

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA DE ESPIRULINA COMO INGREDIENTE PARA
APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

POR

CARLOS EDUARDO SADA BORREGO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

NOVIEMBRE, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA DE ESPIRULINA COMO INGREDIENTE PARA
APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

POR

CARLOS EDUARDO SADA BORREGO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

NOVIEMBRE 2022

EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA DE ESPIRULINA COMO INGREDIENTE PARA
APLICACIÓN EN ALIMENTOS

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN:
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

COMITÉ PARTICULAR

Dr. Celestino García Gómez

Director de Tesis

Dr. Claudio Guajardo Barbosa

Co- Director de Tesis

Dra. Julia Mariana Márquez Reyes

Asesor 1

Dr. Julio César Beltrán Rocha

Asesor 2

ÍNDICE

Resumen/Abstract.....	8
1. Introducción.....	10
2. Revisión de literatura.....	13
2.1. Características de la espirulina.....	13
2.2. Propiedades de la espirulina.....	16
2.3. Aplicaciones en alimentos de la espirulina.....	19
2.4. Contenido y perfil de proteínas.....	20
2.5. Ficocianina.....	22
2.6. Aplicaciones de la ficocianina en alimentos.....	24
2.7. Aplicaciones en otros ramos.....	24
2.8. Tendencias.....	25
3. Justificación.....	26
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
6. Materiales y métodos.....	28
6.1. Crecimiento de espirulina.....	28
6.2. Extracción de ficocianina.....	30
6.3. Precipitación de ficocianina.....	31
6.4. Aplicación en bebida.....	33
7. Resultados.....	36
7.1. Crecimiento de espirulina.....	36
7.2. Extracción de ficocianina.....	38
7.3. Precipitación de ficocianina.....	51
7.4. Optimización de la precipitación de ficocianina.....	54
7.5. Aplicación en bebida.....	60

8. Discusión.....	62
9. Conclusiones.....	71
10. Bibliografía.....	73

Lista de cuadros

1. Contenido nutrimental de la espirulina.....	16
2. Aminoácidos presentes en la espirulina.....	21
3. Tratamientos en la etapa de crecimiento de espirulina.....	28
4. Composición del medio Zarrouk.....	29
5. Condiciones experimentales para la extracción de ficocianina.....	31
6. Condiciones para la extracción de ficocianina a partir de espirulina.....	32
7. Condiciones para la precipitación de ficocianina a partir de espirulina.....	33
8. Formulaciones para aplicación de ficocianina.....	34
9. Tabla de ANOVA.....	39
10. Parámetros del modelo.....	57
11. ANOVA del modelo lineal obtenido.....	57
12. Resultados de proteína y grasa en bebidas.....	62
13. Resultados de color.....	62

Lista de figuras

1. Pasos en el procesamiento de espirulina.....	15
2. Conformación estructural de la C-ficocianina.....	23
3. Formato de evaluación en el análisis sensorial.....	35
4. Crecimiento de biomasa.....	36
5. Concentración de nitritos.....	37
6. Concentración de nitratos.....	38
7. Condiciones donde se maximiza la extracción de ficocianina.....	39
8. Gráfica de datos predichos vs reales.....	40
9. Gráfica de residuales.....	41
10. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y agitación.....	42
11. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y cantidad de solvente.....	43
12. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y tiempo.....	44
13. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y pH.....	45
14. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y cantidad de solvente.....	46
15. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y tiempo.....	47
16. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y pH.....	48
17. Gráfica de contorno con la interacción de muestra:solvente y tiempo.....	49
18. Gráfica de contorno con la interacción de muestra:solvente y pH.....	50
19. Gráfica de contorno con la interacción de tiempo y pH.....	51
20. Muestras con sulfato de amonio.....	52
21. Muestras con fosfato de amonio.....	53
22. Muestras con citrato de sodio.....	53

23. Muestras secas obtenidas con citrato de sodio.....	54
24. Condiciones donde se maximiza la concentración de C-ficocianina.....	56
25. Condiciones donde se maximiza la concentración de ficocianinas totales.....	56
26. Gráfica de datos predichos vs reales.....	58
27. Gráfica de residuales.....	59
28. Gráficas de contorno con la interacción de temperatura y tiempo.....	60
29. Calificación con consumidores.....	61
30. Bebidas evaluadas.....	67
31. Color de las bebidas evaluadas.....	69

RESUMEN

El uso de espirulina para la formulación de alimentos funcionales ha aumentado en los últimos años por sus propiedades y beneficios a la salud. Además, es de interés la utilización de la ficocianina de espirulina por sus efectos propiedades funcionales en el cuerpo humano, con beneficios a la salud que van desde acción antiinflamatoria hasta su poder como un agente anticancerígeno. Sin embargo, uno de los problemas del uso de la ficocianina en alimentos es optimizar su extracción a una máxima concentración y con una buena estabilidad, ya que las metodologías existentes consumen mucho tiempo y no proporcionan una materia prima con una buena concentración, haciendo que el proceso de extracción sea costoso y laborioso. En este trabajo, inicialmente se trabajó con la espirulina como ingrediente funcional, suplementando el medio con fuentes de nitrógeno de origen vegetal con la intención de aumentar el contenido de proteína de la cianobacteria. Posteriormente, se estandarizó un método de extracción y precipitación de la ficocianina con distintas sales por su sencillez y tiempo relativamente rápido de proceso, teniendo como objetivo la optimización de los parámetros del proceso de extracción (temperatura, pH, agitación, cantidad de solvente y tiempo) y de precipitación (temperatura de almacenamiento, concentración de la sal precipitante y tiempo) para maximizar la concentración de ficocianina, utilizando el método de superficie de respuesta. El resultado de suplementar el medio de crecimiento de espirulina con una fuente vegetal de nitrógeno (apio fermentado) no ayudó a incrementar el contenido de la misma, comparando con un control suplementado con el medio Zarrouk. Por otro lado, el método de extracción y precipitación de ficocianina propuesto logró obtener resultados de concentraciones de 0.378 mg/mL y 0.47 mg/g de ficocianinas respectivamente.

ABSTRACT

The use of spirulina in the formulation of functional foods has risen in recent years due to its beneficial properties in human health. Moreover, the use of phycocyanin from spirulina is of interest because of its functional properties in the human body, with health benefits from anti-inflammatory activity to anticarcinogenic activities power. Nonetheless, one of the problems of its application in food is the optimization of extraction by maximizing concentration and stability, since current methodologies are time-consuming and do not yield enough concentration, making the process costly and demanding. In this work, initially a base of spirulina was supplemented with a source of vegetable nitrogen in order to increase its protein content. Later, an extraction and precipitation method based in salts was proposed, due to its simplicity and relatively short process time, with the goal of optimizing process parameters in extraction (temperature, pH, agitation, solvent ratio and time) and in precipitation (storage temperature, salt concentration and time) in order to maximize precipitated phycocyanin concentration, using response surface methodology. The result of supplementing growth medium with a vegetable source of nitrogen (rotten celery) did not help increase the protein content of spirulina, comparing with a Zarrouk medium control. On the other hand, the extraction and precipitation method for phycocyanin obtained results of concentrations of 0.378 mg/mL and 0.47 mg/g of phycocyanins, respectively.

1. INTRODUCCIÓN

La espirulina es una cianobacteria, también conocida como *Arthrospira*, popularmente reconocida en el mundo de los alimentos saludables como un suplemento alto en proteína a la alimentación humana. Se trata de un organismo fotosintético que naturalmente crece en condiciones de luz solar intensa, altas temperaturas y medio altamente alcalino (Wan, 2016). Se caracteriza por un alto contenido de proteína, conteniendo todos los aminoácidos esenciales, aunque cantidades reducidas de metionina, cisteína y lisina, siendo por ello inferior a proteínas animales como el huevo y la leche, pero muy superior a la mayoría de las proteínas vegetales. Además, contiene una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (1.5-2%), vitaminas B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂, C, D y E, y minerales como potasio, calcio, cromo, hierro, cobre, magnesio, manganeso, selenio y zinc (Habib, 2008).

Actualmente, el uso de espirulina como fuente alternativa de proteína goza de alta popularidad, debido en parte al aumento de personas en el mundo que siguen dietas libres o reducidas en consumo de proteína de origen animal. Por ejemplo, a nivel global se estima que el 22% de los consumidores intentan reducir su consumo de carne, mientras que en Latinoamérica este porcentaje es del 21% (IPSOS, 2018). En México, el porcentaje de personas que siguen dietas vegetarianas, flexitarianas y veganas es de 19%, 15% y 9%, respectivamente (Nielsen, 2016). Adicionalmente, el mercado de alimentos funcionales a nivel mundial tiene un valor de 161.49 millones USD, con un crecimiento anual proyectado del 7.9% (Grand View Research, 2019).

Se ha encontrado que la producción de biomasa y proteína en la espirulina está condicionada por el contenido de nitrógeno en el medio y la fuente de la que proviene, siendo las fuentes más efectivas el nitrato de sodio, el nitrato de amonio y la urea (Vieira, 2001). Sin embargo, también se ha estudiado la suplementación del medio con extractos/subproductos vegetales con contenido

de compuestos nitrogenados, logrando una mayor producción de proteína. En el caso específico de la vinaza de remolacha, se logró una mayor producción de biomasa y proteína en espirulina al utilizarla como suplemento al medio de crecimiento (Coca, 2015). El jugo de apio es un material de fácil acceso y con un contenido importante de nitrógeno, en forma de nitrato (97 ppm), amonio (84 ppm), además de contener minerales como Calcio, Potasio, Magnesio, Hierro, Zinc, Cobre, Manganeso y Sodio (Domagala, 2012). Por lo tanto, se selecciona como fuente de nitrógeno para el crecimiento de la espirulina, usándolo como suplemento al medio Zarrouk. Por otro lado, el uso de frutas y vegetales en descomposición como fuentes económicas de carbono y nitrógeno se ha explorado como alternativa de medio para el crecimiento de espirulina, tanto por sus beneficios económicos como medioambientales, utilizando un subproducto que es desechado comúnmente en centros urbanos alrededor del mundo. Como dato adicional, podemos citar que la pérdida de alimentos desde post-cosecha hasta la distribución tiene una media a nivel mundial de 13.8% (FAO, 2016), y en el caso específico de las frutas y verduras, este porcentaje asciende a 22% (FAO, 2019).

Por otro lado, una de las desventajas del uso de *Spirulina* para la formulación de alimentos es la formación de sabores indeseables en el mismo, que pueden deberse a metabolitos de las cianobacterias, como la geosmina y el 2-metilisoborneol, que crean aromas “terrosos” (Agustini, 2019), así como a la presencia de ácidos grasos eicosapentaenoico y docosaheptaenoico, que imparten cierto sabor a “pescado” (Hamdan, 2020). Por lo anterior, es de interés el uso de ficocianina extraída de la espirulina para evitar las notas desagradables anteriormente descritas.

La ficocianina forma parte de la familia de las ficobiliproteínas, que son pigmentos presentes en cianobacterias y que forman complejos que absorben la luz. Las ficobiliproteínas están conformadas por un heterodímero de unidades α y β , cada uno de los cuales se forma por uno, dos

o tres cromóforos llamados bilinas. Dentro de las ficobiliproteínas se encuentran los tipos ficoeritrinas, ficocianinas, alloficocianinas y ficoertrocianinas. En la espirulina, el tipo de mayor importancia es la ficocianina, específicamente del tipo C-ficocianina, la cual se compone de dos subunidades α y β con una conformación hexamérica. (Morancais, 2018).

La ficocianina extraída de la espirulina puede ser utilizada en la formulación de alimentos debido a sus propiedades funcionales entre las que se encuentran antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos, actuando directamente en la reducción del estrés oxidativo, la apoptosis y los procesos inflamatorios en modelos *in vivo* (Mysliwa, 2017).

Existen diversos métodos de extracción para la ficocianina a partir de espirulina u otras cianobacterias, pero en su mayoría tienen desventajas de nivel bajo de pureza y baja estabilidad en el almacenamiento (Pez, 2021). Por lo anterior, es interesante evaluar un método sencillo y económico de extracción, evaluando la recuperación del pigmento y su estabilidad en almacenamiento para su uso como ingrediente alimentario.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características de la espirulina

La producción de espirulina para consumo humano tiene una historia de varios siglos. Durante el siglo XVI, los conquistadores españoles que llegaron a México observaron que los aztecas recolectaban espirulina del lago de Texcoco con el propósito de elaborar una especie de “barra” que servía de fuente de alimentación a las personas que vivían cerca del cuerpo de agua (Cifferri, 1985). Así como este ejemplo, se han encontrado algunos otros a lo largo del globo donde las personas han utilizado este material como una fuente de alimento de buena calidad. Actualmente, la producción de espirulina se puede llevar a cabo por uno de dos métodos: fotobiorreactores cerrados ó estanques abiertos.

En la producción en estanque abierto (ya sea natural o artificial), hay algunas ventajas como la facilidad de construcción y operación, reduciendo de esta manera los costos a expensas de la tasa de producción. Por otro lado, hay una serie de desventajas asociadas de manera natural con este tipo de producción en estanques abiertos, como lo son las grandes áreas necesarias para llevarla a cabo, las pérdidas por evaporación, la utilización limitada de la luz por parte de la cianobacteria y la baja tasa de producción comparada con la de otro tipo de sistemas, debido a una pobre penetración del aire. Adicionalmente, la tasa de producción está sujeta a las variaciones naturales en las condiciones de temperatura y clima, así como los niveles variables de nutrientes en el cuerpo de agua donde se lleve a cabo el desarrollo de la espirulina.

Un fotobiorreactor actúa como un ambiente cerrado donde las condiciones necesarias para la producción de espirulina pueden ser controladas. Debido a su naturaleza de sistema cerrado, algunas de las desventajas asociadas con los sistemas abiertos pueden evitarse, como es el caso de

la exposición a gases y contaminantes externos. A pesar de ser usualmente más caros que los estanques abiertos, los fotobiorreactores pueden tener ventajas sobre este tipo de sistemas, incluyendo la reducción de fuentes de contaminación externas; un mejor control sobre las condiciones de producción como pH, temperatura, luz y concentración de CO₂; prevención de pérdidas por evaporación; tasas de producción más altas; optimización de las condiciones de luz por medio de una mejor distribución, minimizando áreas de poca iluminación.

Adicionalmente, hay un tipo de sistema híbrido que combina las ventajas del fotobiorreactor y de los sistemas de estanque abierto. En este tipo de arreglo, puede haber una estructura de tanque abierto físicamente cubierta en la superficie para evitar fuentes de contaminación externa y reducir pérdidas por evaporación y de CO₂ (Soni, 2017).

La producción de espirulina alrededor del mundo puede tomar dos diferentes formas. Una de producción industrializada, enfocada en producir materia prima para un mercado interesado en alimentos naturales y saludables y para ser tratada posteriormente de manera que puedan extraerse compuestos bioquímicos de alto valor. La otra forma, la más practicada en economías en desarrollo, es donde se produce espirulina como una fuente de proteína al alcance de gran parte de la población, producida en condiciones no ideales y haciendo uso de desechos vegetales y animales en el proceso (FAO, 2008).

El procesamiento de la espirulina después de su cosecha involucra los siguientes pasos: filtración y limpieza, pre-concentración, concentración, neutralización, desintegración, deshidratación, empacado y almacenamiento (FAO, 2008).



Figura 1. Pasos en el procesamiento de la espirulina.

La espirulina está compuesta de aproximadamente 55-70% proteína, 15-25% polisacáridos, 5-6% lípidos, 6-13% ácidos nucleicos y 2.2-4.8% de contenido mineral. Los lípidos y proteínas contenidos en la espirulina son de especial interés. Alrededor de 1.5-2.0% consisten en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico, pero también ácidos estearidónico, eicosapentanoico, docosaheptanoico y araquidónico (FAO, 2008). Adicionalmente, comparado con otras fuentes de proteína, provee una cantidad muy pequeña de colesterol (aproximadamente 32.5 mg/100 g). De su contenido de proteína, la C-ficocianina se ha estudiado ampliamente por sus efectos anticancerígenos, entre otros.

Cuadro 1. Contenido nutrimental de la espirulina.

	FOI, Francia	SAC, Tailandia	IPGSR, Malasia	BAU, Bangladesh
Proteína cruda (%)	65	55-70	61	60
Carbohidratos solubles (%)	19	--	14	--
Grasa cruda (%)	4	5-7	6	7
Fibra cruda (%)	3	5-7	--	--
Cenizas (%)	3	3-6	9	11
Humedad (%)	--	4-6	6	9
Nitrógeno libre (%)	--	15-20	4	17

FOI: French Oil Institute; SAC: Siam Algae Co. Ltd; IPGSR: Institute of Post-graduate Studies and Research Laboratory, University of Malaya; BAU: Bangladesh Agricultural University.

(FAO, 2008)

La espirulina contiene también vitaminas B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ y B₁₂, y minerales como calcio, cromo, cobre, hierro, manganeso, magnesio, fósforo, selenio, sodio y zinc (Wan, 2016).

2.2 Propiedades de la espirulina

También se ha encontrado que la espirulina tiene una serie de propiedades beneficiosas para la salud humana, así como utilizables en la producción de alimentos:

- Actividad anticancerígena:

La actividad anticancerígena de la espirulina se ha estudiado ampliamente y en algunos casos se ha llegado a ligar a la presencia de compuestos tetrapirrólicos relacionados con la molécula de bilirrubina. En algunos experimentos *in vitro* e *in vivo*, se ha comprobado una reducción significativa en las especies reactivas al oxígeno a nivel mitocondrial, en el estado redox del glutatión y en una menor proliferación de líneas celulares pancreáticas humanas, dependientes de la dosis de espirulina utilizada (Koníčková, 2014). En otros casos, se han encontrado efectos en la disminución de la proliferación de células humanas de carcinoma de pulmón A549 (Czerwonka, 2018).

