

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*
ASISTIDO POR ULTRASONIDO**

CATALINA BERNAL LÓPEZ

Ingeniera de Alimentos

DIRECTORES

AIDA RODRÍGUEZ DE STOUVENEL Ph.D

Profesora de la Escuela de Ingeniería de Alimentos

Universidad del Valle

JORGE ENRIQUE LÓPEZ GALÁN DR. Sci.

Profesor de la Escuela de Ingeniería Química

Universidad del Valle

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS

ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

2015

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*
ASISTIDO POR ULTRASONIDO**

CATALINA BERNAL LÓPEZ

Ingeniera de Alimentos

TESIS DE MAESTRÍA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

2015

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	11
1 MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 MICROALGA	12
1.2 CULTIVO DE MICROALGA.....	14
1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MICROALGAS.....	15
1.4 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MICROALGAS.....	19
1.4.1 ULTRASONIDO	22
1.4.2 SURFACTANTE	23
1.5 FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS EN ALIMENTACIÓN	25
1.5.1 PROPIEDADES EMULSIFICANTES Y ESPUMANTES DE LAS PROTEÍNAS	25
1.5.1.1 Propiedades emulsificantes	25
1.5.1.2 Propiedades espumantes.....	27
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 CULTIVO DE MICROALGAS.....	29
2.1.1 CULTIVO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> A NIVEL DE LABORATORIO	29
2.1.2 CULTIVO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> A NIVEL PILOTO	32
2.2 CARACTERIZACIÓN DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> .	35
2.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> ASISTIDO POR ULTRASONIDO	35
2.3.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA ASISTIDO POR ULTRASONIDO (4 ^{TA} ETAPA).....	37
2.3.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS	38
2.3.2.1 Capacidad de formación y estabilidad de espuma	38
2.3.2.2 Actividad emulsificante.....	39
2.4 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.....	39
2.5 EVALUACIÓN DE COSTOS GLOBALES	40
3 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	43
3.1 CULTIVO DE MICROALGAS.....	43
3.1.1 CULTIVO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> A NIVEL DE LABORATORIO	43
3.1.2 CULTIVO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> A NIVEL PILOTO	44
3.1.2.1 ESCALA PILOTO A DIFERENTES LONGITUDES	48
3.2 CARACTERIZACIÓN DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> .	49

3.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> ASISTIDO POR ULTRASONIDO	50
3.3.1 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA EMPLEANDO BAÑO DE ULTRASONIDO	50
3.3.2 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA EMPLEANDO SONDA DE ULTRASONIDO	52
3.4 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE MICROALGA	54
3.4.1 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS AISLADAS CON ULTRASONIDO EN LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (%).....	60
3.4.2 PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LA PROTEÍNA SOLUBLE AISLADA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i>	65
3.5 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	69
3.6 EVALUACIÓN DE COSTOS GLOBALES	70
3.6.1 MATERIAS PRIMAS	70
3.6.2 EQUIPOS PRINCIPALES PARA EL PROCESO Y SERVICIOS	71
3.6.3 ANÁLISIS DE COSTOS	72
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>74</u>
<u>APÉNDICES</u>	<u>75</u>
APÉNDICE A. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	75
APÉNDICE B. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN	76
APÉNDICE C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.	77
APÉNDICE D. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA	81
APÉNDICE E. ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS PROTEÍNAS	85
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>89</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de la célula y pared celular de <i>N. gaditana</i> (A-G) (Scholz <i>et al.</i> , 2014) y <i>C. vulgaris</i> (H-J) (Yamamoto <i>et al.</i> , 2004).....	12
Figura 2. Sistemas de cultivos de microalgas: (a) piscina tipo carrusel, (b) placa delgada, (c) tubular inclinado y (d) horizontal – tubular (Bitog <i>et al.</i> , 2009).....	15
Figura 3. Valorización de microalgas, desde la producción hasta su disposición final	18
Figura 4. Diagrama que muestra las diferentes fases de la formación de la pared celular hija en <i>Chlorella vulgaris</i> : a) Fase temprana del crecimiento celular; b) Fase de crecimiento celular; c) Fase de división del cloroplasto; d) Inicio de la fase de división del protoplasto; e) Fase de división del protoplasto; f) Fase de maduración de células hijas y g) Fase de eclosión (Yamamoto <i>et al.</i> , 2005)	19
Figura 5. Daño celular por efecto del ultrasonido (Adaptado por Chemat <i>et al.</i> , 2011).....	22
Figura 6. Cepario de microalga	30
Figura 7. Fotobiorreactor horizontal tubular. A) Imagen lateral de la tubería, B) Imagen de <i>Chlorella vulgaris</i> al microscopio 40X, C) Fotobiorreactor de 8 m, D) Fotobiorreactor de 35 m	33
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción de proteína	37
Figura 9. Diagrama de flujo para la extracción de proteína de <i>Chlorella vulgaris</i>	42
Figura 10. Diagrama de flujo para la extracción de proteína de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	42
Figura 11. Cambio de la conductividad vs tiempo, en cada uno de los biorreactores	44
Figura 12. Variación en la tasa de crecimiento específico e índice de crecimiento para cada una de las corridas a escala piloto	45
Figura 13. Efecto de las variables en: A) la tasa de crecimiento específico y B) el índice de crecimiento	46
Figura 14. Diagrama de pareto de los efectos estandarizados para: A) la tasa de crecimiento específico y B) el índice de crecimiento.....	47
Figura 15. Gráfica de superficie que muestra el efecto del pH y la concentración de nitrógeno sobre: A) la tasa de crecimiento específica y B) el índice de crecimiento	48
Figura 16. Extractos de proteína soluble de <i>C. vulgaris</i> y <i>N. gaditana</i>	55
Figura 17. Efecto de los factores en el rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	56
Figura 18. Diagrama de pareto del rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	57
Figura 19. Análisis de proteínas por SDS-PAGE A) de <i>Chlorella vulgaris</i> , B) dado por la literatura para <i>Chlorella vulgaris</i> por (Ursu <i>et al.</i> , 2014)	59
Figura 20. Contorno estimado (valores codificados) para el rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), para el pH vs humedad (%).....	60
Figura 21. Efecto de los factores en la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	61
Figura 22. Efecto de los factores en la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	63

Figura 23. Contorno estimado (valores codificados) para la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), para el pH vs humedad (%).....	64
Figura 24. Efecto de los factores en la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	66
Figura 25. Diagrama de pareto de los factores en la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.....	67
Figura 26. Contorno estimado (valores codificados) para la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (1) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (2) y sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (3) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (4), para el pH vs humedad (%).....	68
Figura 27. Análisis de la cinética para el proceso de extracción de proteína con sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (pH 9.5, Surfactante 0.5%, potencia 350 W, humedad 92%) y <i>Nannochloropsis gaditana</i> (pH 12, Surfactante 0.5%, potencia 275 W y humedad 96%).	69
Figura 28. Distribución del costo total	72
Figura 29. Distribución de los costos del proceso por etapa del proceso	73
Figura 30. Curva de calibración para determinación de proteína soluble, utilizando Albúmina de suero bovino de Thermo Scientific® como estándar.	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de diferentes fuentes alimentarias y algas (% peso seco) (Becker, 2007; Guil-Guerrero <i>et al.</i> , 2004).....	16
Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales (% en contenido total de proteína) de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Nannochloropsis s.p</i> comparada con otras fuentes convencionales de proteína y el patrón de referencia de FAO/WHO (FAO/WHO, 1973; Buono <i>et al.</i> , 2014).....	17
Tabla 3. Métodos de extracción aplicados a microalgas para la obtención de proteínas	24
Tabla 4. Mecanismos estudiados utilizando proteínas de plantas y animales como emulsificantes.	27
Tabla 5. Macro nutrientes del medio basal Bold (BBM).....	29
Tabla 6. Características de los fertilizantes orgánicos	30
Tabla 7. Parámetros del diseño para el cultivo a escala de laboratorio para <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Tabla 8. Variables y niveles de variación usados en el diseño experimental a escala de laboratorio	31
Tabla 9. Variables, niveles y parámetros de diseño utilizados en el diseño experimental a escala piloto .	34
Tabla 10. Los factores y niveles empleados para la evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> , a escala piloto.....	34
Tabla 11. Variables y niveles usados en el diseño experimental para el baño de ultrasonido utilizando <i>C. vulgaris</i> y <i>N. gaditana</i>	37
Tabla 12. Variables y niveles usados en el diseño experimental para la sonda de ultrasonido utilizando <i>C. vulgaris</i> y <i>N. gaditana</i>	38
Tabla 13. Variable de respuesta para el cultivo de la microalga a escala de laboratorio (Datos normalizados)	43
Tabla 14. ANOVA para modelo lineal de la tasa de crecimiento específico.....	45
Tabla 15. ANOVA para modelo lineal para el índice de crecimiento.	45
Tabla 16. Datos en base seca para <i>Chlorella vulgaris</i>	49
Tabla 17. Datos en base seca para <i>Nannochloropsis gaditana</i>	50
Tabla 18. Extracción de proteína soluble presente en <i>C. vulgaris</i> asistido por un baño de ultrasonido ...	51
Tabla 19. Extracción de proteína soluble presente en <i>N. gaditana</i> asistido por un baño de ultrasonido ...	52
Tabla 20. Extracción de proteína soluble presente en <i>C. vulgaris</i> asistido por sonda de ultrasonido.....	53
Tabla 21. Extracción de proteína soluble presente en <i>N. gaditana</i> asistido por sonda de ultrasonido.....	53
Tabla 22. Condiciones propuestos para la extracción de proteínas a partir de microalga	70
Tabla 23. Insumos necesarios para el proceso de extracción de proteína	71
Tabla 24. Equipos principales para el proceso	71
Tabla 25. Descripción del consumo de energía	71
Tabla 26. Preparación de estándar de albúmina de suero bovino	75
Tabla 27. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) para <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando baño de ultrasonido (87.41%)	77
Tabla 28. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) de <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando sonda de ultrasonido (92.05%).....	78
Tabla 29. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) de <i>Nannochloropsis gaditana</i> , utilizando sonda de ultrasonido (92.22%)	79
Tabla 30. ANOVA. Rendimiento de extracción (%) utilizando baño de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (96.87%).....	80
Tabla 31. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando baño de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (73.70%).....	81
Tabla 32. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando sonda de ultrasonido para <i>Chlorella vulgaris</i> (87.76%).....	82
Tabla 33. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando sonda de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (73.43%).....	83
Tabla 34. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando baño de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (81.17%).....	84

Tabla 35. ANOVA capacidad para <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando baño de ultrasonido (77.08%).....	85
Tabla 36. ANOVA. Actividad emulsificante (%) utilizando baño de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (89.63%).....	86
Tabla 37. ANOVA Actividad emulsificante (%) utilizando sonda de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (84.77%).....	87
Tabla 38. ANOVA Actividad emulsificante (%) utilizando sonda de ultrasonido para <i>Nannochloropsis gaditana</i> (95.83%).....	88

INTRODUCCIÓN

El uso de las microalgas como fuente alimenticia, data de 2000 años en la China quienes utilizaron la *Nostoc* para sobrevivir a los tiempos de hambruna. Sin embargo no fue sino hasta mediados del siglo pasado que inició el desarrollo de la biotecnología de microalgas, (Spolaore *et al.*, 2006), intensificando los esfuerzos hacia la exploración de nuevas fuentes alternas de proteínas no convencionales. Para ello se centraron los estudios hacia la investigación de levaduras, hongos, bacterias y algas denominadas bajo el nombre de proteínas unicelulares (Single Cell Protein-SCP) que describe la producción de proteínas a partir de la biomasa obtenida de diferentes fuentes microbianas (Becker, 2003). Sin embargo para la época, las proteínas obtenidas a partir de microalgas fueron las de menor interés por el color, olor y textura que aportan a los productos alimenticios, debido a la presencia de compuestos no proteicos (Ej. Clorofilas) propias de estas estructuras (Becker, 2007) y que en muchas ocasiones no son aptas para el consumo. No fue sino a través de los años que múltiples investigaciones han referenciado las amplias ventajas y aplicaciones que presentan las proteínas obtenidas a partir de microalgas lo que incrementó el interés en las aplicaciones tecno-funcionales y además permitió incrementar su valor comercial, al no considerar sólo la obtención de la fracción lipídica, haciendo posible una producción rentable (Williams & Laurens, 2010)

Una de las características más importantes de las microalgas, especialmente las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, es que tienen una gruesa pared celular celulósica que representa alrededor del 10% de la materia seca, la cual no es digerible por humanos ni animales no rumiantes, debido a que restringe el acceso de las enzimas digestivas a los componentes intracelulares (Komaki *et al.*, 1998), limitando el uso de la biomasa sin ningún tratamiento en alimentación, al ofrecer pobres resultados a nivel nutricional (Stoilov *et al.*, 1995). Por lo que es necesario realizar tratamientos efectivos de disrupción celular para acceder a los bio-componentes presentes en la biomasa (Becker, 2007) como son las proteínas, lípidos, pigmentos y carbohidratos y que puedan ser parte de una matriz alimentaria.

Procesos de disrupción celular físicos y químicos como el uso de altas presiones o solventes orgánicos, son ampliamente utilizados para recuperar y liberar los productos presentes en la matriz interna de las microalgas (Doucha & Lívanský, 2008), no obstante son procesos que generan cambios en la estructura molecular de las proteínas (Schwenzfeier *et al.*, 2011), modificando las propiedades de estabilidad y solubilidad y por consiguiente las funciones nutricionales y de estructura (Zayas, 1997). Propiedades que van a definir el tipo de procesamiento, sus características organolépticas y seguridad para una exitosa aplicación como ingrediente alimentario (Draaisma *et al.* 2013).

Con el objetivo de enriquecer las investigaciones realizadas en el Grupo de Investigación en Biocombustible y Biorrefinería (GRUBIOC) y el Grupo de Investigación en Ingeniería de los procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos (GIPAB), en la búsqueda de nuevas fuentes proteicas no convencionales en Colombia y en torno al proceso de extracción de proteína soluble de *Chlorella vulgaris*, este proyecto de investigación, evaluó la extracción asistida por ultrasonido de proteínas de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* con el objetivo de incrementar los rendimientos del proceso para obtener proteínas solubles, que exhibieran propiedades químicas y tecno-funcionales a partir de una tecnología simple, rentable y eficiente (Kadam *et al.*, 2013), que no solo tuviera en cuenta una sola de las fracciones de la biomasa, sino que permitiera el uso de la microalga de forma íntegra (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013)

Para ello, el desarrollo del proyecto, inició con la activación de la cepa de *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio y su posterior cultivo a escala piloto para la obtención de la biomasa. La cepa de *Nannochloropsis gaditana* fue obtenida de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Almería en España. Se determinó el contenido de proteína cruda presente en ambas cepas por el método de Kjeldahl, seguido por el proceso de extracción de la proteína soluble (cuantificada por el método de Lowry) asistido por ultrasonido (utilizando baño o sonda) y un surfactante como agente de extracción, cuantificándose los rendimientos de extracción del proceso, la capacidad de formación de espuma y la capacidad de emulsificación de las proteínas extraídas en cada uno de los tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá Alba Lucia López, quien ha sido y es mi soporte y guía. A mis hermanas, Mónica Lucía y Susan Andrea, mi hermano mayor John Provis y a José David Tascón, por todo su apoyo, consejos, comprensión, amor y paciencia.

Al Grupo de Investigación en Biocombustibles y Biorrefinería (GRUBIOC), por los conocimientos recibidos a través de los años, el apoyo en infraestructura y económico para la ejecución de este proyecto y especialmente al profesor Jorge Enrique López, por creer en mí, por su apoyo y todas las enseñanzas recibidas. A la Escuela de Ingeniería de Alimentos y al Grupo de Investigación en Ingeniería de Procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos (GIPAB), por brindarme todos los conocimiento adquiridos durante mi formación académica y personal y por todo el apoyo brindado para la realización del mismo, en especial a la profesora Aida Rodríguez de Stouvenel, por todos y cada uno de los consejos y las enseñanzas recibidas tanto a nivel personal como profesional.

Al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias por los dos años de la beca-pasantía, en los cuales obtuve parte de los resultados de esta investigación.

Agradezco al proyecto “Innovación y Desarrollo Sustentable en la Producción de Biocombustibles a partir de Microalgas” SENER CONACyT CIIDIR Oaxaca, por la financiación de insumos y equipos, necesarios para la ejecución del proyecto.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 MICROALGA

Las microalgas son una de las formas de vida más antigua, conocidas como plantas primitivas (talofitas) que carecen de raíces, tallos y hojas (Lee,1980); algunas cepas son células procariotas que carecen de organelas como plástidos, mitocondria, núcleo, cuerpo de Golgi, y flagelos, como es el caso de las cianobacterias o algas verde-azules (**Figura 1**), sin embargo la mayoría de las microalgas presentan estructura celular eucariota y se clasifican por el tipo de pigmentos que hay presente en sus membranas fotosintéticas, ciclo de vida y estructura celular básica (Khan *et al.*, 2009), siendo las *Bacillariophyceae* (diatomeas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Cyanophyceae* (alga verde-azul) y *Chrysophyceae* (algas doradas) los cuatro grupos más importantes en términos de abundancia.

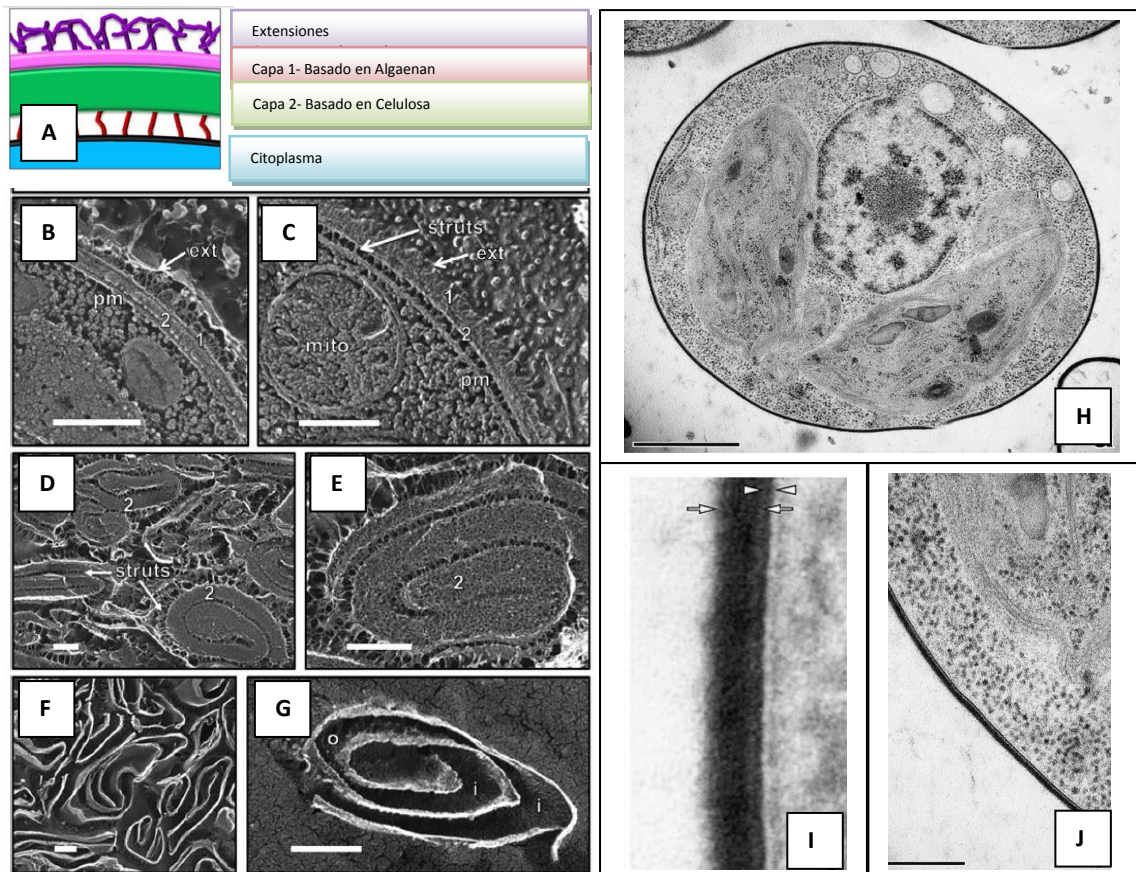


Figura 1. Modelos de la célula y pared celular de *N. gaditana* (A-G) (Scholz *et al.*, 2014) y *C. vulgaris* (H-J) (Yamamoto *et al.*, 2004). **A.** Modelo de la pared de *N. gaditana* **B.** Fractura transversal de la pared nativa mostrando sus dos capas (1,2), extensiones distales, y una estrecha asociación con la membrana plasmática (pm). **C.** Fractura tangencial a través de las dos capas

nativas. **D** y **E**. Presionando las paredes celulares, con la prominente capa fibrilar 2, enmascarando la presencia de la capa 1. **F** y **G**. Pared celular después de 24 horas de incubación con celulasa. La capa fibrilar 2 fue digerida, exponiendo la capa 1. **H**. Célula de *C. vulgaris* completa después de la división de los cloroplastos, pero antes de la división de los protoplastos **I** y **J**. imagen de la pared celular al final de la fase de crecimiento.

El crecimiento de las microalgas se puede llevar a cabo en tres tipos de medios: **1)** Por **nutrición autotrófica**, es decir sintetizan las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de compuestos inorgánicos como CO₂ (proveniente de fuentes como: 1. El CO₂ de la atmósfera (contiene 360 ppmv de CO₂), 2. CO₂ de una fuente industrial y 3. CO₂ de carbonatos solubles como Na₂CO₃ y NaHCO₃ (Chiu *et al.*, 2009)), compuestos orgánicos, como nitrógeno (del aire en forma de NO_x o en forma soluble como la urea), fósforo, potasio y sílice (Çelekli *et al.*, 2009) y luz para realizar el proceso de fotosíntesis (de tipo artificial o solar), convirtiendo la radiación solar y el CO₂ absorbido en adenosín trifosfato (ATP), energía utilizable a nivel celular (Falkowski *et al.*, 1997); **2)** Por **nutrición heterotrófica** donde las microalgas no-fotosintéticas utilizan una fuente de carbono (ej: la glucosa), como fuente de energía para estimular su crecimiento e inducir la producción de lípidos; por último **3)** Por **nutrición mixotrófica**, donde las microalgas tienen la habilidad de ser fotosintéticas y adquirir nutrientes orgánicos exógenos (Lee, 1980).

Los cultivos comerciales a gran escala iniciaron en los años 60's en Japón con el cultivo de *Chlorella* realizado por Nihon Chlorella (Taipei, Taiwan) (Borowitzka, 1999). Para los años 80's, ya existían aproximadamente 46 empresas en Asia que producían más de 1000 Kg/mes de microalga (principalmente *Chlorella*).

Actualmente, las algas son consideradas como una fuente alternativa para la producción de energía renovable (Brennan *et al.*, 2010), ya que posee una eficiencia de conversión de fotones superior a la de las plantas terrestres (3-8% microalgas y 0.5% plantas terrestres), lo cual representa mayor rendimiento de biomasa por hectárea. Crece en zonas marginales no aptas para fines agrícolas como tierras desérticas y costas, su producción no es estacionaria, permitiendo una cosecha continua durante todo el año y puede direccionarse hacia la obtención de altas concentraciones de **proteínas** (Pulz, 2004). El interés por las algas ha incrementado con los años, al ser considerada como una fuente alternativa no convencional de proteínas, cuyo perfil de aminoácidos es similar al de otras proteínas alimentarias, al poseer tanto los esenciales como los no esenciales, permitiendo su incorporación en alimentos, para alimentación animal y humana. Entre los principales compuestos presentes en las algas se encuentran las ficobiliproteínas, las cuales son proteínas hidrosolubles, ampliamente utilizadas en la industria y

laboratorios de inmunología clínica o en investigación, con un costo comercial de aproximadamente US\$3000-25000/Kg; **pigmentos** como β -carotenos con un valor comercial de (US\$300-3000/Kg), clorofilas, astanxantina (US\$ 2500/Kg), (Spolaore *et al.*, 2006) y **lípidos**, cuyo contenido se encuentra entre 1% y 70%, sin embargo algunas microalgas pueden alcanzar hasta el 90%, bajo ciertas condiciones de cultivo. Los lípidos de microalgas contienen ácidos grasos de la familia $\omega 3$ y $\omega 6$, los cuales son de interés para la industria alimentaria. Bio-productos que son alto interés tanto para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, y es por ello que hoy en día el mercado de la biomasa de microalgas produce alrededor de 5000 toneladas de materia seca/año, el cual produce aproximadamente US\$ 1.25 x 10⁹/año (Pulz, 2004), sin embargo los procesos de extracción incrementan considerablemente el valor comercial de la biomasa de microalga, ya que ella sin ningún tratamiento, tiene un valor comercial entre US\$40-50/Kg.

1.2 CULTIVO DE MICROALGA

La posibilidad de transformar sus bio-productos en *Biodiesel* o *biogás*, ha conducido a que se las considere como una fuente para producir biocombustible. Este planteamiento ha tomado fuerza a lo largo de los años ya que los cultivos de microalgas pueden emplearse como una opción para la fijación del CO₂ y al usarse como combustible, contribuir a la reducción del calentamiento global (Chisti Y, 2008). Sin embargo la principal desventaja de la extracción de bio-productos que se pueden obtener de las microalgas, es la baja concentración celular de los cultivos, debido a las limitaciones que presenta la luz solar en penetrar los fotobiorreactores y que las microalgas puedan hacer uso eficiente del mismo.

Una de las formas de cultivo de microalgas son los medios autotróficos, los cuales se realizan en (**Figura 2**) de sistemas abiertos (estanques) o sistemas cerrados (reactores tubulares). En estos últimos se instalan en serie un conjunto de tubos transparentes donde la luz del sol penetra a través del material (Chisti, 2008), permitiendo la conversión biológica de estos organismos fototróficos. Aunque los sistemas abiertos presentan una gran capacidad de producción por unidad de área, los sistemas cerrados se caracterizan por tener una mejor productividad volumétrica (8 veces mayor) y de concentración celular (16 veces mayor aproximadamente), porque resulta más fácil controlar factores como la temperatura del agua, la iluminación y la contaminación del cultivo por otros microorganismos (Richmond A, 2004). Algunas de las desventajas que presenta este sistema, es el crecimiento de microalgas en las paredes del tubo, los gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO₂ a través de la tubería (Ugwu *et al.*, 2008), que pueden ser mejoradas cuando el sistema trabaja en continuo debido al incremento en el tiempo

de permanencia de las microalgas en el sistema, alcanzándose el estado estacionario, permitiendo la obtención de resultados más fiables y reproducibles (Richmond A, 2004)

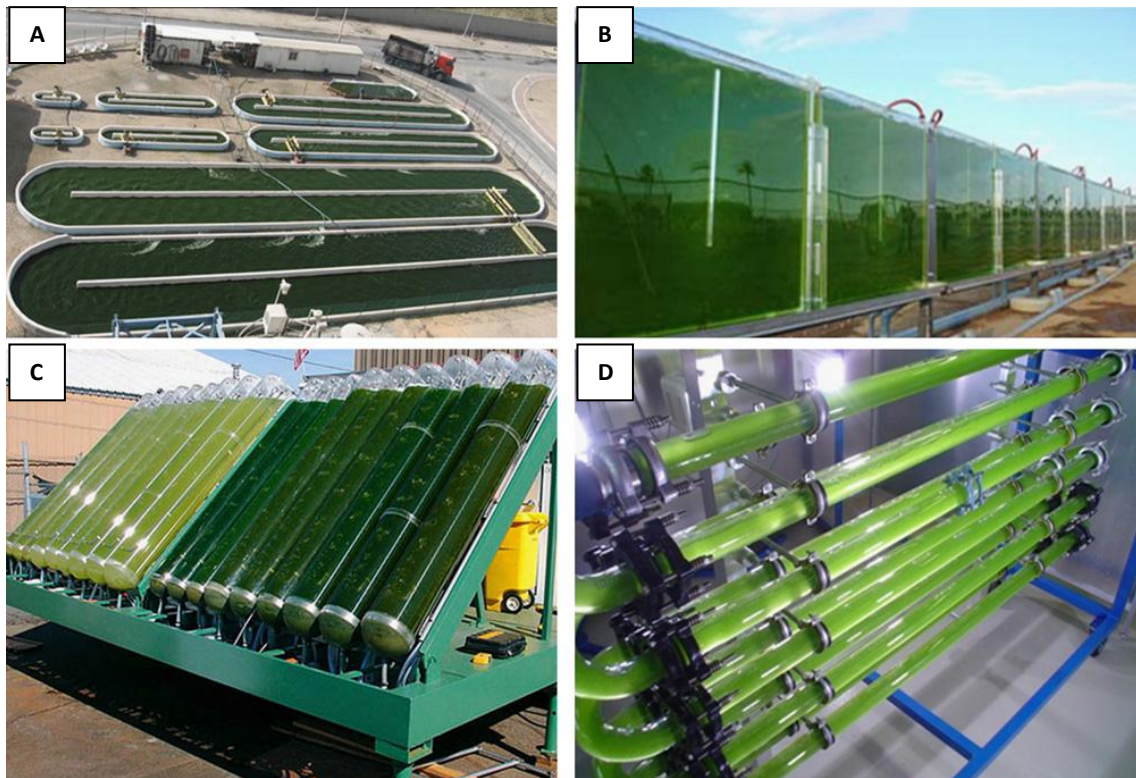


Figura 2. Sistemas de cultivos de microalgas: (a) piscina tipo carrusel, (b) placa delgada, (c) tubular inclinado y (d) horizontal – tubular (Bitog *et al.*, 2009).

