



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**“Obtención de un hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersion, como ingrediente funcional”**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** Tarsis Xavier Camacho Ayala

**Tutor:** PhD. Orestes Darío López Hernández

**Ambato – Ecuador**

**Abril - 2017**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

**PhD. Orestes Darío López Hernández.**

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad

Ambato, 23 de Febrero del 2017.



---

Ph.D. Orestes Darío López Hernández.

C.I. 1754784864

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Tarsis Xavier Camacho Ayala, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

Sr. Tarsis Xavier Camacho Ayala

C.I. 050344880-5

**AUTOR**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

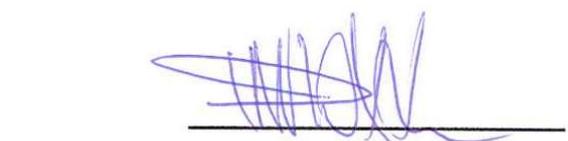
Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Cecilia Mercedes Carpio  
C.I. 1704627650



M.Sc. Paulo Santiago Baquero Icaza  
C.I. 180323354-1

Ambato, 15 de Marzo del 2017.

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos de línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Sr. Tarsis Xavier Camacho Ayala

C.I. 050344880-5

**AUTOR**

## DEDICATORIA

Toda mi vida se la debo a mi familia quienes me han dado todo lo que he necesitado, ustedes han sido mi inspiración: Tarsis y Glenda, Estefanía, Michelle y Andy.

A mi hermana Michelle, aunque ya no brille con su presencia me ha dado la fuerza y la inspiración para concluir esta etapa de mi vida muy importante.

A mi padre, por haberme apoyado cada instante de mi vida y haberme guiado con sus concejos, principios y valores que hicieron de mí el hombre que soy.

A mi madre, por darme la vida y por haberme brindado todo su apoyo y sabiduría para salir adelante siempre y por todo su amor.

A mi hermana Andrea que siempre ha estado junto a mí y es mi fuerza para salir adelante de todo.

A mi querida y amada Emilia que ha sido un gran apoyo durante toda mi carrera y me ha dado todo el cariño y amor como enamorada y amiga.

Gracias a todos por ser la parte fundamental de mi vida.

Los amo incondicionalmente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Orestes López por haber sido un excelente tutor y maestro durante la carrera y por toda la confianza y ayuda brindada en la realización de este proyecto.

A Cristian Carvajal, mi gran amigo y compañero de la vida por haber sido un fiel acompañante y ayudarme en todo lo que he necesitado.

A mis amigos; Paola, Angie, Marcelo, Edison, Jonathan y Johana por haber sido unos buenos compañeros y amigos desde el principio de la carrera.

Al Dr. Wilber Romero Fernández y a su grupo de investigación por haberme permitido realizar una parte importante del proyecto.

A la Dra. Dayana Morales por haberme compartido su tiempo y apoyado en la culminación de los análisis del proyecto.

**ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS**  
**PROYECTO DE INVESTIGACION**

**PÁGINAS PRELIMINARES**

PORTADA.....	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DERECHOS DE AUTOR.....	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
INDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
Resumen.....	XIII
Abstract .....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1

**CAPITULO I**

EL PROBLEMA.....	2
1.1 Tema.....	2
1.2 Justificación .....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 General .....	3
1.3.2 Específicos.....	3

**CAPÍTULO II**

MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes investigativos .....	4

2.1.1	Hidrólisis enzimática.....	9
2.2	Hipótesis.....	9
2.2.1	Hipótesis nula.....	10
2.2.2	Hipótesis alternativa.....	10
2.3	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	10
2.3.1	Variables Independientes.....	10
2.3.2	Variable Dependiente.....	10
<b>CAPÍTULO III</b>		
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1	Materiales.....	11
3.1.1	Materia prima y Reactivos.....	11
3.1.2	Equipos.....	12
3.2	Métodos.....	12
3.2.1	Preparación de los tratamientos.....	12
3.2.2	Estudio de influencia de las condiciones de operación.....	13
3.2.3	Preparación del hidrolizado de Spirulina en base al mejor tratamiento.....	14
3.2.4	Análisis fisicoquímico del hidrolizado.....	15
3.3	Diseño experimental.....	18
<b>CAPÍTULO IV</b>		
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>19</b>
4.1	Análisis y discusión de los resultados.....	19
4.1.1	Resultados del estudio de influencia de condiciones de operación.....	19
4.1.2	Resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos de los tratamientos.....	20

4.1.3	Determinación del mejor tratamiento para el hidrolizado de Spirulina.....	22
4.1.4	Análisis físico – químico del hidrolizado de Spirulina .....	26
4.1.5	Análisis del tamaño de partícula mediante Microscopía Electrónica de Barrido .....	27
4.1.6	Análisis del rendimiento del Secado por aspersion del hidrolizado de Spirulina .....	28
4.1.7	Comparación del concentrado de Spirulina y el hidrolizado de Spirulina mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil-Sulfato Sódico (SDS-PAGE).....	29
4.1.8	Análisis del hidrolizado de Spirulina en polvo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)33	
4.2	Verificación de hipótesis .....	36

## **CAPÍTULO V**

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
5.1 Conclusiones .....	37
5.2 Recomendaciones .....	38
Referencias bibliográficas .....	39

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de aminoácidos de la Spirulina.....	6
Tabla 2. Contenido de vitaminas en la Spirulina.....	6
Tabla 3. Contenido de ácidos grasos en la Spirulina.....	7
Tabla 4. Contenido de minerales en la Spirulina.....	7
Tabla 5. Contenido de carbohidratos en la Spirulina.....	8
Tabla 6. Contenido de pigmentos en la Spirulina.....	8
Tabla 7. Condiciones de hidrólisis de los tratamientos.....	13
Tabla 8. Control del proceso de hidrólisis de los tratamientos.....	19
Tabla 9. Concentración de Sólidos totales y Nitrógeno Amínico.....	21
Tabla 10. Análisis de Varianza para Nitrógeno amínico.....	22
Tabla 11. Optimización de la Respuesta Experimental.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estudio de influencia de condiciones de operación.....	20
Figura 2. Determinación del porcentaje de humedad de los tratamientos....	21
Figura 3. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento.....	23
Figura 4. Efectos principales para Nitrógeno Amínico .....	24
Figura 5. Superficie de respuesta estimada de los tratamientos .....	25
Figura 6. Interacción para el Nitrógeno Amínico.....	25
Figura 7. Morfología del hidrolizado de Spirulina en polvo.....	27
Figura 8. Spirulina concentrada en polvo y Spirulina hidrolizada obtenida mediante secado por aspersion.....	29
Figura 9. Perfil electroforético SDS – PAGE del concentrado y el hidrolizado de Spirulina a distintas concentraciones de las muestras .....	31
Figura 10. Perfil electroforético SDS – PAGE de las proteínas de Spirulina platensis.....	32
Figura 11. Electroforesis SDS – PAGE de Spirulina y del hidrolizado en polvo (10µg/µL) en contraste plata .....	33
Figura 12. Perfil RP-HPLC de Spirulina concentrada a una señal de 280nm.....	34
Figura 13. Perfil RP-HPLC del hidrolizado de Spirulina a una señal de 280nm.....	34
Figura 14. Perfil RP-HPLC de la enzima papaína pura a una señal de 280nm.....	35
Figura 15. Comparación de los cromatogramas de la Spirulina concentrada, Spirulina Hidrolizada y la enzima papaína .....	36

## RESUMEN

El proyecto de investigación se basó en un análisis a la microalga Spirulina (*Arthrospira platensis*), que fue estudiada mediante la aplicación de varios tratamientos con distintas condiciones específicas que permitan una mejor asimilación de la misma, en el caso de ser aplicada como ingrediente farmacéutico activo o suplemento proteico. El mejor tratamiento obtuvo las siguientes condiciones: pH 5, relación 1:20 de sustrato: agua y una temperatura de hidrólisis mantenida en un rango entre 65°C y 70°C. El hidrolizado fue pulverizado mediante secado por aspersión que dio un rendimiento óptimo de 73,89 % y una coloración distinta a la Spirulina en polvo concentrada, a causa de la modificación estructural de las ficobiliproteínas en el proceso hidrolítico. Además se analizó el grado de hidrólisis del polvo mediante una comparación del contenido de nitrógeno amínico del hidrolizado y la Spirulina en polvo concentrada, también se aplicó técnicas de electroforesis SDS – PAGE y cromatografía RP – HPLC, que permitieron determinar que el proceso de hidrólisis fue idóneo y se logró obtener una mezcla compleja de péptidos y aminoácidos libres con bajos pesos moleculares que cumplen con las características necesarias para la futura aplicación del hidrolizado de Spirulina como ingrediente funcional.

**Palabras clave:** Spirulina, *Arthrospira platensis*, hidrólisis, ficobiliproteínas, electroforesis, SDS – PAGE, cromatografía, RP – HPLC.

## ABSTRACT

The research project was based on an analysis of the Spirulina microalgae (*Arthrospira platensis*), which was studied by the application of several treatments with different specific conditions that allow a better assimilation of the alga, in case of being applied as active pharmaceutical ingredient or protein supplement. The best treatment was attained at the conditions: pH 5, a concentration of 5% (in relation to 1:20 of substrate: water) and at a hydrolysis temperature maintained in a range of 65 °C to 70 °C. The hydrolyzate was sprayed by spray drying which gave an optimum yield of 73.89% and a different coloration to Spirulina powder concentrate because of the structural modification of the phycobiliproteins in the hydrolytic process. In addition, the degree of hydrolysis of the powder was analyzed by a comparison of the amine nitrogen content of the hydrolyzate and Spirulina powder concentrate, SDS - PAGE electrophoresis and RP - HPLC chromatography techniques were also applied, which allowed to determine that the hydrolysis process was adequate and produced a complex mixture of free amino acids and low molecular weights peptides with with the necessary characteristics for the future application of Spirulina hydrolyzate as functional ingredient.

**Keywords:** Spirulina, *Arthrospira platensis*, hydrolysis, phycobiliproteins, electrophoresis, SDS - PAGE, chromatography, RP - HPLC.

## INTRODUCCIÓN

Una importante línea de investigación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se enfoca en la producción alternativa de proteínas de distintos suministros tradicionales, tanto de origen animal como vegetal **(ONU, 1993)**. Por lo tanto en el presente proyecto de investigación se seleccionó la microalga *Spirulina platensis*, debido a las características singulares que posee. La Spirulina tiene una capacidad enorme de almacenar nutrientes y posee un alto contenido proteico. Su contenido de proteínas y aminoácidos es de 65%; 5% de lípidos; 7% de minerales; 12% de carbohidratos, 8% de vitaminas y 3% de humedad **(Henrikson, 1994)**.

Otro aspecto que caracteriza a esta microalga y que impulsa a que las investigaciones se expandan es su capacidad de reproducción, el alga se divide en dos cada 7 horas, y en condiciones ideales puede generar hasta 15000 kg/ha anuales de material seco, pero con la aplicación de tecnología apropiada los rendimientos pueden mejorar **(Ponce, 2013)**. La Spirulina posee cualidades inmunológicas, antioxidantes, antivirales, protectoras contra el cáncer, retiene metales pesados por lo que es un antitóxico, y se ha demostrado que es un regulador contra la hiperglicemia y la hiperlipidemia **(Belay, 2002)**.

Según la **Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2011)**, la Spirulina está autorizada legalmente como complemento proteico, indicando que es una fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Los complementos sintéticos de vitaminas y minerales suelen no ser reconocidos por el organismo, pues les falta los agentes capaces de fijar los iones metálicos y no-metálicos, lo que no sucede con la Spirulina que es acogida por el organismo de manera eficiente por ser un complejo natural.

Debido a las propiedades previamente fundamentadas el propósito de esta investigación fue aplicar un proceso de hidrólisis enzimática con papaína y, para una futura aplicación se pulverizó al hidrolizado mediante la técnica de secado por aspersion, que le permite conservar sus extraordinarias características físico – químicas.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 Tema

“Obtención de un hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersion, como ingrediente funcional”.

### 1.2 Justificación

La investigación de microalgas ha proporcionado una amplia gama de productos biotecnológicos con usos en la industria de alimentos, salud y medicina humana, alimentación animal, compuestos orgánicos y biocombustibles. Todo esto adquiere una gran importancia debido a los problemas ambientales globales existentes hoy en día (**Hernández & Labbé, 2014**).