- Propiedades antimicrobianas

El extracto acuoso de espirulina ha mostrado efectos antimicrobianos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*, abriendo el camino para estudiar la posibilidad de desarrollar potentes antimicrobianos extraídos a partir de *Spirulina platensis* y para ser aplicados en la industria de alimentos (El-Sheekh, 2014). En otros estudios se ha demostrado que los extractos de espirulina obtenidos con solventes como metanol y hexano pueden tener un efecto significativo contra patógenos (bacterias y hongos), como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *A. flavus*, *A. niger* y *C. albicans* (Usharani, 2015).

- Protección contra envenenamiento por metales pesados:

En algunos estudios se ha encontrado que la suplementación con espirulina puede disminuir los efectos del envenenamiento por metales pesados como cadmio, mercurio, plomo y arsénico. La mayoría de estos estudios muestran una toxicidad disminuida por metales pesados, mientras que

otros demuestran un efecto protector, atribuido principalmente a la capacidad antioxidante de la espirulina (Bhattacharya, 2020).

- Actividad antioxidante:

El efecto antioxidante de la espirulina se ha estudiado de manera importante y se atribuye principalmente a su contenido de proteínas, especialmente la C-ficocianina. Adicionalmente, algunos de los mecanismos antioxidantes que desencadena la espirulina han sido identificados como la activación de enzimas antioxidantes, la inhibición de la peroxidación de lípidos y de daño al ADN, la neutralización de radicales libres y el incremento en la actividad de superóxido dismutasa y catalasa (Wu, 2016).

- Efecto inmunoestimulante:

La Academia China de Ciencias Médicas ha encontrado que la alimentación de ratones con espirulina mostraba un incremento en la tasa y el tiempo de supervivencia después de una exposición a una dosis letal de radiación. La actividad de superóxido dismutasa mostró también un incremento (FAO, 2008).

- Suplemento alimenticio:

El uso de la espirulina como un suplemento alimenticio en la nutrición humana ha demostrado tener varios beneficios. En primer lugar, la espirulina tiene un contenido alto de ácidos grasos poliinsaturados, conteniendo alrededor de 2 por ciento de ácido γ -linolénico, por ejemplo, haciéndolo una de las pocas fuentes de este ácido graso en la alimentación humana, siendo las otras fuentes la leche humana, y extractos de rosa, moras y borrajo, entre otras. La suplementación de dietas con ácido linolénico ha demostrado ayudar en algunas enfermedades como artritis, afecciones del corazón y obesidad (FAO, 2008).

2.3 Aplicaciones en alimentos

La espirulina se puede utilizar en una gran variedad de alimentos, sacando provecho de sus características antioxidantes y de su capacidad para mejorar el perfil nutrimental de los alimentos donde se aplica. Algunos de los productos donde se ha utilizado son los siguientes:

- **Bebidas:** en preparados base de leche y otros como té y bebidas funcionales, usada en forma de polvo o como extracto. En este tipo de productos, el perfil nutrimental de la bebida (ej. contenido de vitamina C) se puede complementar con la adición de proteína de espirulina, haciendo un producto más completo y con mayores propiedades funcionales.
- **Productos de panificación:** De manera similar a la categoría anterior, la espirulina se puede agregar a pan o productos similares, pasta o galletas de manera que se mejore el perfil nutricional de los mismos, agregando una fuente de proteínas, algunas vitaminas y minerales, e incrementando las propiedades antioxidantes y funcionales del producto. Además, se ha encontrado que la adición de espirulina al pan puede estabilizar sus propiedades de retención de agua en el tiempo, de esta manera extendiendo su vida de anaquel. El rango de uso de espirulina en este tipo de productos se encuentra entre 0.1 y 1.5%, evitando niveles de uso mayores que pueden hacer que la apariencia y el color del producto tenga características que puedan resultar negativas para el consumidor (Hosseini, 2013).
- **Postres y dulces:** la adición de espirulina a este tipo de productos se ha estudiado como un vehículo de ingredientes altamente funcionales y nutritivos, en una categoría de alimentos de alto consumo y muy aceptada. Como se discutió anteriormente, el agregar espirulina en este tipo de alimentos añade proteína y

propiedades antioxidantes y nutracéuticas a un alimento que normalmente no tiene estas características. Adicionalmente, en algunos dulces, la adición de espirulina o sus extractos puede ser utilizada como colorante, debido a su característico tono verde/azul, que es difícil de replicar con otros colorantes de origen natural (Hosseini, 2013).

- Productos lácteos: se ha encontrado que la adición de espirulina a productos a base de leche fermentada puede mejorar el desempeño de los cultivos iniciadores teniendo un efecto protector sobre los mismos, mejorando su tasa de crecimiento y la tasa de supervivencia durante el proceso y el almacenamiento y vida de anaquel. Además, el contenido de ácidos grasos en la cianobacteria complementa de manera interesante el perfil nutrimental de la leche y sus productos (Hosseini, 2013).

2.4 Contenido y perfil de proteínas de la espirulina

La espirulina tiene uno de los mayores contenidos de proteína dentro de las fuentes de alimento de origen microbiano (460-630 g/kg en masa seca), haciendo que sea comparable a otras fuentes de proteína como la soya (400 g/kg en masa seca) y la carne (710-760 g/kg en masa seca). Además, el perfil de aminoácidos de las proteínas de la espirulina la hacen superior a otras fuentes de proteína vegetal debido a su contenido balanceado de aminoácidos esenciales, especialmente valina, treonina e isoleucina (FAO, 2008). De acuerdo con los estándares fijados por la FAO sobre los requerimientos de aminoácidos esenciales, la proteína de espirulina puede ser considerada como una proteína completa y de alta calidad, comparable a aquellas de origen animal. Por otro lado, se ha encontrado que el nivel de proteína en la biomasa de espirulina puede ser altamente afectado por las condiciones de crecimiento. Se ha comprobado que la temperatura, el pH, la luz,

los nutrientes y los micronutrientes pueden influenciar la producción de biomasa y en ocasiones también la producción de proteína. En algunos estudios, se ha ligado la producción de proteína a la suplementación del medio con fuentes de nitrógeno y micronutrientes de fuentes vegetales, como las vinasas (Coca, 2015). En algunos de estos casos, la correcta suplementación puede incrementar la producción de biomasa y de proteína en el producto final.

Muchos de los beneficios a la salud ligados a la espirulina se han relacionado con su contenido de proteína, particularmente el contenido de C-ficocianina. Por lo tanto, la extracción de ficobiliproteínas de la espirulina, incluyendo la C-ficocianina, se ha estudiado abundantemente en los últimos años con la finalidad de optimizar su extracción y hacerla económicamente viable, para promover su uso como ingrediente en alimentos y otros (Lupatini, 2016).

Cuadro 2. Aminoácidos presentes en la espirulina.

Aminoácido (g/100g)	SAC, Tailandia	IPGSR, Malasia
Lisina	2.60 - 3.30	4.63 ± 0.07
Fenilalanina	2.60 - 3.30	4.10 ± 0.08
Tirosina	2.60 - 3.30	3.42 ± 0.10
Leucina	5.90 - 6.50	8.37 ± 0.13
Metionina	1.30 - 2.00	2.75 ± 0.05
Ácido glutámico	7.30 - 9.50	7.04 ± 0.14
Ácido aspártico	5.20 - 6.00	5.37 ± 0.11
Triptófano	1.00 - 1.60	1.98 ± 0.05
Cistina	0.50 - 0.70	0.60 ± 0.03
Serina		3.84 ± 0.06
Arginina		4.94 ± 0.07

Histidina	2.81 ± 0.06
Treonina	3.35 ± 0.06
Prolina	4.11 ± 0.05
Valina	4.02 ± 0.06
Isoleucina	3.85 ± 0.10
Alanina	10.81 ± 0.14
Glicina	6.66 ± 0.10

Fuente: FAO, 2008

2.5 Ficocianina

Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas presentes en la espirulina, responsables de recolectar la luz con el propósito de generar energía. Estas proteínas son compuestos hidrosolubles conformados por cromóforos (ficobilinas), unidos a una sección de la proteína por medio de enlaces covalentes. Se dividen en cuatro categorías: ficoeritrina, ficocianina, ficoeritrocianina y alloficocianina. Cada una de ellas difiere de las otras en su estructura y en sus características relacionadas con la absorción de luz.

La ficobiliproteína más común presente en la espirulina es la ficocianina, la cual está conformada hexaméricamente por subunidades α y β , $(\alpha\beta)_6$, a pH 5.0-6.0 y una conformación trimérica a un pH de 7.0 (Pagels, 2019).

La C-ficocianina (de *M. laminosus*) ha sido secuenciada totalmente y se ha encontrado que la subunidad alfa se compone de 162 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 18000, mientras que la subunidad beta está conformada por 172 residuos con un peso molecular de 19400 (Frank, 1978).

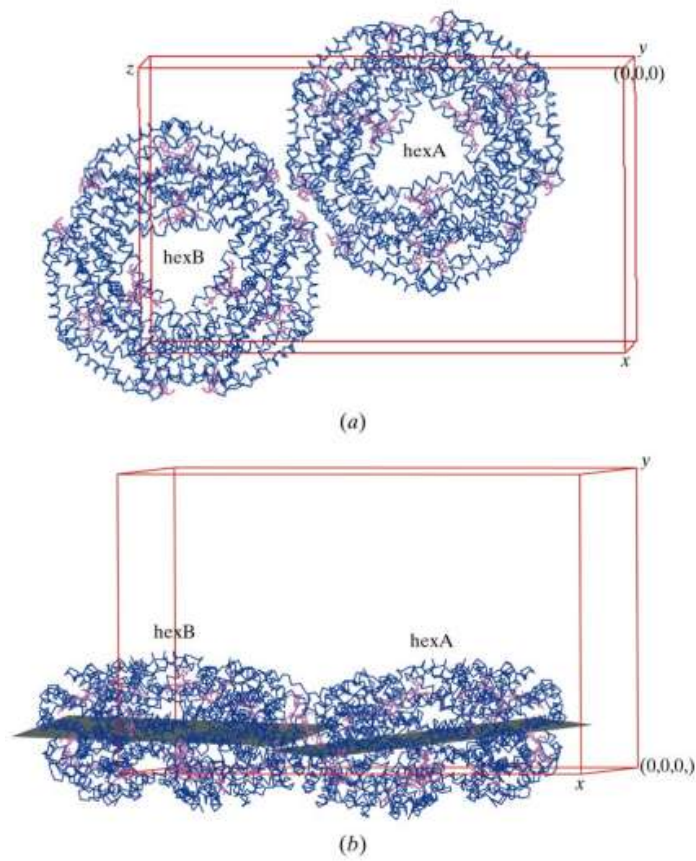


Figura 2. Conformación estructural de la C-ficocianina. Hexámeros de la C-ficocianina. (a) Vista en el eje b. (b) Vista en el eje a. Obtenido de: Wang, 2001.

2.6 Aplicaciones de la ficocianina en alimentos

Debido a sus propiedades como antioxidante, colorante y fuente de proteína, la ficocianina se ha agregado a alimentos en diversos estudios para evaluar su aceptación y su estabilidad a diferentes condiciones. Por ejemplo, se ha agregado a helados, donde el color fue estable por 182 días y adicionalmente el producto resultante mostró un incremento en su actividad antioxidante (Amarante, 2020). Este ejemplo muestra que el uso de ficocianina en alimentos puede lograr una buena aceptación basada en una apariencia atractiva (color) y la funcionalidad biológica de los compuestos de la espirulina, como lo es su capacidad antioxidante, entre otras.

Debido a su potencial comercial como aditivo alimentario, la extracción de ficocianina se ha estudiado de manera importante, y se han propuesto varios métodos de extracción con distintas ventajas y rendimientos. La mayoría de estos métodos se basan en extracción con algún tipo de sal, ya sea cloruro, fosfato, citrato o acetato de sodio. Un método simple de extracción como el descrito puede ser usado para extraer rápida y fácilmente ficocianina a partir de espirulina. Sin embargo, el utilizar procesos extra para mejorar la extracción, como ultrasonido, pulsos eléctricos, microondas o ciclos de congelación y descongelación, pueden incrementar de manera importante los rendimientos de la proteína, ya que ayudan a exponer las estructuras celulares donde se encuentra contenida la ficocianina, haciendo más fácil su liberación (Jaeschke, 2021).

2.7 Aplicaciones en otros ramos

Algunas de las aplicaciones fuera de los alimentos donde actualmente se utiliza de la ficocianina son las siguientes:

- **Fertilizante:** la espirulina se ha usado para mejorar el rendimiento de algunos cultivos por medio de la sustitución de fertilizantes de nitrógeno inorgánico con espirulina seca. En la India, se ha usado en la producción de arroz y se ha demostrado que los rendimientos aumentan alrededor de un 22%. Además de ser una fuente rica en nitrógeno orgánico, la espirulina contiene muchos otros nutrientes que son liberados gradualmente en el suelo, mejorando la fertilidad del mismo. Sin embargo, en la mayoría de los casos todavía son preferidos los fertilizantes de nitrógeno inorgánico debido a su bajo costo y alta disponibilidad. En algunos estudios, la combinación de espirulina con fertilizantes basados en fósforo y cianobacterias fijadoras de nitrógeno demostró incrementar de manera significativa la producción de tomate (más de un 522%) (FAO, 2008).
- **Suplemento de proteína para ganado:** la adición de espirulina a alimento basado en harina de pescado y nueces se ha estudiado en pollos. Una ventaja de esta adición fue que una suplementación del alimento con vitaminas y minerales adicionales ya no fue necesaria, debido a que la espirulina aportaba estos nutrientes (FAO, 2008).

2.8 Tendencias

El valor de mercado de los productos basados en microalgas (como la espirulina) se ha estimado en \$1,654 millones de dólares en 2021, con un crecimiento anual proyectado de 7.9%, esperando un valor de mercado de \$2,811 millones de dólares en 2028. Estos números incluyen productos en distintas categorías, como alimentos y bebidas, alimento para animales, farmacéuticos y nutracéuticos, cuidado personal, entre otros. De éstas, las categorías farmacéutica y nutracéutica representan la parte más importante del mercado en los últimos años. Como dato adicional, Europa

contribuye a la mayor parte de estos tipos de productos, comparado con otras regiones (Globe News Wire, 2022).

Últimamente ha habido más lanzamientos de productos que contienen espirulina enfocados en alimentos, pero la mayoría de ellos consisten en suplementos de espirulina seca, sin mayor procesamiento. Sin embargo, se espera que en los próximos años sean lanzados productos formulados con espirulina o con extractos de ella, como la ficocianina, haciendo que el potencial de crecimiento de este tipo de productos sea muy interesante.

3. JUSTIFICACIÓN

La utilización de ficocianina en alimentos funcionales es actualmente poco socorrida debido a su alto costo, como resultado de los procesos de extracción que consumen tiempo, esfuerzo y dinero. Por lo anterior, es de interés proponer un método de extracción de ficocianina que sea sencillo y económico, por medio del cual se logre obtener ficocianina extraída a partir de espirulina con características aptas para ser aplicada en alimentos funcionales, en términos de concentración de la proteína, así como de características sensoriales.

4. HIPÓTESIS

Por medio de un método simple de extracción de ficocianina a partir de espirulina, es posible obtener ficocianina con características apropiadas para ser utilizada en una bebida funcional, con

un sabor menos intenso que la base (espirulina) y con una concentración apropiada para proveer al alimento de los beneficios funcionales de la ficocianina.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Extraer ficocianina de espirulina como ingrediente para aplicación en una bebida funcional.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la suplementación del medio de crecimiento de espirulina con una fuente vegetal de nitrógeno, en términos del contenido de proteína de la misma.
2. Validar un método de extracción de agitación con fosfatos apropiado para obtener ficocianina estable y concentración suficiente para su uso como materia prima en alimentos funcionales.
3. Validar un método de precipitación con sales apropiado para obtener ficocianina en concentración suficiente para su uso como materia prima en alimentos funcionales.
4. Implementar el precipitado obtenido en una bebida base láctea para su posterior evaluación con consumidores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de remediación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Calle Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda El Canadá, Gral. Escobedo, Nuevo León, México.

El experimento se dividió en tres partes:

6.1. Crecimiento de espirulina

La primera consistió en el crecimiento de la espirulina con medio Zarrouk (control) y dos tratamientos de prueba, uno con el medio Zarrouk más una fuente vegetal de nitrógeno y el otro basado en la fuente vegetal de nitrógeno como sustrato en estado de descomposición.

La espirulina (*Spirulina maxima*) fue obtenida de los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como los materiales de laboratorio y el medio Zarrouk necesario para el experimento. La espirulina fue inoculada a un nivel de 0.1 g de biomasa por litro en botellas de vidrio de 1 litro que se mantuvieron con aireación continua e iluminación intermitente de 12 h, a una temperatura de 30°C. Se hicieron los siguientes tratamientos:

Cuadro 3. Tratamientos en la etapa de crecimiento de espirulina.

Tratamiento	Medio	Nivel
C	Zarrouk	Base
T1	Zarrouk + jugo de apio fresco	Base + 2.5%
T2	Zarrouk + apio podrido	Base + 2.5%
T3	Zarrouk + apio podrido	Base + 5%

Como control se utilizó el medio Zarrouk con la siguiente composición (Rajasekaran, 2015).

Cuadro 4. Composición del medio Zarrouk.

Ingrediente	Concentración (g/L)
NaCl	1.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
NaNO ₃	2.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
EDTA (Na)	0.08
K ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaHCO ₃	16.8
K ₂ HPO ₄	0.5

Para obtener el jugo de apio fresco se adquirió el apio en un supermercado local y se procesó utilizando un extractor de jugos comercial con una posterior filtración para eliminar partículas sólidas. Se agregó con los porcentajes mencionados en el Cuadro 4, restando ese mismo porcentaje del medio Zarrouk.

Para los tratamientos con apio en estado de putrefacción, se siguió un procedimiento descrito para manzana podrida y su utilización como medio para espirulina (Mía, 2019). En este procedimiento, 70 g/L de apio podrido se dejaron descomponerse en agua en condiciones aeróbicas por 21 días a temperatura ambiente en un recipiente de plástico. Posteriormente, se separó el líquido sobrenadante, se hizo una esterilización para eliminar contaminación microbiana, se hizo una filtración para eliminar partículas sólidas y se añadió en el medio para el crecimiento de espirulina

a los niveles descritos en el cuadro 4. El objeto de los tratamientos a distintos niveles fue determinar un nivel óptimo de adición al medio para mejorar la producción de proteína.