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MICROALGAS

Las especies microscópicas unicelulares con un diámetro de 2 a 10 μm , crecen fácilmente, se multiplican rápidamente, son resistentes a condiciones adversas y contaminación, además de producir una gran variedad de biocompuestos.

Al igual que una planta superior, la composición química de las algas no es un factor intrínseco constante, sino que varía de un lote a otro, ya que depende de parámetros ambientales y del medio de cultivo (como la temperatura, pH del medio, contenido de minerales, fuente y concentración de CO_2 , (Becker, 2003), concentración de nitrógeno, entre otros), los cuales permiten la síntesis de lípidos, carbohidratos, vitaminas, antioxidantes y proteínas.

Uno de los principales compuestos de interés son los lípidos, cuya mayor proporción de lípidos no polares (lípidos neutrales) son triglicéridos y ácidos grasos libres, mientras que los lípidos polares son esencialmente glicéridos. El contenido promedio de lípidos en las células de algas

varía entre 1% a 40%, pero puede alcanzar valores del 90% en peso seco bajo ciertas condiciones de estrés (Becker, 2003). Estos lípidos están compuestos de glicerol, azúcares o bases esterificados de ácidos grasos saturados o no saturados (de 12 a 22 átomos de carbono), entre los cuales se encuentra $\omega 3$ y $\omega 6$, que son bioproductos de interés (Spolaore *et al.*, 2006).

Los carbohidratos en las microalgas se encuentran en forma de almidón, azúcares como arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa y otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que no existe ninguna limitación para el uso en alimentación (Becker, 2003).

Estas estructuras también son una valiosa fuente de vitaminas como A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico y contiene altas concentraciones de pigmentos como clorofilas (0.5% y 1.5% en peso seco) y carotenoides (0.1% y 0.2% en peso seco) (Becker, 2003).

Las proteínas obtenidas a partir de microalgas, mejoran el contenido nutricional de los alimentos convencionales y por consiguiente proporcionan un efecto positivo en la salud de quien los consume (humanos ó animales). El contenido en proteína cruda es de aproximadamente 55 y 29% para *Chlorella spp* y *Nannochloropsis spp*, respectivamente (Grimi *et al.*, 2014) (**Tabla 1**). Estas dos especies presentan además alta concentración de aminoácidos esenciales cuando se las compara con las principales fuentes de proteína alimentarias (Spolaore *et al.*, 2006) de Colombia como son el huevo, soya, arroz y carne (Guil-Guerrero *et al.*, 2004) recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2007) y la Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura (FAO, 2008) (**Tabla 2**). Estos contenidos les han permitido ser consideradas como fuentes alternas viables a las proteínas alimentarias existentes (Davies, 1971; Becker, 1994; Safi *et al.*, 2012).

Tabla 1. Composición general de diferentes fuentes alimentarias y algas (% peso seco) (Becker, 2007; Guil-Guerrero *et al.*, 2004)

Fuente	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Carne	43.0	1.0	34.0
Leche	26.0	38.0	28.0
Arroz	8.0	77.0	1.0
Soya	37.0	30.0	20.0
<i>Nannochloropsis spp</i>	29.0	38.0	18.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Anabana cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Dunaliella salina</i>	57.0	32.0	6.0

Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales (% en contenido total de proteína) de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis s.p* comparada con otras fuentes convencionales de proteína y el patrón de referencia de FAO/WHO (FAO/WHO, 1973; Buono *et al.*, 2014)

Fuente	g por 100 g de proteína							
	Leu	Val	Lis	Fe	Met	Tir	Tr	His
WHO/FAO	7.0	5.0	5.5	6.0	3.5	1.0		
Huevo	8.8	7.2	5.3	5.8	3.2	1.7	5.0	2.4
Soya	7.7	5.3	6.4	5.0	1.3	1.4	4	2.6
<i>Chlorella vulgaris</i>	8.8	5.5	8.4	5.0	2.2	2.1	4.8	2.0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	9.2	5.9	6.2	5.2	0.3	2.4	6.2	1.9

Las proteínas de *Chlorella vulgaris* presentan múltiples roles y aproximadamente el 20% del total de las proteínas está presente en la pared celular, más del 50% al interior en el citoplasma, cloroplastos y todas las organelas (Safi *et al.*, 2015) y el 30% migra dentro y fuera de la célula (Berliner, 1986).

Para el caso de *Nannochloropsis gaditana*, el contenido de proteína en la pared celular corresponde al 6.2% (Scholz *et al.*, 2014), siendo su contenido total del 30%.

Todas estas propiedades reflejan la necesidad de implementar procesos integrados para la obtención de estos bio-productos, lo cual va a incrementar su valor comercial, al poderse utilizar cada uno de ellos en diferentes aplicaciones industriales (**Figura 3**).

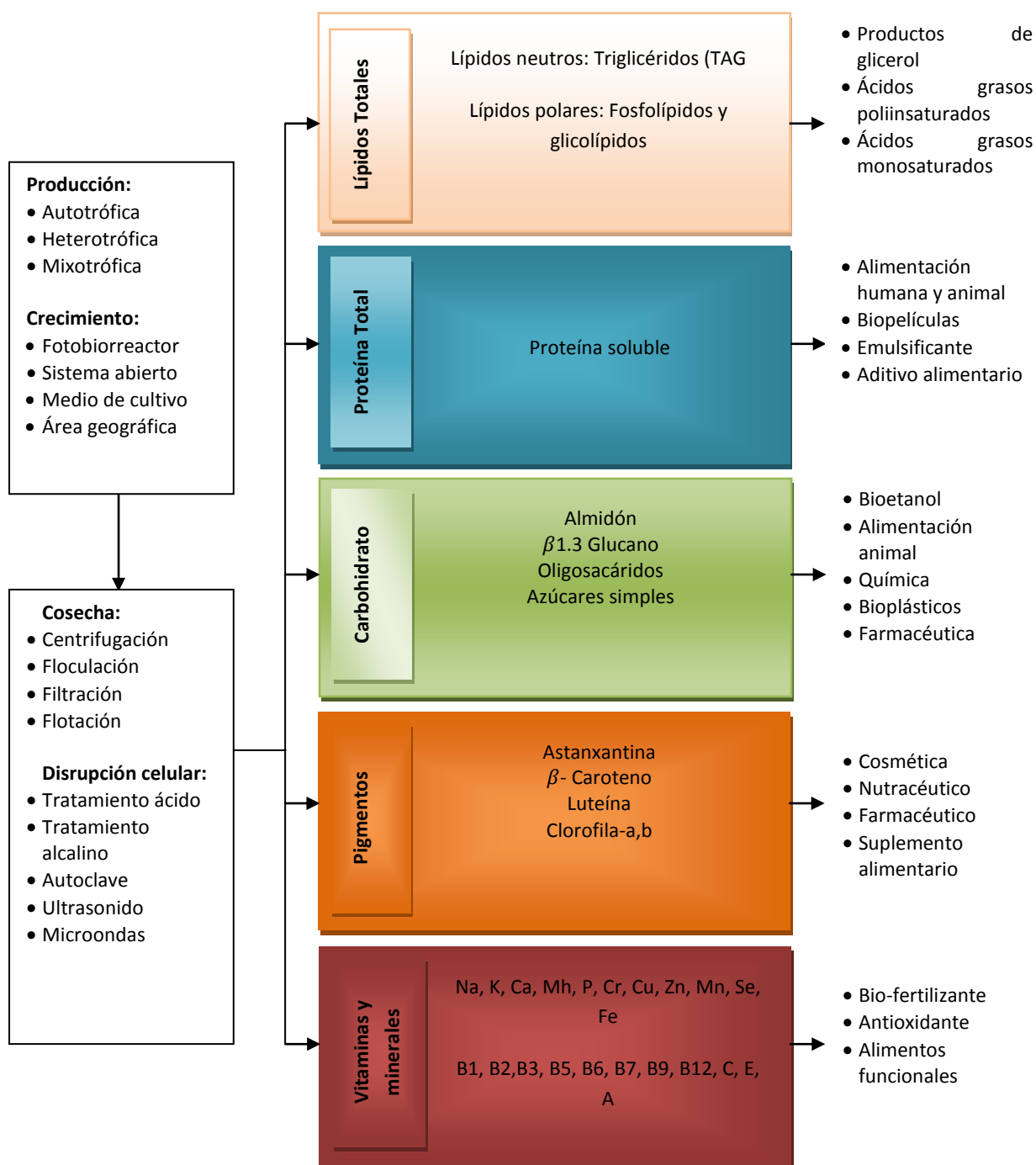


Figura 3. Valorización de microalgas, desde la producción hasta su disposición final

1.4 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MICROALGAS

Uno de los principales inconvenientes en la extracción de proteínas de microalgas es la baja disponibilidad de los componentes intracelulares debido a la pared rígida que presentan estas células (**Figura 1**), como es el caso de *Chlorella vulgaris* (Morris *et al.*, 2008), cuya pared celular está compuesta principalmente de β -glucano 1-3, glucosamina, proteínas, lípidos y ceniza (Blumreisinger *et al.*, 1983) y de *Nannochloropsis gaditana* cuya pared celular está compuesta principalmente de celulosa (Scholz *et al.*, 2014). Sin embargo este no es un factor intrínseco constante, ya que en las distintas fases de crecimiento, el espesor de la pared celular incrementa gradualmente de 2 nm cuando son células hijas, a valores entre los 17 a 21 nm cuando alcanzan el estado de maduración (**Figura 4**) (Yamamoto *et al.*, 2005), en respuesta a los cambios ambientales, modificando de igual forma su composición (Liu *et al.*, 2006). Una vez la microalga alcanza el estado de maduración, se ha detecta una capa microfibrilar, la cual está constituida por quitosano (Yvonne *et al.*, 2000) y proporciona rigidez adicional a la pared celular, aumentando su resistencia.

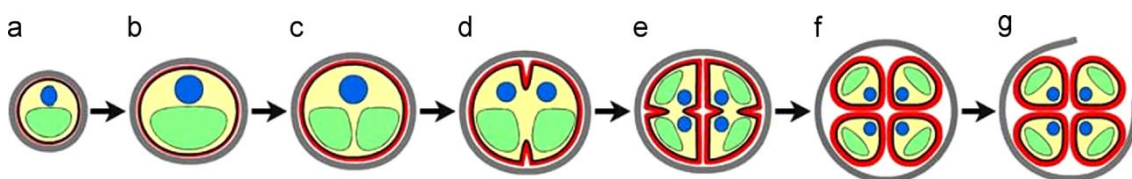


Figura 4. Diagrama que muestra las diferentes fases de la formación de la pared celular hija en *Chlorella vulgaris*: a) Fase temprana del crecimiento celular; b) Fase de crecimiento celular; c) Fase de división del cloroplasto; d) Inicio de la fase de división del protoplasto; e) Fase de división del protoplasto; f) Fase de maduración de células hijas y g) Fase de eclosión (Yamamoto *et al.*, 2005)

Debido a las características de las paredes celulares de estas cepas, es necesario llevar a cabo tratamientos que permitan la apertura de canales y/o rompimiento de la pared celular para incrementar la asimilación y biodisponibilidad de las moléculas intracelulares en el solvente de extracción, por lo tanto un proceso de lisis celular no debe ser aplicado sin considerar la integridad de las moléculas de interés (Safi *et al.*, 2015). En la actualidad se llevan a cabo procesos físicos y químicos para realizar la disrupción celular como son hidrólisis químicas, ultrasonido, altas presiones, tratamientos enzimáticos, tratamiento con solventes (**Tabla 3**), comúnmente empleados para recuperar y liberar los productos presentes en la matriz interna de las microalgas (Doucha & Lívanský, 2008), siendo los métodos estándar como la desintegración mecánica de la célula, utilizando perlas de cristal y extracciones químicas con el uso de enzimas, negativos para el proceso, ya que se afecta la estabilidad de las proteínas (Schuttle &

Kula, 1990; Naglak *et al.*, 1990), debido a la presencia de proteasas en el medio por desintegración de las vacuolas (Coustets *et al.*, 2013)

Es por ello, que uno de los métodos comúnmente utilizados para la obtención de las proteínas solubles de microalgas es la solubilización, en el que se solubiliza la proporción de nitrógeno presente en la fase acuosa de las mismas. La composición química, morfología, estructura de las microalgas y el tiempo influyen la eficiencia del proceso. Sin embargo, algunas proteínas son difíciles de solubilizar en medios acuosos por su naturaleza hidrofóbica y por la presencia de enlaces disulfuro entre las moléculas de proteína, donde es necesario la presencia de medios altamente alcalinos, para romper los enlaces de hidrógeno y disociar los iones de hidrógeno de los grupos sulfato para incrementar la carga superficial de la molécula de proteína y por consiguiente su solubilización en medio acuoso (Shen *et al.*, 2008). Ya que la solución alcalina hidroliza de forma lenta la pared celular, permitiendo la recuperación lenta de las proteínas que se encuentran ligadas a esta estructura (Safi, 2013), se requieren largos tiempos de proceso.

Uno de los aspectos que permite apreciar la eficiencia del proceso radica en la pigmentación obtenida al final de la extracción, la cual puede no tener coloración o ser verde o negra (verde oscuro) debido a que la solución alcalina es capaz de penetrar la bicapa de fosfolípidos de los cloroplastos en donde se encuentran pigmentos como las clorofilas y carotenoides, incorporados al interior de las tilacoides, para solubilizados al medio acuoso debido a que estas moléculas hidrofóbicas se ligan a las moléculas de proteína que resultan ser hidrofílicas indicando la formación de micelas (Safi, 2013).

La solubilidad mide el grado de solubilización de las proteínas presentes en los alimentos, ya sea en estado de solución o en suspensión (Fennema, 1996), siendo ésta la primera propiedad funcional usualmente determinada para el desarrollo y ensayo de nuevos ingredientes proteicos, principalmente para su uso en alimentos líquidos y bebidas (Zayas, 1997). Esta medida proporciona información valiosa sobre un ingrediente proteico y su dependencia con el pH refleja la complejidad del sistema. Un perfil bajo de solubilidad en un amplio rango de pH es un signo de desnaturalización e insolubilización; de este modo, a ciertas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica, la solubilidad de las proteínas es una manifestación de equilibrio entre las interacciones proteína-solvente y las interacciones entre las proteínas (Srivastava, 2013), siendo las interacciones hidrofóbicas e iónicas, las que influyen en mayor proporción las mismas.

Las interacciones hidrofóbicas promueven las interacciones proteína-proteína y como resultado decrece la solubilidad, mientras que interacciones iónicas promueven las interacciones proteína-

agua incrementando la solubilidad, de este modo los residuos iónicos introducen dos tipos de fuerzas repulsivas entre las moléculas de proteínas en solución. La primera involucra repulsiones electrostáticas entre las moléculas de proteína debido a una carga neta positiva o negativa, por debajo y por encima del punto isoelectrico. La segunda involucra repulsiones entre la capa de hidratación que hay presente alrededor de los grupos iónicos de los residuos cargados que promueven la solubilización (Fennema, 1996).

Estas atracciones y/o repulsiones, afectan las propiedades funcionales de las proteínas como el espesor, capacidad de formación de espuma, emulsificación y gelificación, teniendo las proteínas insolubles un uso muy limitado en alimentación (Fennema, 1996).

Los dos factores más importantes en la solubilización de las proteínas son el pH y la temperatura. Basado en las características de solubilidad, las proteínas se clasifican en cuatro categorías en función del pH en: **1) Albuminas** que son solubles en agua a pH 6.6 (serum albumina, ovalbumina y α -lactoalbumina), **2) globulinas** son solubles en soluciones con sales diluidas a pH 7, **3) glutelinas** son solubles sólo en soluciones ácidas a pH 2 o alcalinas pH 12 (glutelinas del trigo) y **4) prolaminas** son solubles en un 70% de etanol (gliadinas). Para este caso prolaminas y glutelinas son proteínas altamente hidrofóbicas. En el caso donde el pH se mantiene constante la solubilidad incrementa con la temperatura entre 0 y 40°C, por encima de esta temperatura, un incremento en la energía cinética térmica causa desnaturalización de las proteínas por exposición de los grupos no polares, agregación y precipitación que se traduce en una reducción en la solubilidad de las proteínas. (Fennema, 1996)

Para la extracción de bio-productos es común el uso de métodos de solubilización junto con otros métodos de extracción, como el uso de *surfactantes* o *ultrasonido*. Los surfactantes son moléculas anfifílicas que reducen la energía libre del sistema mediante la sustitución de las moléculas de mayor energía en la interfase; contienen un radical polar que ayuda a solubilizar el surfactante y un radical hidrofóbico típicamente como cadena alquilo. El *ultrasonido*, es una tecnología limpia, rentable y eficiente que ha sido utilizada a través de los años para eliminar virus y bacterias, en el tratamiento de aguas residuales, como ayudante a la formación de emulsiones, a la transferencia de genes y mejorar procesos de extracción en células (Gogate & Kabadi, 2009), el cual es aplicado de dos formas: **1) Ultrasonificación directa** con el uso de la sonda de titanio (sonotrodo) la cual entra en contacto directo con la muestra y la **2) Ultrasonificación indirecta** en el cual las sondas ultrasónicas llegan al sistema a través de las paredes del recipiente.

1.4.1 Ultrasonido

El ultrasonido se define como el sonido que se encuentra en un rango de frecuencia desde 20 kHz a 10 MHz, la cual dependiendo de los efectos que presentan las ondas de ultrasonido cuando pasan a través de un medio líquido, se divide en dos zonas principales: **1)** altas frecuencias que comprende desde 2 a 10 MHz, conocido como ultrasonido médico, ampliamente utilizado para propósitos medicinales porque las propiedades físicas y químicas del líquido estimulado en este rango no cambian y **2)** bajas frecuencias de ultrasonido que comprende rangos desde 20 KHz a 100 KHz y causa muchos cambios físicos y químicos en el líquido estimulado, como consecuencia de un fenómeno físico llamado cavitación (Araújo *et al.*, 2014), el cual consiste en la creación de burbujas por el ciclo de expansión donde se presenta una presión negativa y el gas disuelto en el líquido se expande creando burbujas o cavidades y el colapso de las burbujas por el ciclo de compresión donde se presenta una presión positiva promueve la ruptura de las mismas.

Sin embargo la importancia de la cavitación en la sonoquímica no es cómo se forman burbujas, sino lo que sucede cuando colapsan (Suslick, 1989) (**Figura 5**).

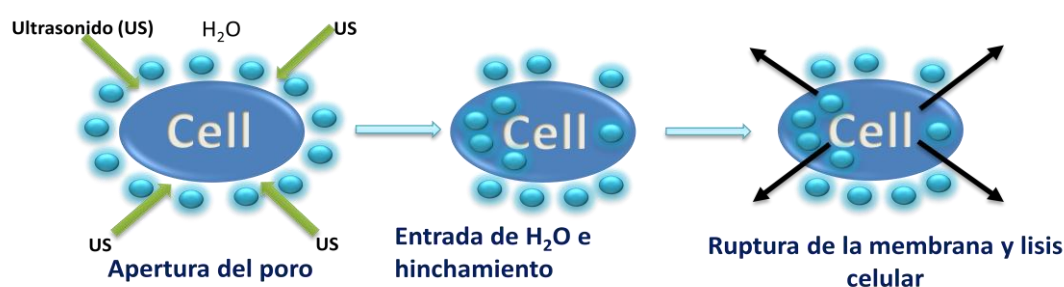


Figura 5. Daño celular por efecto del ultrasonido (Adaptado por Chemat *et al.*, 2011)

La rápida compresión de los gases y vapores dentro de la burbuja crea enormes temperaturas alcanzando los 5000 °C y presiones de 1000 atm, pero como las burbujas son tan pequeñas en comparación con el volumen que las rodea, el calor se disipa rápidamente y las condiciones ambientales no se ven afectadas, estimándose un orden de enfriamiento de 10 billones °C/seg (Suslick, 1989). De este modo, la combinación de altas temperaturas, altas presiones y un rápido enfriamiento crea condiciones difícilmente alcanzables en otros campos, no obstante las consecuencias de la cavitación varían dependiendo de los materiales involucrados y la presencia de sólidos que generan implosiones asimétricas por choque de las sustancias sólidas con el medio, alcanzando velocidades cercanas a 400 Km/h, una fuerza lo suficientemente fuerte como para perforar placas de metal.

Wang & Zhang *et al.*, (2012), encontraron que las mejores condiciones de extracción de proteínas utilizando ultrasonido se presentó a 1000 W de potencia y 180 pulsos, alcanzando un rendimiento del 16% para *Chlorella pyrenoidosa*. Gerde *et al.*, (2013), realizaron la extracción de proteínas de biomasa desengrasada y sin desengrasar de *Nannochloropsis* sp, utilizando una sonda de ultrasonido XL (Misonix, Newtown, CT, USA) con una potencia de 300 W y frecuencia de 20 kHz. Las mejores condiciones de extracción de proteínas fueron 60°C y pH 11. Para la biomasa desengrasada se utilizó un 50% de amplitud (150 W), con un tiempo total de 4 min, con 30 pulsos seguidos por 2 min de descanso en un baño con hielo, obteniendo rendimientos de proteína del 16%, mientras que para la biomasa sin ningún tratamiento se alcanzó un máximo rendimiento del 30%, utilizando ultrasonido como pre-tratamiento, resultados que indican que un pre-tratamiento de extracción de lípidos con isopropanol (70:30 w/w IPA:agua) por reflujo a 80°C por 1 h, disminuye significativamente el rendimiento de proteína extraída (Gerde *et al.*, 2013)

1.4.2 Surfactante

La adición de un agente surfactante para promover la extracción de bio-productos principalmente proteínas, se remonta a más de una década y ha sido ampliamente utilizado principalmente en la estimación de los pesos moleculares de las proteínas, en la formulación de detergentes en polvo con enzimas, productos de higiene personal (Otzen, 2011), en la modificación de las propiedades reológicas de los alimentos (Dickinson E, 1992) y en la extracción de membranas proteicas (Otzen 2011). Los surfactantes, tienen una parte polar y una parte hidrofóbica generalmente en la cadena alcalina, reduciendo la tensión superficial del medio, lo cual incrementa la solubilidad de las estructuras proteínas, capacidad de humectación entre otros (Mulligan, 2005), siendo esta interacción altamente dependiente del pH, de la fuerza iónica y del tipo de sal utilizada en la fase acuosa, así como del tipo y concentración del surfactante y de solvente empleado (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). De este modo los surfactantes interactúan con las proteínas de una forma completamente diferente a como lo hacen las sustancias químicas (Otzen, 2011)

Tabla 3. Métodos de extracción aplicados a microalgas para la obtención de proteínas

Método	Especie de alga	Condiciones de operación				Referencia	Rendimiento de proteína reportado	Estado final de la proteína aislada
		Pre-tratamiento		Desintegración celular				
Tratamiento alcalino	<i>Scenedesmus acutus</i>	n.a	0.5 M NaOH, repetidamente	10 min,	80-100°C,	Rausch, 1981	Indirecto, ~ 24% (w/w)	Soluble
Extracción orgánica + hidrólisis enzimática	<i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	100% EtOH, 50°C, 3h	n.a			Tchorbanov, 1988	No	Pellet, solubilizado por incubación posterior de la proteasa
Sonicación	<i>Chlorella</i>	n.a	Sonicación, 1% SDS, 55-70 W, 3 minutos			Meijer & Wijffels,1998	Indirecto, muy dependiente del método de detección	Recuperación de 113% de proteína soluble (0.56 g de proteína/g de biomasa seca)
Tratamiento alcalino-seguido por precipitación isoelectrica	<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Disruptor celular de alta presión a pH 7 o 12 (utilizando NaOH 1M)			Ursu <i>et al.</i> , 2014	Método de Lowry	52% (w/w) de proteína soluble
Sonicación - Sonda	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	n.a	Se evaluaron potencias de 200, 400, 600, 800 y 1000 W por 6 s (9 seg de intervalo), 90, 120 y 180 veces			Wang & Zhang , 2012	Kit de proteínas Bio-Rad - Método de Bradford	22.9% de Concentración de proteína en solución
Electro-extracción	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Nannochloropsis salina</i>	Se suspendieron en 100 mL de agua 10 ⁸ celulas/mL de <i>N. salina</i> . <i>C. vulgaris</i> a 10 ⁷ celulas/mL, fueron centrifugadas a 2500xg, por 5 min. El pellet fue resuspendido en 10 mL ya sea de bufer fosfato o metanol.		Suspensiones de <i>Chlorella vulgaris</i> fueron procesadas con 3kV/cm, con pulsos de 2 mS (en promedio 30 pulsos entregados) Para <i>Nannochloropsis</i> se utilizó E=6 kV/cm, con pulsos de 2 mS		Coustets <i>et al.</i> , 2013	Método de Bradford	Incrementó en un 400% la concentración de proteínas totales en solución

1.5 FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS EN ALIMENTACIÓN

Las proteínas tienen numerosos propósitos no nutricionales en los alimentos, siendo ampliamente utilizadas en la estabilización de emulsiones y de espumas.

La habilidad para formar y/o estabilizar redes (geles y películas), espumas, emulsiones y soles son las principales propiedades funcionales de las proteínas, las cuales determinan su uso en alimentación (Srivastava, 2013). Sin embargo también presentan propiedades nutricionales y de actividad biológica, que son de gran importancia en el desarrollo de productos alimenticios saludables a base de proteínas (Kitts & Weiler, 2003; Norton & Norton, 2010), por lo que se deben preservar las propiedades nutricionales/bioactivas de las proteínas cuando se emplean en matrices alimentarias (Foegeding & Davis, 2011)

Las propiedades funcionales denotan propiedades físico-químicas de las proteínas como su composición de aminoácidos y secuencia, peso molecular, conformación y densidad, que van a determinar su comportamiento en los alimentos durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo de los mismos, al interactuar con los demás componentes como el agua, los iones, los lípidos, los carbohidratos, las vitaminas y los pigmentos, cuyo comportamiento también es definido por las condiciones del medio como pH, fuerza iónica y temperatura (Srivastava, 2013)

1.5.1 PROPIEDADES EMULSIFICANTES Y ESPUMANTES DE LAS PROTEÍNAS

1.5.1.1 Propiedades emulsificantes

Muchos productos alimenticios naturales y procesados como la leche, la yema de huevo, mantequilla, mayonesa entre otros son emulsiones donde las proteínas juegan un papel muy importante como componente emulsificador. Las propiedades emulsificantes de un alimento son evaluadas por numerosos métodos como son la actividad emulsificante, la capacidad emulsificante y la estabilidad de la emulsión (Fennema 1996).

Las emulsiones estabilizadas por proteínas son afectadas por numerosos factores, como los extrínsecos en el caso del pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de surfactantes con bajo peso molecular, azúcares, volumen de la fase oleosa, tipo de proteína y el punto de fusión del aceite utilizado e intrínsecos como el tipo de equipo, tasa de energía que se proporciona y tasa de cizallamiento. Debido a la dificultad que presenta la evaluación de todas las interacciones de los factores importantes para la determinación de las propiedades emulsificantes de las

proteínas, no se cuentan con métodos estandarizados que permitan una evaluación sistemática (Fennema 1996).

