unicelulares que crecen dentro de un amplio rango de temperaturas y pH. Se hallan principalmente en entornos acuáticos incluidos ambientes de agua dulce, salobre, marino e hipersalino. Su tamaño celular es menor a 10  $\mu\text{m}$ . En comparación con las plantas terrestres son menos diferenciadas, de rápido crecimiento y no presentan competencia por tierra cultivable. Se agrupan en base a un enfoque polifilético, es decir, que tienen rasgos similares, pero no el mismo ancestro a nivel evolutivo. Tienen niveles apreciables de metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas (Qie et al., 2019).

Por otro lado, las cianobacterias, también conocidas como algas verdes azuladas, son procariotas, con un tamaño menor a 30  $\mu\text{m}$ , pueden ser unicelulares o pluricelulares y se agrupan en el reino de las Eubacterias (Grossmann et al., 2020; Ji et al., 2022). La importancia de las cianobacterias radica en su evolutiva actividad fotosintética, ya que fueron el primer grupo que evolucionó para fijar el dióxido de carbono atmosférico en carbono orgánico (Lafarga et al., 2020).

Las cianobacterias y microalgas crecen gracias a la fotosíntesis oxigénica y están protegidos por una pared celular. Su ingesta energética exige agua, luz, dióxido de carbono, fósforo y nitrógeno como nutrientes principales. La facilidad de producir biomasa que satisfaga las necesidades alimentarias sin comprometer a futuras generaciones, explica porque se hallan ampliamente distribuidas en ecosistemas marinos, de agua dulce, aguas termales, rocas áridas de desiertos y hábitats terrestres. Además, permiten reciclar el agua y disminuir las emisiones de gases contaminantes (Ferrazzano et al., 2020).

Aunque las microalgas y cianobacterias son organismos que comparten aspectos similares, presentan ciertas diferencias, entre las que se destacan:

- Las microalgas usan mitocondrias para su respiración, mientras que las cianobacterias emplean directamente sus membranas tilacoides.
- Las microalgas poseen una estructura celular más compleja con organelos unidos a membranas, lo cual no se observa en cianobacterias.
- Las cianobacterias pueden contener cianoficina, que constituye un almacén de nitrógeno



formado por ácido L-aspartico y L-arginina (Lafarga et al., 2020).

- La composición de la pared celular de microalgas es muy variable y puede estar compuesta de escamas multiformes, cubiertas orgánicas mineralizadas o recubrimientos cristalinos de glicoproteínas. Por su parte, la pared celular de las cianobacterias consiste en una capa de peptidoglicano con un grosor de 10-700 nm formado por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, y también tienen una membrana externa formada por proteínas, lípidos y carotenoides (Grossmann et al., 2020). La pared celular es una barrera protectora que varía de grosor contra los factores ambientales de acuerdo a los rasgos genéticos de cada cepa (Zhang & Volkman, 2017).
- Las microalgas tienen pigmentos fotosintéticos que les permiten absorber diferentes longitudes de onda de luz, lo que les otorga una variedad de colores; mientras que las cianobacterias tienen pigmentos que suelen ser de color verde azulado debido a que poseen la ficocianina (Lafarga et al., 2020).
- Las microalgas crecen en forma libre o en colonias, y las cianobacterias de forma general lo hacen en colonias (Lafarga et al., 2020).

En cuanto a su composición, se ha reportado que las cianobacterias tienen una mayor cantidad de proteínas y carbohidratos (43,1 % y 21,8 % respectivamente) y menos lípidos y cenizas (11,7 % y 8,1 % respectivamente) como porcentaje de peso seco, en comparación con los filos de microalgas eucarióticas (Lafarga et al., 2020).

### **1.1.2. Ejemplos y aplicaciones de microalgas y cianobacterias**

Las microalgas y cianobacterias se cultivan para el consumo humano en Asia, Europa, Estados Unidos y Australia desde hace varias décadas (Niccolai et al., 2019). En los últimos años, han incrementado las biotecnologías de cultivo, recolección y extracción de microalgas. Su comercialización se destina a productos de interés económico, tales como productos farmacéuticos, lubricantes, cosméticos, agentes antimicrobianos, biocombustibles, entre otros. Adicionalmente, tienen aplicaciones en criaderos de acuicultura, las células vivas se utilizan en la biorremediación de desechos agrícolas, tratamiento de aguas residuales y eliminación de contaminantes orgánicos. Se emplean en la cría de animales y en la agricultura como suplemento para ganado, aves de corral y biofertilizantes. Además, se emplean en la industria de alimentos para el desarrollo de aditivos, tintes, alimentos funcionales y bebidas (Abu-Ghosh et al., 2021; Ferrazzano et al., 2020).

Las especies de microalgas más cultivadas con fines comerciales son *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Schizochytrium* sp. (Ferreira de Oliveira & Ariseto, 2022). Las especies de *Spirulina*, *C. vulgaris*, *Tetraselmis chui* y *Nannochloropsis oceánica* se han empleado en el desarrollo de cremas vegetales ricas en proteínas (Boukid et al., 2021). Así mismo, *Arthrospira*, *Chlorella* y *Aphanizomenon* son los géneros mayormente utilizados para consumo humano debido a su alto contenido en nutrientes esenciales (Niccolai et al., 2019).

#### 1.1.2.1. *Spirulina platensis*

*Spirulina* es el género más conocido de cianobacterias y es la más cultivada en todo el mundo, pues se le atribuye más del 30 % de la producción mundial de biomasa de microalgas. Su nombre comercial describe principalmente a dos especies de cianobacterias: *Arthrospira platensis* y *Arthrospira máxima*. La *Spirulina* se caracteriza por su alto contenido en proteína, alrededor del 60 % en peso seco y puede llegar hasta un 70 % cuando se cultiva en condiciones no limitadas por nitrógeno. La mayor parte de biomasa producida en la actualidad se consume como un suplemento nutricional, promocionado a manera de “superalimento” y se comercializa como polvo seco o cápsulas (Lafarga et al., 2020).

Estudios han demostrado que *S. platensis* tiene uno de los contenidos de proteínas más altos encontrados. En términos de cultivo, el mayor contenido de proteínas se obtiene aumentando la tasa de suministro de nitrógeno hasta un nivel de umbral máximo. Posee aminoácidos esenciales en las proporciones recomendadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los cuales se comparan con estándares proteicos de origen animal (Lupatini et al., 2017). Su alto contenido de proteína C-ficocianina tiene un rol no solo alimenticio, sino también en los campos de medicina y biotecnología (Lopes et al., 2020). Por otro lado, el color verde de *Spirulina* se convierte en un elemento para satisfacer las demandas de consumidores y empresas de alimentos que se han vuelto “verdes” durante las últimas décadas (Lafarga et al., 2020).

#### 1.1.2.2. *Chlorella vulgaris*

El género *Chlorella* posee una pared celular rígida y gruesa con un diámetro de 17-22 nm; incrustada dentro de una matriz polimérica plástica que contiene ácidos urónicos, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, glucosa, entre otros. El porcentaje de proteína cruda de *Chlorella* es de 51-58 %; del cual el 20 % de las proteínas totales de sus células vegetativas están unidas a la pared celular, el 50 % se localizan en el interior de la célula y el 30 % migran

hacia dentro y fuera de la célula (Grossmann et al., 2020). La calidad nutritiva de *Chlorella* está influenciada principalmente por el ambiente de luz durante la etapa de cultivo, pues se ha visto que la mayor producción de proteína se obtiene con el incremento de la irradiación de luz y el mayor fotoperíodo (Chia et al., 2019).

#### 1.1.2.3. *Nannochloropsis* sp.

El género *Nannochloropsis* comprende seis especies conocidas: *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. oceánica*, *N. oculata* y *N. australis* (Motlagh et al., 2021). *Nannochloropsis* es una pequeña microalga marina con forma esférica u ovoide, sus células muestran un tamaño 3-5  $\mu\text{m}$ , con un solo cloroplasto ocupando un gran volumen de la célula. Posee una pared celular fuerte compuesta por una estructura bicapa, que le confiere gran robustez mecánica. Es ampliamente conocida por la producción de ácidos grasos omega-3, específicamente ácido eicosapentanoico. También, su contenido de proteína total es considerable, siendo hasta 50 % del peso seco (Ribeiro et al., 2022). Este género tiene casi un 80 % de carbohidratos y alrededor de un 6 % de proteínas en la pared celular (Machado et al., 2022).

#### 1.1.3. Condiciones de cultivo

El contenido celular varía según la cepa específica de algas y sus respuestas fisiológicas a los factores bióticos y abióticos a los que son expuestos durante su crecimiento en la fase de cultivo, lo cual también repercute en su composición bioquímica (Barkia et al., 2019). Con este criterio, se pueden diferenciar cuatro tipos principales de condiciones de cultivo para las microalgas: fototrófico, heterótrofo, mixotrófico y fotoheterótrofo (Qie et al., 2019).

La productividad y la composición de nutrientes en microalgas y cianobacterias se mejora mediante estrategias de cultivo y parámetros que deben ser ajustados para cada microalga en específico. Así, la optimización del medio de cultivo, la intensidad de la luz y el pH posibilita una producción específica de metabolitos de interés. En particular, el parámetro más importante para inducir la biosíntesis de proteínas es proporcionar al medio de cultivo compuestos que contengan nitrógeno (Grossmann et al., 2020; Lopes et al., 2020).

Si las algas se cultivan en un medio pobre en nitrógeno, la división celular disminuye causando que las células generen menos proteínas y acumulen mayor cantidad de polisacáridos o lípidos. Otros parámetros para incrementar la productividad de proteínas son la intensidad de la luz, la temperatura, el suministro y fuente de carbono. Los nutrientes, incluido el dióxido de carbono

deben ser ajustados de acuerdo a la cepa, siendo generalmente 1,8 kg de dióxido por kilogramo de biomasa. En cuanto a la temperatura, ésta se define de acuerdo a la especie, y suele ser entre 20 y 25 °C (Grossmann et al., 2020; Lopes et al., 2020).

#### **1.1.4. Calidad nutricional de las microalgas**

El rendimiento de la proteína de las microalgas se reporta en 4-15 ton/Ha/año en comparación con la producción de cultivos terrestres de trigo (1,1 ton/Ha/año), legumbres (1-2 ton/Ha/año) y soja (0,6-12 ton/Ha/año). A nivel mundial, la producción de cultivos terrestres por medio de la agricultura es responsable del 75 % del agua dulce total utilizada. Las fuentes de proteína animal consumen 100 veces más agua en comparación a fuentes vegetales para extraer proteína equivalente. Las microalgas marinas se pueden cultivar sin agua dulce y tierra cultivable, lo cual posibilita optimizar recursos para la producción de cultivos terrestres. Otra ventaja que ofrecen es que las microalgas desarrollan un sistema de protección natural a través de la producción de antioxidantes y pigmentos. Esto se explica porque viven en condiciones ambientales extremas que las exponen a radicales libres. Además, en las microalgas existen componentes útiles para la suplementación humana, como clorofilas, carotenos y ficobiliproteínas que cobran importancia al no ser sintetizados por el organismo humano (Tan et al., 2020).

El cultivo de algas es una estrategia prometedora que podría disminuir el impacto demográfico y el desmesurado aumento de emisiones ocasionadas por la actividad humana en el futuro. Esto es por su uso para la producción de biocombustibles avanzados, biodiesel o producción de bioaceites, así como también por su potencial utilidad para la producción de alimentos aprovechando su gran cantidad de proteínas y alto contenido en aminoácidos esenciales (Lopes et al., 2020).

Las microalgas representan una fuente valiosa como materias primas innovadoras para la industria de alimentos funcionales. Las microalgas pueden convertir moléculas como el dióxido de carbono o el amonio en macromoléculas de valor añadido, como son las proteínas (Lopes et al., 2020). El 50 % del mercado mundial de proteínas y péptidos se obtienen de plantas terrestres y pueden ser reemplazadas por proteínas provenientes de microalgas e insectos (Grossmann et al., 2020; Lopes et al., 2020). Las microalgas se comercializan ampliamente en países del continente asiático, específicamente en China, Japón y Corea, en donde son cotizadas por poseer niveles importantes de carbohidratos, proteínas, enzimas y fibra, vitamina A, C, B1, B2 y B6, niacina, yodo, potasio, hierro, calcio y magnesio (Bilal et al., 2017).

El consumo de biomasa a base de microalgas se encuentra restringido a pocos taxones que dominan el mercado alrededor del mundo: *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* y *Aphanizomenon*, siendo *Chlorella* y *Spirulina* las principales. La biomasa de *Spirulina*, ya sea como extracto o procesada es utilizada en el mercado de nutraceuticos y alimentos funcionales. Por ejemplo, es utilizada en galletas o pasta para favorecer la funcionalidad del tracto digestivo. Así mismo, la suplementación con biomasa de *Spirulina* aumenta la tasa de crecimiento de los lactobacilos. En Francia, Alemania, Japón, Estados Unidos, China y Tailandia se trabaja en amalgamas de microalgas y cianobacterias para la comercialización de alimentos funcionales (Bilal et al., 2017).

### 1.1.5. Calidad proteica de microalgas

Las proteínas están presentes en distintas partes de la célula como orgánulos, plástidos, pared celular, núcleo o citoplasma. Las proteínas se generan gracias a una gran variedad de numerosos genes codificadores. Por ejemplo, *Spirulina platensis* muestra 6630 genes que codifican proteínas, mientras que cepas de *Chlorella* presentan de 9349 a 10240 de estos genes. A pesar de ello, el número de genes codificadores de proteínas no se relaciona de forma directa con el contenido de proteína que pueda tener la microalga. Tal es el caso de *Chlorella* y *Spirulina* que tienen menos de estos genes en comparación a otros géneros como *Haematococcus* que presentan un mayor contenido proteico. Una de las proteínas más importantes involucrada en la fijación de carbono inorgánico durante la fotosíntesis y que se halla en los cloroplastos de las microalgas es la ribulosa bifosfato carboxilasa-oxígeno (Rubisco). Ésta ha sido propuesta como una fuente potencial proteica para la nutrición (Lopes et al., 2020).

Las proteínas de microalgas son similares a proteínas obtenidas de plantas vasculares. Sin embargo, además de la productividad proteica es indispensable evaluar las características intrínsecas de cada especie, pues estas pueden dificultar o facilitar el acceso a las proteínas en la alimentación. Los parámetros para evaluar la calidad de la proteína son la composición de aminoácidos, la biodisponibilidad y la digestibilidad, influidos a su vez por el método usado para la extracción de la misma (Lopes et al., 2020). Ciertas especies de microalgas presentan un contenido de proteínas relativamente alto, tales como *Arthrospira maxima* (60-71 % peso seco - p.s.), *Chlorella vulgaris* (51-58 % p.s.) y *Scenedesmus obliquus* (50-56 % p.s.). Las cianobacterias suelen exhibir un contenido proteico (51-64 % p.s.) superior en comparación con el guisante (21 % p.s.), la soja (34 % p.s.), el huevo (47 % p.s.), la leche (26 % p.s.), la carne (42 % p.s.) y el arroz (8 % p.s.) (Machado et al., 2022; Niccolai et al., 2019).

Las microalgas contienen todos los aminoácidos esenciales, incluso el perfil de aminoácidos puede compararse con fuentes proteicas de alta calidad como la lactoglobulina, la albúmina de huevo y soya (Barkia et al., 2019). En particular, las microalgas constituyen una fuente importante de isoleucina, valina, lisina, triptófano, metionina, treonina e histidina (Qie et al., 2019).

## 1.2. Métodos de extracción y separación proteica

A pesar del alto contenido de proteínas de las microalgas, uno de los principales problemas es acceder a ellas, ya que su pared celular es rica en celulosa,  $\beta$ 1-3 glucano, lípidos, glucosamina proteínas y materia inorgánica. Esto provoca rigidez y dificulta la digestión, limitando la extracción de proteínas y liberación de péptidos. Por cuanto, es necesario debilitar o romper la pared celular para que el proceso extractivo sea eficiente. Se prefieren métodos menos agresivos para no destruir las proteínas, como la hidrólisis química y enzimática. Los cuales resultan más sencillos y económicos, además los hidrolizados aumentan la biodisponibilidad y valor biológico como ingredientes para alimentos o aplicaciones nutraceuticas. Sin embargo, también se emplean métodos mecánicos más agresivos, como la molienda con perlas y la homogeneización a alta presión, que implica la disponibilidad de esos equipos (Cunha et al., 2022).

Se debe considerar que el rendimiento y calidad de los compuestos extraídos depende de la eficiencia del método de disrupción celular escogido, ya que la rígida pared celular de las microalgas dificulta la liberación de su contenido intracelular, por lo cual un proceso de pretratamiento es usualmente requerido para lograr la extracción de los compuestos algales. Este tratamiento se diseña en función de propiedades biológicas y físicas como la rigidez, tamaño y estructura de la pared celular de las microalgas (Liu et al., 2022).

La selección del método óptimo de disrupción celular depende de la biología de la especie, las características de su pared celular y su tamaño, ya que ambas pueden afectar la efectividad del tratamiento de disrupción, el compuesto objetivo y su aplicación. Otras consideraciones incluyen condiciones operativas como la temperatura y la micronización de los desechos celulares que pueden complicar los procesos posteriores durante la separación fina y la purificación del producto de alto valor (Stirk et al., 2020).

Por otro lado, la extracción de componentes, microelementos celulares iónicos, aminoácidos y proteínas solubles en agua son parámetros que dependen de la permeabilidad de la membrana celular y se definen mediante la medición de la conductividad eléctrica, lo cual es considerado un indicador de daño en la membrana. Este es considerablemente mayor en la biomasa

lío-filizada, en comparación con cultivos mantenidos en suspensión, lo que indica que la lio-filización causa daños en la membrana para la extracción de la mayoría de compuestos de bajo peso molecular (Stirk et al., 2020).

Existen varias tecnologías de pretratamiento que han sido desarrolladas últimamente. En general, los métodos de disrupción pueden clasificarse ampliamente en métodos mecánicos y métodos no mecánicos (Rahman et al., 2022). También pueden clasificarse de acuerdo a métodos físicos como molienda, homogeneización, ultrasonicación e irradiación por microondas, según métodos químicos que incluyen tratamientos alcalinos, ácidos, oxidativos, de líquidos iónicos, de fluidos supercríticos y de conversión hidrotermal, o según métodos biológicos donde consta la hidrólisis enzimática y la lisis de células mediante uso de bacterias alquicidas (Liu et al., 2022).

### **1.2.1. Métodos no mecánicos**

Los métodos no mecánicos son comúnmente usados para la disrupción de la pared celular de las microalgas permitiendo la liberación de sus moléculas biológicas intracelulares. Se incluyen métodos como shock osmótico, métodos químicos, pretratamiento enzimático y métodos con aplicación de detergentes (Rahman et al., 2022).

#### *1.2.1.1. Shock osmótico*

El shock osmótico consiste en la reducción brusca de la presión osmótica cuando se aplica una alta concentración de solutos alrededor de una célula. Se realiza con el afán de reducir la presión, causar daño a la pared celular y permitir la liberación del contenido intracelular de las microalgas. El shock osmótico se genera cuando las células son sometidas a un choque hipo o hipertónico (Boer et al., 2012). Su uso, sumado a técnicas como el pretratamiento enzimático y ultrasonido, ha sido optimizado ajustando la concentración de enzimas, el tiempo y duración del tratamiento, asegurando mejores resultados de recuperación y sostenibilidad de proteínas (Rahman et al., 2022).

#### *1.2.1.2. Métodos químicos*

Productos químicos como solventes orgánicos, surfactantes, hipocloritos y agentes quelantes, en combinación con técnicas mecánicas, son aplicados para la disrupción celular de cepas de microalgas para extraer proteínas y carbohidratos. Las técnicas asistidas por estas sustancias son muy utilizadas gracias a su simplicidad y conveniencia para la operación a diversas escalas



de producción. Sin embargo, hay que considerar que los principales desafíos son el tiempo de extracción más prolongado y un mayor consumo de energía (Rahman et al., 2022).

