



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Valorización de la biomasa remanente del proceso de extracción de
aceite de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Diego Isaac Ramírez Salgado

Concepción, Marzo del 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción



Prof. Guía

Dra. Patricia Gómez

Prof. Co-Guía

Dr. Pablo Castro

Prof. Evaluadores

Dra. Fabiola Cruces

Dr. Enrique Ostria

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández

Concepción, Marzo del 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a todo el equipo de FICOLAB, más que un laboratorio un hogar, una familia, que me recibió y me ayudó en mi crecimiento académico y personal.

En especial agradezco a mi profesora guía la Dra. Patricia Gómez, por permitirme ser parte de FICOLAB, por su amabilidad, cordialidad, generosidad, la buena disposición a responder mis dudas, por ayudarme en cada uno de los experimentos y, sobre todo, alentarme cuando los experimentos no resultaban. Profe Patricia gracias infinitas.

Al Dr. Pablo Castro, por su buen sentido del humor, siempre la buena disposición para ayudarme en los experimentos y en especial, por resolver aquellas dudas con respuestas y explicaciones tan sencillas. Pablo gracias infinitas.

Finalmente agradezco al proyecto FONDEF ID 22I10127 por el financiamiento de esta investigación.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
INDICE.....	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCION.....	13
<i>Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas.....</i>	13
<i>Antioxidantes en microalgas.....</i>	14
<i>Actividad antioxidante de proteínas y péptidos.....</i>	15
<i>Phaeodactylum tricornutum.....</i>	16
<i>Concepto de biorrefinería en biotecnología microalgal.....</i>	18
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS.....	21
<i>Objetivo General.....</i>	21
<i>Objetivos Específicos.....</i>	21
METODOLOGIA.....	22
1. <i>Material biológico.....</i>	22
2. <i>Cultivo.....</i>	22
3. <i>Generación de biomasa residual.....</i>	23
4. <i>Análisis bioquímicos.....</i>	23
4.1 <i>Extracción y determinación de lípidos totales.....</i>	23
4.2 <i>Cuantificación de proteínas totales.....</i>	24

5. Extracción de proteínas desde la biomasa residual de <i>P. tricornutum</i>	25
6. Precipitación de proteínas	26
7. Preparación de extractos proteicos para hidrólisis enzimática	28
8. Hidrólisis enzimática	29
9. Actividad antioxidante	29
10. Análisis estadísticos	30
RESULTADOS	31
Crecimiento del cultivo.....	31
Caracterización bioquímica de la biomasa con aceite y biomasa remanente	31
Optimización de la extracción de proteínas desde la biomasa remanente mediante distintos solventes e instrumentos.....	33
Concentración de proteínas de la biomasa residual mediante precipitación	36
Extracción masiva de proteínas con hidróxido de sodio y sonicador.....	39
Determinación de actividad antioxidante del extracto proteico crudo y digerido con las proteasas tripsina y Protamex.....	39
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFIA	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 264 en un cultivo de 20 L, los valores de la curva corresponden a una réplica	31
Figura 2. Determinación del porcentaje de lípidos totales de la biomasa con aceite y biomasa residual. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$).....	32
Figura 3. Determinación del porcentaje de proteínas totales de la biomasa con aceite y biomasa residual. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$).....	32
Figura 4. Extracción de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto) desde la biomasa residual mediante agua destilada, buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio. A) Biomasa lisada con sonicador. B) Biomasa lisada con ultra-turrax. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$).....	34
Figura 5. Espuma en el primer ciclo de molienda con ultra-turrax. A) Biomasa hidratada con tampón de lisis. B) Biomasa hidratada con hidróxido de sodio	35
Figura 6. A) Precipitación por sulfato de amonio (1- Fase superior: Acuosa y 2- Fase inferior: Orgánica). B) Precipitación por partición en tres fases (1- Fase superior: Orgánica, 2- Fase intermedia: Proteínas concentradas y 3- Fase inferior: Acuosa). C) Diálisis de las fases recuperadas. D) Extracto seco obtenido del sulfato de amonio. E) Extracto seco obtenido de la separación trifásica	37
Figura 7. Determinación del porcentaje de proteínas totales concentradas en el extracto seco, obtenido por concentración con sulfato de amonio y la partición en tres fases. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas por tratamiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p > 0,05$).....	38

Figura 8. Actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP de extractos proteicos sin hidrolizar e hidrolizados con tripsina y Protamex a 2 h, 4 h y 6 h. El control corresponde al extracto sin hidrolizar. Se muestran los valores promedio de dos réplicas técnicas usadas para el análisis de actividad antioxidante. TE: equivalentes de Trolox.....39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Eficiencia extractiva de proteínas obtenida desde la biomasa residual tratada con distintos solventes (agua destilada, buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio) y lisada con sonicador y ultra-turrax	34
Tabla 2. Proteínas recuperadas y eficiencia extractiva de los métodos de concentración de proteínas con sulfato de amonio y partición en tres fases. *Valor calculado en relación a 1 g de biomasa residual	38

RESUMEN

Las microalgas, organismos eucariontes unicelulares fotosintéticos, son consideradas una de las materias primas más prometedoras para su aplicación en sectores industriales como la gestión ambiental, industria energética, cosmética, farmacéutica y alimentaria. En las últimas décadas, se han estado estudiando distintas moléculas antioxidantes que podrían ser empleadas a nivel industrial, entre esas moléculas se encuentran las proteínas y péptidos de microalgas, que actúan a través de mecanismos como, la eliminación de radicales libres, eliminación enzimática de oxidantes y quelación de metales. La actividad antioxidante de los péptidos depende de su secuencia de aminoácidos, los grupos funcionales que presenten, la longitud de los péptidos y la orientación de los mismos en la proteína nativa, por lo que, para promover dicha bioactividad, se requiere aislar los péptidos desde las proteínas nativas mediante hidrólisis enzimática para obtener hidrolizados proteicos.

Phaeodactylum tricorutum es una diatomea penada marina, que se caracteriza por presentar tres morfotipos diferentes: fusiforme, trirradiado y ovalado; además es una especie industrialmente relevante, ya que acumula metabolitos como el pigmento carotenoide fucoxantina y el ácido graso poliinsaturado omega-3 ácido eicosapentaenoico (EPA). La industrialización y comercialización de microalgas aún no es del todo rentable, siendo una de las causas el que se obtenga solo un producto desde su biomasa, lo cual ha motivado aplicar un nuevo enfoque, en el que todos los componentes de la biomasa se valoricen, lo cual puede lograrse aplicando el concepto de biorrefinería. En el caso de la extracción de ácidos grasos y fucoxantina desde la biomasa de *P. tricorutum*, se obtiene una biomasa residual que contiene entre un 25-30% de proteínas y que, mediante hidrólisis enzimática de dichas proteínas, se pueden obtener hidrolizados proteicos, con propiedades funcionales mejoradas respecto a la proteína cruda y de gran interés para la industria como son los antioxidantes.

Bajo este contexto, la hipótesis que se planteó en este estudio fue que los péptidos derivados de la hidrólisis de las proteínas de *P. tricorutum* tienen mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas. Para lo cual: 1- Se analizó el contenido proteico de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite de *P. tricorutum* y 2- Se dilucidó si las proteínas hidrolizadas de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite de *P. tricorutum* tienen mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas.

Para ello se estableció un cultivo de 20 L de *P. tricornutum* para obtener biomasa, esta se mezcló junto con otra biomasa liofilizada proveniente de otros cultivos realizados en condiciones similares. Dicha biomasa se sometió a un procedimiento de extracción de lípidos obteniéndose una biomasa sin aceite (biomasa remanente). A la biomasa con aceite y biomasa remanente se les cuantificó lípidos totales y proteínas totales. El análisis lipídico indicó que la biomasa con aceite tuvo un 11,21% de lípidos mientras que la biomasa residual tuvo un 7,65%. El contenido de proteínas de la biomasa con aceite fue del 8,86% y de la biomasa residual un 11,15%. Con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de proteínas desde la biomasa remanente, se procedió a hidratar esta biomasa con agua destilada (pH 7), buffer fosfato (pH 7), tampón de lisis (pH 7) e hidróxido de sodio (pH 10) para posteriormente lisar independientemente con un sonicador y un ultraturrax. Los resultados indicaron que la combinación hidróxido de sodio/sonicador fue el tratamiento con el que se obtuvo la mayor extracción de proteínas ($5173,57 \pm 247,38$ $\mu\text{g/mL}$) y con una eficiencia extractiva del 74,23%. Con el propósito de concentrar las proteínas, se ensayaron dos métodos de precipitación: 1- Sulfato de amonio y 2- Partición en tres fases (TPP), mediante el primer método se recuperó un 0,25% de las proteínas que contenía la biomasa remanente (11,15% de proteína/biomasa) mientras que, con el segundo método se recuperó un 0,19%. Considerando estos resultados se decidió no precipitar las proteínas. Para evaluar si las proteínas hidrolizadas de la biomasa residual tenían mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas, se realizó la hidrólisis enzimática del extracto proteico con tripsina y Protamex, en diferentes tiempos de digestión enzimática (2 h, 4 h y 6 h) y luego se midió la actividad antioxidante de los extractos de proteínas sin hidrolizar e hidrolizados, mediante el ensayo de capacidad de reducción del hierro (FRAP). Los resultados revelaron que los extractos hidrolizados tuvieron mayor actividad antioxidante que el extracto sin hidrolizar (287,58 $\mu\text{moles de TE/L}$). Además, los hidrolizados proteicos producidos por tripsina y Protamex tuvieron diferente actividad antioxidante entre los diferentes tiempos de hidrólisis. Estos resultados sugieren que a partir de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite desde *P. tricornutum*, se pueden generar hidrolizados proteicos con mayor actividad antioxidante que la proteína cruda y, por lo tanto, con mayor valor agregado en comparación al residuo sin tratar.

Palabras claves: *Phaeodactylum tricornutum*, Biomasa Remanente, Hidrolizados Proteicos, Actividad Antioxidante

ABSTRACT

Microalgae, photosynthetic unicellular eukaryotic organisms, are considered one of the most promising raw materials for application in industrial sectors such as environmental management, energy, cosmetics, pharmaceutical and food industries. In recent decades, different antioxidant molecules have been studied that could be used at an industrial level. Among these molecules are proteins and peptides from microalgae, which act through mechanisms such as the elimination of free radicals, enzymatic elimination of oxidants, and metal chelation. The antioxidant activity of peptides depends on their amino acid sequence, the functional groups they present, the length of the peptides and their orientation in the native protein, therefore, to promote said bioactivity, it is necessary to isolate the peptides from native proteins, through enzymatic hydrolysis to obtain protein hydrolysates.

Phaeodactylum tricornutum is a marine pennate diatom, which is characterized by presenting three different morphotypes: fusiform, triradiate and oval; It is also an industrially relevant species, since it accumulates metabolites such as the carotenoid pigment fucoxanthin and the omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA). The industrialization and commercialization of microalgae is not yet completely profitable, one of the causes being that only one product is obtained from its biomass, which has motivated the application of a new approach, in which all the components of the biomass are valorized. which can be achieved by applying the biorefinery concept. In the case of the extraction of fatty acids and fucoxanthin from the biomass of *P. tricornutum*, a residual biomass is obtained that contains between 25-30% of proteins and, through enzymatic hydrolysis of said proteins, protein hydrolysates can be obtained. with improved functional properties compared to crude protein and of great interest to the industry such as antioxidants.

Under this context, the hypothesis raised in this study was that peptides derived from the hydrolysis of *P. tricornutum* proteins have greater antioxidant activity than crude proteins. For which: 1- The protein content of the remaining biomass from the *P. tricornutum* oil extraction process was analyzed and 2- It was elucidated whether the hydrolyzed proteins of the remaining biomass from the *P. tricornutum* oil extraction process have greater antioxidant activity than crude proteins. For this, a 20 L culture of *P. tricornutum* was established to obtain biomass, this was mixed together with other freeze-dried biomass

from other cultures carried out under similar conditions. Said biomass was subjected to a lipid extraction procedure, obtaining a biomass without oil (remaining biomass). Total lipids and total proteins were quantified in the biomass with oil and remaining biomass. The lipid analysis indicated that the biomass with oil had 11,21% lipids while the residual biomass had 7,65%. The protein content of the biomass with oil was 8,86% and of the residual biomass was 11,15%. With the objective of recovering the greatest amount of proteins from the remaining biomass, this biomass was hydrated with distilled water (pH 7), phosphate buffer (pH 7), lysis buffer (pH 7) and sodium hydroxide (pH 10) to subsequently lyse independently with a sonicator and an ultra-turrax. The results indicated that the sodium hydroxide/sonicator combination was the treatment with which the highest protein extraction was obtained ($5173,57 \pm 247,38 \mu\text{g/mL}$) and with an extractive efficiency of 74,23%. With the purpose of concentrating the proteins, two precipitation methods were tested: 1- Ammonium sulfate and 2- Three-phase partition (TPP). Using the first method, 0,25% of the proteins contained in the remaining biomass were recovered (11,15% protein/biomass) while, with the second method, 0,19% was recovered. Considering these results, it was decided not to precipitate the proteins. To evaluate whether the hydrolyzed proteins from the residual biomass had greater antioxidant activity than the crude proteins, the enzymatic hydrolysis of the protein extract was carried out with trypsin and Protamex, at different enzymatic digestion times (2 h, 4 h and 6 h) and then measured the antioxidant activity of unhydrolyzed and hydrolyzed protein extracts, using the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The results revealed that the hydrolyzed extracts had greater antioxidant activity than the unhydrolyzed extract (287,58 $\mu\text{moles of TE/L}$). Furthermore, the protein hydrolysates produced by trypsin and Protamex had different antioxidant activities between the different hydrolysis times. These results suggest that from the remaining biomass of the oil extraction process from *P. tricornutum*, protein hydrolysates can be generated with greater antioxidant activity than crude protein and, therefore, with greater added value compared to the untreated residue.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, Remaining Biomass, Protein Hydrolysates, Antioxidant Activity

INTRODUCCION

Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

La preocupación por el cuidado del medio ambiente ha llevado a que actualmente se busquen medidas innovadoras y ambientalmente sostenibles, que ayuden tanto a la preservación de los recursos naturales disponibles como al crecimiento socioeconómico de una nación (Sunday *et al.*, 2022; Butler *et al.*, 2020), entre esas medidas se encuentra la transición a un modelo de bioeconomía circular, es decir, una economía en que se empleen como materia prima, recursos biológicos renovable y/o bioprocesos integrados con el fin de obtener productos económicamente viables y paralelamente reducir al mínimo la generación de residuos (Butler *et al.*, 2020). En este sentido, las microalgas son materia prima que pueden ser empleadas y aplicadas en distintos sectores industriales (Celi *et al.*, 2022), entre ellos se encuentran, la gestión ambiental, industria energética, cosmética, farmacéutica y alimentaria (Olabi *et al.*, 2023).