Sin embargo, un aspecto fundamental para las propiedades emulsificantes, radica en la solubilidad de la proteína aislada. De este modo un 100% de solubilidad no es un requerimiento absoluto, no obstante proteínas altamente insolubles no se desempeñan bien como emulsionantes, lo cual demuestra que no existe una relación fiable entre la solubilidad y las propiedades emulsionantes en un rango de solubilidad entre 25 y 80% (Liao & Mangino, 1987). Los requerimientos mínimos de solubilidad, necesarios para un buen desempeño de las emulsiones, dependen del tipo de proteína y de la estabilidad que proporcione la película proteica en la interface aceite-agua (Fennema, 1996); de este modo en emulsiones con carnes, como las salchichas, la solubilización de proteínas microfibrilares en 0.5M NaCl mejora las propiedades emulsificantes, pero en el caso de proteínas aisladas de soya comercial, las cuales son aisladas por procesamiento térmico, tienen bajas propiedades emulsificantes por la baja solubilidad de sus proteínas (Fennema 1996)

La formación y estabilidad de las emulsiones estabilizadas con proteínas son afectadas principalmente por el pH, donde muchos mecanismos están involucrados (**Tabla 4**). Generalmente las proteínas tienen una alta solubilidad al pH isoelectrico (serum albumina, gelatina) mostrando una máxima actividad emulsificante y capacidad emulsificante a ese pH. La falta de cargas netas e interacciones de repulsiones electrostáticas al pH isoelectrico ayudan a maximizar la interacción de las proteínas en la interface y promueve la formación de películas altamente viscoelásticas, las cuales contribuyen a la estabilidad de la emulsión. Sin embargo la falta de interacciones de repulsiones electrostáticas, entre las partículas de las emulsiones, en algunos casos, promueven la floculación y la coalescencia, por lo tanto disminuye su estabilidad (Fennema 1996).

Tabla 4. Mecanismos estudiados utilizando proteínas de plantas y animales como emulsificantes.

Proteína	Factores Investigados	Parámetros Medidos	Referencia
Soya y gluten de trigo	Tipo de proteína, pH, temperatura,	Reología, tamaño de gota	Bengoechea, Romero, Aguilar, Cordobés, and Guerrero (2010)
Trigo (Gliadinas)	Hidrólisis, pH, fuerza iónica	Índice de actividad de la estabilidad de emulsión, capacidad de formación de espuma,	Agyare, addo & Xiong (2009)
Huevo	Adición de polisacárido, pH	Carga de superficie, adsorción de la proteína, tamaño de gota	Padala, Williams & Philips (2009)
Suero de leche	Concentración de aceite, concentración de proteína, viscosidad de la emulsión, adición de sal, tratamiento con calor	Viscosidad de la emulsión, tamaño de partícula, prueba de formación de crema acelerado	Djordjevic, Kim, McClements & Decker (2004)
Lenteja	Concentración de proteína, fuerza iónica	Tensión interfacial, índice de estabilidad de la emulsión, índice de actividad de la emulsión	Joshi <i>et al.</i> , 2012
Canola	Concentración de proteína, pH, fuerza iónica, adición de hidrocoloides	Índice de actividad emulsificante, índice de estabilidad de la emulsión	Urukpa & Arntfield, 2005

1.5.1.2 Propiedades espumantes

Las espumas son consideradas como una fase continua acuosa dispersa en una fase gaseosa. Muchos alimentos procesados requieren de la formación de espuma como son los helados, tortas, merengues, entre otros. Las propiedades texturales únicas de estos productos provienen de pequeñas burbujas de aire dispersas, en la mayoría de estos productos, siendo las proteínas

los principales agentes activos, las que ayudan a la formación y estabilización de la fase dispersa (gas) (Fennema 1996).

Las propiedades de las espumas son evaluadas por muchos métodos, uno de ellos es la capacidad de formación de espuma la cual se refiere a la cantidad de área interfacial que puede ser creada por una proteína. Su estabilidad se expresa como el tiempo requerido para que la espuma reduzca su volumen en un 50%, sin embargo son métodos empíricos que no promueven información fundamental sobre los factores que afectan la estabilidad de la espuma (Fennema 1996).

Al igual que las propiedades emulsificantes, las propiedades espumantes de las proteínas, incrementan generalmente en la medida que lo hace su concentración hasta su valor máximo, de este modo, entre mayor sea la concentración de proteínas más rígida es la espuma, lo cual es el resultado de burbujas de pequeño tamaño con una alta viscosidad. Sin embargo también es afectado por el método de formación de espuma utilizado (Fennema 1996)

Muchos estudios han mostrado que las espumas estabilizadas por proteínas son más estables al pH isoelectrico de la proteína que a otro pH, debido a que no hay insolubilización de las proteínas a este pH. Si la proteína es soluble en el punto isoelectrico, como la mayoría de las proteínas, solo la fracción de proteínas solubles estará involucrada en la formación de espuma, por lo tanto, si la concentración de la fracción soluble es muy baja, la cantidad de espuma formada será menor, pero la estabilidad será alta. De este modo la fracción insoluble no contribuye a la formación de espuma, pero la adsorción de estas proteínas insolubles da estabilidad a la formación de espuma por incremento de las fuerzas cohesivas en la película de proteínas. Generalmente, la adsorción de partículas hidrofóbicas incrementa la estabilidad en la formación de espumas (Fennema 1996)

La capacidad de formación de espuma de un alimento depende de la cantidad de espuma solubilizada (Oshodi & Ekpigin, 1989). La capacidad de formación de espuma de una proteína es importante en la producción de confitería y productos de panadería. Bajas capacidades de formación de espuma se deben a repulsiones electrostáticas inadecuadas, baja solubilidad y exceso de interacciones proteína-proteína (Butt & Batool, 2010)

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se dividió en tres partes: **1)** La primera se concentró en el establecimiento de las mejores condiciones para el crecimiento de las microalgas a escala de laboratorio en Erlenmeyers de 2000 mL a 25°C y posteriormente se construyó un fotobiorreactor cerrado horizontal tubular y se validó la información obtenida en la primera parte, para la producción masiva de biomasa de *Chlorella vulgaris* **2)** En la segunda parte se caracterizaron las dos especies seleccionadas (*N. gaditana* y *C. vulgaris*) y **3)** Finalmente se estudió el efecto del ultrasonido en la extracción de proteínas y se evaluaron sus posibles usos como aditivo (emulsificante, espumante) para su empleo en la industria de alimentos.

2.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Se determinaron las condiciones de cultivo tanto a escala de laboratorio como escala piloto, con la cepa de *Chlorella vulgaris* para la producción masiva de la biomasa requerida, para llevar a cabo el proyecto. La cepa se obtuvo en el Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y se activó a escala de laboratorio medio Basal Bold (**Tabla 5**), en Erlenmeyers de 500 mL a 25° C, utilizando una aireación de 2 vvm empleando aire filtrado. La iluminación se proporcionó con lámparas fluorescentes a 1858 Lux, en ciclos de luz y oscuridad de 12/12 h.

Tabla 5. Macro nutrientes del medio basal Bold (BBM)

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Nitrato de potasio (KNO ₃)	250
Cloruro de calcio, (CaCl ₂)	25
Sulfato de magnesio, MgSO ₄	75
Hidrógeno fosfato de di potasio, K ₂ HPO ₄	75
Di hidrógeno fosfato de potasio , KH ₂ PO ₄	17.5
Cloruro de sodio, NaCL	25

En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, la biomasa liofilizada utilizada en este proyecto, se obtuvo de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Almería en España.

2.1.1 CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A NIVEL DE LABORATORIO

Una vez se tuvo un inóculo estable de la microalga de *C. vulgaris*, los cultivos a escala de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Biocombustible del Grupo de Investigación en Biocombustibles y Biorrefinería de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del

Valle. Para ello, se utilizaron matraces Erlenmeyers de 2 L, utilizando como medio de cultivo agua potable enriquecida con macro y micronutrientes, utilizando como fuente de nitrógeno un fertilizante comercial líquido (Marca HOJAS producido por la empresa Soluciones Nutritivas Ltda) y como fuente de fósforo un fertilizante comercial líquido (Marca FLORESCENCIA de la empresa FERCON S.A) con la composición relacionada en la **Tabla 6** , aireación constante a 1.5 vvm e iluminación artificial con lámparas fluorescentes (**Figura 6**)



Figura 6. Cepario de microalga

Los diferentes medios de cultivo evaluados a nivel de laboratorio y a nivel piloto, se calcularon teniendo en cuenta la composición y diferentes proporciones de ambos fertilizantes líquidos presentados en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los fertilizantes orgánicos

HOJAS	Composición (g/L)
Nitrógeno total	250
Nitrógeno amoniacal	48
Nitrógeno nítrico	102
Nitrógeno Ureico	100
Calcio	60
Magnesio	30
FLORESCENCIA	Composición (g/L)
Nitrógeno total	100
Nitrógeno amoniacal	60
Nitrógeno orgánico	40
Fósforo asimilable	300
Potasio soluble en agua	100
Magnesio	30

Los factores y niveles empleados para la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris*, fueron concentración de nitrógeno y de fósforo (**Tabla 8**), utilizando como bloque la periodicidad de alimentación (**Tabla 7**). Estos rangos de concentración de nitrógeno y fósforo fueron determinados anteriormente por (Palomino, 2013) aportando información indispensable para los tratamientos realizados a escala de laboratorio.

Tabla 7. Parámetros del diseño para el cultivo a escala de laboratorio para *Chlorella vulgaris*

Corrida	Bloque	Concentración nitrógeno (mg/L)	Concentración fósforo (mg/L)
1	Día 1	45	12
2	Día 1	75	4
3	Día 1	75	20
4	Día 1	15	20
5	Día 1	15	4
6	Día 1	45	12
7	Día 8	45	23
8	Día 8	45	12
9	Día 8	45	0.69
10	Día 8	87	12
11	Día 8	2.6	12
12	Día 8	45	12

Tabla 8. Variables y niveles de variación usados en el diseño experimental a escala de laboratorio

Variables	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A= Concentración de nitrógeno (mg/L)	2.6	15	45	75	87
B = Concentración de fósforo (mg/L)	0.69	4	12	20	23

Para el análisis estadístico de los datos, se empleó un diseño central compuesto con bloque, realizado de forma aleatoria, utilizando el paquete estadístico Design Expert® 8.0.6, con el propósito de encontrar el efecto de los factores en las variables de respuesta *concentración de microalga g/L* (**Ecuación 1**), *tasa de crecimiento específico* (μ) h^{-1} (**Ecuación 2**) (la cual se refiere a la tasa de crecimiento de biomasa por unidad de concentración de biomasa), el *índice de crecimiento* (**Ecuación 3**) (el cual representa la capacidad de crecimiento de las microalgas) y el *tiempo de duplicación* (h) (**Ecuación 4**) (definido como el tiempo necesario para que la concentración de biomasa alcance el doble) de *Chlorella vulgaris* (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006)

$$\text{Concentración de microalga } \left(\frac{g}{L}\right) (X) = \left(\frac{\text{Peso inicial}-\text{Peso final}}{\text{Volumen muestra}}\right) \left(\frac{g}{L}\right) - \text{Sólidos totales disueltos} \left(\frac{g}{L}\right) \quad \text{Ecuación. 1}$$

$$\ln \frac{X}{X_0} \text{ vs } t \rightarrow \ln \frac{X}{X_0} = (\mu + D) \cdot t \rightarrow (Y = m \cdot X + b), \text{ donde } D \text{ es la tasa de dilución}$$

Ecuación. 2

$$\text{índice de crecimiento} = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{X_{inicial}}$$

Ecuación. 3

$$\text{Tiempo de duplicación (h}^{-1}\text{)} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación. 4

Para evaluar la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de *C. vulgaris*, se realizó el seguimiento del crecimiento celular por peso seco (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006) por un periodo de nueve días. La concentración de peso seco, inició con una homogenización del cultivo a 700 rpm por 10 min con una plancha de agitación Fisher Scientific® (Isotemp). Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de muestra en un vial eppendorf de 2 mL (6 veces para procesar un total de 9 mL), los cuales fueron posteriormente centrifugados a 15000 rpm por 5 min en una centrífuga HETTICH® EBA 21. Se separó la pastilla del sobrenadante, del cual se tomaron 500µL de cada vial (total de 3 mL) y se realizaron mediciones de Sólidos totales disueltos (mg/L) y conductividad (µS/cm) utilizando la sonda de conductividad del multiparamétrico Thermo Scientific Orion 5 Star, cuya sonda fue previamente calibrada utilizando una solución estándar de 1413µS/cm. Posteriormente la biomasa se secó en horno a 60±5°C hasta peso constante. Para determinar la concentración de microalga se utilizó la **Ecuación 1**. Los datos de conductividad y de sólidos totales disueltos, se determinaron porque son medidas que determinan la capacidad que tienen las soluciones (para este caso los medios de cultivo) para transportar corriente, cuyos flujos se forman por la disolución de iones presentes en los fertilizantes. De este modo la conductividad eléctrica es una medida indirecta que permite estimar la concentración de solutos ionizables presentes en los medios de cultivo de las microalgas para este caso en particular (Controls, 2005).

2.1.2 CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A NIVEL PILOTO

Los cultivos a escala piloto, se llevaron a cabo en la planta piloto del Grupo de Investigación en Biocombustibles y Biorrefinería, en la Universidad del Valle. Para ello, se tuvieron en cuenta las mejores condiciones de concentración de nitrógeno, concentración de fósforo y periodicidad de alimentación, encontradas a escala de laboratorio (**Tabla 7**). Se empleó un fotobiorreactor horizontal tubular de 8 metros, con un volumen de operación de 477 L.

El fotobiorreactor (FBR), consta de una tubería plástica de polipropileno de alta densidad, un tanque de polietileno de alta densidad con un volumen de 1000 L (que corresponde al punto de muestreo, toma de datos, alimentación y desgasificación), tubería sanitaria y codos de PVC de 4" y accesorios (válvulas, reductores, conectores macho y hembra) de PVC, que conectan el

tanque con la tubería plástica que corresponde a la zona de captación solar de las microalgas (o zona fótica), donde las microalgas hacen el recorrido por todo el circuito permitiendo su interacción con el medio circundante, lo cual es posible por el sistema de inyección de aire, el cual se realizó con un soplador ELMO RIETSCHLE Tipo hb229s (110-120 @ 7.4A 60Hz, 200-240 @ 3.5A 60Hz y 3250 RPM - 0.67 HP, con un flujo de aire de 460 m³/h (270 CMF)), perpendicular al flujo del cultivo para impulsar el movimiento, con un funcionamiento de 50 min por hora, el cual está automatizado (**Figura 7**).

Para el control de los datos, el FBR, contó con un Analizador de pH y oxígeno disuelto marca ABB modelo AX46, sensor de pH marca ABB modelo AP304, temperatura en línea RTD PT100 y un sensor de oxígeno disuelto marca ABB modelo 9408/7, datos que son registrados en línea.

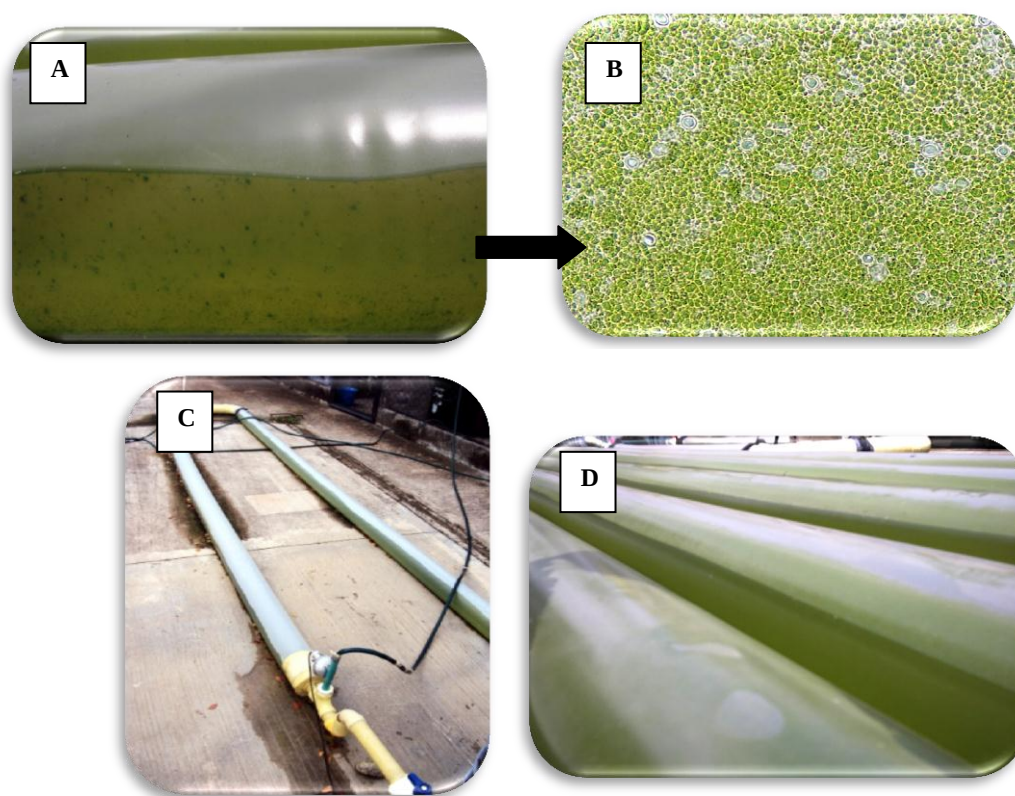


Figura 7. Fotobiorreactor horizontal tubular. **A)** Imagen lateral de la tubería, **B)** Imagen de *Chlorella vulgaris* al microscopio 40X, **C)** Fotobiorreactor de 8 m, **D)** Fotobiorreactor de 35 m

Para el estudio de las condiciones de operación, se evaluó la influencia de la concentración de nitrógeno, (**Tabla 7**) y pH (el cual fue controlado utilizando ácido fosfórico al 85% que actuó como tampón y NaOH a 1 M) en el crecimiento de las microalgas. Para este caso el seguimiento

de la concentración celular se realizó por un período de seis días (Equivalente a una corrida), utilizando el método de peso seco (**Ecuación 1**), cuyos datos fueron analizados utilizando un Diseño central compuesto Box-Benhken (**Tabla 9**), donde se realizaron siete experimentos de forma aleatoria (**Tabla 10**). La tasa de dilución que se empleó en todos los cultivos fue del 2% del volumen total con una remoción diaria de 9.54 L/día (3.97E-1 L/h), lo cual se realizó con el objetivo de renovar el medio y alimentar diariamente las microalgas.

Tabla 9. Variables, niveles y parámetros de diseño utilizados en el diseño experimental a escala piloto

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
A = Concentración de nitrógeno (mg/L)	45	60	75
B = pH	5.5	6.75	8

Tabla 10. Los factores y niveles empleados para la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris*, a escala piloto.

Corrida	Concentración nitrógeno (mg/L)	Concentración fósforo (mg/L)	pH
1	45	0,012	8
2	0,075	0,02	8
3	0,075	0,02	5,5
4	0,045	0,012	5,5
5	0,06	0,016	6,75
6	0,06	0,016	6,75
7	0,06	0,016	6,75

Al igual que en los cultivos a escala de laboratorio, las variables de respuesta fueron la *tasa de crecimiento específico* μ (h^{-1}), *tiempo de duplicación* (h), (**Ecuación 1-4**) y para el caso de cultivo a escala piloto, se determinó la *productividad volumétrica* (g/m^3h) (**Ecuación 5**) la cual fue determinada utilizando la expresión de Cuaresma *et al.*,(2011), donde se tuvo en cuenta la masa del cultivo ($M_{Cosechada}$, Kg) cosechado en 1 día (t_d , día), masa total del bioreactor ($M_{reactor}$, Kg) y concentración de la microalga (C_x , g/L)

$$P_v (\text{Productividad volumétrica}) = \frac{M_{Cosechada} \cdot C_x}{M_{reactor} \cdot t_d} \quad \text{Ecuación. 5}$$

Una vez obtenidas las mejores condiciones de cultivo a 8 metros, se evaluó y validó las condiciones de cultivo de *Chlorella vulgaris* en tuberías de 15, 25 y 35 metros de zona de captación solar, a los cuales se les hizo seguimiento de peso seco cuyos datos se evaluaron a través de las variables de respuesta encontradas en la **Ecuación 1-5**.

Definidas las mejores condiciones de cultivo, junto con la mejor longitud de tubería encontrada, se cultivaron microalgas de *C. vulgaris* por un período de aproximadamente 2 meses para la obtención de la biomasa necesaria para llevar a cabo las extracciones de proteínas.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*

La caracterización de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, se realizó mediante un análisis proximal donde se determinó el contenido de **humedad** en % (m/m) utilizando el método de la NTC 282, **grasa** en % (m/m) utilizando el método de la NTC 668, **fibra cruda** en % (m/m) utilizando el método de la NTC 668, **proteína cruda** (Nx6.25) en % (m/m) utilizando el método de la NTC 282, en el Laboratorio de Análisis Industriales del Departamento de Química de la Universidad del Valle.

2.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* ASISTIDO POR ULTRASONIDO

El proceso de extracción de proteína se llevó a cabo mediante el método de solubilización de la proteína en medio alcalino, a través de un proceso de 5 etapas consecutivas (**Figura 8**).

Para ello inicialmente la biomasa de las microalgas (pasta húmeda de microalga, se homogenizó en el Laboratorio de Biocombustibles de la Escuela de Ingeniería Química, utilizando un agitador Heidolph RZR2120 ® a una velocidad 10 (~400 RPM) durante 1 hora, con el propósito de reducir errores en la selección de las muestras. Posteriormente a esta biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, se le determinó el contenido de humedad utilizando una termobalanza por infrarrojo (OHAUS modelo MB45).

En la **1^{era} etapa** del proceso de extracción (**Figura 8**), se hizo el acondicionamiento de la biomasa a las condiciones del proceso, para ello se realizó el ajuste de la humedad en la muestra, de la concentración del surfactante no-iónico polioxietilen(20)sorbitanmonooleato (Tween 80) a una concentración conocida y del pH de la muestra utilizando NaOH 1 M, con un multímetro Eijkelkamp modelo 18.50.01 (el cual se calibró antes de cada medición utilizando buffers de pH 4, 7 y 10).

Una vez acondicionada la biomasa, esta se homogenizó en una plancha de agitación Fisher Scientific Isotemp® con agitador magnético, por 15 min a 700 rpm.

En la **2^{da} etapa** (**Figura 8**), inicialmente se llevaron a cabo pruebas preliminares, para evaluar el uso o no de un tratamiento previo al proceso de disrupción celular utilizando una autoclave

RAYPA modelo AES-75 a 105°C por 5 min, de acuerdo a las condiciones encontradas por Palomino (2013). Una vez definido el pre-tratamiento se prosiguió al proceso de extracción de proteína en el Laboratorio de análisis físico-químicos de la Escuela de Ingeniería de Alimentos, de la biomasa con ultrasonido de la microalga por un periodo de 1 hora utilizando un baño de ultrasonido TI-H-15 marca ELMA multifrecuencia (25/45 kHz) con una potencia efectiva ultrasónica de 200 W o una sonda de ultrasonido Microprocessor controlled (Serie AC) marca Sonics, que trabaja a 20 kHz con una potencia efectiva de 500 W, con control de temperatura (**3^{era} etapa, Figura 8**). Una vez terminado el proceso de extracción de proteína utilizando ultrasonido, se centrifugó la biomasa a 15000 rpm por 10 min (**4^{ta} etapa, Figura 8**), hasta obtener la separación completa de la biomasa y el sobrenadante el cual fue almacenado para posterior análisis del contenido de proteína soluble utilizando el Kit de ensayo de proteína de Lowry de Thermo Scientific Products® (**Apéndice A**) para el cálculo del rendimiento de extracción de proteína (%) (**Ecuación. 6**), rendimiento de extracción total (%) (**Ecuación. 7**), capacidad de formación de espuma (**Ecuación. 8**), estabilidad de la espuma (**Ecuación. 9**) y actividad emulsificante (**Ecuación. 10**) (**5^{ta} etapa, Figura 8**).

$$\text{Rendimiento de extracción proteína (\%)} = \frac{\text{Concentración proteína soluble } \left(\frac{\text{gr}}{\text{L}}\right) \cdot \text{Volumen recuperado muestra (L)}}{\text{Contenido proteína cruda por el metodo de Kjeldahl (\%)} * \text{Peso muestra seca (gr)}}$$

Ecuación. 6

$$\text{Rendimiento de extracción total (\%)} = \frac{\text{Concentración proteína soluble } \left(\frac{\text{gr}}{\text{L}}\right) \cdot \text{Volumen recuperado muestra (L)}}{\text{Peso muestra seca (gr)}}$$

Ecuación. 7

$$\text{Capacidad de formación de espuma (\%)} = \frac{\text{Volumen después de agitado} - \text{Volumen antes de mezclado}}{\text{Volumen antes de mezclado}} \times 100$$

Ecuación. 8

$$\text{Estabilidad de la espuma (\%)} = \frac{\text{Volumen después de reposo} - \text{Volumen antes de mezclado}}{\text{Volumen antes de mezclado}} \times 100$$

Ecuación. 9

$$\text{Actividad emulsificante (\%)} = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada 24 hr reposo}}{\text{Altura de la capa emulsificada inicial}} * 100$$

Ecuación. 10

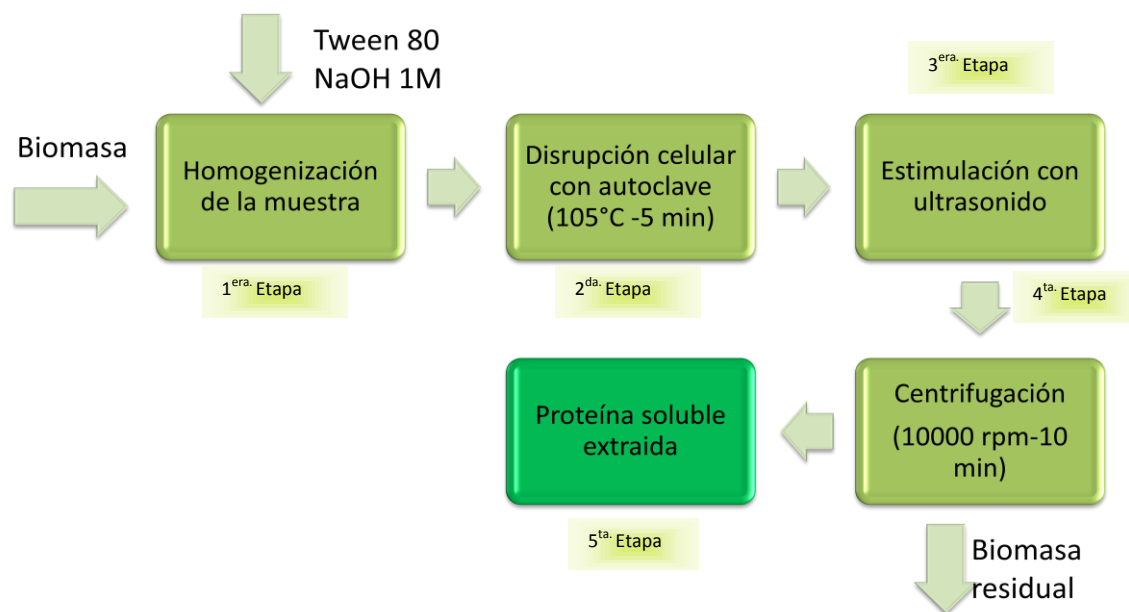


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción de proteína

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA ASISTIDO POR ULTRASONIDO (4^{ta} Etapa)

Una vez determinadas las condiciones de operación obtenidas de las pruebas preliminares, para la extracción de las proteínas tanto para *Chlorella vulgaris* como para *Nannochloropsis gaditana*, se prosiguió al desarrollo del diseño experimental para el baño y sonda de ultrasonido de cada una de las cepas, utilizando un diseño central compuesto con un diseño factorial 2^3 (niveles +1 y -1), considerando puntos axiales ($-\alpha$ y $+\alpha$) y cuatro puntos dobles. Donde se evaluó la influencia de los factores, potencia (W), humedad de la biomasa (% b.h), concentración de surfactante (%) y pH de las muestras (**Tabla 11 y 12**) en las variables de respuesta (**Ecuación 6-10**)

Tabla 11. Variables y niveles usados en el diseño experimental para el baño de ultrasonido utilizando *C. vulgaris* y *N. gaditana*

Variables	Niveles			
	$-\alpha$	-1	+1	$+\alpha$
A = Potencia (W)	20	65	155	200
B = Humedad biomasa (% b.h)	80	84	92	96
C= Concentración surfactante (%)	0	0.125	0.38	0.5
D=pH	7	9.5		12

Tabla 12. Variables y niveles usados en el diseño experimental para la sonda de ultrasonido utilizando *C. vulgaris* y *N. gaditana*

Variables	Niveles			
	$-\alpha$	-1	+1	$+\alpha$
A = Potencia (W)	125	200	275	350
B = Humedad biomasa (% b.h)	80	84	92	96
C= Concentración surfactante (%)	0	0.125	0.38	0.5
D=pH	7	9.5		12

Los 25 experimentos obtenidos de cada diseño experimental, se realizaron de manera aleatoria utilizando el software estadístico Design Expert 8, Versión 8.0.6 del 2011.