Existe una especie de microalga que ha sido utilizada para los fines mencionados, la Spirulina, que es una cianobacteria filamentosa cultivada para consumo humano debido a su contenido nutricional y fácil digestión. Tiene un enorme potencial como fuente completa de alimentación, medicinal o recurso bioquímico (**Ramírez & Olvera, 2006**).

Para **Chamorro et al. (2002)**, la Spirulina se ha convertido en un alga muy codiciada ya que puede ser aplicada para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, el glaucoma, patologías del hígado, cáncer, VIH y otro tipo de enfermedades que siguen en estudio; además porque propicia el aumento de formación de neurotransmisores.

La Spirulina fue declarada por la ONU como el mejor alimento para el futuro, ya que representa una microalga potencial por múltiples razones, es rica en hierro y proteínas, y se puede administrar a cualquier persona sin ningún riesgo (**ONU, 1993**).

El presente proyecto de investigación tiene como propósito transformar a la Spirulina en un ingrediente activo que pueda ser aplicado tanto farmacéutica como funcionalmente en varios campos de la industria, mediante la aplicación de una hidrólisis enzimática y un proceso de secado por aspersión o *spray drying*.

El propósito de obtener un hidrolizado de Spirulina es que al ser sometida a este proceso de ruptura de la proteína, una vez que se ingiera, tenga mejor absorción por parte del organismo, además, se aprovecha de una manera más efectiva todos los nutrientes esenciales que posee.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 General**

- ✓ Obtener un hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional.

#### **1.3.2 Específicos**

- ✓ Evaluar las condiciones óptimas de obtención del hidrolizado de Spirulina.
- ✓ Obtener mediante secado por aspersión un hidrolizado de Spirulina en polvo.
- ✓ Caracterizar el producto obtenido en cuanto a grado de hidrólisis, mediante una comparación con la Spirulina concentrada.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

La Spirulina es un alga unicelular que crece y se multiplica en aguas naturales de medio alcalino. El nombre de Spirulina se deriva de la palabra latina “espiral o hélix”, que se refiere a su configuración física. Se le llama alga azul verdosa por la presencia de clorofila, que le da el color verde, y ficocianina, que le da el color azulado (**Antenna Technologies, 2005**).

La Spirulina es una cianobacteria filamentosa que actualmente ha sido descrita dentro del género *Arthrospira*. Algunas de las especies más utilizadas en la industria son *A. platensis* y *A. máxima*. Estas son algas verde-azuladas, procariotas con capacidad fotosintética, algunas de ellas asimilan nitrógeno atmosférico (**Ramírez & Olvera, 2006**). Es considerada una microalga que realiza procesos fotosintéticos y posee estructura multicelular filamentosa con forma helicoidal (**Sánchez et al, 2003**).

La Spirulina crece en agua, puede ser cosechada y procesada debido a su alto contenido en macro y micronutrientes. Las personas que viven cerca de lagos alcalinos en donde es naturalmente encontrada la Spirulina, han usado ésta como suplemento alimenticio (**Abdulqader, Barsanti, & Tredici, 2000**). Esta cianobacteria es al menos 60 % proteína vegetal, la cual es predigerida por el alga, haciendo de ella un alimento altamente digerible. Es más elevada en proteínas que otros alimentos (vegetales, algas). Su sobresaliente perfil nutricional también incluye los ácidos grasos esenciales, como se muestra en la Tabla 3, el ácido gamma linoleico (GLA), lípidos, ácidos nucleicos, ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico (RNA y DNA), vitamina B12, vitamina C y E y fotoquímicos, tales como carotenos, clorofila (purificador de sangre), ficocianina (pigmento azul) la cual es una proteína que se conoce como inhibidora del cáncer (**Chamorro et al., 2002**) en la tabla 6 se detalla los estos pigmentos presentes en la Spirulina.

Las proteínas, descritas en la **Tabla 1**, se encuentran en esta cianobacteria y son de factible digestión y metabolización, lo cual es favorable al tratamiento de problemas de nutrición. **(Ramírez & Olvera, 2006)**.

Posee ficobiliproteínas las cuales le dan una alta eficiencia fluorescente y solubilidad en agua, por lo que son usadas en la industria como colorante natural, marcadores fluorescentes y reactivos químicos **(Cohen, 1997)**.

La Spirulina es una gran fuente de vitaminas, detalladas en la Tabla 2, aporta gran cantidad de vitaminas del complejo B, principalmente la B12, por lo que constituye un complemento usual en la dieta de los vegetarianos, debido a que ninguna planta contiene esta vitamina. Además suministra beta-carotenos (provitamina A) **(Kozlenko & Henson, 1998)**.

Recientes estudios de farmacología, a nivel experimental *in vivo* e *in vitro*, de la Spirulina indican que algunos de sus constituyentes tienen una alta seguridad en los procedimientos para contrarrestar varios tipos de alergias, anemia, cáncer, hepatotoxicidad, enfermedades virales y cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipemia, inmunodeficiencia y procesos inflamatorios, entre otros **(Chamorro et al., 2002)**.

Según el **Comité de Dieta y Salud del Consejo Nacional de Investigación (1989)**, al comer solo 3 gramos de Spirulina cada día, se obtiene más nutrientes antioxidantes y antiinflamatorios que los que se encuentran en 5 porciones de verduras. La Spirulina es un alimento considerablemente digestible y nutritivo, debido a que además de proteínas, vitaminas, ácidos grasos y carbohidratos (Tabla 5), es una fuente única de minerales importantes para el metabolismo del organismo, en la Tabla 4 se detalla el contenido de los mismos.

**Tabla 1. Contenido de aminoácidos de la Spirulina.**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
<b>Aminoácidos esenciales</b>	
Leucina	5,9-6,5
Valina	7,5
Isoleucina	6,8
Lisina	2,6-3,3
Fenilalanina	2,6-3,3
Metionina	1,3-2,0
Triptófano	1,0-1,6
<b>Aminoácidos no esenciales</b>	
Ácido glutámico	7,3-9,5
Ácido aspártico	5,2-6,0
Cisteína	0,5-0,7

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997) y Sánchez et al. (2003)

**Tabla 2. Contenido de vitaminas en la Spirulina**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
Provitamina A	0,11-0,2
Tiamina B1	3-4mg
Riboflavina B2	2,5-3,5mg
Niacina B3	0,014
Vitamina B6	0,5-0,7mg
Cobalamina B12	0,15-0,25mg
Vitamina E	5-7mg
Vitamina K	2.2mg
Ácido fólico	4-5mg
Ácido pantoténico	0,5-0,8mg
Biotina	5µg

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997), Sánchez et al. (2003)

**Tabla 3. Contenido de ácidos grasos en la Spirulina**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
Ácido mirístico	0,23
Ácido palmítico	44,6-54,1
Ácido palmitoleico	1,26
Ácido gamma-linoleico (GLA)	8-32
Ácido linolénico	11-31
Ácido oleico	1-15,5
Otros	20,88

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997), Sánchez *et al.* (2003)

**Tabla 4. Contenido de minerales en la Spirulina**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
Potasio	1-14
Sodio	0,45-0,5
Fósforo	0,3-0,7
Calcio	0,1-0,4
Magnesio	0,1-0,2
Hierro	0,03-0,05
Manganeso	0,005
Zinc	0,003
Cobre	0,0012
Cromo	0,28mg

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997), Sánchez *et al.* (2003)

**Tabla 5. Contenido de carbohidratos en la Spirulina**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
Glicerol	7,4
Glucosa	7,5
Ramnosa	17,1
Fucosa	3,3
Ribosa	8,1
Xilosa	4,5
Manosa	1,9
Galactosa	8,2
D-Glucosamina	2,1
No identificados	2,6

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997), Sánchez et al. (2003)

**Tabla 6. Contenido de pigmentos en la Spirulina**

<b>Nombre</b>	<b>Contenido (%)</b>
Clorofila	0,8-1,5
Carotenoides	0,648
Beta-caroteno	15
Equinenona	11-13
Beta-criptoxantina	6-8
3'-hidroxiequinenona	7-11
Zeaxantina	25
Diatoxantina	5
Cantaxantina	5
Mixoxantofila	13-17
Oscillaxantina	3-5
No identificados	3-4
Ficocianina	16-20

**Fuente:** Cohen (1997), Sasson (1997), Sánchez *et al.* (2003)

### 2.1.1 Hidrólisis enzimática

Las proteínas son biopolímeros con pesos moleculares elevados. En su estructura poseen elementos que son los alfa-aminoácidos cuya masa molecular se establece mayoritariamente en valores de 10000 Daltons hasta pesos que multiplican este valor **(Severin & Solovieva, 1989)**.

Los procesos de hidrólisis de proteínas se puede aplicar mediante el uso de dos tipos de agentes hidrolizantes: agentes químicos (ácidos o álcalis) o enzimas **(Dave et al., 1991)**. La hidrólisis enzimática brinda la posibilidad de recuperar cantidades muy importantes y específicas de aminoácidos, péptidos y polipéptidos del material original **(Chabás, 1969; Niekliuydov & Navashin, 1985)**.

La papaína es una proteasa sulfhídrica (*tiol proteasa*) que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos donde los residuos de aminoácidos aromáticos del grupo carbonilo son arginina, lisina o glutamina **(Bajaña, 2005)**.

Esta enzima es soluble en agua y glicerol y prácticamente insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Su temperatura óptima es de 65°C y su rango de pH óptimo está entre 5-7. Tiene un tiempo de vida útil corto **(Bajaña, 2005)**. En los últimos años se ha incrementado el interés en evaluar el potencial antioxidante de los hidrolizados de proteínas y su posible aplicación como alimentos funcionales y nutraceuticos **(Martínez, Martínez & Dávila, 2015)**. Los péptidos antioxidantes también pueden liberarse de diferentes proteínas de origen vegetal o animal durante la preparación de hidrolizados de proteínas usando exo y endoenzimas **(Samaranayaka & Lichan, 2011)**.

El proceso de secado por aspersión involucra principalmente los siguientes pasos: concentración de la materia prima, atomización, secado del material y la evaporación del mismo con temperaturas de entrada y salida de 200 y 100°C respectivamente y dependiendo el material a secar. Las ventajas del secado por aspersión pueden ser diseñadas para virtualmente cualquier capacidad requerida. El producto que se obtienen son partículas menores o iguales a los 100 micrómetros de diámetro **(Swati, Wagh, 2014)**.

## **2.2 Hipótesis**

### **2.2.1 Hipótesis nula**

El hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo no presenta diferencia significativa en cuanto a grado de hidrólisis con el polvo de Spirulina concentrado.

### **2.2.2 Hipótesis alternativa**

El hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo presenta diferencia significativa con el polvo de Spirulina concentrado en cuanto a grado de hidrólisis.

## **2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **2.3.1 Variables Independientes**

- ✓ Concentración del sustrato
- ✓ pH
- ✓ Temperatura
- ✓ Concentración de Sólidos totales

### **2.3.2 Variable Dependiente**

- ✓ Contenido de nitrógeno amínico

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (Boro 3,3; Pyrex  $\pm 0,05$ )
- Bureta graduada de 50 mL ( $\pm 0,01$ )
- Probetas graduadas de 10, 50, 1000 mL (Boro 3,3  $\pm 0,05$ )
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL ( $\pm 0,01$ )
- Micropipetas automáticas de 5-50  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$
- Balones de aforo de 50 y 250 mL (Boro 3,3,  $\pm 0,05$ )
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 mL ( $\pm 0,05$ )
- Pipetas Pasteur
- Papel aluminio
- Magnetos de agitación
- Soporte universal
- Pinzas metálicas
- Varillas de agitación
- Espátulas
- Jeringuillas de 1 mL
- Tubos Eppendorf de 1, 1,5 y 2 mL

#### 3.1.1 Materia prima y Reactivos

- Spirulina platensis (Andes Spirulina, Ecuador)
- Papaína soluble con la actividad de 6000 USP-U/mg (Merck, Alemania)
- Agua destilada
- NaOH 0,1 N
- HCl 0,1 N

- Formaldehído (Merck, Alemania)
- Agua MiliQ (Merck, Alemania)
- Metanol (Merck, Alemania)
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma Aldrich, USA)

### 3.1.2 Equipos

- Reactor de acero inoxidable (Cap. 4 Litros)
- Plancha de calentamiento con agitación magnética (Isotemp, Fisher Scientific, USA)
- Balanza Analítica ( $\pm 0,0001$  g) (CITIZEN CY 720)
- pH metro (OAKTON pH11 Series, USA)
- Balanza de humedad (KERN MLS 50-3, Alemania)
- Mini Spray Dryer (BUCHI B-290, Suiza)
- Destilador de agua
- Agitador vertical (ETV)
- Fuente para electroforesis (BIO-RAD Modelo PowerPac™ Basic)
- Cámara de electroforesis (BIO-RAD, USA)
- Vórtex (Labnet, USA)
- Centrífuga (Labnet, USA)
- Minicentrífuga (Labnet, USA)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent Technologies, USA)
- Revelador de electroforesis CHEMIDOC MP (Bio-Rad, EE.UU.).
- Microscopio electrónico de barrido (TESCAN, Alemania)

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparación de los tratamientos

Se utilizó la enzima papaína (Merck - Alemania) en base a una relación de 10 g de enzima (papaína) por kg de sustrato (Spirulina). Además se aplicó dos relaciones para la concentración entre la Spirulina y el agua, en base a la información de **Zhurbenko & Martínez (2005)**.

