



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA Y ACUICULTURA

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE
PROTEÍNAS ASISTIDA POR ULTRASONIDO DESDE
LA CIANOBACTERIA MARINA *OSCILLATORIA* SP. Y
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL
BIOESTIMULANTE EN LA GERMINACIÓN DE
CHENOPODIUM QUINOA.**

Juan José Muñoz Guevara

SEMINARIO DE TÍTULO PRESENTADO

PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y
ACUICULTURA

Concepción – Chile

2026

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y
ACUICULTURA

Este Seminario de Título ha sido realizado en FICOLAB, Grupo de Investigación Microalgal del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Prof. Guía

Dr. Pablo Castro

Departamento de Botánica

pabcastro@udec.cl

Prof. Co-Guía

Dra. Luisa Bascuñan

Departamento de Botánica

lubascun@udec.cl

Comisión

Dra. Patricia Gómez

Evaluada

Dr. Enrique Ostria

Coordinador de seminario de título

Dr. Fernando Cruzat

Departamento de Oceanografía

fecruzat@udec.cl

DEDICATORIA

Para mi familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi tutor, el Dr. Pablo Castro, quien fue fundamental en este proceso. Su paciencia, experiencia y todo lo que me enseñó a lo largo de este camino fueron esenciales para mi formación. Asimismo, valoro enormemente su amabilidad, tranquilidad y la forma siempre respetuosa en que se comunicó conmigo, lo que existe dentro de los equipos de investigación y el quehacer científico, lo cual enriqueció significativamente mi experiencia.

También agradezco sinceramente a todo el equipo de Ficolab por su paciencia, el apoyo y el conocimiento compartido durante el desarrollo de mi investigación, a cada integrante del laboratorio, les tengo un profundo respeto por su dedicación, disciplina, responsabilidad y confianza en mí. Gracias a ello, esta experiencia fue sumamente provechosa y enriquecedora. Además, a la profesora Luisa Bascuñán y Jonathan Fortt del laboratorio de fisiología vegetal, por su buena voluntad y apoyo en el desarrollo en la parte final de mi investigación la cual era algo completamente nuevo para mí y pude lograrlo gracias a su orientación.

Por otro lado, expreso mis más profundos agradecimientos a mi mamá, papá, hermana y sobrina, por estar presentes en cada etapa de este proceso. Ellos fueron mi inspiración, mi apoyo constante y mi lugar seguro. Me brindaron todo lo necesario para alcanzar el mejor desarrollo universitario y personal, ofreciéndole herramientas, amor y enseñanzas que siempre llevaré conmigo. Gracias por entregarme la amabilidad hacia mí y hacia los demás, todo es posible. Siempre buscaré retribuirles con todo lo que soy.

Quiero también destacar a mis compañeras Aranza Zamora y Antonia Cofré, quienes durante todos estos años académicos mantuvieron siempre la mejor disposición para ayudarnos a crecer, confiar en nosotros y apoyarnos mutuamente. Unidos podemos enfrentar todo este camino.

Finalmente, aprendí a agradecerme por lo vivido, por lo elegido y por la forma en que enfrenté y avance en este proceso tanto educativo como personal. Creo firmemente que la fe es una fuerza que nos impulsa hacia la paz y el crecimiento personal, y que nos abre caminos llenos de amor, desafíos y motivos para seguir avanzando hacia nuestro bienestar.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Nuevas fuentes de proteínas.....	11
1.2. MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS COMO FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEÍNAS.....	11
1.3. Producción y acumulación de proteínas en microalgas y cianobacterias	12
1.4. <i>OSCILLATORIA SP.</i> COMO ORGANISMO DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.....	12
1.5. RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y BARRERAS CELULARES	13
1.6. MÉTODOS DE DISRUPCIÓN CELULAR Y EXTRACCIÓN PROTEICA	14
1.7. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO.....	15
1.8. POTENCIAL BIOESTIMULANTE DE EXTRACTOS DERIVADOS DE CIANOBACTERIAS	16
1.9. <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> COMO MODELO DE EVALUACIÓN	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVOS.....	19
2.1.1. OBJETIVO GENERAL	19
2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	20
3.2 CONDICIONES DE CULTIVO.....	20
3.3 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO	20
3.3.1 Cuantificación de clorofila “a”	20
3.3.2.- Tasa de Crecimiento:	21
3.3.3.- Peso seco	21
3.4 ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS BIOMASAS.....	22
3.4.1.- Extracción y cuantificación de Clorofila a y carotenoides totales.	22
3.4.2.- Extracción y cuantificación de pigmentos ficobilínicos.	22
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN MEDIANTE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA (RSM).....	23
3.6 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EXTRACTIVA	24
3.7 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE).	25
3.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN SEMILLAS DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i>	25
3.8.1.- Material vegetal y tratamientos experimentales.....	25
3.8.2. Porcentaje de germinación	25
3.8.3 Longitud radicular.	26
3.8.4 Análisis estadísticos.	26
4.1 CRECIMIENTO DE <i>OSCILLATORIA SP</i> EN MEDIO WALNE MODIFICADO.	27
4.1.1 Curva de crecimiento	27
4.1.2 Cuantificación de pigmentos y composición química del cultivo.....	28
4.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BIOMASA	28
4.2.1 Pigmentos Ficobilínicos	28
4.2.2 Proteínas totales.....	29
4.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR ULTRASONIDO.	30
4.3.1 Eficiencia extractiva del proceso de extracción	31
4.3.2 Superficie de respuesta del proceso de extracción	32
4.3.3 Modelo matemático del proceso de extracción	33
4.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOESTIMULANTE EN <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD.....	34

4.4.1 Tasa de germinación.....	34
4.4.2 Longitud radicular	35
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIÓN	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS	49
ANEXO 1: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO WALNE MODIFICADO CON AJUSTE DE MACRONUTRIENTES SEGÚN BG11 PARA EL CULTIVO DE <i>OSCILLATORIA</i> SP. (CCM-UDEC-334)	49
ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA LONGITUD RADICULAR DE PLÁNTULAS DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD. MEDIANTE ANOVA DE WELCH Y PRUEBA POST HOC DE GAMES-HOWELL.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>OSCILLATORIA SP.</i> (CCM-UDEC-334) CULTIVADA EN MEDIO WALNE MODIFICADO.....	27
FIGURA 2. CONTENIDO FICOBILÍNICOS EN BIOMASA SECA Y VOLUMEN DE CULTIVO	29
FIGURA 3. SUPERFICIE DE RESPUESTA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN SISTEMA ACUOSO	32
FIGURA 4. SUPERFICIE DE RESPUESTA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN SISTEMA ALCALINO...	33
FIGURA 5. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD. BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EVALUADOS. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (N = 3).....	35
FIGURA 6. LONGITUD RADICULAR DE PLÁNTULAS DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD. A LAS 24 H DE GERMINACIÓN BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EVALUADOS. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (N = 3).	36
FIGURA 7. LONGITUD RADICULAR DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD. A LAS 48 H DE GERMINACIÓN BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EVALUADOS. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (N = 3).	37
FIGURA 8. LONGITUD RADICULAR DE PLÁNTULAS DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD. A LAS 72 H DE GERMINACIÓN BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EVALUADOS. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (N = 3)	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DEL CULTIVO DE <i>OSCILLATORIA SP.</i> (CCM-UDEC-334) EN MEDIO WALNE MODIFICADO	28
TABLA 2. CONDICIONES EXPERIMENTALES EVALUADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ULTRASONIDO Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES OBTENIDAS CON LOS SOLVENTES H ₂ O Y NaOH, EXPRESADO EN PORCENTAJE DE BIOMASA SECA.	30
TABLA 3. RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS OBTENIDA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ULTRASONIDO EN SOLVENTES H ₂ O Y NaOH.....	31
TABLA 4. COMPARACIÓN DE MEDIDAS DE LONGITUD RADICULAR A LAS 24 H MEDIANTE PRUEBA DE GAMES-HOWELL (p < 0,05)	49
TABLA 5. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LONGITUD RADICULAR A LAS 48 H MEDIANTE PRUEBA DE GAMES-HOWELL (p < 0,05)	50
TABLA 6. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LONGITUD RADICULAR A LAS 72 H MEDIANTE PRUEBA DE GAMES-HOWELL (p < 0,05)	50

RESUMEN

Las cianobacterias constituyen microorganismos fotosintéticos versátiles con un alto potencial biotecnológico, y la cepa marina *Oscillatoria* sp. CCM-UdeC-334 representa un aislado de interés debido a su capacidad de acumular compuestos proteicos bajo condiciones controladas. Sin embargo, la recuperación eficiente de proteínas intracelulares se ve limitada por estructuras celulares complejas que actúan como barrera en los procesos de ruptura celular. Este trabajo tuvo por objetivo optimizar la extracción de proteínas a partir de biomasa de *Oscillatoria* sp. mediante disrupción celular asistida por ultrasonido, utilizando metodología de superficie de respuesta (RSM) con diseño compuesto central (CCD), y evaluar el efecto de los extractos obtenidos sobre la germinación y crecimiento temprano de *Chenopodium quinoa* Willd.

La cepa *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334) se cultivó en medio Walne modificado con sobreoferta de nitrógeno y fósforo. En fase estacionaria se alcanzaron $5.428 \pm 995.71 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila *a*, una biomasa seca de $0,955 \pm 0,098 \text{ g L}^{-1}$ y un contenido proteico de $30,6 \pm 4,5\%$ de la biomasa seca ($\sim 292 \text{ mg proteínas L}^{-1}$ de cultivo).

Posteriormente, se implementó un diseño compuesto central para evaluar la amplitud (20–50%), tiempo de sonicación (5–15 min) y tipo de solvente (agua destilada y NaOH 0,1 M). La condición óptima correspondió al sistema acuoso (20% amplitud, 5 min), con una eficiencia de extracción de 97,6%, superando la mejor condición alcalina (NaOH 0,1 M; 83,7%).

La selección de los mejores rendimientos de extracción acuosa y alcalina se evaluó mediante un bioensayo de germinación de *C. quinoa*, alcanzando un alto 100% para el solvente acuoso a las condiciones de operación 20% de amplitud a 5 min. A las 72 h, el tratamiento T2 H₂O presentó la mayor longitud radicular ($2,896 \pm 0,651 \text{ cm}$), superando significativamente al control ($2,18 \pm 0,53 \text{ cm}$), lo que evidencia un efecto bioestimulante sobre el crecimiento radicular de las plántulas.

Los resultados indican que la disrupción asistida por ultrasonido en sistema acuoso es una estrategia eficiente para la recuperación de proteínas desde *Oscillatoria* sp., y permite obtener extractos crudos con actividad biológica detectables y potencial bioestimulante sobre el crecimiento radicular de *C. quinoa* con potencial de aplicación en la formulación de bioestimulantes para la industria agrícola.

Palabras clave: *Oscillatoria* sp.; extracción asistida por ultrasonido; metodología de superficie respuesta; proteínas totales; efecto bioestimulante.

ABSTRACT

Cyanobacteria are versatile photosynthetic microorganisms with considerable biotechnological potential. The marine strain *Oscillatoria* sp. CCM-UdeC-334 is of particular interest because of its ability to accumulate proteinaceous compounds under controlled conditions. However, the efficient recovery of intracellular proteins is constrained by complex cellular structures that act as barriers to cell disruption. This study aimed to optimize protein extraction from *Oscillatoria* sp. biomass through ultrasound-assisted cell disruption using response surface methodology (RSM) with a central composite design (CCD), and to evaluate the effects of the resulting extracts on germination and early growth of *Chenopodium quinoa* Willd.

Oscillatoria sp. CCM-UdeC-334 was cultivated in modified Walne medium supplemented with excess nitrogen and phosphorus. During the stationary phase, cultures reached $5,428 \pm 995.71 \mu\text{g L}^{-1}$ chlorophyll *a*, a dry biomass concentration of $0.955 \pm 0.098 \text{ g L}^{-1}$, and a protein content of $30.6 \pm 4.5\%$ of dry biomass, equivalent to approximately $292 \text{ mg protein L}^{-1}$ of culture.

A central composite design was then used to evaluate ultrasound amplitude (20–50%), sonication time (5–15 min), and solvent type (distilled water and 0.1 M NaOH). The optimal condition was obtained in the aqueous system at 20% amplitude and 5 min of sonication, achieving a protein extraction efficiency of 97.6%. This result exceeded the best alkaline condition, which reached 83.7% extraction efficiency using 0.1 M NaOH.

The highest-yielding aqueous and alkaline extracts were evaluated using a *C. quinoa* germination bioassay. The aqueous extract obtained at 20% amplitude and 5 min achieved 100% germination. After 72 h, the T2 H₂O treatment produced the greatest root length ($2.896 \pm 0.651 \text{ cm}$), significantly exceeding the control treatment ($2.18 \pm 0.53 \text{ cm}$), indicating a biostimulant effect on seedling root growth.

These findings indicate that ultrasound-assisted cell disruption in an aqueous system is an efficient strategy for protein recovery from *Oscillatoria* sp. biomass. In addition, the process yields crude extracts with detectable biological activity and potential use as biostimulant ingredients for agricultural applications.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nuevas fuentes de proteínas

La demanda mundial de proteínas ha aumentado de manera sostenida debido al crecimiento poblacional y a cambios dietéticos hacia un mayor consumo de productos de origen animal. Se proyecta que la población mundial superará los 9.000 millones de habitantes hacia 2050, lo que elevaría la demanda global de proteínas en aproximadamente 20–27% respecto de los niveles actuales, mientras que la demanda de proteína animal podría duplicarse hacia mediados de siglo (Henchion et al., 2017; Economist Impact, 2025; Onwezen et al., 2025).

Las fuentes convencionales de proteína, especialmente las de origen animal, presentan limitaciones ambientales que dificultan su expansión sostenible. La producción ganadera representa aproximadamente 14,5–16,5% de las emisiones globales de gases de efecto invernadero, ocupa entre 70 y 80% de la superficie agrícola mundial pese a aportar cerca de 18% de la ingesta calórica global y utiliza alrededor de 70% del agua dulce destinada a la agricultura (FAIRR Initiative, 2023; Ferdowsi et al., 2022). Además, producir 1 kg de proteína a partir de carne de res puede requerir hasta dieciocho veces más superficie de tierra y diez veces más agua que obtener la misma cantidad de proteína a partir de leguminosas (Ferdowsi et al., 2022; FAIRR Initiative, 2023).

Aunque las leguminosas constituyen una alternativa vegetal relevante, presentan limitaciones relacionadas con la estabilidad de los rendimientos, la menor concentración de aminoácidos azufrados y su participación aún reducida en la superficie agrícola mundial (Lisciani et al., 2024). Por ello, la transición hacia fuentes alternativas de proteína requiere diversificar las fuentes disponibles hacia organismos con mayor eficiencia productiva y perfiles nutricionales complementarios (Lumsden et al., 2024). En este escenario, las microalgas y cianobacterias emergen como candidatas de interés, ya que pueden cultivarse sin depender de suelos agrícolas y en sistemas controlados que permiten optimizar el uso de agua y nutrientes (Becker, 2007; Nunes et al., 2024).

1.2. Microalgas y cianobacterias como fuentes alternativas de proteínas

Las microalgas y cianobacterias constituyen un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos capaces de transformar la energía lumínica en energía química y, mediante la absorción de dióxido de carbono y la liberación de oxígeno, contribuir a la generación de compuestos químicos de interés biotecnológico. Esta capacidad metabólica ha impulsado su estudio durante las últimas décadas, ya que pueden sintetizar proteínas, lípidos, polisacáridos y pigmentos con potencial aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y biotecnológica (Becker, 2007; Christaki et al., 2011; Nunes et al., 2024).