Los niveles de Tween 80, utilizados en este estudio para el proceso de extracción de proteína, se determinaron, de acuerdo al Codex Alimentarius, que determina un límite de consumo de 5000 mg/Kg, de este surfactante, lo cual se restringe principalmente a productos a base de chocolate. Sin embargo de acuerdo a la JECFA (1973), el consumo máximo diario permitido es de 25 mg/Kg, por lo tanto la concentración máxima de surfactante a utilizar es de **0.5%**, lo cual se realiza, con el objetivo de no tener que retirar posteriormente el surfactante de la solución proteica.

2.3.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS

2.3.2.1 Capacidad de formación y estabilidad de espuma

A la proteína extraída de ambas microalgas, se le determinó la capacidad de formación de espuma y estabilidad, basada en el método descrito por Mao & Hua, (2012) con modificaciones. Para ello, se preparó una solución de proteína (proteína extraída utilizando ultrasonido), al 17% con agua destilada y se ajustó el pH de la muestra utilizando HCl y NaOH 1M con un multímetro Eijkelkamp modelo 18.50, al pH utilizado en el proceso de extracción. Posteriormente se tomaron 3.6 mL de la solución y agitó con un ultraturrax LabGEN 7 de Cole Parmer® a 10,000 rpm por 2 min. Se registró el volumen de expansión de la espuma (después de agitado) para determinar la capacidad de formación de espuma de la proteína extraída de ambas microalgas (**Ecuación 8**) y se dejó reposar la muestra por 30 min a temperatura ambiente, registrando el valor del volumen una vez transcurrido este tiempo (volumen después de reposo) para determinar la estabilidad de la espuma previamente formada (**Ecuación 9**). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

2.3.2.2 Actividad emulsificante

La estabilidad emulsificante de la proteína extraída con ultrasonido de ambas microalgas, fue determinada utilizando el método descrito por Mao & Hua, (2012) , con modificaciones. Para ello se prepararon soluciones de proteína extraída al 17% con agua destilada y se ajustó el pH de la muestra utilizando HCl y NaOH al 1M con un multímetro Eijkelkamp modelo 18.50.01, al pH utilizado en el proceso de extracción. Posteriormente las muestras fueron mezcladas utilizando aceite de soya en una proporción 1:1, seguido por homogenización utilizando un Ultraturrax LabGEN 7 de Cole Parmer®, a una velocidad de aproximadamente 10,000 rpm por 30 s en la parte inferior y 30 s en la parte superior, para un total de 1 min, registrándose la altura de la capa emulsificada inicial. Posteriormente las muestras se dejaron reposar por 24 horas a temperatura ambiente, registrándose la altura de la capa emulsificada final (después de 24 horas), cuya actividad emulsificante se determinó utilizando la **Ecuación 10**. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

2.4 CINETICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Para determinar la cinética de extracción de la proteína de ambas microalgas, se utilizó un modelo de segundo orden, basado en la ley de velocidad de segundo orden, la cual ha sido ampliamente utilizada para describir el proceso de extracción sólido-líquido en algunas plantas (Goula, 2013; Qu *et al.*, 2010, Rakontondramasy-Rabesiaka *et al.*, 2007). En el caso del proceso de extracción de proteína de la microalga se asume que el proceso es:



En este modelo tomado de Zhong *et al.*, 2014, en donde se hicieron las siguientes suposiciones: 1) la operación es solo una función de la proteína soluble en agua en suspensión; 2) cuando el proceso de extracción alcanza el equilibrio, la concentración de la proteína soluble en agua (capacidad de extracción), se considera constante bajo las mismas condiciones de extracción. De este modo la ecuación de segundo orden es:

$$\frac{dC_t}{dt} = k \cdot (C_s - C_t)^2$$

Donde k es una constante de la tasa de extracción de segundo orden ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), C_s es la capacidad de extracción (mg g^{-1} biomasa seca), la cual se refiere a la concentración de proteína soluble en suspensión cuando alcanza el equilibrio, C_t es la concentración de proteína soluble en

agua (mg g^{-1} biomasa seca) en suspensión en el tiempo t (min). Cuya ecuación se linealizó y se realizó una gráfica de $\frac{t}{C_t}$ vs t para obtener los valores de k y C_s (**APÉNDICE B**)

2.5 EVALUACIÓN DE COSTOS GLOBALES

Para determinar los costos globales de operación inicialmente se realizó un diagrama de flujo con el propósito de determinar los flujos en cada una de las etapas del proceso para ambas microalgas (**Figura 9 y 10**) de las mejores condiciones obtenidas en el proceso de extracción de proteína de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*. Para los cálculos se utilizó una base de producción de 20 Kg/día de biomasa para la obtención de proteína soluble.

Para el cálculo de los costos totales se utilizó el costo de la biomasa obtenida de la parte de cultivos, con un costo total de aproximadamente \$70.000 pesos colombianos (US \$23), asumiendo estos costos de producción de biomasa para ambas cepas, debido a que los datos reportados en la literatura consideran una producción de biomasa 100.000 veces superior a la presentada en este estudio (aproximadamente 2000 toneladas), obteniendo costos de producción de biomasa 38 veces inferior a los reportados en esta investigación, lo cual se aleja de la realidad y de las producciones alcanzadas por la autora. Para los demás insumos, se utilizaron los valores de flujo máxicos obtenidos por los cálculos realizados en el balance de masa, para obtener la cantidad total de agua, surfactante e hidróxido de sodio, necesario para el proceso de extracción.

El costo de cada equipo se estableció utilizando los valores reales de los equipos y/o recipientes empleados a escala de laboratorio y se tomó como referencia los valores reportados por Rivera *et al.*, (2005), extrapolando los precios de acuerdo al índice de costos CEPCI para el año 2005 y 2013, de acuerdo a la siguiente ecuación (Couper *et al.*, 2008):

$$\text{Costo en } \theta_2 = \text{Costo en } \theta_1 \left(\frac{\text{Índice en } \theta_2}{\text{Índice en } \theta_1} \right)$$

Donde:

θ_i : Tiempo i (anual).

Índice en θ_i : Índice CEPCI en el tiempo i .

Posteriormente se ajustó el tamaño de los equipos a un volumen de trabajo de aproximadamente 30 litros, asumiendo que los 20 Kg corresponden al 80% del volumen total de todos los equipos. De este modo, conociendo los precios de un equipo a un tamaño o capacidad especificada, se calcularon los costos de los equipos a una escala mayor con la siguiente ecuación:

$$C_2 = C_1 \left(\frac{S_2}{S_1} \right)^n$$

Donde:

C_1 : Costo equipo con capacidad S_1 .

C_2 : Costo equipo con capacidad S_2 .

n : Factor de Guthrie, que depende del equipo

El consumo de energía se obtuvo escalando los datos obtenidos a escala de laboratorio y utilizando el balance de materia. El costo de kWh se estableció en 0.1331 dólares (Empleando un costo de kWh de \$ 414 pesos colombianos (donde US\$ 1 equivale a \$3000 pesos Colombianos). Asumiendo tres turnos de 8 h.

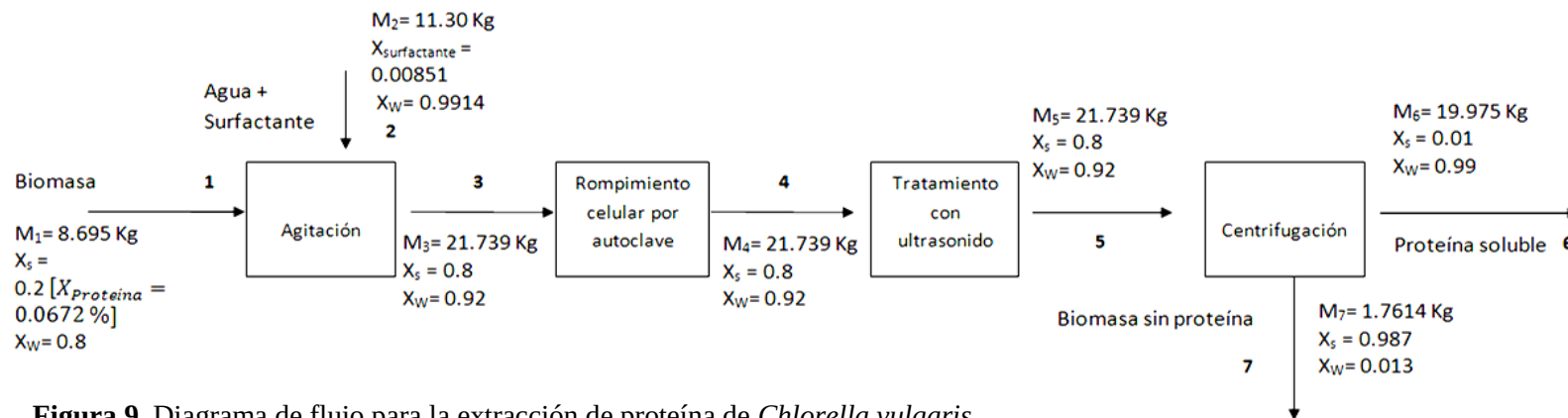


Figura 9. Diagrama de flujo para la extracción de proteína de *Chlorella vulgaris*

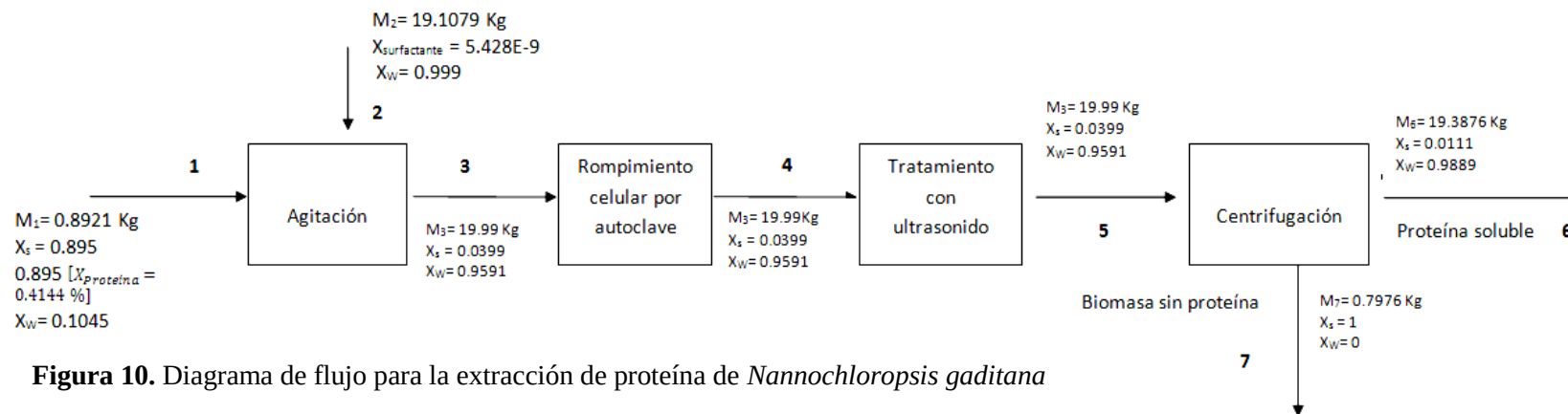


Figura 10. Diagrama de flujo para la extracción de proteína de *Nannochloropsis gaditana*

3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 CULTIVO DE MICROALGAS

3.1.1 CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A NIVEL DE LABORATORIO

Los resultados obtenidos utilizando una periodicidad de alimentación de 8 días, presentaron una influencia negativa en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y por consiguiente en la tasa de crecimiento específica e índice de crecimiento de las microalgas (**Tabla 13**). Opuesto a los resultados obtenidos cuando se trabajaron medios de cultivo con un periodo de alimentación diario, obteniéndose la mayor tasa de crecimiento específico de $1.2\text{E-}2\text{ h}^{-1}$, cuando la concentración de nitrógeno era de 75 mg/L y concentración de fósforo de 4 mg/L; resultados seguidos por una tasa de crecimiento específico de $6.10\text{E-}03\text{ h}^{-1}$, cuando la concentración de nitrógeno fue de 45 mg/L y la concentración de fósforo de 12 mg/L. Mayores tasas de crecimiento, conllevan a la obtención de menores tiempos de duplicación, los cuales se obtuvieron entre 2.4 y 4.7 días (**Tabla 13**), respectivamente.

Tabla 13. Variable de respuesta para el cultivo de la microalga a escala de laboratorio (Datos normalizados)

Corrida	$\mu\text{ (h}^{-1}\text{)}$	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (Día)
1	0,0051	0,014	1,000
2	0,7157	-0,703	0,850
3	0,7157	0,731	0,459
4	-0,7056	0,731	-0,470
5	-0,7056	-0,703	-0,287
6	0,0051	0,014	0,965
7	0,0051	0,014	0,973
8	0,0051	1,000	-0,402
9	0,0051	0,014	0,298
10	0,0051	-1,000	-0,859
11	0,0051	0,014	0,336
12	1,0000	0,014	0,280
13	-1,0000	0,014	-1,000
14	0,0051	0,014	0,318

Por otro lado, en cultivos con periodicidades de alimentación diaria, se obtuvo un incremento en la conductividad (**Figura 11**) y sólidos totales disueltos, durante el tiempo de cultivo, lo que permitió estimar una mayor concentración de solutos ionizables, condiciones que corresponden a las corridas 1 a 6 presentados en la **Tabla 13**.

Por lo tanto las condiciones de cultivo a las cuales se obtuvieron mayores producciones de biomasa, se obtuvieron con periodicidades de alimentación diaria, concentración para la alimentación de nitrógeno entre 0.075-0.045 g/L y concentraciones de fósforo entre 0.012-0.02

g/L (concentraciones referenciadas de acuerdo a especificaciones de los fertilizantes empleados
Tabla 6.

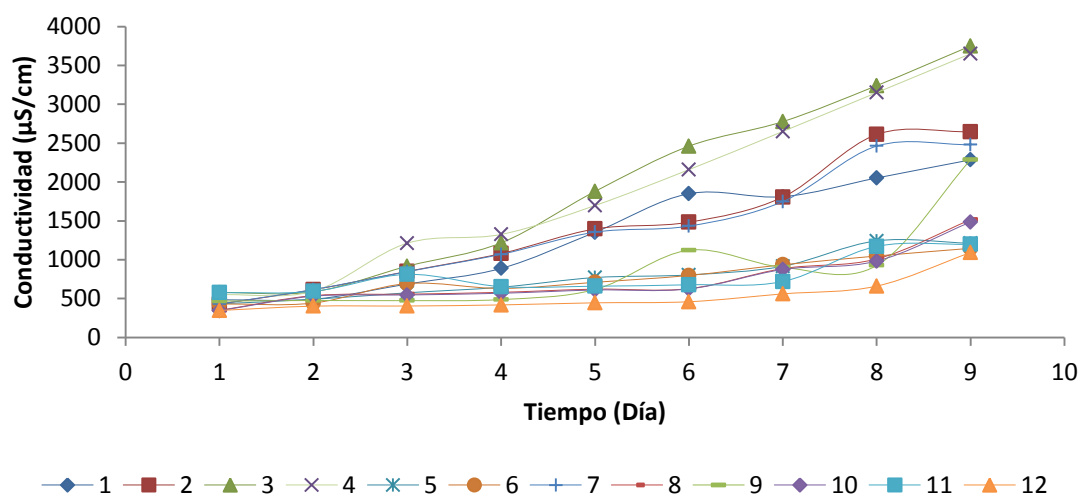


Figura 11. Cambio de la conductividad vs tiempo, en cada uno de los biorreactores

3.1.2 CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* A NIVEL PILOTO

La mayor tasa de crecimiento específico obtenida fue de $8.2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, con un tiempo de duplicación de 3.5 días, productividad volumétrica de $55.3 \text{ g} / \text{m}^3 \cdot \text{día}$ e índice de crecimiento de 1.09 a una concentración de nitrógeno y fósforo de 0.075 y 0.02 g/L, seguido por una tasa de crecimiento de $7.3 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, tiempo de duplicación de 3.7 días, productividad volumétrica de $49.89 \text{ g} / \text{m}^3 \cdot \text{día}$ e índice de crecimiento de 1.37 a una concentración de nitrógeno y fósforo de 0.045 g/L y 0.012 g/L, ambos tratamientos a un pH 5.5 (**Figura 12**). Lo cual implica que *Chlorella vulgaris* crece a las mayores concentraciones de nitrógeno evaluadas en el diseño y mejora la producción de biomasa en un medio ácido, opuesto a los resultados obtenidos en un medio de cultivo a pH básico, el cual afectó de forma negativa el crecimiento de la microalga, a pesar de que en la literatura se reporta que *Chlorella vulgaris* crece mejor a este pH del medio (Zeng *et al.*, 2011).

Sin embargo a pesar de los resultados obtenidos en este estudio, Lam & Lee (2012), reportan que *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad de adaptarse tanto a un medio básico como ácido, lo cual va a depender de otros factores como el tipo de sistema empleado para el cultivo, las fuentes de alimentación, la concentración de los nutrientes, la temperatura del medio, la concentración inicial de inóculo e intensidad de luz, entre otros.

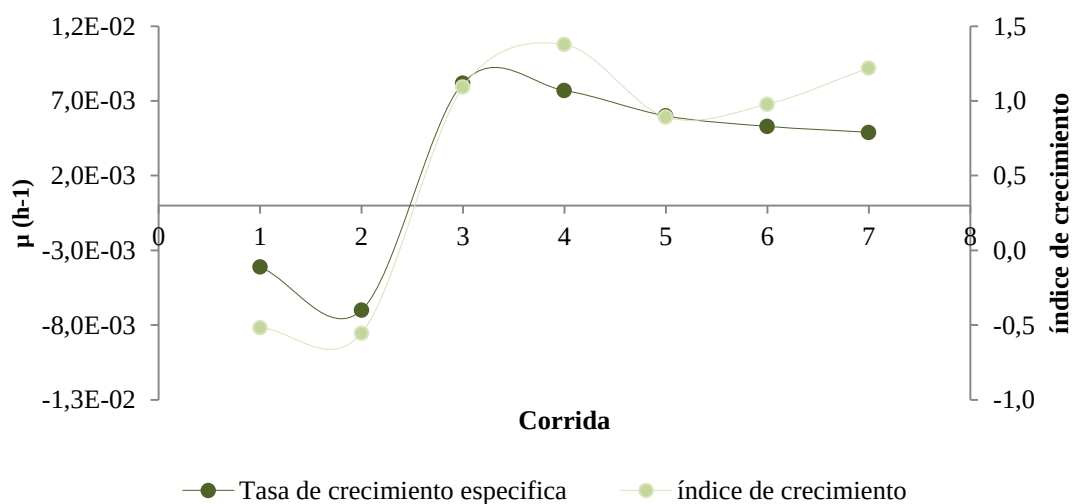


Figura 12. Variación en la tasa de crecimiento específico e índice de crecimiento para cada una de las corridas a escala piloto. (Cuyas condiciones de operación se presentan en la **Tabla 10**)

De acuerdo al análisis estadístico, las dos variables de respuesta se ajustaron a un modelo lineal con un nivel de significancia $p < 0.05$ y se obtuvo un nivel de ajuste de 86.71 y 78.87%, para la tasa de crecimiento específico (**Tabla 25**) e índice de crecimiento (**Tabla 26**), respectivamente, siendo el factor pH la variable más significativa en la tasa de crecimiento y en el índice de crecimiento de *Chlorella vulgaris* (**Figura 13**).

Tabla 14. ANOVA para modelo lineal de la tasa de crecimiento específico.

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor de F</i>	<i>p-value</i>
Modelo	3.14	11.51	0.0219
A - pH	3.11	22.83	0.0088
B- Nitrógeno (g/L)	0.028	0.20	0.6751
C- Fósforo (g/L)	0.00		

Tabla 15. ANOVA para modelo lineal para el índice de crecimiento.

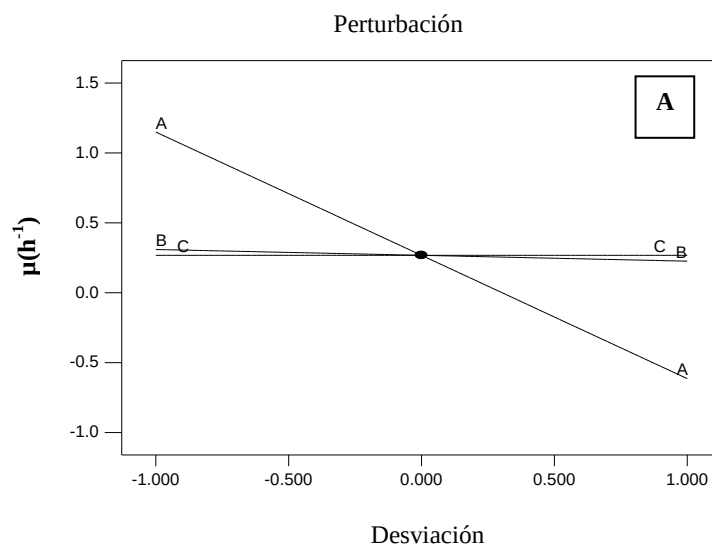
<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor de F</i>	<i>p-value</i>
Modelo	3.39	7.30	0.0463
A - pH	3.36	14.47	0.0190
B- Nitrógeno (g/L)	0.028	0.12	0.7480
C- Fósforo (g/L)	0		

Factores actuales:

A: pH: 0.00

B:Con. Nitrógeno (g/L): 0.5

B:Con Fósforo (g/L): 0.00



Factores actuales:

A: pH: 0.00

B:Con. Nitrógeno (g/L): 0.5

B:Con Fósforo (g/L): 0.00

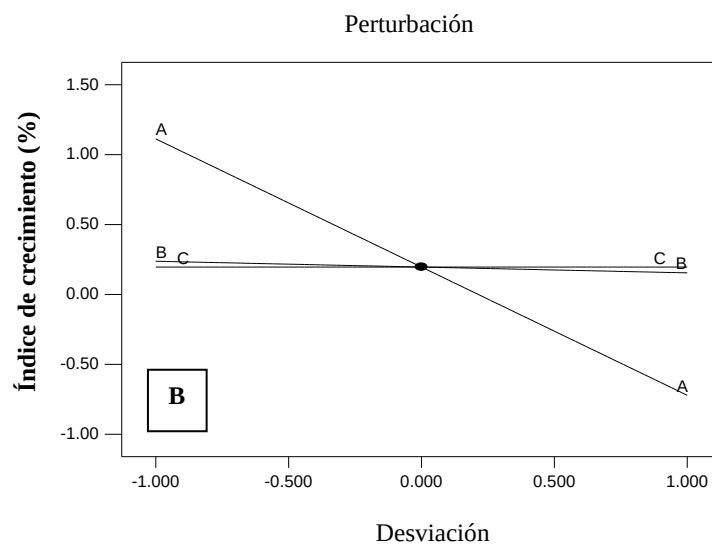
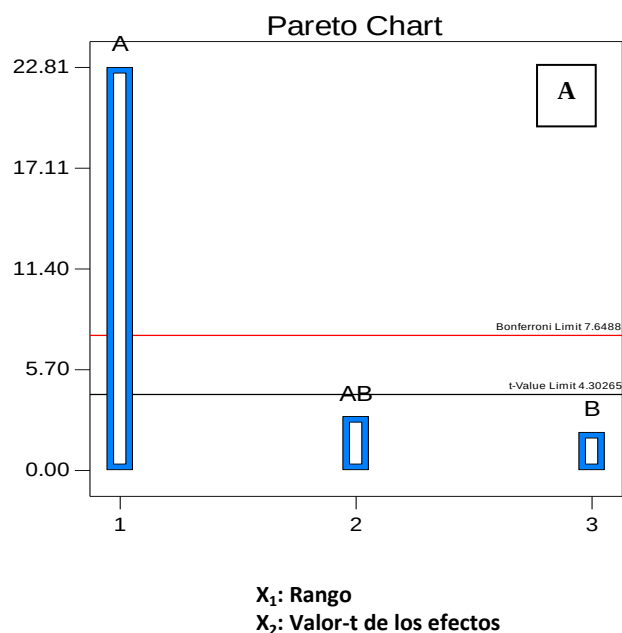


Figura 13. Efecto de las variables en: **A)** la tasa de crecimiento específico y **B)** el índice de crecimiento

En el diagrama de pareto de la **Figura 14**, se confirma la significancia que presenta el pH en ambas variables de respuesta.

Design-Expert® Software
índice de crecimiento (%)

A: pH
B: Concentración de nitrógeno (g/L)
C: Concentración de fósforo (g/L)
■ Positive Effects
■ Negative Effects



Design-Expert® Software
índice de crecimiento (%)

A: pH
B: Concentración de nitrógeno (g/L)
C: Concentración de fósforo (g/L)
■ Positive Effects
■ Negative Effects

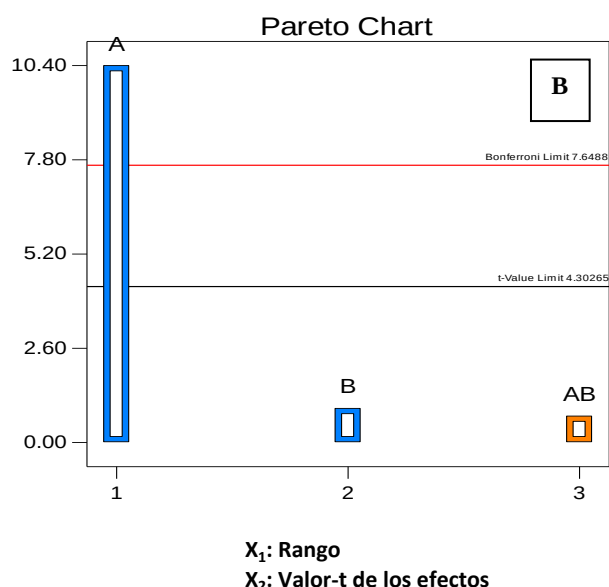


Figura 14. Diagrama de pareto de los efectos estandarizados para: **A)** la tasa de crecimiento específico y **B)** el índice de crecimiento

De este modo, un medio de cultivo a un pH ácido (5.5 para este estudio), resultó ser el factor más importante para el crecimiento de *C. vulgaris*, ($p > 0.05$) independiente de la concentración de nutriente suministrado en el medio, para los intervalos evaluados en el diseño, como se presenta en la **Figura 15**, donde el color rojo corresponde al valor normalizado 1 de la variable de respuesta (ya sea tasa de crecimiento específico ó índice de crecimiento) el cual representa el nivel más alto evaluado en el diseño y en la medida que el color va cambiando a azul (pasando inicialmente de amarillo, verde, azul aguamarina y azul) disminuye el valor normalizado a -1, el cual corresponde al menor nivel evaluado en el diseño estadístico.