En cuanto a gestión ambiental, la biorremediación ha empleado microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* (Batista *et al.*, 2015) para el tratamiento de aguas residuales industriales, domésticas y agrícolas (Alaswad *et al.*, 2015). Mientras que la industria energética ha utilizado microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* en la producción de bioetanol (Singh & Das, 2020) y biohidrógeno (Nagarajan *et al.*, 2017; Show *et al.*, 2019). *Nannochloropsis sp.* se ha utilizado para la generación de biodiésel (Escobedo & Castillo, 2021) y *S. obliquus* (Zhang *et al.*, 2006) y *C. vulgaris* (Yang *et al.*, 2011) para obtener biogás (Mussgnug *et al.*, 2010).

Por otra parte, las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria animal y humana, se han enfocado en el cultivo de microalgas para la elaboración de productos, ya que, son una gran fuente para acumular compuestos bioactivos (Jacob-Lopes *et al.*, 2019). Para el rubro cosmético, *Dunaliella salina* es una especie reconocida comercialmente por la obtención del β -caroteno, que es empleado para la elaboración de cremas y bloqueadores solares (Olabi *et al.*, 2023). En la industria farmacéutica, han utilizado a *Isochrysis galbana* para extraer antioxidantes como la fucoxantina (Kim *et al.*, 2012) en cambio, la acuicultura ha recurrido al cultivo de *I. galbana* para alimentar larvas de peces y bivalvos (Pereira *et al.*, 2017). Misma situación ocurre para la alimentación de las personas quienes necesitan, por ejemplo, consumir ácidos grasos omega-3 como el ácido docosaheptaenoico

(DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), cuya fuente tradicional ha sido el aceite de pescado, sin embargo, dada la demanda de su producción se han encontrado otras fuentes alternativas para su obtención, entre esas fuentes están *I. galbana* y *Phaeodactylum tricorutum*, respectivamente (Katiyar & Arora, 2020).

En los últimos años, dada la búsqueda de ingredientes funcionales y sostenibles para la aplicación alimenticia, se han estudiado distintas moléculas antioxidantes de origen microalgal, ya que, poseen un gran potencial como aditivo alimentario (Ryan *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2022).

Antioxidantes en microalgas

La oxidación es el proceso por el cual una molécula pierde electrones, ya sea, mediante reacciones catalizadas por enzimas o la captura de electrones inducido por moléculas oxidantes (Sáez & Están-Capell, 2014) entre las que se encuentran los radicales libres, que son un grupo de moléculas que poseen uno o más electrones desapareados, otorgándoles así su alta afinidad y tendencia a interactuar y reaccionar con otras moléculas (Lobo *et al.*, 2010; Sáez & Están-Capell, 2014).

Uno de los tipos de radicales libres son las especies reactivas del oxígeno (ROS), que se forman producto de la reducción del oxígeno (O_2) y entre los cuales se encuentran, el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo ($\cdot OH$), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos (ROOH), entre otros (Sáez & Están-Capell, 2014; Wang, 2016). Dichas ROS pueden llegar a ser nocivas para los organismos, ya que, pueden causar daño celular al ser capaces de reaccionar con ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos (de Souza *et al.*, 2019). Sin embargo, los organismos poseen antioxidantes, moléculas que pueden evitar o retrasar significativamente el daño oxidativo causado por las ROS (Gulcin, 2020).

Estas moléculas antioxidantes también se encuentran presentes en las microalgas cuyo fin es proteger a las células del daño oxidativo, ya que, generalmente en las microalgas los radicales provienen desde la cadena transportadora de electrones del cloroplasto y de la mitocondria, así como también desde los peroxisomas (Coulombier *et al.*, 2021). Es por ello, que las microalgas presentan una gran diversidad de moléculas antioxidantes (Assunção *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2007) entre ellas destacan: (1) Polifenoles: ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides y estilbenos (Sansone & Brunet, 2019; Leopoldini

et al., 2011). (2) Carotenoides: astaxantina, luteína, neoxantina, zeaxantina, diatoxantina y diadinoxantina (Takaichi, 2011; Huang *et al.*, 2017). (3) Esteroles: desmosterol, ergosterol, sitosterol y clionasterol (Galasso *et al.*, 2019). (4) Vitaminas: vitaminas A, B (B₁, B₂, B₃, B₆ y B₇), C, D y E (Hosseini & Shariati, 2009; Gulcin, 2020). (5) Otras moléculas: polisacáridos sulfatados, proteínas y péptidos (Sansone & Brunet, 2019; Sharma *et al.*, 2012). Estas moléculas se encuentran en distintos compartimentos celulares dentro de las microalgas y, como se ha mencionado anteriormente, evitan el daño oxidativo causado por los radicales libres (Sharma *et al.*, 2012).

Actividad antioxidante de proteínas y péptidos

Las proteínas son macromoléculas constituidas por aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos, a su vez, cuando los aminoácidos se unen forman pequeños fragmentos denominados péptidos (Alas-Guardado *et al.*, 2011). Tanto los péptidos como las proteínas poseen actividad antioxidante que está dada por ciertos mecanismos que inhiben la oxidación de moléculas biológicas, entre esos mecanismos se encuentran, la eliminación de radicales libres, eliminación enzimática de oxidantes y quelación de metales (Ryan *et al.*, 2008).

La eliminación de radicales libres comprende la inactivación de las ROS, aquello puede ocurrir a través de dos vías, la primera de ellas es la transferencia de átomos de hidrógeno, que consiste en la transferencia de un protón y un electrón de una molécula antioxidante a un radical libre (Lorenzo *et al.*, 2018). La segunda vía es la transferencia de un único electrón, en la que existe la transferencia de un electrón de un antioxidante a un radical libre, en ambos casos, el radical libre alcanza su estabilidad electrónica (Darcy *et al.*, 2018).

Los sistemas biológicos poseen también enzimas antioxidantes, que son un grupo de proteínas involucradas en la transformación catalítica de las ROS, en moléculas más estables, menos reactivas y no tóxicas (Sáez & Están-Capell, 2014). Entre esas enzimas destacan: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), entre otras (Ryan *et al.*, 2008).

Metales como el cadmio (Cd) y arsénico (As) pueden inhibir la actividad antioxidante del glutatión (Flora, 2009), otros como el hierro (Fe) y el cobre (Cu) promueven la generación de radicales libres (Zhu *et al.*, 2022), por lo que para evitar o disminuir los efectos

negativos de los distintos iones metálicos, en la mayoría de los sistemas biológicos se encuentran ciertas proteínas cuya función biológica es quelar metales (Ryan *et al.*, 2008), para ello estas proteínas poseen péptidos específicos que contienen aminoácidos como la histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina y treonina (Diaz & Decker, 2004), responsables de formar enlaces de coordinación con los iones metálicos (Zhu *et al.*, 2022).

La actividad biológica de los péptidos depende de la secuencia de aminoácidos, de los grupos funcionales y de la longitud (Kumar *et al.*, 2022). Otro aspecto importante es que los péptidos pueden estar inactivos dentro de la secuencia de las proteínas (Chalamaiah *et al.*, 2012; López-Rodríguez *et al.*, 2021), producto del plegamiento de las mismas y que los aminoácidos queden orientados hacia el interior de la proteína, provocando que los péptidos en este estado no muestren actividad biológica, entre ellas la actividad antioxidante (Kong & Xiong, 2006; Ryan *et al.*, 2008). Es por ello que, para promover dicha bioactividad, se requiere aislar los péptidos desde las proteínas nativas mediante hidrólisis enzimática o química para así obtener hidrolizados proteicos, es decir, péptidos de diferentes tamaños (Abebaw & Admassu, 2020).

Phaeodactylum tricornutum

Phaeodactylum tricornutum es una diatomea penada marina, que posee un solo cloroplasto con tilacoides en grupos de tres (Borowitzka, 2018; Butler *et al.*, 2020; Celi *et al.*, 2022). En comparación a otras especies de este mismo grupo, *P. tricornutum* es pleomórfica lo que implica que tenga tres morfotipos diferentes: fusiforme, trirradiado y ovalado (De Martino *et al.*, 2007). Las células ovaladas generalmente son bentónicas, en cambio, las fusiformes y trirradiadas son planctónicas (Vartanian *et al.*, 2009), siendo el morfotipo fusiforme el más frecuente de encontrar en aguas naturales y cultivos (De Martino *et al.*, 2007). Junto con ello las células están asociadas a conversiones morfológicas reversibles que pueden variar de acuerdo a condiciones ambientales y condiciones de cultivo (medio de cultivo, salinidad, pH y temperatura) (Celi *et al.*, 2022). Se ha estudiado que este pleomorfismo podría ser en parte responsable de la gran adaptabilidad que posee *P. tricornutum* a diversos entornos (Butler *et al.*, 2020; Falciatore *et al.*, 2020).

Otra particularidad de esta especie es que su pared celular esta poco silicificada, en cambio, está compuesta principalmente por un polisacárido, denominado

glucuronomanano sulfatado (Le Costaouëc *et al.*, 2017). No obstante, los morfotipos fusiforme y trirradiado se caracterizan por tener frústulos completamente orgánicos (Borowitzka, 2018), con bandas de sílice (Tesson *et al.*, 2009) mientras que, en las células ovaladas, ambas valvas pueden ser orgánicas, o bien, una de las dos valvas está compuesta de sílice (Borowitzka, 2018). Además, el morfotipo ovalado posee un único rafe, que generalmente se encuentra en la hipoteca (Tesson *et al.*, 2009).

Phaeodactylum tricornutum es una especie comercialmente relevante, ya que, es cultivada a gran escala debido a su rápido crecimiento y alta eficiencia fotosintética (Sun *et al.*, 2022). Además, esta especie acumula metabolitos comercialmente importantes como el EPA, este ácido graso junto al DHA, se obtienen del aceite de pescado, pero producto de su olor desagradable, la sobrepesca del recurso y presencia de metales pesados, llevaron a buscar alternativas sostenibles para la producción de aceites que tuvieran estos dos ácidos grasos (Kadalag *et al.*, 2022); entre esas alternativas se encuentra el cultivo de *P. tricornutum*, cuyo perfil de ácidos grasos puede llegar a contener un 35% de EPA (Hamilton *et al.*, 2014) sin embargo, se requieren de más estudios para aumentar la productividad del EPA en la especie, para así facilitar su aplicación industrial (Celi *et al.*, 2022). Los aceites que contienen EPA y DHA son relevantes para la elaboración de alimentos para humanos y animales (Cui *et al.*, 2020); para el ser humano el EPA y DHA cumplen funciones en la salud ocular, neurodesarrollo y prevención de enfermedades cardiovasculares (Celi *et al.*, 2022).

Otro metabolito que acumula esta especie es el pigmento carotenoide fucoxantina, a una concentración entre 16 y 26 mg/g de biomasa seca (Kim *et al.*, 2012) cuya demanda de producción está aumentando (Shannon & Abu-Ghannam, 2017), debido a que, es reconocida por ser un compuesto bioactivo de gran importancia para la salud humana, ya que, se ha estudiado sus efectos antiinflamatorios, antiobesidad, antidiabéticos, anticancerígenos y antioxidantes (Song *et al.*, 2020). También se utiliza como aditivo alimentario para mejorar el valor nutricional de los alimentos, demostrándose que es seguro para el consumo humano y animal (Shannon & Abu-Ghannam, 2017; Sun *et al.*, 2022), además se emplea como colorante para conferir color naranja a los alimentos (Ribeiro *et al.*, 2017).

Concepto de biorrefinería en biotecnología microalgal

Las microalgas al ser organismos fotosintéticos, tienen la capacidad de utilizar el dióxido de carbono (CO₂) como materia prima, pueden crecer relativamente rápido proporcionando una alta tasa de producción de biomasa en poco tiempo, se adaptan a distintas condiciones de cultivo y además sintetizan y acumulan una gran variedad de metabolitos (Butler *et al.*, 2020; Celi *et al.*, 2022), por lo que son consideradas una buena fuente para obtener productos con distintos propósitos biotecnológicos (Cui *et al.*, 2020). A pesar de esta serie de ventajas, la industrialización y comercialización de microalgas no es aún del todo rentable, ya que, gran parte de las industrias tradicionalmente han utilizado la biomasa de microalgas para obtener un único producto (Ruiz *et al.*, 2016). Por lo anterior, se ha propuesto que para mejorar la factibilidad económica de los procesos productivos de microalgas a gran escala, todos los componentes de la biomasa deberían valorizarse y esto se puede lograr aplicando el concepto de biorrefinería (Kumar *et al.*, 2022), que corresponde al fraccionamiento de la biomasa para elaborar distintos productos y subproductos, a través de la aplicación de diferentes procesos físicos, químicos y bioquímicos (Butler *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022) con el objetivo de producir un mayor volumen de productos a un menor costo de producción (Butler *et al.*, 2020). De este modo la biorrefinería es considerada una solución ambientalmente sostenible y económicamente viable, sin embargo, falta aún optimizar ciertas tecnologías asociadas a las distintas etapas del procesamiento industrial de las microalgas, para que así se pueda obtener desde la biomasa, múltiples bioproductos (Ruiz *et al.*, 2016).