Dentro de este grupo, las cianobacterias, en tanto organismos procariotas, presentan diferencias estructurales relevantes respecto de las microalgas eucariotas, entre las que incluyen una pared celular de tipo peptidoglicano y el uso de ficobiliproteínas compuestas por proteínas y cromóforos, como parte de su aparato fotosintético, lo que explica su tendencia a presentar contenidos proteicos comparativamente más altos que otros grupos fotosintéticos eucariotas (Finkel et al., 2016).

Diversos estudios han reportado contenidos proteicos de entre 30% y 70% del peso seco, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo (Becker, 2007; García-Encinas et al.,

2025; Giroto & Scapini, 2025). Becker (2007) destaca que en el género *Arthrospira* se han descrito contenidos proteicos superiores al 60% del peso seco de la biomasa, modulados por la disponibilidad de nitrógeno, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico del cultivo.

Esta elevada proporción, junto con perfiles aminoacídicos equilibrados y la presencia de compuestos bioactivos asociados, ha sustentado el creciente interés en aplicaciones industriales y nutricionales basadas en la acumulación de proteínas (Christaki et al., 2011).

1.3. Producción y acumulación de proteínas en microalgas y cianobacterias

El contenido proteico de la biomasa microalgal y cianobacteriana es un rasgo dinámico, determinado por el entorno de cultivo y el estado fisiológico celular. La disponibilidad de nitrógeno es clave para la síntesis proteica: en condiciones suficientes favorece la obtención de biomasa con un alto contenido de proteínas, mientras que su limitación redirige el metabolismo hacia la acumulación de lípidos y carbohidratos de reserva (Rawat et al., 2013; Ni Aznan et al., 2022). El nitrógeno se incorpora en forma de nitrato, nitrito o amonio y se asimila mediante la vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT), permitiendo la síntesis de aminoácidos y proteínas (Rawat et al., 2013; Ni Aznan et al., 2022; Rastogi et al., 2020).

Este comportamiento refleja y evidencia la elevada plasticidad metabólica de estos microorganismos fotosintéticos, evidenciando que la composición final de la biomasa depende de la interacción entre el diseño del cultivo, la disponibilidad de nutrientes y el estado fisiológico celular, tanto en microalgas como en cianobacterias (Rastogi et al., 2020; Oyama et al., 2022). En particular, variables operacionales como el modo de cultivo, régimen de cosecha, la densidad inicial y el suministro de nutrientes pueden modificar no solo la productividad, sino también la estabilidad del contenido proteico en cultivos microalgales y cianobacterianos (Umetani et al., 2024; Oyama et al., 2022).

En este contexto, el rendimiento proteico de un sistema productivo no depende exclusivamente de la especie seleccionada, sino también de la estrategia de cultivo, las condiciones de crecimiento y el momento de cosecha (Becker, 2007; Umetani et al., 2024). En consecuencia, resulta relevante analizar géneros específicos de cianobacterias, considerando tanto su potencial de acumulación proteica como las implicancias de sus características fisiológicas y estructurales en el diseño del cultivo.

1.4. *Oscillatoria* sp. como organismo de interés biotecnológico

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos capaces de generar biomasa en ambientes diversos, incluyendo climas desérticos y sistemas basados en el uso de aguas residuales (Singh et al., 2016; Zahra et al., 2020), lo que las hace ventajosas para el cultivo comercial y la producción de biocombustibles, antioxidantes, antimicrobianos, biofertilizantes y pigmentos (Zahra et al., 2020). Sin embargo, solo $\approx 10\%$ de las especies han sido caracterizadas en detalle, y un número limitado de géneros *Anabaena*, *Arthrospira*, *Nostoc* y *Phormidium* se produce a escala industrial (Idenyi et al., 2021; Jaeschke et al., 2021; Seghiri et al., 2021).

El género *Oscillatoria* agrupa cianobacterias filamentosas no ramificadas, sin heterocistos ni aquinetas, distribuidas en ambientes dulceacuícolas, salobres y marinos (Komárek & Anagnostidis, 2005; Whitton & Potts, 2012), con notable plasticidad fisiológica reflejada en la composición bioquímica de la biomasa y en la síntesis de metabolitos adaptativos (Paerl & Otten, 2013; Nayeem et al., 2025). Estudios en cepas de diferentes orígenes geográficos

de *Oscillatoria* reportan contenido de proteína cruda de 21-57%, lípidos de 9-17% y carbohidratos de 7-17% del peso seco, un perfil comparable o superior al de otras cianobacterias y microalgas usadas como fuente proteica (Nayeem et al., 2025), con incrementos adicionales bajo un suministro suficiente de nitrógeno (Nayeem et al., 2025). Bioquímicamente, distintas especies de *Oscillatoria* acumulan ficobiliproteínas, compuestos fenólicos, péptidos y polisacáridos sulfatados con actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica (Singh et al., 2005; Prasanna et al., 2010; Elkomy & Ismail, 2021; Bishoyi et al., 2024).

Desde el punto de vista de sostenibilidad, la posibilidad de cultivar cianobacterias en medios basados en agua de mar reduce de manera sustantiva la demanda de agua dulce asociada a la producción de biomasa, aspecto crítico en el contexto de la transición proteica y de la bioeconomía azul (Clarens et al., 2010; Iijima et al., 2015). La combinación de un alto contenido proteico y la capacidad de crecer en matrices salinas o de baja calidad refuerza la relevancia de *Oscillatoria* como fuente proteica alternativa, alineada con principios de sostenibilidad y menor uso de suelo y agua dulce. Esto plantea, además, la necesidad de caracterizar su respuesta frente a estrategias de disrupción celular y extracción, aspecto clave para el diseño de procesos eficientes de recuperación proteica en este género.

1.5. Recuperación de proteínas y barreras celulares

La recuperación eficiente de proteínas intracelulares a partir de biomasa microalgal y cianobacteriana está fuertemente condicionada por las características estructurales de cada especie, en particular por la composición y organización de la envoltura celular y por la disposición de las estructuras subcelulares (Lee et al., 2017; Taj-Liad et al., 2025). En cianobacterias, la envoltura presenta una organización similar a las de las bacterias Gram negativas, con una capa de peptidoglicano relativamente gruesa asociada a una membrana externa y, a matrices de exopolisacáridos que confieren resistencia mecánica y estabilidad (Günerken et al., 2015; Hoiczky & Hansel, 2000). Esta configuración actúa como una barrera física que limita la liberación espontánea de compuestos intracelulares, haciendo necesaria la aplicación de técnicas de disrupción celular para recuperar eficientemente proteínas y otros metabolitos.

En cianobacterias de interés comercial, como los géneros *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Arthrospira* y *Nostoc*, la dificultad de ruptura puede incrementarse debido a la baja relación superficie-volumen asociada a la organización filamentosa de los tricomas, a la robustez de sus estructuras celulares y, a la presencia de envolturas extracelulares ricas en polisacáridos descritas en distintas cepas marinas. Cuando están presentes, estas envolturas añaden una capa adicional de resistencia frente a los procesos de ruptura (Whitton & Potts, 2012; Bishoyi et al., 2024). Esta combinación de estructura filamentosa y matrices extracelulares genera una resistencia adicional frente a estrategias de disrupción mecánica y química, en contraste con géneros unicelulares como *Chlorella* o *Nannochloropsis*, cuyos comportamientos frente a métodos como la homogeneización a alta presión o la molienda con perlas han sido caracterizados con mayor detalle (Günerken et al., 2015; Wang et al., 2024). En el caso particular de *Oscillatoria*, estas características morfológicas y de la envoltura implican que la recuperación de proteínas requiere tratamientos diseñados para superar las barreras físicas sin comprometer la calidad funcional de la biomasa.

Además de la envoltura externa, la organización subcelular interna también contribuye a la dificultad de recuperación de biomoléculas. En cianobacterias, numerosas proteínas se

encuentran asociadas a complejos fotosintéticos y sistemas de membranas tilacoidales, por lo que su liberación requiere tanto la ruptura de la pared celular como la desestabilización controlada de membranas internas (Singh & Montgomery, 2013; Günerken et al., 2015). En consecuencia, la eficiencia del proceso extractivo depende no solo de la intensidad del tratamiento aplicado, sino también de su capacidad para preservar la integridad de la biomolécula objetivo, aspecto especialmente relevante cuando se busca recuperar proteínas con funcionalidad biológica o destinada a aplicaciones específicas, como extractos proteicos con potencial bioestimulante (Wang et al., 2024; Guadalupi et al., 2025).

1.6. Métodos de disrupción celular y extracción proteica

En cianobacterias se han aplicado distintas estrategias de disrupción celular con el objetivo de liberar proteínas y otros compuestos intracelulares, las cuales pueden agruparse en métodos mecánicos, físicos y químicos. Estas tecnologías difieren en el tipo de energía aplicada, en su eficiencia de ruptura y en el grado de preservación de las biomoléculas liberadas, y su desempeño depende en gran medida por la composición de la envoltura celular, de la organización intracelular y de las condiciones operacionales del proceso (Mehta et al., 2015; Liu et al., 2022).

Entre los métodos mecánicos aplicados a cianobacterias, la homogenización a alta presión (high-pressure homogenization, HPH) y el ultrasonido (ultrasound assisted Extraction UAE) se han evaluado extensamente para la extracción de proteínas. En biomasa de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, la aplicación de HPH como pretratamiento ha demostrado incrementar de manera significativa la recuperación de proteínas en comparación con procesos convencionales; en suspensiones de *S. platensis* se han descrito recuperaciones proteicas en el sobrenadante que alcanzan entre 80 y 88% del contenido total cuando se combina HPH con condiciones alcalinas moderadas, superando los rendimientos obtenidos mediante extracción alcalina sin pretratamiento mecánico (Parimi et al., 2015; Muccio et al., 2022). De forma complementaria, en la misma cianobacteria se ha observado que la cavitación acústica inducida por ultrasonido permite incrementar la recuperación de proteínas desde valores cercanos al 30–35% en procesos convencionales sin ultrasonido hasta rendimientos superiores al 70–75% bajo condiciones optimizadas de amplitud, tiempo y ciclo de trabajo, evidenciando el potencial del ultrasonido como tecnología mecánica relativamente suave para mejorar la solubilización de proteínas intracelulares (Yüçetepe et al., 2018; Lupatine et al., 2017; Purdi et al., 2023).

Entre los métodos físicos, el uso de microondas se ha evaluado principalmente en el contexto de floraciones de cianobacterias como *Microcystis aeruginosa*, donde el calentamiento rápido del agua intracelular y la generación de presión interna inducen la disrupción de la envoltura celular y la liberación de materia orgánica intracelular (Geadá et al., 2019). Aunque estos tratamientos permiten una descomposición rápida de la biomasa, su aplicación se ha orientado mayoritariamente al control de floraciones y al manejo de toxinas, y no tanto a la obtención de proteínas funcionales, ya que las altas potencias y tiempos cortos utilizados pueden comprometer la estabilidad estructural de las proteínas y otros compuestos sensibles (Peng et al., 2020).

Por otra parte, los métodos químicos, basados en tratamientos ácidos, básicos o con detergentes, pueden debilitar la envoltura celular y la membrana plasmática y facilitar la liberación de compuestos intracelulares. En cianobacterias, se han desarrollado mezclas de enzimas y agentes químicos capaces de degradar de forma controlada las distintas capas

estructurales, logrando una lisis eficiente y la preservación de ADN, ARN y proteínas activas en los lisados (Mehta et al., 2015).

En el ámbito de la extracción proteica desde biomasa algal, los medios acuosos y alcalinos se emplean con objetivos y mecanismos de acción diferentes. El agua destilada constituye un medio acuoso para recuperar compuestos solubles liberados tras la disrupción celular, mientras que una solución de hidróxido de sodio (NaOH) favorece la solubilización de proteínas al elevar el pH y modificar las interacciones entre proteínas y componentes de la matriz celular. Como antecedente, la extracción alcalina con NaOH seguida de precipitación isoelectrica se ha utilizado para recuperar proteínas desde *Arthrospira platensis*; asimismo, la asistencia por ultrasonido puede favorecer la liberación de proteínas en medios acuosos o alcalinos mediante la disrupción de la biomasa (Vernès et al., 2019; Lupatini et al., 2017; Taragjini et al., 2022; Liu et al., 2022). Estudios en microalgas también muestran que los tratamientos acuosos y alcalinos asistidos por ultrasonido pueden generar rendimientos y perfiles de fraccionamiento distintos, debido a la acción conjunta de la cavitación y del medio extractante sobre la disponibilidad y solubilización de proteínas (Hildebrand et al., 2020; Martins et al., 2025). Por tanto, la comparación de agua destilada y NaOH 0,1 M bajo las mismas condiciones de extracción asistida por ultrasonido permite evaluar el efecto del medio extractante sobre la recuperación proteica desde biomasa de *Oscillatoria* sp. En conjunto, los métodos mecánicos, físicos y químicos aplicados a cianobacterias permiten superar las barreras estructurales de la envoltura celular y liberar proteínas intracelulares con eficiencias que dependen de la tecnología y de las condiciones empleadas (Mehta et al., 2015; Liu et al., 2022).

1.7. Extracción asistida por ultrasonido y optimización del proceso

Dentro de las tecnologías evaluadas para la disrupción celular, el ultrasonido ha recibido una creciente atención debido a su capacidad de inducir cavitación acústica en medios líquidos. La formación y el colapso de microburbujas generan microchorros, ondas de choque y gradientes locales de presión que desestabilizan la envoltura celular y favorecen la liberación de compuestos intracelulares (Ashokkumar, 2015; Mondal & Lakkaraju, 2021). La eficiencia del proceso depende de parámetros como la frecuencia acústica, la amplitud de la onda, la potencia aplicada y el tiempo de exposición, los cuales determinan la intensidad de la cavitación y el equilibrio entre recuperación de biomoléculas y su posible degradación (Liu et al., 2022; Mondal et al., 2021).

En cianobacterias como *Arthrospira (Spirulina) platensis*, la extracción asistida por ultrasonido (UAE) ha permitido incrementar la liberación de proteínas en comparación con métodos convencionales. Trabajos que combinan ultrasonido con extracción alcalina y choque osmótico han reportado aumentos claros en el rendimiento proteico frente a procesos sin ultrasonido, al optimizar variables como pH, relación sólido-líquido, concentración de sal, tiempo de sonicación y régimen de pulsos (Yücepe et al., 2018; Yücepe et al., 2019). Más recientemente, Guadalupi et al. (2025) desarrollaron un protocolo de extracción proteica asistida por ultrasonido en tampón acuoso para *Spirulina* y *Chlorella*, logrando rendimientos altos y recuperando numerosas proteínas y péptidos a partir de ficobiliproteínas de *Spirulina*, lo que refuerza el potencial de UAE en cianobacterias como fuente de ingredientes funcionales.