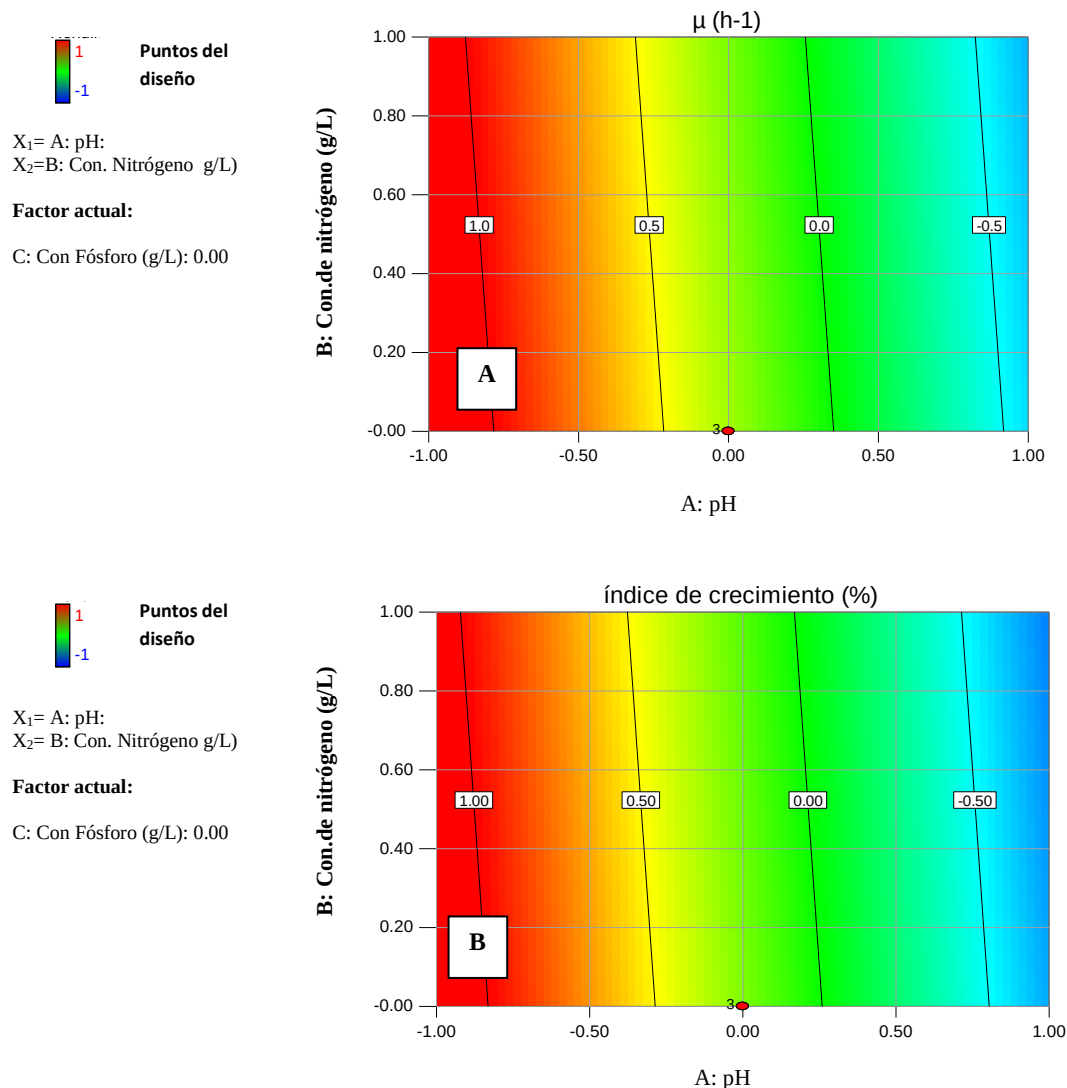


Figura 15. Gráfica de superficie que muestra el efecto del pH y la concentración de nitrógeno sobre: **A)** la tasa de crecimiento específica y **B)** el índice de crecimiento

3.1.2.1 ESCALA PILOTO A DIFERENTES LONGITUDES

De acuerdo a los resultados obtenidos en los tratamientos realizados a escala piloto, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en el crecimiento de la biomasa, cuando los cultivos fueron alimentados con concentraciones de nitrógeno entre 0.075 y 0.045 g/L, siendo el efecto más significativo estadísticamente para el proceso la variable de pH ($p < 0.05$). Por lo tanto para los cultivos a 15, 25 y 35 metros, se seleccionó una concentración de nitrógeno de 0.045 g/L, concentración de fósforo de 0.012 g/L y un de pH 5.5.

Los cultivos llevados a cabo a longitudes de 8 y 15 m, presentaron altas concentraciones de microalga, debido a una reducción en el tiempo de residencia al interior de la tubería al tener

que a travesar una menor longitud la microalga en comparación con mayores longitudes de zona fótica ó de captación solar. Por lo tanto menores longitudes le permitieron a las microalgas realizar la captación de luz suficiente para su proceso de fotosíntesis, importante para el desarrollo de sus procesos metabólicos. De este modo, los mejores resultados obtenidos realizando un seguimiento de 6 días de cultivo, se obtuvieron a una longitud de 15 metros, con una tasa de crecimiento específico de 0.02 h^{-1} , índice de crecimiento de 1.29, tiempo de duplicación de 1.4 días y productividad volumétrica de $46.706 \text{ g/m}^3 \text{ día}$, la cual representa el equilibrio entre la tasa de dilución (D), la concentración de la biomasa y la tasa de crecimiento específico, la cual a su vez depende de la concentración inicial de inóculo, exposición a la luz y la eficiencia fotosintética. Todas estas dependencias, hacen difícil la predicción de la productividad cuando el crecimiento de las microalgas cambia de acuerdo a las condiciones ambientales (Cuaresma *et al.*, 2011), condiciones que para este caso en particular no son controlables, pero sí son medibles.

Finalmente las mejores condiciones encontradas para el cultivo de *C. vulgaris* determinaron las condiciones de crecimiento de las mismas y las características propias de la biomasa obtenida y empleada en el proceso de extracción de proteína asistidos por ultrasonido.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE *Chlorella vulgaris* Y *Nannochloropsis gaditana*

La caracterización inicial de la materia prima se presenta en la **Tabla 16** y **17**, donde se presentan los valores de cenizas, grasa, fibra cruda, proteína utilizando un factor 6.25 y carbohidratos, expresados en base seca.

Tabla 16. Datos en base seca para *Chlorella vulgaris*

Determinación (%)	Resultado	Método
Cenizas	5.89 CV = 0,45 n = 2	NTC 282
Grasa	0.51 CV = 1,45 n = 2	NTC 668
Fibra Cruda	1.96 CV = 1,74 n = 2	NTC 668
Proteína (Nx6,25)	30.20 CV = 2,22 n = 2	NTC 282
Carbohidratos	61.43	-

CV: Coeficiente de variación en %

Tabla 17. Datos en base seca para *Nannochloropsis gaditana*

Determinación (%)	Resultado	Método
Cenizas	10.92 CV = 0,45 n = 2	NTC 282
Grasa	9.28 CV = 1,45 n = 2	NTC 668
Fibra Cruda	5.20 CV = 1,74 n = 2	NTC 668
Proteína (Nx6,25)	44.41 CV = 2,22 n = 2	NTC 282
Carbohidrato	30.20	-

CV: Coeficiente de variación en %

La composición presentada en la **Tabla 16 y 17**, para *C. vulgaris* y *N. gaditana*, respectivamente, resulta tener una composición diferente a los datos reportados en la literatura para las mismas especies (**Tabla 1**), lo cual se presenta porque las microalgas cultivadas en agua potable se adaptan a las condiciones ambientales con un ciclo circadiano de luz:oscuridad, en donde la mayoría de las especies, pasan por un proceso de mitosis durante un intervalo definido del ciclo el cual corresponde típicamente al periodo de oscuridad. Esto se debe, porque las respuestas de las poblaciones celulares periodo a periodo, determinan las variables que sincronizan y mantienen una relación de fase estable entre el ambiente y el ritmo endógeno (reloj circadiano), asegurando la correspondencia del tiempo biológico con el geológico (Vaulot & Chisholm, 1987). Sin embargo además de controlar la división celular, las variaciones de los ciclos cambian el contenido celular de las proteínas, carbohidratos y lípidos (Suknik & Carmeli, 1990), así como el contenido de la clorofila, la composición y actividad del aparato fotosintético (Falkowski, 1980, Richardson *et al.*, 1983).

3.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE *Chlorella vulgaris* Y *Nannochloropsis gaditana* ASISTIDO POR ULTRASONIDO

Para determinar las condiciones del proceso de extracción de proteína, fue necesario realizar ensayos preliminares que proporcionaron el rango y las condiciones de operación a las cuales se llevó a cabo el proceso de extracción tanto en el baño como en la sonda de ultrasonido (**Tabla 19-20**)

3.3.1 Pruebas preliminares para la extracción de proteína empleando baño de ultrasonido

Para ello se evaluó un proceso de disrupción celular a alta presión y temperatura (autoclavado), previo al proceso de extracción de proteína con ultrasonido, debido a las características de la pared celular de las microalgas, en cuyos resultados se obtuvo un incremento en el contenido de proteína soluble extraída en todas las muestras.

Los tratamientos realizados con *C. vulgaris* utilizando el baño de ultrasonido (**Tabla 19**), se evaluaron a las máximas condiciones de operación del equipo (Potencia 200 W, frecuencia 25 kHz) por un tiempo total de estimulación de 1 h, evaluándose el proceso de extracción al tiempo que se realizó la hidrólisis alcalina a pH 7 y 12.

Tabla 18. Extracción de proteína soluble presente en *C. vulgaris* asistido por un baño de ultrasonido

		Proteína soluble (g/L)			
		Pre-tratamiento		Tratamiento	
pH	Concentración de surfactante Tween 80 (%)	Sin tratamiento (Solubilización proteína en medio alcalino)	ningún Tratamiento con autoclave (Únicamente)	Tratamiento con autoclave (105°C por 5 min), previo a la estimulación con ultrasonido	Tratamiento con ultrasonido (Únicamente)
7	0	0,309	-	3,204	2,338
	0.05	0.330	2.298	-	-
	1	2,136	-	6,149	3,115
12	0	0,874	-	3,313	2,773
	0.05	2.002	3.80	-	-
	1	3,372	-	8,322	6,325

Los resultados obtenidos indican que el uso de un pre-tratamiento por autoclave a 105°C por 5 minutos como pre-tratamiento y la adición de un surfactante no-iónico como lo es Tween 80, incrementa la extracción de proteína soluble presente en *C. vulgaris*.

En el caso de *N. gaditana* se obtuvieron resultados similares en la extracción de proteína soluble (**Tabla 20**), donde se evaluaron condiciones de extracción solamente a pH 12, por ser un valor realmente significativo en el proceso, ya que tanto *C. vulgaris* como *N. gaditana*, tienen una mayor cantidad de aminoácidos ácidos en comparación con los básicos, lo cual explica la alta solubilidad que tienen las proteínas en medios muy alcalinos (Ursu et al. 2014).

En la **Tabla 20**, se obtuvo la mayor extracción de proteína soluble (50% adicional) cuando se utilizó como pre-tratamiento autoclave, por la liberación de compuestos internos presente en la microalga. Por otro lado la adición de un surfactante mejoró la extracción de proteína soluble en ambas microalgas, aún en concentración bajas en el medio de extracción, incrementando la extracción de proteína soluble con baño de ultrasonido para ambas microalgas.

Tabla 19. Extracción de proteína soluble presente en *N. gaditana* asistida por un baño de ultrasonido

		Proteína soluble (g/L)	
		Pre- tratamiento	Tratamiento
pH	Concentración de surfactante Tween 80 (%)	Tratamiento con autoclave (105°C por 5 min), previo a la estimulación con ultrasonido	Tratamiento con ultrasonido
12	0	23,647	-
	0.05	31,293	16,492

3.3.2 Pruebas preliminares para la extracción de proteína empleando sonda de ultrasonido

En los procesos de extracción llevada a cabo con sonda de ultrasonido, los parámetros establecidos, alcanzaron potencias de 350 W, a una menor frecuencia (20 kHz), en comparación a las proporcionadas por el baño de ultrasonido, lo cual se traduce en la transmisión de mayor energía ultrasónica. Para todos los tratamientos se utilizó la máxima amplitud permitida por el equipo, (70% de amplitud) y tiempo total de estimulación de 1 h (**Tabla 21**).

En el proceso de extracción de proteínas de *C. vulgaris*, el uso de la autoclave como pre-tratamiento, no incrementó el contenido de proteína soluble extraída, lo cual posiblemente se presentó por un exceso de acumulación de energía en la célula, lo que conllevó a la desnaturalización de las proteínas presentes en la misma, disminuyendo su contenido de proteína soluble en el medio.

Por otro lado, se incrementó el consumo energético en los tratamientos que proporcionaron un mayor número de pulsos a la muestra, incrementando los costos de extracción. Por lo tanto se eliminó el uso de un pre-tratamiento y se utilizó 1 pulso cada 9 min durante 1 h de tratamiento.

Tabla 20. Extracción de proteína soluble presente en *C. vulgaris* asistida por sonda de ultrasonido

						Proteína soluble (g/L)	
						Pre- tratamiento	Tratamiento
pH	Concentración de surfactante Tween 80 (%)	Pulsos por hora	\$ /Proteína soluble (g/L)	Pulsos de ultrasonido		Tratamiento con autoclave (105°C por 5 min), previo a la estimulación con ultrasonido	Tratamiento con ultrasonido
				Encendido	Apagado		
7	0	360	0.28	1	9	6.083	-
	0.05	360	0.22	1	9	7.853	-
12	0.05	360	0.13	1	9	10.881	13.056
	0	360	0.14	1	9	7.230	11.847
	0.05	1800	0.49	1	1	10.858	-
	0.05	3000	0.38	10	1	10.835	-
	0	3480	0.85	25	1	9.605	-
	0	3540	0.72	59	1	11.686	-
	0.05	3540	1.37	59	1	-	5.427

Para el caso de *N. gaditana*, se tuvieron en cuenta los parámetros encontrados para la cepa de *Chlorella vulgaris*, y se evaluó solo el efecto de un pre-tratamiento en el proceso de extracción, el cual incrementó en aproximadamente un 50%, (de 19 a 37 g/L de proteína soluble) el contenido de proteína soluble extraída, cuando se empleó previo al uso de la sonda de ultrasonido (**Tabla 22**), seleccionándose el uso de autoclave como pre-tratamiento.

Tabla 21. Extracción de proteína soluble presente en *N. gaditana* asistida por sonda de ultrasonido

					Proteína soluble (g/L)	
					Pre- tratamiento	
pH	Concentración de surfactante Tween 80 (%)	Tratamiento ultrasonido	con	Tratamiento con autoclave (105°C por 5 min), previo a la estimulación con ultrasonido		
12	0.05				19.930	37.939

Una vez obtenidos los parámetros del pre-tratamiento, se prosiguió a la extracción de proteína soluble de las dos cepas mediante un proceso de solubilización en un medio alcalino utilizando NaOH a 2 M, con el uso de agente de extracción como el surfactante no iónico Tween 80 y estimulación con ultrasonido, empleado con el propósito de incrementar el rendimiento de extracción empleando los diseños estadísticos presentados en las **Tablas 11 y 12**. El efecto de los factores en las variables de respuesta se analizaron utilizando el programa estadístico Design Expert®, el cual arrojó 25 corridas las cuales fueron realizadas de forma aleatoria, con el propósito de reducir el factor de error en la experimentación.

3.4 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE MICROALGA

Una vez realizados los ensayos preliminares, que permitieron definir los niveles de las variables analizadas para la extracción de proteína soluble en ambas microalgas, se prosiguió al estudio más completo de este proceso, mediante un análisis estadístico (**Tabla 11 y 12**) del efecto de los factores del proceso y sus niveles en las variables de respuesta utilizando el programa Design Expert®, versión, 8.0.6, cuyos datos se ajustaron a un modelo cuadrático obteniéndose correlaciones entre 87.41 y 96.87% para el rendimiento de extracción de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, respectivamente, utilizando baño y sonda de ultrasonido (**Apéndice C – C3**), lo cual estableció el buen ajuste de los datos al modelo cuadrático y permitió inferir las significancias de los factores en la variable de respuesta.

En todos los experimentos, valores altos de pH (9.5-12) y de contenido de humedad (92-96%) (**Figura 17**) fueron los factores más importantes en el proceso de extracción de proteína, independiente de la concentración de surfactante y de la potencia empleada.

Sin embargo, aunque la potencia resultó ser un factor no significativo, al analizarse los valores obtenidos para la intensidad ultrasónica se presentó una correlación lineal con los rendimientos alcanzados. De este modo, a las menores intensidades aplicadas en los tratamientos de *N. gaditana* (0.28 W/mL) y *C. vulgaris* (0.92 W/mL) utilizando sonda de ultrasonido, se alcanzaron los mayores rendimientos de extracción de proteína (65.15 y 40.36%, respectivamente) donde se obtuvieron contenidos de proteína soluble entre 10-11 g/L, respecto a los resultados obtenidos cuando se realizó el proceso de extracción con baño de ultrasonido, en cuyos tratamientos se alcanzaron mayores intensidades ultrasónicas, de 1.46 y 1.85 W/mL para *C. vulgaris* y *N. gaditana*, respectivamente, obteniendo rendimientos de extracción de proteína inferiores 30.102 y 37.02% con contenidos de proteína soluble entre 6-7 g/L. Esto se debe a las principales diferencias de potencia ejercida por el equipo de baño, la cual se encuentra entre 20 y 200 W, y por el equipo de sonda que aunque alcanzó potencias hasta 350 W, sólo se

suministraron 44 W a la muestra, al utilizarse 1 pulso por cada 9 s de estimulación, lo cual fue suficiente para alcanzar altos rendimientos de extracción.

Resultados alcanzados por Safi *et al.*, 2015, reportan la extracción de un 26% de proteína soluble después de 4 horas de agitación, resultado inferior al obtenido en este estudio. Un indicador del proceso de extracción, radicó en la coloración obtenida del aislado proteico (**Figura 16**), ya que la presencia de complejos proteínas-clorofilas, indicó que el tratamiento produjo pequeñas cavidades en la pared celular de la microalga como en los cloroplastos permitiendo a algunos pigmentos penetrar a través de la membrana (Safi et al. 2015), para salir al medio, e interactuar con las proteínas.



Figura 16. Extractos de proteína soluble de *C. vulgaris* y *N. gaditana*

No obstante, al analizar las regiones en las cuales se obtuvieron valores mínimos de rendimiento de extracción entre el 8-20%, los contenidos de humedad estuvieron entre el 80-84% a un pH 7, alcanzándose las mayores intensidades ultrasónicas (entre 4-13 W/mL) del proceso.

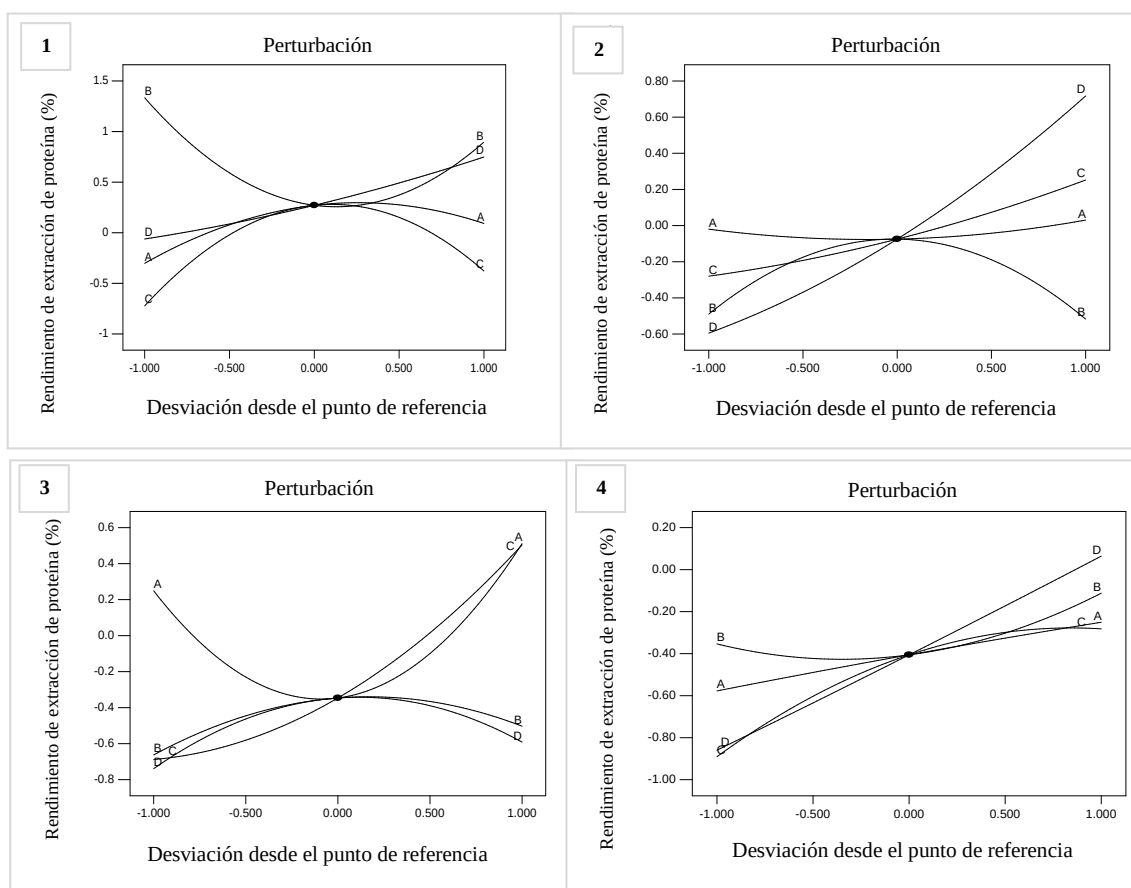


Figura 17. Efecto de los factores en el rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH

En la **Figura 18**, se presenta el diagrama de pareto para el rendimiento de extracción, donde se presentan los efectos positivos y negativos en la variable de respuesta. Los efectos positivos son factores e interacciones que incrementan el nivel de significancia de un modelo, mientras que los factores negativos son factores e interacciones que reducen el nivel de significancia del modelo en la variable de respuesta. En la **Figura 18-1 y 3**, se muestra a la humedad como un efecto positivo, lo cual muestra que mayores humedades incrementan la extracción de proteína soluble, al igual que la concentración de surfactante, mientras la potencia, presenta un efecto negativo en la variable de respuesta. En los datos analizados estadísticamente para la cepa de *N. gaditana* aunque la humedad tuvo un efecto significativo (**Figura 18-2 y 4**), el pH fue el factor que presentó un efecto positivo en la variable de respuesta para los tratamientos utilizando baño y sonda de ultrasonido.

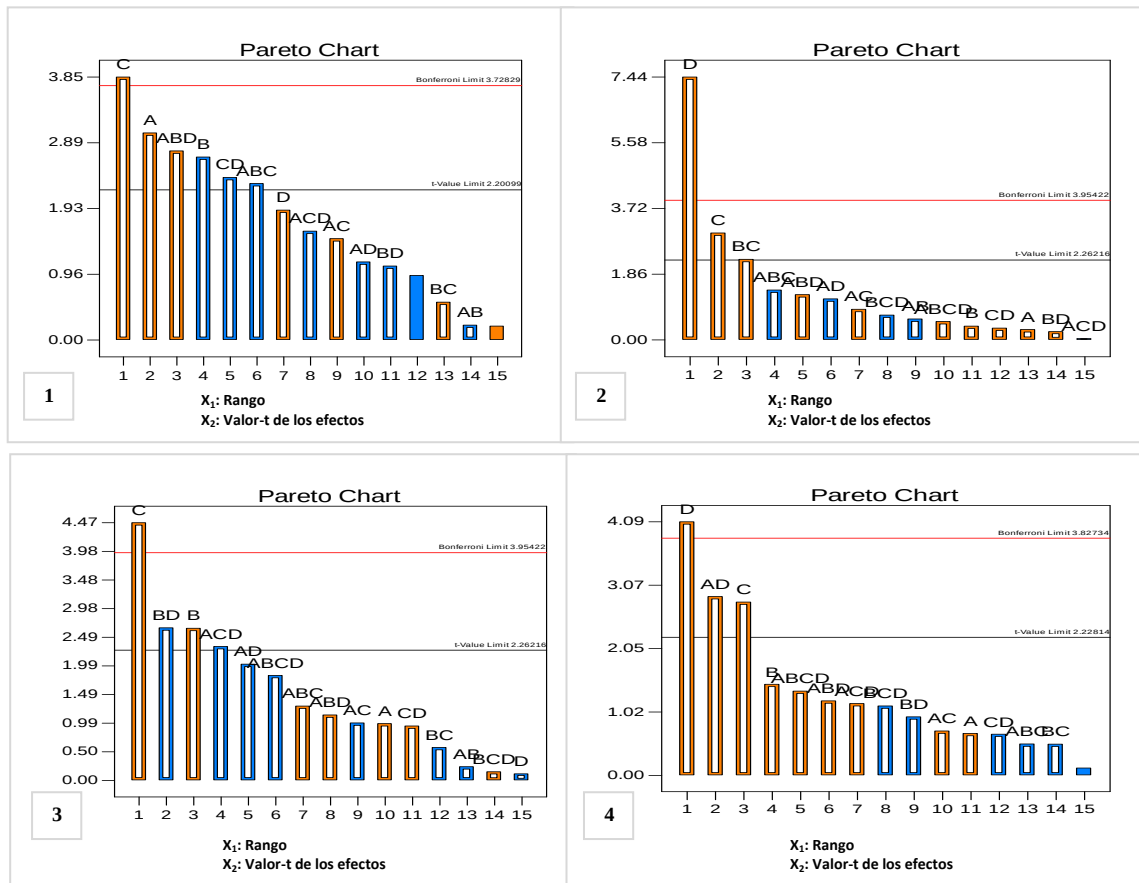


Figura 18. Diagrama de pareto del rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH

El proceso de extracción de proteína empleando ultrasonido, requiere de un solvente en el cual viajen las ondas ultrasónicas, para tener un mayor contacto con los sólidos presentes en el medio, los cuales para este caso específico son las microalgas. Los altos contenidos de humedad en estos procesos, conllevan a una extensa hidratación por los dipolos de agua, asegurando que las moléculas de proteína se mantengan separadas, solubilizándolas en el medio acuoso. Sin embargo la fuerza iónica también define la extracción de proteína soluble al medio, debido a que en un medio con baja fuerza iónica, la adición de sales como el NaOH rodea y protege los grupos ionizables de la proteína, lo cual previene la interacción entre estos grupos, reduciendo las interacciones proteína-proteína, incrementando la solubilización de las proteínas en medio acuoso (Stenesh J, 1998).

Por otro lado, altas humedades van a permitir la formación de un mayor número de burbujas que incrementan la temperatura y presión alrededor de la microalga, por lo tanto cuando estas colapsan, la proteína se despliega y se rompen los enlaces de péptidos por hidrólisis (Jambrak *et*

al., 2009), incrementando la solubilidad de las proteínas a 2.338 y 2.773 g/L, en comparación con las muestras donde no se realizó ningún tratamiento donde se logró una extracción de 0.309 y 0.874 g/L a pH 7 y 12, respectivamente para *Chlorella vulgaris* (**Tabla 18**). Resultados similares fueron obtenidos por Chronakis, (2001) y Gerde *et al.*, (2013) quienes en sus investigaciones obtuvieron un máximo rendimiento de extracción de proteína soluble de 1.5% a pH 9 y 2.3% a pH 12 para *Chlorella vulgaris*. Lo cual demuestra que el tratamiento químico (solubilización de las proteínas) induce una parcial permeación en la pared celular, pero no es suficiente para liberar la mayor parte de las proteínas intracelulares (Ursu *et al.*, 2014)

Otro factor significativo en la extracción de las proteínas, resultó ser el pH el cual de acuerdo a Damodaran (1996), se atribuye a una carga eléctrica neta de las proteínas. En el caso del presente estudio, la naturaleza ácida de las proteínas, se debe a que la cantidad de aminoácidos ácidos (suma de los residuos de Asp y Glu) es mayor en comparación con los aminoácidos básicos (la suma de los residuos de Lis, Arg e His), de acuerdo a los datos reportados por la literatura (**Tabla 2**), lo cual explica la alta solubilidad de las proteínas en medio alcalino (Ursu *et al.* 2014) tanto para *C. vulgaris* (Ursu *et al.*, 2014) como para *N. gaditana* (Gerde *et al.*, 2013). Esto se debe principalmente porque las proteínas presentan cargas netas negativas o cargas netas positivas, dependiendo de si el valor de pH se encuentra por encima o por debajo del punto isoeléctrico respectivamente. Para *Chlorella vulgaris* el pH del punto isoeléctrico se encuentra entre 4.0-5.5 (Ursu *et al.*, 2014) y para *Nannochloropsis gaditana* alrededor de pH 3.2 (Gerde *et al.*, 2013). En los rangos de pH evaluados en este trabajo, cuyos mejores resultados se obtuvieron a pH 12, podría considerarse que se encuentran por encima del pH isoeléctrico y que posiblemente las proteínas de ambas cepas, presentaron una carga neta negativa, las cuales de acuerdo a la literatura son proteínas más solubles que aquellas cargadas positivamente, debido a que los aminoácidos ácido aspártico y glutámico, contribuyen de forma más favorable a la solubilidad de las proteínas que los demás 18 aminoácidos (Kramer *et al.*, 2012).