Para cada uno de los tratamientos se tomaron muestras a los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16. Estas muestras se sometieron a análisis de concentración de biomasa, nitritos, nitratos, ortofosfato y amonio para determinar las diferencias entre los distintos tratamientos, además de una determinación del nivel de proteína en el tiempo final por el método de Bradford.

El análisis estadístico de los datos se llevará utilizando el software Minitab, versión 2017, llevando a cabo un ANOVA para los resultados de cada etapa del experimento y realizando una comparación de medias por el método Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%.

6.2 Extracción de ficocianina

Para la etapa de extracción se utilizó espirulina seca (*S. maxima*). El procedimiento de extracción se basó en el descrito por Ying *et al* (2020), utilizando un buffer de fosfatos (pH 7.8), en este caso KH_2PO_4 , ajustado a cierto pH (6, 8 ó 10), y donde se dispersó una cantidad determinada de muestra (espirulina seca) y se sometió a una agitación, tiempo y temperatura (Cuadro 5). Una vez obtenido el extracto, se midió absorbancia a 615 y 652 nm para determinar la cantidad de ficoeritrocianina (PE), C-ficocianina (CPC) y allo-ficoocianina (APC), así como las ficocianinas totales (TPC) presentes en el mismo (Choi, 2018). La cantidad de cada una de ellas (mg/ml) se determinó por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{CPC} = (A_{615\text{nm}} - 0.474A_{652\text{nm}})/5.34$$

$$\text{APC} = (A_{652\text{nm}} - 0.208A_{615\text{nm}})/5.08$$

$$\text{TPC} = \text{CPC} + \text{APC}$$

Cuadro 5. Condiciones experimentales para la extracción de ficocianina.

Variable	Mín	Punto central	Máx
T (°C)	10	25	40
Agitación (RPM)	0	100	200
Relación muestra:solvente	1:1	1:3	1:5
Tiempo (min)	5	15	25
pH	6	8	10

Una vez extraída la ficocianina en las condiciones óptimas determinadas en la etapa anterior, se procedió a evaluar su estabilidad a condiciones de almacenamiento de distintas temperaturas (-20, -4, 5, 25, 40°C) por un periodo de hasta 4 días.

Adicionalmente, se llevó a cabo el mismo procedimiento a una temperatura de 72°C por un periodo de 15 minutos, con mediciones a los tiempos 0, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos.

6.3. Precipitación de ficocianina

Esta etapa consistió en llevar a cabo la precipitación de ficocianina extraída previamente con buffer de fosfatos (con las condiciones óptimas obtenidas en la etapa 2) a partir de espirulina, probando varias sales (sulfato de amonio, fosfato de amonio y citrato de sodio) para encontrar la sal más eficiente en la precipitación.

Para ello se partió de ficocianina extraída con un método descrito por Ying (2020), utilizando un buffer de fosfatos, en este caso KH_2PO_4 , ajustado a pH de 7.8, y donde se dispersó una cantidad determinada de muestra (espirulina seca) y se sometió a una agitación, tiempo y temperatura

(Cuadro 6) que se validaron en un experimento anterior como el punto óptimo para maximizar la extracción de ficocianina a partir de espirulina.

Cuadro 6. Condiciones para la extracción de ficocianina a partir de espirulina.

Variable	valor
T (°C)	40
Agitación (RPM)	150
Relación muestra:solvente	1:5
Tiempo (min)	25 min
pH	7.8

Posteriormente se adicionaron en tratamientos distintos las siguientes sales precipitantes al extracto de espirulina y se dejó en reposo a temperatura de refrigeración por espacio de varias horas.

- Sulfato de amonio al 65%
- Fosfato de amonio al 65%
- Citrato de sodio al 10%

Después de ello, se centrifugó el producto resultante, se separó el precipitado, se secó en estufa por 24 horas y se disolvió en buffer de fosfatos para evaluar la muestra a una absorbancia de 615 nm y 652 nm y determinar la cantidad de C-ficocianina (CPC) y allo-ficoocianina (APC), así como las ficocianinas totales (TPC) presentes en el mismo (Choi, 2018).

Posteriormente, se seleccionó la sal que precipitó con mayores concentraciones de ficocianina, como la que haya presentado menores dificultades de proceso.

Finalmente, se llevó a cabo la optimización de las condiciones (temperatura de almacenamiento, tiempo y concentración de sal precipitante) para maximizar la concentración de ficocianina precipitada, con la sal seleccionada (citrato de sodio). Una vez extraída la ficocianina con buffer de fosfatos se procedió a una centrifugación del líquido resultante, se separó el precipitado, se disolvió en buffer de fosfatos y se midió la absorbancia a 615 nm y 652 nm, con el procedimiento y las ecuaciones descritas en la sección anterior para calcular la concentración de C-ficocianina, alloficocianina y ficocianinas totales.

Todos los datos se analizaron por medio del método de superficie de respuesta a través de una estrategia Box-Behnken, utilizando el software Design-Expert 13.

Cuadro 7. Condiciones para la precipitación de ficocianina a partir de espirulina.

Variable	Mín	Medio	Máx
Tiempo de almacenamiento (h)	3	16	29
Temperatura de almacenamiento (°C)	5	15	25
Concentración de citrato de sodio (%)	5	10	15

6.4. Aplicación en bebida

Una vez determinadas las condiciones óptimas de precipitación en la etapa anterior, se procedió a utilizarlas para obtener una cantidad suficiente de ficocianina y hacer su aplicación en una bebida base láctea con las siguientes formulaciones:

Cuadro 8. Formulaciones para aplicación de ficocianina.

Ingrediente	T1	T2	T3
Leche entera deslactosada (%)	93.9	92.9	89.9
Ficocianina (%)	1	2	5
Goma xantano (%)	0.1	0.1	0.1
Azúcar (%)	5	5	5

El objetivo fue tener formulaciones simples que pudieran hacer evidentes las características que imparte la ficocianina, con la finalidad de conocer estos efectos y limitaciones en el uso de la ficocianina como ingrediente para la formulación de bebidas. Por lo tanto, no se utilizaron saborizantes que pudieran enmascarar las notas de sabor y aroma de la ficocianina.

La preparación de la bebida fue la siguiente:

- a) Agregar leche entera deslactosada y pasteurizada
- b) Agregar mezcla de ingredientes secos y pesados: azúcar, goma xantano y ficocianina.
- c) Agitación mecánica por medio de licuadora casera por 15 segundos.

Posteriormente se tomaron muestras de cada una de las bebidas preparadas y se dieron a probar a 15 personas (panelistas no entrenados, consumidores de productos base leche como yogurt bebibles o licuados) para evaluar las características sensoriales de los productos en atributos como apariencia, textura, olor y sabor por medio de una prueba hedónica de 7 puntos, en los que el 7 es la mayor calificación y 1 la menor.

Posteriormente se hicieron determinaciones de proteína y grasa por los métodos de Kjeldahl ((NMX-f-608-NORMEX-2011) y Gerber butirométrico (AOAC 2000.18), respectivamente, así

como determinación de color $L^*a^*b^*$, utilizando un colorímetro Minolta CR410 (Konica Minolta Co. Japón).

Figura 3. Formato de evaluación en el análisis sensorial.

Prueba de escala hedónica

Edad: _____ **Sexo:** _____

A continuación se presentan tres muestras de bebidas. Empezando en cualquier orden, toma una muestra, da un pequeño sorbo y mantenlo en la boca por 10 segundos. Si es necesario, prueba la muestra las veces que se requiera.

Califica, según tu preferencia, los atributos mencionados en la siguiente tabla para cada una de las muestras, donde 1 corresponde a "me disgusta mucho" y 7 a "me gusta mucho".

Procede con la siguiente muestra haciendo lo mismo, enjuagando la boca con agua entre cada muestra.

Muestra 787	
Atributo: Apariencia	Atributo: Aroma
7. Me gusta mucho	7. Me gusta mucho
6. Me gusta moderadamente	6. Me gusta moderadamente
5. Me gusta poco	5. Me gusta poco
4. No me gusta ni me disgusta	4. No me gusta ni me disgusta
3. Me disgusta poco	3. Me disgusta poco
2. Me disgusta moderadamente	2. Me disgusta moderadamente
1. Me disgusta mucho	1. Me disgusta mucho
Atributo: Sabor	Atributo: Textura
7. Me gusta mucho	7. Me gusta mucho
6. Me gusta moderadamente	6. Me gusta moderadamente
5. Me gusta poco	5. Me gusta poco
4. No me gusta ni me disgusta	4. No me gusta ni me disgusta
3. Me disgusta poco	3. Me disgusta poco
2. Me disgusta moderadamente	2. Me disgusta moderadamente
1. Me disgusta mucho	1. Me disgusta mucho

7. RESULTADOS

7.1. Crecimiento de espirulina

Los resultados de crecimiento de biomasa se presentan en la figura 4, donde se puede observar que hay un crecimiento de la espirulina a través del tiempo para todos los tratamientos, pero el tratamiento C (medio Zarrouk) tiene la mayor producción de biomasa ($p < 0.05$) comparado con los demás tratamientos, entre los cuales no existe diferencia significativa en este parámetro.

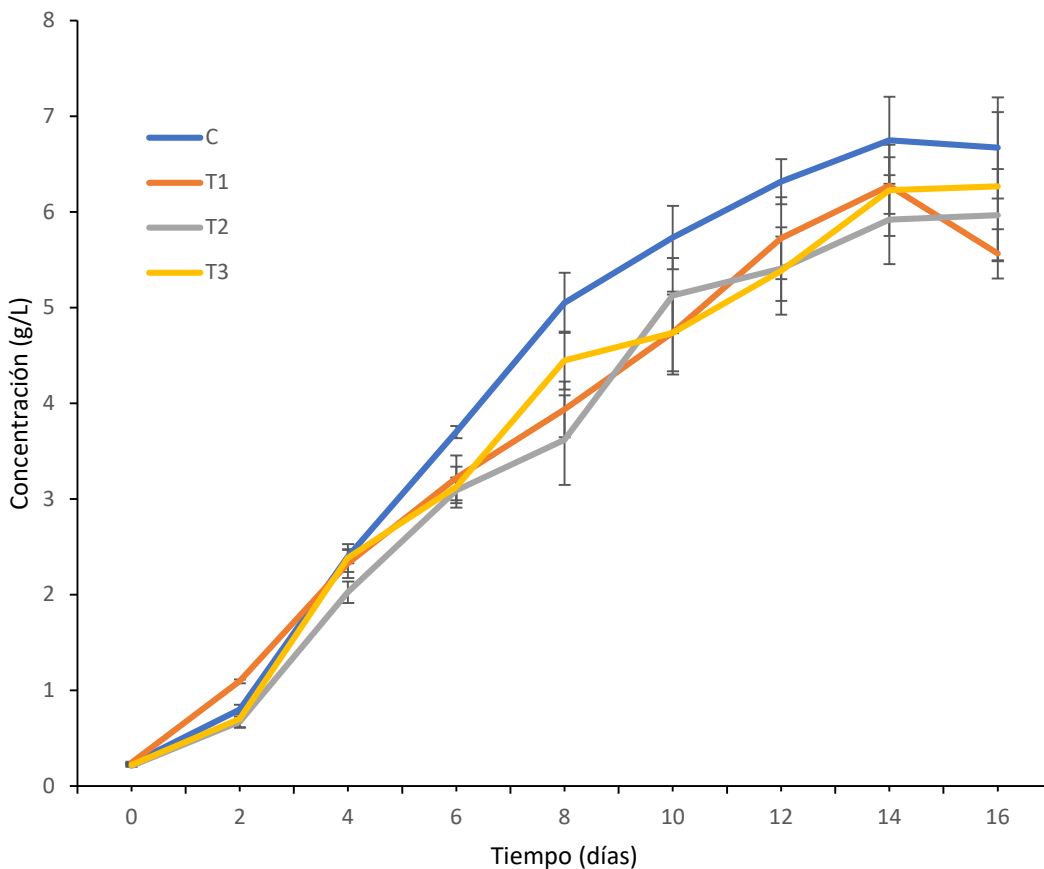


Figura 4. Crecimiento de biomasa.

Por otro lado, los resultados de contenido de nitritos y nitratos en los tratamientos se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente. En éstas se puede observar que existe una diferencia significativa entre la concentración de estos compuestos entre el tratamiento C (medio Zarrouk) y

los demás tratamientos. Además, es notoria que la mayor proporción de este tipo de compuestos es en su forma de nitritos, siendo más de 30 veces la cantidad existente de nitratos en las muestras.

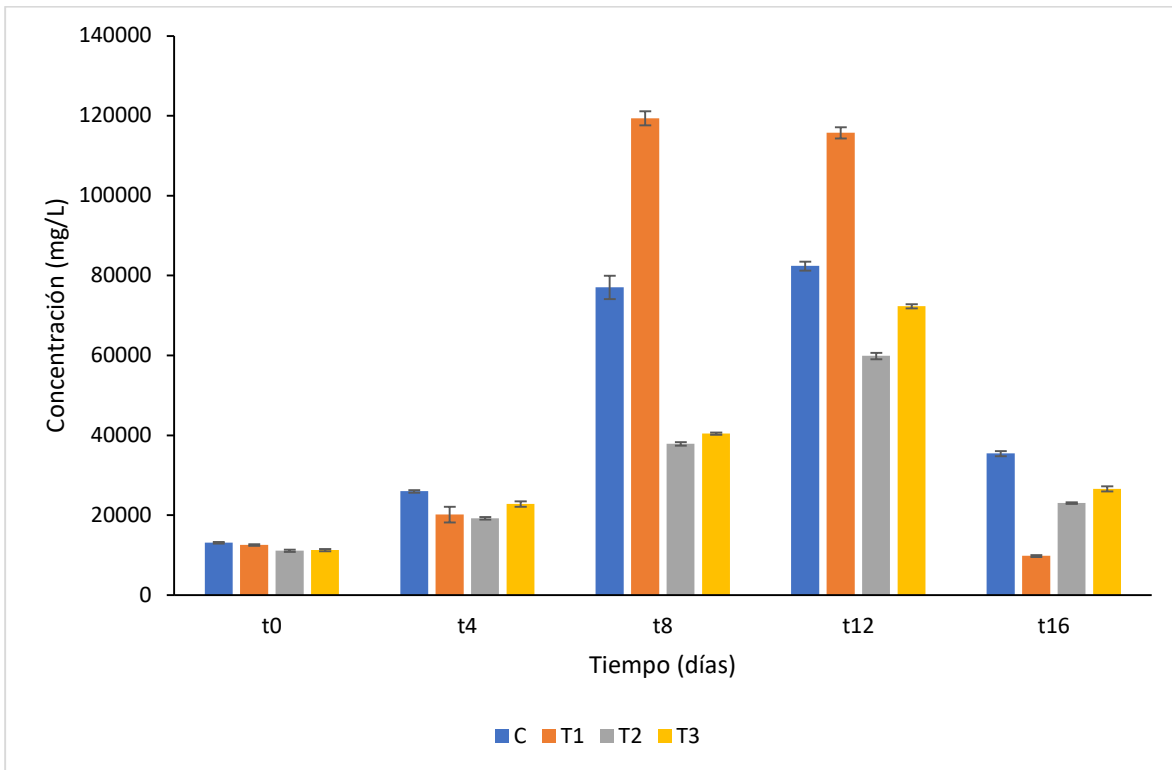


Figura 5. Concentración de nitritos en el tiempo.

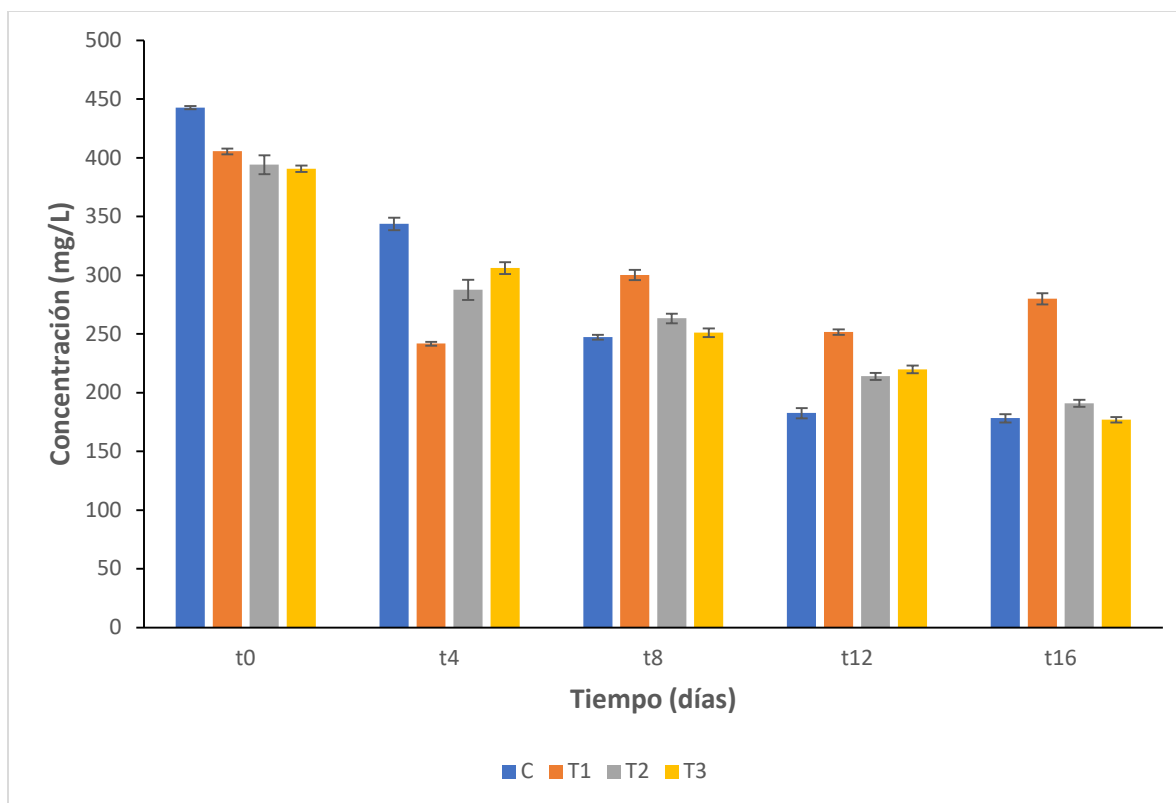


Figura 6. Concentración de nitratos en el tiempo

7.2. Extracción de ficocianina

El punto óptimo al que se maximiza la extracción de ficocianinas totales es a 40°C, 146 rpm, 25 min, pH 7.8 y una relación muestra-solvente de 1:5 (figura 7). La concentración predicha en el extracto a estas condiciones es de 0.378 mg/mL de ficocianina. Por otro lado, el punto óptimo de extracción de C-ficocianina es a 40°C, 151 rpm, 24.8 min, pH 7.7 y relación muestra-solvente de 1:5, con una concentración predicha de 0.249 mg/mL. El modelo obtenido (Cuadro 8) logra explicar en buena medida la concentración de ficocianina basada en las variables mencionadas ($R^2=0.8671$). Como puede observarse en las imágenes 2 y 3, los datos obtenidos en la experimentación se ajustan de buena manera al dato predicho y se mantienen cercanos a éste.