### 3.2.1.1 Relación sustrato/agua

Se realizó dos diluciones en la relación entre el sustrato, Spirulina, y el disolvente, agua destilada.

- Relación 1:10

20g de Spirulina + 200 mL de agua

- Relación 1:20

10g de Spirulina + 200 mL de agua

### 3.2.2 Estudio de influencia de condiciones de operación

Se realizó 4 ensayos con distintas condiciones experimentales: donde se varió el pH entre 5 – 6, se utilizó NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N (previamente preparado) para la regulación, y la concentración del sustrato (5 % y 10 %). La temperatura se mantuvo en un rango de 65 °C a 70 °C durante 4 horas, una vez transcurridas las 4 horas del proceso de hidrólisis se sometió a ebullición (92 °C) por 5 minutos al hidrolizado. En cada hora del proceso de hidrólisis se ajustó el pH y temperatura en los límites establecidos. En la Tabla 7 se detalla las condiciones de los ensayos mencionados, de los cuales se realizó 3 réplicas de cada tratamiento.

**Tabla 7. Condiciones de hidrólisis de los tratamientos**

Parámetros	Ensayos			
	1	2	3	4
pH	5	6	5	6
Concentración	10%	5%	10%	5%
Temperatura (°C)	65 - 70	65 - 70	65 - 70	65 - 70
Relación	1/10	1/20	1/10	1/20

### 3.2.2.1 Cálculo de la cantidad de enzima a utilizar

Se determinó la cantidad de enzima (papaína) mediante la siguiente relación:

- 10g de enzima por 1kg (1000 g) de sustrato.

a) Para los tratamientos:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ x \rightarrow 20 \text{ g} \\ \mathbf{x= 0,2 \text{ g de papaína}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ x \rightarrow 10 \text{ g} \\ \mathbf{x= 0,1 \text{ g de papaína}} \end{array}$$

b) Para el hidrolizado final:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ g} \\ x \rightarrow 200 \text{ g} \\ \mathbf{x= 2 \text{ g de papaína}} \end{array}$$

### 3.2.3 Preparación del hidrolizado de Spirulina en base al mejor tratamiento.

Una vez aplicadas las corridas respectivas del diseño experimental se determinó que el mejor tratamiento se produce a las siguientes condiciones: pH = 5, concentración del sustrato 5 % (dilución 1/20), temperatura de 65 °C – 70 °C.

En un reactor con agitación vertical y en las condiciones previamente detalladas se mezcló 200 g de Spirulina y 4 L de agua destilada (1/20), una vez alcanzada la temperatura óptima (65 °C) se agregó la enzima papaína (en base al cálculo indicado para el hidrolizado final en el punto **3.2.2.1.** y se mantuvo la mezcla en las condiciones indicadas durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo del proceso de hidrólisis se aumentó la temperatura del reactor hasta que llegue el hidrolizado al punto de ebullición y se

mantuvo así por 5 minutos. En cada hora del proceso de hidrólisis se ajustó el pH y temperatura en los límites establecidos.

### 3.2.4 Análisis fisicoquímico del hidrolizado

#### 3.2.4.1 Determinación de sólidos totales

Se realizó en el equipo de determinación de humedad KERN MLS 50-3. A peso constante en un rango de temperatura entre 103 °C – 121 °C, durante 40 minutos, se colocó 3 g de muestra del hidrolizado y se determinó la humedad del mismo. En base al porcentaje de humedad obtenido, se restó del 100 % y el resultado fue el porcentaje de sólidos totales, como se indica en la **Ec. 1**. Se efectuó dos mediciones por cada muestra de hidrolizado.

$$\%Sólidos\ Totales = 100 - \%Humedad \quad [Ec. 1]$$

#### 3.2.4.2 Determinación del contenido de nitrógeno amínico

Se preparó una solución al 2 % del hidrolizado, de la solución preparada se tomó 3 mL y se completó a 20 mL con agua destilada en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL. Posteriormente se colocó 20 mL de una solución de formaldehído a concentración normal en un vaso de precipitación de 50 mL. Ambas soluciones fueron neutralizadas (pH 6,95 – 7,01) con solución de NaOH 0,1 N. Después se agregó 2 mL de la solución de formaldehído neutralizada a la solución del hidrolizado y se mezcló. Se tituló con NaOH 0,1 N la solución final hasta un pH entre 9,10 - 9,20. Se anotó el gasto exacto de NaOH y se realizó los cálculos correspondientes en base a la siguiente fórmula:

$$\%N. am. = \frac{ml\ NaOH * 1.4 * k}{ml\ muestra * 1000} * 100 * \frac{95}{\%S.T} \quad [Ec. 2]$$

Dónde:

- ml NaOH = gasto de NaOH 0,1 N en la titulación
- $k = \frac{\text{concentración práctica NaOH}}{\text{concentración teórica NaOH}}$
- %S.T = Porcentaje de sólidos totales

### 3.2.4.3 Análisis del tamaño de partícula del hidrolizado de Spirulina mediante Microscopia Electrónica de Barrido.

El tamaño, forma y superficie de las partículas del hidrolizado de Spirulina se analizó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, la muestra se preparó fijando una mínima cantidad sobre una placa porta muestras metálica (diámetro 1 cm), luego se fijó la muestra a un metalizador al vacío (Q150R, Reino Unido), donde se recubrió con oro a 20 nm de espesor; finalmente se colocó en el microscopio electrónico de barrido (Phenom 1255, Eindhoven), los parámetros utilizados fueron: resolución de  $\leq 30$  nm y un voltaje de aceleración de 5kV.

### 3.2.4.4 Secado por aspersion del hidrolizado de Spirulina

Se utilizó 2500 mL del hidrolizado de Spirulina, se instaló la manguera de absorción del equipo Spray Dryer y se estableció en el panel una temperatura de entrada de 140 °C y una temperatura de salida de 80 °C. Seguidamente la manguera de absorción succionó la solución del hidrolizado, concluido el proceso se recolectó todo el polvo secado y se pesó para la determinar el rendimiento de secado mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento\ secado = \frac{Peso\ obtenido(g)}{Peso\ teórico(g)} \times 100 \quad [Ec. 3]$$

Para determinar el peso teórico del polvo obtenido del hidrolizado se aplicó la siguiente ecuación:

$$Peso\ teórico\ (g) = \frac{\%S.T.}{100} \times Vol.\ Hidro. \quad [Ec. 4]$$

### 3.2.4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizó una comparación del polvo obtenido de Spirulina hidrolizada con la Spirulina concentrada mediante el proceso de electroforesis SDS-PAGE.

Se caracterizó el hidrolizado de Spirulina en polvo, siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizó geles de poliacrilamida al 12 %, para

determinar los pesos moleculares aproximados de la Spirulina concentrada y del hidrolizado.

Se agregó con la micropipeta 20  $\mu\text{L}$  de muestra en los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo en el equipo PowerPac<sup>TM</sup> Basic (BIO-RAD, USA) a 200 voltios durante 30 minutos, posteriormente se realizó la tinción de las bandas de polipéptidos con el colorante azul de Coomassie G-250 durante aproximadamente 12 horas, y se destiñó con una solución de ácido acético (5%), agua y metanol (50 %). Se reveló las bandas del gel en el equipo CHEMIDOC MP (BIO-RAD, USA).

#### **3.2.4.6 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)**

Se analizó el perfil de aminoácidos del hidrolizado de Spirulina mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa aplicando el método descrito por **Niessen *et al.* (2005)**.

Se examinó el hidrolizado, la Spirulina concentrada y la enzima papaina en RP-HPLC utilizando el Cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent Technologies, USA). El eluyente A que se empleó fue 100 % de agua MilliQ con Ácido Trifluoroacético (TFA) a concentración 0,027 % (v/v), el eluyente B fue 70 % de metanol con TFA al 0,027 % (v/v).

El sistema de cromatografía HPLC, se equipó con una bomba cuaternaria, un detector de longitud de onda variable a 280 nm y un inyector automático, todos de la serie Agilent 1100.

El sistema de adquisición de datos fue OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Se empleó una columna en fase inversa C18 Hi-pore (250 x 4,6 mm de diámetro interno) (Bio-Rad, Richmond; USA).

El volumen de inyección fue de 100  $\mu\text{L}$ , con una concentración de la muestra de 5 mg/mL disuelta en la fase A.

La muestra del hidrolizado se eluyó con un gradiente lineal del 0 % al 70 % en fase B hasta 5 minutos a un flujo de 1 ml/min. Y a una presión de 200 – 400 bar. El tiempo de corrida fue de 12 minutos por muestra.

### **3.3 Diseño experimental**

Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.205. Se aplicó un diseño factorial  $2^2$ , donde se utilizó los siguientes factores experimentales:

**Factor 1:** pH del hidrolizado

**Niveles del factor:** 5, 6

**Factor 2:** Concentración del sustrato

**Niveles del factor:** 5 % (1/20), 10 % (1/10)

Respuesta experimental: % Nitrógeno amínico

Se comparó entre tratamientos mediante análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95 %.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1 Resultados del estudio de influencia de las condiciones de operación

En los ensayos realizados para determinar las condiciones idóneas de operación para el hidrolizado de Spirulina, se efectuó 3 réplicas de cada tratamiento; el pH tuvo un efecto altamente significativo en el proceso de hidrólisis, debido a que la disminución de la concentración de iones de hidrógeno en las disoluciones es un indicativo de que la hidrólisis enzimática se ejecutó de manera efectiva, a excepción de la réplica 3' que presentó una alteración mínima del pH, en la **Tabla 8** se muestra cada tratamiento con sus respectivas condiciones.

**Tabla 8. Control del proceso de hidrolisis de los tratamientos en rango de temperatura de 65°C – 70°C**

<i>Replica</i>	<i>Dilución</i>	<i>pH<sub>0</sub></i> <i>(0h)</i>	<i>pH<sub>1</sub></i> <i>(1h)</i>	<i>pH<sub>2</sub></i> <i>(2h)</i>	<i>pH<sub>3</sub></i> <i>(3h)</i>	<i>pH<sub>4</sub></i> <i>(4h)</i>
1	1/10	5,30	5,25	5,18	5,15	5,13
1'	1/10	5,42	5,38	5,23	5,09	5,08
1''	1/10	5,22	5,31	5,18	5,13	5,10
2	1/20	5,19	5,15	5,10	5,06	5,03
2'	1/20	5,23	5,18	5,13	5,09	5,05
2''	1/20	5,17	5,14	5,15	5,11	5,00
3	1/10	6,41	6,38	6,33	6,20	6,12
3'	1/10	6,05	6,31	6,26	6,12	6,30
3''	1/10	6,29	6,25	6,23	6,19	6,15
4	1/20	6,33	6,21	6,13	6,09	5,95
4'	1/20	6,05	6,03	6,23	6,15	6,02
4''	1/20	6,35	6,19	6,11	6,07	6,00

La **Figura 1** muestra el estudio de influencia de las condiciones de operación de los tratamientos, los cuales fueron sometidos simultáneamente al proceso de hidrólisis en las condiciones de temperatura y agitación.