En el género *Oscillatoria*, la UAE se ha aplicado específicamente a la obtención de ficobiliproteínas, como ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina, que forman parte importante de las proteínas presentes en estas cianobacterias. Sharma et al. (2020) estudiaron la extracción

de estas proteínas a partir de *Oscillatoria* sp. BTA 170, evaluando el efecto de la relación sólido-líquido, el ciclo de trabajo, la intensidad acústica y el pH sobre el rendimiento de C-ficoeritrina y otras ficobiliproteínas. La optimización de las condiciones de UAE en este trabajo se realizó mediante un diseño estadístico tipo Taguchi, lo que permitió cuantificar, a través de razones señal-ruido y análisis de varianza, la contribución de cada parámetro sobre la respuesta y alcanzar recuperaciones de FC y FE cercanas al 94–95% en las condiciones optimizadas. En el caso de *Spirulina*, otros estudios han empleado diseños compuestos centrales y diseños Box–Behnken dentro de la metodología de superficie de respuesta para modelar el efecto conjunto de pH, temperatura, tiempo de sonicación y relación sólido-líquido sobre el rendimiento proteico (Yüçetepe et al., 2019). De forma complementaria, en microalgas verdes se han utilizado diseños de cribado determinista (DSD) y análisis de espacio de diseño para optimizar la extracción proteica alcalina asistida por ultrasonido, con rendimientos elevados y modelos con buena capacidad predictiva (Li et al., 2026).

A pesar de estos avances, en *Oscillatoria* la optimización de UAE se ha centrado en ficobiliproteínas y no en la extracción de proteínas totales orientada a concentrados funcionales. Este vacío justifica la aplicación de UAE junto con un diseño experimental de optimización en biomasa de *Oscillatoria*, orientado a mejorar la eficiencia de recuperación proteica y avanzar hacia protocolos más sostenibles y eficientes energéticamente.

1.8. Potencial bioestimulante de extractos derivados de cianobacterias

La calidad funcional de los extractos proteicos no depende únicamente del rendimiento cuantitativo de la extracción, sino también de la integridad estructural de las biomoléculas recuperadas. En *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* se ha demostrado que la extracción asistida por ultrasonido en medios acuosos permite obtener altos rendimientos de proteínas en tiempos cortos, sin recurrir a condiciones extremas de pH ni temperatura, reduciendo así el riesgo de desnaturalización severa en comparación con los procesos alcalinos convencionales (Vernès et al., 2019). Este aspecto es especialmente relevante cuando el objetivo es generar extractos con aplicación biológica, como la estimulación del crecimiento vegetal, donde la bioactividad depende de la estructura tridimensional de los compuestos y de su capacidad para interactuar con receptores y rutas metabólicas de la planta (Colla et al., 2015; Chiaiese et al., 2018; Kapoore et al., 2021).

Las cianobacterias tienen un uso histórico en agricultura, particularmente en cultivos de arroz inundado, donde contribuyen a la fertilidad del suelo mediante la fijación de nitrógeno y la liberación de compuestos orgánicos (Calvo et al., 2014). Más recientemente, se ha demostrado que los extractos de cianobacterias actúan como bioestimulantes al aportar proteínas, aminoácidos, polisacáridos y fitohormonas capaces de modular la absorción de nutrientes y la tolerancia a estrés abiótico (Chiaiese et al., 2018; Santini et al., 2021). Un ejemplo directo de esta relación es el trabajo de Santini et al. (2022), quienes evaluaron hidrolizados proteicos de distintas cianobacterias (*Arthrospira*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Tolypothrix* y *Leptolyngbya*) aplicados foliarmente en albahaca. Los hidrolizados de *Nostoc*, *Tolypothrix* y *Leptolyngbya* incrementaron el peso fresco en más de 30% respecto del control, sugiriendo que la bioactividad depende más de la calidad de los péptidos liberados que del aporte nutricional directo de nitrógeno.

Durante las primeras etapas del desarrollo vegetal, la germinación implica la movilización de reservas y la síntesis de nuevas proteínas necesarias para el establecimiento de la plántula (Bewley et al., 2013). En este contexto, distintos estudios han mostrado que extractos

de microalgas y cianobacterias pueden mejorar parámetros como porcentaje de germinación, longitud radicular y biomasa aérea en cultivos hortícolas y de interés agronómico (Chiaiese et al., 2018; Mutale-Joan et al., 2021). En particular, Elhakim et al. (2026) evaluaron extractos de *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina* y *Arthrospira platensis* como agentes de pretratamiento de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), observando que la imbibición durante 4 h en soluciones de extracto con concentraciones hasta 1,0% mejoró significativamente la germinación y el vigor de las plántulas. El efecto más marcado para *N. salina* al 0,5%, que aumentó la germinación hasta aproximadamente 96% frente a 84% en el control y elevó el índice de vigor de plántulas en torno a 130% respecto al control. En cambio, concentraciones superiores (2–5%) redujeron la germinación y el vigor, lo que demuestra que el efecto bioestimulante de estos extractos es dosis-dependiente.

En conjunto, estos antecedentes indican que los extractos derivados de cianobacterias pueden ejercer efectos bioestimulantes sobre la germinación y el crecimiento vegetal, y que preservar la estructura y actividad de sus componentes proteicos y peptídicos es clave para mantener dicha bioactividad. En este marco, la obtención de extractos proteicos de *Oscillatoria* mediante UAE bajo condiciones optimizadas se plantea como una estrategia coherente con el desarrollo de bioestimulantes de origen cianobacteriano, orientada a generar fracciones con potencial bioestimulante que puedan integrarse en esquemas de manejo agrícola más sostenibles (Santini et al., 2021)

1.9. *Chenopodium quinoa* como modelo de evaluación

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un pseudocereal de creciente interés nutricional y agronómico debido a su contenido proteico, cercano al 14–18% en base seca, y a un perfil de aminoácidos esenciales más equilibrado que el de la mayoría de los cereales (Vega-Gálvez et al., 2010; Hernández-Ledesma, 2019). Además de su importancia como cultivo, constituye un modelo apropiado para bioensayos de germinación y crecimiento temprano, ya que sus semillas germinan de manera rápida puesto que su embrión rodea el endospermo, y relativamente homogénea en condiciones controladas. Esto permite cuantificar variables como porcentaje de germinación, longitud radicular y crecimiento inicial de las plántulas, parámetros que pueden responder de forma sensible a cambios en el medio de cultivo y a la aplicación de compuestos bioactivos (Ruiz-Carrasco et al., 2011; Panuccio et al., 2014).

La sensibilidad fisiológica de algunos genotipos de quinoa ha sido ampliamente documentada frente a distintos factores de estrés abiótico, bajo condiciones de salinidad, se han observado variaciones en la germinación, la elongación radicular, y el crecimiento de la parte aérea e indicadores bioquímicos de estrés, terminándose genotipos sensibles (Ruiz-Carrasco et al., 2011; Panuccio et al., 2014). Esta sensibilidad resulta útil para evaluar extractos bioactivos, puesto que permite detectar respuestas tempranas en el establecimiento de la plántula antes de realizar ensayos de mayor duración o bajo condiciones de cultivo más complejas.

La pertinencia de la quinoa para evaluar bioestimulantes de origen fotosintético también ha sido respaldada por estudios recientes. Fiorentino et al. (2025) observaron que extractos de *Ettlia pseudoalveolaris* y *Chlorella vulgaris* modificaron el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, así como la capacidad antioxidante de plántulas de quinoa sometidas a estrés salino. De manera similar, Giorgetti et al. (2026) reportaron que extractos de *C. vulgaris* incrementaron el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de plántulas de quinoa ‘Regalona’ expuestas a estrés salino y térmico. Estos antecedentes justifican que la quinoa es capaz de

responder fisiológicamente a extractos derivados de microorganismos fotosintéticos y, por tanto, constituye un modelo adecuado para detectar efectos bioestimulantes.

Considerando que los extractos derivados de cianobacterias pueden contener aminoácidos, péptidos, polisacáridos, vitaminas, pigmentos y otros compuestos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, la evaluación de la germinación y de la elongación radicular en quinoa permite determinar su desempeño fisiológico temprano (Santini et al., 2021; Santini et al., 2022). Por ello, *C. quinoa* representa un sistema experimental pertinente para evaluar el potencial bioestimulante de extractos crudos obtenidos desde *Oscillatoria* sp. mediante extracción asistida por ultrasonido.

Estos vacíos justifican abordar de manera conjunta la optimización del proceso de extracción y la evaluación biológica de sus productos, en lugar de tratarlos como líneas de investigación independientes. En este contexto, la presente investigación busca responder a la siguiente pregunta:

¿Cómo afecta la optimización de los parámetros de extracción asistida por ultrasonido (UAE) al rendimiento de recuperación de proteínas desde biomasa de *Oscillatoria* sp., y en qué medida los extractos proteicos crudos obtenidos mediante esta tecnología presentan un efecto bioestimulante sobre la germinación y el desarrollo temprano de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd?

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El medio de extracción y las condiciones de operación (amplitud y tiempo de sonicación) asistida por ultrasonido a partir de biomasa de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334) influyen en la recuperación de proteínas y en la respuesta bioestimulante de los extractos sobre la germinación y el crecimiento temprano de *Chenopodium quinoa* Willd.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo General

Optimizar procesos basados en ultrasonido para la extracción de proteínas totales desde la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp., y el efecto bioestimulante sobre *Chenopodium quinoa* Willd.

2.1.2. Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de extracción de proteínas totales mediante tecnologías de cavitación (ultrasonido), comparando rendimientos frente a métodos convencionales.
- Determinar las condiciones de extracción que afectan a la bioactividad del extracto crudo sobre la germinación y crecimiento temprano de *Chenopodium quinoa* Willd

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Para el desarrollo de este estudio se empleó la cepa de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas (CCM-UdeC) del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, con el código (CCM-UdeC-334).

3.2 Condiciones de cultivo

La cepa fue cultivada en medio Walne (Walne, 1970) modificado mediante el ajuste de las concentraciones de nitrógeno y fósforo, con el objetivo de favorecer la acumulación de biomasa y compuestos proteicos (Anexo 1).

Los cultivos se mantuvieron en matraces de 500 mL, con un total de cuatro réplicas experimentales ($n = 4$), bajo condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C), fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad) y densidad de flujo fotónico de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La aireación fue continua mediante suministro de aire filtrado a través de membranas de $0,22 \mu\text{m}$. Previo al establecimiento del experimento, la cepa fue sometida a un proceso de aclimatación en el medio modificado durante un periodo de 15 a 20 días. Posteriormente, se realizó un segundo ciclo de aclimatación de dos semanas, con el fin de estabilizar las condiciones fisiológicas del cultivo.

Para la preparación del inóculo, se estandarizó la densidad inicial a $500 \mu\text{g}$ de clorofila a por litro de cultivo, asegurando condiciones homogéneas entre réplicas. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada dos días mediante la cuantificación de clorofila a. Una vez alcanzada la fase estacionaria, los cultivos fueron cosechados mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. La biomasa obtenida fue recuperada, almacenada a -18 °C y posteriormente sometida a liofilización por 48hrs y almacenada a -20 °C hasta su uso en los análisis químicos y de extracción.

3.3 Determinación del crecimiento

3.3.1 Cuantificación de clorofila “a”

El crecimiento del cultivo se determinó mediante la cuantificación de clorofila “a” en extractos preparados con acetona al 90%, solvente que permite la extracción de clorofilas y carotenoides. Se tomó un volumen de 3 mL por réplica, los cuales fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido fue suspendido en 1 mL de acetona al 90% en un tubo homogeneizador FastPrep, utilizando una esfera cerámica y agitación en vortex. Las muestras fueron procesadas en un homogeneizador automático FastPrep en tres ciclos de 20 segundos cada uno. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue colectado en un matraz aforado, mientras que el pellet fue sometido a extracciones sucesivas con acetona al 90% hasta obtener un solvente incoloro. El volumen final del extracto se ajustó a 5 mL con acetona. Las muestras se leyeron a 750 nm, 663 nm y 644 nm en un espectrofotómetro, utilizando acetona al 90% como blanco. Las lecturas fueron corregidas por turbidez de la siguiente manera:

$$A^{663} = A^{750} - A^{663}$$

$$A^{644} = A^{750} - A^{644}$$

Para calcular la concentración de clorofila a se utilizaron las ecuaciones de Wegmann & Metzner (1971):

$$\text{Concentración relativa clorofila a} = 10,3 \times AA^{663} - 0,918 \times AA^{644}$$

Finalmente se calculó la concentración de clorofila a por volumen de cultivo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Clorofila a } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{Concentración relativa} \times v}{(V \times z)}$$

Donde:

v = Volumen del extracto (mL)

V = Volumen de cultivo filtrado (L)

z = Longitud de la cubeta (cm)

Los datos para la cuantificación de clorofila a se recolectaron cada tres días de las 4 réplicas de cada tratamiento y el promedio de los datos de las réplicas se utilizó para la construcción de una curva de crecimiento por cada tratamiento.

3.3.2.- Tasa de Crecimiento:

La tasa de crecimiento se calculó desde las curvas de crecimiento identificando la fase de crecimiento exponencial y utilizando la siguiente fórmula (Guillard, 1973):

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

Donde:

t₁ = 3

t₂ = 6

N₁ = Densidad celular obtenida en t₁

N₂ = Densidad celular obtenida en t₂

3.3.3.- Peso seco

Para determinar el rendimiento de los cultivos expresado como peso seco, se utilizaron filtros de nitrocelulosa (poro 0,45 µm), previamente secados a 80 °C durante 24 horas y pesados hasta peso constante. Se filtraron 10 mL de cultivo por réplica y la biomasa obtenida fue lavada con 10 mL de formiato de amonio 0,5 M para eliminar las sales.

Posteriormente, los filtros fueron secados en estufa a 80 °C durante 48 horas, enfriados en desecador y pesados nuevamente. La biomasa seca se calculó a partir de la diferencia de peso del filtro antes y después de la filtración, expresándose en (mg/L.)

$$\frac{(\text{Gramos de biomasa})}{(\text{litro de cultivo})} = (P_2 - P_1)/V \times 1000/1$$

Donde:

P₁ = Peso del filtro seco sin biomasa

P₂ = Peso del filtro seco con biomasa

V = Volumen de cultivo filtrado (mL).

3.4 Análisis químico de las biomásas.

3.4.1.- Extracción y cuantificación de Clorofila a y carotenoides totales.

La determinación de clorofila a se realizó siguiendo el protocolo descrito por Strickland & Parsons (1968). Para cada réplica experimental, se tomaron 3 mL de cultivo, los cuales fueron centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos para obtener el pellet celular. El pellet fue suspendido en 1 mL de acetona al 90% en tubos de extracción FastPrep, incorporando una esfera cerámica y agitación en vortex. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a homogeneización en un equipo FastPrep durante tres ciclos de 20 segundos, seguidos de centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y el pellet sometido a extracciones sucesivas hasta obtener un solvente incoloro. Los sobrenadantes fueron reunidos y el volumen final se ajustó a 10 mL con acetona al 90%. La absorbancia se determinó a 750, 663 y 644 nm, utilizando acetona al 90% como blanco. Las lecturas fueron corregidas por turbidez y la concentración de clorofila a se calculó mediante la ecuación de Wegmann & Metzner (1971):

$$\text{Concentración relativa clorofila a} = 10,3 \times A^{663} - 0,918 \times A^{644}$$

$$\text{Concentración relativa carotenoides} = 4,2 \times A^{453} - 0,0264 \times Cr \text{ clor a}$$

Finalmente se calculó la concentración de los pigmentos en microgramos por gramos de biomasa seca utilizada para análisis.

$$\text{Concentración de Clorofila a} = \frac{(Cr \text{ clorofila a} \times v)}{(\text{Gramos de biomasa})}$$

$$\text{Concentración de Carotenoides} = \frac{(Cr \text{ carotenoides} \times v)}{(\text{Gramos de biomasa})}$$

Donde:

v = Volumen del extracto

3.4.2.- Extracción y cuantificación de pigmentos ficobilínicos.