El enfoque principal que tenía la biorrefinería de biomasa de microalgas, era la generación de biocombustibles mediante distintas metodologías termoquímicas (Koyande *et al.*, 2019). No obstante, en los últimos años, se ha dado mayor prioridad hacia la producción de otros bioproductos de alto valor para así promover su aplicación industrial (Sunday *et al.*, 2022). Es el caso de la extracción de EPA y fucoxantina desde la biomasa de *P. tricornutum* (Cui *et al.*, 2020; García *et al.*, 2021). De dicho proceso se obtiene una biomasa residual que contiene entre un 25-30% de proteínas (Derbel *et al.*, 2023) además, a través de la hidrólisis enzimática de dichas proteínas se pueden obtener hidrolizados proteicos, con propiedades funcionales mejoradas y de gran interés para la industria como son los antioxidantes (López-Rodríguez *et al.*, 2021). Se ha reportado que las proteínas crudas e hidrolizados proteicos de *Rhodomonas sp.* (Derbel *et al.*, 2023), *Arthrospira maxima*, *A. platensis* (López-Rodríguez *et al.*, 2021), *S. obliquus* (Afify *et al.*, 2018),

Porphyridium purpureum y *P. tricornutum* (Stack *et al.*, 2018) poseen actividad antioxidante. Además, en la mayoría de estos estudios informaron que los hidrolizados proteicos tenían mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas, excepto en Derbel *et al.* (2023). Con estos antecedentes se pretende evaluar si las proteínas hidrolizadas de la biomasa residual de *P. tricornutum* poseen mayor actividad antioxidante que la proteína cruda, sin hidrolizar.

HIPOTESIS

Los péptidos derivados de la hidrólisis de las proteínas de *Phaeodactylum tricornutum* tienen mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Valorizar la biomasa residual del proceso de extracción de aceite de *Phaeodactylum tricornutum*.

Objetivos Específicos

1. Analizar el contenido proteico de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite de *Phaeodactylum tricornutum*.
2. Dilucidar si las proteínas hidrolizadas de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite de *Phaeodactylum tricornutum* tienen mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas.

METODOLOGIA

1. *Material biológico*

Para el desarrollo del presente estudio se empleó la cepa de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* CCM-UdeC 264, que se encuentra depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas de la Universidad de Concepción (CCM-UdeC), Chile.

2. *Cultivo*

La cepa se cultivó en medio de cultivo Walne (Walne, 1970) con triple concentración de nitrato y fosfato, en un volumen de 20 L, con aireación constante, temperatura de 21 ± 2 °C, densidad de flujo fotónico de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y fotoperiodo 16:8 (Luz: Oscuridad).

El crecimiento del cultivo se determinó mediante conteo celular, utilizando una cámara Neubauer y un microscopio óptico. Con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento y se determinó la tasa de crecimiento máxima durante la fase exponencial, siendo expresada en divisiones por día, para aquello se utilizó la fórmula de Guillard (1973), la cual se detalla a continuación:

$$k = (3,322/t_2 - t_1) \times \log (N_2/N_1)$$

Donde: t_1 y t_2 son los tiempos entre los cuales se calculó la tasa de crecimiento y N_1 y N_2 son las densidades celulares obtenidas en los días t_1 y t_2 , respectivamente. Luego, el cultivo se cosechó mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C. La biomasa cosechada se congeló durante 24 h a -20 °C y se secó mediante liofilización a -50 °C con una presión de 100 Millitorr durante 72 h. Esta biomasa se mezcló junto con otra biomasa liofilizada proveniente de otros cultivos realizados en condiciones similares, se pesó y molió en un mortero de porcelana, para luego ser almacenada a -20 °C hasta su uso.

3. *Generación de biomasa residual*

La biomasa fue sometida a un proceso de extracción de lípidos, por extracción pasiva con hexano (C_6H_{14}), para ello se prepararon 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml, en cada uno de los cuales se mezcló 10 g de biomasa liofilizada con 125 mL de C_6H_{14} , se marcó el nivel del solvente y los matraces fueron tapados con papel parafilm, al que se le hicieron agujeros, para luego colocar los matraces en un agitador orbital (SK-300) a 100 rpm durante 6 días a temperatura ambiente. Durante este tiempo se fue reponiendo el solvente evaporado. Tras los 6 días se trasvasió el solvente a tubos Falcon, estos tubos se dejaron reposar durante 15 min, para luego recuperar la biomasa decantada y secarla en estufa a 37 °C por 4 días. La biomasa sin aceite seca proveniente de los 10 matraces, ahora en adelante llamada biomasa residual, se juntó y molió en un mortero de porcelana, para así pesarla y almacenarla a -20 °C hasta su posterior análisis.

4. *Análisis bioquímicos*

Los análisis bioquímicos fueron realizados a la biomasa antes y después de la extracción de lípidos, es decir, la biomasa con aceite y biomasa residual, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.1 *Extracción y determinación de lípidos totales*

La extracción de lípidos se realizó de acuerdo a lo descrito por Bligh & Dyer (1959), con modificaciones. En viales de plástico se pesaron 30 mg de biomasa microalgal, se agregaron a cada vial 2 esferas de homogenización junto con 1 mL de metanol (CH_3OH) y se procedió a realizar en el equipo FastPrep-24, la homogenización en 8 ciclos a 4,0 m/s durante 20 segundos/ciclo. Luego se transfirió el contenido de cada vial hacia tubos de vidrio, a su vez, las esferas de homogenización y los viales se lavaron con 2 mL adicionales de CH_3OH , dicho volumen se transfirió a los tubos de vidrio. Se añadieron a cada tubo 1,5 mL de cloroformo ($CHCl_3$) y 0,8 mL de agua destilada, para después homogenizar en vortex durante 35 s y ser almacenados durante 24 h a 4 °C. Los tubos se centrifugaron a 3200 rpm durante 10 min a 21 °C, y los sobrenadantes se transfirieron con pipeta Pasteur a tubos de vidrio limpios. A continuación, se adicionó 1,5 mL de $CHCl_3$ y 1,6 mL de agua destilada. Los tubos se homogenizaron en vortex durante 35 s y después se centrifugaron a 3200 rpm durante 10 min a 21 °C, para así, eliminar con pipeta Pasteur

la fase acuosa y transferir la fase clorofórmica a tubos de vidrio limpios. A la fase clorofórmica se le añadió 500 µl de acetona (C₃H₆O) y los tubos se dejaron en la estufa a 38 °C durante 3 días. Transcurrido este tiempo, a los tubos se les agregó 1 mL de CHCl₃:CH₃OH (1:2) y se homogenizaron en vortex durante 1 min, para luego, tomar alícuotas de 250 µl de los extractos, que se añadieron a tubos de vidrio limpios, los cuales se utilizaron para la determinación de lípidos totales. Dichos tubos se dejaron evaporar a 38 °C por 24 h.

La determinación de lípidos totales se realizó siguiendo la técnica de Marsh & Weinstein (1966). Para esto, a cada tubo se agregó 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄), se cubrieron con papel de aluminio, para posteriormente ser llevados a la estufa a 200 °C durante 15 min. Luego los tubos fueron enfriados a -18 °C por 5 min, para después, añadir 8 mL de agua destilada y agitar en vortex durante 8 s. Los tubos fueron enfriados a -18 °C por 5 min, y luego, se realizó la lectura de la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (Jasco V-750) a 375 nm. Se utilizó como estándar, la tripalmitina para la respectiva curva de calibración. Los resultados fueron expresados como porcentaje de lípidos totales en la biomasa seca.

4.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Para esto se requirió la preparación de las siguientes soluciones:

- Solución A: Carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2% p/v en hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M
- Solución B1: Sulfato de cobre (CuSO₄ x 5H₂O) al 0,5% p/v en agua destilada
- Solución B2: Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆ x 4H₂O) al 1% p/v en agua destilada
- Solución C: 49 mL de solución A + 1 mL de solución B1 + 1 mL de solución B2
- Solución D: Dilución del Reactivo de Folin-Ciocalteu 50% v/v en Agua destilada

En tubos de vidrio se pesaron 30 mg de biomasa microalgal, se agregaron 5 ml de NaOH 0,1 M y se agitó en vortex. Los tubos se dejaron en una placa calefactora a 100 °C durante

1 h. Luego, se tomó 1 mL de muestra de cada tubo, los que fueron depositados en tubos Eppendorf, estos se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes fueron retirados y transferidos a tubos Eppendorf limpios. Desde estos tubos se tomaron alícuotas de 25 µl, que luego se añadieron a tubos de vidrio, a los cuales se agregó 975 µl de NaOH 0,1 M y 1 mL de solución C, se agitó en vortex para después esperar 10 min. Finalmente se añadieron 100 µl de solución D, los tubos se agitaron en vortex, dejando reposar por 30 min en oscuridad y se leyó la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (Jasco V-750) a 750 nm. Se utilizó como estándar de proteína, la albúmina de suero bovino (BSA) para realizar la respectiva curva de calibración. Los resultados fueron expresados como porcentaje de proteínas totales en la biomasa seca.

5. Extracción de proteínas desde la biomasa residual de P. tricornutum

Se procedió a evaluar 4 solventes para la extracción de proteínas: Agua destilada pH 7; buffer fosfato (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) 0,1 M pH 7; tampón de lisis (SDS 2% p/v, NaCl 0,4 M, EDTA 0,04 M y Tris 0,1 M) pH 7 y NaOH 0,1 M pH 10. Utilizando a su vez dos equipos: un Sonicador (VCX 500) y un Ultra-Turrax (MTOPS SR 30).

Para la extracción se transfirieron 2 g de biomasa residual a tubos Falcon, se adicionaron 32 mL de cada uno de los solventes, mencionados anteriormente y paralelamente se marcó el nivel de los solventes. Dicha biomasa se dejó hidratar durante 24 h a temperatura ambiente. Con el sonicador las muestras se trataron bajo una frecuencia de 20 kHz, potencia de 500 W, amplitud de onda del 40% durante 15 min a 20 °C. Con el ultra-turrax las muestras fueron tratadas a una velocidad de 19700 rpm con 3 ciclos de 5 min. Cada 5 min se detuvo el equipo para que se enfriara, las muestras se mantuvieron en hielo durante la molienda. Las muestras con tampón de lisis e NaOH fueron molidas solo por 2 min con el ultra-turrax, debido a que se generó excesiva espuma, impidiendo completar el ciclo de molienda.

Los lisados celulares derivados de todos los tratamientos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para luego reponer el solvente evaporado. Se tomaron 1,5 mL de los lisados, los cuales se depositaron en tubos Eppendorf, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, luego se recuperaron los sobrenadantes, los cuales se colocaron en tubos Eppendorf limpios y junto con los lisados celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente, se cuantificaron las proteínas totales según lo descrito por Lowry *et al.* (1951). Para ello los sobrenadantes se descongelaron y se prepararon distintas diluciones; para las muestras con agua destilada, buffer fosfato y tampón de lisis tratadas con sonicador y ultra-turrax, la dilución fue de 1:30 (v/v), mientras que, para las muestras con NaOH tratadas con ambos equipos, la dilución fue de 1:40 (v/v). Una vez preparadas las diluciones, se tomaron alícuotas de 250 μ l, las que luego se añadieron a tubos de vidrio y se agregaron 750 μ l de NaOH 0,1 M. Después se siguieron los mismos pasos, mencionados en el punto 4.2. Los resultados fueron expresados como μ g de proteínas totales/mL de extracto. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Además, se calculó la eficiencia extractiva de cada método, mediante la expresión 1:

$$Eficiencia\ extractiva\ (\%) = \frac{A1 \times A2}{A3} \times 100 \quad (1)$$

Donde, A1: g de proteínas totales en el lisado celular, A2: mL de solvente y A3: g proteínas totales en la biomasa residual.

6. *Precipitación de proteínas*

Se ensayaron dos métodos de precipitación de proteínas con el propósito de concentrar las proteínas del lisado celular con mayor eficiencia extractiva. Para esto se descongeló y centrifugó uno de los lisados con NaOH tratado con el sonicador, a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C, recuperándose un total de 30 mL de sobrenadante.

El primer método consistió en añadir en tubos Falcon, 5 mL de sobrenadante, luego se agregaron 1,5 g de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ 30% p/v (Chew *et al.*, 2019). El contenido de cada tubo se homogenizó y las mezclas se dejaron reposar a 4 °C durante 1 h.

Paralelamente, se realizó el segundo método denominado partición en tres fases (TPP) (o separación trifásica), de acuerdo a la metodología informada por Waghmare *et al.* (2016), con ciertas modificaciones. En tubos Falcon se adicionaron 5 mL de sobrenadante, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$ 20% p/v y 5 mL de t-butanol ($C_4H_{10}O$). El contenido de cada tubo se homogenizó y las mezclas se trasvasijaron a vasos de precipitado, los cuales se colocaron en un agitador magnético a 28 °C por 20 min.

Las mezclas de ambos métodos se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C, y las fases que se formaron fueron separadas con pipeta Pasteur; en el primer método se recuperó solo la fase acuosa (superior), mientras que para el segundo método se retiró la fase orgánica (superior) y la fase acuosa (inferior) y se recuperó la fase intermedia que contenía las proteínas concentradas. Con el fin de remover las sales, las fases anteriormente recuperadas fueron puestas en membranas de diálisis Spectra/Por 2 (MWCO 12-14 kD) en 1 L de agua destilada durante 15 h en un agitador magnético. Transcurrido este tiempo se cambió el agua y se mantuvo por 5 h más. A continuación, las membranas fueron sacadas del agua, secadas y se vertió el contenido en bandejas de pesar, las que se colocaron en la estufa a 35 °C durante 3 días. Finalmente, los extractos de proteínas secos fueron raspados, molidos en un mortero de porcelana, pesados y guardados en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior análisis.

Posteriormente se cuantificaron las proteínas totales siguiendo la metodología de Lowry *et al.* (1951). Para esto en tubos Eppendorf se agregaron 10 mg de extracto seco, los cuales se resuspendieron en 1 mL de agua destilada, se homogenizó y centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes fueron recuperados en tubos Eppendorf limpios para determinarles el contenido de proteínas totales, se tomaron 500 µl de los sobrenadantes y se diluyeron con 500 µl de agua destilada. De esta dilución se tomaron alícuotas de 250 µl, las que luego se añadieron a tubos de vidrio y se agregaron 750 µl de NaOH 0,1 M. Después se siguieron los mismos pasos, mencionados en el punto 4.2. Los resultados fueron expresados como porcentaje de proteínas totales presentes en el extracto seco. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Además, para ambos métodos de precipitación se calculó el porcentaje de proteínas recuperadas, mediante la expresión 2:

$$\% \text{ Proteinas recuperadas} = \frac{B1}{B2} \times 100 \tag{2}$$

Donde, B1: g de proteínas y B2: g de biomasa residual.