**Figura 1.** Estudio de influencia de las condiciones de operación en la hidrólisis de Spirulina. La plancha de calentamiento mantuvo a la misma temperatura a los 4 matraces y con una velocidad de agitación constante.

#### **4.1.2 Resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos de los tratamientos**

Uno de los principales indicadores físico – químicos que se determinó al concluir el proceso de hidrólisis fue el porcentaje de sólidos totales en base a la humedad del hidrolizado, en la **Tabla 9** se resume los valores correspondientes, los porcentajes varían de acuerdo a los parámetros aplicados a cada tratamiento. En el caso de la muestra 2 y sus respectivas réplicas; se diferencia que existe mayor contenido de nitrógeno amínico que en las otras muestras cuyos resultados son muy análogos entre replicas.

**Tabla 9. Concentración de Sólidos totales y Nitrógeno Amínico**

Replica	Relación	ml sustrato 2%	ml NaOH	%ST	%N.ami
1	1:10	1,2	1,45	10,07	1,60
1'	1:10	1,2	1,55	9,78	1,76
1''	1:10	1,2	1,3	9,91	1,45
2	1:20	0,6	0,65	4,89	2,95
2'	1:20	0,6	0,6	4,95	2,69
2''	1:20	0,6	0,625	5,04	2,75
3	1:10	1,2	1,45	9,37	1,72
3'	1:10	1,2	1,7	9,53	1,98
3''	1:10	1,2	1,55	10,02	1,71
4	1:20	0,6	0,5	5,02	2,21
4'	1:20	0,6	0,6	5,23	2,54
4''	1:20	0,6	0,65	5,38	2,68

En la **Figura 2** se muestra el proceso de determinación de humedad de una de las muestras hidrolizadas, se indica la influencia del calor en las temperaturas establecidas para deshidratar totalmente a la muestra.



**Figura 2.** Determinación del porcentaje de humedad de los tratamientos.

El porcentaje de sólidos totales es uno de los parámetros principales, de este depende el contenido de nitrógeno amínico determinado en cada muestra, al concluir el proceso de hidrólisis. El análisis del contenido de nitrógeno amínico en el hidrolizado es fundamental, pues comprende aproximadamente el 16% del peso de las proteínas y su valor biológico se basa en los aminoácidos, así lo describe **Brody (1999)**.

#### **4.1.3 Determinación del mejor tratamiento para el hidrolizado de Spirulina**

En la determinación del mejor tratamiento para la obtención del hidrolizado se empleó un diseño factorial  $2^2$ , se aplicó un análisis estadístico que engloba a todos los tratamientos propuestos, y se basó en la respuesta experimental del porcentaje de nitrógeno amínico contenido en el hidrolizado de Spirulina. Para el análisis estadístico se tomó en cuenta los parámetros pH y la concentración del sustrato, de esta manera se expresó estos factores en función del porcentaje de nitrógeno amínico.

El diseño experimental fue aplicado en el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV, se evaluaron los datos experimentales mediante un análisis de varianza al 95 % de nivel de significancia. Los valores presentados en la Tabla ANOVA (**ver Tabla 10**), donde se muestra la interacción de ambos factores en relación a la respuesta experimental, lo que permitió determinar el mejor tratamiento experimental para la obtención del hidrolizado de Spirulina.

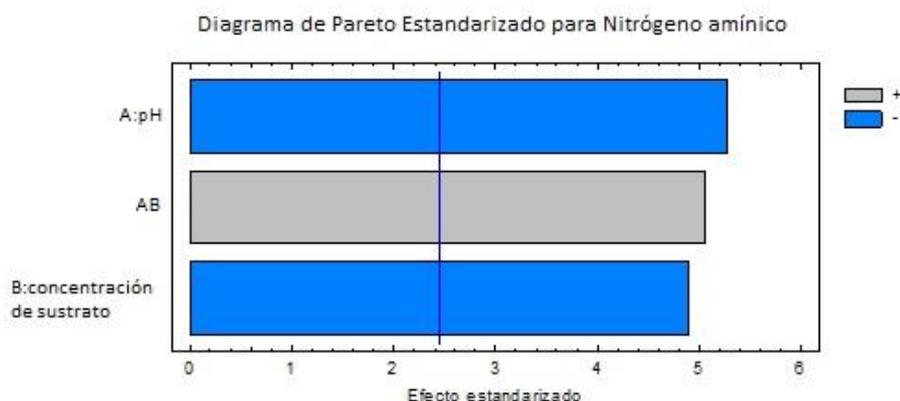
**Tabla 10. Análisis de Varianza para Nitrógeno amínico**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón -F</b>	<b>Valor-P</b>
A: pH	9,01354	1	9,01354	24,68	0,0017
B:Concentración de sustrato	7,98456	1	7,98456	21,98	0,0025
AB	8,55605	1	8,55605	23,91	0,0021
Bloques	0,0049357	2	0,0024678	0,01	0,9921
Error total	1,99304	6	0,3321733		
Total (corr.)	27,5521	11			

Fuente: Statgraphics Centurion XV, 2016

El análisis de varianza indicó estadísticamente la significancia de cada efecto mediante la comparación de los cuadrados medios contra un estimado del error experimental. Como se muestra en la **Tabla 10**, las interacciones o efectos entre factores tienen un “Valor-P” que es de 0,0017, el cual es considerablemente diferente al nivel de significancia de 0,05 a un nivel de confianza del 95%.

A continuación, se presentó el diagrama de Pareto (**ver Figura 3**), que permitió evidenciar que tanto el factor A (pH) como el factor B (concentración del sustrato) tienen incidencia en los resultados experimentales, el pH presentó una mayor incidencia pero mínima con relación al factor de concentración de sustrato. Por lo que ambos factores tienen un efecto cuadrático significativo.



**Figura 3. Diagrama de Pareto de Efectos Incidentes en el experimento**

**Fuente:** Statgraphics Centurion XV, 2016

Una vez definidos los efectos de los factores experimentales y el análisis de varianza se realizó el análisis de optimización de la respuesta experimental, de esta manera se definió el mejor tratamiento para el hidrolizado de Spirulina; en la **Tabla 11** se indican los valores óptimos de cada factor en base al análisis de los 12 ensayos aplicados, para ambos factores el valor óptimo fue el de nivel bajo, en el caso del factor pH el valor óptimo fue 5 y en el factor concentración de sustrato fue al 5%.

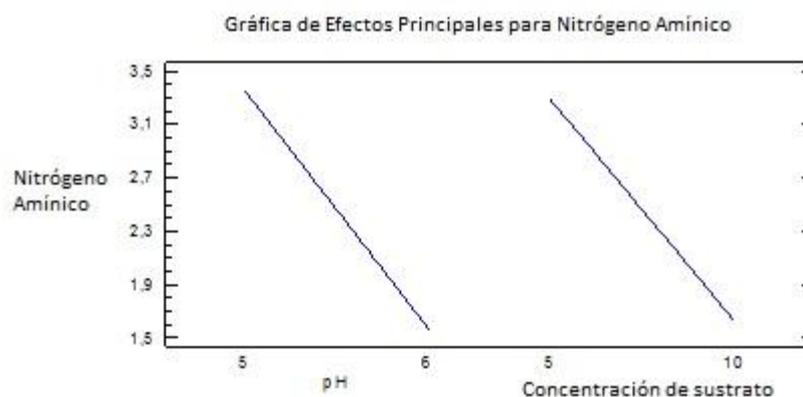
**Tabla 11. Optimización de la Respuesta Experimental**

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	5,0	6,0	5,0
Concentración de sustrato (%)	5,0	10,0	5,0

Fuente: Statgraphics Centurion XV, 2016

Las mejores condiciones para obtener el hidrolizado de Spirulina fueron las utilizadas en el ensayo experimental 2, en este se aplicó un pH de 5 y una concentración del sustrato de 5% en base a la relación 1/20 de sustrato: agua.

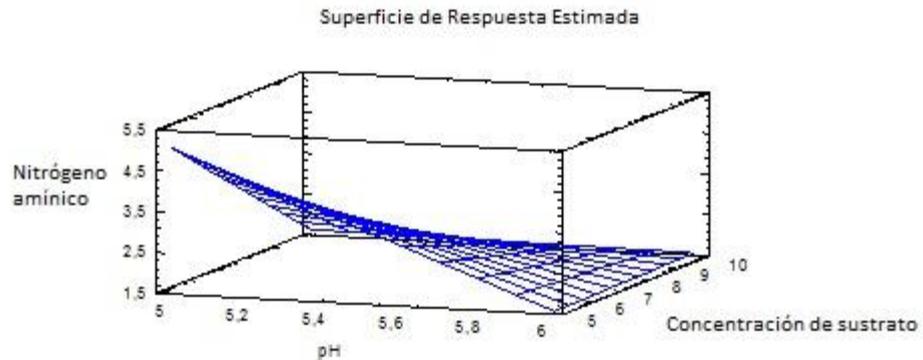
En el Gráfico de Efectos principales para Nitrógeno Amínico representado en la **Figura 4** se aprecia con mayor claridad la incidencia de los factores, pH y concentración de sustrato. La figura muestra la incidencia del pH y la concentración de sustrato sobre el Nitrógeno Amínico. A pH 5 hubo una mayor hidrólisis de la Spirulina, la cual se refleja en el porcentaje del nitrógeno amínico, un efecto similar se produjo con la concentración de sustrato del 5%. Por tanto a menor pH el porcentaje de Nitrógeno Amínico se incrementó y a menor concentración de sustrato se dio el mismo efecto.



**Figura 4.** Efectos principales para Nitrógeno Amínico

Fuente: Statgraphics Centurion XV, 2016

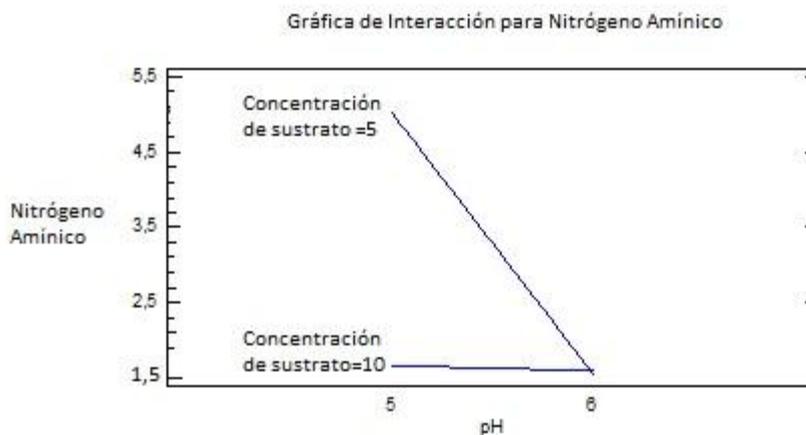
En la **Figura 5** se representa la superficie de respuesta estimada de los tratamientos experimentales, aquí se observó la tendencia de los ensayos experimentales para alcanzar los niveles máximos en cuanto a sus factores, enfocados en los valores de nitrógeno amínico hasta un máximo de 5%.



**Figura 5.** Efecto del pH y de la concentración de sustrato sobre el contenido de Nitrógeno Amínico para los tratamientos estudiados.

**Fuente:** Statgraphics Centurion XV, 2016

En la **Figura 6** se ilustra las interacciones entre el efecto del pH y el de las concentraciones de sustrato en la respuesta experimental contenido de Nitrógeno Amínico, se observa la influencia de la concentración del sustrato en sus distintas concentraciones.



**Figura 6.** Interacción de concentraciones de sustrato en base al Nitrógeno Amínico y pH

**Fuente:** Statgraphics Centurion XV, 2016

Finalmente, en el diseño experimental se obtuvo un coeficiente de regresión lineal  $R^2$  de 94,7 %, que representa el porcentaje de variación de la variable de respuesta, es decir, el Nitrógeno Amínico fue ajustado por los grados de libertad, dando un  $R^2$  ajustado de 92,23 %, el error estándar del estudio fue de 0,43 y el error absoluto de 0,21.