La determinación de pigmentos ficobilínicos se realizó siguiendo el método descrito por Bennett & Bogorad (1973). Para ello, se pesaron 0,25 mg de biomasa liofilizada en tubos de homogeneización FastPrep, a los cuales se añadió 1 mL de tampón fosfato 100 mM (Ph:6.5) y una esfera cerámica. Las muestras fueron sometidas a homogeneización en un equipo automático FastPrep en tres ciclos de 20 segundos. Posteriormente, se aplicó un ciclo de congelación a -80 °C durante 8 minutos, seguido de descongelación a temperatura ambiente, agitación en vortex y centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue recolectado en un matraz aforado de 10 mL. El pellet residual fue sometido a extracciones sucesivas con tampón fosfato 100 mM, repitiendo el proceso hasta obtener un sobrenadante incoloro. El volumen final del extracto se ajustó a 10 mL con tampón fosfato.

La absorbancia del extracto se midió a 750 nm (corrección de turbidez), 620 nm (ficocianina), 650 nm (aloficocianina) y 565 nm (ficoeritrina), utilizando tampón fosfato 100 mM como blanco. Las lecturas fueron corregidas por turbidez mediante la resta de la

absorbancia a 750 nm. Las concentraciones de los pigmentos ficobilínicos se calcularon utilizando las ecuaciones descritas por Bermejo et al. (2002):

$$\begin{aligned} \text{Ficocianina (PC)} &= (A^{620} - 0,7 \times A^{650}) / 7,38 \\ \text{Alfocianina (APC)} &= (A^{650} - 0,19 \times A^{620}) / 5,65 \\ \text{Ficoeritrina (PE)} &= (A^{565} - 2,8 \times PC - 1,34 \times APC) / 12,7 \end{aligned}$$

Los resultados fueron expresados como μg de pigmento por gramo de biomasa seca.

3.4.3 Determinación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales en la biomasa se realizó mediante el método de Lowry et al. (1951), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Previo al análisis, se determinó el contenido de humedad de la biomasa liofilizada con el fin de expresar los resultados en base a peso seco. Para ello, se pesaron aproximadamente 30 mg de biomasa en sobres previamente secos y pesados, los cuales fueron secados en estufa a 80 °C durante 48 horas.

El porcentaje de humedad se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{((PS1 - PS2) - (PS3 - PS2))}{(PS1 - PS2)} \times 100$$

Donde:

PS1: Peso del sobre seco con la biomasa liofilizada sin secar

PS2: Peso del sobre seco

PS3: Peso del sobre seco con la biomasa liofilizada seca

Para la cuantificación de proteínas, se preparó una curva de calibración en el rango de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de una solución estándar de BSA disuelta en NaOH 0.1 M.

Las muestras fueron preparadas a partir de 25 mg de biomasa liofilizada, las cuales fueron sometidas a extracción alcalina mediante la adición de 5 mL de NaOH 0.1 M y calentamiento a 100 °C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente, centrifugadas a 7000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado para el análisis. Para el desarrollo de la reacción colorimétrica, se tomaron alícuotas del extracto y se le añadió la solución reactiva correspondiente al método de Lowry, seguida de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu. Las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos y la absorbancia fue medida a 750 nm en un espectrofotómetro. La concentración de proteínas se determinó a partir de la curva de calibración y los resultados fueron expresados como mg de proteína por gramo de biomasa seca, considerando la corrección por contenido de humedad.

3.5 Diseño experimental y optimización mediante metodología de superficie respuesta (RSM)

La optimización del proceso de extracción de proteínas totales mediante ultrasonido se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta (Response Surface Methodology, RSM), aplicando un diseño compuesto central (DCC). Esta estrategia permitió evaluar el efecto

de las variables independientes sobre el rendimiento extractivo de proteínas totales presentes en biomasa de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334).

En el proceso de extracción asistida por ultrasonido (UAE), se evaluaron variables independientes como la amplitud de la onda, el tiempo de tratamiento y el tipo de solvente utilizado para la extracción. La amplitud de onda se evaluó en un rango de 20 a 50 %, mientras que el tiempo de sonicación se evaluó entre 5 y 15 minutos. Como solventes de extracción se emplearon agua destilada (H₂O) y una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M.

El diseño experimental incluyó puntos factoriales, puntos axiales y tres réplicas en el punto central, con el fin de estimar el error puro y evaluar la posible curvatura del modelo. Todos los ensayos experimentales se realizaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los datos obtenidos fueron ajustados a un modelo polinómico cuadrático reducido, expresado mediante una ecuación de regresión que relaciona las variables independientes con la variable de respuesta, correspondiente al rendimiento de extracción de proteínas.

La significancia estadística del modelo y de sus términos individuales fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA), considerando un nivel de significancia del 95 % ($p < 0,05$). La calidad del ajuste del modelo fue determinada mediante el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de variación (CV) y el parámetro de precisión adecuada (Adeq Precision). Valores de R^2 cercanos a 1 indican un buen ajuste del modelo, mientras que valores de CV inferiores al 10 % reflejan una adecuada reproducibilidad. Asimismo, valores de Adeq Precision superiores a 4 indican una relación señal-ruido adecuada y una buena capacidad predictiva del modelo. El análisis estadístico y la generación de las superficies de respuesta se realizaron utilizando el software Design-Expert versión 12.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE. UU.).

3.6 Determinación de la eficiencia extractiva

Con el fin de evaluar el rendimiento del proceso de extracción de proteínas mediante ultrasonido, se calculó la eficiencia extractiva considerando el contenido total de proteínas presente en la biomasa utilizada para cada ensayo. Para las extracciones se empleó una relación biomasa: solvente de 100 mg de biomasa por 10 mL de solvente (10 mg/mL; 1% p/v; relación 1:100 g/mL). La eficiencia de extracción fue determinada como la relación entre la cantidad de proteínas extraídas bajo cada condición experimental y el contenido total de proteínas presente en la biomasa, previamente determinado mediante el método de Lowry (sección 3.4.3).

La eficiencia extractiva se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia extractiva (\%)} = \left(\frac{(\text{Proteínas extraídas})}{(\text{Proteínas totales biomasa})} \right) \times 100$$

donde las proteínas extraídas corresponden a la cantidad de proteínas obtenidas en cada condición de extracción asistida por ultrasonido, mientras que las proteínas totales en biomasa corresponden al contenido proteico inicial de la biomasa. Los valores obtenidos permitieron comparar el efecto de las distintas condiciones experimentales evaluadas en el diseño de superficie de respuesta (RSM), así como seleccionar los tratamientos con mayor rendimiento extractivo para su posterior evaluación biológica.

3.7 Extracción asistida por ultrasonido (UAE).

La extracción de proteínas se realizó mediante disrupción celular asistida por ultrasonido (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE), mediante el equipo ultrasónico de sonda (Sonics Vibra-Cell VCX 500, 20 kHz, 500 W) provisto de un vástago de 13 mm de diámetro. Para cada ensayo experimental, se utilizaron 100 mg de biomasa liofilizada, los cuales fueron suspendidos en 10 mL de solvente, estableciendo una relación biomasa: solvente de 1:100 (p/v). Como solventes de extracción se emplearon agua destilada (H₂O) y una solución de NaOH 0.1 M. Las muestras fueron sometidas a tratamiento ultrasónico bajo las condiciones definidas en el diseño experimental (sección 3.5), evaluando combinaciones de amplitud (20–50 %) y tiempo de sonicación (5–15 minutos). Durante el proceso, las muestras fueron mantenidas en baño de hielo con el fin de controlar el aumento de temperatura generado por la cavitación acústica. Finalizado el tratamiento, las muestras fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado para la posterior cuantificación de proteínas.

3.8 Evaluación del efecto de los extractos en semillas de *Chenopodium quinoa*.

3.8.1.- Material vegetal y tratamientos experimentales

Chenopodium quinoa Willd, fue seleccionada como modelo de bioensayo por su reconocida sensibilidad a compuestos bioestimulantes durante la germinación, su relevancia agronómica en Chile, y su caracterización en estudios de este tipo como indicador temprano de bioactividad (Ruiz et al., 2014; Mutale-Joan et al., 2020). Las semillas utilizadas en el ensayo de germinación fueron facilitadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción.

Se evaluaron seis condiciones experimentales: (i) un control con agua destilada (H₂O), (ii) un control con solución de NaOH 0.1 M, y (iii–iv–v–vi) dos tratamientos correspondientes a extractos obtenidos a partir de biomasa de *Oscillatoria* sp. mediante extracción asistida por ultrasonido en condiciones previamente optimizadas dos para cada solvente (2 H₂O y 2 NaOH 0.1M). Los extractos seleccionados corresponden a las condiciones de mayor eficiencia extractiva dentro de cada sistema (Tratamiento 2 y 5 para H₂O y tratamientos 7 y 11 para NaOH, según diseño de superficie respuesta), y fueron utilizados como extractos crudos.

Para cada tratamiento se dispusieron 50 semillas en placas Petri de 9 cm de diámetro, dispuestas sobre papel absorbente previamente humedecido con 5 ml de solución correspondiente a cada tratamiento. Cada condición se evaluó en tres réplicas independientes (n=3), totalizando 150 semillas por tratamiento.

3.8.2. Porcentaje de germinación

El ensayo de germinación se realizó en placas Petri de 9 cm de diámetro, incubadas en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante un periodo de 72 horas. Previamente las semillas se embebieron durante 20 minutos en las soluciones correspondientes a cada tratamiento (Control H₂O, Control NaOH, T2 H₂O, T5 H₂O, T7 NaOH y T11 NaOH).

Se consideró como semilla germinada aquella que presentó emergencia visible de la radícula con una longitud superior a 1 mm. El número de semillas germinadas fue registrado cada 24 h desde el inicio del ensayo, y a partir de este conteo se calculó el porcentaje de germinación a las 24 h para cada tratamiento.

El porcentaje de germinación se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\%Germinación = \frac{Ng}{Nt} \times 100$$

Donde Ng corresponde al número de semillas germinadas a las 24 h y Nt al número total de semillas sembradas por placa. Cada tratamiento se evaluó en tres réplicas independientes (tres placas de 50 semillas, n=150 semillas por tratamiento).

3.8.3 Longitud radicular.

La longitud de la radícula se utilizó como indicador del crecimiento temprano de las plántulas bajo los distintos tratamientos, siguiendo el enfoque metodológico empleado en bioensayos de germinación con extractos de microalgas y cianobacterias (Chiaiese et al., 2018; Navarro-López et al., 2020). A partir del criterio de germinación descrito anteriormente, consiste en la emergencia de radícula con longitud superior a 1 mm a las 24 h, se realizó un seguimiento del crecimiento de la radícula a las 24, 48 y 72 h de germinación. La longitud de la radícula se registró en centímetros (cm) mediante análisis de imágenes con el software ImageJ (Fiji) (Schneider et al., 2012), midiendo la distancia desde la base de la semilla hasta el ápice radicular y su desviación estándar, con el fin de descubrir la dinámica de elongación y comparar los efectos de los extractos crudos de *Oscillatoria* sp. sobre el crecimiento radicular.

3.8.4 Análisis estadísticos.

La longitud de la radícula se utilizó como indicador del crecimiento temprano de las plántulas bajo los distintos tratamientos. Para cada tratamiento y tiempo de evaluación se calculó la longitud de la radícula (cm) y su desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de Welch, debido a la heterogeneidad de varianzas detectada con la prueba de Levene. La normalidad fue evaluada con la prueba de Shapiro-Wilk y las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba post hoc de Games-Howell, considerando diferencias significativas con $p < 0,05$. El detalle del análisis estadístico se presenta en el Anexo 2.

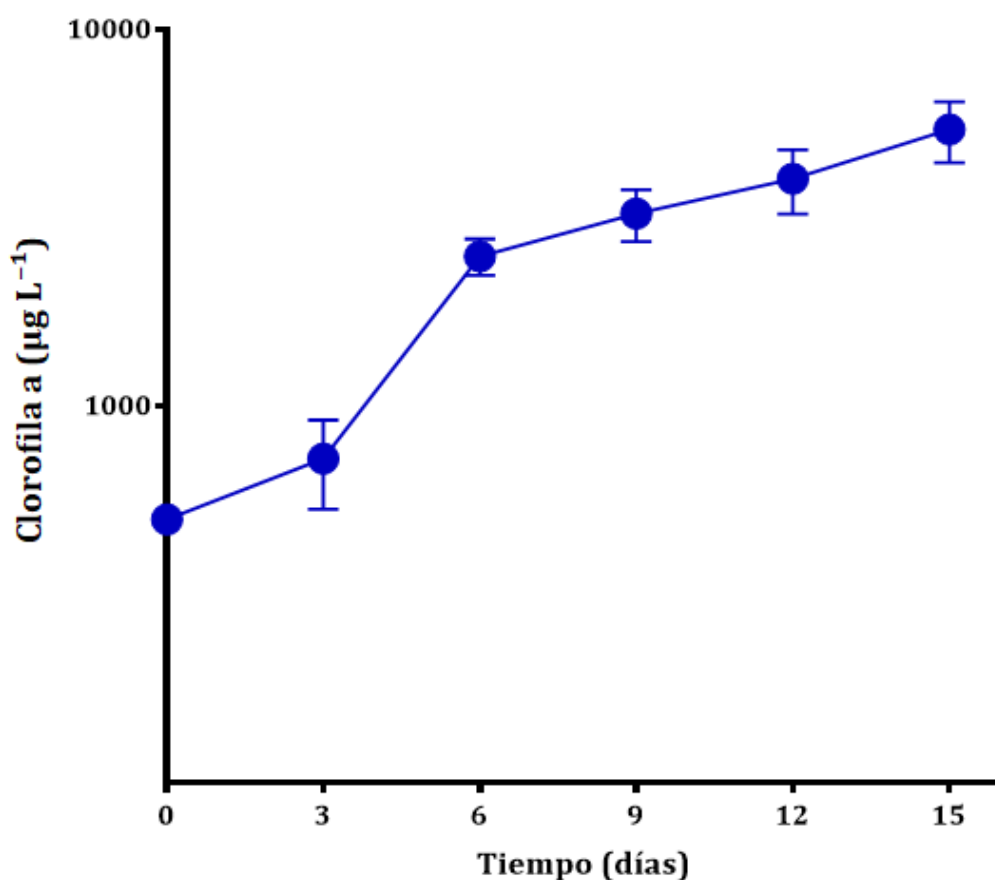
RESULTADOS

4.1 Crecimiento de *Oscillatoria* sp en medio Walne modificado.

4.1.1 Curva de crecimiento

Con el objetivo de caracterizar el comportamiento fisiológico del cultivo de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334), se evaluó su crecimiento en medio Walne modificado mediante el seguimiento de la concentración de clorofila *a* durante un periodo de 15 días.

La dinámica de crecimiento se presenta en la Figura 1, donde se observa un incremento progresivo en la concentración de clorofila *a*, a lo largo del periodo de incubación. El cultivo fue inoculado con una densidad inicial estandarizada de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila *a*, la cual aumentó sostenidamente hasta $5428.35 \pm 995.71 \mu\text{g L}^{-1}$ hacia el día 15 de cultivo (Figura 1).