#### *1.2.1.3. Pretratamiento enzimático*

La hidrólisis enzimática otorga condiciones suaves de rompimiento celular, es de bajo requerimiento energético, alta especificidad y no aumenta la temperatura durante la reacción. Es un método, que, de acuerdo a la composición celular, emplea enzimas como proteasa, celulasa, driselasa, xilanasa, amilasa, lisozima, viscozima y glucosidasa para maximizar la extracción de compuestos intracelulares (Liu et al., 2022). Tiene un rendimiento de extracción de 0,7 mg por mg de peso de célula seca, el cual es mayor en comparación con técnicas convencionales en los que suele haber también un aumento de temperatura. Además, el pretratamiento enzimático no debe realizarse cuando la proteína de interés se encuentra en las enzimas, ya que puede haber interferencias. La duración de la hidrólisis enzimática dependerá de la extensión de los sitios de escisión específicos disponibles para cada enzima (Sedighi et al., 2019).

#### *1.2.1.4. Método con detergentes*

Los detergentes (ácidos o álcalis) se emplean para debilitar la membrana celular y liberar los metabolitos contenidos dentro, así también como para mejorar la difusión del solvente para que pueda extraer los compuestos celulares (Rahman et al., 2022).

### **1.2.2. Métodos mecánicos**

Son métodos alternativos de disrupción celular que facilitan el proceso de extracción, pues superan la rigidez intrínseca de la pared celular (Al-Zuhair et al., 2017). La selección del método debe considerar factores como la naturaleza de las biomoléculas, la escalabilidad, la energía de entrada, la composición de la pared celular y la concentración de biomasa (Rahman et al., 2022).

#### *1.2.2.1. Molienda con perlas*

Es un método en el que las partículas son molidas y dispersadas por la fuerza de colisión generada entre las células y las perlas de batido de cerámica, vidrio o aluminio, cuyo diámetro y carga define la eficacia de la lisis celular (Rahman et al., 2022). Al aplicar este método por al menos 5 minutos es posible lograr una ruptura en el 70-80 % de las células tratadas (Stirk et al., 2020). Se considera el método más eficaz para liberar proteínas intracelulares, incluso de células microbianas resistentes, pero exceder esta actividad no necesariamente aumenta la



concentración de proteínas extraídas (López et al., 2010).

#### *1.2.2.2. Extracción por homogeneización a alta velocidad*

Este método rompe las células de las microalgas gracias a la integración de dos técnicas, la homogeneización a alta velocidad y la extracción por cavitación dinámica, donde la muestra previamente homogeneizada y cizallada es sometida a una cámara de cavitación en condiciones de vacío, presión negativa y temperatura controlada, provocando explosiones celulares que permiten acceder a los compuestos bioactivos de interés. Las desventajas de su aplicación recaen en el alto consumo de energía y la posible desnaturalización proteica, por lo cual se usa a escalas industriales y por periodos cortos de tiempo (Guo et al., 2019).

#### *1.2.2.3. Extracción por homogeneización a alta presión hidrostática*

Es un método mecánico que disminuye el tamaño de partículas o lisa las células, a través de líquidos en condiciones de presión elevadas (20 a 120 mPa) que aumentan la presión hidrostática, y permiten ingresar mayor cantidad de solvente a las células, recuperando una mayor cantidad de compuestos bioactivos. Este método aún se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo y necesita más investigación (Briones-Labarca et al., 2015; Rahman et al., 2022).

#### *1.2.2.4. Ultrasonicación*

La disrupción celular es mediada por energía ultrasónica mediante ondas acústicas del ultrasonido, las cuales tienen frecuencias oscilantes más altas que el rango de audición humana, entre 20 kHz a 10 MHz. Esta energía se transfiere a una solución líquida que genera una presión negativa, formando burbujas llenas de gas que van aumentando de tamaño y colapsan violentamente, liberando grandes cantidades de energía que ocasionan efectos físicos y químicos que producen la ruptura (Liu et al., 2022; Rahman et al., 2022).

La sonicación es más adecuada para las paredes celulares de microalgas con baja resistencia química y no tanto para las de alta resistencia. Además, este método aumenta la permeabilidad de la membrana celular considerablemente, logrando una disrupción entre el 10-20 % (Stirk et al., 2020). Sin embargo, su alta probabilidad de dañar compuestos resulta contraproducente, en especial si se tratara de proteínas bioactivas (López et al., 2010).

#### *1.2.2.5. Extracción asistida por irradiación de microondas*

La irradiación de microondas electromagnéticas, generalmente a 2450 MHz, junto con el aumento de temperatura y presión, calientan la matriz de solventes que están en contacto con las muestras. La ruptura se produce cuando el agua que está en el interior de la célula se evapora y genera una enorme presión sobre las paredes celulares, rompiéndolas y liberando los compuestos bioactivos que contiene, a una mayor velocidad y con una recuperación similar a los métodos de extracción convencionales (Torres, 2019).

#### *1.2.2.6. Pulso con campos eléctricos*

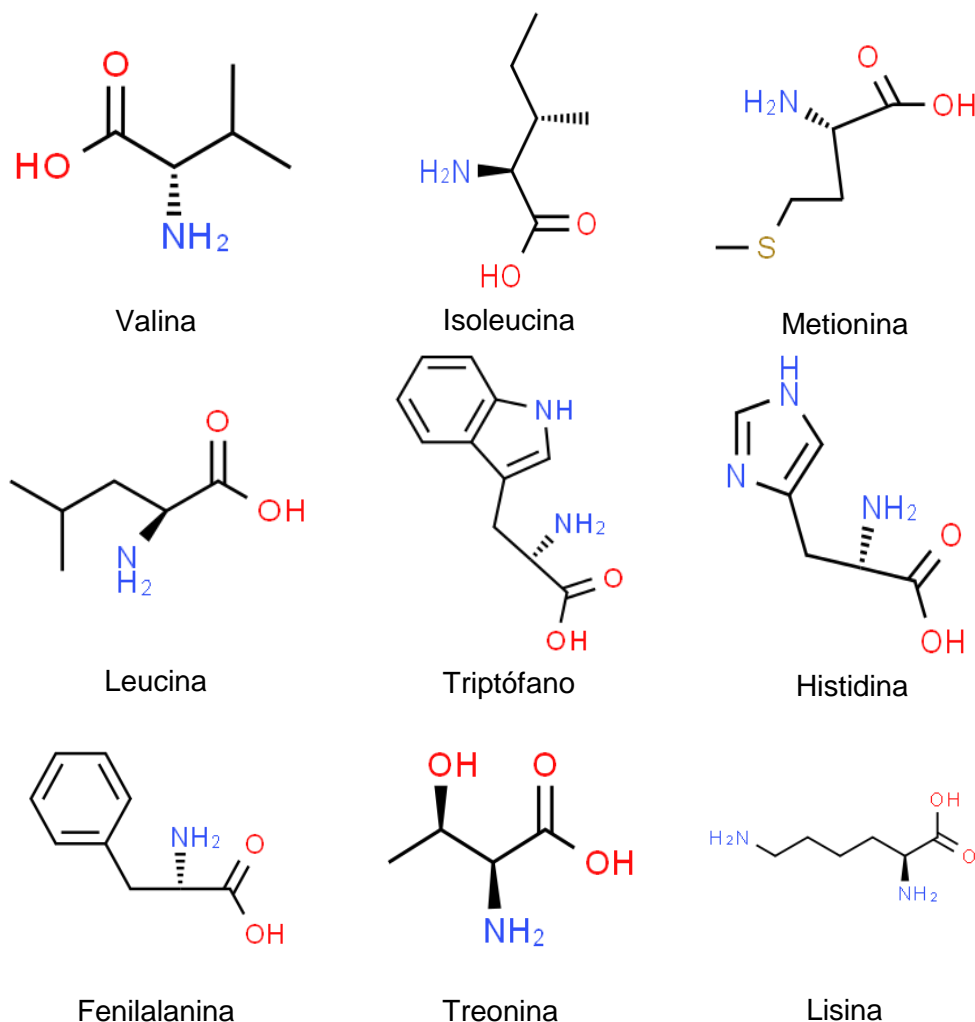
Es un tratamiento con descargas eléctricas intensas (1-80 kV/cm) durante 2 a 20 microsegundos, para romper la membrana celular y provocar electroporación, creando agujeros en ella. Durante la ruptura se generan burbujas, cavitación y turbulencia en el líquido, facilitando el acceso a los componentes intracelulares de las microalgas (El Kantar et al., 2019). Se favorece la transferencia de masa y se mejora la eficiencia en el procesamiento de alimentos, especialmente en aquellos con altas concentraciones de proteínas, ya que permiten que la corriente eléctrica aplicada fluya de mejor manera dentro del campo (Vivanco et al., 2021).

### **1.3. Determinación de proteínas y aminoácidos**

#### **1.3.1. Aminoácidos**

Los aminoácidos (aa) son compuestos orgánicos que poseen un grupo amino primario o secundario unido a una cadena lateral variable. Tienen propiedades anfóteras, ya que los grupos funcionales donan o aceptan un protón. El punto isoeléctrico de los aminoácidos depende de los valores de pH de los grupos ionizables de la molécula (Lestari et al., 2022).

Los aa esenciales son aquellos cuyos esqueletos de carbono no se sintetizan de novo o que su síntesis no cubre las necesidades metabólicas en células animales. Los aa esenciales deben ser obtenidos de manera externa, a través de la dieta. Los aa esenciales son histidina, isoleucina, cistina, metionina, leucina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, treonina y valina (Figura 1). Los alimentos de origen vegetal contienen menor cantidad de lisina, metionina, treonina y triptófano en comparación a alimentos de origen animal (Hou & Wu, 2018).



**Figura 1:** Estructuras de aminoácidos esenciales. Fuente: (Royal Society of Chemistry, n.d.).

En el 2007, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación/ Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) propuso un contenido de aminoácidos esenciales obtenidos a partir de una proteína o mezcla de proteínas (Tabla 1) en referencia al perfil de aminoácidos del huevo y la soya que presentan un contenido adecuado para los aminoácidos considerados esenciales (isoleucina, leucina, valina, lisina, fenilalanina, tirosina, metionina, cisteína, triptófano, treonina e histidina) (Lopes et al., 2020; FAO, 2007).

**Tabla 1:** Valor teórico de aminoácidos según la FAO/WHO de distintos alimentos expresados en g/100 g proteína. Fuente: Lopes et al. (2020).

Aminoácido	FAO/WHO*	Huevos	Soya	Maíz
Isoleucina	4	6,6	5,3	3,4
Leucina	7	8,8	7,7	11,2

Valina	5	7,2	5,3	4,9
Lisina	5,5	5,3	6,4	3,2
Fenilalanina + tirosina	6	10	8,7	8,9
Metionina + cisteína	3,5	5,5	3,2	3,3
Triptófano	1	1,7	1,4	4,4
Treonina	-	5	4	3,7
Alanina	-	-	5	7,2
Arginina	-	6,2	7,4	5,1
Aspartato	-	11	1,3	6,8
Glutamato	-	12,6	19	17,6
Glicina	-	4,2	4,5	4,1
Histidina	-	2,4	2,6	-
Prolina	-	4,2	5,3	8,5
Serina	-	6,9	5,8	4,6

\* Valores recomendados de FAO/WHO obtenido a partir de una proteína o mezcla de proteínas de varios productos alimenticios.

### 1.3.2. Método de Bradford

Este método se basa en la reacción entre las proteínas presentes en la muestra con el reactivo de Bradford que contiene Azul de Coomassie Brillante G-250, lo que causa que el tinte cambia de color marrón-rojizo a azulado, desplazando la máxima absorción de la coloración desde 465 nm hasta 595 nm. La unión se atribuye a la atracción electrostática que un grupo sulfónicos (Kielkopf et al., 2020). El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. Al igual que otros métodos de coloración, el método de Bradford se basa en la naturaleza anfótera de las proteínas. La eficiencia de la unión se ve mejorada por la interacción hidrofóbica del colorante con la columna vertebral polipeptídica contigua que está cargada positivamente por residuos de proteína (Nielsen, 2017). La concentración del contenido de proteínas totales se determina al convertir el valor de la absorbancia a una curva de calibración entre la densidad óptica a 595 nm y concentraciones proteicas de albúmina de suero bovina (BSA). La curva de calibración se obtiene usando BSA como un estándar de proteína en un rango de 0-1 g/L (Chia et al., 2019).

### 1.3.3. Análisis de aminoácidos

Existen métodos novedosos para la separación y cuantificación de aminoácidos libres antes o después de la hidrólisis de proteínas. Éstos incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía de gases y la electroforesis capilar. Lamentablemente, el carácter zwitteriónico (eléctricamente neutro) de los compuestos requiere el uso de métodos de derivatización adecuados, principalmente para los ensayos de cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Özcan & Şenyuva, 2006). Si bien la derivatización de aminoácidos incrementa la eficiencia de su ionización, comparados con homólogos no derivatizados; para ciertas especies, especialmente dicarboxílicas, la principal desventaja radica en la degradación de algunos analitos de interés (Campos, 2012).

#### 1.3.3.1. Análisis de aminoácidos por HPLC

La técnica de HPLC se emplea en la química analítica para la separación, detección, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla de diversa procedencia. La separación de los compuestos se produce por las interacciones específicas entre una fase móvil (que contiene la muestra) y una fase estacionaria (contenida en la columna cromatográfica) que, en un ambiente con presión modificada, permiten que los componentes de la solución emigren de acuerdo a las interacciones químicas generadas mientras la muestra va atravesando una columna cromatográfica (García & Yusá, 2016). El empleo del HPLC es predominante para la caracterización y cuantificación de compuestos no volátiles como los aminoácidos (Nielsen, 2017).

Cada componente de una muestra interactúa de forma diferente con la fase estacionaria, lo que ocasiona distintas velocidades de elución de los componentes de la muestra. Para la determinación de los aminoácidos se debe considerar tres etapas: 1) Hidrolizar la muestra para liberar los aminoácidos; 2) Convertir esos aminoácidos por medio de un proceso de derivatización con FMOC y OPA, para hacerlos lo suficientemente hidrofóbicos y que puedan ser detectados por fluorescencia o luz UV, y 3) Separar el derivatizado empleando procedimientos cromatográficos que involucren su detección y cuantificación. A pesar de que no hay métodos estándares oficiales para el análisis de aminoácidos, se han desarrollado varios métodos para lograr dicho cometido (Nielsen, 2017).

Los aminoácidos primarios que se derivatizan con el reactivo OPA en presencia de un reductor fuerte como el 2-mercaptoetanol y condiciones alcalinas originan derivados isoindólicos fluoróforos que posteriormente pueden ser detectados por fluorescencia, como el caso de la histidina, glicina y treonina que normalmente coeluyen. Por otro lado, los aminoácidos secundarios (particularmente prolina y lisina) se derivatizan con el reactivo FMOC, el cual permite llevar a cabo reacciones rápidas de condensación con el grupo amino que producen carbamatos que son estables y que al igual que el OPA, permite la detección por medio de fluorescencia, lo cual muestra que ambos mejoran enormemente la sensibilidad analítica (Acquaviva, 2014; Ovalles et al., 2002).

#### *1.3.3.2. Análisis de aminoácidos por cromatografía de gases (GC)*

La cromatografía de gases es una técnica de cromatografía donde la fase móvil es gaseosa y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte colocado sobre una columna de tipo capilar. Si bien esta técnica se emplea para separar componentes volátiles de una mezcla, particularmente los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos, son compuestos poco volátiles e inadecuados para ser separados y analizados directamente por cromatografía de gases. Por lo que, se requiere de una derivatización previa obligatoria (Tinoco, 2009).

Los métodos por cromatografía de gases presentan como desventaja el hecho de que son escasas las muestras que pueden introducirse al cromatógrafo sin algún tipo de operación previa que pueda comprometer su estructura o genere incompatibilidad con el sistema, dificultando el procedimiento analítico (Tinoco, 2009).

#### *1.3.3.3. Análisis de aminoácidos por espectrometría de masas*

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, que se basa en diversas técnicas de destrucción iónica, que permiten la separación y detección de iones facilitando la estimación de la masa molecular relativa de cada molécula (Nielsen, 2017). Junto con el HPLC, se considera una técnica ideal para el estudio de alimentos, lípidos, proteínas y aminoácidos, ya que, comparada con otras técnicas, es mucho más sensible. Sin embargo, su principal limitante es el alto costo de los análisis, el carácter zwitteriónico de los compuestos y el personal especializado que requiere para su manejo (Özcan & Şenyuva, 2006).

## 2. Metodología

### 2.1. Tipo de diseño de investigación

El presente trabajo se realizó en base a un diseño de corte analítico de tipo transversal. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca, durante los meses de enero a junio del 2023.

### 2.2. Material de estudio

En este trabajo se analizaron dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.*), dos cianobacterias (*Spirulina platensis* y posible *Hapalosiphon*) y dos microalgas adicionales sin identificar (MAAL 29 y MAAL 32). Estas especies fueron cultivadas in-vitro y cosechadas en el Laboratorio de Microalgas del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. Cada muestra de microalga provino de alrededor de 20 cultivos bajo condiciones controladas a nivel de laboratorio. La biomasa fue congelada a -20 °C y liofilizada. Se proporcionaron alrededor de 1,5 g por microalga liofilizada.

Los reactivos y equipos para los análisis fueron proporcionados por el Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca, a excepción del ácido tricloroacético (TCA) y reactivo de Bradford que fueron adquiridos por los tesisistas.

### 2.3. Extracción, cuantificación de proteínas y análisis de aminoácidos

En este estudio se realizaron dos tratamientos de preparación de muestra, el análisis del contenido de proteínas totales por el método de Bradford y la determinación cromatográfica del perfil de aminoácidos. Uno de los tratamientos de preparación de muestras fue la extracción y precipitación de proteínas, que se continuó con el análisis del contenido de proteínas totales y el perfil de aminoácidos. Ante los resultados obtenidos, se optó por un tratamiento alternativo que consistió en una hidrólisis directa de la biomasa, seguida únicamente de la determinación del perfil de aminoácidos debido a la cantidad de biomasa disponible.

#### 2.3.1. Materiales, reactivos y equipos

- **Materiales**

Los materiales utilizados en los distintos análisis fueron balones de aforo, tubos de ensayo, espátulas, frascos ámbar, vasos de precipitación, varillas, microtubos, cubetas para

espectrofotómetro, papel filtro Whatman N.º 1, soporte universal, matraces, tubos de ensayo, mortero, pilón, filtros de membrana 0,45 µm, microtubos, viales ámbar, jeringas, vasos de precipitación, varillas, balones de aforo, tiras de pH, filtros de jeringa de polifluoruro de vinilideno (PVDF) 0,45 µm de tamaño de poro.

- **Reactivos**

- Agua destilada
- Agua ultrapura
- Hidróxido de sodio
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Azul de Coomasie Brillante G-250
- Etanol
- Ácido fosfórico (al 85 %)
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Ácido clorhídrico
- Metanol (MeOH)
- Acetonitrilo (ACN)
- Cloruro de fluorenil-metoxycarbonilo (Fmoc)
- Orto-ftaldehído (OPA)
- Fosfato dibásico de sodio
- Ácido 3-mercaptopropiónico
- Buffer de borato
- Fosfato de sodio dibásico
- Solución mixta de concentración de 2500 pmol/µl de estándares de aminoácidos: L-alanina, cloruro de amonio, L-arginina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-ácido glutámico, L-leucina, L-lisina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina y glicina.