En base a los datos obtenidos del análisis de varianza se formuló la siguiente ecuación de regresión ajustada a los datos experimentales:

$$\%N. am. = 31,48 - 5,29 * pH - 3,78 * C. sust + 0,53 * pH * C. sust \quad [Ec. 4]$$

Dónde:

- C.sust = % de concentración del sustrato

#### **4.1.4 Análisis físico – químico del hidrolizado de Spirulina a pH 5 y concentración de sustrato 5%**

##### **4.1.4.1 Determinación de la humedad y sólidos totales del hidrolizado**

La humedad obtenida al concluir el proceso de hidrólisis fue de 95,11%±0,65%, en base a la [Ec. 1] se obtuvo 4,89%±0,65%, de sólidos totales en el hidrolizado, esto concuerda con lo reportado por **Zhurbenko & Martínez (2005)**, en donde el porcentaje de sólidos totales obtenidos en el hidrolizado de Spirulina fue de 4,30% ±0,60%. La diferencia es mínima con el experimento comparado y el valor experimental concuerda con el rango del valor bibliográfico.

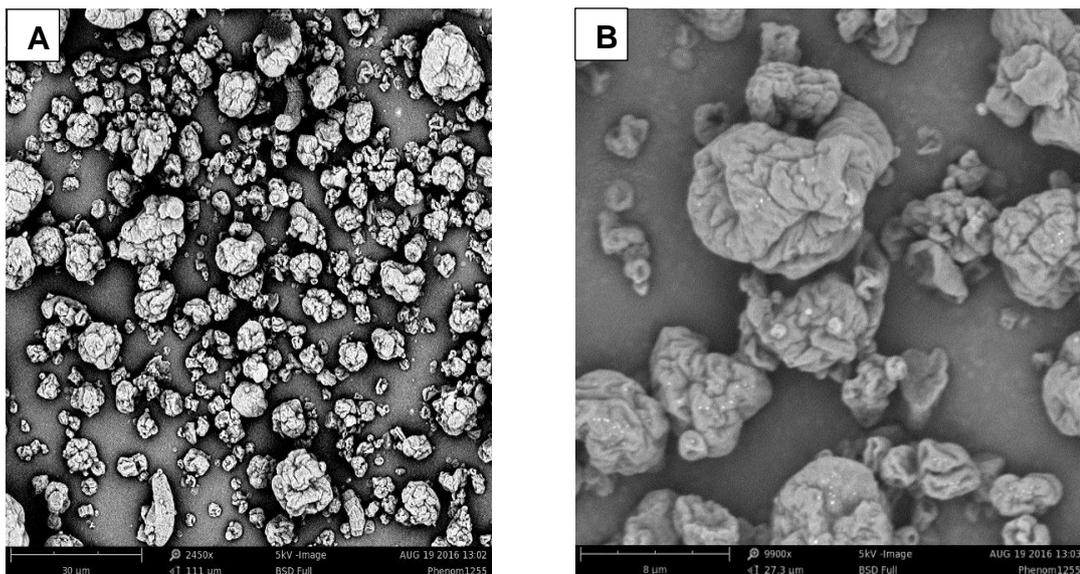
##### **4.1.4.2 Determinación del contenido de nitrógeno amínico**

El nitrógeno amínico para **Hicks (2001)** representa aproximadamente el 16% del peso de las proteínas y su valor biológico se basa en los aminoácidos; por esta razón la determinación de este parámetro fue muy importante en el proyecto de investigación, ya que la Spirulina además de los aminoácidos esenciales que posee, presenta cantidades significativas de los no esenciales. El nitrógeno amínico obtenido en el hidrolizado fue de 2,58%±0,61 que es un valor significativo en el producto obtenido, según

**Zhurbenko & Martínez (2005)** el rango porcentual de nitrógeno amínico que debe contener un hidrolizado de Spirulina es de  $2,69\% \pm 0,10\%$ . También se analizó el contenido de nitrógeno amínico del polvo concentrado de Spirulina, que resultó un valor cercano a 0, lo que tiene sentido ya que en éste existe una mínima cantidad de grupos amino libres de los aminoácidos y péptidos, lo contrario al hidrolizado.

#### 4.1.5 Análisis del tamaño de partícula mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Se analizó la forma y la superficie del hidrolizado de Spirulina en polvo mediante microscopía electrónica de barrido. En la **Figura 7** se observa las partículas formadas por el proceso de hidrólisis, se puede determinar que la morfología de las partículas del hidrolizado en polvo es indefinida y porosa, característica de las partículas de hidrolizados proteicos, las proteínas al ser sometidas a un proceso de hidrólisis y en este caso a un posterior proceso de secado por aspersion adquieren esta morfología esférica. El diámetro de partícula indicado en la imagen a) con un aumento de 2450x es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En el caso de la imagen b) que fue aumentada 9900x se consiguió determinar un diámetro de partícula más exacto de 8  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7.** Morfología del hidrolizado de Spirulina en polvo. Medición del diámetro de partículas del polvo a diferentes aumentos (A) 2450x B) 9900x) mediante microscopía electrónica de barrido.

#### 4.1.6 Análisis del rendimiento del Secado por aspersión del hidrolizado de Spirulina

Para la obtención del hidrolizado de Spirulina en polvo se secó la solución del hidrolizado en el Spray Dryer, de la cual se utilizó un volumen de 2500 mL, de este se obtuvo 133,37 g de hidrolizado en polvo. En base al cálculo de peso teórico la cantidad de polvo obtenido debía ser 180,5 g, este valor resultó del cálculo aplicado en la [Ec. 4] se comparó los pesos obtenidos tanto teórica como el experimentalmente para determinar el rendimiento que resultó de la aplicación de la [Ec. 3] dando un rendimiento neto de 73,89 %, este rendimiento es óptimo para la cantidad de solución del hidrolizado que se secó, incluso pudo tener un mayor rendimiento el hidrolizado en polvo pero en el proceso de secado por aspersión se adhieren a las paredes internas de la cámara de secado una mínima cantidad del polvo el cual no puede ser retirado por completo y es desechado. Sin embargo la cantidad obtenida supera al 50 % de rendimiento, en la investigación de **Lopez, et al. (2008)** quien especifica que en el proceso de secado por aspersión de extractos acuosos los rendimientos obtenidos superan el 50%, además la aplicación de esta metodología asegura la calidad del principio activo ya que elimina todo tipo de impurezas que existan en la muestra.

Una de las características más evidentes de la hidrólisis de Spirulina fue la coloración que presentó al concluir el proceso, ya que de una solución acuosa color verde pasión, característico de la Spirulina, se obtuvo una solución color caribe verde lima, esta solución al ser sometida a secado por aspersión se presentó como en la **figura 8**. Los colores de ambos polvos de Spirulina fueron asignados según la tabla internacional de colores presentada en el **Anexo 13**.

Para **Cabranes et al. (2000)**, las ficobiliproteínas son pigmentos – proteínas fluorescentes naturales, que presentan grupos cromóforos denominados bilinas, las cuales son tetrapirroles lineales unidos a su esqueleto covalente, responsable de las características ópticas de la Spirulina, estas proteínas al

ser hidrolizadas, en especial la ficocianina responsable de la coloración verde azulada de la microalga, provocan que se den cambios en estas estructuras y alteren las características en la coloración de producto final.



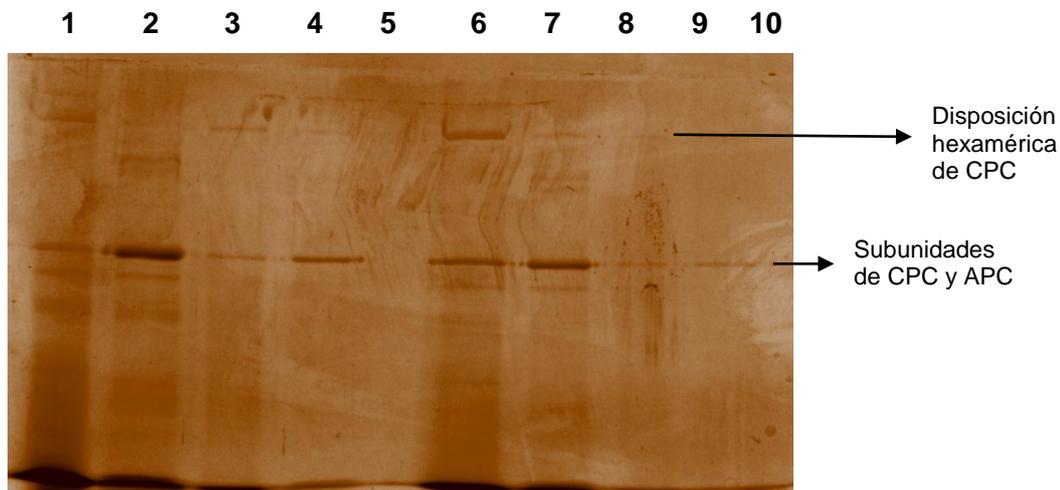
**Figura 8.** Spirulina concentrada en polvo (Izquierda) y Spirulina hidrolizada obtenida mediante secado por aspersión (Derecha).

#### **4.1.7 Comparación del concentrado de Spirulina y del hidrolizado de Spirulina mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil-Sulfato Sódico (SDS-PAGE)**

Se comparó el polvo del hidrolizado de Spirulina con el polvo concentrado de Spirulina mediante SDS-PAGE, no se utilizó ningún tipo de estándar de peso molecular, debido a que el propósito de la electroforesis fue comprobar que las proteínas de la Spirulina fueron hidrolizadas, es decir que se formaron péptidos de distintos pesos moleculares lo cual permitió el paso de los mismos a través del gel. Para esta determinación se realizó varias repeticiones a distintas concentraciones de las muestras y se definió la imagen de los geles con dos contrastes: el normal de coloración azul y en contraste plata que fue el que permitió una mejor definición de las bandas del gel.

En el primer gel de 0,75 mm de grosor y de 10 pocillos que se elaboró se corrió 8 muestras dejando libres los pocillos 5 y 10, como se puede apreciar en la **Figura 9**; en los 4 primeros pocillos se cargó las muestras concentradas según correspondía, y en los 4 pocillos restantes se cargó las muestras en dilución  $\frac{1}{2}$ . Las bandas de los pocillos 1 y 2 corresponden a las muestras más concentradas, que se prepararon sin concentración conocida, al contrario de las muestras cargadas en los pocillos 3 y 4 que fueron previamente preparadas a  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , en el caso de las bandas de los pocillos 3, 4, 7 y 8 se aprecia que son menos visibles, debido a que la concentración de la muestra cargada fue muy baja ya que estaba diluida. Al contrario, las bandas de los carriles 1 y 2 son más definidas, el carril 1 corresponde al concentrado de Spirulina, en la intensidad de sus bandas se distingue que existe una mayor concentración de proteínas que en las del carril 2 que son del hidrolizado de Spirulina.

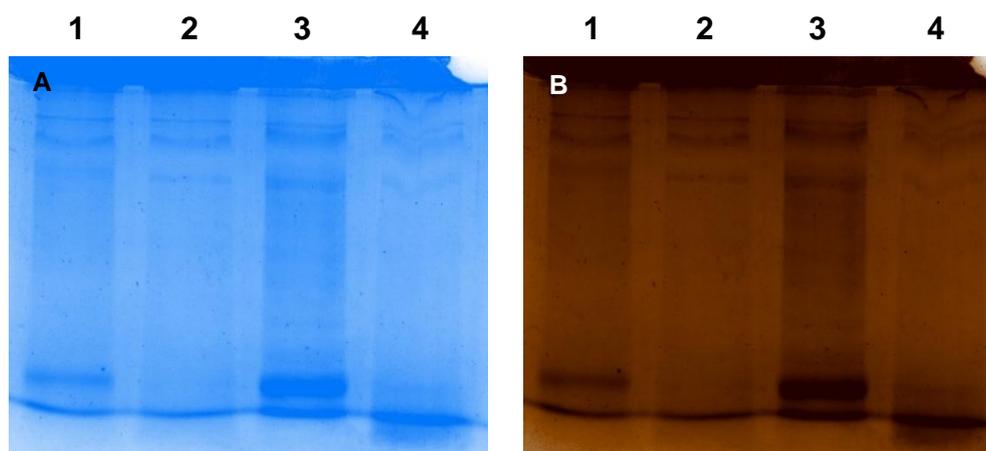
En todas las muestras se puede distinguir dos bandas con mayor intensidad, una ubicada en la parte superior del gel, lo cual indica que tiene un peso molecular alto y probablemente pertenece a las C-ficocianinas (CPC) y la que se encuentra en la parte inferior que puede corresponder a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las ficocianinas y aloficocianinas, esto se corrobora con el estudio de **Martínez, et al. (2015)**, que presenta perfiles electroforéticos de las proteínas de Spirulina y explica, que la fracción principal de las proteínas de Spirulina se encuentra en forma de disposiciones supramoleculares conocidas como ficobilisomas, que están constituidas por polipéptidos pigmentados (ficobiliproteínas) y no pigmentados (péptidos de unión), las ficobiliproteínas más importantes son la C-ficocianina (CPC) y aloficocianina (APC), que en conjunto representan más del 60% de la proteína total.