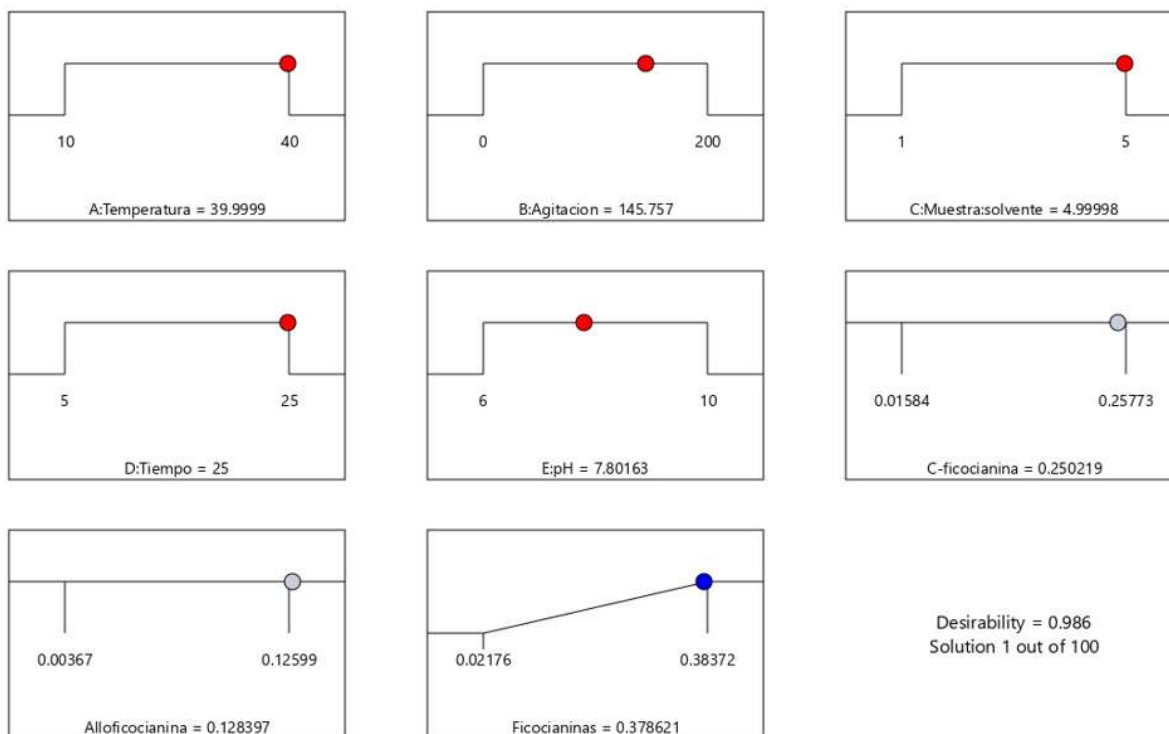


Figura 7. Condiciones donde se maximiza la extracción de ficocianina.

Cuadro 9. Tabla de ANOVA, donde A=Temperatura, B=Agitación, C=Muestra:solvente, D=Tiempo y E=pH.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrada	Valor F	Valor p
Modelo	0.0345	20	0.0017	7.83	<0.0001
A	0.0029	1	0.0029	12.99	0.0014
B	0.0001	1	0.0001	0.4547	0.5065
C	0.0157	1	0.0157	71.09	<0.0001
D	0.0006	1	0.0006	2.51	0.1263
E	0.0001	1	0.0001	0.4963	0.4879
AB	0.0003	1	0.0003	1.24	0.2756

AC	1.44×10^{-8}	1	1.44×10^{-8}	0.0001	0.9936
AD	3.33×10^{-6}	1	3.33×10^{-6}	0.0151	0.9032
AE	0.0001	1	0.0001	0.4163	0.5249
BC	3.5×10^{-6}	1	3.5×10^{-6}	0.0159	0.9008
BD	0.0000	1	0.0000	0.0839	0.7746
BE	8.28×10^{-7}	1	8.28×10^{-7}	0.0038	0.9516
CD	0.0019	1	0.0019	8.75	0.0068
CE	1.96×10^{-8}	1	1.96×10^{-8}	0.0001	0.9926
DE	2.12×10^{-7}	1	2.12×10^{-7}	0.0010	0.9755

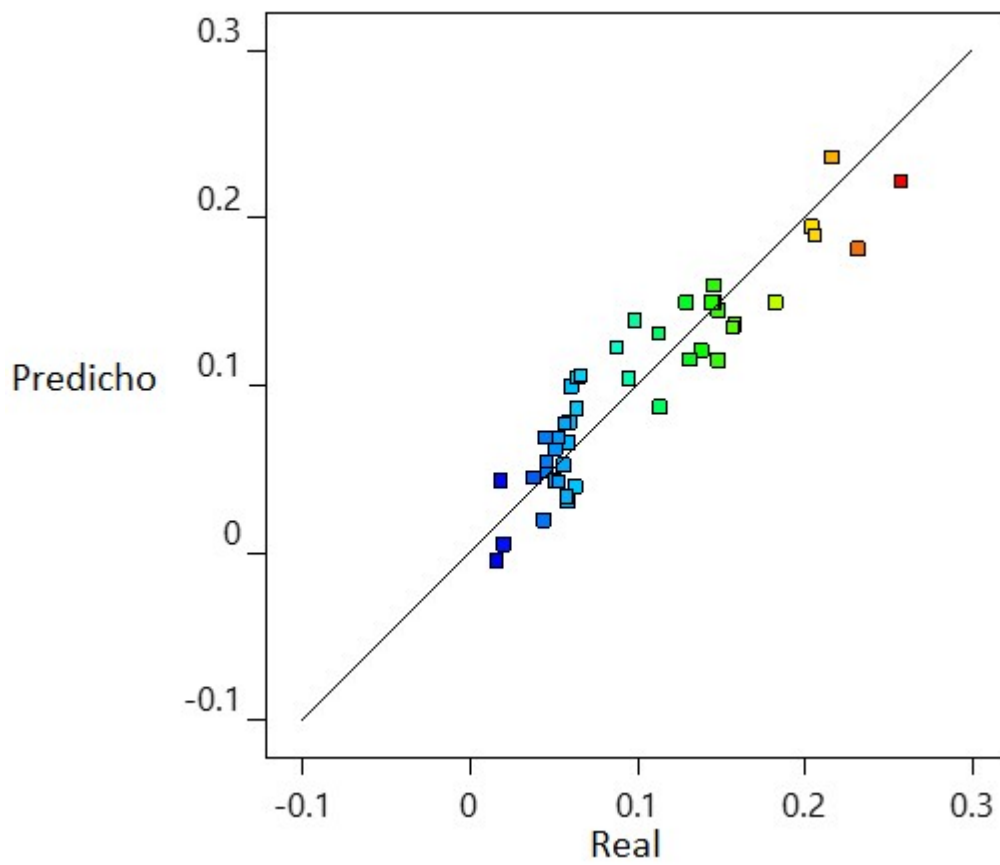


Figura 8. Gráfica de datos predichos vs reales.

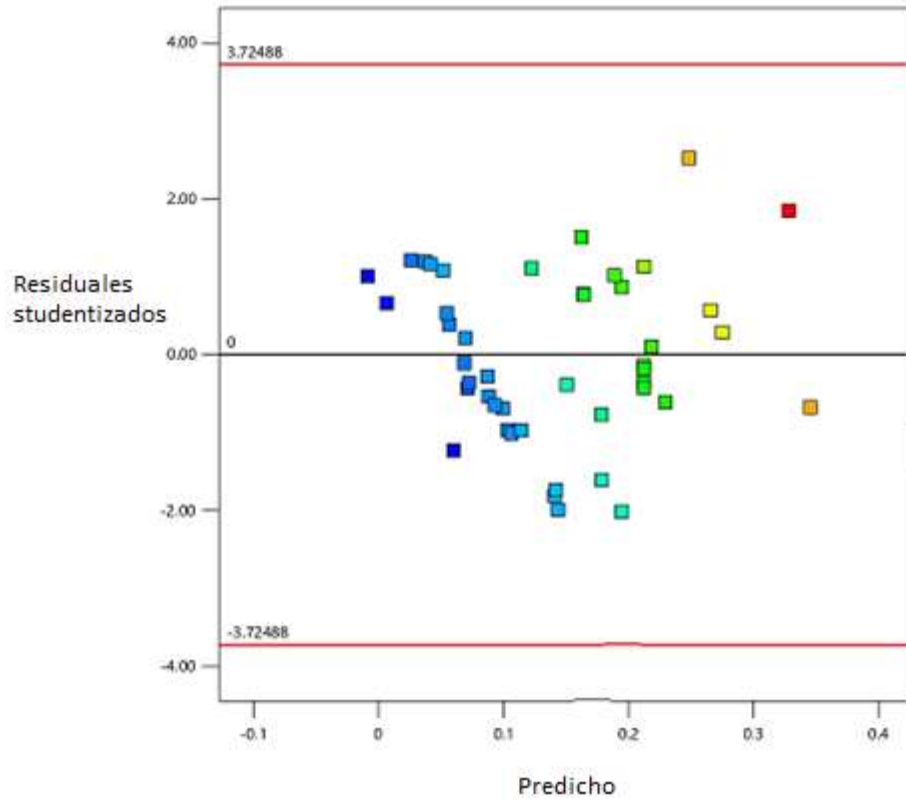


Figura 9. Gráfica de residuales.

El comportamiento de la extracción fue altamente dependiente de la temperatura y la agitación, como puede observarse en la Figura 10, donde la zona de mayor concentración de ficocianina se encuentra a las mayores temperaturas usadas y entre 100 y 200 rpm.

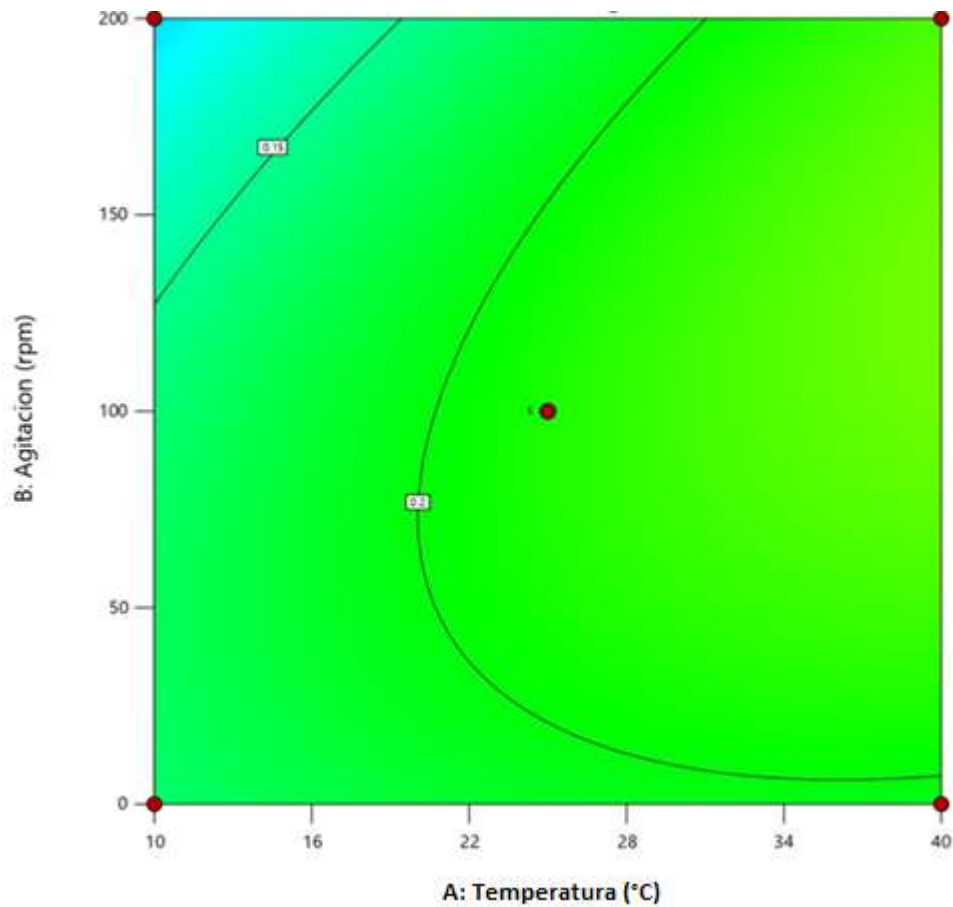


Figura 10. Gráfica de contorno con la interacción de la temperatura y agitación.

Por otro lado, la relación entre la temperatura y cantidad de solvente es muy directa, ya que la concentración de ficocianina extraída aumenta a medida que aumenta la temperatura y la cantidad de solvente, quedando el punto máximo de la interacción en la máxima temperatura y la máxima cantidad de solvente, como puede verse en la imagen 11.

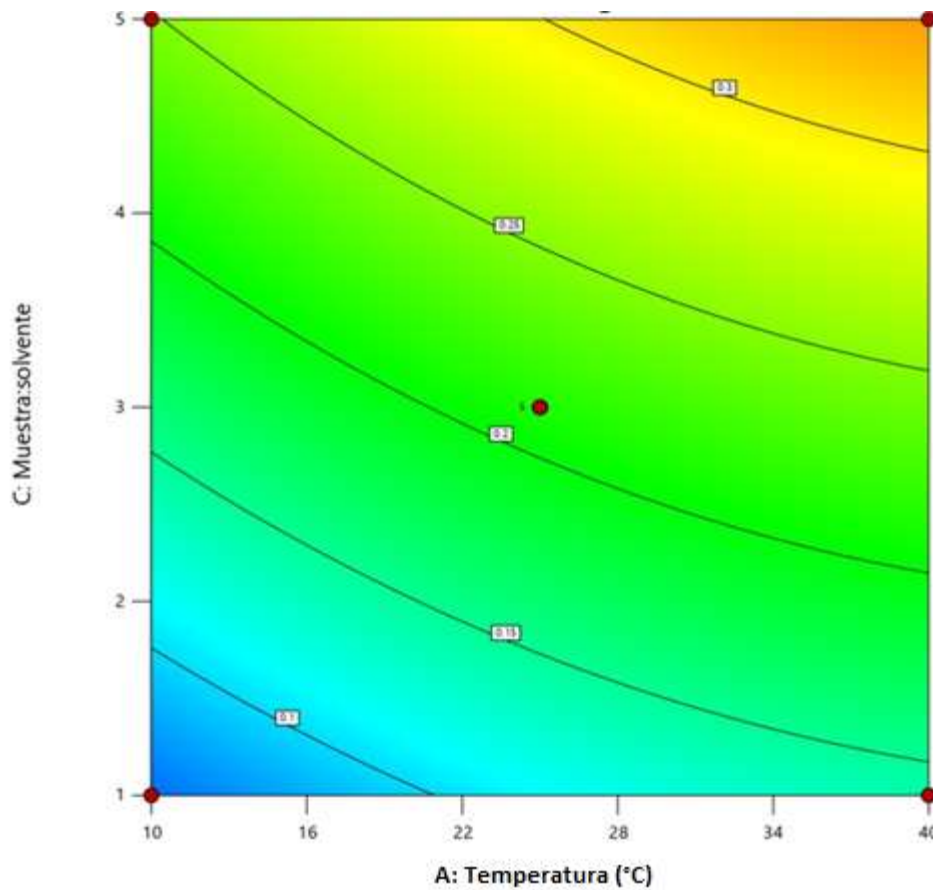


Figura 11. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y cantidad de solvente.

En el caso de la interacción de la temperatura con el tiempo, la concentración de ficocianina aumenta a medida que aumenta la primera, pero en el caso del tiempo, hay una mayor extracción entre 15 y 20 minutos, disminuyendo la misma a partir de los 20 minutos, como puede observarse en la Figura 12.