- **Equipos**

- Pipetas automáticas
- Balanza analítica de precisión (marca Sartorius modelo ED224S Extend, Alemania)
- Baño ultrasónico (marca Branson modelo 3510R-DTH, USA)
- Centrífuga (marca Hettich modelo MIKRO 220/200R, Alemania)
- Agitador vórtex (marca VELP Scientific modelo ZX Classic Serie No. 153081, Italia)



- Espectrofotómetro (marca Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10-S, USA)
- Sistema múltiple de extracción al vacío (marca Waters serie No. WAT200677)
- Bomba de vacío (marca Heidolph modelo Rotavac Valvetec, Alemania)
- Baño seco digital de dos bloques (marca Thermo Scientific modelo 88870002, USA)
- Potenciómetro (marca METTLER TOLEDO modelo SevenEasy S20, Suiza)
- Equipo HPLC (Serie Agilent 1200) equipado con bomba cuaternaria, detector de matriz de diodos (DAD), detector de fluorescencia (FLD), inyector automático, automuestreador y termostato de columna (Agilent Technologies, USA).
- Columna de HPLC (4,6 x 150 mm x 5  $\mu$ m) ZORBAX Eclipse-AAA (Agilent Technologies, USA)
- Purificador de agua marca Barnstead International (modelo D11931, USA)
- Sistema soporte de vidrio para filtración (Glassco, modelo 47 mm, India), filtros de membrana de nylon de 47 mm de diámetro y 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro.

### 2.3.2. Extracción de proteínas

El procedimiento de extracción proteica se llevó a cabo en base a lo descrito por Barbarino & Lourenço (2005) con ciertas modificaciones en la velocidad de centrifugación, tiempo de centrifugación y el empleo de diferentes equipos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cada muestra liofilizada (50 mg) fue sumergida en 4 ml de agua ultrapura, dejando en incubación a 4 °C durante un periodo de 12 h. Para la disrupción celular de las muestras, se empleó un método de molienda manual, utilizando el mortero y pilón de cerámica durante 10 min con una velocidad de giro media. Posteriormente, las suspensiones resultantes se colocaron en tubos de ensayo y fueron sonicadas a 10 °C durante 30 min. Luego las muestras fueron centrifugadas a 6400 rpm a 8 °C, por 40 min. Se recolectó el sobrenadante de cada tubo y fue refrigerado a 4 °C. Al precipitado se le añadió 1 ml de NaOH 0,1N y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora, siendo homogeneizado en el vórtex cada 15 min. Al cabo de este tiempo, se centrifugó a 6400 rpm, a temperatura ambiente, durante 40 min. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se combinó con el primer sobrenadante, conformando el extracto crudo (Anexo A).

### 2.3.3. Precipitación de proteínas

Al extracto crudo (*ref. apartado 2.3.2*) se le añadió TCA al 25 % en una proporción 2:1, v/v (10 ml de TCA más 5 ml del extracto de los sobrenadantes combinados) se homogeneizó y se mantuvo en congelación a -20 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 6400

rpm a 8 °C, durante 40 min. Se descartó el sobrenadante, mientras que el sedimento se enjuagó con 5 ml de ácido tricloroacético al 10 %. Se centrifugó a 6400 rpm, a 8 °C por 4 min. El precipitado fue suspendido y homogeneizado en ácido tricloroacético al 5 %, en una proporción 5:1, para ser centrifugado por última vez a 6400 rpm a temperatura ambiente por 40 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se obtuvo el sedimento proteico. Éste último fue suspendido en 2,5 ml de NaOH 1N y se filtró con filtros de membrana de 0,45 µm. El extracto final se almacenó en microtubos a una temperatura de -20 °C hasta su análisis, tanto para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford como para el análisis de aminoácidos por HPLC-FLD.

#### **2.3.4. Hidrólisis de la biomasa**

Para la hidrólisis de la biomasa, se realizó el pesaje de las especies de microalgas, utilizando dos tubos para cada especie: *S. platensis*: 0,1 g, *C. vulgaris*: 0,07 g, *Nannochloropsis sp.*: 0,1 g, *Hapalosiphon* (posible): 0,08 g, MAAL 29: 0,1 g y MAAL 32: 0,06 g. El primer tubo se mezcló con HCl 6N (hidrólisis ácida), y el segundo tubo se mezcló con NaOH 6N (hidrólisis básica). Se homogeneizó ambas muestras durante un minuto y se incubaron a 105 °C durante 12 horas en baño seco. Posteriormente, se mezcló ambos extractos y se adicionó un volumen de agua ultra pura. Posteriormente se neutralizó la suspensión a un pH entre 6,8-7,2 con NaOH 1N o HCl 1N según fuera necesario, realizando las medidas con el potenciómetro. Luego, se centrifugó la suspensión neutralizada a 6000 rpm durante 10 min y por último se filtraron los sobrenadantes con el sistema múltiple de extracción al vacío utilizando un filtro de membrana de 0.45 µm (Anexo B).

#### **2.3.5. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

##### *2.3.5.1. Preparación del reactivo de Bradford*

Se mezclaron 10 mg de azul de Coomassie Brillante G-250 en 5 ml de etanol al 95 %. Se añadió 10 ml de ácido fosfórico al 85 % y se aforó hasta 100 ml con agua destilada. La solución se filtró a través de papel filtro Whatman N.º 1 y se envasó en frasco ámbar a temperatura ambiente (el reactivo siempre debe filtrarse antes de su uso).

##### *2.3.5.2. Solución patrón y curva de calibración*

La albúmina de suero bovino (BSA) suele ser el estándar de elección. También se recomienda el uso de inmunoglobulina G o lisozima, dependiendo el tipo de muestra que se analice (Olson, 2016).

La solución patrón se preparó disolviendo 10 mg del estándar de BSA en 10 ml de agua destilada (concentración de 1 mg/ml), la solución se almacenó a -20 °C. A partir de la solución patrón, se prepararon diluciones de 7.5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/ml, con un volumen final de 1000 µl (Tabla 2), cuyas absorbancias se pueden evidenciar en el Anexo C y la curva de calibración a partir de dichos estándares en el Anexo D.

**Tabla 2:** Preparación de curva de calibración de Bradford.

Concentración (µg/ml)	Solución patrón (µl)	Agua destilada (µl)	Volumen final (µl)
100	100	900	1000
75	75	925	1000
50	50	950	1000
25	25	975	1000
10	10	990	1000
7,5	7,5	992,5	1000

### 2.3.5.3. Procedimiento de microensayo

Se midieron 100 µl de muestra/diluciones en las cubetas de lectura para espectrofotómetro. En el caso del blanco, se midieron 100 µl de agua destilada. Se añadió 1 ml de reactivo de Bradford y se homogeneizó con ayuda del vórtex. La solución fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos (medida con cronómetro). Al cabo de este tiempo, nuevamente se homogeneizó y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 545 nm.

La reacción a partir de los extractos precipitados de las muestras de microalgas y la medición de su absorbancia se realizó por triplicado, frente al blanco. Fue necesario diluir las muestras de *S. platensis*, MAAL 32 y *Nannochloropsis sp.* en 1/14, 1/4 y 1/3, respectivamente, para que sus concentraciones estén dentro del rango lineal del método de Bradford (10-100 µg/ml).

Se debe considerar que la sensibilidad del método oscila entre 0,20-2 µg/ml. El cambio de color a 595 nm es directamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. A niveles más altos de proteína, este cambio en la coloración ya no tendrá esa misma relación proporcional (Goldring, 2019). Por otro lado, el colorante empleado en Bradford se une con avidez a las

cubetas de cuarzo, por lo que se requiere cubetas de vidrio o plástico (Olson, 2016). El procedimiento completo de cuantificación de proteína por el método de Bradford se observa en el Anexo E.

### 2.3.6. Análisis de aminoácidos por HPLC-FLD

#### 2.3.6.1. Preparación de las muestras

Se realizó una comparación entre tratamientos de muestras. Por un lado, se utilizaron los extractos reconstituidos en 2,5 ml de NaOH, tal como se describió en el apartado 2.3.3 (muestras precipitadas sin hidrólisis). Por otro lado, se analizaron las muestras hidrolizadas, tal como se describió en el apartado 2.3.4. Los extractos fueron colocados en viales ámbar para su posterior análisis por HPLC.

#### 2.3.6.2. Curvas de calibración

Se trabajó con una solución stock de estándares de aminoácidos, en forma de solución mixta a una concentración de 2500 pmol/ $\mu$ l, la cual fue obtenida de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se realizaron curvas de calibración de los estándares en un rango de 2,50 a 2000 nMol/ml; para cada estándar se consideró diferentes puntos equidistantes dentro de ese amplio rango, que justifiquen la linealidad del método (Anexo F). A partir de estas curvas también se calcularon los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ). En la Tabla 3 y Anexo G se presentan los datos de los estándares de aminoácidos con su tiempo de retención promedio y el área correspondiente a cada estándar, respectivamente.

**Tabla 3:** Tiempos de retención promedio con desviación estándar (DE) de los estándares de aminoácidos.

Aminoácido	Promedio (min)	DE
Asp	1,62	0,004
Glu	3,44	0,007
Ser	5,95	0,057
His	6,67	0,068
Gly	7,12	0,007
Thr	7,33	0,005
Arg	8,14	0,003
Ala	8,47	0,005

Tyr	9,65	0,003
Val	11,38	0,004
Met	11,57	0,003
Phe	12,73	0,006
Ile	12,9	0,006
Leu	13,47	0,008
Lys	13,93	0,012
Pro	16,95	0,223

#### 2.3.6.3. Procedimiento

El perfil de aminoácidos fue determinado mediante el método analítico optimizado en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias, Universidad de Cuenca, a partir de la nota técnica descrita por Henderson et al. (2000). El análisis se realizó en un HPLC Agilent serie 1200 acoplado a un detector de fluorescencia. La separación se llevó a cabo en una columna Zorbax C18 (4,6 x 250 mm x 5 µm) a una temperatura de 40 °C. Se inyectó un volumen de 20 µl de los extractos reconstituidos filtrados que fueron derivatizados con el reactivo OPA (5,12 mg en 1 ml de metanol, añadiendo 4 ml de tampón de borato 0,4 M y 10 µl de 3-MPA) y el reactivo FMOC (2,5 mg/ml en ACN) siguiendo la programación indicada en el Anexo H. Se utilizó como fase móvil A una solución acuosa de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,8) y como fase móvil B una mezcla de MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O 45:45:10 (v/v/v). Se aplicó una elución tipo gradiente con un caudal de 2 ml/min que inició con 100 % A de 0-1,9 min, seguido de un aumento de B de 0-57 % hasta 18,1 min que luego pasó a 100 % B a los 18,6 min. Esta concentración se mantuvo hasta los 22,3 min y finalmente se regresó a condiciones originales hasta 26 min para reequilibrar la columna, el gradiente llevado a cabo se observa en el Anexo I. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### 2.3.7. Análisis de datos

Para la cuantificación por Bradford, la concentración de las muestras se calculó sobre la base de la curva de calibración de BSA y los resultados se expresaron en mg de proteína/g de extracto microalgal. Mientras que, para procesar los datos cromatográficos, se utilizó el software Chemstation (Agilent Technologies, St. Clara, CA, EE. UU.). Los picos cromatográficos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de los estándares. Las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos fueron interpoladas en la curva de calibración construida para

cada estándar. La concentración de cada aminoácido se expresó como  $\mu\text{g}$  de aminoácido/g de extracto microalgal. Los datos fueron organizados en hojas de cálculo de Microsoft Excel. Se aplicó estadística descriptiva, presentando los resultados en promedio, desviación estándar (DE) y gráficos comparativos entre las diferentes muestras. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Extracción de proteínas

En este trabajo se evaluaron dos tipos de tratamientos de las muestras de manera secuencial. Primero se aplicó un tratamiento mecánico seguido con la precipitación de proteínas. Tras cuantificar el contenido proteico (*ref. apartado 3.2*) y el perfil de aminoácidos (*ref. apartado 3.3*), y comparar los resultados con la literatura disponible, surgió la necesidad de aplicar un tratamiento alternativo más agresivo que consistió en una hidrólisis directa de la biomasa. Bajo este tratamiento fue posible determinar únicamente el perfil de aminoácidos, cuyos resultados fueron mejores y comparados con los obtenidos con el primer método (*ref. apartado 3.3*).

El grado de extracción de proteínas depende de la efectividad del método de disrupción celular y de la morfología estructural de la pared celular de cada especie de microalga (Safi et al., 2014). En este estudio se realizó una combinación de tratamientos que permitan modificar la permeabilidad de la membrana y pared de la microalga, y disminuir la resistencia mecánica conferida por sus características celulares inherentes (Zhang & Volkman, 2017).

Las muestras de microalgas provistas estuvieron liofilizadas, tratamiento que, si bien es la forma más efectiva de conservación, suele dificultar la extracción proteica del talo (Barbarino & Lourenço, 2005). Esto sucede porque el agua intracelular contenida se expande durante el proceso de congelación y forma cristales de hielo, que subliman y deshidratan a la muestra debido a las bajas temperaturas, provocando daños a la membrana celular, la cual no se rompe, pero sí adquiere una mayor porosidad (Stirk et al., 2020). Para corregir los efectos de liofilización sobre los talos fue necesario realizar largos periodos de incubación con agua que facilitaron la extracción proteica mediante los tratamientos mecánicos, físicos y químicos aplicados posteriormente.

Estudios previos han señalado que los tratamientos mecánicos resultan más eficaces que los químicos por su facilidad para romper las paredes celulares y los agregados proteicos, siendo la molienda de perlas y homogeneización a alta presión los métodos más descritos para lograr una alta liberación de proteínas. Sin embargo, la mayor desventaja de dichos métodos es la necesidad de contar con equipos específicos que son de alto consumo energético junto con la gran cantidad de calor que suelen generar (Callejo-López et al., 2019).

La utilización de un mortero y pilón para la molienda de microalgas se considera un método mecánico, aunque la forma más eficaz de llevarlo a cabo según Filipigh (2021) es moler la

suspensión celular con perlas de vidrio, partículas de cerámica finas u óxido de aluminio o zirconio, durante 10 minutos a una velocidad de 2039 rpm, lo cual garantiza una recuperación de hasta el 40 % de proteínas. Estos métodos mecánicos conllevan ciertos problemas de reproducibilidad, por lo que no es el más efectivo (Olmedo, 2019). Sin embargo, éste fue escogido por su facilidad de aplicación, la baja contaminación de los metabolitos primarios, la más baja obtención de desechos celulares, el hecho de que no genera impactos negativos sobre etapas posteriores, y la disminución de costos, tiempo y energía.

En este estudio se acoplaron las técnicas de molienda con mortero y sonicación para la extracción proteica. Esto se propuso en base al estudio de Stirk et al., (2020) en el que se ha señalado la posibilidad de romper la pared celular de entre el 10-20 % de las células tratadas a través de un método físico, como la sonicación. Sin embargo, varios autores concuerdan que debido a la alta resistencia de la pared celular de la mayoría de microalgas, no es recomendable emplear este pretratamiento en solitario, sino junto con otros pretratamientos mecánicos o químicos (Filipigh, 2021).

Otro hallazgo importante fue el estudio de Rahman et al. (2022) en el que se evidenció que tanto la sonicación como la molienda con perlas de cerámica dieron mayores rendimientos de extracción de la biomasa cuando se utiliza metanol al 50 % como disolvente, demostrando que la combinación de ultrasonificación acoplada a otros tratamientos tiene una mayor eficiencia de disrupción celular. La extracción por ultrasonido puede potenciarse al utilizar condiciones óptimas de presión y temperatura. Al respecto, Kent et al. (2015) propuso el método combinando las tres variables y resultó en un aumento en el rendimiento de proteínas en un 229 % en comparación con el método convencional de exposición ultrasónica. Esto se debe a que la combinación del efecto de esas tres mejora la destrucción de las células e intensifica el proceso de transferencia de masa en comparación con el uso únicamente de ultrasonido.

En cuanto a los métodos químicos, Al-Zuhair et al. (2017) detalla que los rendimientos de extracción de células tratadas mediante hidrólisis alcalina y presión alta son superiores a los obtenidos mediante tratamientos químicos en solitario. A pesar de ello, no se debe obviar el hecho de que la adaptación de las cepas a temperaturas más altas puede alterar la vía metabólica encargada de la producción de proteínas. Según el estudio de Juárez et al. (2021) los pretratamientos donde se expone a la biomasa a un medio acuoso ácido (HCl 2M) o básico (NaOH 2M) en combinación con temperaturas elevadas (121 °C) durante una hora, permite la solubilización de proteínas en alrededor del 75,5 % y 69,3 %, respectivamente. Debido a las



diferencias estructurales y morfológicas entre la familia *Scenedesmaceae* de la microalga analizada en dicho estudio, en el presente trabajo se decidió incrementar las condiciones de la hidrólisis, específicamente en la concentración de NaOH, HCl y el tiempo de tratamiento. Cabe destacar que la mayor dificultad y desventaja de la hidrólisis química es el nivel de control que se tiene sobre los reactivos químicos, los cuales son fuertes y no son específicos para los enlaces peptídicos, pudiendo causar daños irreversibles como la degradación para algunos aminoácidos (Barkia et al., 2019).

La hidrólisis química y enzimática son métodos más sencillos, sostenibles y económicos que los métodos mecánicos (Callejo-López et al., 2019). A su vez la hidrólisis enzimática es mucho más sencilla de controlar que la hidrólisis química, pues se emplean condiciones menos agresivas de tratamiento sin grandes volúmenes de químicos orgánicos o tóxicos, lo cual preserva la estructura y funcionalidad de los aminoácidos y maximiza el rendimiento de extracción recuperando productos finales con mayor valor nutritivo (Piedra, 2020). La efectividad de este tratamiento depende de varios parámetros, tales como la especificidad del sustrato, relación enzima/sustrato y del minucioso control de temperatura, pH y tiempo de reacción (Barkia et al., 2019).

La solubilidad de la proteína a pH ácido es menor que a pH alcalino. A mayor pH, la solubilidad incrementa pues las proteínas tendrán cargas netas negativas debido a la ionización de las cadenas laterales ácidas y más agua interactuará con las moléculas de proteína (Grossmann et al., 2020; Lestari et al., 2022). Debido a esto, en este estudio la reconstitución final del extracto se realizó con NaOH, durante la extracción y precipitación de proteína. Esto contribuyó a mejorar la solubilidad de las proteínas de las muestras. Así mismo, la alteración mecánica y química aplicadas en la pared celular de las microalgas (baño ultrasónico y la molienda manual durante 10 minutos como mínimo) permitió que las proteínas sean liberadas con mayor facilidad y rapidez.

### **3.2. Cuantificación de la proteína total**

Los resultados de la cuantificación de proteínas total obtenidos a partir del extracto por tratamiento mecánico y precipitación de proteínas se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Concentraciones de proteína de muestras de microalgas y cianobacterias expresados en mg de proteína/g de extracto microalgal.

Microalga/cianobacteria	Promedio (mg/g)	DE
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,89	± 0,05
<i>Nannochloropsis sp.</i>	7,50	± 0,10
<i>Spirulina platensis</i>	50,10	± 1,29
<i>Hapalosiphon</i> (posible)	1,69	± 0,02
MAAL 29	1,14	± 0,14
MAAL 32	9,49	± 0,34

La mayor concentración proteica se observó en *S. platensis* (50,10 ± 1,29 mg/g), que es la microalga que lidera el mercado mundial de comercialización (Abu-Ghosh et al., 2021), en comparación con las restantes muestras. Se encontró MAAL 32 con una concentración de proteína de 9,49 mg/g, seguida de *Nannochloropsis sp.* con 7,50 mg/g. En el Anexo J se presenta la comparación del contenido proteico entre las diferentes especies de microalgas y cianobacterias, expresado en mg de proteína/g de extracto.

El estudio de Wang et al., (2021) reportó que el contenido proteico crudo en la biomasa de microalgas se encuentra entre 6-63 %, siendo *Chlorella vulgaris* y *Arthrospira sp.* las especies más explotadas. A pesar que, para *C. vulgaris* el contenido de proteína hallado fue el menor entre todas las especies analizadas (0,89 mg/g), su perfil se compara favorablemente al perfil estándar para la nutrición humana propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO, porque sus células sintetizan aminoácidos esenciales y no esenciales. En general, su contenido proteico es mayor que el de la soya, que bordea un 37 % en peso seco. El contenido total de proteínas en la madurez alcanza entre un 42-59 % en peso seco, del cual alrededor del 20 % están ligadas a la pared celular, más del 50 % se sitúan al interior y un 30 % migran hacia dentro y fuera de la célula (Becker, 2007; Bito et al., 2020).