En este estudio, el uso de ultrasonido de alta intensidad de 20 kHz (en comparación con el uso del baño de ultrasonido con 25 kHz) incrementó significativamente ($p < 0.05$) la solubilidad de las proteínas en medio acuoso, comparado con las muestras control (**Tabla 18-21**), lo cual se presentó porque el uso de ultrasonido de alta intensidad, cambia la conformación y estructura de las proteínas de tal manera que se alteró su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, exponiendo los residuos hidrofílicos de los aminoácidos que se encuentran al interior de las proteínas hacia el medio acuoso (Morel *et al.*, 2000; Moulton & Wang, 1982; Wang, 1975). Los tratamientos realizados con ultrasonido, incrementaron la temperatura del medio entre 29 y 45°C, dependiendo de la potencia y humedad empleada. En estos rangos de

temperatura se mejora la solubilización de las proteínas en medio acuoso, lo cual está de acuerdo con estudios realizados por Jambrak *et al.*, (2008), en proteínas aisladas de soya.

Estos cambios de estructura de las proteínas, incrementa el número de grupos cargados (NH_4^+ , COO^-) (Jambrak *et al.*, 2008), cambiando la conductividad de las muestras tratadas con ultrasonido, en comparación con las muestras sin ningún tratamiento. Este cambio se presentó porque las fuerzas electrostáticas son mayores cuando hay estimulación, permitiendo que más moléculas de agua interactúen con las moléculas de proteína (Jambrak *et al.*, 2008), además de la formación de radicales hidroxilos durante el proceso de sonicación, (Petrier *et al.*, 1992; Makino *et al.*, 1983, Hart & Henglien, 1985), lo cual también incrementa la conductividad del medio (Jambrak *et al.*, 2008).

Morel *et al.*, 2000, encontró que el ultrasonido genera una disminución en el peso molecular de la proteína, dejando expuesta una mayor área de proteína para que esta sea cubierta por moléculas de agua. Una disminución en el peso molecular se presentó por el rompimiento de los enlaces peptídicos a causa del ultrasonido, cuyos fragmentos pueden tener una mayor solubilidad en comparación con la proteína madre, que fue el caso de este estudio, ya que en análisis realizados de electroforesis en geles de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico, se revelaron proteínas con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa (**Figura 19-A**), inferior a los análisis reportados en la literatura, donde para muestras de *Chlorella vulgaris* es posible encontrar proteínas con peso molecular superior (**Figura 19-B**).

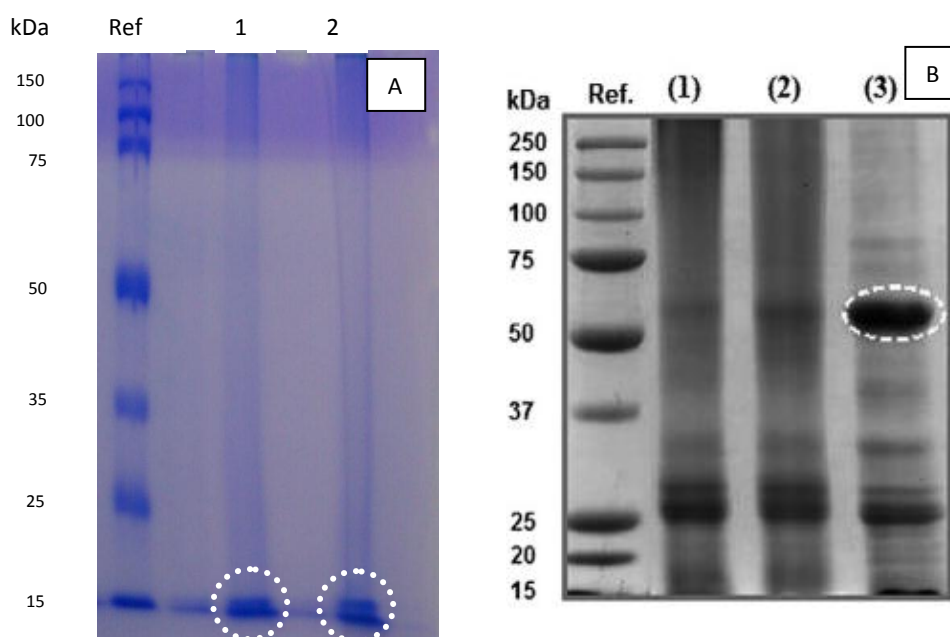


Figura 19. Análisis de proteínas por SDS-PAGE **A)** de *Chlorella vulgaris*, **B)** dado por la literatura para *Chlorella vulgaris* por (Ursu *et al.*, 2014)

Otro aspecto importante es el *punto de turbidez* del surfactante, cuya temperatura se encuentra alrededor de los 65°C para Tween 80, por lo tanto realizar el proceso de solubilización por debajo de esta temperatura, mejora la solubilización de las proteínas. Sin embargo una de las desventajas del *punto de turbidez*, es la alta temperatura a la cual se debería llevar la solución (mezcla de proteína-surfactante) para la formación de dos fases (proteína- surfactante), seguido por centrifugación, para finalmente separar las proteínas del surfactante (Seddon, *et al.*, 2004; Bhairi, 1997), en caso de que sea necesario o se desee aislar el surfactante de la mezcla.

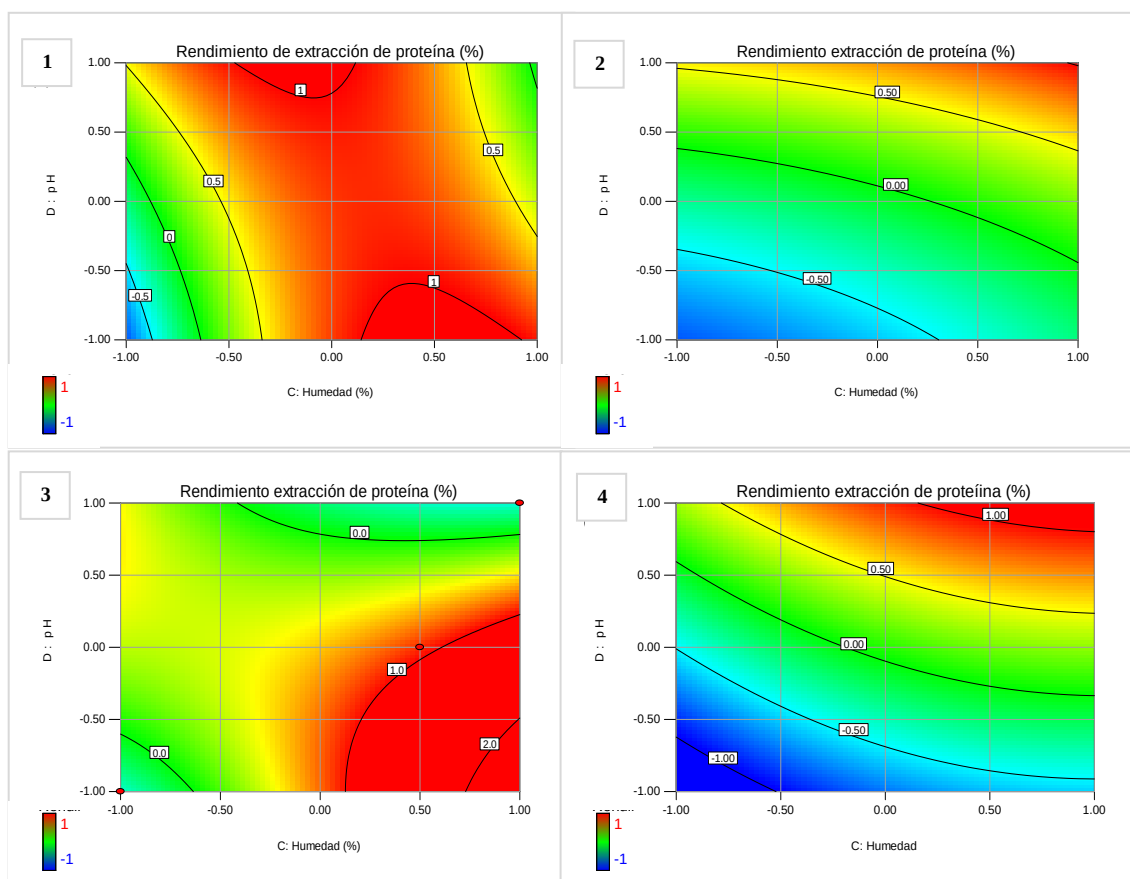


Figura 20. Contorno estimado (valores codificados) para el rendimiento de extracción de proteína utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), para el pH vs humedad (%)

3.4.1 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS AISLADAS CON ULTRASONIDO EN LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (%)

Uno de los aspectos de este estudio, incluye determinar la capacidad de formación de espuma de las proteínas extraídas de ambas microalgas. Para ello, el análisis estadístico de los datos se realizó a través del programa Design Expert®, los cuales se ajustaron a un modelo cuadrático

obteniéndose una correlación entre 73.43 y 81.16% para la capacidad de formación de espuma de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, utilizando baño y sonda de ultrasonido (**Apéndice D– D3**).

En todos los experimentos, los tratamientos con mayor pH (9.5-12) y menores contenidos de humedad (80-84%), demostraron ser los factores más importantes en la capacidad de formación de espuma, independiente de la concentración de surfactante y potencia empleada (**Figura 21**).

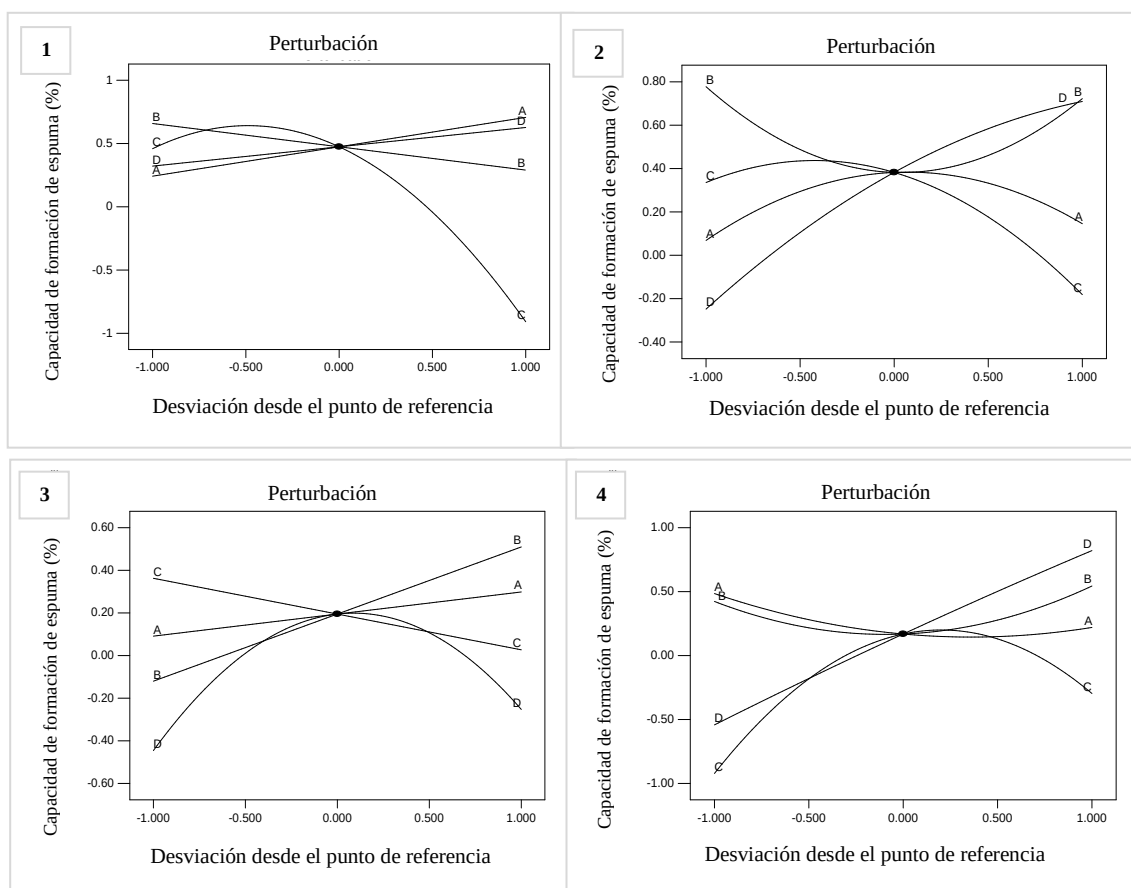


Figura 21. Efecto de los factores en la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.

Los máximos valores obtenidos, para la formación de espuma de *Chlorella vulgaris* fue de 60% (estabilidad de espuma de 0%) y 38% (estabilidad de espuma de 83%), para el tratamiento con baño de ultrasonido a 25 kHz y 65 W y sonda a 20 kHz y 350 W, respectivamente. Para la cepa de *N. gaditana* se obtuvieron valores entre 66.57% (estabilidad 0%) y 77.8% (estabilidad de 100%) para la sonda 20 kHz y 155 W y el baño de ultrasonido a 25 kHz y 275 W, respectivamente.

Estos valores se obtuvieron a concentraciones de proteína soluble entre 12-15 g/L (equivalente 72-100%, respectivamente de proteína soluble total obtenida) para la cepa de *Chlorella vulgaris* utilizando el baño y la sonda de ultrasonido respectivamente, y para la cepa de *Nannochloropsis gaditana* se obtuvo una concentración de proteína soluble de 6-24 g/L para el baño y la sonda de ultrasonido, respectivamente (equivalente 23-83%, respectivamente de proteína soluble total obtenida), siendo las proteínas extraídas de *N. gaditana*, las que mayor capacidad de formación de espuma presentaron. El efecto que presenta la estimulación con ultrasonido en este parámetro, radica en la inicial homogenización de la muestra por efecto del ultrasonido, cuyo movimiento usualmente dispersa la proteína volviéndolas uniformes, desplegando parcialmente las proteínas, mejorando la capacidad espumante (Jambrak *et al.*, 2008)

En el diagrama de pareto presentado en la **Figura 22**, para todos los tratamientos, la humedad y el pH fueron significativos en la variable de respuesta, siendo la concentración de surfactante la de menor efecto en todos los casos. Las estimulaciones con ultrasonido, realizadas para *N. gaditana* la variable pH fue la de mayor efecto, cuando éste se encontraba en los rangos más altos, mientras que para *C. vulgaris* el factor humedad fue más significativo cuando se encontraba en el rango mínimo evaluado en esta investigación.

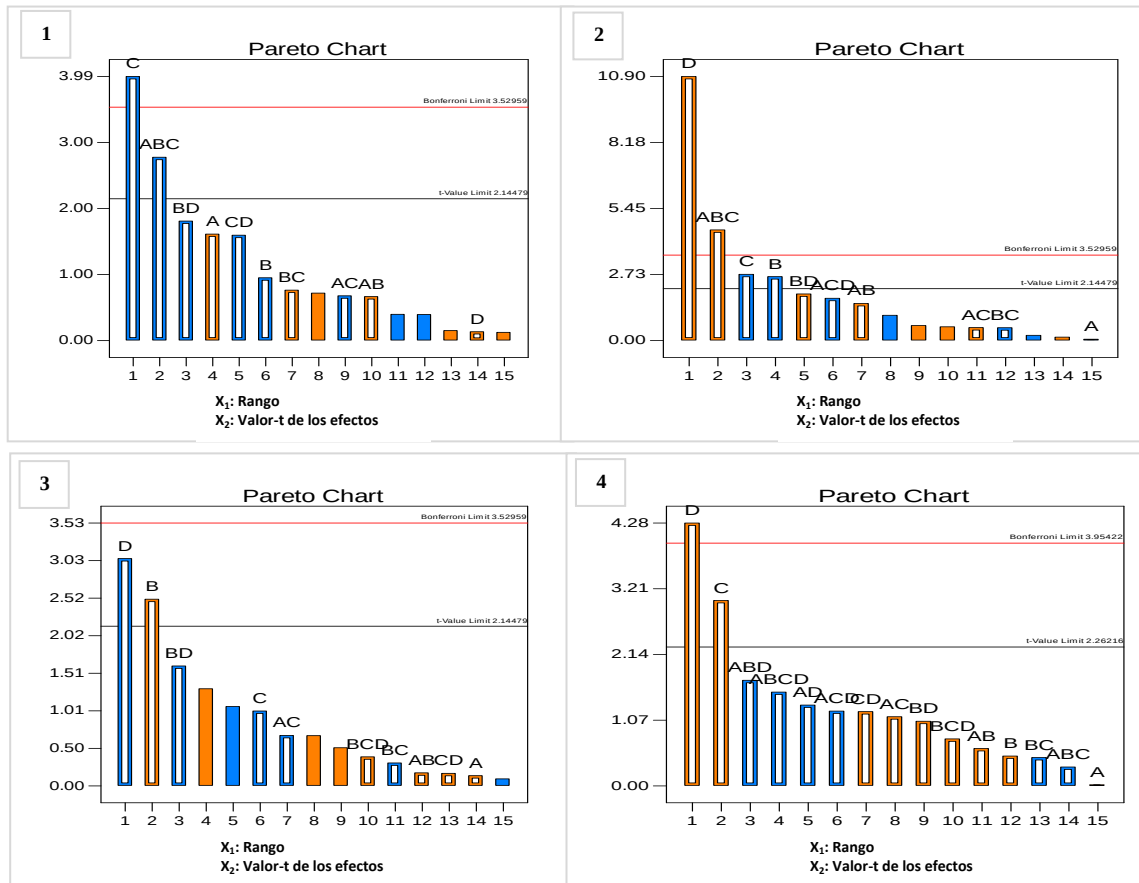


Figura 22. Efecto de los factores en la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.

La concentración de surfactante aunque no presentó significancia estadística ($p > 0.05$), la tendencia de los datos indica que las más altas espumas se formaron a concentraciones de Tween 80 entre 0.125-0.5%, donde resultó favorable potencias entre 20-155 W y 25 kHz, cuando se empleó el baño y potencias entre 275-350 W a 20 kHz (**Figura 23**)

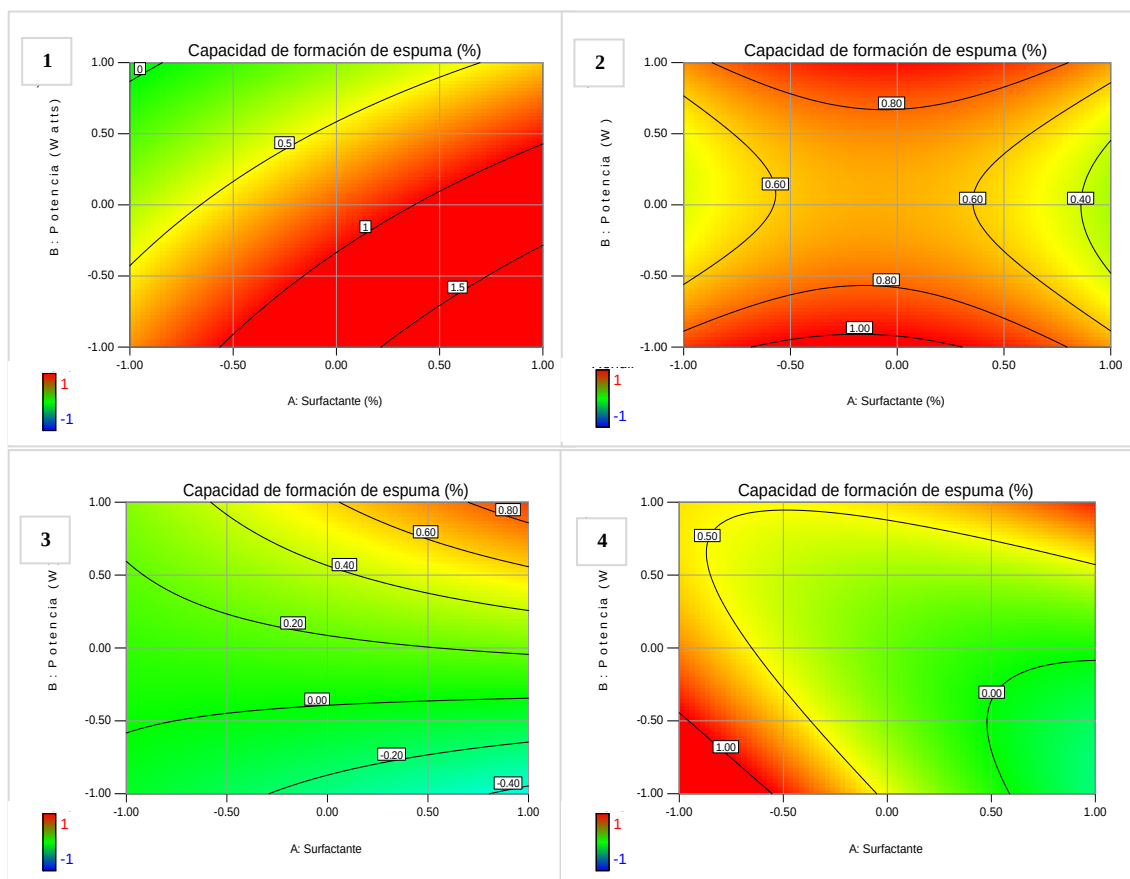


Figura 23. Contorno estimado (valores codificados) para la capacidad de formación de espuma utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), para el pH vs humedad (%)

En este estudio, los menores porcentajes de espuma obtenidos estuvieron entre 0 a 25% a concentraciones de proteína entre 2- 5 g/L para *Chlorella vulgaris* y 17-26 g/L para *Nannochloropsis gaditana*, a un pH 7 y humedad entre 84-92%, (independiente de los valores de potencia y concentración de surfactante). De este modo bajas solubilidades expresan un bajo índice de funcionalidad de las proteínas, ya que los datos indican desnaturalización y agregación de las proteínas, exhibiendo por consiguiente una falta de habilidad para participar efectivamente en la formación de espumas y emulsiones (Kinsella, 1976), como es el caso de este estudio. Resultados similares obtuvieron Schwenzfeier *et al.*, (2013) para la microalga *Tetraselmis sp.*, a pH 5, donde se correlacionó un decrecimiento en la formación de espuma, como consecuencia de una disminución en la solubilidad a este pH.

Al comparar los resultados de formación de espuma de las microalgas, con las espumas obtenidas a partir de proteína de soya estimulada con sonda de ultrasonido a 20 kHz, se observa que esta última presenta una capacidad de formación de espuma entre 93-104% (Jambrak *et al.*,

2009) resultados mucho mayores a los reportados para la proteína aislada de ambas microalgas evaluadas en este estudio.

3.4.2 PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LA PROTEÍNA SOLUBLE AISLADA de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*

El análisis estadístico de los datos se realizó a través del programa Design Expert®, los cuales se ajustaron a un modelo cuadrático obteniéndose una correlación entre 77 y 95% para la actividad emulsificante de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana*, respectivamente, utilizando baño y sonda de ultrasonido (**Apéndice E – E3**).

En todos los experimentos, los tratamientos con mayor pH (7-9.5) y mayores contenidos de humedad (80-84%) y la potencia de 65 W a 25 kHz para el baño de ultrasonido y potencia de 350 W a 20 kHz para el caso de la sonda, demostraron ser los factores más importantes para la actividad emulsificante (**Figura 24**), independiente de la concentración de surfactante, aunque los datos presentaron una tendencia hacia las muestras que contenían concentraciones de 0.375% y 0.5% (**Figura 26**). Por lo tanto las proteínas aisladas de ambas microalgas pueden ser empleadas en alimentos que se encuentren en este rango de pH.

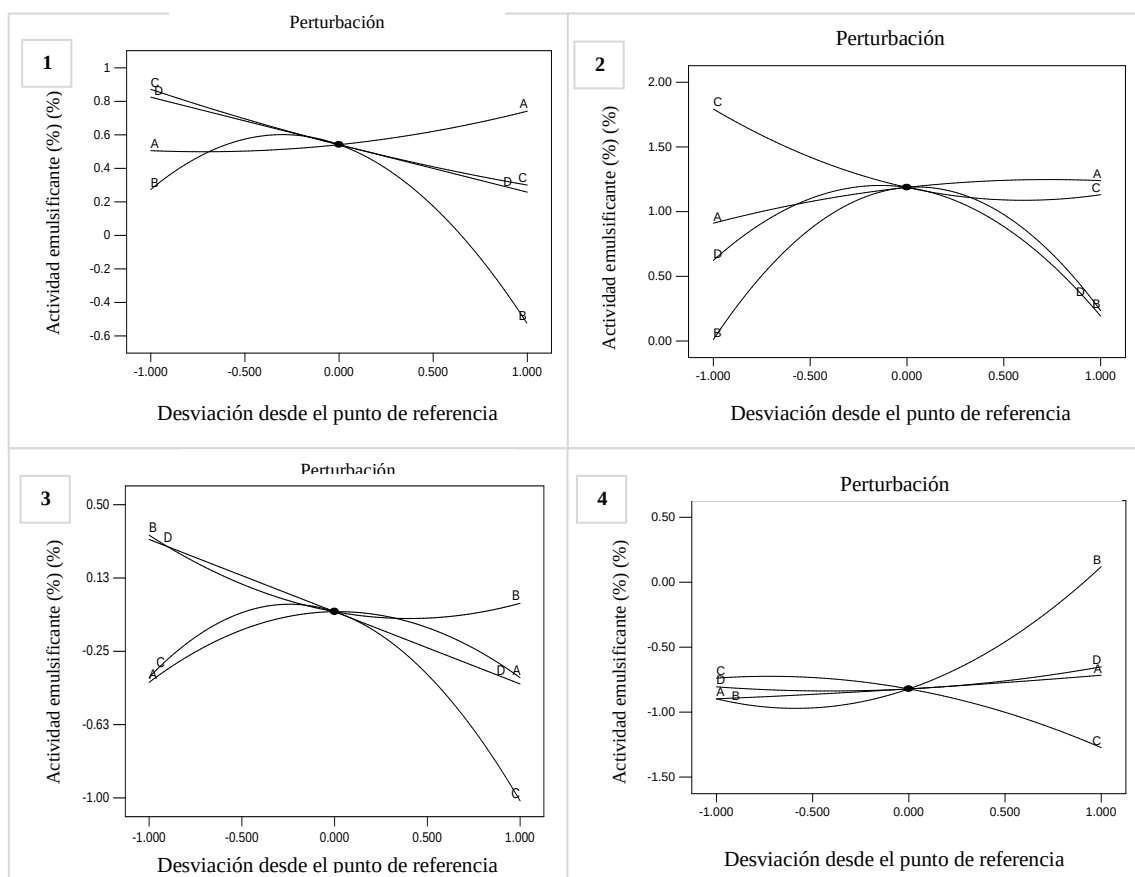


Figura 24. Efecto de los factores en la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.

En investigaciones realizadas con albúmina de suero bovino, el uso del ultrasonido (ya sea en pulsos o de forma continua) no tuvo un efecto significativo en la actividad superficial de esta proteína, ni en la capacidad de la proteína en formar emulsiones (Güzey *et al.*, 2006). Resultados similares se obtuvieron en esta investigación, donde no hubo un efecto significativo ($p < 0.05$) de la potencia en la actividad emulsificante de las proteínas.

En la **Figura 25** se presenta el diagrama de pareto, en el cual se presentó en todos los casos un efecto significativo de la potencia en la capacidad emulsificante, sin embargo en las muestras estimuladas con baño de ultrasonido, esta variable tuvo un efecto significativo negativo, mientras que para las muestras estimuladas con sonda presentó un efecto significativo positivo para ambas cepas.