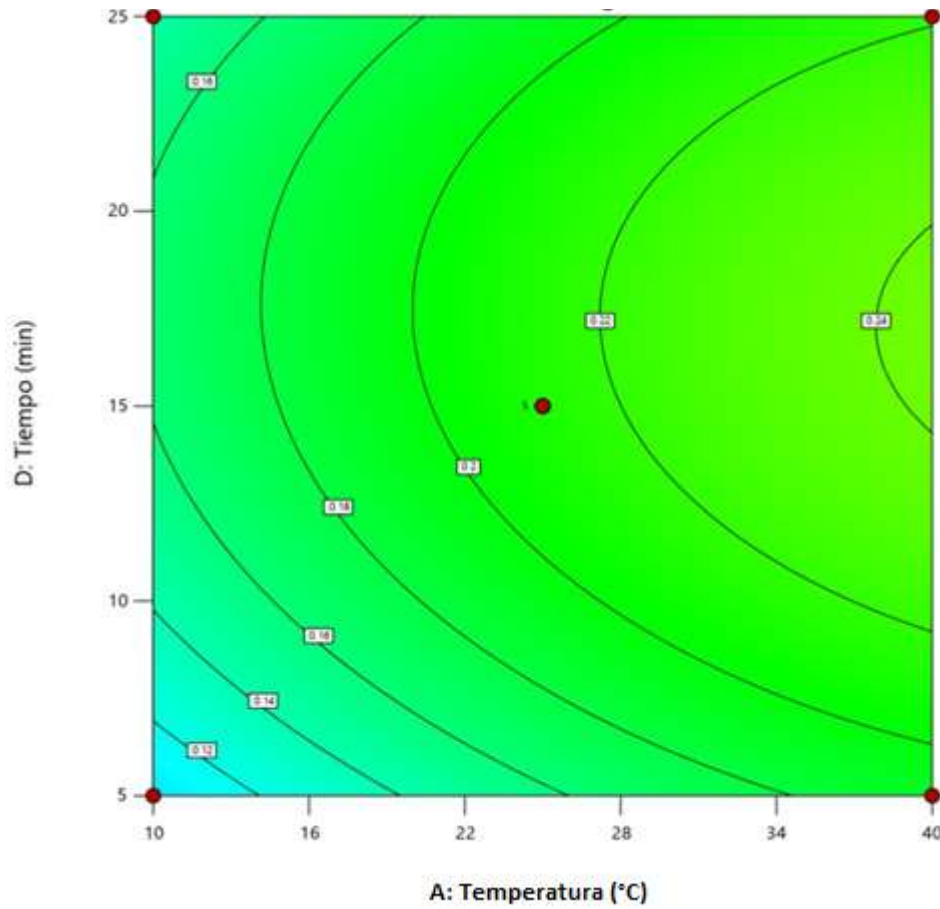


Figura 12. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y tiempo.

Para la interacción de la temperatura con el pH (Figura 13), la maximización de la extracción de ficocianina se concentra alrededor del pH 8, y manteniendo estable el pH, la concentración de ficocianina aumenta a medida que aumenta la temperatura.

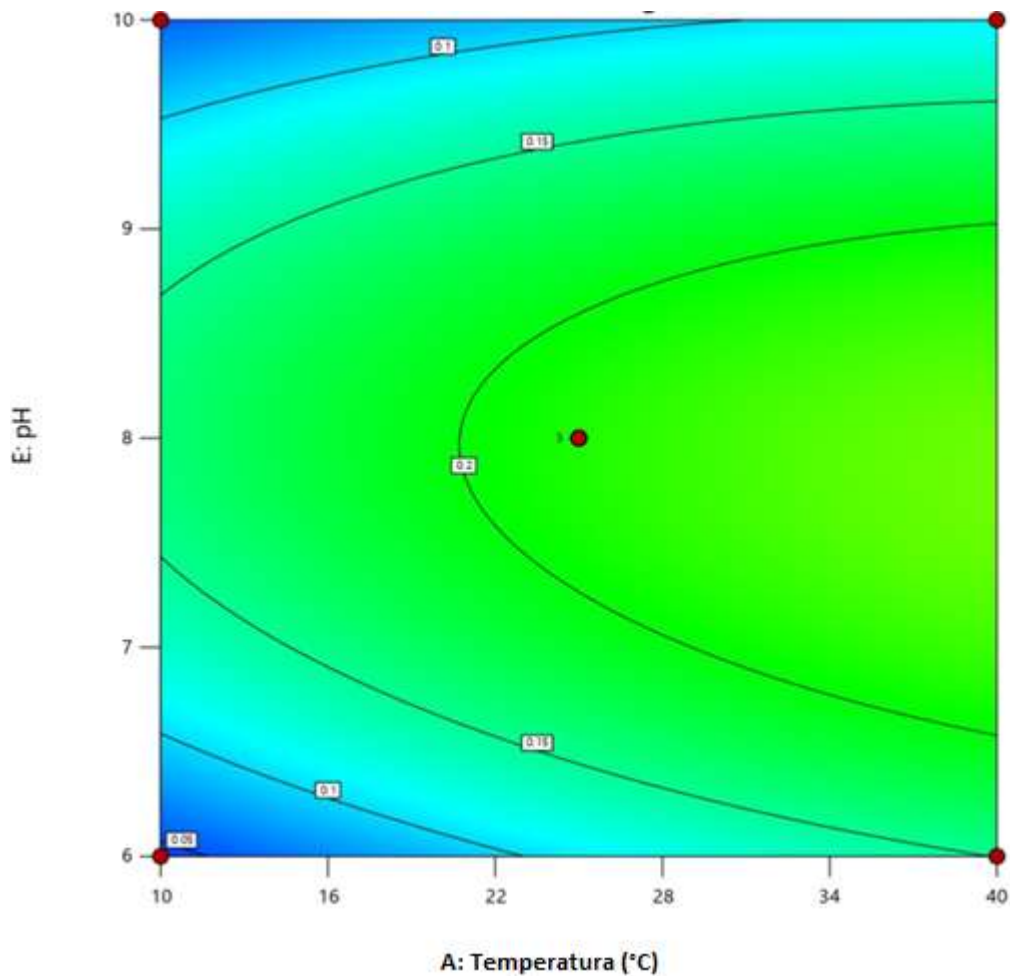


Figura 13. Gráfica de contorno con la interacción de temperatura y pH.

La relación de la agitación con la cantidad de solvente (Figura 14) tiene una maximización de la concentración de ficocianina en los valores medios de agitación (entre 50 y 150 rpm), mientras que la relación con la cantidad de solvente es directa, con un aumento en el factor y la variable de respuesta.

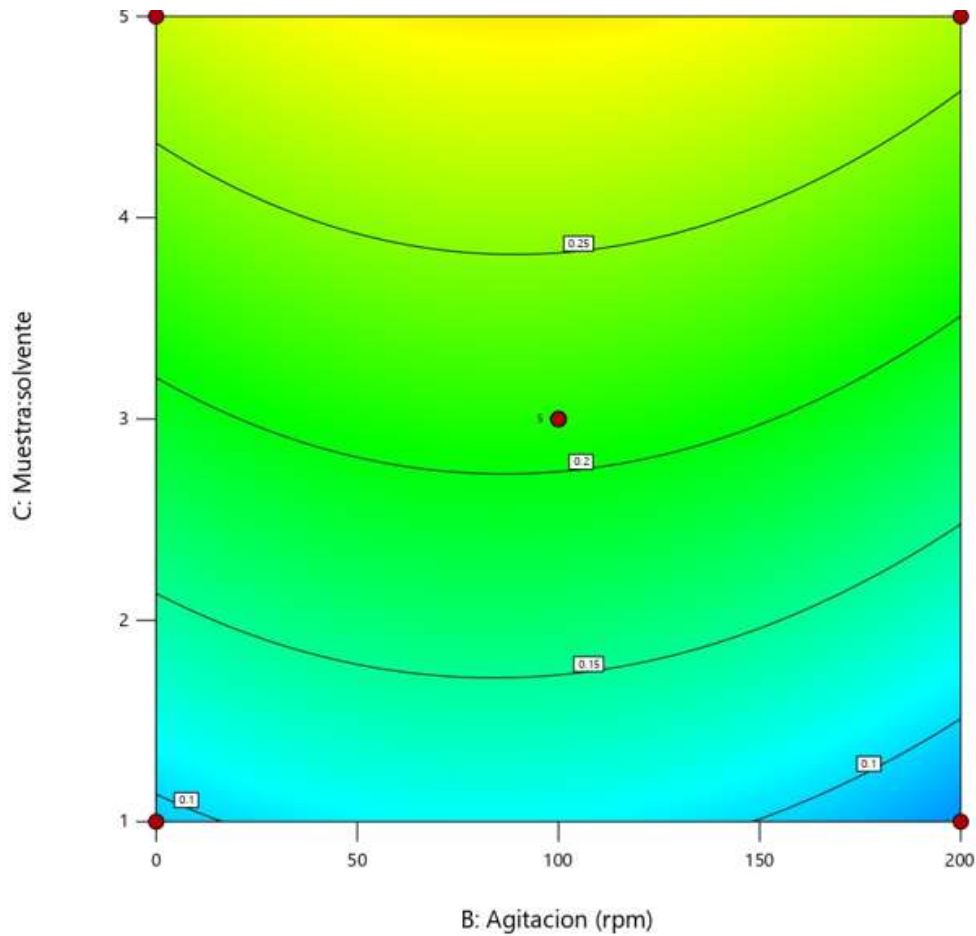


Figura 14. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y cantidad de solvente.

Por otro lado, la relación entre agitación con dos factores, tiempo (Figura 15) y pH (Figura 16), se encuentra centrada entre los 40 y 150 rpm con la máxima cantidad de extracción de ficocianina. En el caso del tiempo, esta maximización se localiza en la zona entre 12 y 23 minutos, mientras que, en el caso del pH, esta área se encuentra entre 7.5 y 8.5.

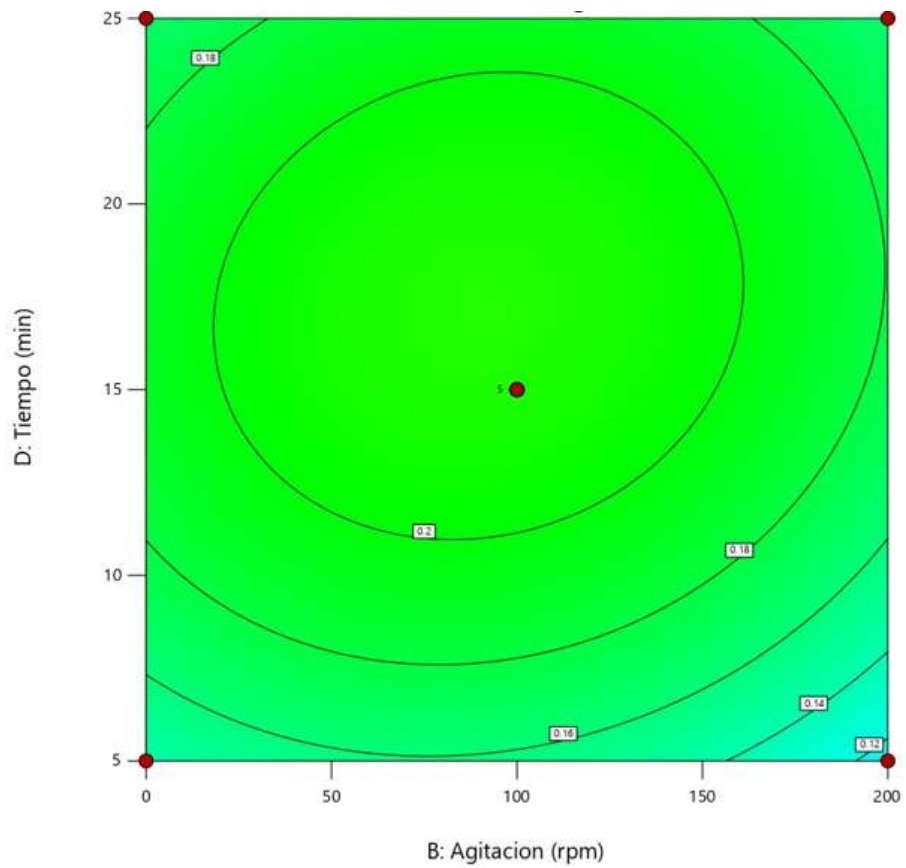


Figura 15. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y tiempo.

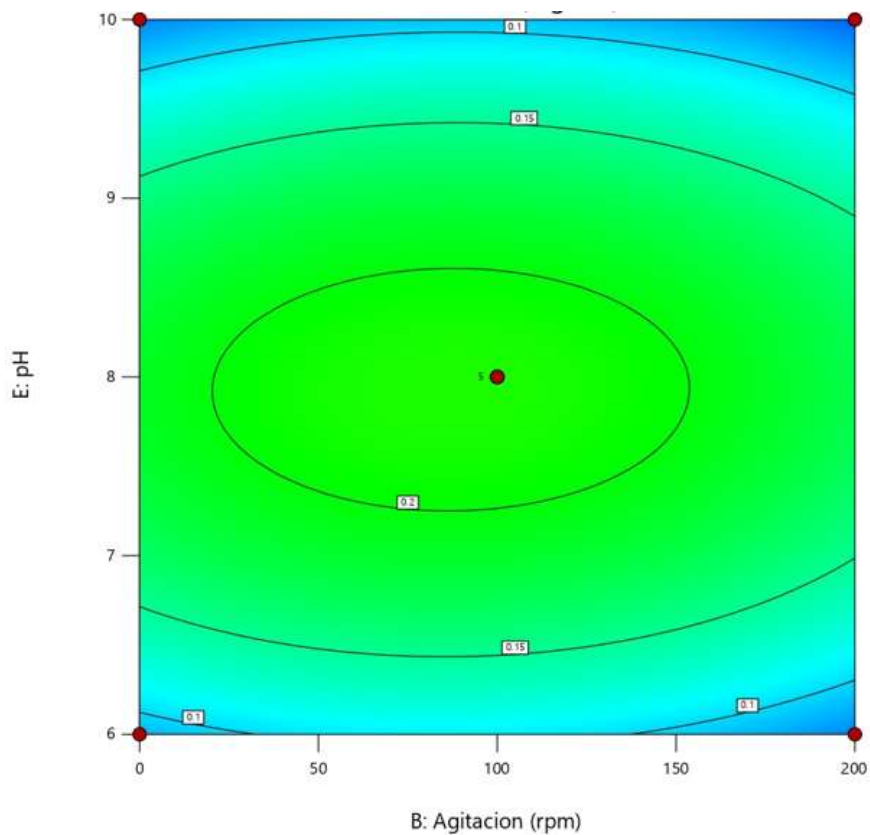


Figura 16. Gráfica de contorno con la interacción de agitación y pH.

Para la relación muestra/solvente, su interacción con el tiempo (Figura 17) es fuerte, aumentando la concentración de la extracción a medida que aumentan ambos factores, encontrándose el punto máximo de ficocianina en el mayor tiempo y la mayor cantidad de solvente. Además, en el caso del pH, la mayor concentración de ficocianina se observa alrededor del pH 8, aumentando a medida que aumenta la cantidad de solvente (Figura 18).

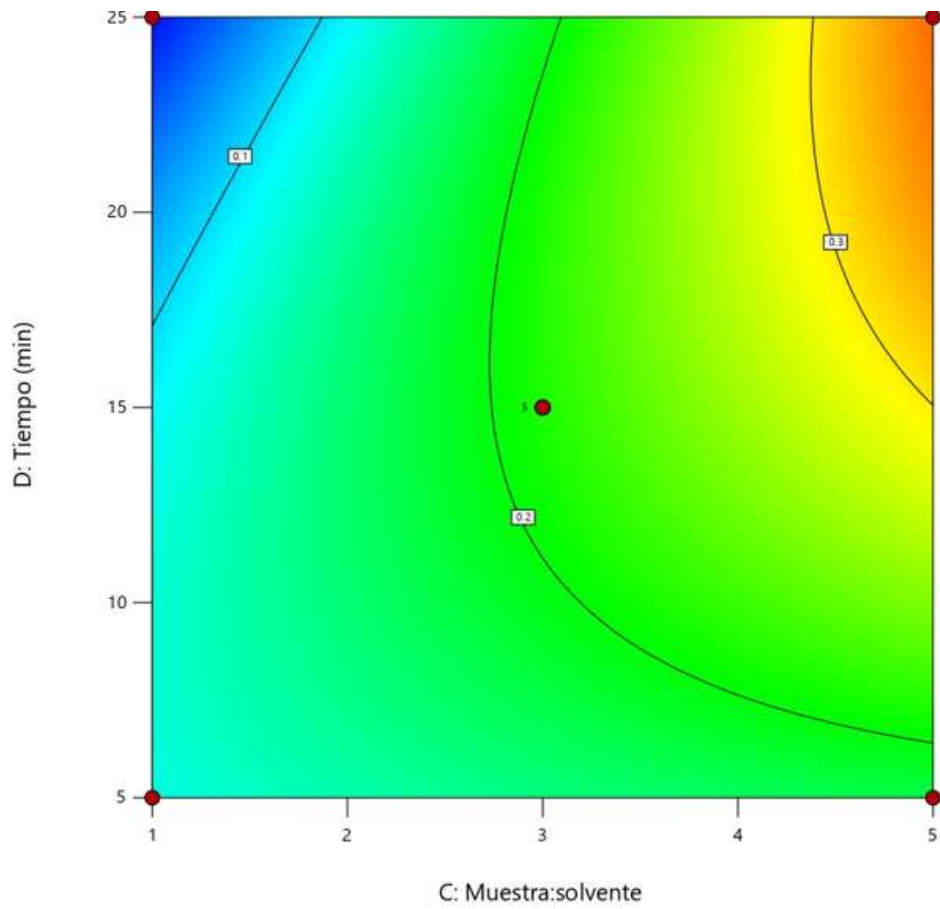


Figura 17. Gráfica de contorno con la interacción de muestra:solvente y tiempo.