Para la especie de *Hapalosiphon sp.* se encontró un estudio de Ruangsomboon (2014) en el cual la restricción o agotamiento de nitrógeno limitaba la biosíntesis de proteínas, pero aumentaba

considerablemente las fracciones lipídicas, siendo estas condiciones específicas de la especie.

Existen otros métodos utilizados con mayor frecuencia para determinar el contenido de nitrógeno que son los métodos de Kjeldahl y Dumas. Estos métodos requieren factores de conversión para calcular el contenido de proteína. La dificultad que surge para determinar el valor proteico de microalgas y cianobacterias radica precisamente en esos factores de conversión, pues no se han establecido cuáles son los valores a usarse para la mayoría de especies. Además, estos métodos no distinguen entre el nitrógeno proteico y el no proteico, lo cual representa una desventaja ante el método de Bradford en el que se crea complejos con moléculas de proteína, midiéndose así estas moléculas puras con mayor precisión (Mæhre et al., 2018). Sin embargo, el método de Bradford presenta el inconveniente de que los espectros de absorción del colorante unido y libre se superponen, haciendo que el rango lineal de la medición sea limitado. Por ello, se suele recomendar un ajuste de segundo orden para la curva de calibración (Olson, 2016).

### 3.3. Cuantificación de aminoácidos por HPLC-FLD

El perfil de aminoácidos de las microalgas estudiadas se determinó cromatográficamente por HPLC con detección de fluorescencia. Las curvas de calibración de cada aminoácido, expresadas en nMol/ml, se muestran en el Anexo F. Los parámetros cromatográficos del método se presentan en el Anexo K.

Inicialmente, el perfil de aminoácidos se determinó en los extractos precipitados de proteínas (muestras no hidrolizadas), las cuales recibieron un tratamiento ácido-básico como parte de la extracción. Aparentemente, este tratamiento no fue lo suficientemente agresivo como para destruir la pared celular y la cantidad de proteína total medida fue considerablemente menor a lo esperado. Ante esto, se procedió a hidrolizar las muestras. El perfil de aminoácidos, expresados en mg de aminoácido/g de extracto en muestras no hidrolizadas se presentan en la Tabla 5, y el perfil de aminoácidos en muestras hidrolizadas se presenta en la Tabla 6. El tratamiento sin hidrólisis se desarrolló por triplicado, para cada uno de los seis extractos disponibles (*S. platensis*, *Nannochloropsis sp.*, *C. vulgaris*, *Hapalosiphon* (posible), MAAL 29 y MAAL 32); mientras que la hidrólisis se realizó por triplicado sólo para el extracto de *Nannochloropsis sp.* y *S. platensis*, a los restantes extractos no se aplicó réplicas debido a la escasa cantidad de biomasa liofilizada.

**Tabla 5:** Perfil de aminoácidos de muestras de microalgas y cianobacterias no hidrolizadas expresadas en µg/g extracto microalgal.

Aminoácidos	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Hapalosiphon</i> (posible)	MAAL 29	MAAL 32
Aspartato	7,73 ± 11,56	26,42 ± 30,95	64,22 ± 3,28	8,06 ± 6,80	-	38,18 ± 9,73
Glutamato	12,10 ± 32,92	31,88 ± 33,04	393,70 ± 4,85	11,01 ± 21,23	4,61 ± 32,45	41,76 ± 3,86
Serina	23,82 ± 28,07	150,97 ± 31,45	1955,62 ± 4,26	28,56 ± 14,03	31,02 ± 5,94	179,78 ± 12,05
Histidina*	-	-	31,69 ± 71,34	-	-	-
Glicina	20,91 ± 21,66	195,62 ± 29,12	1937,32 ± 7,16	30,22 ± 14,88	14,24 ± 10,02	173,79 ± 13,32
Treonina*	9,33 ± 10,06	30,61 ± 23,39	401,39 ± 1,14	11,11 ± 6,04	2,73 ± 20,15	50,02 ± 11,64
Arginina	8,36 ± 9,25	19,62 ± 19,03	177,41 ± 14,40	9,39 ± 13,57	7,59 ± 12,09	28,71 ± 6,22
Alanina	9,64 ± 8,03	47,68 ± 33,03	529,97 ± 4,00	11,41 ± 7,87	2,91 ± 85,44	60,79 ± 9,56
Tirosina	7,45 ± 7,24	7,10 ± 5,32	73,52 ± 43,73	7,11 ± 17,10	15,70 ± 18,83	10,44 ± 8,02
Valina*	10,08 ± 3,88	16,66 ± 9,95	67,94 ± 32,21	9,17 ± 16,40	7,43 ± 32,91	19,47 ± 2,10
Metionina*	3,15 ± 32,96	10,96 ± 10,70	92,38 ± 33,08	1,82 ± 110,10	29,73 ± 69,45	12,71 ± 11,26
Fenilalanina*	7,68 ± 9,03	25,44 ± 18,65	268,92 ± 28,38	8,27 ± 28,62	3,90 ± 18,38	28,18 ± 12,11
Isoleucina*	6,48 ± 5,91	5,68 ± 49,62	-	4,31 ± 36,57	7,39 ± 9,08	8,81 ± 37,79
Leucina*	-	12,93 ± 25,17	186,97 ± 16,58	6,05 ± 10,05	46,74 ± 9,86	18,40 ± 1,25
Lisina*	60,45 ± 3,94	22,22 ± 2,61	487,88 ± 46,32	22,49 ± 4,96	-	26,52 ± 10,71
Prolina	188,58 ± 23,55	154,58 ± 111,31	283,19 ± 27,26	-	13,50 ± 51,36	18,72 ± 43,01

\*Aminoácidos esenciales

**Tabla 6.** Perfil de aminoácidos de muestras de microalgas y cianobacterias hidrolizadas expresadas en µg/g extracto microalgal.

Aminoácidos	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Hapalosiphon</i> (posible)	MAAL 29	MAAL 32
Aspartato	21399,15 ± ND	35274,39 ± 11,54	56624,31 ± 10,70	24558,99 ± ND	12789,35 ± ND	9424,52 ± ND
Glutamato	25324,65 ± ND	48182,94 ± 10,87	85037,62 ± 10,88	27332,01 ± ND	14837,33 ± ND	12298,41 ± ND
Serina	6349,47 ± ND	10464,12 ± 14,97	17083,32 ± 13,60	4857,35 ± ND	3043,99 ± ND	2131,11 ± ND
Histidina*	-	-	1064,99 ± 33,56	-	-	-
Glicina	432,95 ± ND	758,45 ± 13,30	1059,37 ± 10,20	477,42 ± ND	240,02 ± ND	173,65 ± ND
Treonina*	5630,33 ± ND	8729,60 ± 18,41	13205,57 ± 15,65	2346,61 ± ND	3005,74 ± ND	1408,38 ± ND
Arginina	6583,53 ± ND	9919,09 ± 24,48	16259,59 ± 16,07	4703,66 ± ND	2805,15 ± ND	2773,88 ± ND
Alanina	16621,15 ± ND	23616,98 ± 13,22	41341,91 ± 11,66	16885,06 ± ND	8611,04 ± ND	6585,41 ± ND
Tirosina	6489,99 ± ND	12068,13 ± 40,12	20761,26 ± 6,63	5466,70 ± ND	2556,96 ± ND	1588,95 ± ND
Valina*	6976,14 ± ND	11061,72 ± 30,29	14237,40 ± 12,91	6131,17 ± ND	3424,24 ± ND	3079,61 ± ND
Metionina*	2775,34 ± ND	6752,75 ± 29,34	10919,06 ± 4,74	2431,25 ± ND	1327,03 ± ND	1442,98 ± ND
Fenilalanina*	9663,34 ± ND	16382,36 ± 26,34	20199,00 ± 13,51	10179,17 ± ND	4825,76 ± ND	4999,65 ± ND
Isoleucina*	4887,23 ± ND	8757,79 ± 32,28	14170,51 ± 13,75	4880,13 ± ND	2577,23 ± ND	2613,25 ± ND
Leucina*	15681,51 ± ND	24771,35 ± 21,42	39304,64 ± 14,69	15523,91 ± ND	7201,12 ± ND	6608,99 ± ND
Lisina*	14680,71 ± ND	37475,79 ± 54,78	29227,96 ± 14,63	13236,40 ± ND	6323,93 ± ND	8795,24 ± ND
Prolina	4539,71 ± ND	17154,60 ± 1332	10368,03 ± 13,66	5429,74 ± ND	2688,16 ± ND	2183,13 ± ND

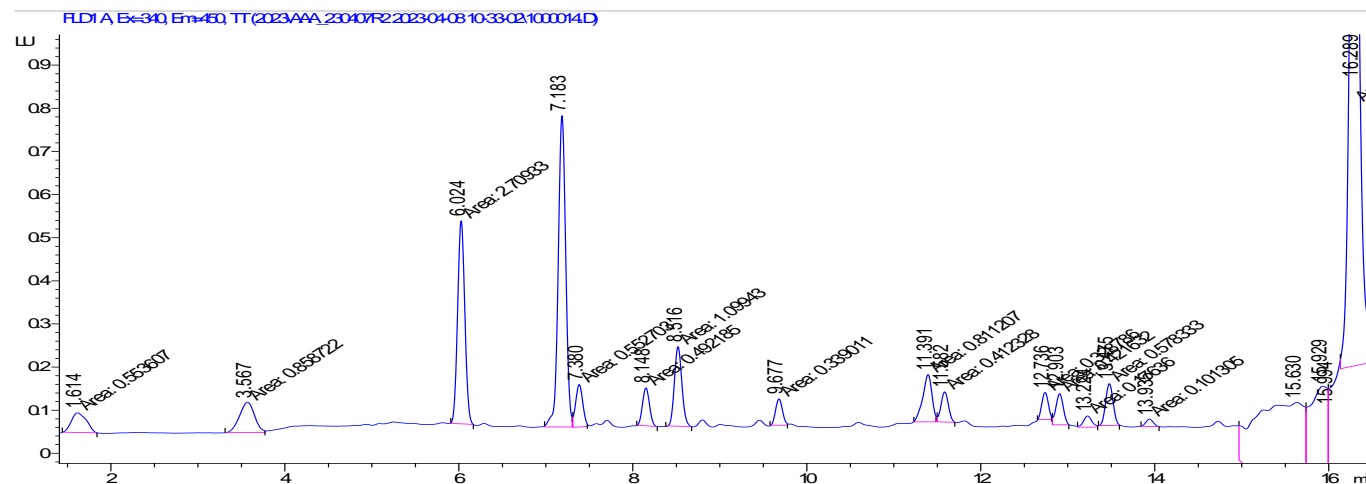
\*Aminoácidos esenciales

ND: No disponible/sin réplicas

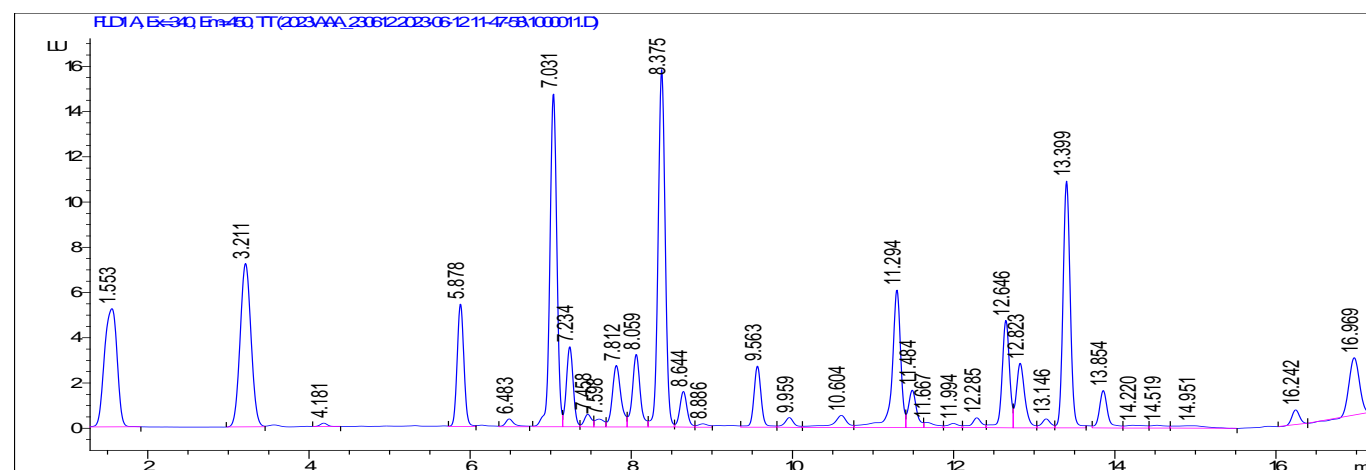
Diana Paola Flores Vizñay - Cristian Andrés Palta Jara

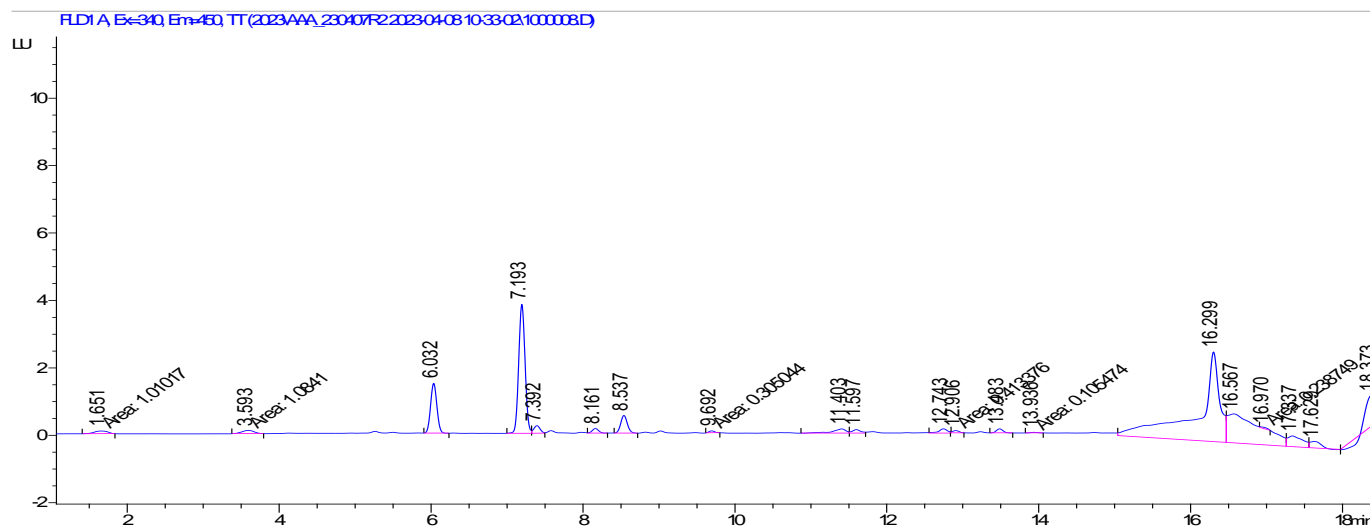
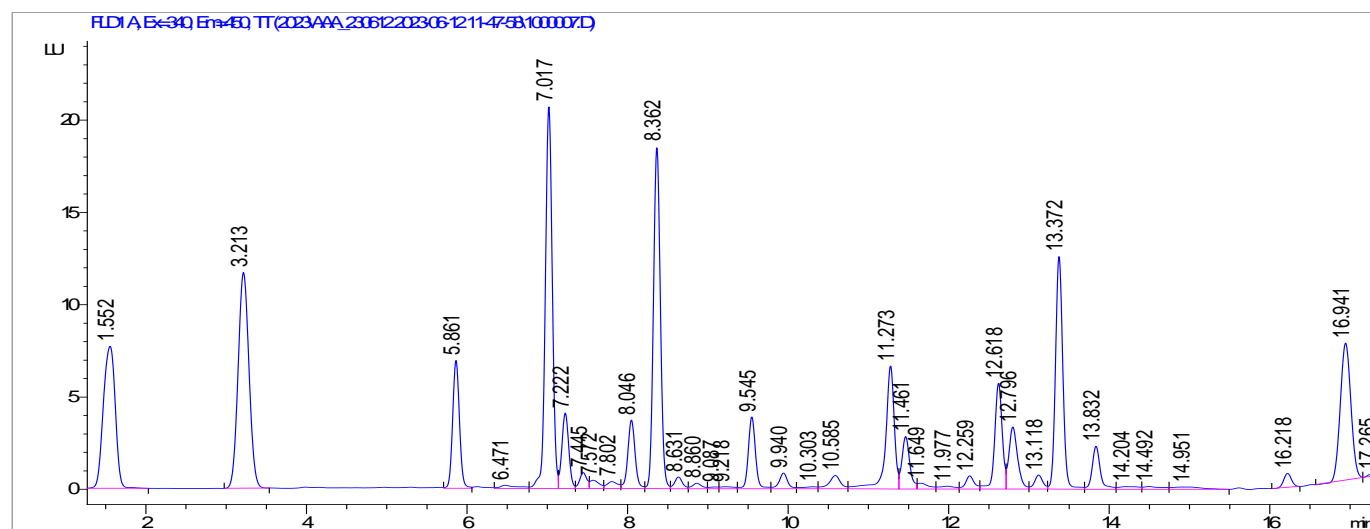
La hidrólisis de las muestras también contribuyó a obtener cromatogramas con menor cantidad de interferentes, lo que mejoró considerablemente la capacidad de detección y distinción de los compuestos (Figura 2).

a) *Chlorella vulgaris* (no hidrolizada)

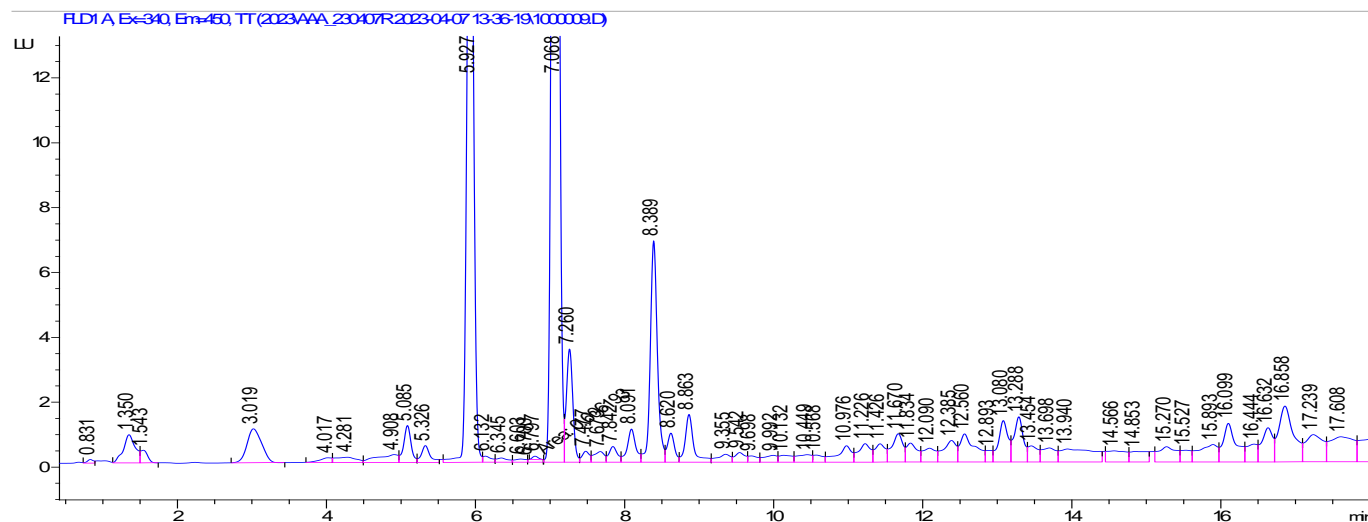


b) *Chlorella vulgaris* (hidrolizada)