También se calculó para ambos métodos la eficiencia del método de concentración de proteínas, mediante la expresión 3:

$$\text{Eficiencia extractiva (\%)} = \frac{C1}{C2} \times 100 \quad (3)$$

Donde, C1: Valor de la expresión (2) y C2: % de proteínas totales en la biomasa residual.

7. Preparación de extractos proteicos para hidrólisis enzimática

Dados los resultados del porcentaje de proteínas recuperadas con los dos métodos de concentración ensayados, se decidió no precipitar las proteínas, procediendo de esta manera a realizar una nueva extracción de proteínas, empleando para ello la biomasa residual almacenada a -20 °C, el solvente NaOH 0,1 M y el sonicador (protocolo seleccionado de los resultados previos). Para la extracción se transfirieron 2 g de biomasa a 13 tubos Falcon, junto con 32 mL de NaOH, paralelamente se marcó el nivel del solvente, se dejó hidratar durante 24 h a temperatura ambiente y después las muestras se trataron con el sonicador bajo una frecuencia de 20 kHz, potencia de 500 W, amplitud de onda del 40% durante 15 min a 20 °C. Los lisados celulares, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para así reponer el solvente evaporado y estos se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C. En una botella se recuperaron los sobrenadantes mediante pipeta Pasteur, se midió el volumen total del extracto y se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis.

De este extracto se cuantificaron las proteínas totales siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.2. Se tomó 1 mL de extracto y se depositaron en tubos Eppendorf, estos se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min, se retiraron los sobrenadantes, los cuales se colocaron en tubos Eppendorf limpios. Se preparó una dilución 1:40 (v/v), de esta se tomaron alícuotas de 250 µl, las que luego se añadieron a tubos de vidrio y se agregaron 750 µl de NaOH 0,1 M, para luego continuar con la metodología descrita en el punto 4.2. Los resultados fueron expresados como µg de proteínas totales/mL de extracto. La cuantificación de proteínas se hizo por triplicado.

8. Hidrólisis enzimática

El extracto con las proteínas cuantificadas fue separado en 2 volúmenes de 200 mL y trasvasiados a dos botellas. Dichos extractos fueron hidrolizados por separado con las proteasas tripsina (Sigma-Aldrich) y Protamex (Sigma-Aldrich).

Para la hidrólisis con tripsina, se tomó 200 mL de extracto y se le ajustó el pH a 8 con ácido clorhídrico (HCl) al 37% (López-Rodríguez *et al.*, 2021). Dicha hidrólisis se realizó utilizando una relación enzima/sustrato (E/S) de 1:100 (López-Rodríguez *et al.*, 2021), incubando a 50 °C (Bai *et al.*, 2023) en un baño termorregulado durante 6 h.

Para la hidrólisis con Protamex, se tomó 200 mL de extracto y se le ajustó el pH a 7,5 con HCl al 37% (Bai *et al.*, 2023). La hidrólisis se realizó usando una relación E/S de 1:100, incubando a 55 °C (Bai *et al.*, 2023) en un baño termorregulado durante 6 h.

En ambos tratamientos, cada 2 h (a las 2 h, 4 h y 6 h) se fue tomando una alícuota de 1,5 mL de extracto e inmediatamente se inactivó la actividad de cada enzima en una placa calefactora a 95 °C durante 15 min, dejando después enfriar las muestras a temperatura ambiente y transfiriendo finalmente a tubos Eppendorf, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

9. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de proteínas sin hidrolizar e hidrolizados se determinó mediante el ensayo de capacidad de reducción del hierro (FRAP, del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power), siguiendo la metodología propuesta por Thaipong *et al.* (2006), con ciertas modificaciones. Para aquello se requirió de la preparación de soluciones stock que incluyeron: HCl 40 mM, 2,4,6-Tri-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM, cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM y tampón acetato 0,3 mM pH 3,6. La solución de trabajo FRAP se preparó previamente, mezclando 237,5 μl de TPTZ, 237,5 μl de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ y 2375 μl de tampón acetato. Dicha solución se mantuvo en un baño termorregulado a 37 °C antes de usarla.

Por otra parte, los extractos sin hidrolizar e hidrolizados fueron centrifugados a 13000 rpm por 10 min, recuperando luego los sobrenadantes en tubos Eppendorf limpios. Se preparó una dilución 1:3 (v/v), de la cual se tomaron alícuotas de 150 μl , las que se añadieron a tubos de vidrio, luego se adicionaron 2850 μl de solución FRAP, dejando

reposar por 30 min en oscuridad y se procedió a leer la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (Jasco V-750) a 593 nm. Para realizar la respectiva curva de calibración se utilizó el antioxidante 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox). Los resultados se expresaron en μ moles de equivalentes de Trolox (TE)/L de extracto. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

10. Análisis estadísticos

Los análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas se realizaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe, respectivamente. Para evaluar lípidos y proteínas totales entre la biomasa con aceite y biomasa residual, se utilizó la prueba t-Student. Misma prueba se aplicó para evaluar los dos métodos de precipitación de proteínas, sulfato de amonio y partición en tres fases. La extracción de proteínas mediante el uso de cuatro solventes (agua destilada, buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio) y dos equipos (sonicador y ultra-turrax), se evaluó por medio de un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Al encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos, se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey. Para el análisis de actividad antioxidante de los extractos sin hidrolizar e hidrolizados con proteasas en diferentes tiempos de incubación, no se realizó ninguna prueba estadística, los datos se presentaron como valores promedio de dos réplicas técnicas. Los análisis fueron realizados en el software GraphPad Prism 8. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Crecimiento del cultivo

La curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 264 se registró durante 12 días (Figura 1), la cosecha del cultivo se realizó el día 12. Si bien se observa que el día de la cosecha el cultivo seguía creciendo, se decidió su cosecha el día 12, ya que, esta biomasa fue combinada con otra biomasa obtenida de experimentos previos cosechados a los 12 días. La tasa de crecimiento máxima de este cultivo se estimó entre los días 3 y 6 y fue de 0,62 (divisiones/día).

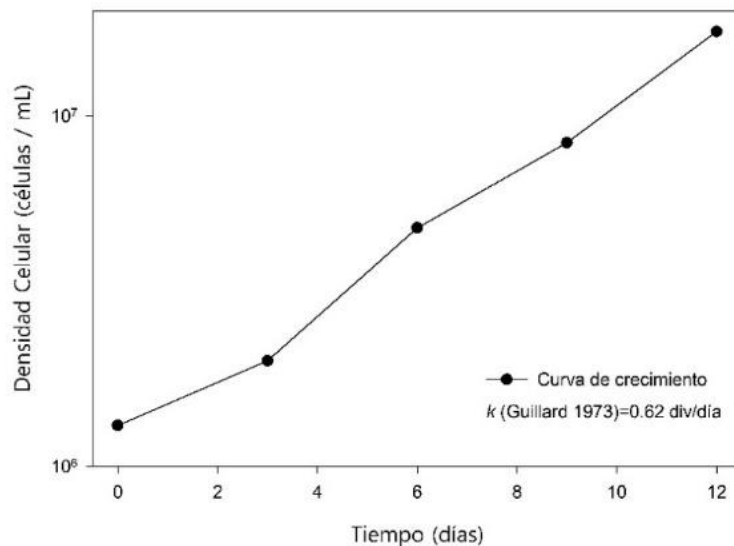


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 264 en un cultivo de 20 L, los valores de la curva corresponden a una réplica.

Caracterización bioquímica de la biomasa con aceite y biomasa remanente

Tanto a la biomasa con aceite como a la biomasa residual, se les analizó el contenido de lípidos y proteínas totales. Con respecto al análisis de lípidos totales, la biomasa antes de la extracción con hexano tuvo un porcentaje de lípidos del 11,21% y posterior a esa extracción se obtuvo una biomasa residual que contenía un 7,65% de lípidos, es decir, un porcentaje menor de lípidos totales (Figura 2). En base al análisis estadístico realizado, esta disminución del porcentaje de lípidos fue estadísticamente significativa ($p=0,0299$).

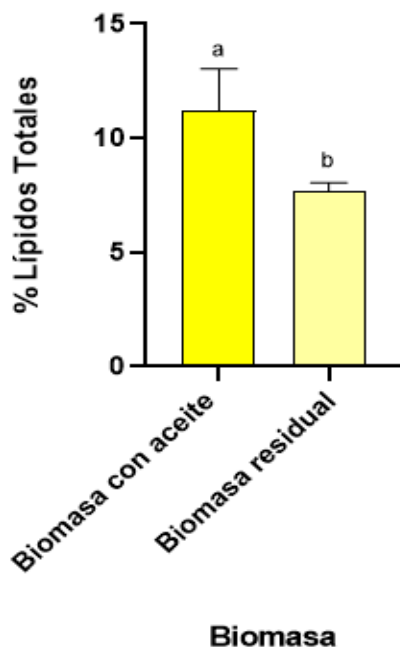


Figura 2. Determinación del porcentaje de lípidos totales de la biomasa con aceite y biomasa residual. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$).

Respecto al contenido de proteínas, la biomasa con aceite tuvo un porcentaje de proteínas del 8,86%, en cambio, la biomasa residual contenía un 11,15% de proteínas (Figura 3). El aumento del porcentaje de proteínas fue estadísticamente significativo ($p=0,0081$).

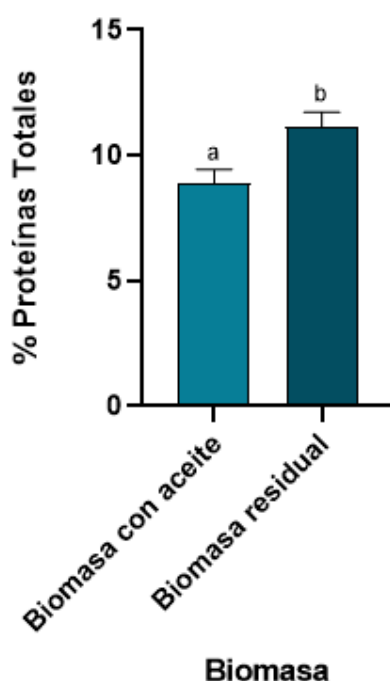


Figura 3. Determinación del porcentaje de proteínas totales de la biomasa con aceite y biomasa residual. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p < 0,05$).

Optimización de la extracción de proteínas desde la biomasa remanente mediante distintos solventes e instrumentos

Los valores de la concentración de proteínas totales en los extractos obtenidos con cada equipo con sus respectivos solventes se muestran en la Figura 4. En los lisados obtenidos con el sonicador y centrifugados, cuando se utilizó como solventes agua destilada y buffer fosfato se evidenció con claridad dos fases bien definidas, una fase inferior compuesta por detritus y una fase superior compuesta por un sobrenadante café claro, en cambio, con el tampón de lisis e hidróxido de sodio se obtuvieron extractos en los cuales no se evidenciaban claramente las dos fases después de centrifugar, sino más bien un extracto homogéneo, espeso y con aspecto coloidal.

Con el sonicador todos los solventes extrajeron proteínas, pero con distinta eficiencia extractiva pudiendo ser ordenados de menor a mayor, según la concentración de proteínas recuperadas y eficiencia, obteniéndose el siguiente orden: Buffer fosfato < Agua destilada < Tampón de lisis < Hidróxido de sodio. En base a esto se puede decir que, utilizando el sonicador, tanto el buffer fosfato como el agua destilada fueron los solventes que extrajeron la menor concentración de proteínas, entre $3011,08 \pm 297,02$ y $3158,11 \pm 254,45$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4A) y por ende tuvieron una eficiencia por debajo del 46% (Tabla 1). Mientras que, con el mismo equipo tanto el tampón de lisis como el hidróxido de sodio fueron los solventes que recuperaron la mayor concentración de proteínas, en especial el hidróxido de sodio con $5173,57 \pm 247,38$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4A) observándose una eficiencia en torno al 74% (Tabla 1), la más alta en comparación a los otros tres solventes. Además, el análisis estadístico realizado indicó que existen diferencias significativas ($p=0,0097$) entre la concentración de proteínas recuperadas por medio del tampón de lisis y el hidróxido de sodio (Figura 4A). Por lo tanto, el hidróxido de sodio fue el solvente más eficiente para la extracción proteica a través de la sonicación.

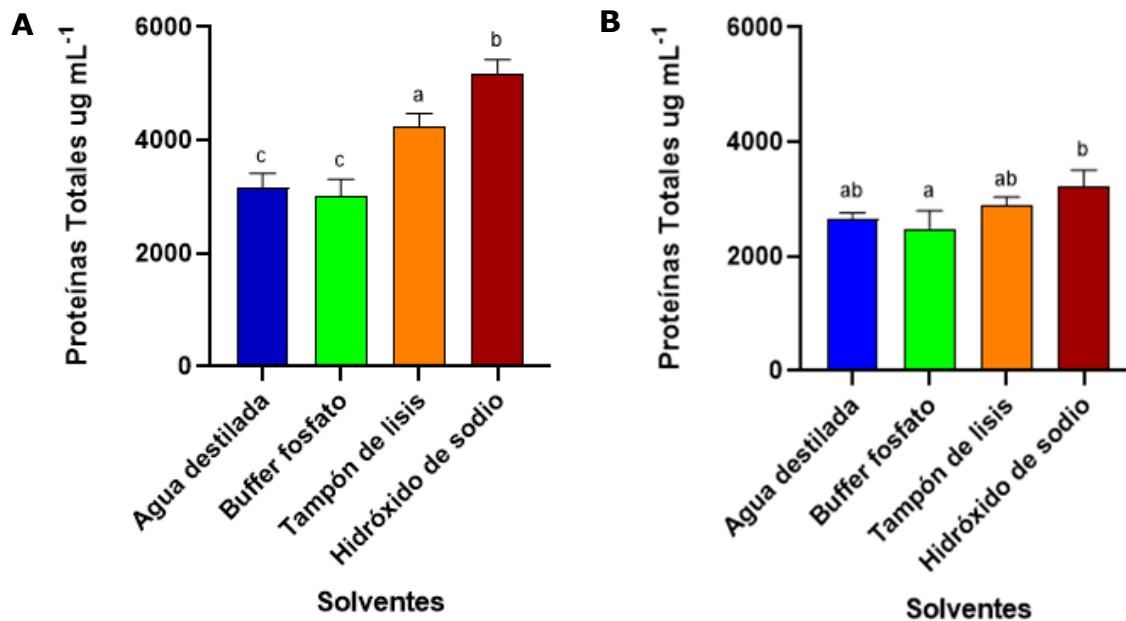


Figura 4. Extracción de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto) desde la biomasa residual mediante agua destilada, buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio. A) Biomasa lisada con sonicador. B) Biomasa lisada con ultra-turrax. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas evaluadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$).