**Figura 9. Perfil electroforético SDS – PAGE del concentrado y el hidrolizado de Spirulina a distintas concentraciones de las muestras.**

Carril 1: Spirulina, Carril 2: Hidrolizado de Spirulina, Carril 3: Spirulina (5µg/µL), Carril 4: Hidrolizado (5µg/µL), Carril 5: vacío, Carril 6: dilución ½ Spirulina, Carril 7: dilución ½ hidrolizado, Carril 8: dilución ½ Spirulina (5µg/µL), Carril 9: dilución ½ hidrolizado (5µg/µL), Carril 10: vacío.

En la **Figura 10** se presentó un gel de 1.00 mm de grosor en donde se cargó 4 muestras con mayor concentración, aquí se comparó los perfiles electroforéticos a diferentes contrastes a) y b), en el contraste b) en color plata es donde se tuvo mejor definición de las bandas de las muestras. Las muestras 1 y 2 fueron cargadas en ausencia de 2-mercaptoetanol mientras que las 3 y 4 se cargó con el reactivo, esto nos permitió definir que en presencia del 2-mercaptoetanol se puede tener una mejor apreciación de las bandas proteicas. Además en este gel se visualizó como, en el carril 4 correspondiente al hidrolizado, se fraccionaron las proteínas en péptidos de menor peso molecular hasta llegar al final del carril, al contrario del carril 3 perteneciente a la Spirulina concentrada cuyas bandas son intensas cuando tienen pesos moleculares más altos.

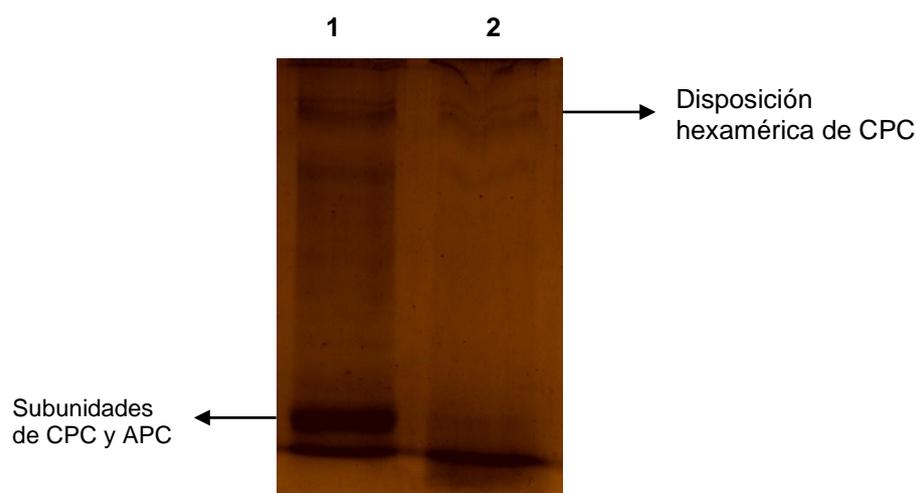


**Figura 10. Perfil electroforético SDS – PAGE de las proteínas de Spirulina platensis.**

**A)** Gel de electroforesis en contraste azul **B)** Gel de electroforesis en contraste plata. Carril 1: Spirulina sin 2-mercaptoetanol, Carril 2: Hidrolizado de Spirulina sin 2-mercaptoetanol, Carril 3: Spirulina con 2-mercaptoetanol, Carril 4: Hidrolizado de Spirulina con 2-mercaptoetanol.

**Mathews et al. (2002)** puntualiza que en los estudios de proteínas donde se aplica electroforesis SDS – PAGE, es importante evaluar las muestras en dos experimentos: el primero en presencia de un agente reductor, en este caso el 2-mercaptoetanol, que actúa rompiendo los enlaces disulfuro y asegura que la proteína esté completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, y el otro debe ser en ausencia del agente, así se puede distinguir entre las subunidades que se mantienen juntas mediante los puentes disulfuro y las que se mantienen unidas mediante fuerzas no covalentes.

En la **Figura 11** se observa el gel donde se comparó la Spirulina concentrada (1) con el hidrolizado de Spirulina (2) aquí se puede distinguir las bandas de proteínas de alto peso molecular presentes en el concentrado, además se visualiza que al final del carril existe una banda con mayor intensidad que todas, al comparar con la investigación de **Martínez, et al. (2015)**, esta banda podría corresponder a las subunidades de las principales ficobiliproteínas. En el caso del hidrolizado (carril 2) se distingue la disociación que tuvieron las proteínas siendo fraccionadas en moléculas de bajos pesos moleculares por lo que tendieron a precipitar.

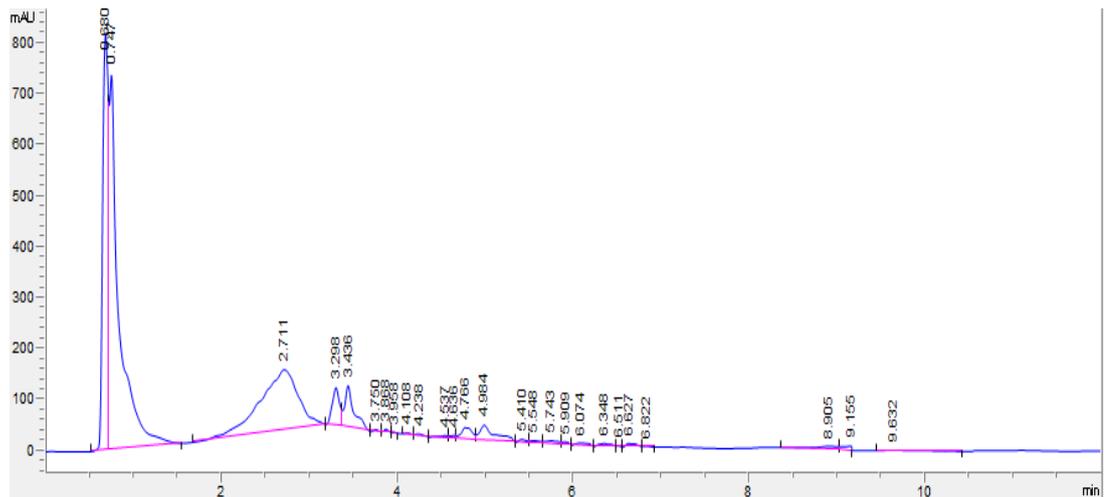


**Figura 11. Electroforesis SDS – PAGE de Spirulina y el hidrolizado en polvo (10µg/µL) en contraste plata.** Carril 1: Spirulina con 2-mercaptoetanol, Carril 2: Hidrolizado de Spirulina con 2-mercaptoetanol.

#### 4.1.8 Análisis del hidrolizado de Spirulina en polvo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

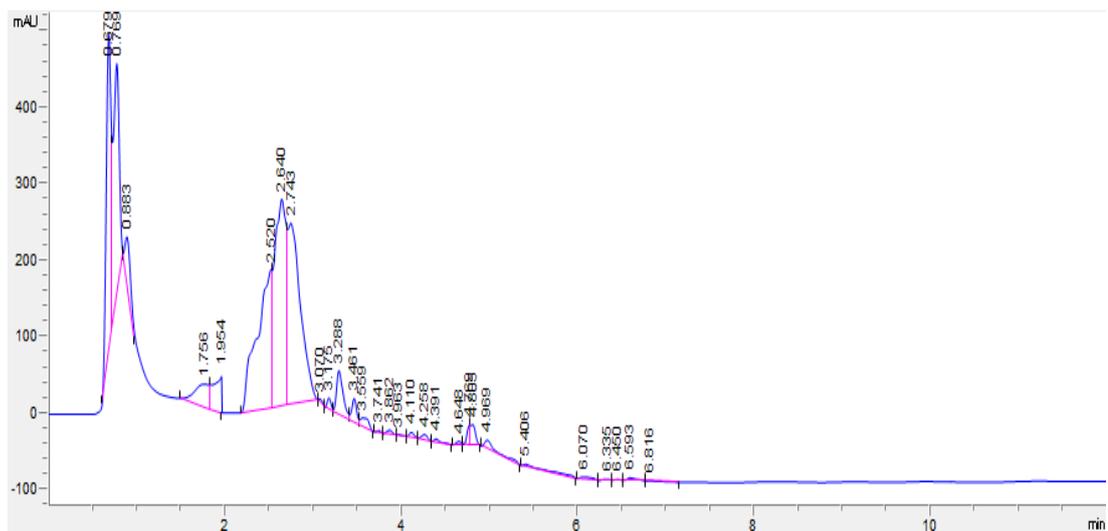
Para conocer el perfil cromatográfico del hidrolizado de Spirulina en polvo se utilizó la técnica de RP-HPLC, en este análisis se confirmó que las proteínas de la Spirulina concentrada fueron hidrolizadas gracias a la acción de la papaína. Se inyectó una muestra de la Spirulina concentrada, otra del hidrolizado y una de la enzima papaína. Los perfiles cromatográficos de las 3 muestras contienen una señal alta aproximadamente en el minuto 1 del análisis, esta señal se debe a la presencia del TFA, es por eso que en el mismo tiempo de cada muestra se formó el pico característico a este compuesto.

La **Figura 12** presenta el perfil cromatográfico mediante RP-HPLC del concentrado de Spirulina, donde se puede observar la presencia de varios picos cromatográficos característicos de las proteínas y otros componentes de la Spirulina. Además se observa que al minuto 10, aproximadamente, ya no se detectaron las señales y la absorbancia se mantuvo en 0, hasta concluir la corrida de la muestra en el minuto 12.



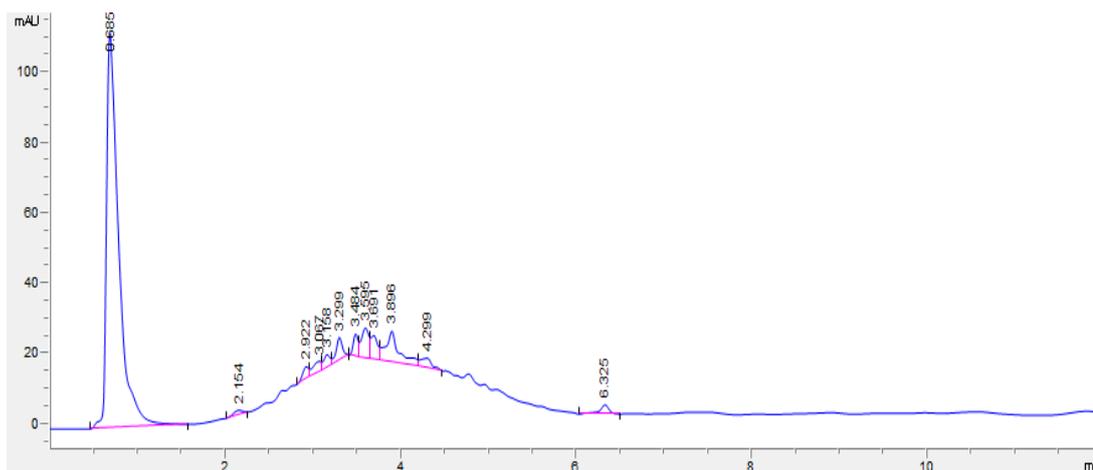
**Figura 12. Perfil de Spirulina concentrada a una señal de 280nm obtenida por RP-HPLC**

En el caso del perfil cromatográfico del hidrolizado de Spirulina, la **Figura 13** señaló los picos cromatográficos con una mayor absorbancia que en el concentrado, esto se debe a que al ser hidrolizadas las proteínas de la microalga, algunos de los péptidos y aminoácidos libres tienden a coincidir en una concentración que intensifica la absorbancia como se indica en el cromatograma. Sin embargo, es notable que existe una menor cantidad de señales debido a que existen proteínas de pesos moleculares muy bajos que no producen señal alguna, por esto los picos cromatográficos tendieron a disminuir a partir del minuto 3 aproximadamente hasta el minuto 7 que se dejó de producir señal alguna en el cromatograma.