El

Figura 1. Curva de crecimiento de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334) cultivada en medio Walne modificado

crecimiento del cultivo fue determinado mediante la cuantificación de clorofila *a* durante 15 días. La concentración de clorofila *a* se expresa en $\mu\text{g L}^{-1}$ y se presenta en escala logarítmica para facilitar la visualización de la fase exponencial. Los valores corresponden al promedio de cuatro réplicas independientes ($n = 4$) $\pm$ desviación estándar

El análisis de la curva de crecimiento permitió identificar las distintas fases fisiológicas del cultivo. Durante los primeros días se observó una fase inicial de adaptación, seguida por una fase exponencial caracterizada por un incremento acelerado en la concentración de clorofila *a* entre los días 3 y 6. Posteriormente, el cultivo ingresó a una fase estacionaria a partir del día 9, donde la densidad celular tendió a estabilizarse progresivamente.

4.1.2 Cuantificación de pigmentos y composición química del cultivo.

La cuantificación de clorofila *a* y proteínas totales permitió estimar los parámetros fisiológicos y químicos del cultivo correspondientes a la fase exponencial y estacionaria, los cuales se resumen en la Tabla 1. La tasa de crecimiento (*k*) fue calculada a partir de las concentraciones promedio de clorofila *a* obtenidas en los tiempos seleccionados, mediante la ecuación de Guillard (1973), por lo que se reportan como un valor puntual. En cambio, la densidad celular, el peso seco y el contenido proteico se expresan como promedio desviación estándar, considerando las cuatro réplicas experimentales analizadas.

La fase exponencial, el cultivo presentó una tasa de crecimiento de 0.542 divisiones día⁻¹, asociada a una densidad celular de 2497.72 ± 277.50 µg L⁻¹ de clorofila *a* y un peso seco de 0.530 ± 0.046 g L⁻¹. En esa misma fase, el contenido de proteínas totales alcanzó 18.14 ± 2.58 mg g⁻¹ de biomasa seca, equivalentes a 0.49 ± 0.08 mg mL⁻¹ de cultivo. Por su parte, en la fase estacionaria se observó una tasa de crecimiento de 0.595 divisiones día⁻¹, junto con una densidad celular de 5428.35 ± 995.71 µg L⁻¹ de clorofila *a* y un peso seco de 0.955 ± 0.098 g L⁻¹. En esta fase, el contenido de proteínas totales aumentó a 30.60 ± 4.54 mg g⁻¹ de biomasa seca, equivalentes a 0.88 ± 0.11 mg mL⁻¹ de cultivo.

Estos resultados evidencian que la fase estacionaria concentró los mayores valores de biomasa y proteínas, mientras que la fase exponencial correspondió al periodo de mayor actividad de crecimiento celular. En consecuencia, la biomasa de fase estacionaria fue seleccionada para los ensayos posteriores de extracción proteica.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y producción de proteínas totales del cultivo de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334) en medio Walne modificado

Fase	Tasa crecimiento (divisiones día ⁻¹)	Clorofila a (µg L ⁻¹)	Peso seco (g L ⁻¹)	Proteínas totales por biomasa seca (%)
Exponencial	0.542 ^a	2497.72 ± 277.50	0.53 ± 0.046	18.14 ± 2.58
Estacionaria	0.595 ^a	5428.35 ± 995.71	0.955 ± 0.098	30.60 ± 4.54

^a Tasa de crecimiento calculada mediante la ecuación de Guillard (1973) a partir de las concentraciones promedio de clorofila *a* en los tiempos seleccionados (Día 6 fase exponencial y día 15 fase estacionaria). Al no calcularse a partir de réplicas independientes de *k*, no se reporta desviación estándar.

4.2 Composición química de la biomasa

4.2.1 Pigmentos Ficobilínicos

La cuantificación de pigmentos ficobilínicos de *Oscillatoria* sp. se realizó mediante análisis espectrofotométrico, expresando los resultados tanto en función de la biomasa seca

como del volumen de cultivo procesado, con el fin de evaluar el contenido intracelular de pigmentos y la productividad del cultivo, respectivamente (Figura 2)

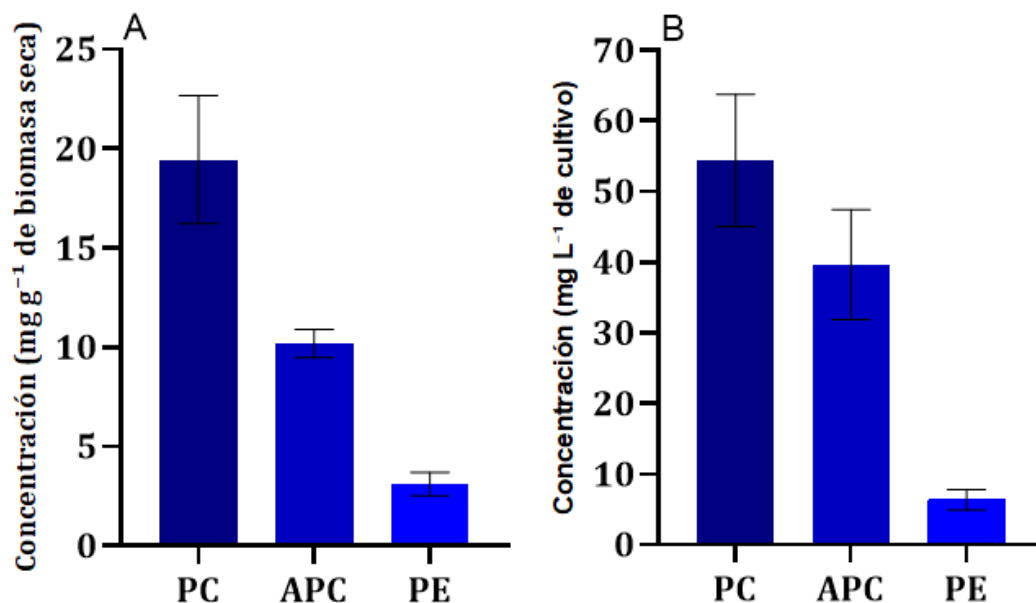


Figura 2. Contenido ficobilínicos en biomasa seca y volumen de cultivo

Expresado en función de biomasa seca (A) y en función del volumen de cultivo (B). Las barras representan el promedio de las concentraciones de ficocianina (PC), aloficocianina (APC) y ficoeritrina (PE), y las barras de error corresponden a la desviación estándar ($n = 4$).

En base a biomasa seca (Figura 2 A), la ficocianina (PC) fue el pigmento predominante, presentando un valor promedio de $19.44 \pm 3.17 \text{ mg g}^{-1}$ de biomasa seca, seguida por la aloficocianina (APC), con $10.18 \pm 0.71 \text{ mg g}^{-1}$, mientras la ficoeritrina (PE) mostró las menores concentraciones, con $3.11 \pm 0.60 \text{ mg g}^{-1}$. Este patrón refleja la composición característica de las cianobacterias, donde la ficocianina constituye la principal ficobiliproteína involucrada en la captación de fotones. Por otra parte, al expresar los resultados en función del volumen de cultivo (Figura 2 B), se observó el mismo comportamiento. La ficocianina presentó la mayor concentración promedio ($54.39 \pm 9.35 \text{ mg L}^{-1}$ de cultivo), seguido por la aloficocianina ($36.63 \pm 7.80 \text{ mg L}^{-1}$ de cultivo), mientras que la ficoeritrina registro los valores más bajos ($6.37 \pm 1.46 \text{ mg L}^{-1}$).

La consistencia del patrón en ambas formas de expresión indica que la distribución relativa de los pigmentos se mantiene independiente del criterio de normalización utilizado, evidenciando que la ficocianina es el pigmento dominante expresado tanto en biomasa seca y por volumen de cultivo.

4.2.2 Proteínas totales

El contenido de proteínas totales en la biomasa se determinó para muestras cosechadas en fase exponencial y fase estacionaria del cultivo. Debido a que estos resultados fueron incorporados en la Tabla 1, su comparación se presenta integrada dentro de la caracterización fisiológica y química del cultivo.

La biomasa obtenida en fase estacionaria presentó un mayor contenido de proteínas, alcanzando $30.60 \pm 4.54 \text{ mg g}^{-1}$ de biomasa seca, equivalentes a $0.88 \pm 0.11 \text{ mg mL}^{-1}$ de cultivo. En contraste, la fase exponencial registró valores inferiores, con $18.14 \pm 2.58 \text{ mg g}^{-1}$, $0.49 \pm 0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados indican una mayor acumulación de proteínas durante la fase estacionaria del cultivo; en consecuencia, la biomasa de esta fase fue seleccionada para los ensayos posteriores de extracción.

4.3 Optimización del proceso de extracción de proteínas por ultrasonido.

Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones de ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de proteínas a partir de la biomasa, se analizaron distintas combinaciones de amplitud y tiempo de sonicación utilizando dos solventes de extracción: agua destilada (H_2O) y NaOH 0.1M. Los resultados obtenidos para cada combinación experimental se presentan en la Tabla 2, donde se muestra el contenido de proteínas extraídas bajo las distintas condiciones evaluadas. Estos valores se expresan como porcentaje de biomasa seca con el objetivo de homogeneizar la forma de reporte y facilitar la comparación de solventes utilizados.

Tabla 2. Condiciones experimentales evaluadas para la extracción de proteínas mediante ultrasonido y contenido de proteínas totales obtenidas con los solventes H_2O y NaOH, expresado en porcentaje de biomasa seca.

Tratamiento	Amplitud de onda (%)	Tiempo (min)	Proteínas totales por biomasa seca H_2O (%)	Proteínas totales NaOH por biomasa seca (%)
1	50	10	18.39	24.24
2	35	10	29.63	24.33
3	50	15	13.71	21.91
4	20	10	23.44	21.01
5	20	5	29.85	23.71
6	20	15	26.97	23.28
7	35	15	16.96	24.55
8	35	10	19.17	23.44
9	35	5	15.40	17.59
10	50	5	22.85	16.40
11	35	10	18.09	25.61

Los resultados evidenciaron que la extracción de proteínas mediante ultrasonido estuvo influenciada por las condiciones operacionales evaluadas, en particular por la amplitud de onda, el tiempo de sonicación y tipo de solvente. En el sistema con H_2O , los mayores valores de proteínas extraídas se obtuvieron en los tratamientos 5 y 2, correspondientes a combinaciones de baja amplitud (20-35%) y tiempos de extracción moderados (5-10 min), alcanzando valores de 29.85 y 29.64 mg g^{-1} de biomasa seca, respectivamente. Esto indica que condiciones menos intensas favorecieron la liberación de proteínas en medio acuoso.

En contraste, para el sistema con NaOH, se observó una menor variabilidad entre tratamientos; los valores más altos de extracción se registraron en los tratamientos 7 y 11, con 24.55 y 25.61 mg g^{-1} de biomasa seca, respectivamente. En este caso, el medio alcalino podría favorecer la solubilización de proteínas estructurales, permitiendo su extracción incluso bajo condiciones de mayor intensidad de cavitación.

En conjunto, se observa que el sistema H_2O permitió alcanzar mayores valores de proteínas extraídas en comparación con NaOH, lo que sugiere una mayor eficiencia en solventes

acuosos bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, el uso de NaOH mostró una extracción más homogénea entre tratamientos, lo que podría reflejar una menor sensibilidad del sistema frente las variaciones en los parámetros operacionales. La tendencia se mantuvo al expresar los datos como porcentaje de biomasa seca: en general, menores amplitudes y tiempos moderados favorecen la extracción de proteínas, particularmente en H₂O.

4.3.1 Eficiencia extractiva del proceso de extracción

Con el objetivo de evaluar la eficiencia del proceso de extracción, los resultados se expresaron como rendimiento de extracción de proteínas, definido como la relación entre la cantidad de proteínas recuperadas y contenido total de proteínas presentes en la biomasa. Los valores de rendimiento para cada tratamiento experimental se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de extracción de proteínas obtenida bajo diferentes condiciones de ultrasonido en solventes H₂O y NaOH.

Tratamientos	Amplitud de onda (%)	Tiempo (min)	Rendimiento de extracción H ₂ O (%)	Rendimiento de extracción NaOH (%)
1	50	10	60.1	79.2
2	35	10	96.9	79.5
3	50	15	44.8	71.6
4	20	10	76.6	68.6
5	20	5	97.6	77.5
6	20	15	88.1	76.1
7	35	15	55.4	80.2
8	35	10	62.7	76.6
9	35	5	50.3	57.5
10	50	5	74.7	53.6
11	35	10	59.1	83.7

Los resultados evidenciaron que la eficiencia de extracción de proteínas dependió de las condiciones de operación del ultrasonido, particularmente de la amplitud, el tiempo de sonicación y el tipo de solvente utilizado. En el sistema de extracción con agua (H₂O), las mayores eficiencias extractivas se observaron en los tratamientos tratamiento 5 y 2, alcanzando valores superiores al 95 %. Estas condiciones corresponden a combinaciones de amplitud moderada y tiempos de sonicación menores, lo que sugiere una extracción más eficiente bajo condiciones menos intensas de operaciones.

En contraste, las condiciones de mayor intensidad, asociadas a amplitudes elevadas o tiempos prolongados, evidencian una disminución en la eficiencia extractiva. En el sistema con NaOH, las eficiencias extractivas fueron generalmente elevadas, alcanzando en algunos casos valores superiores al 80 %, lo que se asocia a la capacidad del medio alcalino para solubilizar proteínas mediante la desestabilización de estructuras celulares. Sin embargo, en ciertas

condiciones, la eficiencia fue menor en comparación con el sistema acuoso optimizado, lo que sugiere una menor recuperación final bajo esas condiciones.

En conjunto, estos resultados indican que la eficiencia extractiva no depende únicamente de maximizar la intensidad del ultrasonido, sino de alcanzar un equilibrio entre la disrupción celular inducida por cavitación y la estabilidad de las proteínas extraídas. En este contexto, condiciones moderadas de operación resultaron más favorables para maximizar la recuperación proteica.

4.3.2 Superficie de respuesta del proceso de extracción

Con el fin de analizar el efecto conjunto de las variables del proceso de extracción, se generaron superficies de respuesta tridimensionales que describen la interacción entre la amplitud del ultrasonido y el tiempo de extracción en el contenido de proteínas extraídas.

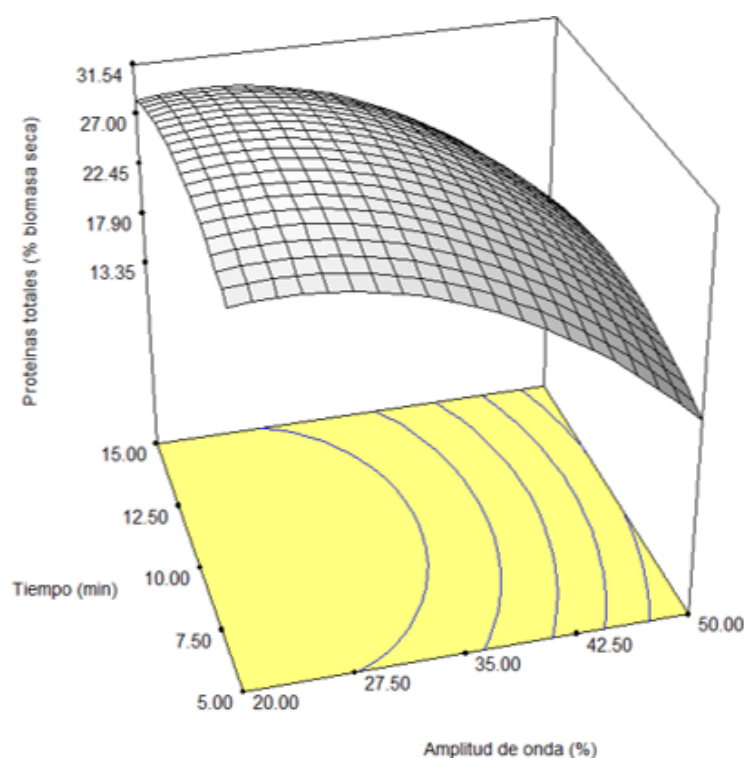


Figura 3. Superficie de respuesta de extracción de proteínas en sistema acuoso

La Figura 3 presenta la superficie de respuesta obtenida para el proceso de extracción utilizando agua destilada (H_2O) como solvente. En esta superficie se observó un comportamiento no lineal del sistema, evidenciado por la curvatura pronunciada de la superficie, lo que indica la presencia de efectos cuadráticos asociados principalmente a la amplitud del ultrasonido. El contenido de proteínas extraídas aumentó hacia condiciones intermedias de amplitud y tiempo, alcanzando una zona óptima dentro del dominio experimental, para luego disminuir en condiciones de mayor intensidad. Este comportamiento es consistente con el modelo estadístico obtenido, donde la amplitud y sus términos cuadráticos presentan un efecto significativo sobre la respuesta.