Tabla 1. Eficiencia extractiva de proteínas obtenida desde la biomasa residual tratada con distintos solventes (agua destilada, buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio) y lisada con sonicador y ultra-turrax.

Solventes	Sonicador	Ultra-turrax
	Eficiencia extractiva %	Eficiencia extractiva %
Agua destilada	45,31	38,17
Buffer fosfato	43,20	35,66
Tampón de lisis	60,85	41,56
Hidróxido de sodio	74,23	46,37

Con respecto al ultra-turrax, las muestras fueron molidas a 19700 rpm durante 15 min, aunque, aquellas muestras hidratadas con tampón de lisis e hidróxido de sodio fueron tratadas solo por 2 min, debido a que, en este lapso de tiempo se generó excesiva espuma impidiendo completar el primer ciclo de molienda (Figura 5).

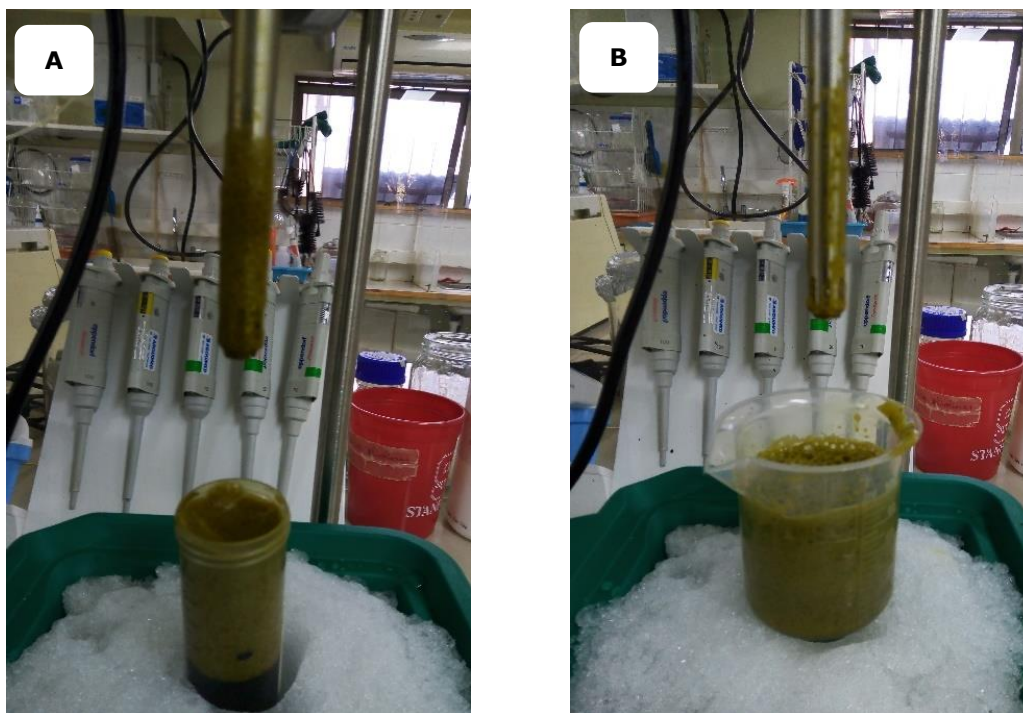


Figura 5. Espuma en el primer ciclo de molienda con ultra-turrax. A) Biomasa hidratada con tampón de lisis. B) Biomasa hidratada con hidróxido de sodio.

A pesar de este inconveniente, al igual que como ocurrió con el sonicador en los extractos con agua destilada, buffer fosfato y esta vez, con hidróxido de sodio se observaron las dos fases luego de centrifugar, mientras que, en el extracto obtenido con tampón de lisis, se obtuvo un extracto espeso de aspecto coloidal similar al descrito anteriormente.

En cuanto a la extracción proteica con el ultra-turrax, todos los solventes extrajeron proteínas y al igual que en el caso anterior, los solventes se pudieron ordenar de menor a mayor, de acuerdo a la concentración de proteínas extraídas y eficiencia extractiva, obteniéndose el mismo orden: Buffer fosfato < Agua destilada < Tampón de lisis < Hidróxido de sodio. Por lo tanto, mediante el ultra-turrax, el buffer fosfato seguido del agua destilada fueron los solventes que extrajeron la menor concentración de proteínas $2485,49 \pm 310,06 \mu\text{g/mL}$ y $2660,36 \pm 99,65 \mu\text{g/mL}$ (Figura 4B), respectivamente, con una eficiencia inferior al 40% (Tabla 1). A pesar de que con el tampón de lisis y el hidróxido de sodio la homogenización se realizó por 2 minutos, estos fueron los solventes

que extrajeron más proteínas $2896,58 \pm 139,70 \mu\text{g/mL}$ y $3231,83 \pm 277,50 \mu\text{g/mL}$ (Figura 4B), respectivamente, con una eficiencia entre el 41 y 46% (Tabla 1). Los resultados anteriores no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3296$) entre la concentración de proteínas recuperadas por el tampón de lisis y el hidróxido de sodio (Figura 4B), por consiguiente, ambos solventes fueron igualmente eficientes para la extracción proteica con ultra-turrax.

Entre el sonicador y el ultra-turrax, como instrumentos utilizados en la homogenización de la biomasa residual, existió una tendencia en cuanto a los solventes que fueron menos y más eficientes para la extracción proteica: el buffer fosfato y el agua destilada fueron los solventes menos eficientes, por el contrario, el tampón de lisis y el hidróxido de sodio fueron los más eficientes. Pese a esta tendencia, al usar el sonicador, la concentración de proteínas recuperadas y eficiencia extractiva del buffer fosfato, tampón de lisis e hidróxido de sodio fueron mayores que con el ultra-turrax. La combinación hidróxido de sodio/sonicador fue el tratamiento con el que se obtuvo la mayor extracción de proteínas (Figura 4).

Concentración de proteínas de la biomasa residual mediante precipitación

Una vez que se aplicaron los dos métodos de precipitación de proteínas, se recuperaron las fases en donde estaban concentradas las proteínas, las cuales fueron sometidas a diálisis y luego a un proceso de secado, lo que permitió obtener extractos proteicos secos (Figura 6). El extracto obtenido mediante el sulfato de amonio tuvo un 0,96% de proteínas y el obtenido mediante separación trifásica contenía 1,05% de proteínas. A pesar de que el porcentaje de proteínas que se consiguió concentrar con este último método fue mayor que con el sulfato de amonio, esta diferencia no fue significativa ($p=0,4317$) (Figura 7).

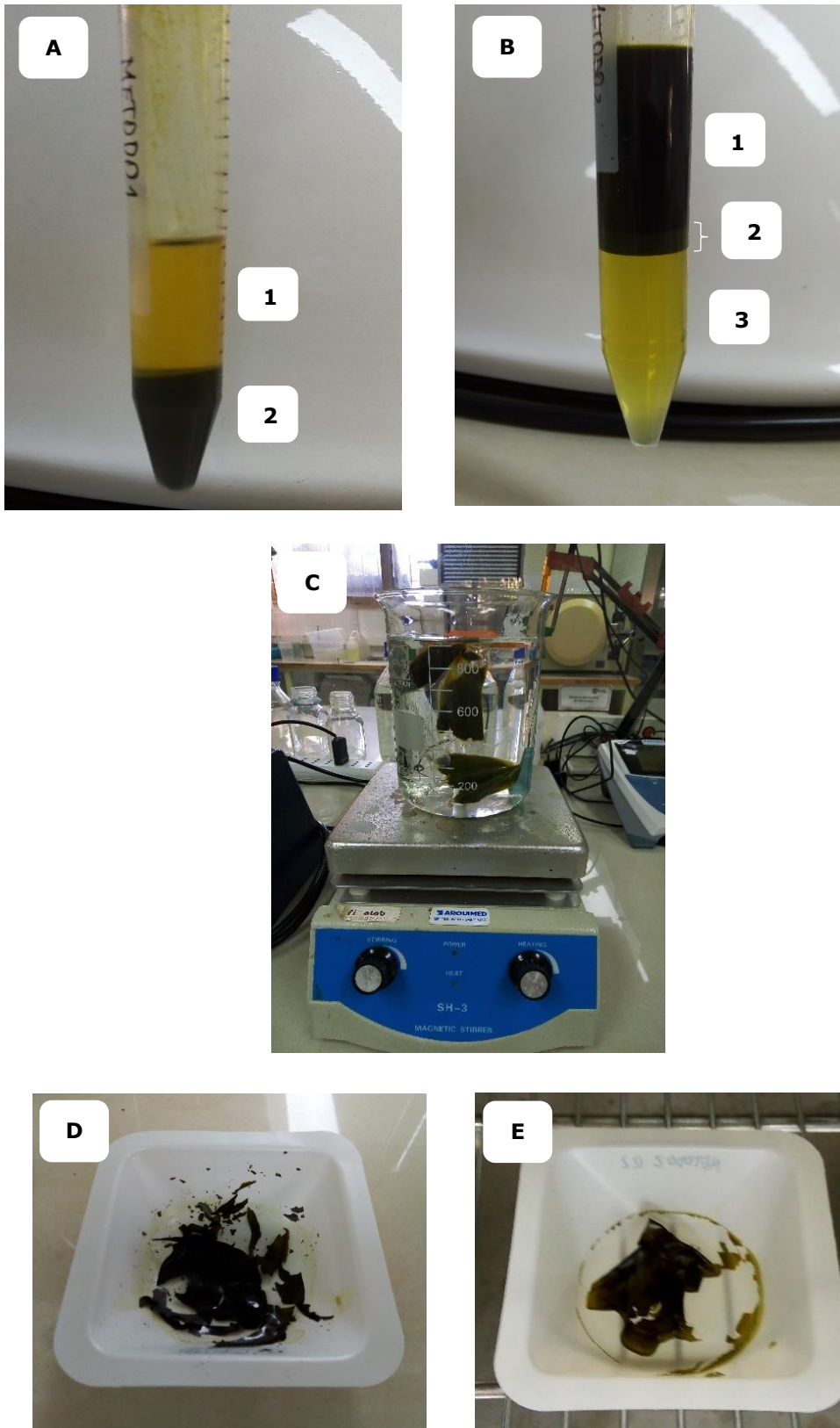


Figura 6. A) Precipitación por sulfato de amonio (1- Fase superior: Acuosa y 2- Fase inferior: Orgánica). B) Precipitación por partición en tres fases (1- Fase superior: Orgánica, 2- Fase intermedia: Proteínas concentradas y 3- Fase inferior: Acuosa). C) Diálisis de las fases recuperadas. D) Extracto seco obtenido del sulfato de amonio. E) Extracto seco obtenido de la separación trifásica.

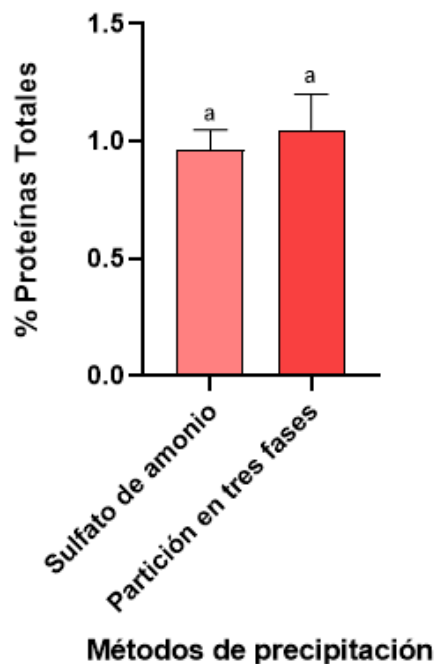


Figura 7. Determinación del porcentaje de proteínas totales concentradas en el extracto seco, obtenido por concentración con sulfato de amonio y la partición en tres fases. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas por tratamiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas evaluadas mediante la prueba t-Student ($p > 0,05$).

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de proteínas recuperadas y la eficiencia extractiva de cada método, estos valores se muestran en la Tabla 2. Mediante el método del sulfato de amonio se recuperó solo el 0,25% de las proteínas que contenía la biomasa remanente (la cual contenía un 11,15% de proteína/biomasa) mientras que, con el método de partición en tres fases se recuperó aún menos, solo un 0,19%. Considerando estos resultados se decidió no precipitar las proteínas.

Tabla 2. Proteínas recuperadas y eficiencia extractiva de los métodos de concentración de proteínas con sulfato de amonio y partición en tres fases. *Valor calculado en relación a 1 g de biomasa residual.

Técnica de precipitación	*Proteínas recuperadas (%)	Eficiencia extractiva (%)
	Sulfato de amonio	0,25
Partición en tres fases	0,19	1,70

Extracción masiva de proteínas con hidróxido de sodio y sonicador

Una vez elegido el mejor método de extracción, se realizó una extracción masiva de proteínas obteniéndose un extracto cuya concentración de proteínas fue de $5047,81 \pm 382,51 \mu\text{g/mL}$ de extracto. La digestión con tripsina y Protamex se realizó en 200 mL de este extracto (app 1000 mg de proteínas totales) manteniendo la relación enzima/sustrato (E/S) de 1:100 en ambos casos.

Determinación de actividad antioxidante del extracto proteico crudo y digerido con las proteasas tripsina y Protamex

Con el propósito de evaluar si las proteínas hidrolizadas de la biomasa residual tenían mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas, se realizó la hidrólisis enzimática del extracto proteico con tripsina y Protamex, en diferentes tiempos de incubación. Luego, se evaluó la actividad antioxidante de las proteínas crudas y de los hidrolizados proteicos generados con las dos proteasas comerciales, en los diferentes tiempos de hidrólisis (Figura 8).