**Figura 13. Perfil RP-HPLC del hidrolizado de Spirulina a una señal de 280nm**

Finalmente, se analizó al perfil cromatográfico de la papaína señalado en la **figura 14**, lo que nos permitió comparar algunas señales que fueron visibles también en el cromatograma del hidrolizado según los tiempos específicos. Como se observó, las absorbancias de la enzima son menores a las que se producen en el hidrolizado, pero se presentaron entre los minutos 2 y 6 la mayoría de picos cromatográficos.

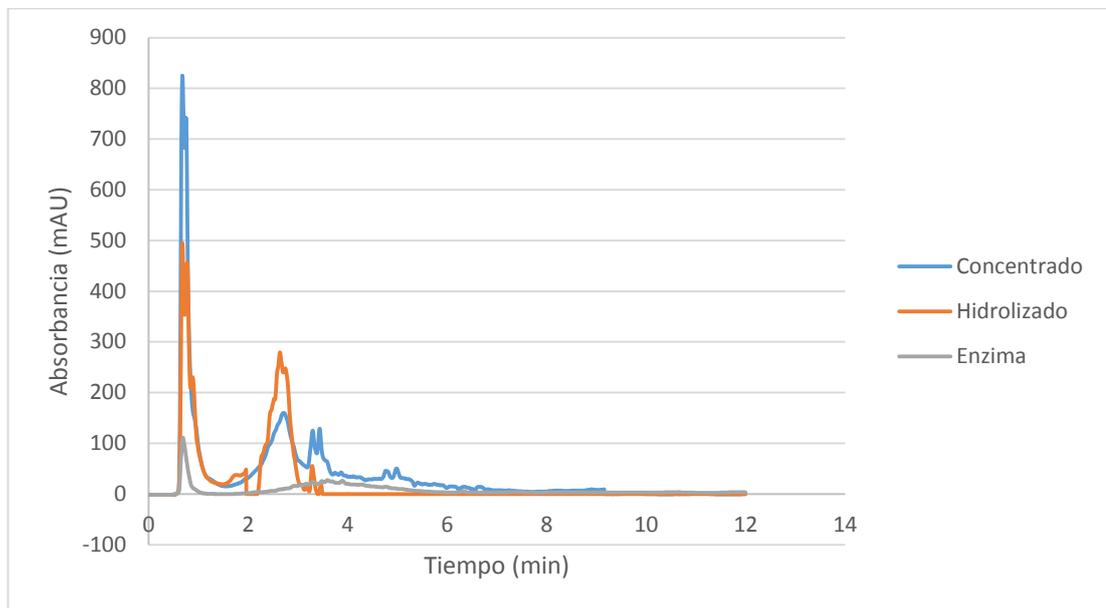


**Figura 14. Perfil RP-HPLC de la enzima papaína pura a una señal de 280nm**

Existen varios picos cromatográficos que coinciden en el mismo tiempo entre el hidrolizado y la Spirulina concentrada, pero con diferencia de absorbancias. Según se comparó con la investigación de **Hanaa et al. (2003)**, donde se enfoca en los perfiles cromatográficos por RP-HPLC de los carotenoides y el tocoferol de *Spirulina platensis*, existen señales entre los minutos 2 y 4 que son exclusivos de este tipo de compuestos. Además el pico con más absorbancia que se da en el minuto 2,7 aproximadamente representa a la señal de la ficocianina, ya que es el que presentó mayor concentración que el resto.

Se realizó un gráfico de comparación de los 3 cromatogramas como se muestra en la **Figura 15**, donde se puede distinguir la relación de ciertos picos cromatográficos, entre el hidrolizado y el concentrado, y entre el hidrolizado y la enzima, pero con distintas absorbancias. Además, en el hidrolizado, se observa que existen picos que presentan absorbancias similares a los de la papaína, esto se debe a que existen componentes de la

papaína que fueron desnaturalizados al momento de aumentar la temperatura para concluir el proceso de hidrólisis.



**Figura 15. Comparación de los cromatogramas de la Spirulina concentrada, Spirulina Hidrolizada y la enzima papaína.**

#### 4.2 Verificación de hipótesis

El hidrolizado de Spirulina en polvo obtenido presenta diferencia significativa con el polvo de Spirulina concentrado en cuanto a grado de hidrólisis, que se verificó mediante varios análisis aplicados al hidrolizado; en el punto 4.1.4.2. se comparó el contenido de nitrógeno amínico del hidrolizado con el concentrado de Spirulina. Además se comparó las bandas de los perfiles electroforéticos previamente puntualizadas en la **Figura 11**, además de los cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa como se especificó en la **Figura 15**. En ambos casos se comprobó que el proceso de hidrólisis y secado fueron altamente eficientes y permitieron obtener un producto con un alto nivel de hidrólisis, capaz de ser aplicado como ingrediente funcional según el propósito que se establezca para el mismo. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- ✓ Se obtuvo un hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersion, el mismo que podría ser utilizado como ingrediente funcional, es decir, este hidrolizado tiene la multifuncionalidad de ser aplicado como ingrediente farmacéutico activo o como suplemento proteico.
- ✓ Se evaluaron las condiciones óptimas de obtención del hidrolizado de Spirulina, en base a los ensayos experimentales y al diseño experimental aplicado se determinaron que las mejores condiciones para la hidrólisis fueron las empleadas en el ensayo experimental 2, en el que se estabilizó el pH a 5, con concentración del sustrato de 5% en base a la relación 1/20 de sustrato: agua y un rango de temperatura entre 65°C y 70°C.
- ✓ Se obtuvo mediante secado por aspersion un hidrolizado de Spirulina en polvo, logrando un rendimiento óptimo de 73,89 % a partir de la cantidad de solución del hidrolizado que se secó y presentó un color caribe verde lima, comparado con el polvo concentrado de Spirulina que presenta un color verde pasión, los cambios en la coloración se debe a modificaciones estructurales de las ficobiliproteínas en el proceso de hidrólisis.
- ✓ Se caracterizó el producto obtenido en cuanto a grado de hidrólisis mediante una comparación con la Spirulina concentrada. Los análisis mediante electroforesis SDS – PAGE, y Cromatografía Líquida de Alta

Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC) permitieron establecer que por el proceso de hidrólisis se generó una mezcla compleja de péptidos de bajos pesos moleculares y de aminoácidos libres a diferencia del polvo concentrado que presenta proteínas de pesos moleculares elevados.

## **5.2 Recomendaciones**

- ✓ Ampliar los estudios del hidrolizado de Spirulina en polvo en cuanto a las ficobiliproteínas, caracterizando la secuencia aminoacídica de sus cadenas polipeptídicas.
- ✓ Estudiar las características moleculares de la C-ficocianina presente en el hidrolizado de Spirulina.
- ✓ Aplicar un estudio específico del hidrolizado de Spirulina para su aplicación como ingrediente funcional ya sea en el campo farmacéutico o alimenticio.

## MATERIAL DE REFERENCIA

### Referencias bibliográficas

Abdulqader, G., Barsanti, L., & Tredici, M. R. (2000). Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Journal of Applied Phycology*, 12 (January 1997), 493–498. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:100817792579>

Antenna Technologies. (2005). *Spirulina: some scientific foundations*. Disponible en: [www.antenna.ch](http://www.antenna.ch).

APHA. (1995). *Standard Methods for the examination of water and wastewaters*, American Public Health Association, Washington. 19 Edición, pp. 353-358.

Bajaña, C.,. (2005). Inmovilización de papaína en soporte de quitosano. Guayaquil, Ecuador. pp. 15-19.

Banchon, C., (2005). Inmovilización de papaína en soporte de quitosano. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/413>

Brody, T., (1999). *Nutritional Biochemistry*. Academic Press. San Diego, California. 2<sup>da</sup> Edición. pp. 455.

Bruguer, (2015). Paleta Internacional de Colores. Disponible en: <https://www.bruguer.es/es/paletas-de-colores>.

Cabranes, Y., Lagomasino, J., Lagomasino, A., (2000) Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-ficocianina-620 obtenida a partir de la *Spirulina platensis*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Ciudad de La Habana, Cuba. Vol. 31. N°3.

Chabás, J. (1969). Enzimología. Editorial Científico-Médica. Barcelona, España. Vol. 12: 283-289.

Chamorro, G., Salazar, M., Gomes, M., Pereira, C., Ceballos, G., & Fabila, C. (2002). Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento convencional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, M.A.D. México - Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Brasil. pp. 232-240.

Cohen, Z. (1997). The chemicals of *Spirulina*. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. Talor & Francis. Londres. Reino Unido. pp. 175-203.

Consejo Nacional de Investigación. (1989). Washington, DC, Estados Unidos. Disponible en: <http://www.nationalacademies.org/index.html>

Dave, R., Joshi, N., Patel, J., & Thakar, P., (1991). Protein hydrolysates – a review. Indian Journal of Dairy Science. pp. 557-564.

Food and Drug Administration. (2011). *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Washington, DC, Estados Unidos. Disponible en: [www.fda.gov/downloads/food/ingredientpackaginglabeling/gras/noticeinventory/ucm269772.pdf](http://www.fda.gov/downloads/food/ingredientpackaginglabeling/gras/noticeinventory/ucm269772.pdf)

Hanaa, H., Abd E., Farouk, K., El, B., Gamal, S. (2003). Spirulina AS a Source of Carotenoids and  $\alpha$ -Tocopheril and its Anticarcinoma Factors. Asian Network for Scientific Information. Biotechnology. Vol. 2. Cairo, Egipto.

Henrikson, R. (1994). Microalga Spirulina - Superalimento del futuro. Urano S.A. Barcelona, España.

Hernández, A., & Labbé, J., (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía. Chile. Vol. 49: 157-173.

Hicks, J. (2001). Bioquímica. 1ª.ed. McGraw-Hill. México. pp. 636. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?isbn=8429172084>

Kozlenko, R., Henson, R., (1998). Latest Scientific Research on Spirulina: Effects on the AIDS Virus, Cancer and the Immune System. Disponible en: [www.spirulina.com/SPLNews96.html](http://www.spirulina.com/SPLNews96.html).

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature, pp 680–685.

López, D., Torres, L., Izquierdo, S., González & M., Chávez D., (2008). Secado por aspersion de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco. Recuperado el 03 de marzo de 2016. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962008000400010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000400010)

Martínez, N., Martínez, A., Dávila, G., (2015). Determinación de actividad antioxidante y quelante de Hidrolizados proteicos de espirulina (*Arthrospira maxima*) obtenidos por simulación de digestión gastrointestinal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Morelos, Mexico. Vol. 14. N°1. pp. 25-34.

Mathews, C., Van Holde, K. E., & Ahern, K., (2002). *Bioquímica*. Pearson Education S.A. Madrid, España. Vol. 3.

Niekliyudov, A., & Navashin, S., (1985). Preparación de hidrolizados de proteínas con propiedades deseadas. Visión general. *Bioquímica y Microbiología Aplicada*. Ucrania. pp. 3-12.

Niessen, S., Mcleod, I., & Yates, J. (2005). HPLC Separation of Digested Proteins and Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis. *Cold Spring Harbor*.

Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas. ONU. (1993). *Institution for the Use of Micro-alga Spirulina against Malnutrition*. Ginebra, Suiza. Disponible en:

[www.un.org/en/ecosoc/do...s/2003/decision%202003-212.pdf](http://www.un.org/en/ecosoc/do...s/2003/decision%202003-212.pdf)

Ponce, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. Vol. 31, N° 1. pp. 135-139. *Revista IDESIA*. Chile. Enero-Abril, 2013

Ramírez, L., & Olvera, R., (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina sp.* (*arthrospira sp.*). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. Disponible en:

[www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037884420060009000](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037884420060009000)

Samaranayaka, A., Li-Chan, A., (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. Canadá. pp. 229-254.