Por otra parte, la Figura 4 muestra la superficie de respuesta correspondiente al proceso de extracción utilizando NaOH como solvente. En este caso, el rendimiento de proteínas extraídas también mostró dependencia de la interacción entre las variables de procesos. La superficie presentó una curvatura más suave y variaciones más gradual en la función de la amplitud y el tiempo de sonicación, lo que sugiere un comportamiento más estable del sistema dentro del rango evaluado. El modelo estadístico indica que el tiempo de extracción y el término cuadrático de la amplitud fueron las variables que influyeron significativamente en la respuesta.

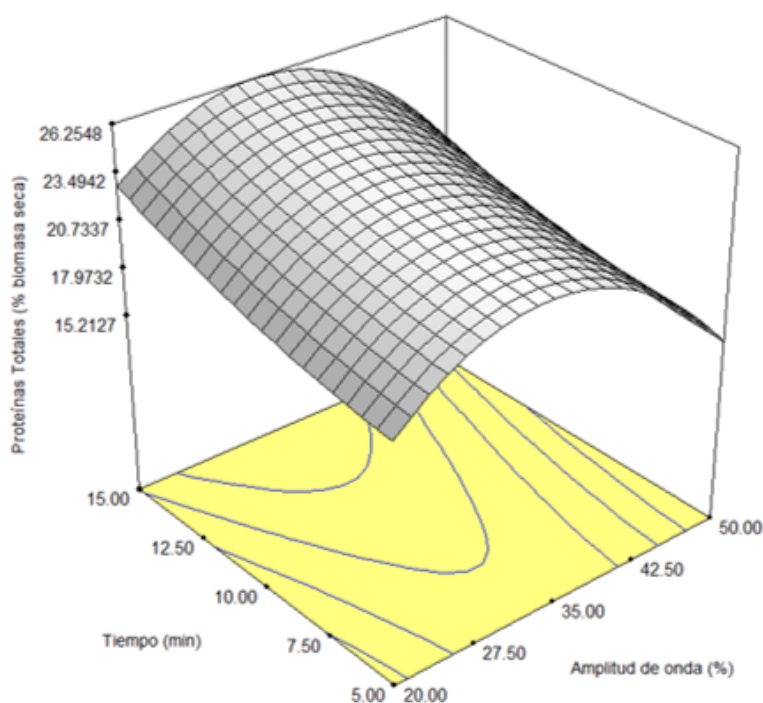


Figura 4. Superficie de respuesta de extracción de proteínas en sistema alcalino

En conjunto, las superficies de respuesta evidencian que el proceso de extracción de proteínas asistido por ultrasonido presenta un comportamiento no lineal donde la optimización del sistema depende de la interacción entre las variables evaluadas y de la existencia de condiciones intermedias que maximizan la recuperación proteica. A partir de este comportamiento, se ajustaron modelos cuadráticos mediante la metodología de superficie respuesta para describir cuantitativamente la relación entre las variables operacionales y el contenido de proteínas extraídas.

4.3.3 Modelo matemático del proceso de extracción

Para el sistema de extracción utilizando agua destilada (H_2O), la ecuación 1 (EC 1) muestra la forma codificada que se utilizó para predecir los datos para la extracción de proteínas totales.

$$\text{Proteínas Totales (\%)} = 8.93488 + 1.02254 \cdot A + 2.07803 \cdot B - 0.02217 \cdot A^2 - 0.10953 \cdot B^2 + 0.00423 \cdot A \cdot B \quad (\text{EC.1})$$

Donde A corresponde a la amplitud del ultrasonido (%) y B al tiempo de extracción (min). El análisis del modelo indica una mayor influencia de la amplitud del ultrasonido y los

términos cuadráticos asociados a ambas mostraron influencia significativa sobre la respuesta, evidenciando un comportamiento no lineal del sistema y la existencia de un punto óptimo dentro del dominio experimental evaluado.

Para el sistema de extracción que utiliza NaOH como solvente, ecuación 2 (EC 2) muestra la forma codificada que se utilizó para predecir los datos para las extracción de proteínas totales mediante la siguiente expresión:

$$\text{Proteínas Totales (\%)} = -3.84988 + 1.55813 \cdot A + 0.00314 \cdot B - 0.02349 \cdot A^2 + 0.02533 \cdot B^2 - 0.003 \cdot A \cdot B \text{ (EC.2)}$$

En este caso, el modelo evidenció una menor dependencia de la interacción entre variables, observándose que el tiempo de extracción y el término cuadrático de la amplitud influyen en el comportamiento del sistema, lo que refleja una respuesta más estable frente a variaciones operacionales.

En conjunto, los modelos obtenidos permiten describir matemáticamente el proceso de extracción y predecir el rendimiento dentro del rango experimental evaluado, constituyendo una herramienta útil para la optimización de las condiciones de operación y su reproducibilidad.

4.4 Evaluación del efecto bioestimulante en quinoa

Para determinar el efecto bioestimulante de los extractos obtenidos a partir de *Oscillatoria* sp., se realizó un ensayo de germinación utilizando semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Para este análisis, se seleccionaron los extractos con mayor eficiencia extractiva obtenidos durante el proceso de optimización, correspondientes a los tratamientos 2 y 5 para el sistema acuoso H₂O, y los tratamientos 7 y 11 para el sistema con NaOH (Tabla 1).

Los tratamientos evaluados incluyeron controles correspondientes a cada solvente, así como los extractos seleccionados. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 24h posteriores a la siembra y el crecimiento temprano de las plántulas mediante la medición de la longitud radicular las 24, 48 y 72 h de germinación.

4.4.1 Tasa de germinación

El porcentaje de germinación de las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. fue evaluado a las 24h posteriores a la siembra bajo los distintos tratamientos experimentales (Figura 5). No hubo diferencias significativas respecto al Control; solo el Control NaOH presentó un menor porcentaje de germinación (84,7%).

En adelante, la sigla “T” se utilizará para designar Tratamientos experimentales.

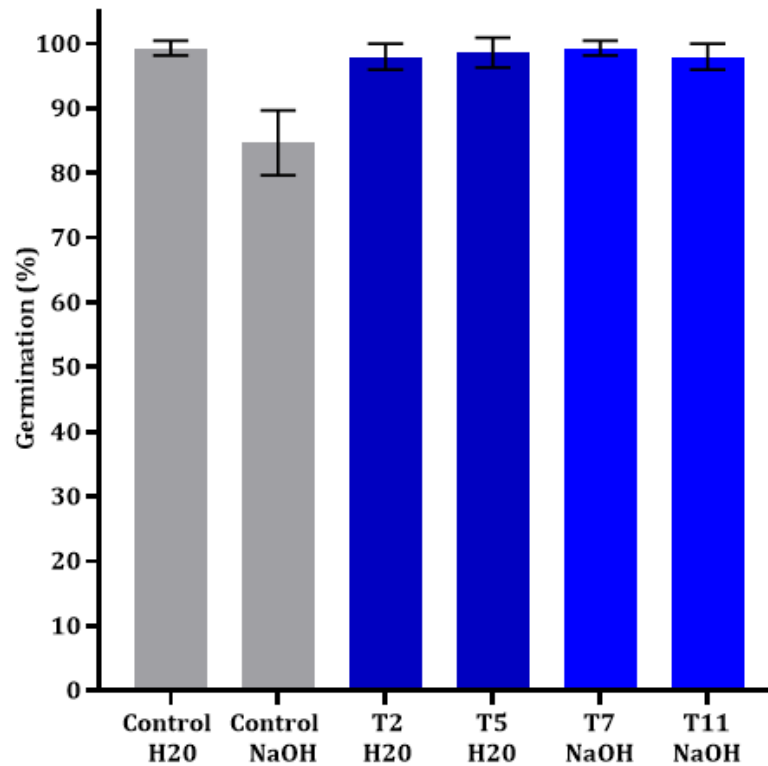


Figura 5. Porcentaje de germinación de *Chenopodium quinoa* Willd. bajo los distintos tratamientos evaluados. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 3)

4.4.2 Longitud radicular

La longitud radicular fue utilizada como indicador del crecimiento temprano de las plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd bajo los distintos tratamientos evaluados. Los resultados obtenidos muestran un incremento progresivo de la longitud radicular a lo largo del tiempo en todos los tratamientos, con diferencias significativas entre grupos a las 24, 48 y 72 h de germinación (Figuras 6, 7 y 8).

A las 24 h de germinación se observaron diferencias significativas en la longitud radicular entre los tratamientos evaluados (Figura 6). El Control H₂O presentó el mayor valor de longitud radicular (letra A), sin diferencias significativas respecto al Control NaOH y a T5 H₂O (letra AB). T2 H₂O presentó un valor intermedio (letra B), sin diferenciarse significativamente del Control NaOH ni de T5 H₂O, pero sí del Control H₂O. Los tratamientos T7 NaOH y T11 NaOH registraron los valores más bajos, sin diferencias significativas entre sí (letra C), diferenciándose significativamente del resto de los grupos.

Figura 6. Longitud radicular de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. a las 24 h de germinación bajo los distintos tratamientos evaluados. Las barras de error representan el error

estándar de la media ($n = 3$). Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

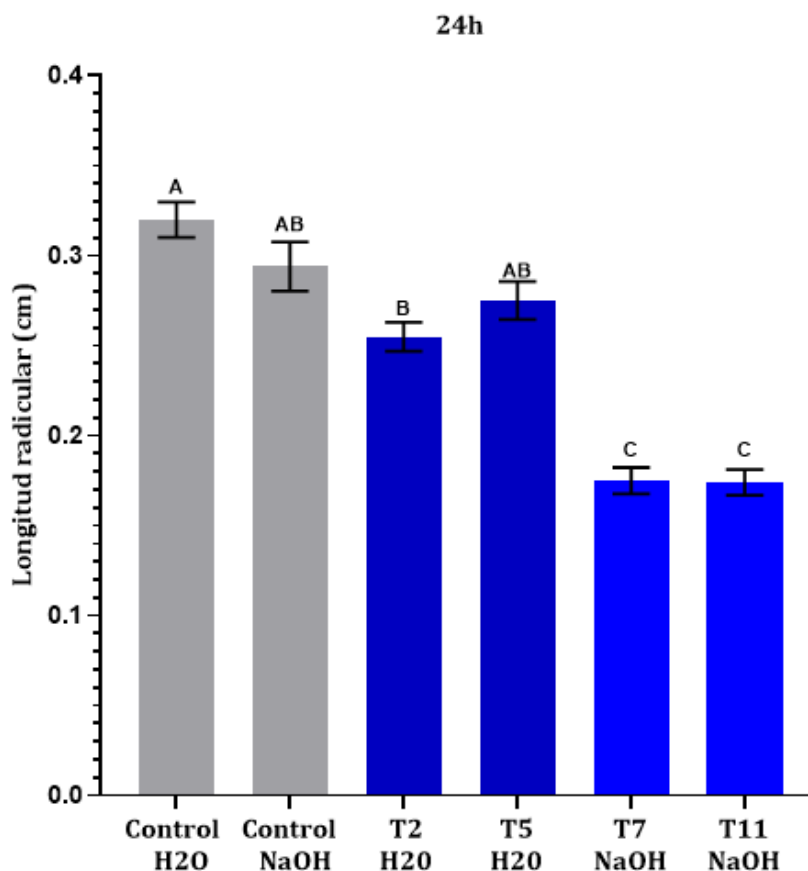


Figura 6. Longitud radicular de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. a las 24 h de germinación bajo los distintos tratamientos evaluados. Las barras de error representan el error estándar de la media ($n = 3$).

A las 48 h de germinación se evidenciaron diferencias significativas en la longitud radicular entre los tratamientos evaluados (Figura 7). T11 NaOH, T2 H₂O y T5 H₂O presentaron los mayores valores de elongación, sin diferencias significativas entre sí (letra A). T7 NaOH presentó valores intermedios-altos, diferenciándose significativamente del grupo anterior (letra

B). El Control H₂O registró valores menores (letra C), mientras que el Control NaOH presentó la longitud más baja (letra D).

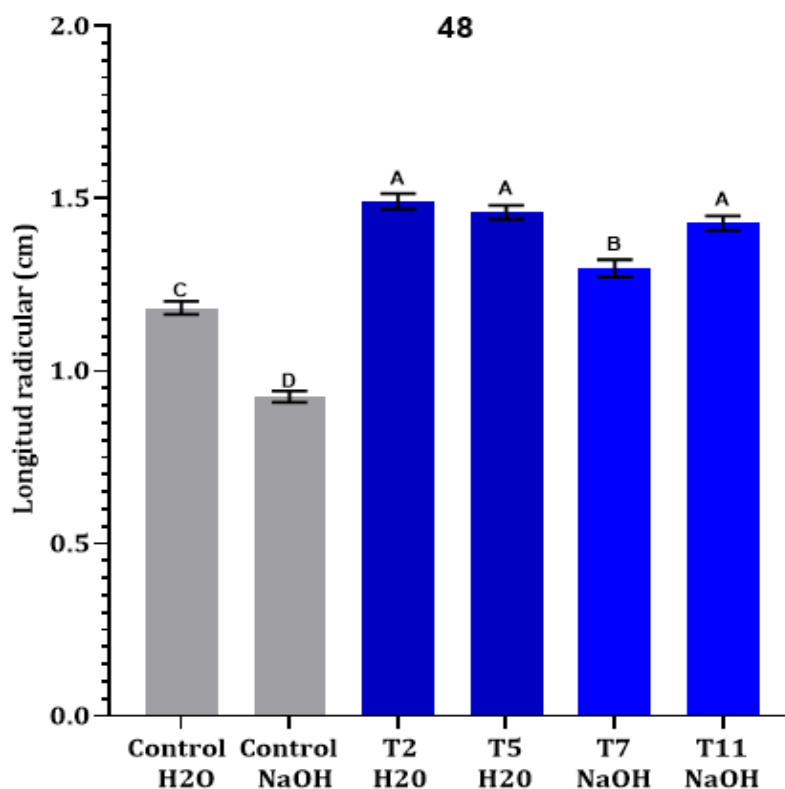


Figura 7. Longitud radicular de *Chenopodium quinoa* Willd. a las 48 h de germinación bajo los distintos tratamientos evaluados. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 3).