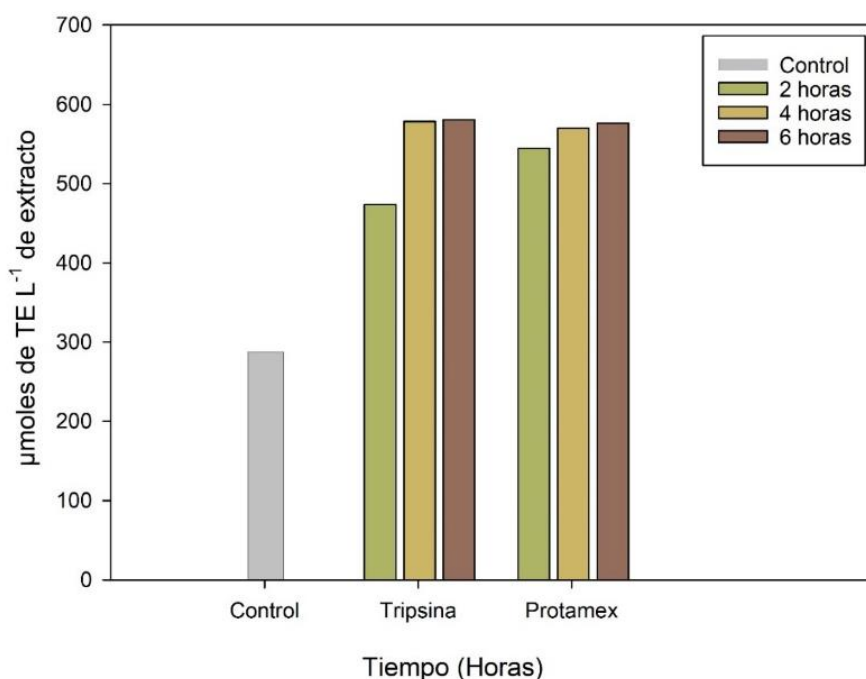


Figura 8. Actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP de extractos proteicos sin hidrolizar e hidrolizados con tripsina y Protamex a 2 h, 4 h y 6 h. El control corresponde al extracto sin hidrolizar. Se muestran los valores promedio de dos réplicas técnicas usadas para el análisis de actividad antioxidante. TE: equivalentes de Trolox.

Todos los extractos hidrolizados tuvieron mayor actividad antioxidante que el extracto sin hidrolizar (287,58 μ moles de TE/L) (Figura 8). Los hidrolizados proteicos producidos por tripsina y Protamex tuvieron diferente actividad antioxidante entre los diferentes tiempos de hidrólisis, aunque en ambos casos, esta actividad fue incrementando a medida que aumento el tiempo de digestión enzimática (Figura 8). El tiempo de hidrólisis afectó menos a la digestión con Protamex que con tripsina; sin embargo, la mayor actividad antioxidante se obtuvo con tripsina a las 6 horas de hidrólisis (580,75 μ moles de TE/L) (Figura 8). Debido a limitaciones técnicas no fue posible realizar este ensayo con réplicas por lo que falta confirmar si las diferencias detectadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas.

DISCUSION

La biorrefinería microalgal implica la valorización de todas las fracciones de la biomasa, permitiendo obtener múltiples bioproductos (Sivaramakrishnan *et al.*, 2022), en este sentido desde la biomasa de *P. tricornutum* se pueden extraer una serie de compuestos entre los que se encuentran los ácidos grasos como el EPA (García *et al.*, 2021), de este proceso se obtiene una biomasa remanente de la cual se pueden recuperar proteínas hidrosolubles y liposolubles (Bai *et al.*, 2023). En este estudio para generar dicha biomasa se extrajeron los lípidos y para ello se utilizó el hexano un solvente apolar que posee afinidad por los lípidos, debido al componente hidrocarbonado de estos (Lopes *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2021). De esta manera el análisis lipídico indicó que antes de la extracción, la biomasa tuvo un 11,21% de lípidos y después de la extracción un 7,65% (Figura 2). Debido a la naturaleza apolar del solvente, la fracción principal de lípidos extraídos fueron los lípidos neutros (Shin *et al.*, 2018; Saini *et al.*, 2021).

Por otra parte, el contenido de proteínas de la biomasa con aceite fue del 8,86% y de la biomasa residual un 11,15% de proteínas (Figura 3). Según Derbel *et al.* (2023) tras la extracción de lípidos se obtiene una biomasa residual con un 25-30% de proteínas, sin embargo, aquí el porcentaje fue en torno al 11%, lo cual pudo deberse a que, durante la extracción de lípidos con hexano, proteínas liposolubles pudieron coextraerse con los lípidos (Yao *et al.*, 2012). Mismo resultado obtuvieron Ansari *et al.* (2017) quienes indicaron que tras la extracción de lípidos de *S. obliquus*, tuvieron pérdidas de proteínas superiores al 30%.

Las microalgas son una gran fuente de compuestos bioactivos, entre ellos las proteínas y cuya disponibilidad se encuentra limitada por la presencia de la pared celular, por lo que para extraer estas biomoléculas intracelulares se requiere alterar dicha estructura (Nassoury & Morse, 2005; Soto-Sierra *et al.*, 2018). Una de las estrategias más utilizadas para tal fin es la combinación de tecnologías de extracción física como el ultrasonido (o sonicación), o bien, mecánica a través de la homogenización mediante ultra-turrax junto con tratamientos químicos usando solventes de extracción (Momen *et al.*, 2021). Utilizando este enfoque y con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de proteínas desde la biomasa residual, se procedió a hidratar esta biomasa con agua destilada (pH 7), buffer fosfato (pH 7), tampón de lisis (pH 7) e hidróxido de sodio (pH 10) para

posteriormente lisar independientemente con ultrasonido y ultra-turrax, para generar la disrupción de la pared celular, aumentando así su permeabilidad (Phong *et al.*, 2018). Lo anterior permite que los solventes accedan y solubilicen las proteínas intracelulares mediante la formación de enlaces covalentes, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Safi *et al.*, 2014; Raharjo *et al.*, 2019).

En este estudio se demostró que algunos solventes recuperaron más proteínas que otros, permitiendo ordenar los solventes de menor a mayor extracción y eficiencia, el orden fue: Buffer fosfato < Agua destilada < Tampón de lisis < Hidróxido de sodio. Los dos equipos utilizados para la ruptura celular se basan en diferentes principios de funcionamiento: por un lado, el ultra-turrax es un equipo que utiliza un mecanismo estor-rotor el cual ejerce un movimiento circunferencial de alta velocidad de corte (Sand & Jawaid, 2019); en cambio, el sonicador emite ondas de ultrasonido al medio líquido a través de ciclos de rarefacción y compresión (Wang *et al.*, 2020), aquí se genera la cavitación de burbujas de gas, las cuales liberan grandes cantidades de energía que fragmentan, perforan o deforman la pared celular (Soto-Sierra *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022). A pesar de estas diferencias, en ambos casos el orden de eficiencia extractiva de los solventes fue exactamente el mismo. El buffer fosfato fue el solvente con el que se recuperó la menor concentración de proteínas, incluso levemente inferior al agua, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4A y 4B). Lo cual pudo deberse a que este buffer a pH neutro generalmente no cambia la carga de las proteínas, disminuyendo tanto la capacidad de unión al agua como la solubilidad (Kramer *et al.*, 2012; Raharjo *et al.*, 2019). El agua destilada pudo solubilizar proteínas hidrófilas, sin embargo, en las células existen proteínas hidrofóbicas que están asociadas a otras macromoléculas como los lípidos y carbohidratos, provocando que el agua no haya sido capaz de disolver esas proteínas (Safi *et al.*, 2014), esto último puede considerarse la principal causa de que el agua no haya tenido una eficiencia extractiva aún mayor (Tabla 1). Por su parte, con el sonicador el tampón de lisis fue el segundo mejor solvente para extraer proteínas (Figura 4A), dicho tampón contiene SDS un detergente iónico, el cual se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, como también a los núcleos hidrofóbicos de las proteínas hidrosolubles, facilitando la solubilidad de las proteínas hidrófilas e hidrofóbicas en el solvente (Mota *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2020). Cabe considerar que la biomasa hidratada con tampón de lisis e hidróxido de sodio y molida con el ultra-turrax se generó mucha espuma (Figura 5), pues ambos solventes actuaron como detergentes,

produciendo burbujas de gas que se dispersaron en el medio (biomasa + solvente) y ascendieron a la superficie debido a su menor densidad y al agitar a alta velocidad con el equipo durante 2 min se intensificó la generación de más espuma (Johnson *et al.*, 2021). Esta situación no ocurrió con el sonicador, puesto que como se explicó anteriormente, esta técnica se basa en la ruptura de las células por la cavitación de burbujas y no por un corte mecánico. Además, a pesar de que con el ultra-turrax no se completó los tres ciclos de homogenización presupuestados, el tampón de lisis e hidróxido de sodio tuvieron una mayor eficiencia extractiva en comparación al agua destilada y el buffer fosfato (Tabla 1), dado a que los dos primeros solventes pueden romper enlaces covalentes y no covalentes de las proteínas (Braspaiboon *et al.*, 2020).

Tanto para el sonicador como para el ultra-turrax fue el hidróxido de sodio el solvente con la mayor eficiencia extractiva (Tabla 1), esto concuerda con lo informado por Hildebrand *et al.* (2020) quienes realizaron una extracción de proteínas de *C. vulgaris* asistida con ultrasonido y recuperaron más proteínas empleando como solvente el hidróxido de sodio. Por su parte, Harnedy & FitzGerald (2013) molieron células de *Palmaria palmata* con un homogenizador ultra-turrax e hicieron una extracción secuencial de proteínas con una combinación de solventes, entre los que se encontraba el hidróxido de sodio, como resultado obtuvieron más proteínas. Este aumento en la concentración de proteínas recuperadas se debe a que un disolvente alcalino como el hidróxido de sodio, rompe los enlaces entre las moléculas que conforman la pared celular (Safi *et al.*, 2014). Además, la solubilización de las proteínas aumenta a medida que el pH del solvente sea alcalino (Benelhadj *et al.*, 2016; Soto-Sierra *et al.*, 2018), ya que, está más alejado del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de *P. tricornutum* (pI 3,5 - 7) (Grossmann *et al.*, 2018); provocando que las proteínas tengan una carga neta más alta, favoreciendo las interacciones proteína-solvente en desmedro de las interacciones proteína-proteína, lo que facilita la solubilización proteica (Hildebrand *et al.*, 2020). Muestra de ello es lo reportado por Phusunti & Cheirsilp (2020) quienes trabajando con *C. vulgaris* evaluaron la extracción alcalina de proteínas, a medida que ajustaron el pH del medio a 8, 9, 10, 11 y 12 recuperaron un 20%, 25%, 40%, 65% y 80% de proteínas, respectivamente.

En el presente estudio, para la biomasa hidratada con hidróxido de sodio a pH 10 y molida con el ultra-turrax, se obtuvo una eficiencia en torno al 46%, mientras que con el ultrasonido fue de 74% (Tabla 1). En base a esto se puede decir en primer lugar, que el

pH del medio es un factor relevante para que la extractabilidad de las proteínas sea aún mayor, puesto que, independientemente del equipo utilizado, la mayor recuperación proteica fue con el hidróxido de sodio que tenía un pH 10, en comparación al agua destilada, buffer fosfato y tampón de lisis que poseían un pH 7 (Figura 4A y 4B), por lo tanto, en condiciones alcalinas de pH 10 a 12 la solubilización de proteínas es mayor que en condiciones neutras y ácidas (pH de 2 a 5) (Teuling *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2020), incluso se recomienda que para lograr la máxima solubilidad de las proteínas, el medio debería ajustarse a pH 12 (Safi *et al.*, 2014).

En segundo lugar, la combinación hidróxido de sodio/ultrasonido es el procedimiento más adecuado para que haya una mayor solubilidad de proteínas (Gerde *et al.*, 2013; Momen *et al.*, 2021) dado al aumento en la interacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófilos y los núcleos hidrofóbicos de las proteínas con el hidróxido de sodio (Grossmann *et al.*, 2018; Qing *et al.*, 2023). Por otra parte, el tratamiento único e independiente, ya sea, físico como el ultrasonido o químico como el hidróxido de sodio no es suficiente para extraer la cantidad de proteínas deseadas (Ursu *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2022) pues, la ruptura de la pared celular es parcial (O'Connor *et al.*, 2022). Adicionalmente, esta combinación es una estrategia simple y más respetuosa con el medio ambiente que el uso de solventes orgánicos tóxicos (Liu *et al.*, 2023), el consumo de solvente y la energía del proceso extractivo es medio-bajo (Phong *et al.*, 2018) y el sistema es potencialmente escalable a nivel comercial, aunque se requiere evaluar su viabilidad económica (Sari *et al.*, 2015). Respecto a las desventajas potenciales del uso del ultrasonido, se debe considerar que genera calor, lo cual hace que las proteínas sean susceptibles a la desnaturalización (Lopes *et al.*, 2020; Momen *et al.*, 2021) incluso, puede existir hidrólisis de las cadenas polipeptídicas (Deleu *et al.*, 2019) o bien, puede dar lugar a la oxidación de las proteínas causada por radicales libres, promoviendo la formación de agregaciones proteicas insolubles afectando directamente las propiedades funcionales de las proteínas (Ruiz *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). También la extracción asistida por ultrasonido depende de múltiples parámetros como la frecuencia, potencia, amplitud de onda, pH, tiempo y temperatura, los cuales deben ser optimizados (Wang *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2021; Purdi *et al.*, 2023). Liu *et al.* (2022) y Rahman *et al.* (2022) sugieren que aplicando tiempos de procesamiento cortos y temperaturas bajas se logra mayores rendimientos de extracción, así como la correcta recuperación de moléculas termolábiles como las proteínas. Khawli *et al.* (2021) evaluaron la extracción proteica de

P. tricornutum asistida con ultrasonido bajo distintas condiciones y observaron que las condiciones óptimas con las que recuperaron más proteínas fueron con agua destilada (pH 8,5) bajo una frecuencia de 20 kHz, con una potencia de 100 W durante 24,4 min a 20 °C. A pesar de que en este estudio no se evaluó el efecto en la recuperación proteica de cambiar alguno de estos parámetros como, por ejemplo, la amplitud de onda, el tiempo o la temperatura (Liu *et al.*, 2022). Es necesario optimizar estas variables que permitan extraer la mayor cantidad de proteínas preservando al mismo tiempo su funcionalidad y bioactividad (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

Generalmente tras el proceso de extracción proteica con hidróxido de sodio/ultrasonido, se procede a concentrar las proteínas aplicando técnicas de precipitación (Harrysson *et al.*, 2018) aquí se utilizó la precipitación con sulfato de amonio y la separación trifásica. En cuanto al primer método, las proteínas al solubilizarse están rodeadas por una capa de hidratación, esta capa se vio alterada al momento de adicionar esta sal, pues como los iones sulfato (SO_4^{2-}) y amonio (NH_4^+) se encuentran dentro de los primeros iones de la serie Hofmeister (Duong-Ly & Gabelli, 2014; Pakhale & Bhagwat, 2016) interactúan con el solvente, causando la deshidratación de las proteínas, promoviendo la estabilidad de las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y al mismo tiempo disminuyendo la solubilidad, lo que conlleva a que las proteínas precipiten (Yan *et al.*, 2018; Chew *et al.*, 2019; Kurák & Polakovič, 2022).