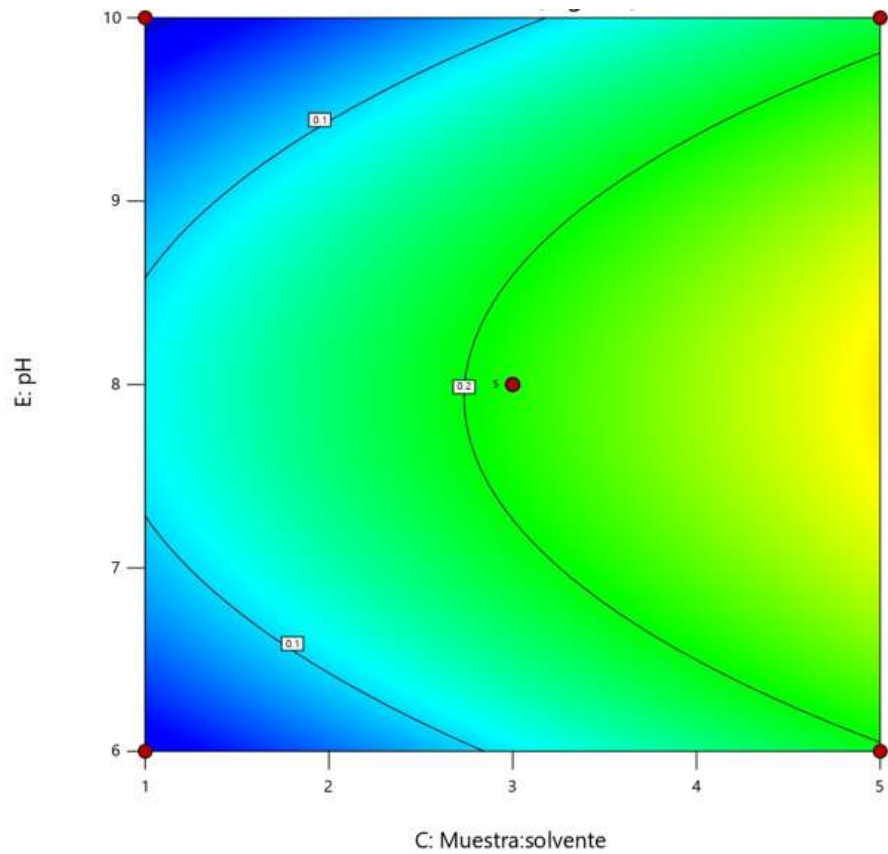


Figura 18. Gráfica de contorno con la interacción de muestra:solvente y pH.

Finalmente, la relación entre el tiempo y el pH (Figura 19) se encuentra localizada en las zonas centrales, donde la mayor cantidad de ficocianina extraída se encuentra en un tiempo entre 12 y 24 minutos y un pH de entre 7.5 y 8.5.

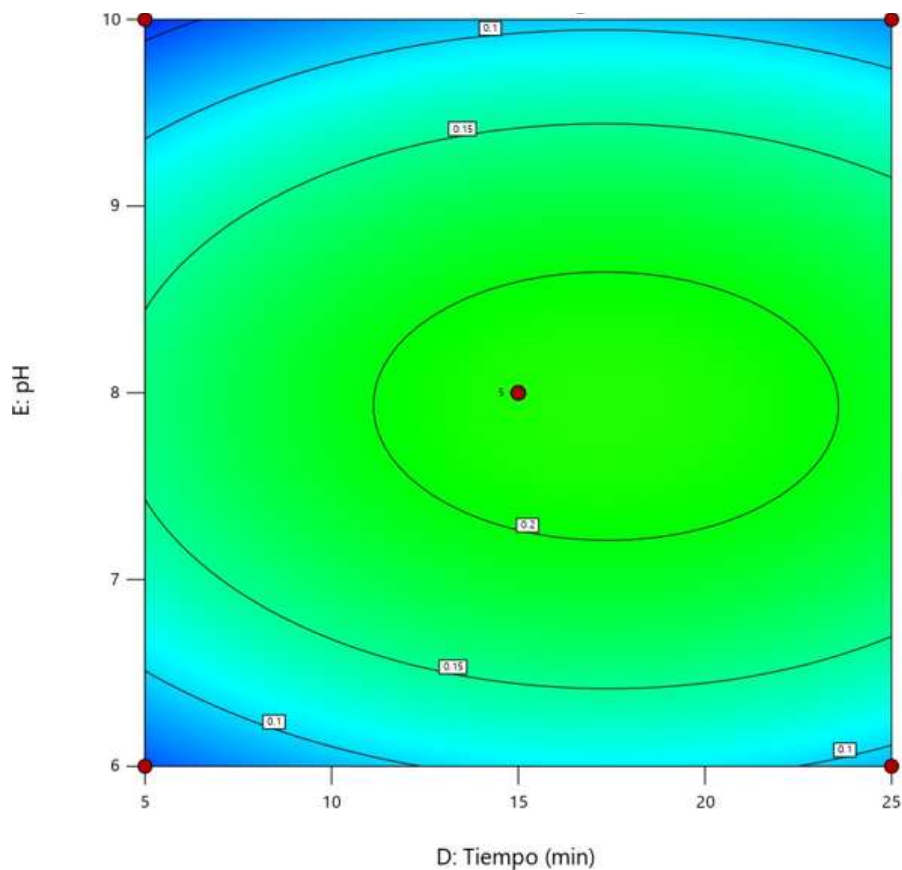


Figura 19. Gráfica de contorno con la interacción de tiempo y pH.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para aumentar la concentración de ficocianina extraída, se procedió a hacer una nueva extracción con un resultado de 0.37 mg/mL de ficocianina. Este dato es consistente con la predicción del modelo, alejada solamente un 2% del valor previsto en el mismo.

7.3. Precipitación de ficocianina

Selección de sal precipitante

En esta etapa inicial se agregaron por separado sulfato de amonio al 65%, fosfato de amonio al 65% y citrato de sodio al 10%. En el caso de las dos primeras sales, se presentaron dificultades en

el proceso. Cuando se utilizó el sulfato de amonio, hubo dificultad para hacer el secado del producto precipitado, tomando más de 3 días sin alcanzar un secado (ver Figura 20). En el caso del fosfato de amonio, durante el almacenamiento después de agregar la sal se presentó una espuma que dificultó las etapas posteriores del proceso de precipitación, impidiendo sobre todo hacer la lectura de absorbancia (Figura 21). Cuando se utilizó el citrato de sodio para la extracción, el proceso se llevó a cabo sin dificultad, se llegó a un precipitado seco en menos de 24 horas (una noche de secado) y la lectura de absorbancia se pudo llevar a cabo sin ningún contratiempo. Por lo anterior, el citrato de sodio se seleccionó como la sal a utilizar (Figura 22). En la Figura 23 se puede observar el resultado final de secar las muestras precipitadas con citrato de sodio, las cuales fueron utilizadas para los siguientes pasos del experimento.



Figura 20. Muestras con sulfato de amonio.



Figura 21. Muestras con fosfato de amonio.

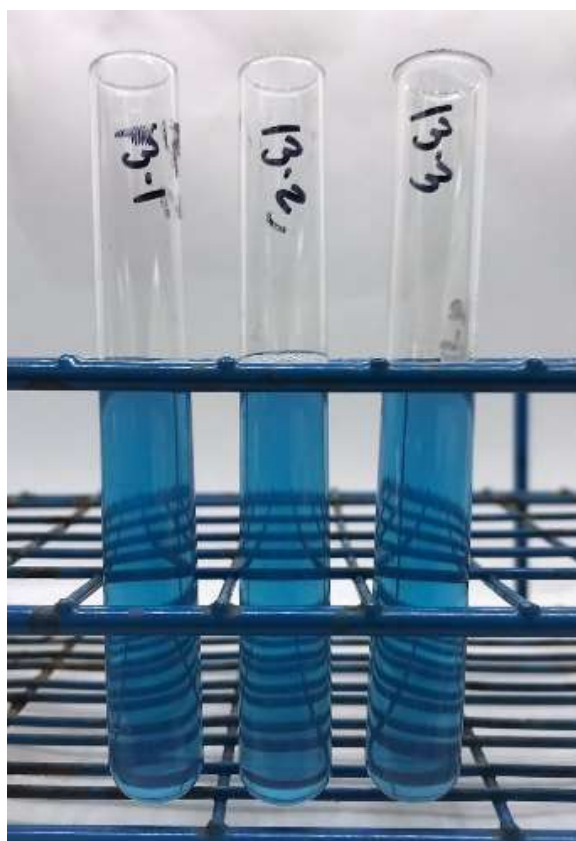


Figura 22. Muestras con citrato de sodio.

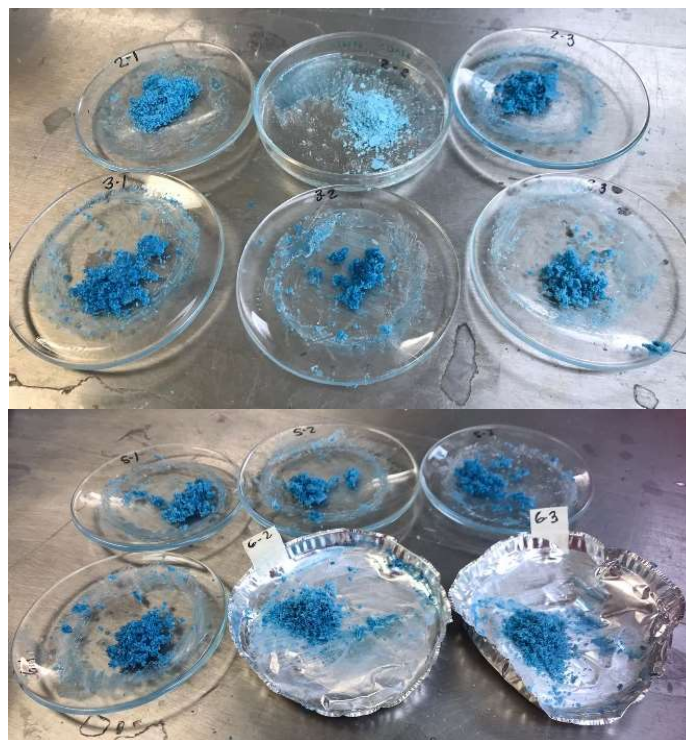


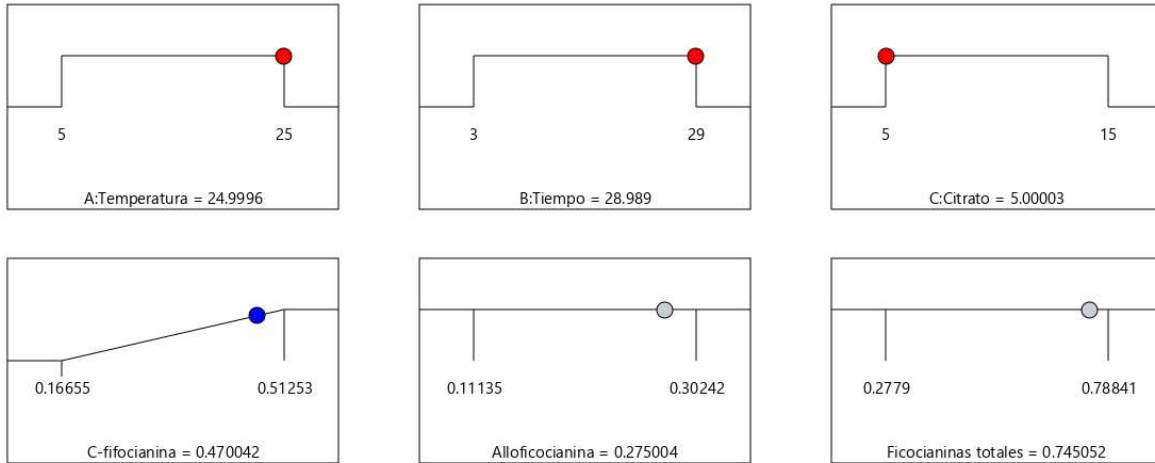
Figura 23. Muestras secas obtenidas con citrato de sodio.

7.4. Optimización de la precipitación de ficocianina

El punto óptimo al que se maximizó la concentración de C-ficocianina precipitada fue de 29 h, 25 grados centígrados y una concentración de citrato de sodio del 5%. Para este punto, hubo una concentración máxima predicha de 0.470 mg/g de C-ficocianina, 0.275 mg/g de alloficocianina y 0.745 mg/g de ficocianinas totales (Figura 24). Por otro lado, el punto al que se maximizó la concentración de ficocianinas totales coincidió con el anterior, siendo 29 h, 25 grados centígrados y 5% de citrato de sodio. Para este punto, hubo una concentración máxima predicha de 0.470 mg/g de C-ficocianina, 0.275 mg/g de alloficocianina y 0.745 mg/g de ficocianinas totales (Figura 9). En ambos casos, fue notorio el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la concentración de la ficocianina precipitada. Entre mayor fue la temperatura de almacenamiento y el tiempo, mayor es la concentración obtenida al final de ficocianina. El efecto de la temperatura

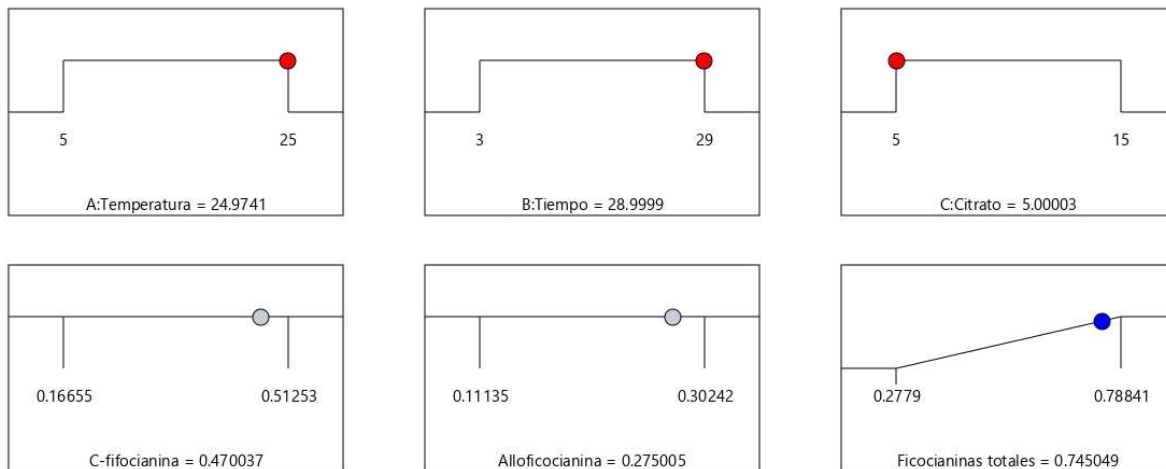
sobre la velocidad de la reacción es notorio, al tener una relación directamente proporcional con la precipitación de ficocianina. Además, un mayor tiempo también permitió una mayor reacción de la sal precipitante con la ficocianina disuelta, aumentando por lo tanto la concentración de la misma en el producto final. Sin embargo, en el caso de la concentración de citrato de sodio, se notó un efecto totalmente contrario al de los otros parámetros. La mayor concentración de ficocianina precipitada se obtuvo a la menor concentración de citrato, disminuyendo la primera a medida que aumenta la segunda. Esto puede deberse a un efecto de sobresaturación de la solución y un efecto diluyente en el precipitado. Puesto que la mayor concentración obtenida de ficocianina se logra al 5% de citrato de sodio, el aumentar esta misma no tiene un efecto en una mayor precipitación de ficocianina, pero sí en disminuir la cantidad de la misma en el producto resultante, al tener una mayor proporción de citrato de sodio en el material.

El modelo lineal obtenido (Cuadro 10) logró explicar en buena medida la concentración de ficocianina basada en las variables mencionadas ($R^2=0.7069$). Los demás modelos evaluados por medio del software Design Expert, ofrece R^2 de menor magnitud, por lo tanto, se seleccionó el primero como el que mejor explica el comportamiento obtenido en la experimentación. Al ajuste del modelo puede observarse en las gráficas de residuales y la comparación de éstos con los datos predichos por el sistema (figuras 24 y 25). Además, en el Cuadro 11 puede observarse el ANOVA del modelo lineal que se seleccionó. Por otro lado, en las Figuras 26 y 27 pueden observarse las gráficas de los datos predichos contra los residuales y de los residuales vs la probabilidad normal, respectivamente.



Desirability = 0.877
Solution 1 out of 87

Figura 24. Condiciones donde se maximiza la concentración de C-ficocianina.



Desirability = 0.915
Solution 1 out of 90

Figura 25. Condiciones donde se maximiza la concentración de ficocianinas totales.

Cuadro 10. Parámetros del modelo.

Fuente	Valor de p	R ² ajustada	R ² predicha
Lineal	0.0002	0.7069	0.6144
2FI	0.9058	0.6388	0.3091
Cuadrático	0.2418	0.7059	0.5307
Cúbico	08747	0.5597	-

Cuadro 11. ANOVA del modelo lineal obtenido.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor p
Modelo	0.1433	3	0.0478	0.0002
Temperatura	0.0003	1	0.0003	0.7788
Tiempo	0.0012	1	0.0012	0.5688
Citrato	0.1418	1	0.1418	<0.0001
Residual	0.0448	13	0.0034	

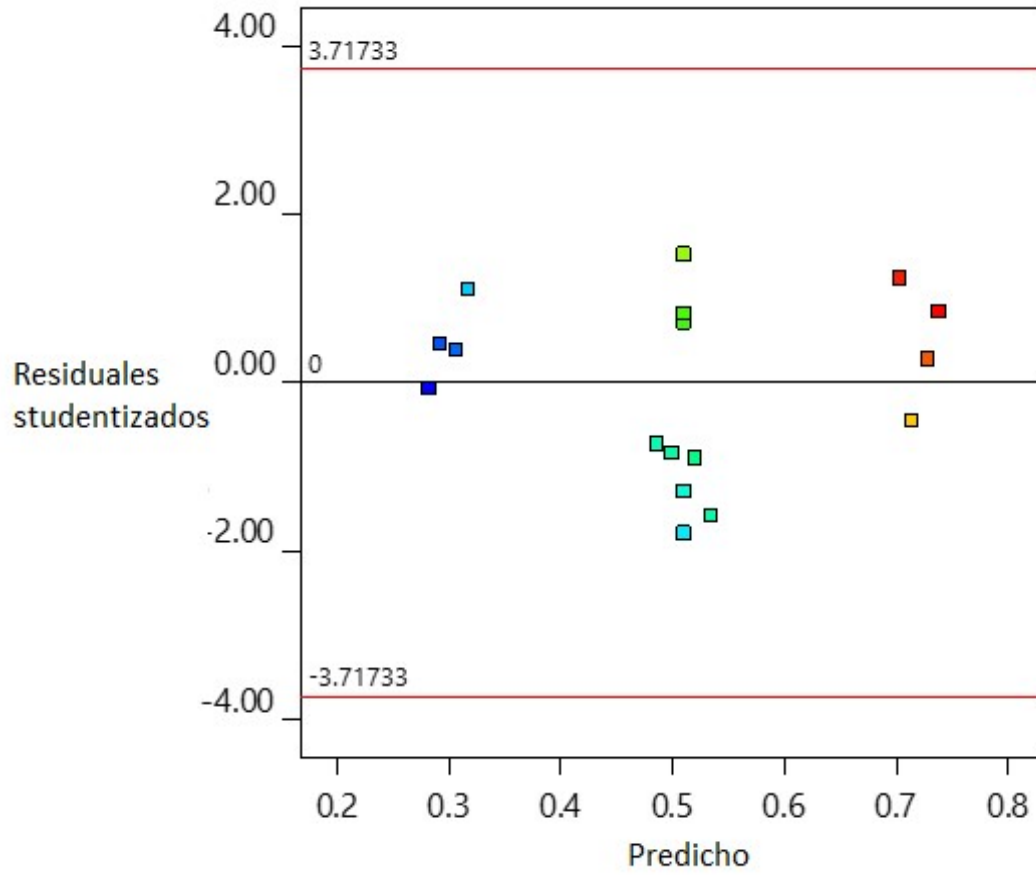


Figura 26. Gráfica de datos predichos.