A las 72 h de germinación se observaron diferencias significativas en la longitud radicular entre todos los tratamientos evaluados (Figura 8). T2 H₂O presentó la mayor longitud radicular promedio ($2,896 \pm 0,651$ cm; letra A), seguido por T5 H₂O ($2,537 \pm 0,654$ cm; letra B), diferenciándose significativamente entre sí. El Control H₂O presentó valores intermedios ($2,182 \pm 0,533$ cm; letra C). El Control NaOH registró $1,571 \pm 0,393$ cm (letra D), seguido por T11 NaOH con $1,425 \pm 0,430$ cm (letra E). T7 NaOH presentó la menor longitud radicular de todos los tratamientos ($1,202 \pm 0,472$ cm; letra F), diferenciándose significativamente de todos los demás grupos.

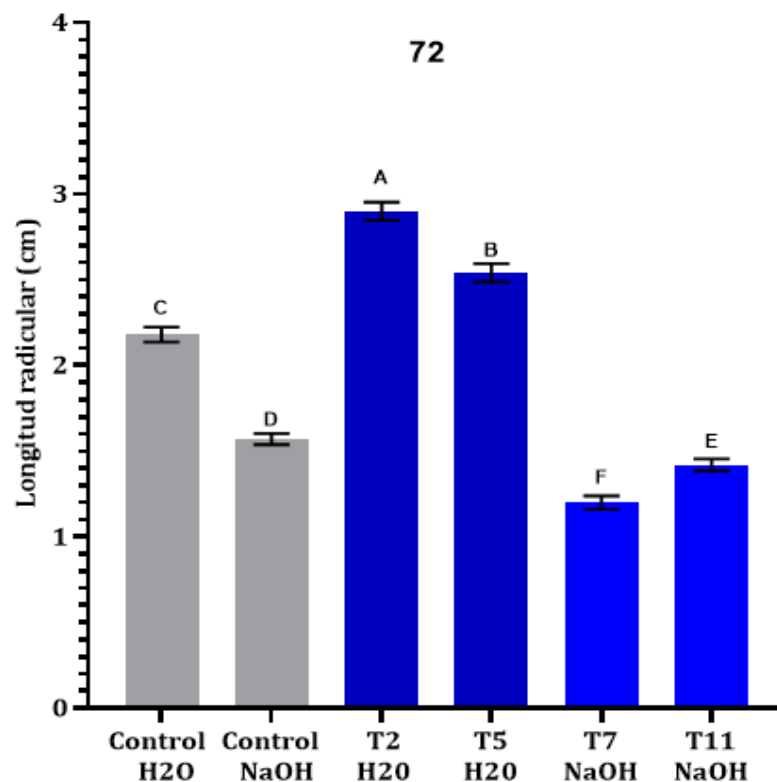


Figura 8. Longitud radicular de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. a las 72 h de germinación bajo los distintos tratamientos evaluados. Las barras de error representan el error estándar de la media ($n = 3$)

En conjunto, los resultados indican que los extractos obtenidos en el sistema acuoso (H₂O) generaron un mayor efecto sobre la elongación radicular en comparación con los extractos alcalinos (NaOH) y los controles, siendo este efecto más marcado a las 48 y 72 h. A las 72 h, T2 H₂O alcanzó la mayor longitud radicular, superando significativamente al Control H₂O ($p < 0,001$), lo que sugiere un efecto bioestimulante de los extractos obtenidos bajo condiciones optimizadas de ultrasonido sobre el crecimiento radicular temprano de *C. quinoa*.

DISCUSIÓN

La biomasa de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334) alcanzó $0,955 \pm 0,098 \text{ g L}^{-1}$ en la fase estacionaria, valor superior al registrado en fase exponencial ($0,530 \pm 0,046 \text{ g L}^{-1}$), junto con un aumento de la concentración de clorofila *a* desde $2497,72 \pm 277,50$ hasta $5428,35 \pm 995,71 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 1; Figura 1). Estos resultados muestran que el medio Walne modificado permitió mantener el crecimiento del cultivo hasta una fase adecuada para la cosecha de biomasa destinada a los ensayos de extracción. La producción de biomasa y su composición química pueden variar según las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de las cepas de *Oscillatoria* (Nayeem et al., 2025; Bishoyi et al., 2024).

El contenido de proteínas totales aumentó desde $18,14 \pm 2,58\%$ en fase exponencial hasta $30,60 \pm 4,54\%$ de la biomasa seca en fase estacionaria (Tabla 1). Este valor se encuentra dentro del intervalo informado para especies de *Oscillatoria*, donde se han reportado concentraciones de proteína cruda entre 21 y 57% del peso seco (Nayeem et al., 2025). Las diferencias observadas reflejan la influencia de las condiciones de cultivo y del estado fisiológico sobre la composición bioquímica de las cianobacterias (Becker, 2007; Umetani et al., 2024; Nayeem et al., 2025), y respaldan la selección de la fase estacionaria para los ensayos de extracción debido a su mayor contenido proteico.

La caracterización de pigmentos ficobilínicos mostró un predominio de ficocianina, con $19,44 \pm 3,17 \text{ mg g}^{-1}$ de biomasa seca, seguida de aloficocianina con $10,18 \pm 0,71 \text{ mg g}^{-1}$ y ficoeritrina con $3,11 \pm 0,60 \text{ mg g}^{-1}$ (Figura 2). El mismo orden se mantuvo al expresar los resultados por volumen de cultivo, con $54,39 \pm 9,35 \text{ mg L}^{-1}$ de ficocianina, $36,63 \pm 7,80 \text{ mg L}^{-1}$ de aloficocianina y $6,37 \pm 1,46 \text{ mg L}^{-1}$ de ficoeritrina. La predominancia de ficocianina concuerda con la presencia de ficobiliproteínas previamente descrita en especies de *Oscillatoria* y con estudios que han aplicado ultrasonido para recuperar estas fracciones desde biomasa cianobacteriana (Bishoyi et al., 2024; Sharma et al., 2020).

En conjunto, la biomasa utilizada presentó una fracción proteica total y pigmentaria relevante para evaluar su recuperación mediante ultrasonido. Sin embargo, debido a que los extractos posteriores fueron analizados como extractos crudos, no fue posible determinar la contribución individual de ficocianina, aloficocianina o ficoeritrina a la eficiencia extractiva ni a la respuesta biológica observada en quinoa. Esta precaución es necesaria, ya que la actividad de los extractos derivados de microalgas y cianobacterias puede depender de la interacción entre proteínas, péptidos, pigmentos, polisacáridos y otros compuestos presentes en la fracción obtenida (Kapoore et al., 2021; Santini et al., 2022).

La eficiencia de extracción proteica dependió del solvente y de las condiciones de ultrasonido evaluadas. El mayor rendimiento se obtuvo con agua destilada en T2, correspondiente a 20% de amplitud y 5 min de sonicación, alcanzando una recuperación extractiva de 97,6%; en contraste, mayor rendimiento en el sistema alcalino correspondió a T7 NaOH 0,1 M, con 20% de amplitud y 15 min, alcanzando 83,7% (Tabla 3). Por tanto, dentro del espacio experimental evaluado, el tratamiento ultrasónico en agua permitió una recuperación proteica superior a la obtenida en NaOH 0,1 M.

Estos resultados indican que la disrupción celular inducida por ultrasonido fue suficiente para recuperar una alta proporción de las proteínas cuantificadas sin requerir condiciones

alcalinas. Este comportamiento es concordante con estudios en cianobacterias y microalgas que muestran que la extracción asistida por ultrasonido puede ser efectiva en medios acuosos, aunque el rendimiento depende de la combinación de biomasa, solvente, amplitud y tiempo de tratamiento (Liu et al., 2022; Guadalupi et al., 2025). La superficie de respuesta del sistema acuoso mostró que la mayor eficiencia se concentró bajo menor amplitud y menor tiempo de sonicación (Figura 3), mientras que el sistema alcalino presentó una respuesta más uniforme y no superó el rendimiento máximo obtenido en solvente acuoso (Figura 4).

El comportamiento observado concuerda con antecedentes donde el incremento de intensidad o duración del ultrasonido no necesariamente mejora la extracción de proteínas, debido a la interacción entre los factores operacionales y las características de la biomasa tratada (Yüçetepe et al., 2018; Yüçetepe et al., 2019). En este sentido, Yüçetepe et al. (2019) demostraron, mediante metodología de superficie de respuesta, que variables como el pH, la temperatura y el tiempo de extracción, así como sus interacciones, pueden modificar las propiedades de los concentrados proteicos obtenidos a partir de *Spirulina platensis*. Asimismo, Parimi et al. (2015) observaron que la recuperación proteica varió según el método de disrupción celular, obteniendo una mayor recuperación mediante homogeneización a alta presión que mediante ultrasonido, lo que evidencia que la eficiencia del proceso depende de la estrategia de ruptura celular empleada. Estos antecedentes respaldan que un aumento de la intensidad o duración del tratamiento no necesariamente se traduce en una mayor recuperación proteica, sino que existe una combinación de condiciones que favorece la extracción. Esta dependencia de las características estructurales de la biomasa también ha sido descrita por Hildebrand et al. (2020) quienes demostraron en *Chlorella vulgaris*, una microalga caracterizada por una pared celular resistente, que el tratamiento ultrasónico favoreció la recuperación de proteínas y produjo modificaciones observables en la morfología de la superficie celular. Los autores reportaron que la extracción alcalina asistida por ultrasonido durante 10 min permitió alcanzar recuperaciones proteicas equivalentes a las obtenidas mediante maceración durante períodos considerablemente más prolongados, mientras que una extracción secuencial asistida por ultrasonido con NaOH 0,4 M y HCl alcanzó una recuperación de $79,1 \pm 5,3$ % (Hildebrand et al., 2020). Estos antecedentes respaldan el uso del ultrasonido como estrategia para favorecer la disrupción celular y mejorar la disponibilidad de proteínas intracelulares, aunque la magnitud de la respuesta dependerá de las características estructurales de cada biomasa y de las condiciones de extracción empleadas. En el presente estudio, la condición T2 (20 % de amplitud y 5 min de sonicación) alcanzó la mayor eficiencia extractiva (97,6 %), lo que sugiere que condiciones ultrasónicas moderadas fueron suficientes para favorecer la recuperación proteica desde *Oscillatoria* sp. Los modelos ajustados describen la respuesta dentro de los rangos de amplitud y tiempo evaluados (Ecuaciones 1 y 2; Figuras 3 y 4); no obstante, como no se caracterizó el perfil bioquímico de los extractos, no es posible atribuir la menor eficiencia del sistema alcalino a un mecanismo específico.

Los extractos de *Oscillatoria* sp. no incrementaron el porcentaje de germinación de *Chenopodium quinoa* respecto del control con agua destilada (Figura 5). En cambio, el control con NaOH 0,1 M presentó una menor germinación, por lo que la respuesta de los tratamientos alcalinos debe interpretarse considerando el efecto del solvente bajo las condiciones del bioensayo. Estudios realizados en quinoa han demostrado que la germinación y el desarrollo temprano son sensibles a cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio, incluidas

aquellas asociadas con estrés osmótico o salino (Ruiz-Carrasco et al., 2011; Panuccio et al., 2014).

La ausencia de un aumento evidente de la germinación no descarta la posibilidad de una actividad bioestimulante. En extractos derivados de microalgas y cianobacterias, la respuesta puede expresarse principalmente durante las etapas iniciales del crecimiento de la plántula, particularmente en variables relacionadas con el vigor y la elongación radicular. Asimismo, estos efectos pueden variar según la especie vegetal, concentración, composición del extracto y método de aplicación (Chiaiese et al., 2018; Mutale-Joan et al., 2021; Elhakim et al., 2026).

De acuerdo con la figura 6 a las 24 h no se observaron diferencias marcadas en longitud radicular entre los tratamientos evaluados (Figura 6; Tabla 4). Sin embargo, a las 48 h los extractos obtenidos con agua destilada comenzaron a presentar mayores longitudes radiculares que los tratamientos alcalinos y sus respectivos controles (Figura 7; Tabla 5). Esta diferencia se hizo más evidente a las 72 h, cuando T2 H₂O alcanzó una longitud radicular de $2,896 \pm 0,651$ cm y superó al control con agua destilada, que registró $2,182 \pm 0,533$ cm (Figura 8; Tabla 6).

En conjunto, los resultados indican que la actividad bioestimulante de los extractos se evidenció principalmente durante las etapas tempranas de elongación radicular y no en el porcentaje de germinación. La longitud radicular constituye un parámetro sensible para detectar respuestas de crecimiento en bioensayos con extractos derivados de microalgas y cianobacterias (Chiaiese et al., 2018; Navarro-López et al., 2020). De manera consistente con los resultados, estudios realizados con extractos cianobacterianos, incluidos aquellos derivados de *Nostoc*, han reportado efectos favorables sobre el crecimiento vegetal, los cuales se han asociado a la presencia de mezclas de compuestos bioactivos, más que exclusivamente con el aporte nutricional de un componente aislado (Ordog et al., 2021; Santini et al., 2022).

El mayor desempeño de T2 H₂O es particularmente relevante porque correspondió a la condición con mayor eficiencia extractiva, obtenida con 20% de amplitud y 5 min de sonicación (Tabla 3). La coincidencia entre recuperación proteica y mayor elongación radicular sugiere que el proceso de extracción acuosa, bajo condiciones moderadas de ultrasonido permitió obtener un extracto con actividad biológica detectable en *C. quinoa*. Sin embargo, esta relación no permite atribuir el efecto exclusivamente a la concentración de proteína, dado que los extractos fueron crudos y no se determinaron las concentraciones individuales de péptidos, ficobiliproteínas, polisacáridos, pigmentos u otros metabolitos hidrosolubles potencialmente bioactivos (Kapoor et al., 2021; Santini et al., 2021; Santini et al., 2022).

CONCLUSIÓN

La biomasa de *Oscillatoria* sp. CCM-UdeC-334 cultivada en medio Walne modificado presentó su mayor concentración de biomasa y contenido proteico en fase estacionaria, condición seleccionada para los ensayos de extracción. La extracción asistida por ultrasonido, optimizada mediante metodología de superficie de respuesta, permitió recuperar proteínas desde esta biomasa. La mayor eficiencia extractiva se obtuvo en agua destilada con 20% de amplitud y 5 min de sonicación (T2 H₂O), alcanzando 97,6%, valor superior a la máxima eficiencia obtenida con NaOH 0,1 M, correspondiente a 83,7%.

Los extractos obtenidos no mostraron diferencias claras en el porcentaje de germinación de *Chenopodium quinoa* en comparación con el control con el agua destilada. Sin embargo, los extractos acuosos promovieron una mayor elongación radicular durante el crecimiento temprano de las plántulas, siendo T2 H₂O el tratamiento que alcanzó la mayor longitud radicular a las 72 h ($2,896 \pm 0,651$ cm). En conjunto, la extracción asistida por ultrasonido en sistema acuoso permitió obtener extractos crudos con alta recuperación proteica y potencial bioestimulante sobre la elongación radicular temprano de *C. quinoa*.

Proyecciones

Futuros estudios deberían caracterizar químicamente los extractos, identificar los compuestos asociados a la respuesta observada, evaluar distintas concentraciones de aplicación y validar sus efectos en condiciones de invernadero y cultivo.