Por otra parte, en la separación trifásica, el sulfato de amonio causó la precipitación de las proteínas, mientras que el t-butanol, un alcohol cosmotrópico no iónico (Gagaoua *et al.*, 2017) se une a las zonas hidrofóbicas de las proteínas, provocando que disminuya su densidad y permitiendo que las proteínas permanezcan en suspensión (Kulkarni & Rathod, 2014). Esto lleva a que se formen tres fases (Figura 6B), una fase superior orgánica compuesta principalmente por moléculas apolares, una fase intermedia, en donde permanecen las proteínas precipitadas y una fase inferior acuosa compuesta de moléculas polares y residuos de sal (Chew *et al.*, 2019; Silvanir *et al.*, 2024).

En este estudio con el sulfato de amonio se obtuvo un extracto proteico seco que tenía un porcentaje menor de proteínas (0,96%) que el extracto conseguido por separación trifásica (1,05%) aunque, la diferencia no fue significativa (Figura 7). Estudios previos, indican que generalmente la separación en tres fases genera concentrados con un contenido proteico mayor que la precipitación con sulfato de amonio (Gagaoua *et al.*, 2017; Chia *et*

al., 2019). Sin embargo, en este estudio la recuperación con ambos métodos fue extremadamente baja. La baja recuperación pudo haber ocurrido debido a pérdidas de proteínas durante el procedimiento de cada técnica, durante la diálisis (Schwenzfeier *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2019; Chia *et al.*, 2019) o bien, las proteínas pudieron haber quedado en alguna fase distinta a la esperada, por ejemplo, los iones sulfato pueden causar en las proteínas un efecto deshidratante excesivo llevando a que se concentren en la fase orgánica (Kulkarni & Rathod, 2014). Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas que componen la biomasa de *P. tricornutum* no serían precipitables eficientemente con estos métodos de concentración.

Habitualmente se han utilizado métodos químicos para generar péptidos bioactivos a partir de extractos proteicos crudos (Nguyen *et al.*, 2020); sin embargo, la hidrólisis enzimática es la forma más común de producir péptidos bioactivos con pesos moleculares definidos y composición específica de aminoácidos (Al-Zuhair *et al.*, 2017; Akbarian *et al.*, 2022). En este estudio se utilizaron las proteasas comerciales tripsina y Protamex, las cuales generaron hidrolizados proteicos con mayor actividad antioxidante que las proteínas crudas (Figura 8), tal como se había demostrado previamente en *Nitzschia laevis* (Alzahrani *et al.*, 2018), *S. obliquus* (Afify *et al.*, 2018), *P. purpureum*, *P. tricornutum* (Stack *et al.*, 2018), *A. maxima* y *A. platensis* (López-Rodríguez *et al.*, 2021). Estos resultados demostraron que los péptidos al estar en la secuencia de las proteínas crudas poseen actividad antioxidante, pero esta bioactividad aumenta una vez que los péptidos son liberados (Akbarian *et al.*, 2022). No obstante, los hidrolizados proteicos producidos por las dos enzimas tuvieron diferente actividad antioxidante entre los distintos tiempos de hidrólisis (Figura 8), debido a que cada proteasa hidroliza los enlaces peptídicos entre aminoácidos específicos (Mojica & de Mejía, 2016; Derbel *et al.*, 2023) causando que la longitud de los péptidos, así como su composición y secuencia de aminoácidos sean diferentes (Akbarian *et al.*, 2022). La tripsina es una endopeptidasa que se une a las cadenas laterales e hidroliza en el grupo carbonilo de los aminoácidos arginina y lisina (Deng *et al.*, 2018; O'Connor *et al.*, 2022) en cambio, Protamex es un conjunto de endopeptidasas de amplio rango de escisión (Bruno *et al.*, 2019).

A medida que aumentó el tiempo de hidrólisis la actividad antioxidante fue incrementando, obteniéndose a las 2 h con ambas enzimas, hidrolizados proteicos con una menor capacidad reductora férrica (método FRAP) mientras que, después de 6 h de digestión con las dos enzimas se obtuvo la mayor capacidad reductora férrica (Figura 8).

Por su parte, Bai *et al.* (2023) evaluaron la producción de hidrolizados proteicos de *A. maxima* y observaron que tras 2 h de hidrólisis con tripsina y Protamex se generaron hidrolizados proteicos con la menor actividad eliminadora de radicales DPPH, lo cual coincide con los resultados obtenidos; por el contrario, la mayor actividad antioxidante fue tras 4 y 8 h de hidrólisis con tripsina y Protamex, respectivamente, lo cual difiere con los resultados de este estudio. Esta diferencia se puede deber al grado de hidrólisis, la especie que se está estudiando (Sbroggio *et al.*, 2016) y del tipo de ensayo que se utilizó para evaluar la actividad antioxidante, debido a que, el ensayo FRAP se basa en la transferencia de electrones y mide la reducción del ion férrico a ion ferroso, en cambio, el ensayo DPPH depende de la transferencia de electrones de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH (Mejía *et al.*, 2021).

Algunos estudios han mostrado que la tripsina genera hidrolizados proteicos con baja actividad antioxidante (Alzahrani *et al.*, 2018), incluso menor a los de Protamex (Bai *et al.*, 2023). En este estudio ambas proteasas generaron hidrolizados proteicos con actividad antioxidante similar (Figura 8), lo cual da más opciones a nivel comercial para generar hidrolizados proteicos con actividad antioxidante a partir de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite desde *P. tricornutum*. Futuros estudios debieran enfocarse en dilucidar la secuencia aminoacídica de los péptidos responsables de la actividad antioxidante en estos hidrolizados.

CONCLUSIONES

En biorrefinería microalgal todas las fracciones de la biomasa son valorizadas; en este estudio se trabajó en la valorización de los residuos generados del proceso de extracción de aceite desde la biomasa de *P. tricornutum*. Se evaluaron distintos procedimientos para la extracción y mejora de las propiedades antioxidantes de las proteínas de este material residual concluyéndose que:

- El uso del sonicador en presencia de hidróxido de sodio fue el método más eficiente para recuperar proteínas desde este residuo.
- Los métodos tradicionalmente utilizados para concentrar proteínas (precipitación con sulfato de amonio y la separación trifásica) no fueron eficientes en el extracto proteico de esta microalga.
- Las proteasas tripsina y Protamex permitieron generar hidrolizados proteicos con mayor actividad antioxidante que las proteínas sin hidrolizar, permitiendo incrementar el valor de este material residual.

BIBLIOGRAFIA

- Abebaw, S & S. Admassu. 2020. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market, *Heliyon* 6(8): 1-11.
- Afify, A., G. El Baroty., F. El Baz., H. El Baky & S. Murad. 2018. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 399-408.
- Ahmad, N., Y. Zuo., F. Anwar., A. Abbas., M. Shahid., A. Hassan., M. Bilal & T. Rasheed. 2021. Ultrasonic-assisted extraction as a green route for hydrolysis of bound phenolics in selected wild fruits: Detection and systematic characterization using GC–MS–TIC method. *Process Biochemistry*, 111: 79-85.
- Akbarian, M., A. Khani., S. Eghbalpour & V. Uversky. 2022. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1-30.
- Alas-Guardado, S., A. Rojo & G. Merino. 2011. Levinthal's paradox: when a contradiction becomes logical. *Chemistry Education*, 22(1): 51-54.
- Alaswad, A., M. Dassisti., T. Prescott & A. Olabi. 2015. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51: 1446-1460.
- Alzahrani, M., P. Conrad & Y. Hemar. 2018. Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(3): 676-682.
- Al-Zuhair, S., S. Ashraf., S. Hisaindee., N. Darmaki., S. Battah., D. Svistunenko., B. Reeder., G. Stanway & A. Chaudhary. 2017. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Engineering in Life Science*, 17(2): 175-185.
- Ansari, F., A. Shriwastav., S. Gupta., I. Rawat & F. Bux. 2017. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(12): 3407-3412.

- Assunção, M., R. Amaral., C. Martins., J. Ferreira., S. Ressurreição., S. Santos., J. Varejão & L. Santos. 2017. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29: 865-877.
- Bai, R., T. Nguyen., Y. Zhou., Y. Diao & W. Zhang. 2023. Identification of Antioxidative Peptides Derived from *Arthrospira maxima* in the Biorefinery Process after Extraction of C-Phycocyanin and Lipids. *Marine Drugs*, 21(3): 1-17.
- Batista, A., L. Ambrosano., S. Graça., C. Sousa., P. Marques., B. Ribeiro., E. Botrel., P. Neto & L. Gouveia. 2015. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production-An integrated microalgae-based approach. *Bioresource Technology*, 184: 230-235.
- Benelhadj, S., A. Gharsallaoui., P. Degraeve., H. Attia & D. Ghorbel. 2016. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. *Food Chemistry*, 194: 1056-1063.
- Bligh, E & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917.
- Borowitzka, M. 2018. Biology of Microalgae in Microalgae In Health and Disease Prevention. Ed by Levine & Fleurence. Murdoch: Academic Press. 23-72.
- Braspaiboon, S., S. Osiriphun., P. Peepathum & W. Jirarattanarangsri. 2020. Comparison of the effectiveness of alkaline and enzymatic extraction and the solubility of proteins extracted from carbohydrate-digested rice. *Heliyon*, 6(11): 1-8.
- Bruno, S., T. Kudre & N. Bhaskar. 2019. Effects of different pretreatments and proteases on recovery, umami taste compound contents and antioxidant potentials of *Labeo rohita* head protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 56(4): 1966-1977.
- Butler, T., R. Kapoore & S. Vaidyanathan. 2020. *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. *Trends in Biotechnology*, 38(6): 606-622.
- Celi, C., D. Fino & F. Savorani. 2022. *Phaeodactylum tricornutum* as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies. *Bioresource Technology Reports*, 19: 1-12.

- Chalamaiah, M., B. Dinesh., R. Hemalatha & T. Jyothirmayi. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4): 3020-3038.
- Chew, K., S. Chia., S. Lee., L. Zhu & P. Show. 2019. Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. *Chemical Engineering Journal*, 367: 1-8.
- Chia, S., K. Mak., Y. Khaw., N. Suhaidi., K. Chew & P. Show. 2019. An efficient and rapid method to extract and purify protein-Liquid Triphasic Flotation system. *Bioresource Technology*, 294: 1-8.
- Coulombier, N., T. Jauffrais & N. Lebouvier. 2021. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Marine Drugs*, 19(10): 1-30.
- Cui, Y., S. Thomas-Hall., E. Chua & P. Schenk. 2020. Development of High-Level Omega-3 Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology*, 57(1): 258-268.
- Darcy, J., B. Koronkiewicz., G. Parada & J. Mayer. 2018. A continuum of proton-coupled electron transfer reactivity. *Accounts of Chemical Research*, 51(10): 2391-2399.
- De Martino, A., A. Meichenin., J. Shi., K. Pan & C. Bowler. 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43(5): 992-1009.
- de Souza, M., M. Hoeltz., P. Gressler., L. Benitez & R. Schneider. 2019. Potential of microalgal bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. *Waste Biomass Valorization*, 10(8): 2139-2156.
- Deleu, L., M. Lambrecht., J. Van de Vondel & J. Delcour. 2019. The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Current Opinion in Food Science*, 25: 98-103.
- Deng, Y., C. Butré & P. Wierenga. 2018. Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86: 39-48.

- Derbel, H., J. Elleuch., W. Mahfoudh., P. Michaud., I. Fendri & S. Abdelkafi. 2023. *In Vitro* Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Bioactive Proteins and Peptides from *Rhodomonas sp.* Applied Sciences, 13(5): 1-15.
- Díaz, M & E. Decker. 2004. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26): 8208-8213.
- Duong-Ly, K & S. Gabelli. 2014. Chapter Seven - Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. Methods in Enzymology, 541: 85-94.
- Escobedo, M & A. Castillo. 2021. Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. Scientia Agropecuaria, 12(2): 265-282.
- Falciatore, A., M. Jaubert., JP. Bouly., B. Bailleul & T. Mock. 2020. Diatom Molecular Research Comes of Age: Model Species for Studying Phytoplankton Biology and Diversity. The Plant Cell, 32(3): 547-572.
- Flora, S. 2009. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2: 191-206.
- Gagaoua, M., F. Ziane., S. Rabah., N. Boucherba., A. El-Okki., A. Bouanane-Darenfed & K. Hafid. 2017. Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo* var. *reticulatus*. International Journal of Biological Macromolecules, 102: 515-525.
- Galasso, C., A. Gentile., I. Orefice., A. Ianora., A. Bruno., D. Noonan., C. Sansone., A. Albin & C. Brunet. 2019. Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: A focus on cancer prevention and interception. Nutrients, 11(6): 1-22.
- García, T., T. Castillo., A. Martínez & E. Galindo. 2021. *Phaeodactylum tricornutum*, a potential source of eicosapentaenoic acid. BioTechnology, 25(5): 66-81.
- Gerde, J., T. Wang., L. Yao., S. Jung., L. Johnson & B. Lamsal. 2013. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. Algal Research, 2(2): 145-153.