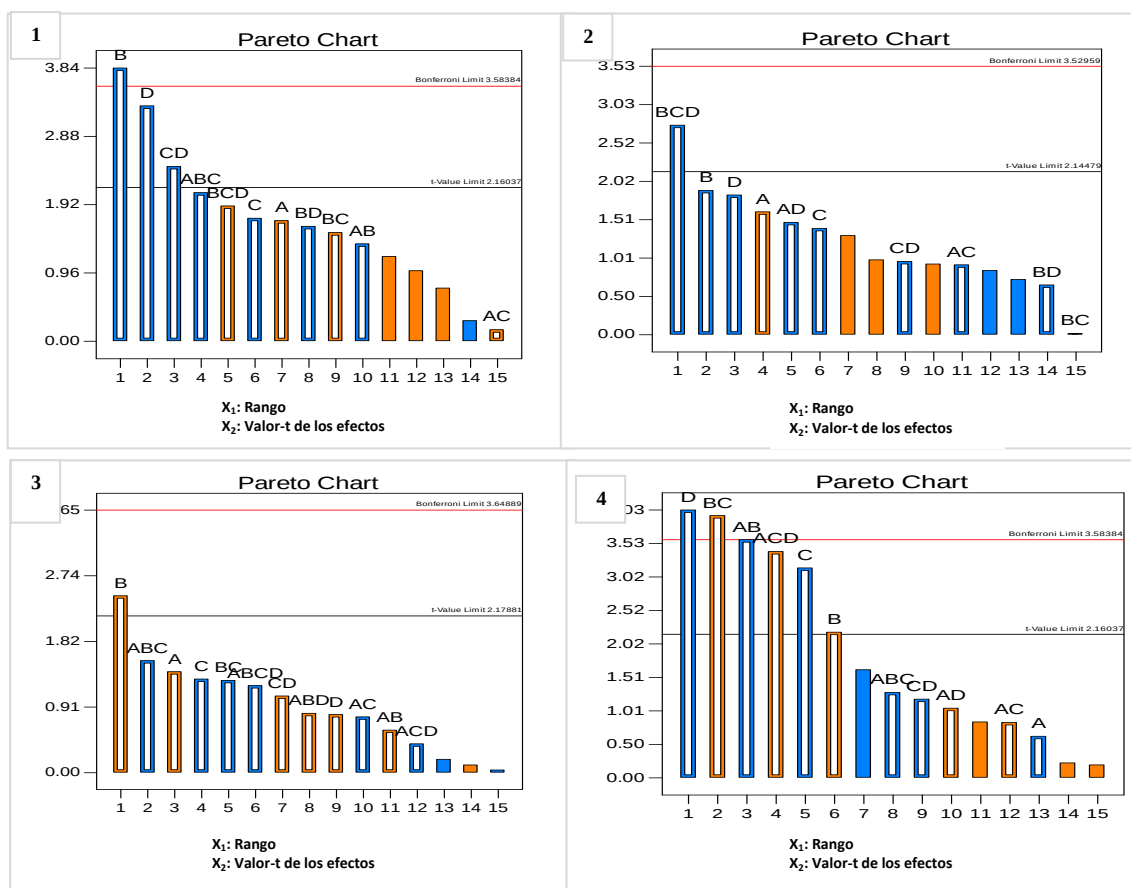


Figura 25. Diagrama de pareto de los factores en la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), donde A: es la Concentración de surfactante, B: Potencia (W), C: Humedad (%) y D: pH.

Al igual que el rendimiento de extracción, hubo una correlación lineal con la intensidad ultrasónica, ya que a intensidades de 4.16 W/mL y 2.73 W/mL para *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* utilizando el baño de ultrasonido, se obtuvieron las proteínas con la mayor actividad emulsificante alcanzando valores de 71.43% y 68.33%, respectivamente.

Resultados inferiores se obtuvieron para las proteínas aisladas obtenidas a partir del proceso de estimulación de las microalgas con sonda de ultrasonido, alcanzando actividades emulsificantes de aproximadamente 63% para *C. vulgaris* y *N. gaditana*. Alcanzándose estos resultados en muestras con contenidos de proteína soluble de aproximadamente 12 g/L.

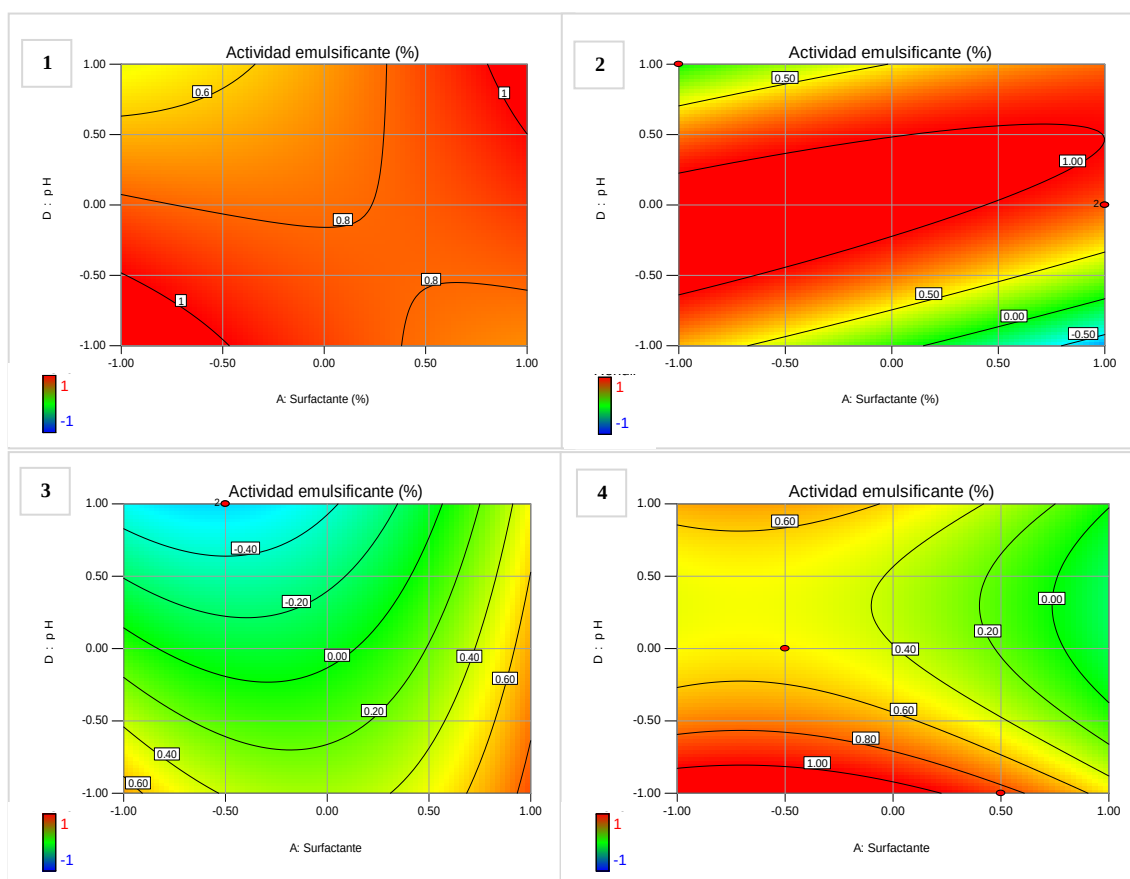


Figura 26. Contorno estimado (valores codificados) para la actividad emulsificante utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (1) y *Nannochloropsis gaditana* (2) y sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (3) y *Nannochloropsis gaditana* (4), para el pH vs humedad (%)

Por otro lado, las menores actividades emulsificantes, para el baño de ultrasonido estuvieron entre el 1 -2% (con muestras que contenían entre 5-6 g/L de proteína soluble), con intensidades ultrasónicas entre 1-3 W/mL, y para la sonda entre 10 a 30% a intensidades ultrasónicas entre 0.02-0.05 W/mL, a pH entre 9.5-12, humedad entre 92-96%, y potencia entre 155-200W para el baño y 125-375 W para la sonda. De este modo, muestras con mayores contenidos de proteína soluble y mayores intensidades ultrasónicas, presentaron mayores actividades emulsificantes. Para la capacidad de formación de espuma, según Krause *et al.*, 2000, la resistencia que presentan las proteínas a la desnaturalización es tan importante como la hidrofobicidad que presentan las proteínas en su superficie. De este modo un incremento en la solubilidad de las proteínas por efecto del ultrasonido, presentó una influencia beneficiosa en la formación de una emulsión, ya que más proteínas se solubilizan en la solución y por lo tanto estarán más disponibles para estabilizarla.

Las proteínas son de gran interés por su naturaleza anfifílica, ya que reduce la tensión interfacial en la interface agua-aceite, cuya fuerza impulsora para la adsorción de las proteínas en esta interface es el efecto hidrófobo. De este modo, la parte hidrofóbica de las proteínas interactúan con la fase oleosa, mientras que los aminoácidos hidrofílicos van a interactuar con la fase acuosa, por lo que un 100% de solubilidad de la proteína no siempre refleja una mayor capacidad de formación de emulsión. Por otro lado, numerosos estudios han reportado que el tratamiento con ultrasonido de soluciones proteicas, puede incrementar la actividad superficial de las proteínas bajo ciertas condiciones de experimentación (Feng, Barbosa-Cánovas, & Weiss, 2011).

3.5 CINETICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

La cinética de extracción de proteína se realizó para los mejores tratamientos obtenidos en el rendimiento de extracción de proteína de ambas cepas. Los valores experimentales fueron ajustados a un modelo de segundo orden, que de acuerdo a Chen Zhong *et al.*, (2014) describe el proceso de extracción sólido-líquido, de proteínas solubles.

Para el cálculo de la cinética, la ecuación de segundo orden se linealizó y se graficó t/C_t vs t (Figura 27)

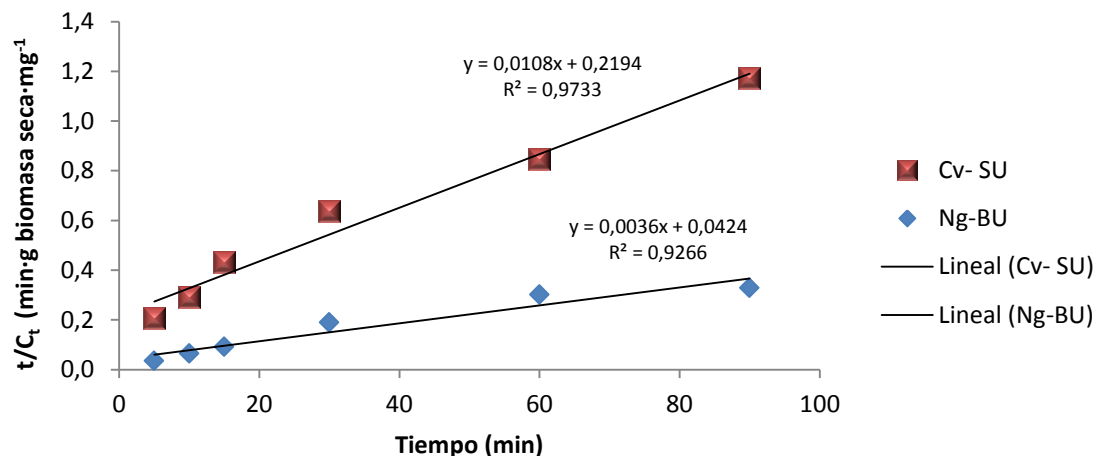


Figura 27. Análisis de la cinética para el proceso de extracción de proteína con sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (pH 9.5, Surfactante 0.5%, potencia 350 W, humedad 92%) y *Nannochloropsis gaditana* (pH 12, Surfactante 0.5%, potencia 275 W y humedad 96%).

Teniendo las ecuación de la regresión lineal, la capacidad de extracción de proteína (C_s) para *Chlorella vulgaris*, la cual se refiere a la concentración en el equilibrio de proteína soluble en suspensión fue de 92.59 mg/g de biomasa seca, con una constante de la tasa de extracción (k) de $5.31E-4 \text{ g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y para *Nannochloropsis gaditana* fue de 277.77 mg/g de biomasa seca, con una constante de la tasa de extracción de $3.056E-4 \text{ g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Alcanzándose una mayor

C_s , para la cepa de *N. gaditana* lo cual posiblemente se debe a que es una microalga con mayor contenido de proteína que *C. vulgaris*.

Los valores de k , revelan la rapidez con la que el proceso de extracción se lleva a cabo, o la cantidad de proteína que ha sido extraída en un tiempo específico. Por lo tanto mayores valores de k indican una mayor tasa de extracción, por lo tanto la liberación de más proteínas cuando se alcanza el equilibrio.

3.6 EVALUACIÓN DE COSTOS GLOBALES

Para la evaluación de los costos globales se utilizó el diagrama de proceso que se encuentra en la **Figura 9 y 10**, empleando una base de producción de 20 Kg/día de biomasa para la obtención de proteína soluble. Las condiciones óptimas a las cuales estarían las etapas del proceso, se presentan en la siguiente tabla (**Tabla 22**).

Tabla 22. Condiciones propuestas para la extracción de proteínas a partir de microalga

Parámetros	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Adecuación de la biomasa		
pH	9.5	12
Humedad Final (%)	92	96
Concentración Tween 80 (%)	0.5	0.5
Tiempo de agitación (min)	5	5
Ultrasonido – Extracción proteína		
Potencia (W)	500	500
Frecuencia (kHz)	20	20
Amplitud (%)	70	55
Temperatura (°C)	40	40
Velocidad agitación (rpm)	700	700
Tiempo agitador (min)	60	60
Tiempo ultrasonido (min)	60	60
Centrífuga		
Rendimiento (%)	99	99
Velocidad agitador (rpm)	15000	15000
Tiempo (min)	10	10

3.6.1 Materias primas

La cantidad y el costo de las materias primas que se necesitan para procesar 8 Kg de biomasa húmeda/hora, presentado en la **Figura 9 y 10**, se presentan en la **Tabla 23**. Es importante mencionar que esta capacidad de producción, se seleccionó por las limitantes en cuanto a volumen de trabajo del equipo de ultrasonido.

Tabla 23. Insumos necesarios para el proceso de extracción de proteína

Insumos	Cantidad	Unidades	Precio unitario (US \$/Kg)	Total (US \$)
Biomasa microalga	8.7	Kg	22	191.4
Tween 80	0.11	Kg	8	0.88
Hidróxido de sodio	0.11	Kg	5	0.55
Agua	12	Kg	0.41 US \$/m ³	0.051
Total				200.091

El costo de la biomasa se tomó de acuerdo a estudios previos realizados donde se estima un costo de producción de \$ 71 000, para las demás materias primas se tomó en base a su precio de venta industrial.

3.6.2 Equipos principales para el proceso y servicios

En la siguiente **Tabla 24** y **25**, se presentan los equipos necesarios para cada etapa en el proceso de producción y los gastos de consumo de energía para cada uno junto con sus costos totales de operación. El costo de cada equipo se estableció de acuerdo a lo descrito en la metodología utilizando los valores reales de los equipos y/o recipientes empleados a escala de laboratorio, obteniéndose un costo total de equipos a escala de laboratorio de US\$15548.22 y US\$ 37543.922.

Tabla 24. Equipos principales para el proceso

Equipo	Volumen Escala Lab. (Litro)	Precio unitario escala Lab (US \$)	Volumen esc. Piloto (Litro)	n	Costo del equipo escala piloto (US \$)
Tanque agitador	0.1	12.86	30	0.53	264.35
Autoclave	250	7202.57	50	0.54	7202.57
Sonda ultrasonido	1	5466.23	20	1	16077
Centrifuga	0.048	2866.56	30	0.67	14000
Total					37543.92

Tabla 25. Descripción del consumo de energía

Equipo	Capacidad	Consumo por unidad (kWh)	Cantidad	Total (US \$)
Centrifuga (Litro/h)	30	5.5	1	17
Autoclave (Litro)	250	4.4	1	14
Tanque agitación (Litro)	30	2.0	1	12.77
Sonda ultrasonido (Litro)	20	8.4	1	1.11
Total				44.89

Personal	Cantidad turno	Total (US \$)
Operario (\$ 8/h)	3	192

3.6.3 Análisis de costos

De acuerdo al balance de costos de producción, se tienen en promedio un precio de la proteína de US \$ 22.37/Kg de proteína soluble en medio acuoso (US \$ 49.32/Kg de proteína soluble concentrada) y US \$ 5.45/Kg de la fracción de proteína insoluble (resto de la biomasa) con 0.14 Kg de proteína soluble. Wijffels *Et al.*, (2010) reportaron costos inferiores, donde se estima un valor de US \$ 5.5/Kg de la fracción de proteína soluble y US \$ 0.84/Kg de la fracción insoluble, inferiores a los obtenidos en este estudio. Los mayores costos se asocian a la biomasa, insumos y personal.

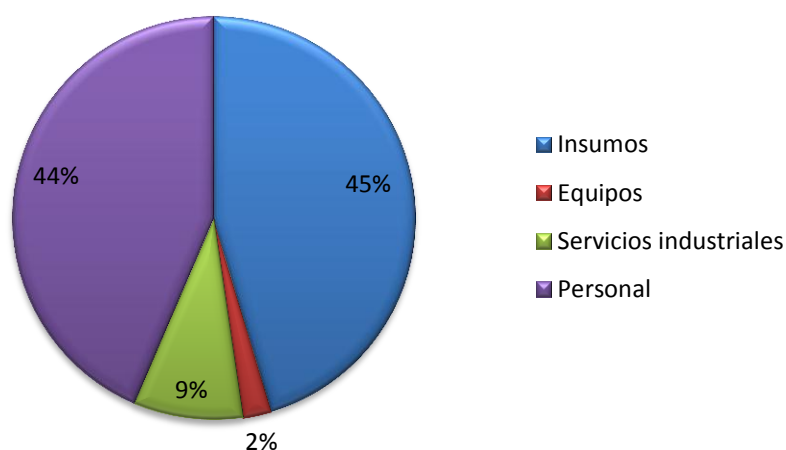


Figura 28. Distribución del costo total

En la siguiente figura se presentan una distribución de los costos para cada etapa del proceso, donde los mayores porcentajes se encuentran en la etapa de agitación y rompimiento celular por autoclave y el de menores costos el uso del ultrasonido.

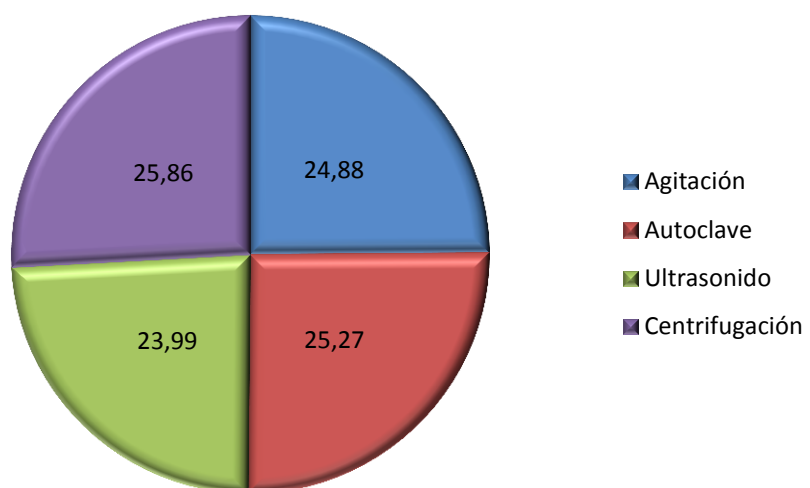


Figura 29. Distribución de los costos del proceso por etapa del proceso

CONCLUSIONES

- Los cambios en la composición de *Chlorella vulgaris* están asociados a las condiciones del cultivo, siendo la concentración de nitrógeno, la frecuencia de alimentación diaria y un pH ácido los factores determinantes para la síntesis de proteínas en la microalga.
- Es posible la extracción de proteína soluble mejorando su rendimiento con el uso de un surfactante no-iónico como Tween 80 y ultrasonido entre 500-800%, en comparación con la extracción mediante solubilización en medio acuoso básico, o con la ruptura celular en autoclave.
- El uso del ultrasonido de sonda incrementó la extracción de proteína soluble en un 20% para *C. vulgaris* y en un 40% para *N. gaditana*.
- Bajas intensidades ultrasónicas, alta humedad (92-96%) y pH 12, incrementaron el rendimiento de extracción de proteínas solubles, sin necesidad de una etapa de secado previa a la estimulación con ultrasonido, permitiendo que el proceso sea continuo.
- Las proteínas solubles extraídas reflejaron propiedades funcionales como la capacidad de formación de espuma (39-66%) y formación de emulsiones (63-71%), indicando su potencial para ser empleadas como aditivo en la elaboración de productos alimenticios, además de su reconocido valor nutricional.
- La cinética de extracción se ajustó a un modelo de segundo orden obteniéndose una capacidad de extracción para *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* de 92.59 mg·g de biomasa seca⁻¹ y 277.77 mg·g de biomasa seca⁻¹, aunque *C. vulgaris* tuvo la mayor constante cinética para la tasa de extracción con 5.31E-4 g·mg⁻¹·min⁻¹.
- Existen diferencias en la capacidad de formación de espuma y la estabilidad de la espuma en el tiempo de las proteínas de microalgas, según sea el tratamiento ultrasónico empleado. Cuando la proteína de la microalga se va a utilizar por su capacidad de formación de espuma es más conveniente realizar el tratamiento con baño de ultrasonido. Si las muestras se tratan con sonda de ultrasonido, se obtiene la menor estabilidad de espuma en el tiempo.

APÉNDICES

APÉNDICE A. Curva de calibración para cuantificación de proteína soluble

El contenido de proteína soluble se determinó, mediante una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino y la extrapolación de la concentración a través de la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 750 nm de la muestra desconocida en la ecuación cuadrática obtenida. En la siguiente tabla se presentan las concentraciones y valores de absorbancia obtenidos.

Tabla 26. Preparación de estándar de albúmina de suero bovino

Muestra	Concentración (µg/mL)	Absorbancia (Abs)	
		Muestra	Duplicado
A+	2000	2,695	2,776
A	1500	2,32	2,39
B	1000	1,862	1,991
C	750	1,545	1,627
D	500	1,189	1,282
E	250	0,738	0,764
F	125	0,413	0,419
G	25	0,109	0,109
H	5	0,051	0,054
I	1	0,048	0,048
J	0	0,045	0,045

Obteniendo la siguiente curva, en la cual se utilizó un modelo polinomial para ajustar mejor los datos

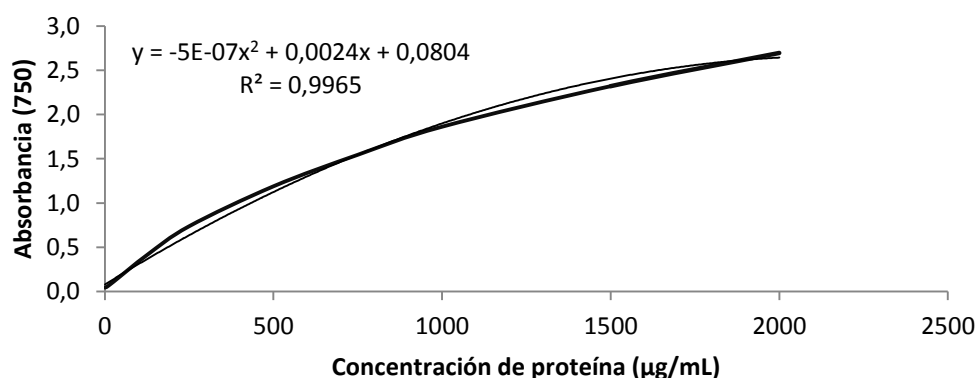


Figura 30. Curva de calibración para determinación de proteína soluble, utilizando Albúmina de suero bovino de Thermo Scientific® como estándar.

Obteniendo la ecuación polinomial $y = -5E-07x^2 + 0,0024x + 0,0804$, la cual se utilizó para extrapolar los datos de absorbancia obtenidos para cada uno de los procesos de extracción y determinar el contenido de proteína soluble presente en cada una de las muestras.

APÉNDICE B. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Para la linealización de la ecuación de segundo orden que predijo el proceso de extracción, se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones de frontera:

$$t=0, C_t=0, \text{ mientras } t=t, C_t= C_t$$

Obteniéndose la siguiente ecuación:

$$C_t = \frac{k \cdot t \cdot C_s^2}{1 + k \cdot t \cdot C_s} \rightarrow \frac{t}{C_t} = \frac{1}{k \cdot C_s^2} + \frac{t}{C_s}$$

De este modo se graficó $\frac{t}{C_t}$ vs t y se obtuvo como pendiente el valor de $\frac{1}{C_s}$ y en el intercepto el valor de $\frac{1}{k \cdot C_s^2}$.

APÉNDICE C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.