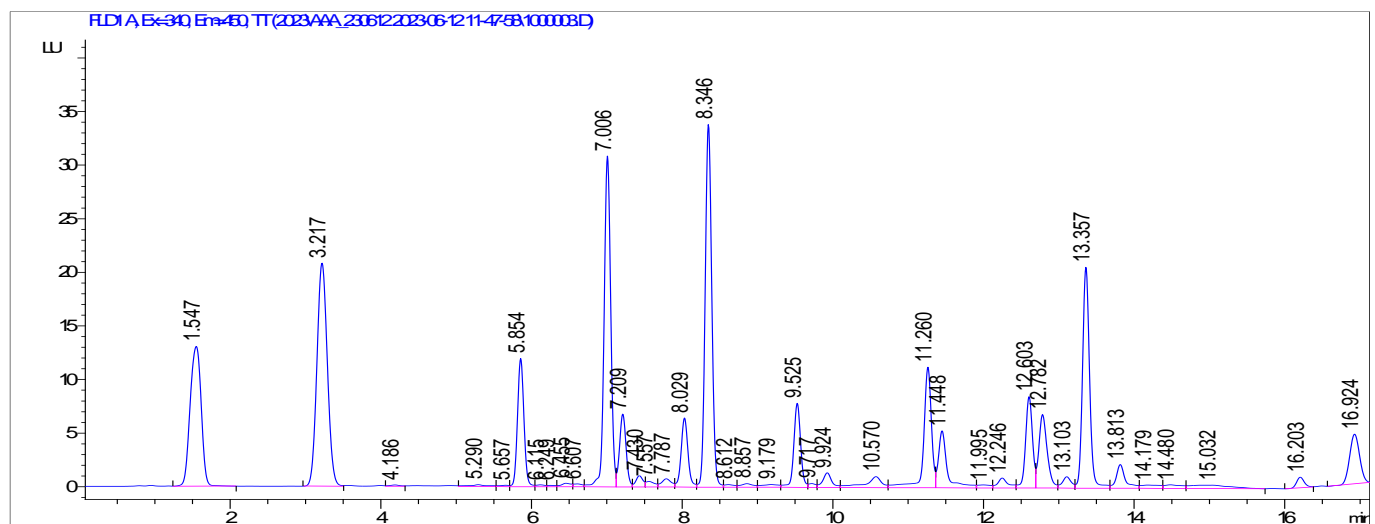


c) *Nannochloropsis* sp. (no hidrolizada)d) *Nannochloropsis* sp. (hidrolizada)

e) *Spirulina platensis* (no hidrolizada)

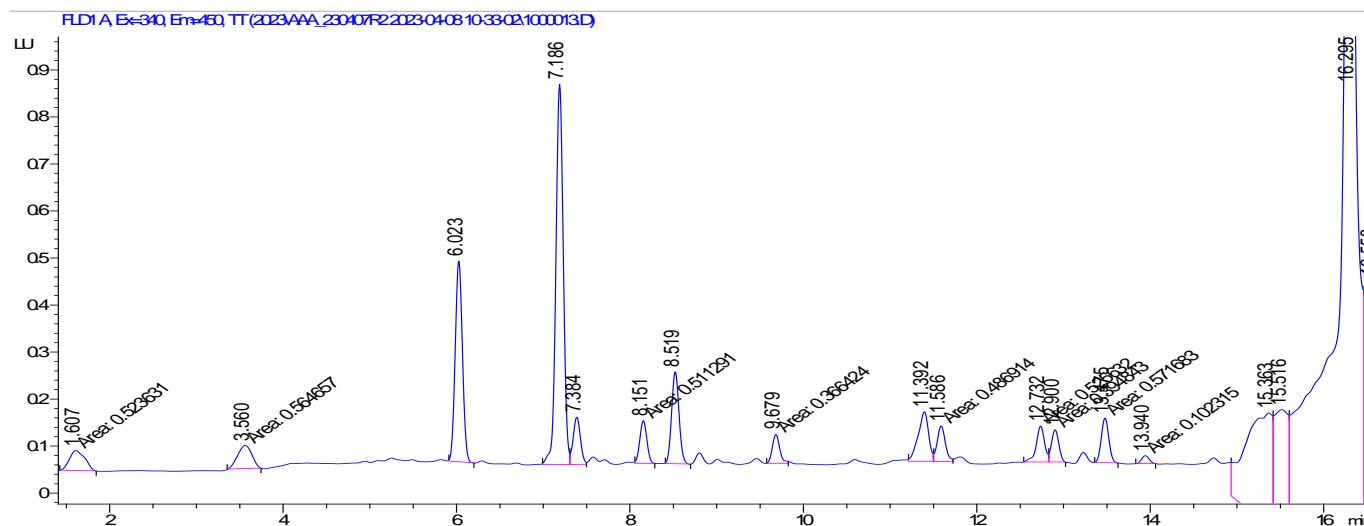


f) *Spirulina platensis* (hidrolizada)

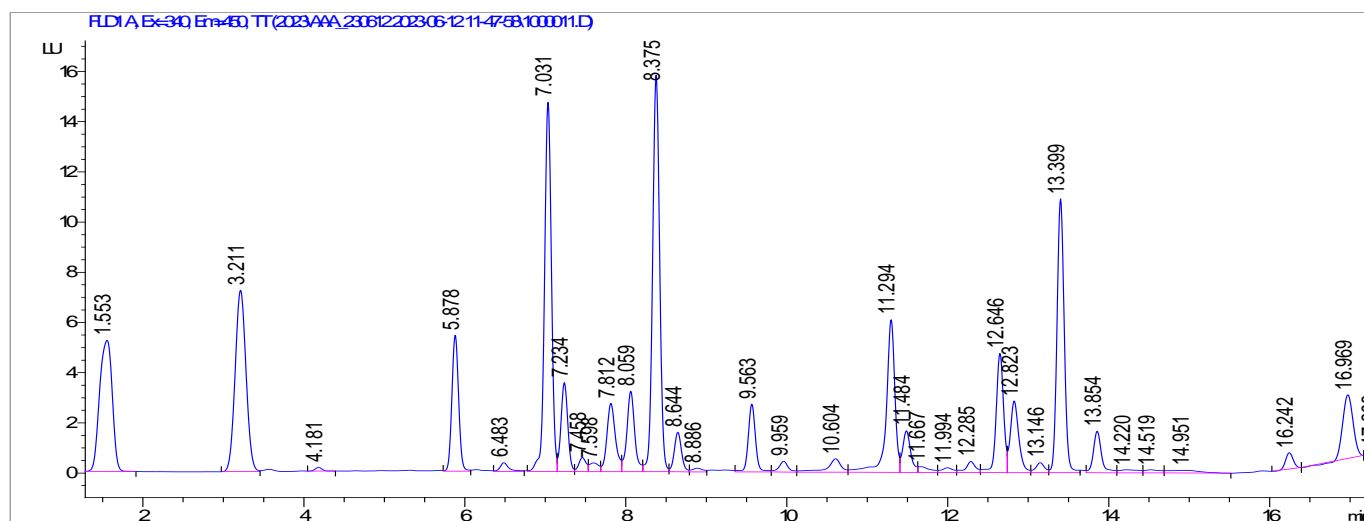




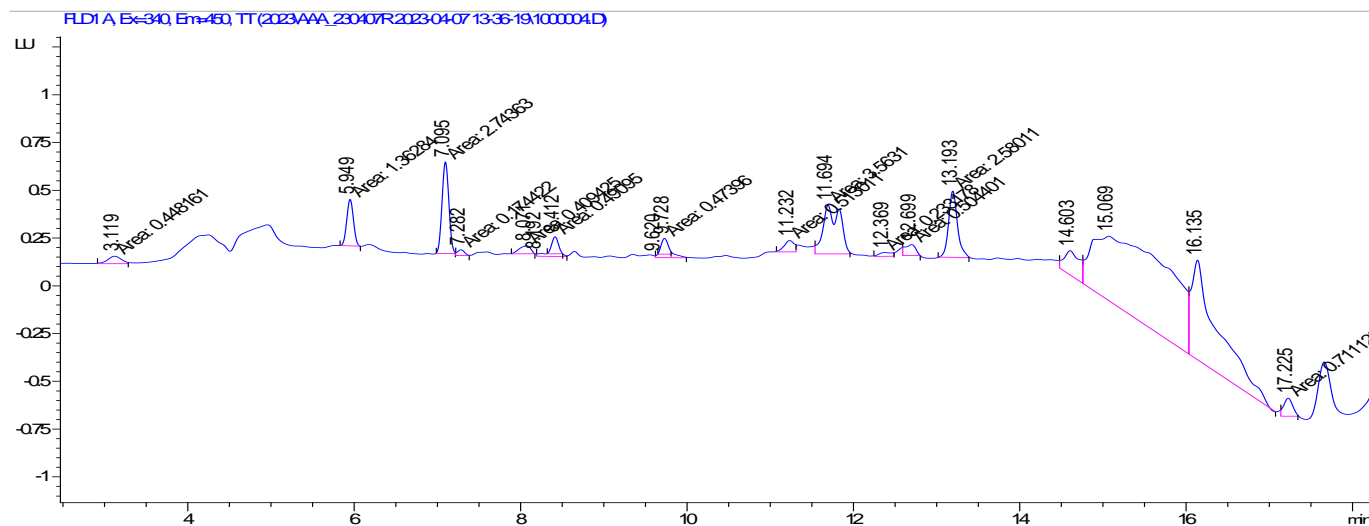
g) *Hapalosiphon* (posible) (no hidrolizada)



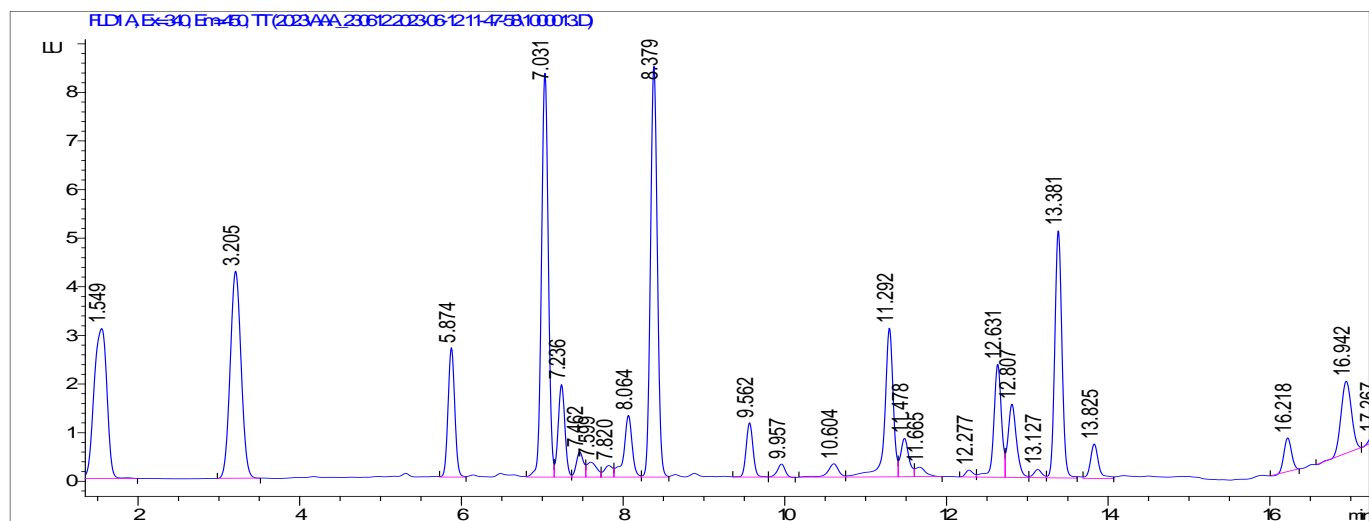
h) *Hapalosiphon* (posible) (hidrolizada)



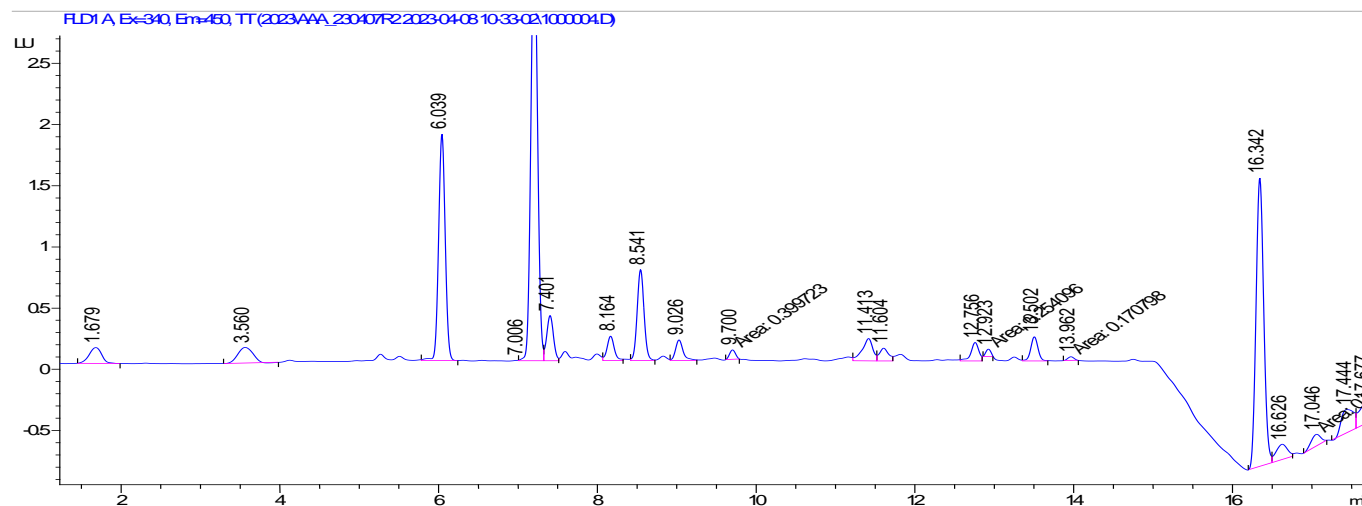
## i) MAAL 29 (no hidrolizada)



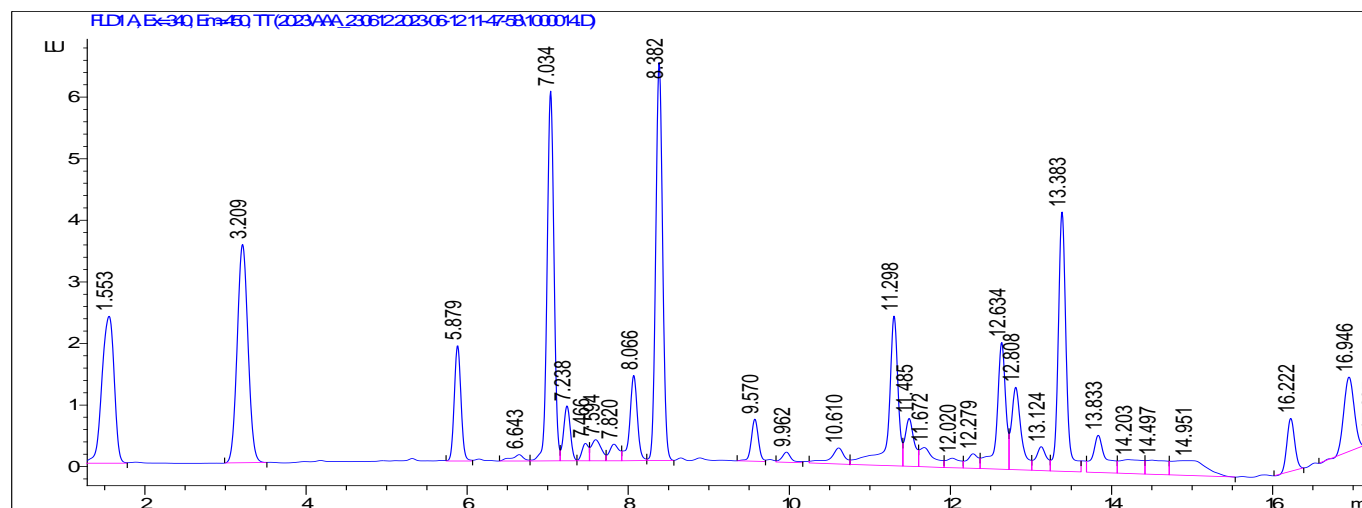
## j) MAAL 29 (hidrolizada)



k) MAAL 32 (no hidrolizada)



l) MAAL 32 (hidrolizada)



**Figura 2.** Cromatogramas de muestras de microalgas y cianobacterias hidrolizadas y no hidrolizadas.

En base a los resultados, se identificaron de manera general los tres aminoácidos de mayor concentración en las microalgas estudiadas. Al contrastar entre los tratamientos de preparación de muestras fue posible apreciar diferentes aminoácidos prevalentes de acuerdo a cada método, siendo serina, glicina y alanina los aminoácidos más representativos cuando las muestras se precipitaron, pero no se hidrolizaron (Figura 3); mientras que, en las muestras hidrolizadas los aminoácidos prevalentes fueron aspartato, glutamato y lisina (Figura 4). A más de ello, se evidenció las diferencias cuantitativas que se obtienen mediante uno u otro método.

Jisha et al. (2021) reportó que la cantidad de aminoácidos esenciales en *Nannochloropsis oceánica* fue de 141,86 mg/g de peso seco; mientras que la cantidad de aminoácidos no esenciales fue de 160,83 mg/g de peso seco. En ese mismo estudio, los aminoácidos esenciales que se encontraron en mayor cantidad fueron leucina y fenilalanina. En este trabajo, en *Nannochloropsis sp.* fue prevalente el aminoácido esencial treonina (muestra no hidrolizada) y lisina (muestra hidrolizada).

La mayoría de estudios en el género *Nannochloropsis* se enfoca en la extracción de lípidos, por lo que surge la dificultad en realizar la comparación cuantitativa con respecto a la composición y concentración de aminoácidos (Zhang et al., 2019). Según el estudio de Abugrara et al. (2020) el contenido de proteína de *Nannochloropsis* dependerá de la fuente inorgánica empleada durante el cultivo de la microalga, para mejorar el crecimiento de la biomasa. Por ejemplo, se sugiere que el añadir bicarbonato sódico al medio de cultivo tiene efectos significativos en la producción de proteínas y más específicamente en la concentración de los aminoácidos esenciales arginina y leucina.

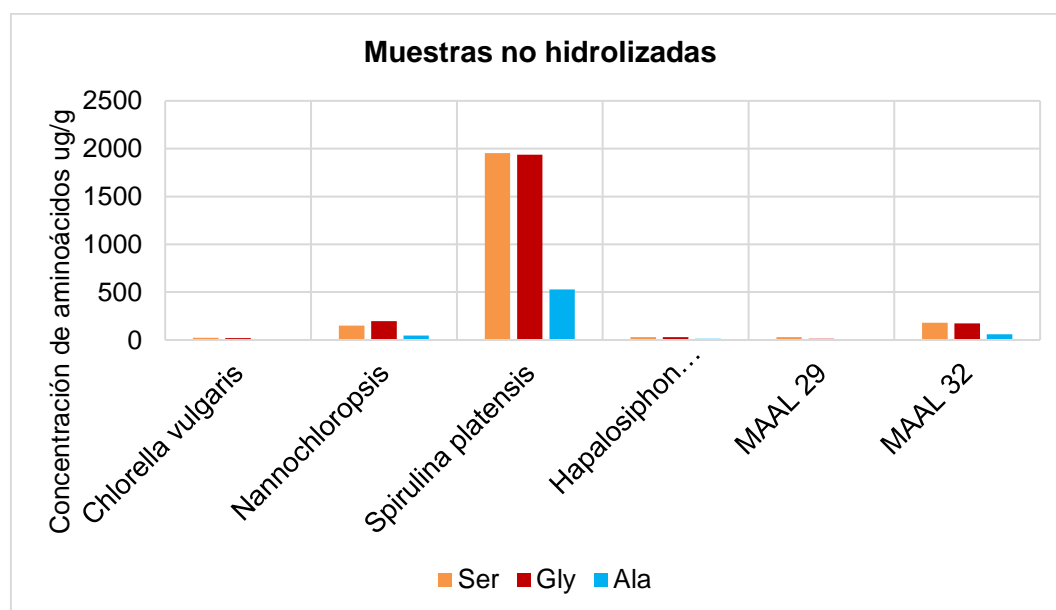
Respecto al perfil de aminoácidos de *C. vulgaris*, en Bito et al. (2020) el aminoácido más destacado fue la arginina (3,2 g/100 g de peso seco). En contraste, en el presente estudio los aminoácidos más abundantes fueron la prolina (188,58 µg aa/g extracto) y lisina (60,45 µg aa/g extracto) (muestra no hidrolizada), limitando a la arginina a una concentración menor de solo 8,36 µg aa/g extracto. Mientras que en la muestra hidrolizada se determinó al glutamato (25324,65 µg aa/g extracto) como el de mayor concentración.