- Grossmann, L., S. Ebert., J. Hinrichs & J. Weiss. 2018. Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 29: 266-276.
- Guillard, R. 1973. Culture Methods and Growth Measurements in Handbook of Phycological Methods. Ed by Stein JR. London: Cambridge University Press. 289-311.
- Gulcin, İ. 2020. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Archives of Toxicology*, 94: 651-715.
- Hamilton, M., R. Haslam., J. Napier & O. Sayanova. 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22: 3-9.
- Harnedy, P & R. FitzGerald. 2013. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1): 375-382.
- Harrysson, H., M. Hayes., F. Eimer., N-G. Carlsson, G. Toth & I. Undeland. 2018. Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology*, 30: 3565-3580.
- Hildebrand, G., M. Poojary., C. O'Donnell., M. Lund., M. García-Vaquero & B. Tiwari. 2020. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32: 1709-1718.
- Hosseini, A & M. Shariati. 2009. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 14-35.
- Huang, J., S. Lin., W. Xu & P. Cheung. 2017. Occurrence and Biosynthesis of Carotenoids in Phytoplankton. *Biotechnology Advances*, 35(5): 597-618.
- Jacob-Lopes, E., M. Maroneze., M. Deprá., R. Sartori., R. Dias & L. Zepka. 2019. Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25: 1-7.
- Johnson, P., M. Vaccaro., V. Starov & A. Trybala. 2021. Formation of Sodium Dodecyl Sulfate Foams by Compression of Soft Porous Material. *Journal Surfactants and Detergents* 24(6): 981-989.

- Kadalag, N., P. Pawar & G. Prakash. 2022. Co-cultivation of *Phaeodactylum tricorntutum* and *Aurantiochytrium limacinum* for polyunsaturated omega-3 fatty acids production. *Bioresource Technology*, 346: 1-9.
- Katiyar, R & A. Arora. 2020. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research*, 46: 1-15.
- Khawli, F., F. Martí-Quijal., N. Pallarés., F. Barba & E. Ferrer. 2021. Ultrasound Extraction Mediated Recovery of Nutrients and Antioxidant Bioactive Compounds from *Phaeodactylum tricorntutum* Microalgae. *Applied sciences*, 11(4): 1-17.
- Kim, S., S-W. Kang., O-N. Kwon., D. Chung & C-H. Pan. 2012. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis* aff. *galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55: 477-483.
- Kong, B & Y. Xiong. 2006. Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16): 6059-6068.
- Koyande, A., K. Chew., K. Rambabu., Y. Tao, D-T. Chu & P-L. Show. 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1): 16-24.
- Kramer, R., V. Shende., N. Motl., C. Pace & J. Scholtz. 2012. Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophysical Society*, 102: 1907-1915.
- Kulkarni, V & V. Rathod. 2014. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 52: 292-297.
- Kumar, R., A. Hegde., K. Sharma., P. Parmar & V. Srivatsan. 2022. Microalgae as a sustainable source of edible proteins and bioactive peptides–Current trends and future prospects. *Food Research International*, 157: 1-22.
- Kurák, T & M. Polakovič. 2022. Adsorption Performance of a Multimodal Anion-Exchange Chromatography Membrane: Effect of Liquid Phase Composition and Separation Mode. *Membranes*, 12(12): 1-22.

- Le Costaouéc, T., C. Unamunzaga., L. Mantecon & W. Helbert. 2017. New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 26: 172-179.
- Leopoldini, M., N. Russo., M. Toscano. 2011. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2): 288-306.
- Li, H-B., K-W. Cheng., C-C. Wong., K-W. Fan., F. Chen & Y. Jiang. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3): 771-776.
- Liu, F., M. Li., Q. Wang., J. Yan., S. Han., C. Ma., P. Ma., X. Liu & D. McClements. 2023. Future foods: Alternative proteins, food architecture, sustainable packaging, and precision nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(23): 6423-6444.
- Liu, Y., X. Liu., Y. Cui & W. Yuan. 2022. Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87: 1-18.
- Lobo, V., A. Patil., A. Phatak & N. Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8): 118-126.
- Lopes, M., J. Soares., B. Vieira., W. Batista-Silva & M. Martins. 2020. Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. *Bioresource Technology*, 307: 1-9.
- López-Rodríguez, A., J. Mayorga., D. Flaig., G. Fuentes, J. Cotabarren, W. Obregón & P. Gómez. 2021. Comparison of two strains of the edible cyanobacteria *Arthrospira*: Biochemical characterization and antioxidant properties. *Food Bioscience*, 42: 1-10.
- Lorenzo, J., P. Munekata., B. Gómez., F. Barba., L. Mora., C. Pérez-Santaescolastica & F. Toldra. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79: 136-147.
- Lowry, O., N. Rosebrough., A. Farr & R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1): 265-275.
- Marsh, J & D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7: 574-576.

- Mejía, J., K. García-Cabrera., G. Velázquez-Ovalle., G. Vázquez-Ovando & A. Vázquez-Ovando. 2021. Antioxidant capacity: concepts, quantification methods and use for tropical fruits and derived products characterization. *Colombian Journal of Agroindustrial Research*, 9(1): 9-33.
- Mojica, L & E. de Mejía. 2016. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food Function*, 7(2):713-727.
- Momen, S., F. Alavi & M. Aider. 2021. Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, 110: 778-797.
- Mota, M., M. Souza., E. Bon., M. Rodrigues & S. Freitas. 2018. Colorimetric protein determination in microalgae (Chlorophyta): association of milling and SDS treatment for total protein extraction. *Journal of Phycology*, 54(4): 577-580.
- Mussnug, J.H., V. Klassen., A. Schlüter & O. Kruse. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150(1): 51-56.
- Nagarajan, D., D-J. Lee, A. Kondo & J-S. Chang. 2017. Recent insights into biohydrogen production by microalgae—From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*, 227: 373-387.
- Nassoury, N & D. Morse. 2005. Protein targeting to the chloroplasts of photosynthetic eukaryotes: getting there is half the fun. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1743 (1-2): 5-19.
- Nguyen, H., J. Gathercole., L. Day & J. Dalziel. 2020. Differences in peptide generation following in vitro gastrointestinal digestion of yogurt and milk from cow, sheep and goat. *Food Chemistry*, 317: 1-11.
- O'Connor, J., M. García-Vaquero., S. Meaney & B. Tiwari. 2022. Bioactive peptides from algae: Traditional and novel generation strategies, structure-function relationships, and bioinformatics as predictive tools for bioactivity. *Marine Drugs*, 20(5): 1-16.

- Olabi, A., N. Shehata., E. Sayed., C. Rodriguez., R. Anyanwu., C. Russell & M. Abdelkareem. 2023. Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of The Total Environment*, 854: 1-26.
- Pakhale, S & S. Bhagwat. 2016. Purification of serratiopeptidase from *Serratia marcescens* NRRL B 23112 using ultrasound assisted three phase partitioning. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 532-538.
- Pereira, M., G. Jáuregui., A. Devia & J. Rojas. 2017. Cultivation of microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis sp.* for feeding marine fish larvae. *Mutis*, 7(2): 75-80.
- Phong, W., P. Show., T. Ling., J. Juan., E-P. Ng & J-S. Chang. 2018. Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae-Recent developments and future perspectives. *Algal Research*, 31: 506-516.
- Phusunti, N & B. Cheirsilp. 2020. Integrated protein extraction with bio-oil production for microalgal biorefinery. *Algal Research*, 48: 1-11.
- Purdi, T., A. Setiowati & A. Ningrum. 2023. Ultrasound-assisted extraction of *Spirulina platensis* protein: physicochemical characteristic and techno-functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17: 5474-5486.
- Qing, M., J. Zang., Y. Ma., Y. Chi & Y. Chi. 2023. Effects of rice vinegar treatment on the antioxidant activities and protein structures of whole egg liquid before and after gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 404: 1-9.
- Raharjo, S., D. Susilaningsih., M. Kasim., P. Susilawati., Muzuni & Tien. 2019. Variation of different solvent types for optimization of protein extraction from microalgae. *Journal of Physics: Conference Series*, 1242: 1-7.
- Rahman, M., N. Hosano & H. Hosano. 2022. Recovering Microalgal Bioresources: A Review of Cell Disruption Methods and Extraction Technologies. *Molecules*, 27: 1-31.
- Ren X., C. Wei., Q. Yan., X. Shan., M. Wu., X. Zhao & Y. Song. 2021. Optimization of a novel lipid extraction process from microalgae. *Scientific Reports*, 11(1): 1-9.
- Ribeiro, A., A. Gonçalves., M. Barbeiro., N. Bandarra., M. Nunes., M. Carvalho., J. Silva., J. Navalho., M. Dinis., T. Silva & J. Días. 2017. *Phaeodactylum tricornutum* in

finishing diets for gilthead seabream: effects on skin pigmentation, sensory properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*, 29: 1945-1956.

Ruiz, J., G. Olivieri., J. de Vree., R. Bosma., P. Willems., J. Reith., M. Eppink., D. Kleinegris., R. Wijffels & M. Barbosa. 2016. Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Science*, 9(10): 3036-3043.

Ryan, E., S. Kellerby & E. Decker. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5): 430-441.

Sáez, G & N. Están-Capell. 2014. Antioxidant Enzymes in *Encyclopedia of Cancer*. Ed by Schwab. Berlin: Springer. 288-294.

Safi, C., A. Ursu., C. Laroche., B. Zebib., O. Merah., P-Y. Pontalier & C. Vaca-García. 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3: 61-65.

Saini, R., P. Prasad., R. Sreedhar., K. Naidu., X. Shang & Y-S. Keum. 2021. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits-A Review. *Antioxidants*, 10(10): 1-23.

Sand, S & M. Jawaid. 2019. The Effect of Bi-Functionalized MMT on Morphology, Thermal Stability, Dynamic Mechanical, and Tensile Properties of Epoxy/Organoclay Nanocomposites. *Polymers*, 11(12): 1-18.

Sansone, C & C. Brunet. 2019. Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants*, 8(7): 1-9.

Sari, Y., U. Syafitri., J. Sanders & M. Bruins. 2015. How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products*, 70: 125-133.

Sbroggio, M., M. Montilha., V. Garcia de Figueiredo., S. Georgetti & L. Kurozawa. 2016. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2): 375-381.

Schwenzfeier, A., P. Wierenga & H. Gruppen. 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* *Bioresource technology*, 102(19): 9121-9127.

- Shannon, E & N. Abu-Ghannam. 2017. Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as Functional Food in Microbial Functional Foods and Nutraceuticals. Ed by Gupta, Treichel, Shapaval, de Oliveira & Tuohy. Dublin: Arrow@TU Dublin. 39-64.
- Sharma, P., A. Jha., R. Dubey & M. Pessarakli. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 1: 1-26.
- Shin, Y., H. Choi., J. Choi., J. Lee., Y. Sung & S. Sim. 2018. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 258: 335-344.
- Show, KY., Y. Yan., C. Zong., N. Guo., JS. Chang & DJ. Lee. 2019. State of the art and challenges of biohydrogen from microalgae. *Bioresource Technology*, 289: 1-11.
- Silvanir, S. Lai., A. Asmawi., K. Chew & C. Ngan. 2024. Application of high shear-assisted liquid biphasic system for protein extraction from *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 393: 1-8.
- Singh, H. & D. Das. 2020. Biohydrogen from microalgae in Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Ed by Jacob-Lopes, Manzon, Queiroz & Queiroz. Kharagpur: Academic Press. 391-418.
- Sivaramakrishnan, R., S. Suresh., S. Kanwal., G. Ramadoss., B. Ramprakash & A. Incharoensakdi. 2022. Microalgal Biorefinery Concepts' Developments for Biofuel and Bioproducts: Current Perspective and Bottlenecks. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5): 1-25.
- Song, Z., G. Lye & B. Parker. 2020. Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. *Algal Research*, 47: 1-11.
- Soto-Sierra, L., P. Stoykova & Z. Nikolov. 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36: 175-192.
- Stack, J., A. Le Gouic., P. Tobin., F. Guihéneuf, D. Stengel & R. FitzGerald. 2018. Protein extraction and bioactive hydrolysate generation from two microalgae, *Porphyridium purpureum* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Food Bioactives*, 1: 153-165.

- Sun, J., C. Zhou., P. Cheng., J. Zhu., Y. Hou., Y. Li., J. Zhang & X. Yan. 2022. A simple and efficient strategy for fucoxanthin extraction from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 61: 1-8.
- Sunday, E., O. Ejeromedoghene., C. Okoye., T. Ezeorba., R. Nyaruaba., C. Ikechukwu., A. Oladipo & J. Orege. 2022. Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. *Energy Conversion and Management*: X, 16: 1-20.
- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions. *Marine drugs*, 9(6): 1101-1118.
- Tesson, B., C. Gaillard & V. Martin-Jézéquel. 2009. Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Marine Botany*, 52(2): 104-116.
- Teuling, E., P. Wierenga., J. Schrama & H. Gruppen. 2017. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36): 7989-8002.
- Thaipong, K., U. Boonprakob., K. Crosby., L. Cisneros-Zevallos & D. Hawkins. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 669-675.
- Ursu, A-V., A. Marcati., T. Sayd., V. Sante-Lhoutellier., G. Djelveh & Philippe Michaud. 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157: 134-139.
- Vartanian, M., J. Desclés., M. Quinet., S. Douady & P. Lopez. 2009. Plasticity and robustness of pattern formation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist*, 182(2): 429-442.
- Waghmare, A., M. Salve., J. LeBlanc & S. Arya. 2016. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(16): 1-11.
- Walne, P. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilis*. *Fishery Investigations*, 26: 1-62.

- Wang, F., Y. Zhang., L. Xu & H. Ma. 2020. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. *LWT-Food Science and Technology*, 127: 1-8.
- Wang, G. 2016. Reactive Oxygen Species in *Encyclopedia of Cancer*. Ed by Schwab. Berlin: Springer. 3930-3935.
- Weber, S., P. Grande., L. Blank & H. Klose. 2022. Insights into cell wall disintegration of *Chlorella vulgaris*. *Plos One* 17(1): 1-14.
- Yan, J-K., Y-Y. Wang., W-Y. Qiu., H. Ma., Z-B. Wang & J-Y. Wu. 2018. Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14): 2416-2431.
- Yang, B., Z. Dai., SY. Ding & C. Wyman. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4): 421-449.
- Yao, L., J. Gerde & T. Wang. 2012. Oil extraction from microalga *Nannochloropsis sp.* with isopropyl alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(12): 2121-2287.
- Zhang, R., N. Grimi., L. Marchal., N. Lebovka & E. Vorobiev. 2019. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. *Algal Research*, 40: 1-9.
- Zhang, YH., M. Himmel & J. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5): 452-481.
- Zhu, Y., F. Lao., X. Pan & J. Wu. 2022. Food Protein-Derived Antioxidant Peptides: Molecular Mechanism, Stability and Bioavailability. *Biomolecules*, 12(11): 1-27.