Tabla 27. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) para *Chlorella vulgaris* utilizando baño de ultrasonido (87.41%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.83	4.91	0.0079
<i>A-Surfactante (%)</i>	<i>0.53</i>	<i>6.22</i>	<i>0.0318</i>
<i>B-Potencia (Watts)</i>	<i>0.39</i>	<i>4.54</i>	<i>0.0591</i>
<i>C-Humedad (%)</i>	<i>0.25</i>	<i>2.92</i>	<i>0.1183</i>
<i>D-pH</i>	<i>1.97</i>	<i>23.22</i>	<i>0.0007</i>
<i>AB</i>	<i>0.21</i>	<i>2.49</i>	<i>0.1456</i>
<i>AC</i>	<i>0.032</i>	<i>0.37</i>	<i>0.5544</i>
<i>AD</i>	<i>0.026</i>	<i>0.31</i>	<i>0.5920</i>
<i>BC</i>	<i>0.050</i>	<i>0.59</i>	<i>0.4607</i>
<i>BD</i>	<i>0.39</i>	<i>4.54</i>	<i>0.0589</i>
<i>CD</i>	<i>1.04</i>	<i>12.22</i>	<i>0.0058</i>
<i>A²</i>	<i>0.25</i>	<i>2.89</i>	<i>0.1200</i>
<i>B²</i>	<i>0.45</i>	<i>5.27</i>	<i>0.0445</i>
<i>C²</i>	<i>0.55</i>	<i>6.47</i>	<i>0.0291</i>
<i>D²</i>	<i>0.021</i>	<i>0.25</i>	<i>0.6272</i>

Apéndice C-1

Tabla 28. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) de *Chlorella vulgaris* utilizando sonda de ultrasonido (92.05%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.52	6.95	0.0030
<i>A-Surfactante</i>	0.22	4.08	0.0741
<i>B-Potencia</i>	0.081	1.54	0.2466
<i>C-Humedad</i>	2.50	47.18	< 0.0001
<i>D-pH</i>	0.058	1.09	0.3242
<i>AB</i>	0.26	5.00	0.0523
<i>AC</i>	0.15	2.81	0.1282
<i>AD</i>	1.11	20.90	0.0013
<i>BC</i>	4.503E-003	0.085	0.7771
<i>BD</i>	0.37	6.93	0.0272
<i>CD</i>	0.13	2.55	0.1451
<i>A²</i>	0.74	13.93	0.0047
<i>B²</i>	0.23	4.38	0.0659
<i>C²</i>	0.069	1.31	0.2817
<i>D²</i>	0.45	8.56	0.0169
<i>BCD</i>	0.69	13.00	0.0057

Apéndice C-2

Tabla 29. ANOVA Rendimiento de extracción de proteína (%) de *Nannochloropsis gaditana*, utilizando sonda de ultrasonido (92.22%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	3.72	8.47	0.0009
<i>A-Surfactante</i>	0.17	5.38	0.0428
<i>B-Potencia (W)</i>	0.12	3.92	0.0758
<i>C-Humedad</i>	0.67	21.41	0.0009
<i>D-pH</i>	1.44	45.89	< 0.0001
<i>AB</i>	4.533E-003	0.14	0.7118
<i>AC</i>	0.035	1.12	0.3149
<i>AD</i>	0.19	6.00	0.0343
<i>BC</i>	0.016	0.50	0.4965
<i>BD</i>	0.042	1.33	0.2749
<i>CD</i>	1.481E-003	0.047	0.8324
<i>A²</i>	4.114E-005	1.311E-003	0.9718
<i>B²</i>	0.049	1.55	0.2419
<i>C²</i>	0.023	0.75	0.4081
<i>D²</i>	1.861E-004	5.932E-003	0.9401

Apéndice C-3

Tabla 30. ANOVA. Rendimiento de extracción (%) utilizando baño de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (96.87%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	7.92	22.14	< 0.0001
<i>A-Surfactante (%)</i>	<i>7.152E-003</i>	<i>0.28</i>	<i>0.6083</i>
<i>B-Potencia (W)</i>	<i>1.939E-003</i>	<i>0.076</i>	<i>0.7885</i>
<i>C-Humedad (%)</i>	<i>0.69</i>	<i>27.13</i>	<i>0.0004</i>
<i>D-pH</i>	<i>5.52</i>	<i>216.15</i>	<i>< 0.0001</i>
<i>AB</i>	<i>4.085E-003</i>	<i>0.16</i>	<i>0.6976</i>
<i>AC</i>	<i>0.066</i>	<i>2.60</i>	<i>0.1381</i>
<i>AD</i>	<i>3.677E-005</i>	<i>1.439E-003</i>	<i>0.9705</i>
<i>BC</i>	<i>0.27</i>	<i>10.49</i>	<i>0.0089</i>
<i>BD</i>	<i>0.19</i>	<i>7.60</i>	<i>0.0203</i>
<i>CD</i>	<i>4.349E-003</i>	<i>0.17</i>	<i>0.6886</i>
<i>A²</i>	<i>0.016</i>	<i>0.61</i>	<i>0.4517</i>
<i>B²</i>	<i>0.054</i>	<i>2.09</i>	<i>0.1784</i>
<i>C²</i>	<i>1.198E-003</i>	<i>0.047</i>	<i>0.8329</i>
<i>D²</i>	<i>0.080</i>	<i>3.14</i>	<i>0.1067</i>

Apéndice D. Capacidad de formación de espuma

Tabla 31. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando baño de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (73.70%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	4.75	2.80	0.0435
<i>A-Surfactante (%)</i>	<i>0.76</i>	<i>5.41</i>	<i>0.0383</i>
<i>B-Potencia (Watts)</i>	<i>0.30</i>	<i>2.15</i>	<i>0.1681</i>
<i>C-Humedad (%)</i>	<i>3.48</i>	<i>24.59</i>	<i>0.0003</i>
<i>D-pH</i>	<i>0.27</i>	<i>1.94</i>	<i>0.1889</i>
<i>AB</i>	<i>5.085E-003</i>	<i>0.036</i>	<i>0.8528</i>
<i>AC</i>	<i>0.26</i>	<i>1.82</i>	<i>0.2028</i>
<i>AD</i>	<i>0.42</i>	<i>2.99</i>	<i>0.1095</i>
<i>BC</i>	<i>0.100</i>	<i>0.71</i>	<i>0.4169</i>
<i>BD</i>	<i>0.98</i>	<i>6.90</i>	<i>0.0221</i>
<i>CD</i>	<i>0.42</i>	<i>2.96</i>	<i>0.1112</i>
<i>C²</i>	<i>0.96</i>	<i>6.82</i>	<i>0.0227</i>
<i>ABD</i>	<i>0.39</i>	<i>2.76</i>	<i>0.1223</i>

Apéndice D-1

Tabla 32. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando sonda de ultrasonido para *Chlorella vulgaris* (87.76%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	4.92	5.12	0.0067
<i>A-Surfactante (%)</i>	<i>0.017</i>	<i>0.25</i>	<i>0.6308</i>
<i>B-Potencia (W)</i>	<i>7.819E-003</i>	<i>0.11</i>	<i>0.7427</i>
<i>C-Humedad (%)</i>	<i>0.65</i>	<i>9.54</i>	<i>0.0115</i>
<i>D-pH</i>	<i>2.94</i>	<i>42.91</i>	<i>< 0.0001</i>
<i>AB</i>	<i>0.012</i>	<i>0.17</i>	<i>0.6906</i>
<i>AC</i>	<i>0.086</i>	<i>1.25</i>	<i>0.2895</i>
<i>AD</i>	<i>0.051</i>	<i>0.74</i>	<i>0.4090</i>
<i>BC</i>	<i>0.064</i>	<i>0.93</i>	<i>0.3565</i>
<i>BD</i>	<i>0.048</i>	<i>0.70</i>	<i>0.4219</i>
<i>CD</i>	<i>0.040</i>	<i>0.58</i>	<i>0.4623</i>
<i>A²</i>	<i>0.18</i>	<i>2.69</i>	<i>0.1321</i>
<i>B²</i>	<i>0.039</i>	<i>0.57</i>	<i>0.4659</i>
<i>C²</i>	<i>0.030</i>	<i>0.44</i>	<i>0.5231</i>
<i>D²</i>	<i>0.100</i>	<i>1.46</i>	<i>0.2555</i>

Apéndice D-2

Tabla 33. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando sonda de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (73.43%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.26	2.76	0.0455
<i>A-Surfactante</i>	<i>0.15</i>	<i>0.96</i>	<i>0.3463</i>
<i>B-Potencia (W)</i>	<i>1.37</i>	<i>8.63</i>	<i>0.0124</i>
<i>C-Humedad</i>	<i>0.33</i>	<i>2.10</i>	<i>0.1731</i>
<i>D-pH</i>	<i>0.12</i>	<i>0.78</i>	<i>0.3935</i>
<i>AB</i>	<i>0.13</i>	<i>0.80</i>	<i>0.3895</i>
<i>AC</i>	<i>0.22</i>	<i>1.37</i>	<i>0.2641</i>
<i>AD</i>	<i>0.73</i>	<i>4.61</i>	<i>0.0530</i>
<i>BC</i>	<i>0.43</i>	<i>2.71</i>	<i>0.1256</i>
<i>BD</i>	<i>0.10</i>	<i>0.64</i>	<i>0.4408</i>
<i>CD</i>	<i>0.095</i>	<i>0.60</i>	<i>0.4548</i>
<i>D²</i>	<i>1.65</i>	<i>10.39</i>	<i>0.0073</i>
<i>ABD</i>	<i>0.17</i>	<i>1.07</i>	<i>0.3204</i>

Apéndice D-3

Tabla 34. ANOVA. Capacidad de formación de espuma (%) utilizando baño de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (81.17%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.21	3.08	0.0399
<i>A-Surfactante</i>	0.11	0.92	0.3612
<i>B-Potencia (W)</i>	0.031	0.25	0.6253
<i>C-Humedad</i>	0.71	5.87	0.0359
<i>D-pH</i>	3.13	25.89	0.0005
<i>AB</i>	0.91	7.54	0.0206
<i>AC</i>	0.30	2.48	0.1462
<i>AD</i>	4.513E-004	3.731E-003	0.9525
<i>BC</i>	4.328E-003	0.036	0.8538
<i>BD</i>	3.342E-003	0.028	0.8713
<i>CD</i>	0.087	0.72	0.4173
<i>A²</i>	0.020	0.17	0.6904
<i>B²</i>	0.16	1.33	0.2751
<i>C²</i>	0.43	3.58	0.0877
<i>D²</i>	2.432E-003	0.020	0.8901

Apéndice E. Actividad emulsificante de las proteínas

Tabla 35. ANOVA capacidad para *Chlorella vulgaris* utilizando baño de ultrasonido (77.08%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	4.36	2.85	0.0454
<i>A-Surfactante (%)</i>	0.19	1.62	0.2290
<i>B-Potencia (Watts)</i>	1.44	12.22	0.0050
<i>C-Humedad (%)</i>	0.68	5.78	0.0350
<i>D-pH</i>	0.97	8.27	0.0151
<i>AB</i>	0.023	0.19	0.6689
<i>AC</i>	0.028	0.24	0.6335
<i>AD</i>	0.48	4.10	0.0678
<i>BC</i>	0.20	1.66	0.2242
<i>BD</i>	0.36	3.07	0.1076
<i>CD</i>	0.018	0.16	0.7013
<i>A²</i>	0.012	0.10	0.7544
<i>B²</i>	0.28	2.40	0.1499
<i>C²</i>	1.629E-003	0.014	0.9086

Apéndice E-1

Tabla 36. ANOVA. Actividad emulsificante (%) utilizando baño de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (89.63%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.67	3.56	0.0472
<i>A-Surfactante</i>	<i>1.348E-003</i>	<i>0.014</i>	<i>0.9080</i>
<i>B-Potencia (W)</i>	<i>0.031</i>	<i>0.33</i>	<i>0.5819</i>
<i>C-Humedad</i>	<i>0.61</i>	<i>6.45</i>	<i>0.0387</i>
<i>D-pH</i>	<i>1.11</i>	<i>11.87</i>	<i>0.0108</i>
<i>AB</i>	<i>2.265E-003</i>	<i>0.024</i>	<i>0.8809</i>
<i>AC</i>	<i>0.17</i>	<i>1.80</i>	<i>0.2213</i>
<i>AD</i>	<i>0.092</i>	<i>0.98</i>	<i>0.3561</i>
<i>BC</i>	<i>0.014</i>	<i>0.15</i>	<i>0.7074</i>
<i>BD</i>	<i>0.078</i>	<i>0.83</i>	<i>0.3922</i>
<i>CD</i>	<i>0.085</i>	<i>0.90</i>	<i>0.3734</i>
<i>A²</i>	<i>0.069</i>	<i>0.74</i>	<i>0.4185</i>
<i>B²</i>	<i>0.16</i>	<i>1.72</i>	<i>0.2310</i>
<i>C²</i>	<i>0.48</i>	<i>5.16</i>	<i>0.0573</i>
<i>ABC</i>	<i>0.21</i>	<i>2.19</i>	<i>0.1822</i>
<i>ABD</i>	<i>2.756E-003</i>	<i>0.029</i>	<i>0.8687</i>
<i>BCD</i>	<i>0.12</i>	<i>1.30</i>	<i>0.2923</i>
<i>A²B</i>	<i>0.23</i>	<i>2.41</i>	<i>0.1644</i>

APÉNDICE E-2

Tabla 37. ANOVA Actividad emulsificante (%) utilizando sonda de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (84.77%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	3.63	3.98	0.0169
<i>A-Surfactante</i>	<i>0.013</i>	<i>0.20</i>	<i>0.6659</i>
<i>B-Potencia (W)</i>	<i>0.20</i>	<i>3.01</i>	<i>0.1132</i>
<i>C-Humedad</i>	<i>0.026</i>	<i>0.41</i>	<i>0.5386</i>
<i>D-pH</i>	<i>0.20</i>	<i>3.11</i>	<i>0.1082</i>
<i>AB</i>	<i>0.24</i>	<i>3.64</i>	<i>0.0856</i>
<i>AC</i>	<i>1.696E-004</i>	<i>2.599E-003</i>	<i>0.9603</i>
<i>AD</i>	<i>1.788E-005</i>	<i>2.740E-004</i>	<i>0.9871</i>
<i>BC</i>	<i>0.47</i>	<i>7.17</i>	<i>0.0232</i>
<i>BD</i>	<i>2.020E-003</i>	<i>0.031</i>	<i>0.8639</i>
<i>CD</i>	<i>0.081</i>	<i>1.23</i>	<i>0.2925</i>
<i>A²</i>	<i>0.033</i>	<i>0.50</i>	<i>0.4960</i>
<i>B²</i>	<i>9.006E-004</i>	<i>0.014</i>	<i>0.9088</i>
<i>C²</i>	<i>0.14</i>	<i>2.10</i>	<i>0.1783</i>
<i>D²</i>	<i>0.52</i>	<i>7.99</i>	<i>0.0179</i>

APÉNDICE E-3

Tabla 38. ANOVA Actividad emulsificante (%) utilizando sonda de ultrasonido para *Nannochloropsis gaditana* (95.83%)

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>p-value</i>
Model	5.55	11.50	0.0008
<i>A-Surfactante (%)</i>	0.29	9.73	0.0142
<i>B-Potencia (W)</i>	0.073	2.41	0.1591
<i>C-Humedad (%)</i>	0.72	23.81	0.0012
<i>D-pH</i>	0.54	17.94	0.0029
<i>AB</i>	0.050	1.66	0.2333
<i>AC</i>	0.17	5.49	0.0472
<i>AD</i>	0.10	3.36	0.1040
<i>BC</i>	0.016	0.53	0.4891
<i>BD</i>	0.057	1.90	0.2049
<i>CD</i>	1.40	46.51	0.0001
<i>A²</i>	0.019	0.64	0.4457
<i>B²</i>	0.20	6.56	0.0336
<i>C²</i>	0.018	0.59	0.4658
<i>D²</i>	1.21	40.21	0.0002
<i>ABC</i>	0.43	14.35	0.0053
<i>ABD</i>	0.96	31.92	0.0005

BIBLIOGRAFÍA

- Ahle W. (2007). “Enzymes in Industry: Production and Applications”, Wiley, Weinheim.
- Agyare, K. K., Addo, K., & Xiong, Y. L. (2009). Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids*, 23, 72–81.
- Araújo, J.E., E. Oliveira, P. Kouvonen, G.L. Corthals, C. Lodeiro, H.M. Santos, and J.L. Capelo. (2014). “A Journey through PROTEOSONICS.” *Talanta* 121 (April): 71–80.
- Bagby, S., K. I. Tong, M. Ikura, V. D. Thomas, L. James, and S. Uli. 2001. Optimization of protein solubility and stability for protein nuclear magnetic resonance. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. 20–41.
- Bitog JP, Lee IB, Yoo JI, Hwang SB, Hong SW and Seo IH. 2009. Development of a large-sized photobioreactor for microalgae production. In *Proceedings of the 2009 CIGR International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture*, Brisbane, Queensland, Australia, September 13–16
- Borowitzka. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70, 313– 321.
- Bhairi S.M. (1997). A guide to the properties and uses of detergents in biological systems, Calbiochem-Novabiochem Corporation. Libro?
- Becker, E W. 2007. “Micro-Algae as a Source of Protein.” *Biotechnology Advances* 25 (2): 207–10.
- Becker E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Berliner MD. (1986). Proteins in *Chlorella vulgaris*. *Microbios*; 46:199–203.
- Bengoechea, C., Romero, A., Aguilar, J. M., Cordobés, F., & Guerrero, A. (2010). Temperature and pH as factors influencing droplet size distribution and linear viscoelasticity of O/W emulsions stabilised by soy and gluten proteins. *Food Hydrocolloids*, 24, 783–791.
- Bigelow Timothy A, Xu Jin, Stessman Dan J., Yao Linxing, Spalding Martin H., Wange Tong. (2013). Lysis of *Chlamydomonas reinhardtii* by high-intensity focused ultrasound as a function of exposure time. *Ultrasonics Sonochemistry*.
- Buono, S, a Luca Langellotti, a Martello, F Rinna, and V Fogliano. (2014). “Functional Ingredients from Microalgae.” *Food & Function* 5: 1669–1685.

- Butt, M.S and Batool, R. (2010). Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9 (4): 373 – 379
- Blumreisinger M, Meindl D, Loos E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*. 22:1603-4.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.
- Cohn, E. J., and J. T. Edsall. (1943). Proteins, Amino Acids, and Peptides. Hafner Publishing Company, New York.
- Collins, K. D. (1997). Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophys. J.* 72:65–76.
- Çelekli A, Yavuzatmaca M, Bozkurt H. (2009). Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology* 100(14):3625–9.
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. (2008). *Biotechnology advances*. Vol 25. Pages 294-306
- Chemat, F.; Zill-e-Huma; Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18, 813–835.
- Coustets, M, N Al-Karablieh, C Thomsen, and J Teissié. (2013). “Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae.” *The Journal of Membrane Biology* 246 (10) (October): 751–60.
- Chronakis, I.S., (2001). Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. *J. Agric. Food Chem.* 49, 888–898.
- Cuaresma, María, Marcel Janssen, Carlos Vílchez, and René H Wijffels. (2011). “Horizontal or Vertical Photobioreactors? How to Improve Microalgae Photosynthetic Efficiency.” *Bioresource Technology* 102 (8) (April): 5129–37.
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Ellen Slegers, P., Brentner, L. B., Roy, A., & Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 169–77.
- Davies, D.R. (1971). Single cell protein and the exploitation of mutant algae lacking cell walls. *Nature*, 233(5315), 143-144.
- Dickinson E. (1992). An introduction to Food Colloids, Oxford University Press, Oxford.

- Djordjevic, D., Kim, H.-J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Physical stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential x-3 fatty acid delivery systems (part A). *Journal of Food Science*, 69, C351–C355.
- Falkowski PG (1980) Light shade adaptation in microalgae. In: Falkowski PG, ed. *Primary Productivity in the Sea*. New York: Plenum Press, pp. 99–119.
- Doucha, J, and K Lívanský. (2008). “Influence of Processing Parameters on Disintegration of Chlorella Cells in Various Types of Homogenizers.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (3): 431–440.
- Faletra Peter. (2012). pH and Bacterial Growth. URL: [http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mole00/mole00150.htm]
- Falkowski PG, Raven JA. (1997). Aquatic photosynthesis. London: Blackwater Science; 375.
- FAO. (2008). A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, FAO Fish Aquacult, Rome, 20.
- Fennema, Owen R. (1996a). *Food Chemistry*. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc
- Feng, Hao, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, and Jochen Weiss. (2011). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer
- Foegeding, E. Allen, and Jack P. Davis. (2011). “Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach.” *Food Hydrocolloids* 25 (8) (December): 1853–1864.
- Gerde, Jose a., Tong Wang, Linxing Yao, Stephanie Jung, Lawrence a. Johnson, and Buddhi Lamsal. (2013). “Optimizing Protein Isolation from Defatted and Non-Defatted Nannochloropsis Microalgae Biomass.” *Algal Research* 2 (2) (February): 145–153.
- Grimi, N., a. Dubois, L. Marchal, S. Jubeau, N. I. Lebovka, and E. Vorobiev. (2014). “Selective Extraction from Microalgae Nannochloropsis Sp. Using Different Methods of Cell Disruption.” *Bioresource Technology* 153: 254–259.
- Godoy-hernández, Gregorio, and Felipe A Vázquez-flota. (2006). “Growth Measurements.” In *Plant Cell Culture Protocols*, 318:51–58.
- Gogate, P.R., Kabadi, A.M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochem. Eng. J.* 44 (1), 60–72.
- Goula AM. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil- Kinetic modeling. *J Food Eng* 117(4):492–498.
- Guil-Guerrero, J.L, R Navarro-Juárez, J.C López-Martínez, P Campra-Madrid, and MaM Reboloso-Fuentes. (2004). “Functional Properties of the Biomass of Three Microalgal Species.” *Journal of Food Engineering* 65 (4) (December): 511–517.

- Güzey, D., Gülseren, İ. Bruce, B., and Weiss, J. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 669–677.
- Hafiz Ahmed. (2004). Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization . CRC Press.
- Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13: 155
- Huang K.S., Bayley H., Liao M.J., London E., Khorana H.G. (1981). Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments, *J. Biol. Chem.* 256 pag 3802–3809.
- Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., and Herceg, I.L (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.
- Jambrak, Anet Režek, Vesna Lelas, Timothy J. Mason, Greta Krešić, and Marija Badanjak. (2009). “Physical Properties of Ultrasound Treated Soy Proteins.” *Journal of Food Engineering* 93 (4) (August): 386–393.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Barrow, C. J. (2012). Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134, 1343–1353
- Kitts, D. D., &Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309e1323
- Kinsella, J.E., (1976). Functional properties of proteins in foods. A survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7219.
- Komaki, H., Yamashita, M., Niwa, Y., Tanaka, Y., Kamiya, N., Ando, Y., Furuse, M. (1998). The effect of processing of *Chlorella vulgaris*: K-5 on in vitro and in vivo digestibility in rats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70, 363–366.
- Khan, Shakeel a., Mir Z. Hussain, S. Prasad, and U.C. Banerjee. (2009). “Prospects of Biodiesel Production from Microalgae in India.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (9) (December): 2361–2372.
- Krause, J. P., Dudek, S., and Schwenke, K. D. (2000). Changes in interfacial behaviour, emulsifying and foaming properties of faba bean legumin after modification with dimethylsuberimide. *Die Nahrung*, 44(6), 403–406.
- Lee RE (1980). *Phycology*. New York: Cambridge University Press

- Malissard, M. & Berger, E. G. (2001). Improving solubility of catalytic domain of human beta-1,4-galactosyltransferase 1 through rationally designed amino acid replacements. *Eur. J. Biochem.* 268, 4352–4358.
- Mao Xiaoying & Hua Yufei. (2012). Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences*.
- McClements, D. J. (2005). Food emulsions: Principles, practice and techniques (2nd ed). Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Meijer, E.A., Wijffels, R.H. (1998). Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnology Techniques*, 12(5), 353- 358.
- Morris, Humberto J, Angel Almarales, Olimpia Carrillo, and Rosa C Bermúdez. (2008). “Utilisation of *Chlorella vulgaris* Cell Biomass for the Production of Enzymatic Protein Hydrolysates.” *Bioresource Technology* 99 (16) (November): 7723–9.
- Morel, M.-H., Dehlon , P., Autran, J. C., Leygue J.P., Bar-L’Helgouac’h, C. (2000). Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal chemistry*, 77, pag 685-691.
- Mulligan, Catherine N. (2005). “Environmental Applications for Biosurfactants.” *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 133 (2) (January): 183–98.
- Naglak TJ, Hettwer DJ, Wang HJ (1990) Chemical permeabilisation of cells for intracellular product release. *Bioprocess Technol* 9:177–205
- Norton, J., & Norton, I. (2010). Designer colloids e towards healthy everyday foods? *Soft Matter*, 6,3735e3742
- Liao, S. Y., and M. E. Mangino (1987). Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates. *J. Food Sci.* 52:1033–1037.
- Liu YS,Wu JY, Ho K-p. (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J*; 27:331–5.
- Otzen, Daniel. (2011). “Protein-Surfactant Interactions: A Tale of Many States.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1814 (5) (May): 562–91.
- Oshodi, A.A and Ekperigin, M.M (1989). Functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour. *Food Chemistry*. 34:187 – 191.
- Payne MF, Ripplingale RJ (2000) Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 187:85– 96

- Padala, S. R., Williams, P. A., & Philips, G. O. (2009). Adsorption of gum Arabic, egg white protein, and their mixtures at the oil–water interface in limonene oil-in- water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4964–4973.
- Pulz O, Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6):635–48.
- QuW, Pan Z, MaH. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *J Food Eng* 99(1):16–23.
- Rakotondramasy-Rabesiaka L, Havet JL, Porte C, Fauduet H. (2007). Solid– liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.—Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Sep Purif Technol* 54(2):253–261.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* A. Richmond & Q. Hu, eds., Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Rausch, T., (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78, 237–251.
- Richardson K, Beardall J, Raven JA (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* **93**: 157–191.
- Safi, Carl, Christine Frances, Alina Violeta, Céline Laroche, Cécile Pouzet, Carlos Vaca-garcia, and Pierre-yves Pontalier. (2015). “Understanding the Effect of Cell Disruption Methods on the Diffusion of *Chlorella vulgaris* Proteins and Pigments in the Aqueous Phase” 8: 61–68.
- Safi, Carl, Michaël Charton, Olivier Pignolet, Françoise Silvestre, Carlos Vaca-Garcia, and Pierre Yves Pontalier. (2013). “Influence of Microalgae Cell Wall Characteristics on Protein Extractability and Determination of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors.” *Journal of Applied Phycology* 25: 523–529.
- Safi C., Charton M., Pignolet O., Silvestre F., Vaca-Garcia C., Pontalier P.-Y. (2012). Influence of microalgae cellwall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors, *J. Appl. Phycol.* 1–7.
- Seddon, Annela M, Paul Curnow, and Paula J Booth. (2004). “Membrane Proteins, Lipids and Detergents: Not Just a Soap Opera.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1666 (1-2) (November 3): 105–17.
- Schuttle H, Kula MR (1990) Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol Appl Biochem* 12:559–620
- Stickley, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A. & Rose, G. D. (1992). Hydrogen bonding in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 226, 1143–1159.

- Stoilov IL, Georgiev TD, Taskov MV, Koleva ID, (1995). Oral preparation for patients with chronic renal insufficiency and other protein metabolic diseases. WO patent 95/2952.
- Schwenzfeier, Anja, Peter Alexander Wierenga, and Harry Gruppen. (2011). "Isolation and Characterization of Soluble Protein from the Green Microalgae *Tetraselmis* Sp." *Bioresource Technology* 102 (19) (October): 9121–7.
- Schwenzfeier, Anja, Frederik Lech, Peter a. Wierenga, Michel H.M. Eppink, and Harry Gruppen. (2013). "Foam Properties of Algae Soluble Protein Isolate: Effect of pH and Ionic Strength." *Food Hydrocolloids* 33 (1) (August): 111–117.
- Sukenik A, Carmeli Y (1990) Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *J. Phycol.* **26**: 463–469.
- Srivastava, Yashi. (2013). *Advances in Food Science and Nutrition*.
- Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. (2006). "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2) (February): 87–96.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.* 101, page 87–96.
- Suslick, Kenneth S. (1989). "The Chemical Effects of Ultrasound." *Scientific American*.
- Scholz Matthew J., Weiss Taylor L., Jinkerson Robert E., Jing Jia, Roth Robyn, Goodenough Ursula, Posewitz Matthew, Gerkene Henri G. (2014). Ultrastructure and Composition of the *Nannochloropsis gaditana* Cell Wall. *American Society for Microbiology*.
- Trevino, S. R., J. M. Scholtz, and C. N. Pace. (2007). Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *J. Mol. Biol.* 366:449–460.
- Scholz, M. J., T. L. Weiss, R. E. Jinkerson, J. Jing, R. Roth, U. Goodenough, M. C. Posewitz, and H. G. Gerken. (2014). "Ultrastructure and Composition of the *Nannochloropsis gaditana* Cell Wall." *Eukaryotic Cell* 13 (11): 1450–1464.
- Shen, Lianqing, Xiangyang Wang, Zhongying Wang, Yuanfeng Wu, and Jianshe Chen. (2008). "Studies on Tea Protein Extraction Using Alkaline and Enzyme Methods." *Food Chemistry* 107 (2) (March): 929–938.
- Stenesh J. (1998). *Biochemistry*. Springer Science-Business Media New York.
- Tchorbanov, B., Bozhkova, M., (1988). Enzymatic hydrolysis of cell proteins in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10 (4), 233–238.

- Ugwu C.U, Aoyagi H., Uchiyama H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae.. *Bioresource Technology*. Vol 99, Pages 4021-4028
- Ursu, Alina-Violeta, Alain Marcati, Thierry Sayd, Véronique Sante-Lhoutellier, Gholamreza Djelveh, and Philippe Michaud. (2014). “Extraction, Fractionation and Functional Properties of Proteins from the Microalgae *Chlorella vulgaris*.” *Bioresource Technology* 157 (April): 134–9.
- Uruakpa, F. O., & Arntfield, S. D. (2005). Emulsifying characteristics of commercial canola protein-hydrocolloid systems. *Food Research International*, 38, 659–672.
- Vaultot D, Chisholm SW (1987) A simple model of the growth of phytoplankton populations in light/ dark cycles. *J. Plankton Res.*9: 345–366.
- Vanthoor-Koopmans, Marieke, Rene H Wijffels, Maria J Barbosa, and Michel H M Eppink. (2013). “Biorefinery of Microalgae for Food and Fuel.” *Bioresource Technology* 135 (May): 142–9.
- Wang, Xiaoqin, and Xuewu Zhang. (2012). “Optimal Extraction and Hydrolysis of *Chlorella Pyrenoidosa* Proteins.” *Bioresource Technology* 126 (December): 307–13.
- Williams, Peter J le B, and Lieve M L Laurens. (2010). “Microalgae as Biodiesel & Biomass Feedstocks: Review & Analysis of the Biochemistry, Energetics & Economics.” *Energy & Environmental Science* 3 (5): 554–590.
- WHO. (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, World Health Organisation, Geneva, 284.
- Yamamoto Maki, Fujishita Mariko, Hirata Aiko, Kawano Shigeyuki. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J Plant Res*, 117:257–264
- Yamamoto M, I. Kurihara, S. Kawano. (2005). Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Planta* 221, pag 766–775.
- Yvonne N, K. Tomas (2000). Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Arch. Hydrobiol.* 100, pag 95–105
- Zayas, J.F. (1997). “Solubility of Proteins.” In *Functionality of Proteins in Food*, 1332–1334. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Zeng X, Danquah MK, Chen XD, Lu Y. (2011). Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renew Sust Energy Rev* 15:3252–60.