A pesar de que no hay estudios anteriores acerca de aminoácidos en *Hapalosiphon sp.*, en el presente estudio se analizó que la muestra con un tratamiento sin hidrólisis mostró un contenido de isoleucina (4,31), lisina (22,49) y tirosina (7,11) expresados en µg aa/g extracto. Lo cual se aproximó a la concentración hallada en *Nannochloropsis sp.* (5,68; 22,22; y 7,10 µg aa/g extracto) respectivamente. En esta misma microalga, el aminoácido esencial predominante fue la lisina y el no esencial fue la glicina con una concentración de 30,22 µg

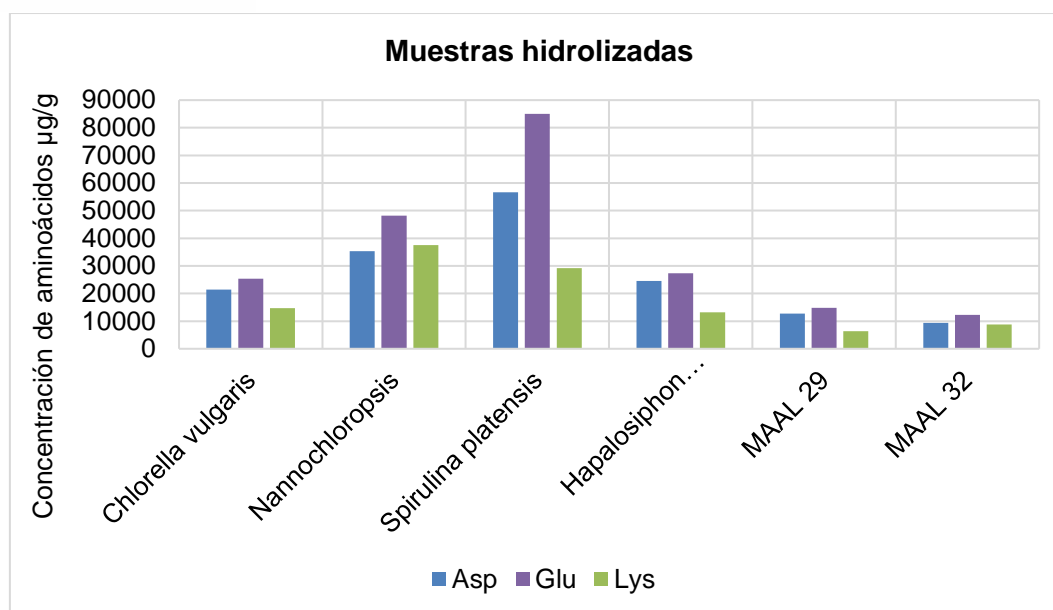
aa/g extracto. En términos generales, se estableció que *Hapalosiphon* (posible) no es una fuente rica de aminoácidos esenciales.

Así mismo, MAAL 29 y MAAL 32, al ser dos especies no identificadas, se dificultó la comparación del contenido proteico y de aminoácidos con respecto a otros estudios realizados previamente. Sin embargo, el contenido de isoleucina puede ser comparable al de las otras especies identificadas. Pues, en MAAL 29 se encontró 7,39  $\mu\text{g}$  aa/g extracto, y en *C. vulgaris* y *Nannochloropsis* sp. 6,48 y 5,68  $\mu\text{g}$  aa/g extracto, respectivamente. En el caso de MAAL 32, metionina y fenilalanina pudieron ser comparables en concentración con referencia a *Nannochloropsis* sp.

En las muestras no hidrolizadas de microalgas, la histidina únicamente estuvo presente en *S. platensis*. En cuanto a isoleucina, no se detectó en *S. platensis*, mientras que las más altas concentraciones se hallaron en las especies desconocidas MAAL 32 y MAAL 29, con 8,82 y 7,39  $\mu\text{g}$  aa/g extracto, respectivamente. Referente a leucina, lisina, metionina, valina fenilalanina, tirosina y treonina se hallaron en todas las muestras analizadas, a excepción de *C. vulgaris* en la que la leucina no fue detectable. *S. platensis* fue la que abarcó la mayor concentración de todos los aminoácidos antes mencionados.



**Figura 3:** Aminoácidos prevalentes determinados de las muestras no hidrolizadas.



**Figura 4:** Aminoácidos prevalentes determinados de las muestras hidrolizadas.

Es importante tomar en cuenta que el contenido de aminoácidos esenciales influye en la calidad de la proteína. En base a los resultados obtenidos de *Spirulina* (no hidrolizada) que incluye casi todos los aminoácidos esenciales, se explica el interés por esta cianobacteria para procesadores y consumidores. En el estudio de Hassan et al. (2020), se reportó una importante cantidad de lisina (176,33 µg/ml), lo cual coincide con el presente estudio, en el que se obtuvo una concentración de lisina de 487,88 µg aa/g extracto. Respecto a los aminoácidos no esenciales, la más alta concentración se atribuyó a serina con 1937,32 µg aa/g extracto.

También, se ha reportado que los niveles de proteína en peso seco de *Spirulina platensis* (460-630 mg/g) eran similares a los de la carne (710-760 mg/g) y soja (alrededor de 400 mg/g); mientras que para *Chlorella vulgaris* (510-530 mg/g) tener un menor contenido proteico no disminuía su potencial para figurar como complemento alimenticio en la industria alimentaria, gracias a las excelentes propiedades emulsionantes que le otorga su perfil proteico (Lupatini et al., 2017).

Para una dieta basada en cereales, la *Spirulina* es una opción para la suplementación, pues se sabe que los cereales son bajos en el aminoácido limitante lisina, a diferencia de la *Spirulina* que posee en altas concentraciones de ésta. Aunque, contiene menos histidina y metionina que la leche bovina, su composición es más equilibrada que la de muchas fuentes de proteínas vegetales (Tessier et al., 2020).

Por otro lado, en Eilam et al. (2023) se planteó que la concentración de proteínas en microalgas se ve afectada por las condiciones de cultivo y la especie. Por ejemplo, las

microalgas que crecen de manera heterótrofa poseen concentraciones de proteína más alta en comparación con aquellas que crecen de forma autótrofa, esto se atribuye muy probablemente a la reducción de pigmentos fotosintéticos, primordialmente la clorofila rica en nitrógeno. Incluso, aquellas cultivadas en agua salina el contenido proteico total de *S. platensis* es de 48,59 % en peso seco, mientras que en agua residual desalinizadora es del 56,17 % (Hassan et al., 2020).

A día de hoy, las proteínas de origen vegetal de alta calidad obtenidas de legumbres se han vuelto cada vez más populares. Sin embargo, los recursos limitados de tierra cultivable y agua dulce no satisfacen la demanda actual. Esto le ha abierto caminos a las proteínas de microalgas, quienes podrían equilibrar los requerimientos diarios en países con escasez de proteínas de origen animal e insuficientes fuentes de aminoácidos esenciales (Wang et al., 2021). Siendo las proteínas de *Spirulina platensis*, por ejemplo, aquellas con proporciones de aminoácidos esenciales recomendadas por la FAO y calidad superior a las proteínas vegetales, las que tomen la rienda (Habib et al., 2008).

Ante todas estas potenciales utilidades de microalgas, también podrían presentarse desventajas asociadas a la posible presencia de metabolitos secundarios considerados compuestos antinutricionales o tóxicos. Por ejemplo, se ha descrito que el excesivo consumo tanto de *Chlorella vulgaris* como de *Arthrospira sp.* podría producir alergias, náuseas, vómitos, problemas gastrointestinales, nefritis intersticial aguda o insuficiencia renal. Estos problemas generan dudas importantes sobre cuan idóneas son las microalgas para el consumo humano (Gómez-Luciano et al., 2019; Hyung et al., 2007).

## 4. Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1. Conclusiones

El objetivo general de este estudio fue determinar el contenido proteico de distintas microalgas que podrían utilizarse como fuente alternativa proteica. Específicamente, se cuantificó el contenido proteico total y el perfil de aminoácidos en seis diferentes tipos de microalgas y cianobacterias, por el método de Bradford y HPLC-FLD, respectivamente.

Se evaluaron dos tipos de tratamientos de las muestras y fue evidente que aplicar un proceso de hidrólisis permitió destruir la pared celular, mejorando considerablemente la extracción proteica y la determinación del perfil de aminoácidos. Además, la hidrólisis ayudó a reducir las interferencias de matriz en los cromatogramas, permitiendo una mejor cuantificación de cada aminoácido.

*Spirulina platensis* fue la microalga que presentó el mejor potencial proteico (50,10 mg/g), al poseer no sólo la mayor concentración de proteína, sino también la mayor parte de los aminoácidos esenciales, lo que evidencia el alto interés de investigación que existe en ella. Además, este estudio ha demostrado que el perfil proteico de la especie no identificada MAAL 32 fue superior al de *Chlorella vulgaris*, la cual ya ha sido reconocida en la industria alimentaria.

Si bien hay evidencia del potencial proteico de microalgas y cianobacterias, es necesario abordar otros estudios acerca de cuan factible es su consumo en personas que tienen patologías de base. Por todo ello, los resultados del estudio constituyen una línea de base para el desarrollo de futuras investigaciones basadas en la exploración de microalgas y cianobacterias como fuente promisorio de proteínas valiosas que se empleen en la dieta. Esto permitirá abordar acerca del cultivo en condiciones macro y se podrían plantear investigaciones sobre formulaciones de alimentos a base de microalgas como alternativas proteicas.

### 4.2. Recomendaciones

Para futuros estudios es necesario validar el proceso de extracción y precipitación proteica que se emplee, ya que estos pasos previos son cruciales para obtener una buena liberación proteica de la matriz de la muestra, antes de proceder a realizar la cuantificación. Pues, se conoce que la asociación entre métodos químicos, físicos y mecánicos bajo condiciones controladas permite obtener mejores rendimientos de recuperación proteica. Además, se debería realizar estudios adicionales acerca de la digestibilidad de aminoácidos de microalgas y estudios toxicológicos, con el propósito de reforzar investigaciones de salud y



nutrición. Así, se contaría con información adicional que permita definir el valor biológico de las microalgas.

También, se precisa optimizar las condiciones de cultivo de microalgas para tener biomasa disponible con la que se realice un mayor número de réplicas en los análisis experimentales. Siendo indispensable la información acerca de las condiciones de cultivo de microalgas y cianobacterias. Esto, debido a que dichas condiciones afectan la concentración de nutrientes en las especies, lo cual influye considerablemente en la determinación de aminoácidos y cuantificación de proteínas.

## Referencias

- Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., & Iluz, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329(January), 124895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124895>
- Abugrara, A. M., Khairy, H. M., El-Sayed, H. S., & Senousy, H. H. (2020). Effect of various bicarbonate supplements on biodiesel production and valuable biochemical components of the marine eustigmatophyceae nannochloropsis oculata (Droop). *Egyptian Journal of Botany*, 60(3), 785–796. <https://doi.org/10.21608/EJBO.2020.27849.1492>
- Acquaviva, A. (2014). *Desarrollo y optimización de metodologías separativas de análisis de citrulina y aminoácidos metabólicamente relacionados*.
- Al-Zuhair, S., Ashraf, S., Hisaindee, S., Darmaki, N. Al, Battah, S., Svistunenko, D., Reeder, B., Stanway, G., & Chaudhary, A. (2017). Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Engineering in Life Sciences*, 17(2), 175–185. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600127>
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Ulrikh, E., Ivanova, S., Prosekov, A., & Dolganyuk, V. (2021). Production, Purification, and Study of the Amino Acid Composition of Microalgae Proteins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092767>
- 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>
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs*, 17(5), 1–29. <https://doi.org/10.3390/md17050304>
- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Bilal, M., Rasheed, T., Ahmed, I., & Iqbal, H. M. N. (2017). High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 9(3), 319–342. <https://doi.org/10.2741/S490>
- Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., & Watanabe, F. (2020). Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutrients*, 12.

- Boer, K., Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., & Bahri, P. A. (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1681–1698. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9835-z>
- Boukid, F., Comaposada, J., Ribas-Agustí, A., & Castellari, M. (2021). Development of High-Protein Vegetable Creams by Using Single-Cell Ingredients from Some Microalgae Species. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/FOODS10112550>
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuña, C., & Jamett, F. (2015). High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *Lwt*, 60(1), 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.057>
- Callejo-López, J., Ramírez, M., Bolívar, J., & Cantero, D. (2019). Main Variables Affecting a Chemical-Enzymatic Method to Obtain Protein and Amino Acids from Resistant Microalgae. *Jorunal of Chemistry*, 1–10.
- Campos, D. (2012). Aplicación de la espectrometría de masas en tandem en el tamiz neonatal de los errores innatos del metabolismo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(2), 195–203.
- Chia, S. R., Chew, K. W., Zaid, H. F. M., Chu, D. T., Tao, Y., & Show, P. L. (2019). Microalgal Protein Extraction From *Chlorella vulgaris* FSP-E Using Triphasic Partitioning Technique With Sonication. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00396>
- Cunha, S. A., Coscueta, E. R., Nova, P., Silva, J. L., & Pintado, M. M. (2022). Bioactive Hydrolysates from *Chlorella vulgaris*: Optimal Process and Bioactive Properties. *Molecules*, 27(8), 2505. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27082505/S1>
- Eilam, Y., Khattib, H., Pintel, N., & Avni, D. (2023). Microalgae-Sustainable Source for Alternative Proteins and Functional Ingredients Promoting Gut and Liver Health. *Global Challenges (Hoboken, NJ)*, 7(5). <https://doi.org/10.1002/GCH2.202200177>
- El Kantar, S., Rajha, H. N., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. *Food Chemistry*, 295(May 2019), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.111>
- ENSANUT. (2013). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*.

- FAO. (2007). Protein and Amino Acid Requirements of Infants and Children. In *Nutrition abstracts and reviews*.
- Ferrazzano, G. F., Papa, C., Pollio, A., Ingenito, A., Sangianantoni, G., & Cantile, T. (2020). Cyanobacteria and Microalgae as Sources of Functional Foods to Improve Human General and Oral Health. *Molecules*, 25(21). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25215164>
- Ferreira de Oliveira, A., & Ariseto, A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2022.100157>
- Filipigh, Á. (2021). *Valorización de un consorcio de microalgas y bacterias: comparación de métodos convencionales y nuevos métodos de extracción asistida*. Universidad de Valladolid.
- Goldring, J. P. D. (2019). Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 31–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_3)
- Gómez-Luciano, C. A., Vriesekoop, F., & Urbano, B. (2019). Towards Food Security of Alternative Dietary Proteins: a Comparison between Spain and the Dominican Republic. *The Amfiteatru Economic Journal*, 21(51), 393–393. <https://ideas.repec.org/a/aes/amfeco/v21y2019i51p393.html>
- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). 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>
- Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y. W., Wang, L. T., Niu, L. J., Liu, Z. M., & Fu, Y. J. (2019). Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction. *Food Chemistry*, 296(May), 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.196>
- Habib, A., Huntington, T., & Hasan, M. (2008). A review on culture production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Hasegawa, T., Fujimori, S., Havlík, P., Valin, H., Bodirsky, B. L., Doelman, J. C., Fellmann, T., Kyle, P., Koopman, J. F. L., Lotze-Campen, H., Mason-D'Croz, D., Ochi, Y., Pérez

- Domínguez, I., Stehfest, E., Sulser, T. B., Tabeau, A., Takahashi, K., Takakura, J., van Meijl, H., ... Witzke, P. (2018). Risk of increased food insecurity under stringent global climate change mitigation policy. *Nature Climate Change*, 8(8), 699–703. <https://doi.org/10.1038/S41558-018-0230-X>
- Hassan, K., Ismael Salih, S., Hassan Sdiq, K., & Tahsin Kakayi, S. (2020). Evaluation of Spirulina Platensis Crude Extract against some Pathogenic Microorganisms and Determination of Amino Acid Profile by HPLC, Erbil City Molecular detection of Shiga toxin genes and pathogenicity of Escherichia coli O157: H7 isolated from salad samples in Erbil city-Iraq View project Evaluation of Spirulina Platensis Crude Extract against some Pathogenic Microorganisms and Determination of Amino Acid Profile by HPLC, Erbil City. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 28(1), 2020–2046. <https://www.researchgate.net/publication/344242926>
- Henderson, J. W., Ricker, R. D., Bidlingmeyer, B. A., & Woodward, C. (2000). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. *Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent*, 1100(1100), 1-10.
- Hou, Y., & Wu, G. (2018). Nutritionally Essential Amino Acids. *Advances in Nutrition*, 9(6), 851. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMY054>
- Hyung, Y., Hwan, K., Hee, W., Hee, N., Sook, Y., & Won, J. (2007). Acute tubulointerstitial nephritis following ingestion of Chlorella tablets. *Pediatric Nephrology*, 22, 887–888. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0420-z>
- Ji, J., Shi, L., Ampofo, J., & Abbey, Lord. (2022). Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods*, 11(12), 1744. <https://doi.org/10.3390/FOODS11121744>
- Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García, P., Muñoz, R., & Bolado, S. (2021). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129330>
- Kent, M., Welladsen, H. M., Mangott, A., Li, Y., Kent, M., Welladsen, H. M., Mangott, A., & Li, Y. (2015). Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0118985>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Methods for measuring the concentrations of proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), 97–101.

<https://doi.org/10.1101/PDB.TOP102277>

- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Acién-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109356>
- Lestari, L., Rohman, A., Riswahyuli, Purwaningsih, S., Kurniawati, F., & Irnawati. (2022). Analysis of amino acids in food using High Performance Liquid Chromatography with derivatization techniques: a review. *Food Research*, 6(3), 435–442. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(3\).442](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(3).442)
- Liu, Y., Liu, X., Cui, Y., & Yuan, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87(June), 106054. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>
- Lopes, M., Soares, J., dos Reis, J., de Oliveira, M., Teixeira, L., & Arêdes, M. (2020). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1–28. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>
- López, C. V. G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724–732. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7987>
- Machado, L., Carvalho, G., & Pereira, R. (2022). Effects of innovative processing methods on microalgae cell wall: prospects towards digestibility of protein-rich biomass. *Biomass*, 2(2), 80–102. <https://doi.org/10.3390/BIOMASS2020006>
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein Determination-Method Matters. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/FOODS7010005>
- Motlagh, S. R., Elgharbawy, A. A., Khezri, R., Harun, R., & Omar, R. (2021). Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of protein from *Nannochloropsis* sp. biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-01778-2>

- Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, 42, 101617. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101617>
- Nielsen, S. (2017). Basic Principles of Chromatography. In H. Dennis & N. Suzanne (Eds.), *Food Analysis* (Fifth edit, pp. 187–192). Springer International Publishing.
- Olmedo, V. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
- Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73(1), A.3A.1-A.3A.32. <https://doi.org/10.1002/CPPH.3>
- Ovalles, J., León, A., Vielma, R., & Medina, A. (2002). Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista De La Facultad De Farmacia*, 44(1), 7–78.
- Özcan, S., & Şenyuva, H. (2006). Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods. *Journal of Chromatography*, 1135(2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.039>
- Piedra, I. (2020). *Efecto de los parámetros operacionales y las condiciones de cultivo en la valorización de microalgas mediante hidrólisis enzimática*. Universidad de Valladolid.
- Qie, F., Zhu, J., Rong, J., & Zong, B. (2019). Biological removal of nitrogen oxides by microalgae, a promising strategy from nitrogen oxides to protein production. *Bioresource Technology*, 292. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122037>
- Rahman, M. M., Hosano, N., & Hosano, H. (2022). Recovering Microalgal Bioresources: A Review of Cell Disruption Methods and Extraction Technologies. *Molecules*, 27(9), 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>
- Ramos-Romero, S., Torrella, J. R., Pagès, T., Viscor, G., & Torres, J. L. (2021). Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. *Nutrients*, 13(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/NU13020563>
- Ribeiro, C., Santos, E. T., Costa, L., Brazinha, C., Saraiva, P., & Crespo, J. G. (2022). Nannochloropsis sp. Biorefinery: Recovery of Soluble Protein by Membrane



Ultrafiltration/Diafiltration. *Membranes*, 12(4), 401.  
<https://doi.org/10.3390/MEMBRANES12040401>

Royal Society of Chemistry. (n.d.). *ChemSpider: Search and share chemistry*.  
<http://www.chemspider.com/>

Ruangsomboon, S. (2014). Effect of media and salinity on lipid content of cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(2), 307–315.