REFERENCIAS

- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25, 17–23.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of development, germination, and dormancy* (3rd ed.).
- Bishoyi, A. K., Sahoo, C. R., Padhy, R. N., & Mishra, S. K. (2024). *Oscillatoria: A comprehensive review of its biology, bioactive compounds, and biotechnological applications*. *Algal Research*, 78, 103407.
- Burlingame, B., Molledo, A., & Cafiero, C. (2024). Global protein sustainability and the United Nations through the 2030 Agenda. *Frontiers in Nutrition*, 11, Article 1383898.
- Burrieza, H. P., López Fernández, M. P., & Maldonado, S. (2014). Analogous reserve distribution and tissue characteristics in quinoa and grass seeds suggest convergent evolution. *Frontiers in Plant Science*, 5, 546.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1–2), 3–41.
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M. C., & Rouphael, Y. (2018). Renewable sources of plant biostimulation: Microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1782.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794–799.
- Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental Science & Technology*, 44(5), 1813–1819.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28–38.
- Economist Impact. (2025, December 7). How much more protein does the world need? <https://impact.economist.com/sustainability/how-much-more-protein-does-the-world-need>
- Elhakim, K. O., Gharib, F. A. E. L., & Ahmed, E. Z. (2026). Agronomic evaluation of microalgal extracts as seed biostimulants for improving germination and early growth of common bean. *Scientific Reports*, 16(1), 19605.

- Elkomy, R. G., & Ismail, G. A. (2021). Crude sulfated polysaccharides extracted from the marine cyanobacterium *Oscillatoria simplicissima* with evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(5), 513–531.
- FAIRR Initiative. (2023). *Greenhouse gases from intensive animal agriculture* [Technical report].
- Ferdowsi, S. E., Kant, R., & Hansen, J. (2022). Resource efficiency and environmental impacts of animal- and plant-based protein sources. *Animal Frontiers*, 12(2), 45–54.
- Finkel, Z. V., Follows, M. J., Liefer, J. D., Brown, C. M., Benner, I., & Irwin, A. J. (2016). Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLOS ONE*, 11(5), e0155977.
- Fiorentino, S., Bellani, L., Santin, M., Castagna, A., Echeverria, M. C., & Giorgetti, L. (2025). Effects of microalgae as biostimulants on plant growth, content of antioxidant molecules, and total antioxidant capacity in *Chenopodium quinoa* exposed to salt stress. *Plants*, 14(5), 781.
- García-Encinas, J. P., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Ornelas-Paz, J. de J., Del Toro-Sánchez, C. L., & Márquez-Ríos, E. (2025). Proteins from microalgae: Nutritional, functional, and bioactive properties. *Foods*, 14(6), Article 921.
- Gead, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J. A., Vasconcelos, V., & Vicente, A. A. (2019). Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology: Applications, techniques, and future trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 433–443.
- Giorgetti, L., Melchiorre, A., Fabbri, L. P., Gabriele, M., & Bellani, L. (2026). Evaluating *Chlorella vulgaris* as a biostimulant for salt and heat stress tolerance in *Chenopodium quinoa*. *Environments*, 13(4), 182.
- Giroto, F., & Scapini, A. (2025). Microalgal biomass in the European food industry: Navigating regulation, technological innovation, and consumer acceptance. *Algal Research*, 91, Article 104288.
- Guadalupi, G., Bazzano, M., Longo, V., & Pastorelli, G. (2025). Ultrasound-assisted extraction of proteins from microalgae: Optimization and functional characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 112, 107165.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 6(7), 53.
- Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a source of nutrients and bioactive compounds: A review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 9(11), 1–21.

- Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C. P. F., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 1709–1718.
- Hoiczky, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1191–1199.
- Idenyi, J. N., Nwoba, E. G., Ogbonna, J. C., & Ubi, B. E. (2021). Biomass production and biochemical composition of two locally isolated filamentous cyanobacteria, *Oscillatoria* and *Phormidium* spp., at different growth temperatures. *EBSU Journal of Nature*, 3(3), 63–77.
- Iijima, H., Nakaya, Y., Kuwahara, A., Hirai, M. Y., & Osanai, T. (2015). Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 6, 326.
- Jaeschke, D. P., Teixeira, I. R., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314.
- Kapoor, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (2005). *Cyanoprokaryota 2: Oscillatoriales*. Elsevier/Spektrum.
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317–1328.
- Li, Q., Peng, T., Mo, X., Su, K., Yang, C., Zhong, S., & Cheng, L. (2026). DSD-guided ultrasound-assisted protein recovery from *Chlamydomonas reinhardtii*: Modeling, optimization, and enzyme inhibitory activity assessment. *Journal of Food Science*, 91(8), e71329.
- Lisciani, S., Marconi, S., Le Donne, C., Camilli, E., Aguzzi, A., Gabrielli, P., Gambelli, L., Kunert, K., Marais, D., Vorster, B. J., Alvarado-Ramos, K., Reboul, E., Cominelli, E., Preite, C., Sparvoli, F., Losa, A., Sala, T., Botha, A.-M., & Ferrari, M. (2024). Legumes and common beans in sustainable diets: Nutritional quality, environmental benefits, spread, and use in food preparations. *Frontiers in Nutrition*, 11, Article 1385232.
- Liu, Y., Nie, J., Niu, L., Wang, X., Yu, Y., & Wang, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106035.
- Lumsden, C. L., Jägermeyr, J., Ziska, L., & Fanzo, J. (2024). Critical overview of the implications of a global protein transition in the face of climate change: Key unknowns and research imperatives. *One Earth*, 7(7), 1187–1201.
- Lupatini, A. L., de Oliveira Bispo, L., Colla, L. M., Vieira Costa, J. A., Canan, C., & Colla, E. (2017). Protein and carbohydrate extraction from *Spirulina platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. *Food Research International*, 99(Pt 3), 1028–1035.

- Martins, P. L., Duarte, L. C., Pereira, H., Reis, A., & Carvalheiro, F. (2025). Evaluation of different fractionation methods for the simultaneous protein and carbohydrate extraction from microalgae. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(1), 999–1011.
- Mehta, A., Shinde, V. A., & Bharate, S. B. (2015). Chemical lysis of cyanobacteria for the extraction of intracellular biomolecules. *Journal of Microbiological Methods*, 111, 7–12.
- Mondal, J., & Lakkaraju, R. (2021). Acoustic cavitation-induced shear: A mini-review. *Biophysical Reviews*, 13(6), 1229–1243.
- Muccio, E., et al. (2022). High-pressure-assisted extraction of proteins from wet biomass of *Arthrospira platensis* (Spirulina). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 80, 103050.
- Mujica, A., Jacobsen, S.-E., Izquierdo, J., & Marathe, J. P. (Eds.). (2001). *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): Ancestral Andean crop, food of the present and future*. FAO/RLC, UNA Puno, CIP.
- Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., Zeroual, Y., & El Arroussi, H. (2021). Screening of microalgae liquid extracts for their biostimulant properties on plant growth, nutrient uptake, and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Scientific Reports*, 11, 372.
- Nayeem, J., Dey, P., Dey, S. K., & Khatoon, H. (2025). Unveiling the biological potential of indigenous *Oscillatoria* spp. from freshwater and marine ecosystems through advanced characterization. *Food Science & Nutrition*, 13(9), e70868.
- Ni Aznan, N. A., Halim, R., Wong, C. Y., & Williamson, M. (2022). Effect of nitrogen availability on protein accumulation in microalgae biomass. *Bioresource Technology*, 346, 126648.
- Nunes, M. C., Raymundo, A., & Batista, A. P. (2024). Microalgae proteins: Extraction, characterization, and future applications. *Foods*, 13(4), Article 612.
- Onwezen, M. C., Dwyer, L., Herceglić, N., Kremer, F., Logatcheva, K., van den Puttelaar, J., Verain, M. C. D., & van Wonderen, D. (2025). *Eiwitmonitor 2025: Insights into consumption, behavioral determinants, and supply of the Dutch protein balance*. Wageningen Social & Economic Research.
- Oyama, K., Hagiwara, Y., Shintani, T., & Ibaraki, Y. (2022). Optimization of nitrogen supply strategy for protein-rich microalgal biomass production. *Algal Research*, 64, 102694.
- Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: Causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 65(4), 995–1010.
- Panuccio, M. R., Jacobsen, S. E., Akhtar, S. S., & Muscolo, A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB Plants*, 6, plu047.

- Parimi, N. S., Singh, J., Raghavarao, K. S. M. S., & Balasubramanian, S. (2015). Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* for food and fuel applications. *Frontiers in Energy Research*, 3, 30.
- Peng, L., Meng, F., Li, S., Zhang, S., & Li, J. (2020). Effects of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* cell destruction and release of intracellular organic matter. *Separation and Purification Technology*, 248, 117035.
- Prasanna, R., Sood, A., Jaiswal, P., Nayak, S., Gupta, V., Chaudhary, V., Joshi, M., & Natarajan, C. (2010). Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(2), 119–134.
- Prego, I., Maldonado, S., & Otegui, M. (1998). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 82(4), 481–488.
- Purdi, T. S., Setiowati, A. D., & Ningrum, A. (2023). Ultrasound-assisted extraction of *Spirulina platensis* protein: Physicochemical characteristic and techno-functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(5), 5474–5486.
- Rastogi, R. P., Sonani, R. R., Madamwar, D., & Incharoensakdi, A. (2020). Cyanobacterial biotechnology: Challenges and prospects. *Biotechnology Advances*, 44, 107622.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large-scale production. *Applied Energy*, 103, 444–467.
- Ruiz-Carrasco, K., Antognoni, F., Coulibaly, A. K., Lizardi, S., Covarrubias, A., Martínez, E. A., Molina-Montenegro, M. A., Biondi, S., & Zurita-Silva, A. (2011). Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(11), 1333–1341.
- Santini, G., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2021). Plant biostimulants from cyanobacteria: An emerging strategy to improve yields and sustainability in agriculture. *Plants*, 10(4), 643.
- Santini, G., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2022). Effects of cyanobacterial-based biostimulants on plant growth and development: A case study on basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, 34, 2063–2073.
- Seghiri, R., Legrand, J., Hsissou, R., & Essamri, A. (2021). Comparative study of the impact of conventional and unconventional drying processes on phycobiliproteins from *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 53, 102165.
- Sharma, R., Bhunia, B., Mondal, A., Bandyopadhyay, T. K., Devi, I., Oinam, G., Prasanna, R., Abraham, G., & Tiwari, O. N. (2020). Statistical optimization of process parameters for improvement of phycobiliprotein yield using ultrasound-assisted extraction and its kinetic study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.

- Singh, A. K., & Montgomery, B. L. (2013). Sensing and responding to environmental cues: Regulation of the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 451.
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: A precious bioresource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 7, 529.
- Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73–95.
- Taj-Liad, S. T., Raviadaran, R., Chandran, D., & Lam, M. K. (2025). Cell disruption and extraction for microalgae biorefinery: Focus on deep eutectic solvents moving toward aqueous biphasic systems. *Results in Engineering*, 26, 105066.
- Taragjini, E., Ciardi, M., Musari, E., Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Morillas-España, A., ... & Fernández-Sevilla, J. M. (2022). Pilot-scale production of *Arthrospira platensis*: Protein isolation following an ultrasound-assisted strategy and assessment of techno-functional properties. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 1299–1310.
- Umetani, I., Sposób, M., & Tiron, O. (2024). Semi-continuous cultivation for enhanced protein production using indigenous green microalgae and synthetic municipal wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 36, 1105–1116.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2541–2547.
- Vernès, L., Vian, M., & Chemat, F. (2019). Application of ultrasound for green extraction of proteins from *Arthrospira platensis* cyanobacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 56, 89–97.
- Wang, Z., Yin, Z., Zhao, Y., & Zhang, Z. (2024). Ultrasound-assisted extraction and functional characterization of proteins from *Nannochloropsis* biomass. *Food Hydrocolloids*, 148, 109455.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Springer.
- Yücepe, A., Saroglu, O., Daskaya-Dikmen, C., Bildik, F., & Özçelik, B. (2018). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of protein from *Spirulina platensis*. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(1), 14–21.
- Yücepe, A., Saroğlu, Ö., & Özçelik, B. (2019). Response surface optimization of ultrasound-assisted protein extraction from *Spirulina platensis*: Investigation of the effect of extraction conditions on techno-functional properties of protein concentrates. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3282–3292.
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments*, 7(2), 13.

ANEXOS

Anexo 1: Composición del medio de cultivo Walne modificado con ajuste de macronutrientes según BG11 para el cultivo de *Oscillatoria* sp. (CCM-UdeC-334)

La cepa fue cultivada en medio Walne (Walne, 1970), modificado mediante el ajuste de las concentraciones de nitrógeno y fósforo con el fin de igualar el aporte de estos nutrientes al del medio BG-11 y favorecer la acumulación de biomasa y compuestos proteicos. Específicamente, la concentración de NaNO_3 se ajustó para aportar 1500 mg L^{-1} de esta sal, equivalente a la concentración utilizada en el medio BG-11. Asimismo, la concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se modificó para aportar $7,1 \text{ mg P L}^{-1}$, equivalente al fósforo suministrado por K_2HPO_4 en el medio BG-11, manteniendo sin modificaciones el resto de los componentes del medio Walne.

Macronutrientes

Reactivo	Concentración (g/L)
NaNO_3	150
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.3
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.36
H_3BO_3	33.6
EDTA	45

Metales traza (TMS- disuelto en 100 ml; se agrega 1 mL/L)

Reactivo	g en 100 mL	Stock (g/L)
ZnCl_2	2.1	21.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0	20.0
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.96	9.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.0	20.0

Vitaminas (Disueltas en 100 mL; se agrega 1 mL/L)

Vitamina	mg en 100 mL
Cianocobalamina (B_{12})	10
Tiamina (B_1)	10
Biotina	0.2(200 μg)

Anexo 2: Análisis estadístico de la longitud radicular de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. mediante ANOVA de Welch y prueba post hoc de Games-Howell.

Tabla 4. Comparación de medidas de longitud radicular a las 24 h mediante prueba de Games-Howell ($p < 0,05$)

Tratamiento	Media (cm)	DE	EE	Grupo
Control H_2O	0,320	0,120	0,00981	A
Control NaOH	0,294	0,168	0,01368	AB

T5 H ₂ O	0,275	0,129	0,01054	AB
T2 H ₂ O	0,255	0,099	0,00809	B
T7 NaOH	0,175	0,090	0,00733	C
T11 NaOH	0,174	0,087	0,00706	C

Nota. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). $n = 150$ por tratamiento.

Tabla 5. Comparación de medias de longitud radicular a las 48 h mediante prueba de Games-Howell ($p < 0,05$)

Tratamiento	Media (cm)	DE	EE	Grupo
T11 NaOH	1,491	0,285	0,0233	A
T2 H ₂ O	1,460	0,250	0,0205	A
T5 H ₂ O	1,428	0,256	0,0209	A
T7 NaOH	1,298	0,306	0,0250	B
Control H ₂ O	1,183	0,233	0,0190	C
Control NaOH	0,926	0,207	0,0169	D

Nota. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). $n = 150$ por tratamiento.

Tabla 6. Comparación de medias de longitud radicular a las 72 h mediante prueba de Games-Howell ($p < 0,05$)

Tratamiento	Media (cm)	DE	EE	Grupo
T2 H ₂ O	2,896	0,651	0,0531	A
T5 H ₂ O	2,537	0,654	0,0534	B
Control H ₂ O	2,182	0,533	0,0435	C
Control NaOH	1,571	0,393	0,0321	D
T11 NaOH	1,425	0,430	0,0351	E
T7 NaOH	1,202	0,472	0,0385	F

Nota. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). $n = 150$ por tratamiento.