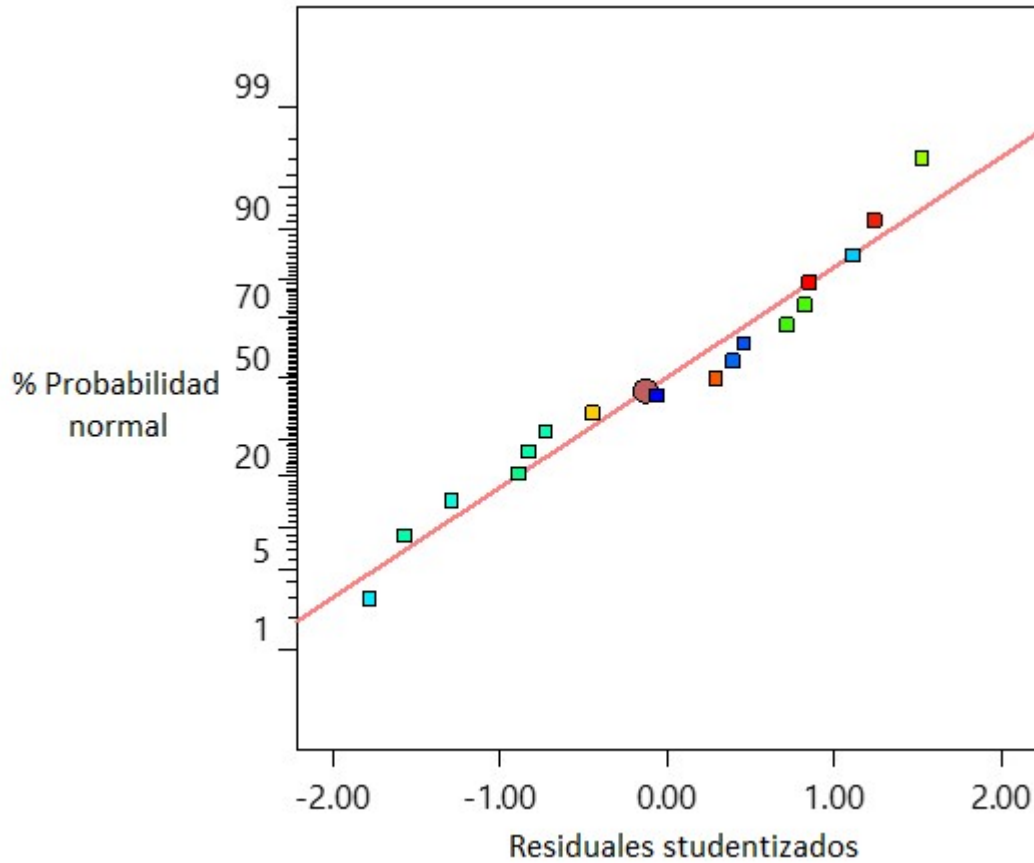


Figura 27. Gráfica de residuales.

El comportamiento de la concentración de ficocianina precipitada fue altamente dependiente de la temperatura y el tiempo de almacenamiento la Figura 28, donde la zona de mayor concentración de ficocianina se encuentra a los mayores temperaturas y tiempos utilizados, es decir a 29 horas de almacenamiento y 25 grados centígrados.

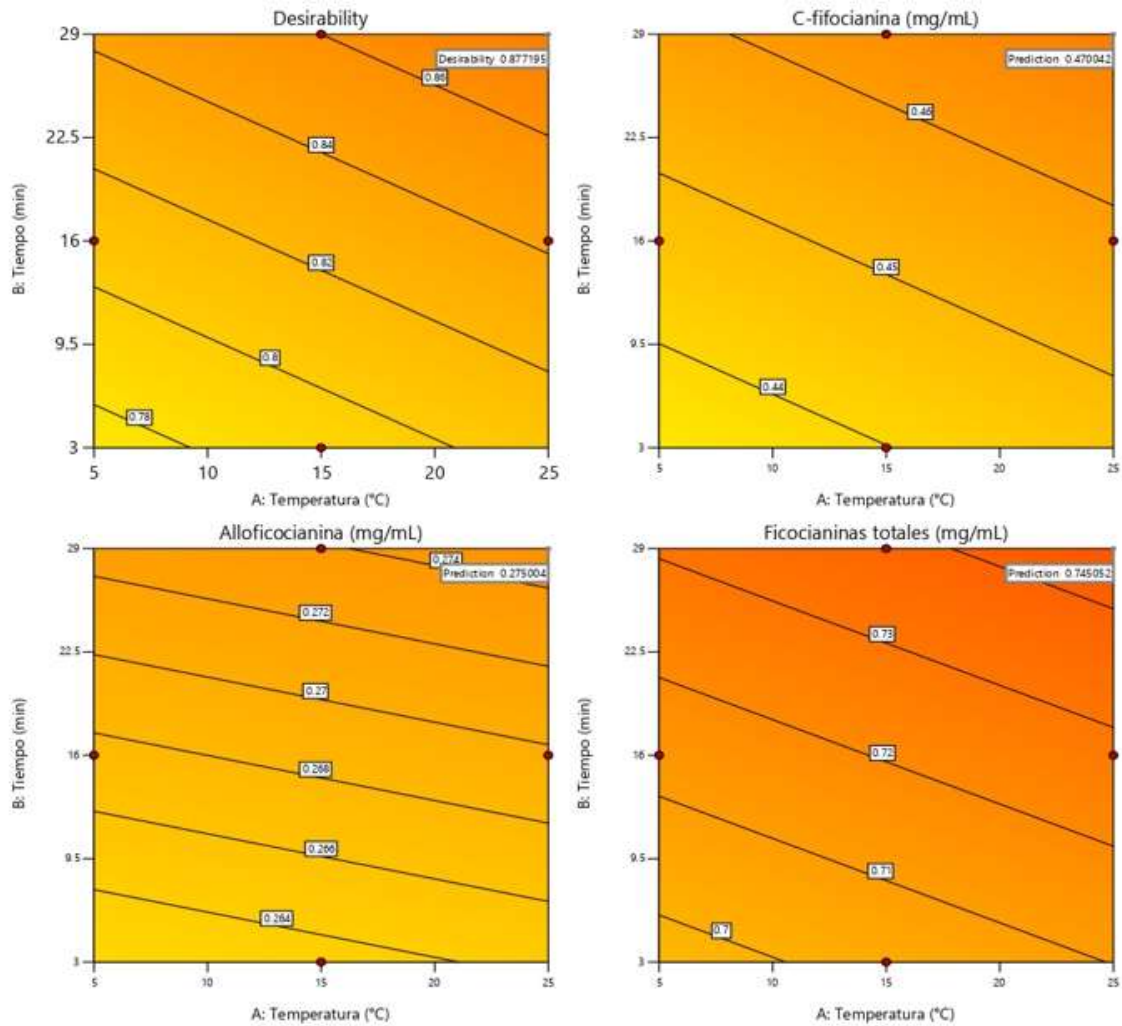


Figura 28. Gráficas de contorno con la interacción de la temperatura y tiempo.

7.5. Aplicación en bebida

La preparación de las bebidas con ficocianina no presentó ninguna dificultad, salvo la presencia de espuma en el producto que desapareció después de pocos minutos, a excepción de la prueba T3, donde permaneció en pequeña cantidad sobre la superficie del líquido.

Los resultados de las evaluaciones con consumidor se muestran a continuación:

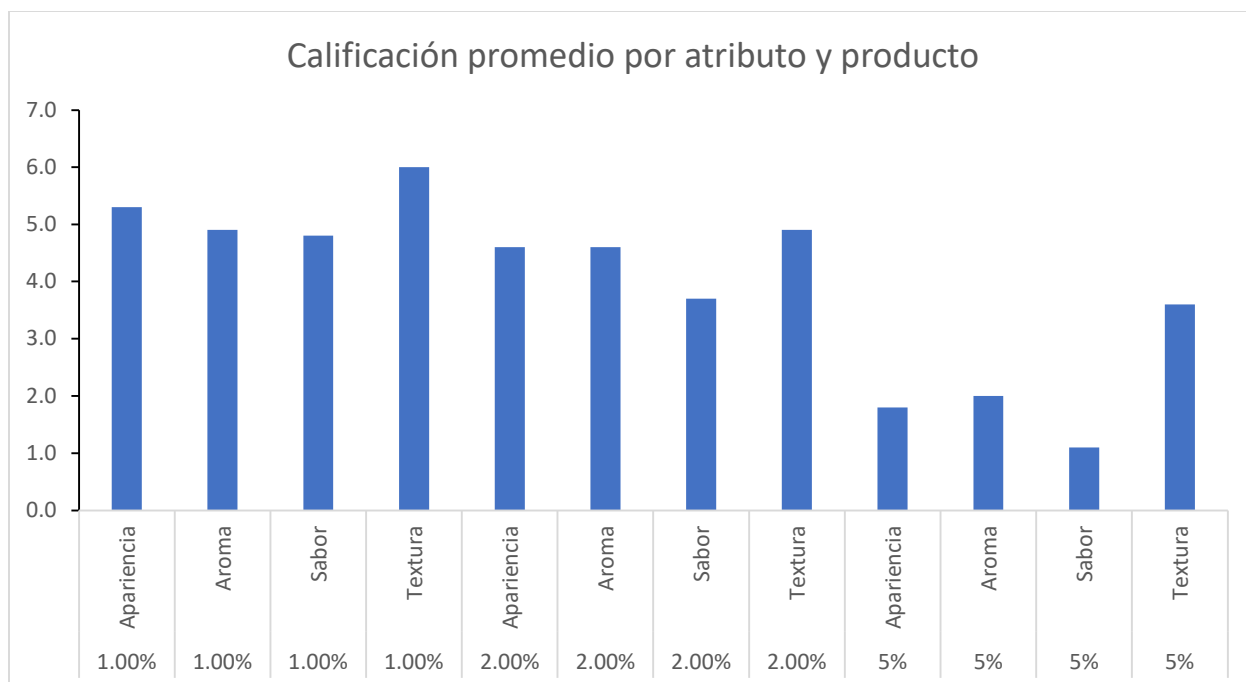


Figura 29. Calificaciones de consumidores.

En la Figura 29 se puede observar que las calificaciones de todos los atributos van disminuyendo a medida que aumenta el nivel de uso de la ficocianina en la bebida, impactando sobre todo en atributos de apariencia y aroma, donde la prueba con el 5% es la más castigada.

Por otro lado, se analizaron en laboratorio las bebidas para determinar los niveles de proteína y grasa en los productos elaborados. Estos variaron de manera ligera, de acuerdo con los resultados plasmados en el Cuadro 12. Los métodos utilizados para las determinaciones fueron Kjeldahl para proteínas y Gerber butirométrico para grasas.). Estas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y el resultado que se encuentra en el cuadro 12 es el promedio de los datos obtenidos.

Cuadro 12. Resultados de proteína y grasa en bebidas.

	T1	T2	T3
Proteína	3.23	3.14	2.95
Grasa	2.94	2.94	2.91

Finalmente, se hicieron mediciones de color de las muestras elaboradas, cuyos resultados se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 13. Resultados de color.

	L*	a*	b*
T1	82.60 ± 1.58 ^a	-5.32 ± 0.28 ^a	1.57 ± 0.05 ^a
T2	78.43 ± 0.02 ^b	-5.41 ± 0.04 ^a	-0.10 ± 0.35 ^b
T3	64.26 ± 0.21 ^c	-8.34 ± 0.03 ^b	-7.11 ± 0.08 ^c

Las letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

8. DISCUSIÓN

1. Crecimiento de espirulina

Para los tratamientos planteados, existió una diferencia significativa entre el control (medio Zarrouk) y los tratamientos suplementados con apio, ya sea fresco o en putrefacción. Esta diferencia puede relacionarse con la menor cantidad de nitritos y nitratos presentes en el medio, los cuales son necesarios para el desarrollo óptimo de la espirulina. Los compuestos nitrogenados son esenciales para el crecimiento de espirulina y la fuente de los mismos puede tener un efecto

en el crecimiento de la biomasa. Dentro de estos compuestos, el que ha demostrado tener una mayor eficiencia es el nitrato de sodio (Vieira, 2001), superior a otros compuestos base amonio, como cloruro de amonio, nitrato de amonio o sulfato de amonio, y a la urea.

Por otro lado, el apio es una fuente natural de compuestos nitrogenados, especialmente nitritos y amonio. El jugo de apio fresco puede contener alrededor de 97 ppm de nitratos y 84 ppm de amonio (Domagala, 2012). Sin embargo, estas cantidades son muy inferiores a las encontradas en el medio Zarrouk base, ya que en éste se agregaron 2.5 g/L (2500 ppm) de nitrato de sodio. En estudios se ha demostrado que la cantidad óptima para el crecimiento de espirulina donde hay una maximización de la producción de biomasa es alrededor de 0.03 M de nitrato de sodio (Vieira, 2001). Esto corresponde aproximadamente a 2500 ppm de nitrato, lo cual es el nivel suplementado en el medio Zarrouk base, por lo tanto, cualquier disminución en este nivel tendría un impacto directo en el crecimiento de la espirulina, como se observó en los datos de la imagen 1. Finalmente, el contenido de minerales del jugo de apio, principalmente potasio, fósforo, magnesio, calcio, azufre y hierro, entre otros (Domagala, 2012), no tuvo un impacto significativo en la producción de biomasa en los tratamientos suplementados con jugo de apio. Además, las características del apio podrido no lograron mejorar la producción de biomasa en los experimentos planteados, quedando al mismo nivel de los suplementados con apio fresco e inferior al tratamiento control con medio Zarrouk.

2. Extracción de ficocianina

Comparativamente, el resultado óptimo de la extracción planteada (0.378 mg/mL de ficocianina y 0.249 mg/mL de C-ficocianina) es menor a otro tipo de extracciones donde se involucra un paso previo que facilita la extracción. Por ejemplo, se ha encontrado que la disrupción celular por medio de pulsos electromagnéticos ayuda a aumentar el rendimiento de la extracción (Li, 2020). También

se han propuesto otros métodos para mejorar la extracción como una molienda previa, ultrasonido y ciclos de congelación-descongelación (Jaeschke, 2021). Los rendimientos obtenidos con las extracciones mencionadas varían entre los 5 mg/mL y 150 mg/mL de C-ficocianina, por lo que este tipo de pasos previos serían necesarios para obtener un ingrediente con una concentración suficiente para ser utilizado como materia prima para la elaboración de otros alimentos, especialmente alimentos funcionales, donde la funcionalidad (antioxidante) está dada directamente por la cantidad de ficocianina añadida.

Por otro lado, la composición de las ficocianinas en el experimento fue de 66% C-ficocianina y 34% alloficocianina, comparado con otros métodos donde se obtiene hasta un 89% de C-ficocianina en las extracciones (Li, 2020). Esta diferencia puede deberse tanto a la especie utilizada para la extracción como las condiciones específicas en las que se hizo la misma. Además, la distinta composición de las ficocianinas extraídas puede impartirle características distintas a dicho extracto, ya que la alloficocianina tiene una mayor termoestabilidad, siendo estable hasta 60 minutos a 60 grados centígrados (Gysi, 1979), mientras que la C-ficocianina empieza a degradarse a partir de los 47 grados y a 60 grados centígrados por 15 minutos, tiene una degradación de alrededor del 30% (Chaiklahan, 2012).

En cuanto a la interacción de los factores para la extracción, la temperatura, el tiempo y la cantidad de solvente tienen una influencia directa en la extracción de ficocianina, ya que mientras aumentan éstos, crece la concentración de la primera. Sin embargo, para los dos factores restantes, existe una maximización de la ficocianina alrededor de valores específicos, reduciéndose la concentración de la primera a medida que la condición se aleja de estos valores centrales. Por ejemplo, para la agitación, la cantidad máxima de extracción se obtiene alrededor de 146 rpm, observándose menores extracciones a 200 rpm. Además, para el pH, éste valor se encuentra se encuentra en 7.8,

disminuyendo la concentración de ficocianina en valores de pH menores y mayores que éste. Algunas de estas interacciones son consistentes con resultados obtenidos en otras investigaciones, donde se ha encontrado que el mayor rendimiento en la extracción de ficocianina se encuentra entre 30 y 50 grados centígrados, y donde la cantidad de solvente y el tiempo tienden a mejorar la extracción, aun sin ser una relación proporcional y que disminuye a medida que aumentan estos factores (Su, 2014). Sin embargo, otros factores no son tan consistentes con otras investigaciones, como en el caso del pH, donde se ha reportado entre 6 y 7 como los valores óptimos para la extracción.