Safi, C., Charton, M., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Research*, 3(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.017>

Sedighi, M., Jalili, H., Darvish, M., Sadeghi, S., & Ranaei-Siadat, S. O. (2019). Enzymatic hydrolysis of microalgae proteins using serine proteases: A study to characterize kinetic parameters. *Food Chemistry*, 284(December 2018), 334–339.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.111>

Stirk, W. A., Bálint, P., Vambe, M., Lovász, C., Molnár, Z., van Staden, J., & Ördög, V. (2020). Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*, 307, 35–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.012>

Tan, J. Sen, Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1), 129.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>

Tessier, R., Calvez, J., Khodorova, N., & Gaudichon, C. (2020). Protein and amino acid digestibility of 15N *Spirulina* in rats. *European Journal of Nutrition* 2020 60:4, 60(4), 2263–2269. <https://doi.org/10.1007/S00394-020-02368-0>

Tinoco, C. (2009). *Identificación y cuantificación de diferentes aminoácidos por cromatografía de gases capilar*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Torres, M. (2019). El rol de los solventes eutécticos para obtener compuestos bioactivos de fuentes naturales. *Universidad Autónoma de Madrid*, 1–55.

Vivanco, D., Ardiles, P., Castillo, D., & Puente, L. (2021). Tecnología emergente: Campo de pulsos eléctricos (PEF) para el tratamiento de alimentos y su efecto en el contenido de antioxidantes. *Revista Chilena de Nutrición*, 48(4), 609–619.



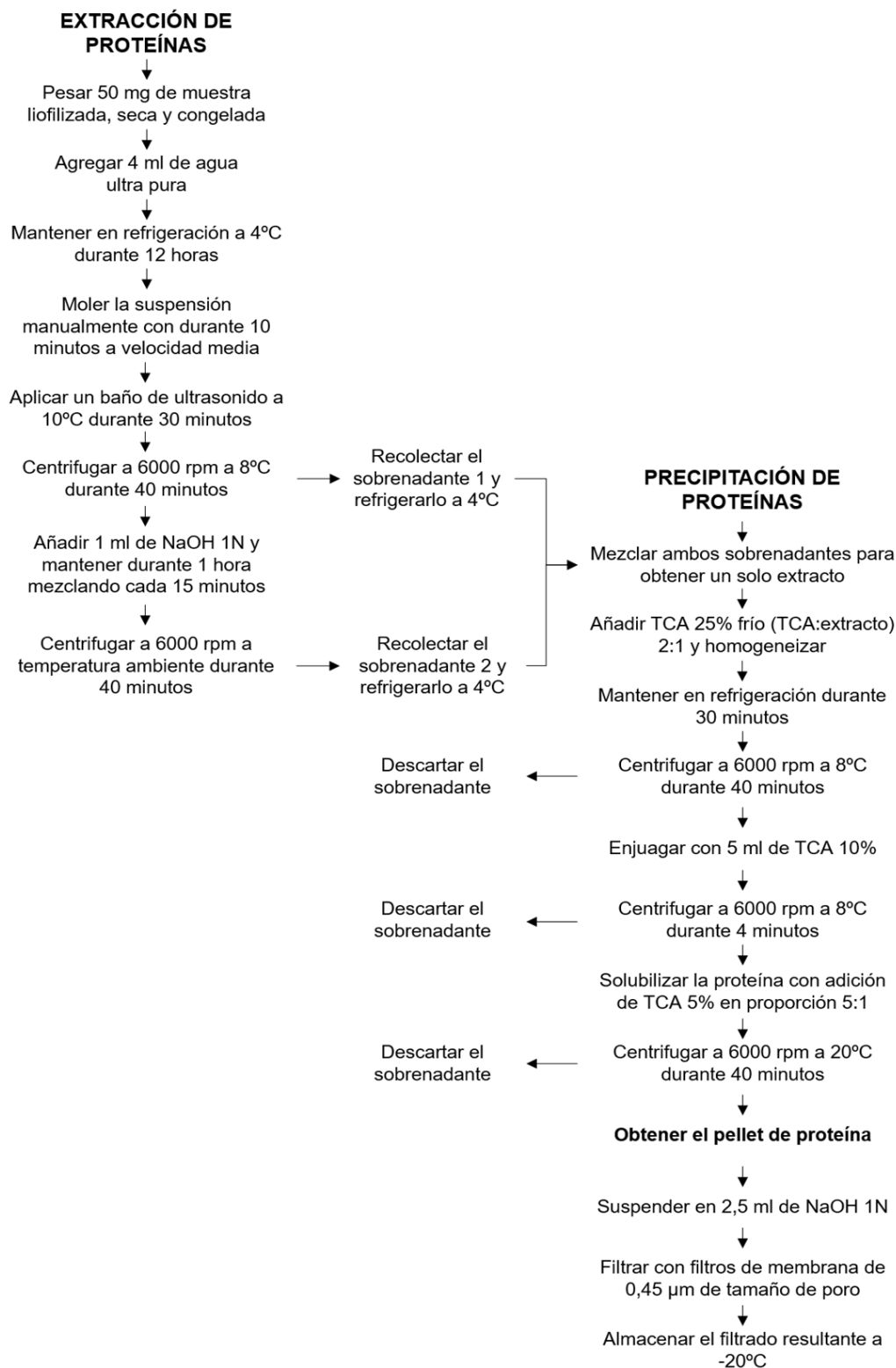
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000400609>

Wang, Y., Tibbetts, S. M., & McGinn, P. J. (2021). Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. *Foods*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/foods10123002>

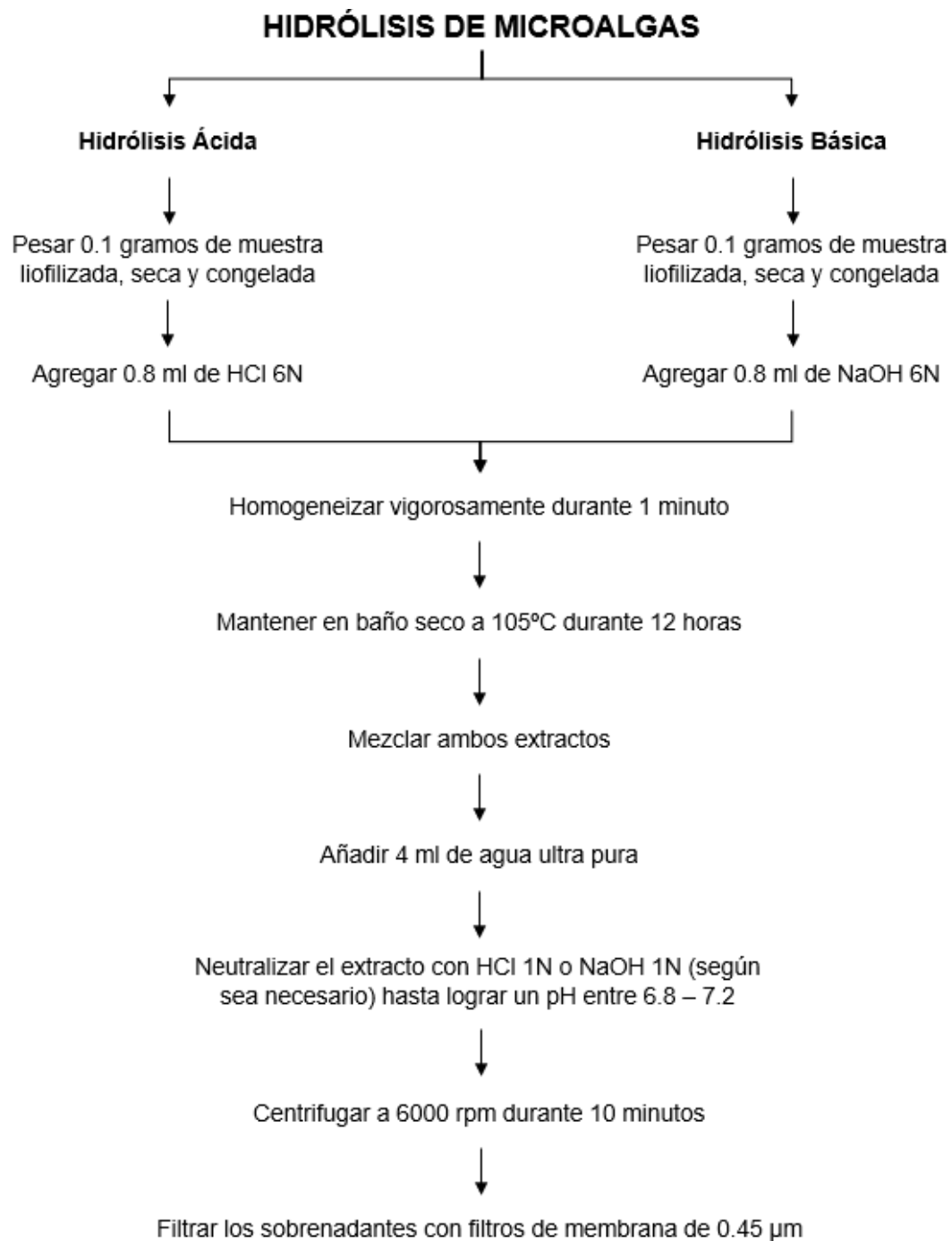
Zhang, R., Parniakov, O., Grimi, N., Lebovka, N., Marchal, L., & Vorobiev, E. (2019). Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(2), 173–186. <https://doi.org/10.1007/S00449-018-2038-5/METRICS>

Zhang, Z., & Volkman, J. (2017). Algaenan structure in the microalga *Nannochloropsis oculata* characterized from stepwise pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 104, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.11.005>

## Anexos

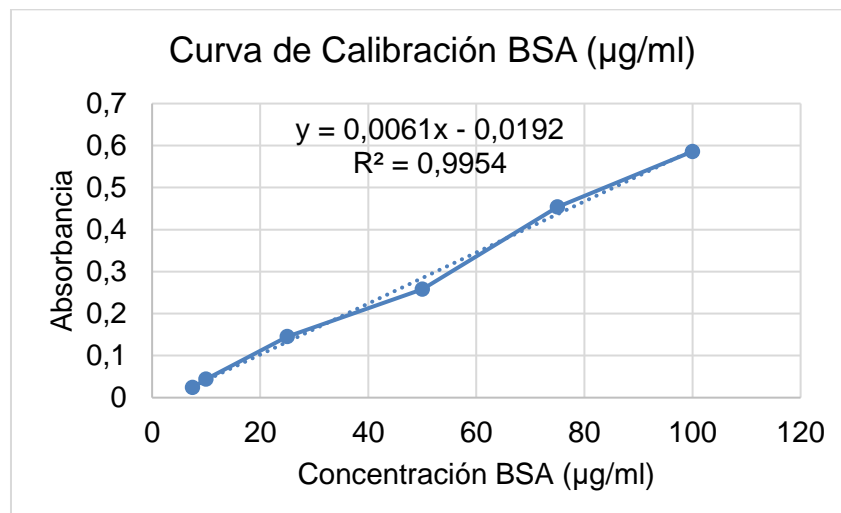
**Anexo A.** Procedimiento de extracción y precipitación proteica de muestras de microalgas y cianobacterias

## Anexo B. Procedimiento de hidrólisis de microalgas y cianobacterias

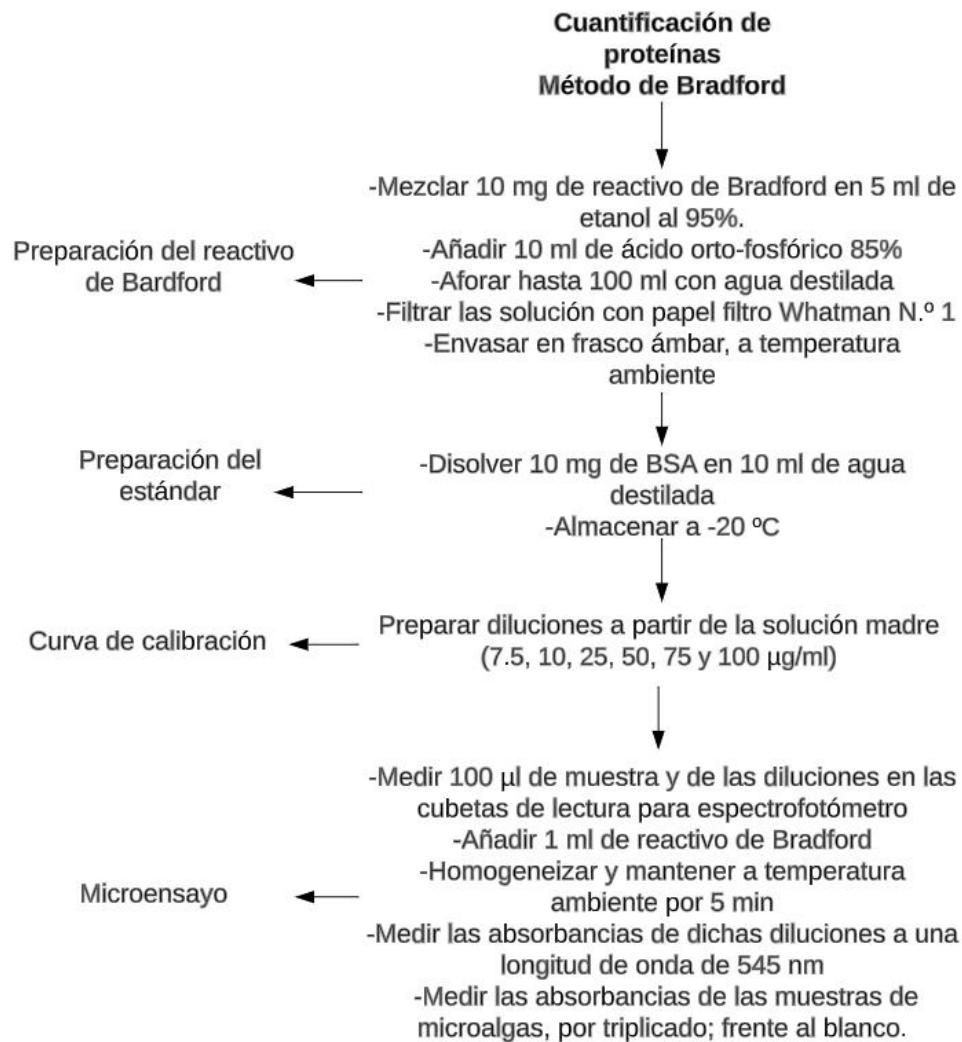


**Anexo C.** Absorbancias de estándares de albúmina de suero bovina (BSA)

Concentración BSA $\mu\text{g/ml}$	Absorbanci a
7,5	0,024
10	0,044
25	0,145
50	0,258
75	0,454
100	0,586

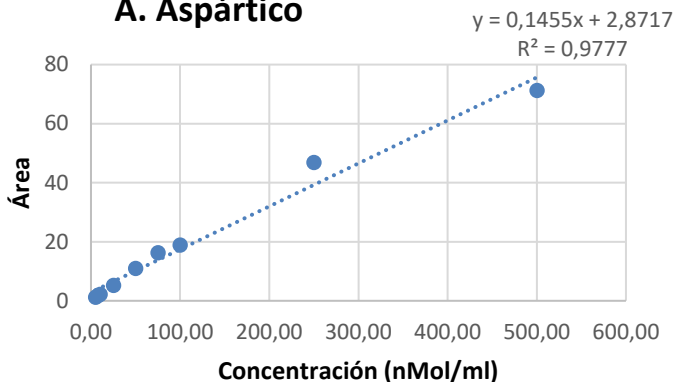
**Anexo D.** Curva de calibración de estándares de albúmina de suero bovina (BSA)

## Anexo E. Procedimiento de cuantificación de proteínas por el método de Bradford

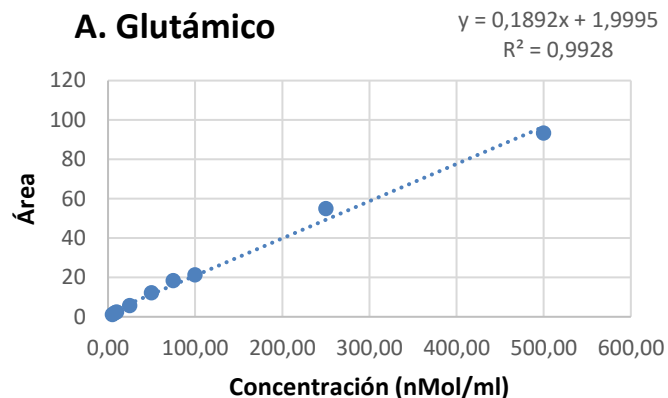


## Anexo F. Curvas de calibración de estándares de aminoácidos.

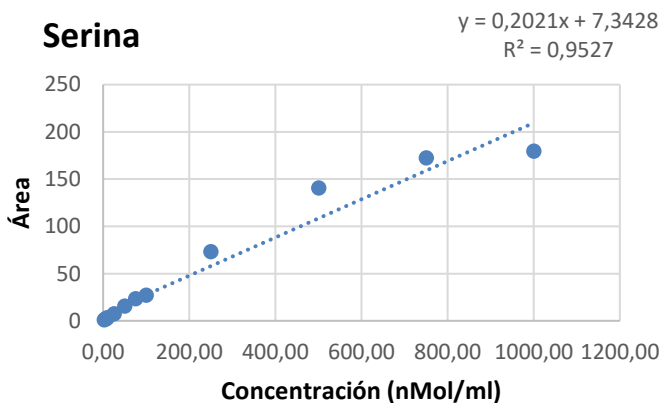
**A. Aspártico**



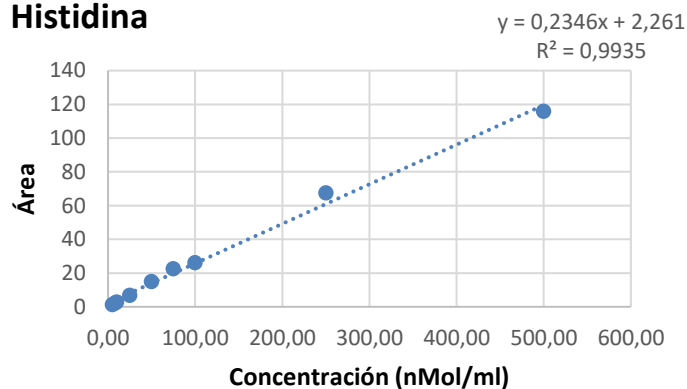
**A. Glutámico**



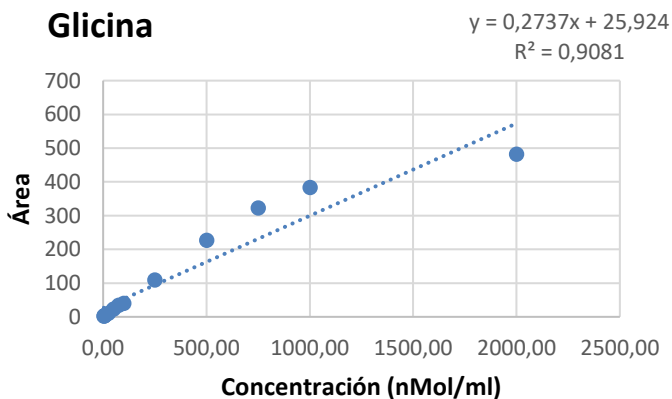
**Serina**



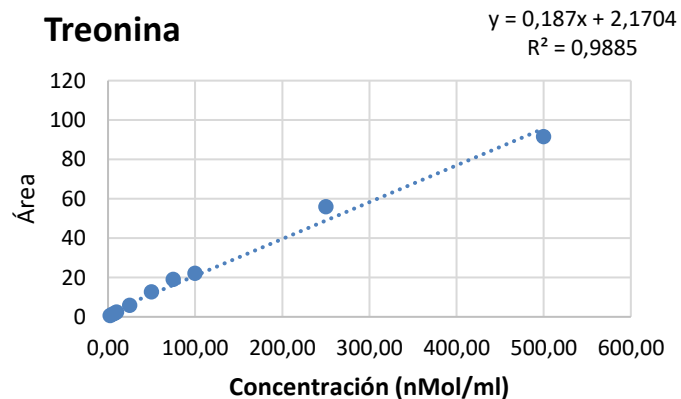
**Histidina**



**Glicina**



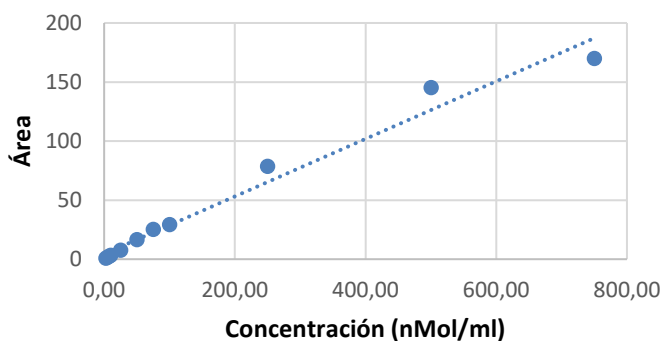
**Treonina**



## Arginina

$$y = 0,2437x + 4,3806$$

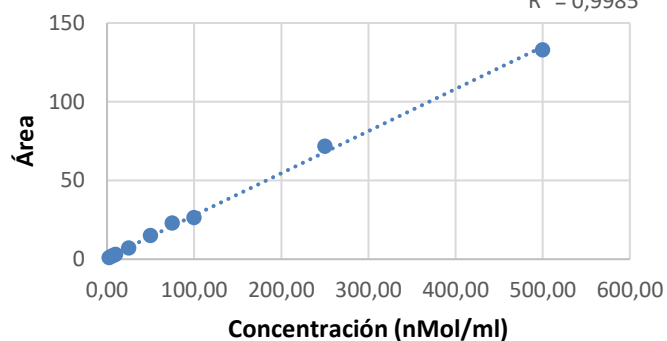
$$R^2 = 0,9753$$



## Alanina

$$y = 0,2677x + 1,0185$$

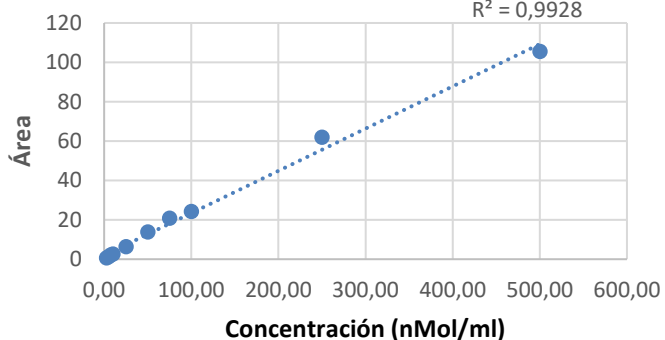
$$R^2 = 0,9985$$



## Tirosina

$$y = 0,2147x + 1,9467$$

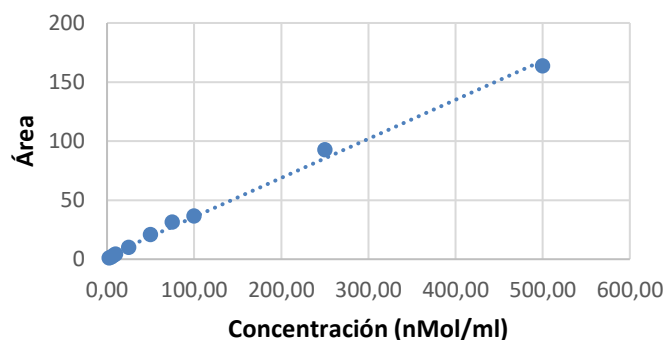
$$R^2 = 0,9928$$



## Valina

$$y = 0,3309x + 2,6756$$

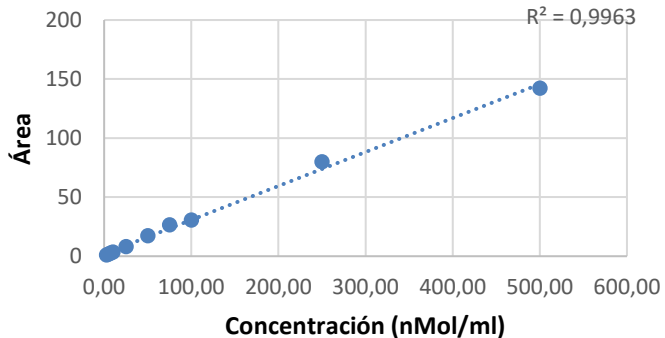
$$R^2 = 0,9955$$



## Metionina

$$y = 0,2875x + 1,9669$$

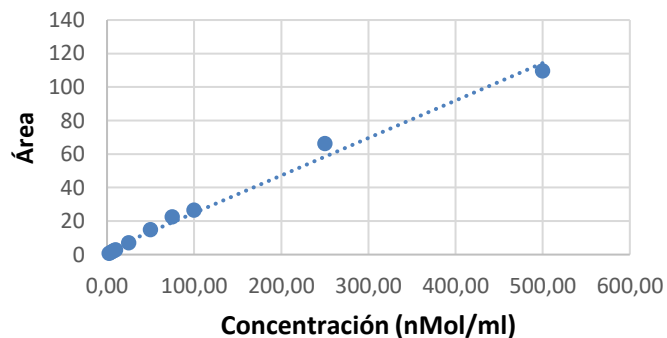
$$R^2 = 0,9963$$



## Fenilalanina

$$y = 0,2236x + 2,4932$$

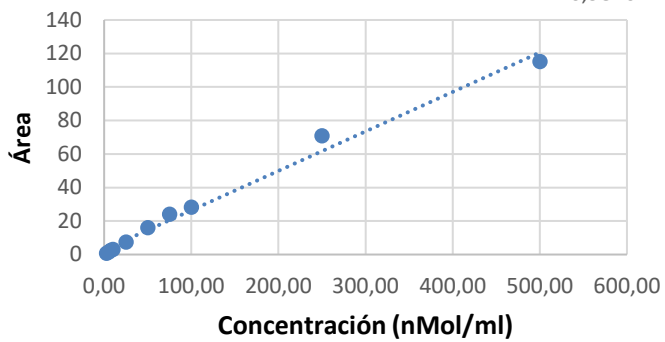
$$R^2 = 0,9896$$



## Isoleucina

$$y = 0,2356x + 2,8177$$

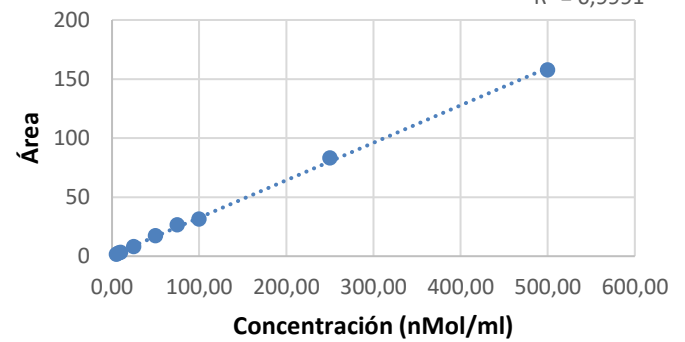
$$R^2 = 0,9876$$



## Leucina

$$y = 0,3171x + 0,8596$$

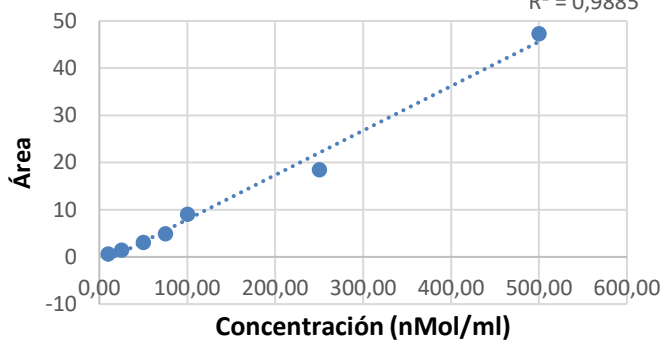
$$R^2 = 0,9991$$



## Lisina

$$y = 0,0942x - 1,4857$$

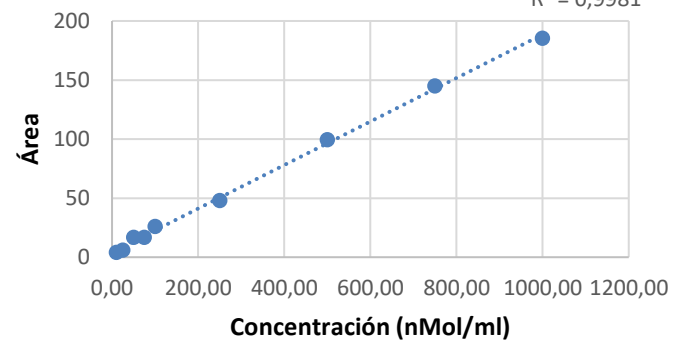
$$R^2 = 0,9885$$



## Prolina

$$y = 0,1842x + 4,3211$$

$$R^2 = 0,9981$$



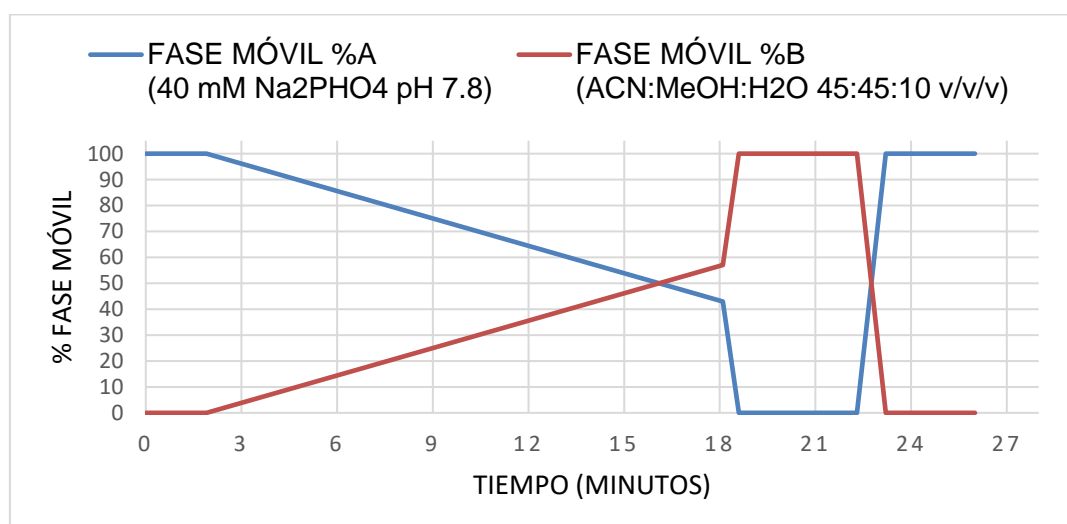


**Anexo G.** Áreas de las diferentes concentraciones de estándares de aminoácidos utilizadas para construir las curvas de calibración

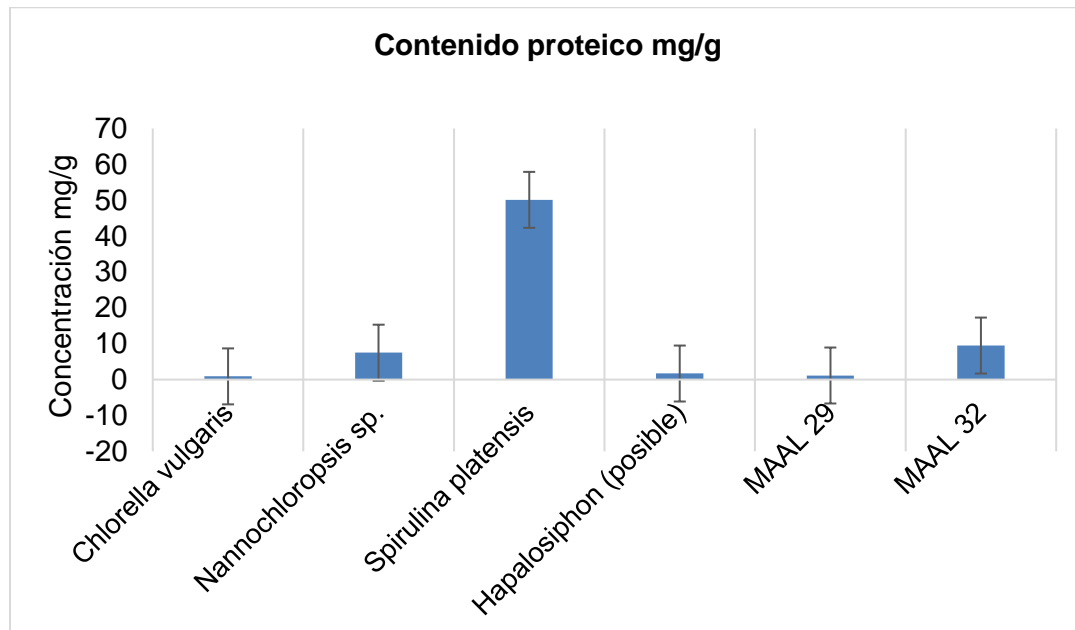
	Concentración (nMol/ml)												
	2,5	5	7,5	10	25	50	75	100	250	500	750	1000	2000
<b>Asp</b>	0,66	1,19	1,75	2,21	5,18	10,98	16,30	18,93	46,89	71,24	71,13	66,97	53,36
<b>Glu</b>	0,62	1,23	1,94	2,39	5,69	12,17	18,35	21,28	54,97	93,39	100,37	98,11	82,14
<b>Ser</b>	1,12	2,06	2,56	3,35	7,55	15,60	23,48	27,24	73,22	140,75	172,46	179,68	51,60
<b>His</b>	0,72	1,41	2,14	2,85	6,84	14,94	22,57	26,17	67,49	115,85	126,47	125,14	0,77
<b>Gly</b>	1,53	2,73	3,67	4,75	10,82	22,78	34,41	40,31	109,43	226,56	322,22	382,90	481,80
<b>Thr</b>	0,63	1,24	1,84	2,48	5,93	12,67	19,07	22,07	55,96	91,50	96,22	94,11	78,47
<b>Arg</b>	0,88	1,64	2,45	3,25	7,70	16,56	25,14	29,26	78,72	145,30	169,89	174,03	157,86
<b>Ala</b>	0,97	1,74	2,38	3,14	7,19	15,15	22,90	26,45	71,69	132,98	156,11	159,36	140,28
<b>Tyr</b>	0,71	1,35	2,07	2,68	6,41	13,75	20,79	24,20	62,01	105,53	110,17	109,57	90,49
<b>Val</b>	1,09	2,03	3,13	4,28	10,13	20,75	31,54	36,56	92,72	163,66	171,43	172,80	140,97
<b>Met</b>	1,09	1,88	2,77	3,61	8,24	17,46	26,49	30,59	80,03	142,20	159,59	162,62	141,92
<b>Phe</b>	0,75	1,46	2,23	2,91	6,96	14,94	22,50	26,51	66,34	109,53	116,02	115,14	94,63
<b>Ile</b>	0,78	1,55	2,39	3,09	7,41	15,99	24,10	28,30	70,93	115,10	119,52	120,47	94,76
<b>Leu</b>	0,88	1,69	2,61	3,37	8,02	17,42	26,44	31,34	83,24	157,82	187,56	196,26	169,49
<b>Lys</b>	0,13	0,29	0,64	0,59	1,45	3,09	4,87	9,01	18,44	47,28	55,33	61,58	33,04
<b>Pro</b>	2,66	2,83	3,20	3,97	6,03	16,71	16,84	25,94	47,97	99,42	145,09	185,46	306,64

**Anexo H.** Programación para la derivatización pre-columna en el automuestreador del HPLC

1	Extracción de 2,5 µl del vial 1 que contiene buffer de borato
2	Extracción de 0,5 µl de muestra del vial 11 (muestra de aa)
3	Mezclar 3 µl al aire con una velocidad de máxima de 2x
4	Esperar 0,5 minutos
5	Extracción de 0 µl del vial 2 (lavado externo de la aguja con agua en el vial destapado)
6	Extracción de 0,5 µl del vial 3 que contiene OPA
7	Mezclar 3,5 µl al aire con una velocidad máxima de 6x
8	Extracción de 0 µl del vial 2 (lavado externo de la aguja con vial destapado)
9	Extracción de 0,5 µl del vial 4 (FMOC)
10	Mezclar 4 µl al aire con velocidad máxima de 6x
11	Extraer 32 µl del vial 5 (agua)
12	Mezclar 18 µl al aire con una velocidad de 2x
13	Injectar

**Anexo I.** Gradiente de fases móviles en relación con el tiempo de análisis

**Anexo J.** Contenido proteico total de especies de microalgas y cianobacterias (mg de proteína / g de extracto).



**Anexo K:** Parámetros cromatográficos del método HPLC-FLD para la determinación de aminoácidos.

Aminoácido	Tiempo de retención (tR) (min)	Ventana de tR (min)	LOD* (µg/ml)	LOQ* (µg/ml)	Rango lineal (nMol/ml)	Rango lineal (µg /ml)	Linealidad (R <sup>2</sup> )
Aspartato	1,62	1,57 – 1,67	65,05	130,11	5 – 500	665,5 – 66550,0	0,9777
Glutamato	3,44	3,99 – 3,49	144,36	288,72	5 – 500	735,7 – 73566,0	0,9928
Serina	5,95	5,90 – 6,00	169,52	339,03	2,5 – 1000	262,7 – 105092,0	0,9527
Histidina	6,67	6,62 – 6,72	80,79	161,58	5 – 500	775,8 – 77576,0	0,9935
Glicina	7,12	7,07 – 7,17	48,42	96,85	2,50 – 2000	187,7 – 150144,0	0,9081
Treonina	7,33	7,28 – 7,38	20,03	40,06	2,50 – 500	297,8 – 59560,0	0,9885
Arginina	8,14	8,09 – 8,19	34,00	67,99	2,50 – 750	435,5 – 130650,0	0,9753
Alanina	8,47	8,42 – 8,52	47,47	94,95	2,50 – 500	222,7 – 44546,0	0,9985
Tirosina	9,65	9,60 – 9,70	77,81	155,62	2,50 – 500	453,0 – 90596,0	0,9928
Valina	11,38	11,33 – 11,43	75,84	151,68	2,50 – 500	292,9 – 58576,0	0,9955
Metionina	11,57	11,52 – 11,62	48,53	97,05	2,50 – 500	373,0 – 74606,0	0,9963
Fenilalanina	12,73	12,68 – 12,78	59,05	118,11	2,50 – 500	413,0 – 82596,0	0,9896
Isoleucina	12,90	12,85 – 12,95	64,10	128,20	2,50 – 500	2049,6 – 65586,0	0,9876
Leucina	13,48	13,43 – 13,53	70,89	141,79	5 – 500	655,9 – 65586,0	0,9991
Lisina	13,94	13,89 – 13,99	580,18	1160,35	10 – 500	1461,9 – 73096,0	0,9885
Prolina	16,95	16,90 – 17,00	1556,15	3112,30	10 – 1000	1151,3 – 115132,0	0,9981

\*LOD = Límite de detección; LOQ = Límite de cuantificación