3. Precipitación de ficocianina

Comparativamente, el resultado óptimo de la concentración de ficocianina por medio de la precipitación con citrato de sodio (0.470 mg/g de C-ficocianina y 0.745 mg/g de ficocianinas totales) es menor a otro tipo de extracciones donde se involucra un paso previo que facilita la extracción. Por ejemplo, se ha encontrado que la disrupción celular por medio de pulsos electromagnéticos ayuda a aumentar el rendimiento de la extracción (Li, 2020). También se han propuesto otros métodos para mejorar la extracción como una molienda previa, ultrasonido y ciclos de congelación-descongelación (Jaeschke, 2021). Los rendimientos obtenidos con las extracciones mencionadas varían entre los 5 mg/mL y 150 mg/mL de C-ficocianina, por lo que este tipo de pasos previos serían necesarios para obtener un ingrediente con una concentración suficiente para ser utilizado como materia prima para la elaboración de otros alimentos, especialmente alimentos

funcionales, donde la funcionalidad (antioxidante) está dada directamente por la cantidad de ficocianina añadida.

Por otro lado, la diferencia en composición de c-ficocianina y alloficocianina puede deberse tanto a la especie utilizada para la extracción como las condiciones específicas en las que se hizo la misma. Además, la distinta composición de las ficocianinas extraídas puede impartirle características distintas a dicho extracto, ya que la alloficocianina tiene una mayor termoestabilidad, siendo estable hasta 60 minutos a 60 grados centígrados (Gysi, 1979), mientras que la C-ficocianina empieza a degradarse a partir de los 47 grados y a 60 grados centígrados por 15 minutos, tiene una degradación de alrededor del 30% (Chaiklahan, 2012).

Por otro lado, la concentración obtenida como máxima en el proceso de precipitación contrasta con una concentración mayor obtenida en un experimento previo de extracción simple de ficocianina con buffer de fosfatos, donde se llegó a un resultado óptimo de 0.378 mg/mL de ficocianinas totales y 0.249 mg/mL de C-ficocianina). Por lo tanto, el proceso de precipitación sí logro incrementar la concentración de ficocianina disponible, ayudando en mejorar la calidad del material para ser utilizado como ingrediente funcional en alimentos, ya sea bebidas u otro tipo de producto.

En cuanto a la interacción de los factores para la extracción, la temperatura, el tiempo y la concentración de citrato de sodio, tuvieron una influencia directa en la precipitación de ficocianina debido a que facilitan la reacción del citrato de sodio para precipitar la ficocianina. Este efecto es directamente proporcional en temperatura y tiempo. Sin embargo, para la concentración de citrato de sodio se presenta el efecto contrario, donde una mayor concentración del mismo disminuye la concentración final de ficocianina. Esto puede deberse principalmente a un efecto diluyente de la sal en el producto final. Al no existir un incremento de la reacción al subir la concentración de

citrato de sodio más allá del 5%, el aumentar la cantidad de la sal sólo aumentó la proporción de la misma dentro del material seco que se obtiene en la etapa final, de esta manera disminuyendo la proporción de ficocianina en la mezcla. Por lo tanto, se observó que la concentración del 5% es suficiente para llevar a cabo una precipitación exitosa de la ficocianina.

4. Aplicación en bebida

Comparativamente, el producto mejor evaluado fue la prueba T1, seguido de la prueba T2 y la prueba T3. Sin embargo, esta última tuvo una calificación muy baja en la aceptación de los consumidores, por lo que podríamos considerarla como una prueba no aceptada. Los atributos de apariencia, aroma y sabor fueron castigados con calificaciones muy bajas, a diferencia de la textura que tuvo una ponderación más alta. Esto se debió directamente a las características del producto, ya que se trataba de una bebida con un intenso color azul y un sabor salado y amargo que resultó desagradable para los consumidores. Por lo anterior, el nivel de uso de la ficocianina en polvo debería estar entre 1 y 2% para poder contar con un buen nivel de aceptación por parte de consumidores y evitar defectos en la apariencia y el sabor de la bebida.



Figura 30. Bebidas evaluadas (de izquierda a derecha: ficocianina 1%; ficocianina 2%; y ficocianina 5%).

En algunos estudios, se ha analizado la aplicación de ficocianina extraída de *Arthrospira platensis* en bebidas con la finalidad de obtener coloraciones azules de manera natural en lugar de utilizar colorantes sintéticos (Ying, 2020). Se ha encontrado que la ficocianina utilizada como colorante en bebidas tiene una buena estabilidad en vida de anaquel, así como a distintos pH's (entre 3 y 9). Esta estabilidad es una característica importante de la ficocianina que ayuda en su utilización como ingrediente, ya que puede ser usado sin tener que complementar la formulación con antioxidantes o rangos reducidos de pH que limitan el tipo de ingredientes a utilizar o el tipo de bases en las que puede ser aplicada (García, 2021).

Otro punto importante a mencionar, es que una bebida con potencial para ser comercializable debe ser sometida a algún tipo de tratamiento que asegure su vida de anaquel. Sin embargo, el tratamiento térmico (como una pasteurización o esterilización) tiene el potencial de dañar la estructura de la ficocianina, haciendo que ésta pierda su característico color azul y sus propiedades funcionales. Por lo tanto, es importante encontrar tratamientos adecuados que limiten la pérdida de estas propiedades y que aseguren que el producto estaría en los anaqueles y llegaría al consumidor con las características adecuadas y aceptables. En algunos estudios se ha encontrado que esta estabilidad es muy dependiente del pH, logrando su pico (mayor estabilidad) a un pH de 3, y perdiéndose a medida que éste aumenta (Zhang, 2021). Por lo anterior, al momento de formular sería preferible utilizar bases con un pH ácido, tal vez con sabores frutales, y de esta manera ayudar a la vida de anaquel final del producto, a la vez que se desarrolla un perfil aceptado por los consumidores.

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro 12, los niveles de proteína y grasa son muy similares en todas las pruebas, aunque como es de esperarse, es mayor en la prueba T1, posteriormente en la T2 y finalmente en la T3, ya que como se vio anteriormente, la primera cuenta

con el mayor nivel de uso de leche, mientras que la T3 tiene en el menor nivel y esto impacta directamente en la cantidad de proteína añadida a la bebida.

Los colores de las tres bebidas (Cuadro 13) son diferentes entre sí en la mayoría de los parámetros, a excepción de a^* para las muestras T1 y T2. Esto se puede apreciar a simple vista, ya que las bebidas tenían un tono azul distinto entre ellas, siendo la más alejada la muestra T3 con un color azul muy intenso, como puede apreciarse en la figura 31. La diferencia en color viene dada directamente por el aumento en la concentración de ficocianina en cada una de las bebidas, ya que este compuesto, uno de los pocos pigmentos naturales con tonalidades de este tipo, imparte un color azul (longitud de onda de 618 nm) a los productos donde se utiliza por las propiedades de absorción de luz propias de su estructura química (Ying, 2020).

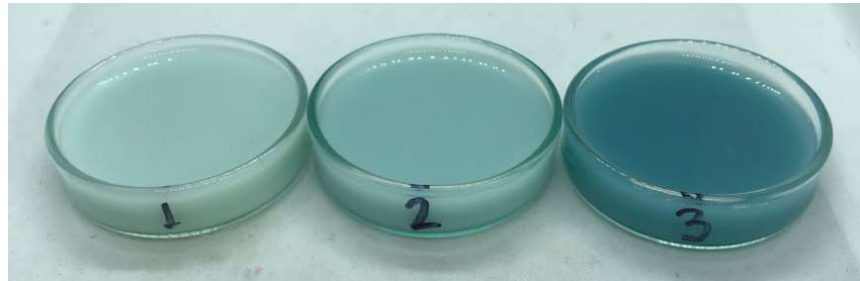


Figura 31. Color de las bebidas evaluadas (de izquierda a derecha: T1, T2 y T3).

Además, pudo constatar que la ficocianina utilizada le imparte un característico tono azul a la bebida donde se aplique al menos desde un 1% de aplicación, por lo que esto es un punto a tomar en cuenta a la hora de formular, ya que se trata de un color poco utilizado en alimentos y al que los consumidores podrían no estar acostumbrados. Por otro lado, entre mayor sea el nivel al que se agrega la ficocianina (en el caso del experimento 1, 2 y 5%), la bebida va tomando un color más intenso como se puede confirmar con los resultados de $L^*a^*b^*$ del cuadro 13. La capacidad de

proveer la tonalidad azul a bebidas sin el uso de colorantes artificiales por medio de la ficocianina ya ha sido estudiado y validado en otros experimentos (García, 2021), donde se utilizó una proporción de 0.4% de ficocianina en una bebida para obtener la misma tonalidad azul de una bebida comercial con colorantes artificiales ($L^* = 88.4$; $a^* = -15.07$; $b^* = -9.68$). Aunque en el caso del experimento mencionado y en el nuestro las muestras obtuvieron un color azul, hay ligeras diferencias en la luminosidad y en el parámetro a^* , esto debido a la matriz donde se aplicaron los extractos. En el experimento de García, la muestra se aplicó en una bebida isotónica transparente, mientras que en el nuestro se aplicó en una base de leche, lo que afectó los parámetros de color a disminuir luminosidad y a^* . Sin embargo, ambos productos tienen tonalidades azules que se consiguen actualmente con colorantes artificiales como azul brillante (E-133) e indigotina (E-132).

9. CONCLUSIONES

Crecimiento de espirulina

La suplementación del medio con jugos de apio fresco y en estado de putrefacción no representan una mejora en la producción de biomasa para espirulina en las condiciones planteadas en el experimento. Por lo tanto, se mantiene el medio base Zarrouk como el tratamiento óptimo para maximizar la producción de biomasa.

Extracción de ficocianina

Se logró determinar las condiciones a las cuales se maximiza la concentración de ficocianina extraída, con un proceso relativamente corto (25 min). Sin embargo, para llevar a cabo una aplicación industrial se necesitaría aplicar un método que aumente el rendimiento de la extracción y permitiendo de esta manera proponer un método efectivo y económicamente viable que promueva el uso de este ingrediente en la formulación de alimentos funcionales.

Precipitación de ficocianina

El proceso de precipitación logró incrementar la concentración de ficocianina a partir de extracto de espirulina en un 89% para la C-ficocianina y un 97% para las ficocianinas totales. Tomando en cuenta que la concentración de ficocianina aumentó, y por lo tanto, las impurezas disminuyeron, este paso logra adecuar de mejor manera el material para ser usado como un ingrediente funcional en alimentos que busquen un perfil nutrimental mejorado con propiedades funcionales en el organismo.

Aplicación en bebida funcional

Finalmente, la aplicación en una bebida permitió situar los niveles de uso del extracto obtenido en un rango específico donde hay una buena aceptación del consumidor, de esta manera evitando niveles mayores donde se pueden presentar defectos en el producto, enfocados sobre todo en la parte de sabor y generando un rechazo por parte del mercado.

Adicionalmente, se puede plantear la aplicación de ficocianina en bebidas con perfiles de sabor más fuerte (por ejemplo, sabores frutales, ácidos, etc.) donde el sabor de la ficocianina se pueda perder o enmascarar, y por lo tanto, llegar a niveles de aplicación mayores sin afectar de manera negativa las características sensoriales del producto, y de esta manera aumentando las propiedades funcionales del alimento.

Otro punto adicional es el color de los alimentos donde se aplica la ficocianina, ya que éstos toman un color azul que, dependiendo del nivel de uso del extracto, puede ser intenso y en ocasiones inusual para productos alimenticios, por lo que debe tenerse especial cuidado en este aspecto y evaluar de alguna manera la apreciación y aceptación de este tipo de productos por parte de consumidores, ya que en el caso de este experimento un nivel de uso del 5% causó un rechazo importante de la bebida.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Amarante, M. Cavalcante, A. Sala, L. Kalil, S. (2020). *Colour stability and antioxidant activity of C-phycoyanin-added ice creams after in vitro digestion*. Food Research International 137.
- Bao, J., Zhang, X., Zheng, J.-H., Ren, D.-F., & Lu, J. (2018). Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. Food Chemistry, 264, 64–72. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.027
- Ciferri, O; Tiboni, O (1985). The Biochemistry and Industrial Potential of *Spirulina*. Annual Review of Microbiology, 39(1), 503–526. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.002443
- Coca, M., Barrocal, V. M., Lucas, S., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2015). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. Food and Bioproducts Processing, 94, 306–312.
- Colla, L., Bertol, C., Ferreria, D., Bavaresco, J., Costa, J., Bertolin, T. Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. Brazilian Journal of Biology. 77(2), 332-339.
- Czerwonka, A. Kaławaj, K. Sławińska-Brych, A. Lemieszek, M. Bartnik, M. Wojtanowski, K. Zdzisińska, B. Rzeski, W. (2018). *Anticancer effect of the water extract of a commercial Spirulina (Arthrospira platensis) product on the human lung cancer A549 cell line*. Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol. 106, 292-302.
- Domagala, I. Gastol, M. (2012). Comparative study on mineral content of organic and conventional carrot, cereals and red beet juices. Agricultural University in Krakow.
- El-Sheekh, M. Daboo, S. Swelim, M. Mohamed, S. (2014). *Production and characterization of antimicrobial active substance from Spirulina platensis*. Iranian Journal of Microbiology, 2014; 6(2): 112-119.

FAO. Food loss index from post-harvest to distribution. 2016. Obtenido de: www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/1231/en/

FAO. The State of Food and Agriculture. 2019. Obtenido de: www.fao.org/

Frank, G. Sidler, W. Widmer, H. Zuber, H. (1978). *The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycoyanin from the cyanobacterium Mastigocladus laminosus*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 359(11): 1491-507.

García, A., Longo, E., Bermejo, R. 2021. The application of a phycoyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. Journal of Applied Phycology, 33-3059-3070.

Grand View Research. (2019). Functional foods market size, share and trend analysis report. Obtenido de: www.grandviewresearch.com

Habib M.A.B.; Parvin M.; Huntington T.C., Hasan, M. A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034., 2008.

Hosseini, S. Shahbazizadeh, S. Khosravi-Darani, K. Mozafari, M. (2013). *Spirulina paltensis*: Food and Function. Current Nutrition & Food Science. 2013, 9, 00-00.

IPSOS. (2018). Nuevas tendencias alimentarias a nivel mundial. Obtenido de: www.ipsos.com

Jaeschke, D. Rocha, I. Ferreira, L. Domeneghini, G. (2021). *Phycoyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability*. Food Research International 143.

Koníčková, R. Vaňková, K. Vaníková, J. Vánová, K. Muchová, L. Subhanová, I. Zadinová, M. Zelenka, J. Dvořák, A. Kolář, M. Strnad, H. Rimpelová, S. Ruml, T. Wong, R. Vitek, L. (2014). *Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds*. Annals of Hepatology, Vol. 13-2, 273-283.

Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M. & Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin – A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence on processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science*, 00(2020), 0.

Mia, L., Habib, A., Hoque, N., Islam, S., Rahman, M., Asif, A. A study on growth performance of *Spirulina platensis* in different concentrations of rotten apple as a carbon source. *International Journal of Excellence Innovation and Development*. 2019.

Morançais, M., Mouget, J.-L., & Dumay, J. (2018). Proteins and Pigments. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 145–175. doi:10.1016/b978-0-12-811405-6.00007-4

Nielsen. (2016). 8 de cada 10 mexicanos afirma seguir algún tipo de dieta restrictiva. Obtenido de: www.nielsen.com

Nirmala, C., Prakash, V., & Venkataraman, L. V. (1992). Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). *Food / Nahrung*, 36(6), 569–577.

Pagels, F. Guedes, A. Amaro, H. Kijjoa, A. (2019). *Phycobiliproteins from Spirulina: Chemistry and biotechnological applications*. *Biotechnology Advances*.

Pelizer, L. H., de Carvalho, J. C. M., & de Oliveira Moraes, I. (2015). Protein production by *Arthrospira (Spirulina) platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. *Biotechnology Reports*, 5, 70–76.

Pez Jaeschke, D., Rocha Teixeira, I., Damasceno Ferreira Marczak, L., & Domeneghini Mercali, G. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314.

- Prates, D. da F., Radmann, E. M., Duarte, J. H., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2018). Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, 256, 38–43.
- Rajasekaran, C., Ajeesh, M., Balaji, S., Shalini, M., Siva, R., Das, R., Fulzele, D., Kalaivani, T. Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains. *Walailak Journal*. 2015.
- Soni, R. Sudhakar, K. Rana, R. (2017). *Spirulina*- From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology* 69 (2017) 157-171.
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327–336. doi:10.1016/j.egy.2019.02.009
- Su, C., Liu, C., Yang, P., Syu, K., Chiu, C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, 123, 64-68.
- Usharani, G. Srinivasan, G. Sivasakthi, S. Saranraj, P. (2015). *Antimicrobial activity of Spirulina platensis solvent extracts against pathogenic bacteria and fungi*. *Advances in Biological Research* 9(5): 292-298.
- Vieira, J. Leal, K. Oliveira L. Magagnin, G. (2001). Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Wan, Dan (2016). Nutraceuticals || Spirulina. , (), 569–583. doi:10.1016/B978-0-12-802147-7.00042-5

Wang, X. Li, L. Chang, W. Zhang, J. Gui, L. Guo, B. Liang, D. (2001). *Structure of C-phycoyanin from Spirulina platensis at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes*. Biological Crystallography 57(6), 784-792.

Wu, Q. Liu, L. Miron, A. Klímová, B. Wan, D. Kuca, K. (2016). *The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview*. Archives of Toxicology 90, 1817-1840.

Wu, H., Wang, G., Xiang, W., Li, T. & Hui, H. (2016). Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from Spirulina platensis. International Journal of Food Properties, 19(2016), 2349-2362.

Ying, L. Zhang, Z. Paciulli, M. Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin – A natural blue colorant from dried spirulina mass: Influence of processing parameters and extraction techniques. Journal of Food Science. 00(0).

Zhang, Z., Cho, S., Dadmohammadi, Y., Li, Y., Abbaspourrad, A. (2021). Improvement of the storage stability of C-phycoyanin in beverages by high-pressure processing. Food Hydrocolloids, 110.

Zhou, Z., Liu, L., Chen, X. Factors that affect antioxidant activity of C-phycoyanins from *Spirulina platensis*. Journal of Food Biochemistry. 29(3), 313-322.