Sánchez, M., Bernal J., Rozo, C., & Rodriguez, I., (2003). Spirulina (Artrhospira): An Edible Microorganism. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. *Revista Universitas Scientiarum*, pp. 7-24, Publicada en enero 2003. Disponible en:

[revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4842](http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4842)

Sasson, A., (1997). Biotechnologies in developing countries: present and future. *Asia-Pacific Marine Biotechnol.* Paris - Francia. Vol. 2: pp. 11-31.

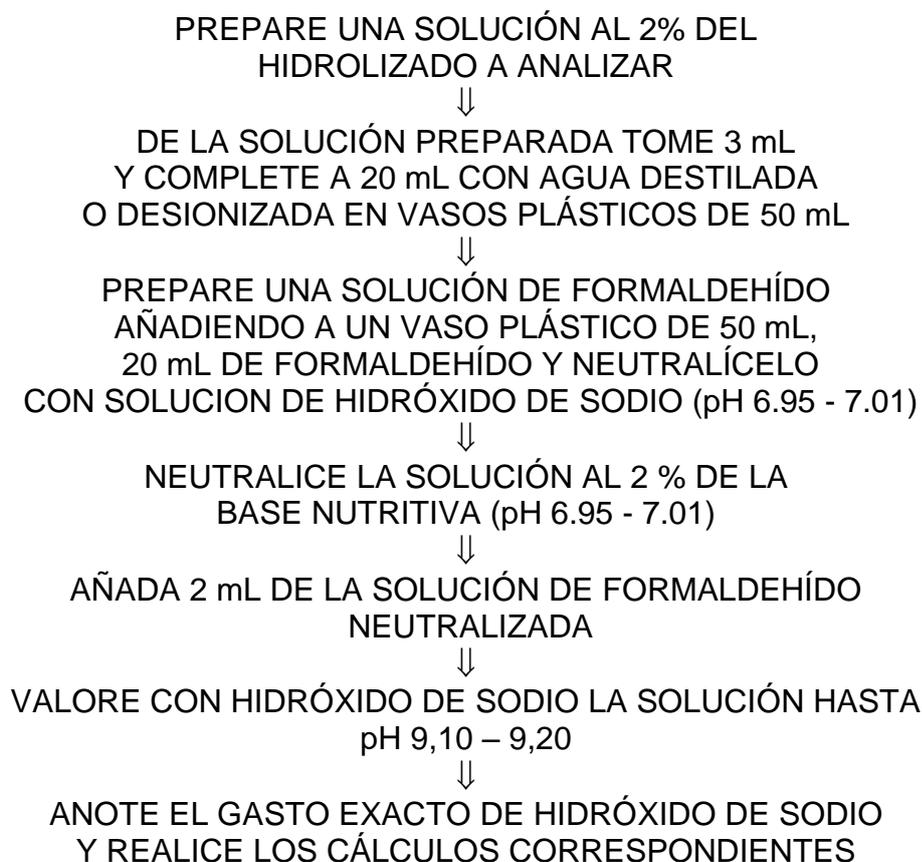
Severin, S., & Solovieva, G., (1989). Taller de Bioquímica. Universidad de Moscú. pp. 122-144.

Swati, Wagh. (2014). Review on Spray Drying Technology. Recuperado el 07 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.ijpcbs.com/files/02-468.pdf>.

Zhurbenko, R., & Rodríguez, C., (2005). Metodología para el desarrollo de Hidrolizados Proteicos para Medios de Cultivo en Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Ciudad de La Habana, Cuba. Vol. 36.

## ANEXOS

### Protocolo A. Determinación del contenido de nitrógeno amínico



NOTA: ESTA DETERMINACIÓN NO REQUIERE DE BLANCOS.

**Fuente:** López O., 2016

## Protocolo B. Electroforesis SDS-PAGE

### SDS-PAGE (Laemmli)

Casting and running protein gels according to Laemmli using BioRad's Minipro-tean II.

#### The protocol

1. Take two spacers, a comb, one small and one large glass plate, a casting block and the casting stand.
2. Clean the glass plates with ethanol.
3. Assemble the "sandwich", take care that the lower edges of glass plates and spacers are well aligned. Otherwise the whole thing will leak when you pour the gel.
4. Prepare 10 % (w/v) ammoniumpersulfate (APS) solution fresh
5. Prepare the separating gel mixture (at least 10 ml per gel when using the 1.5 mm spacers):

	30 % acrylamide	Buffer I	MilliQ
10 % gel	3.3 ml	2.5 ml	4.0 ml
12 % gel	4.0 ml	2.5 ml	3.3 ml
15 % gel	5.0 ml	2.5 ml	2.3 ml
18 % gel	6.0 ml	2.5 ml	1.3 ml

6. Add 100  $\mu$ l of 10 % SDS, 80  $\mu$ l of 10 % APS and 10  $\mu$ l of TEMED
7. Pour the gel leaving ca. 2 cm free from the top of the lower glass plate. Carefully pipette water or water-saturated iso-butanol on top to create smooth top surface.
8. When the separating gel has polymerised, prepare the stacking gel mixture (3.75 % acrylamide):

2.4 ml	MilliQ
1.0 ml	Buffer II
0.5 ml	30 % acrylamide
40 $\mu$ l	10 % SDS
9. Pour the water from the top of the separating gel completely.
10. Add APS and TEMED to stacking gel mix, pour it to the top and insert the comb. Be careful not to introduce air bubbles to the gel. Let it polymerise.
11. Attach the gel sandwich to the electrode assembly. Grease the gasket to prevent leakage. If you are running only one gel, turn the gasket from the other side around and put only the acryl block on that side.
12. Pour running buffer inside the gel assembly. The buffer should cover be in contact with the gel. Let stand for few minutes while preparing the samples to check for leakage. If there is no leakage, fill the outer chamber (tank) with buffer to cover the bottom of the gels.

13. Prepare the samples by mixing one volume of sample and one volume of sample buffer. Heat at 95°C for few minutes and load on the gel.
14. run with 150V for ca. 1 h 20 min.

#### Solutions needed

<b>Buffer I (4x)</b>	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
<b>Buffer II (4x)</b>	0.5 M Tris-HCl pH 6.8
<b>30 % Acrylamide</b>	29.2 % acrylamide 0.8 % bis-acrylamide
<b>Sample buffer (2x)</b>	0.125 M Tris-HCl pH 6.8 20 % glycerol 4 % SDS 2 % $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) 0.02 % bromphenolblue
<b>Running buffer (1x)</b>	25mM Tris 192mM glycine 0.1 % SDS

#### Notes

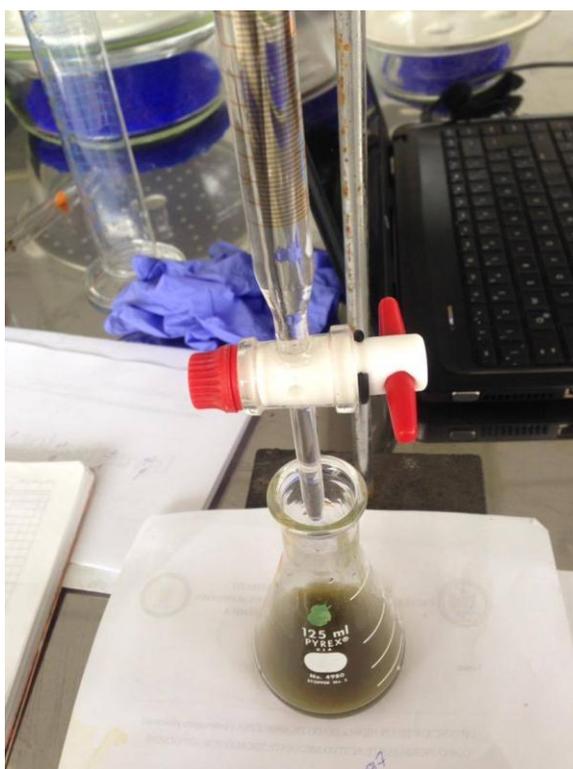
Acrylamide is very toxic and should be handled with care. Wear always gloves and clean any spills etc. immediately. If you have to weight it out, do it in the fume hude as the powder is very light. I would recommend to buy ready made solutions whenever possible to avoid the need to handle the powder.

Prepare the sample buffer without  $\beta$ -ME and add it after thawing new batch from -20°C. For non-reduced samples leave it out. In practice to make 100 ml mix all the components except  $\beta$ -ME and fill the volume to 98 ml. Freeze the solution in 9.8 ml aliquotes. Add 200  $\mu$ l of  $\beta$ -ME before use.

Running buffer can be prepared as 5- or 10-fold stock solution. To make 5 l of 5-fold stock, you will need 75.6 g of Tris base, 360 g of glycine and 25 g of SDS. Do not adjust the pH, it should be correct as is.



**Anexo 1. Tratamientos a diferentes condiciones experimentales.**



**Anexo 2. Titulación de muestra para determinación de nitrógeno amínico.**



**Anexo 3. Reactor en agitación vertical en plancha de calentamiento**



**Anexo 4. Hidrólisis enzimática de Spirulina**



**Anexo 5. Mini Spray Dryer Büchi B-290**



**Anexo 6. Condiciones de Secado por aspersion**



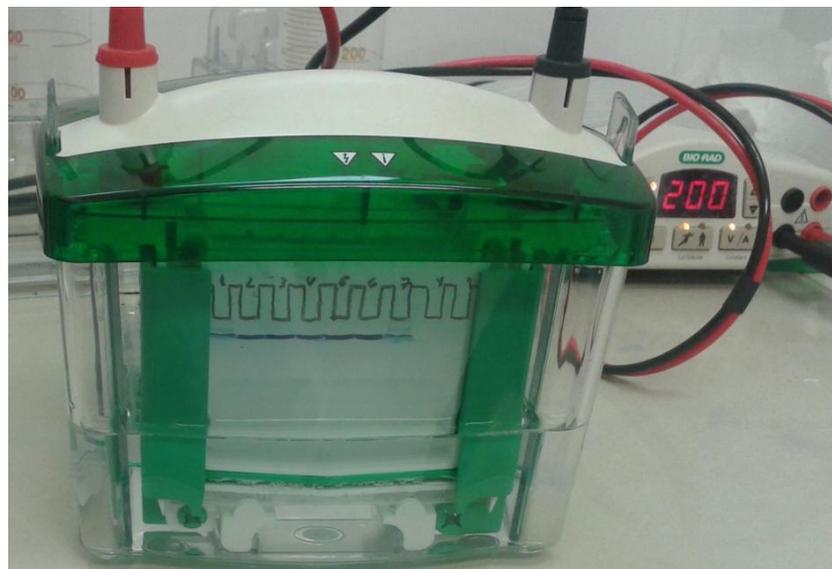
**Anexo 7. Alimentación del hidrolizado de Spirulina al Spray Dryer**



**Anexo 8. Obtención del Polvo de Spirulina hidrolizada**



**Anexo 9. Análisis del hidrolizado mediante RP-HPLC**



**Anexo 10. Electroforesis SDS-PAGE**



**Anexo 11. Spirulina pura en polvo**



**Anexo 12. Hidrolizado de Spirulina en polvo**

Verde Agua	Verde Helado	Verde Saludable	Verde Pastel	Verde Mentolado	Rojo Sonrosado	Colorado Malva Natural	Vinca	Fucsia	Amaranto
Verde Lúcido	Verde Tímido	Verde Fronda	Verde Manzana	Verde Hoja	Fresa	Naranja	Naranja	Rosa Suntuoso	Rubi Brillante
Verde Primavera	Verde Selva	Verde Galicia	Verde Primavera	Verde Primavera	Rojo Cálido	India Magenta Sari	Kenia Fucsia Masai	Rojo Tónico	Nepal Rojo Pashmina
Verde Pasión	Verde Esperanza	Verde Pino			Flor De Brezo	Beso Carmin	Rojo Pasión	Rojo Amapola	Granada
Canario Pálido	Piedra Luna	Pera	Amarillo Frio	Arañillo Limón	Lava	Bermellón	Rojo Quemado	Gules	Flor Eterna
Amarillo Limón	Amarillo Confeti	Suspiro Del Sáhara	Amarillo Espiga	Maíz	Rojo Tomate	Berry	Fuente De Rubí	Magenta	Rojo Tentación
Amarillo Paz	Sorbete De Guayaba	Sahara Arañillo Intermedio	Pirita	Arañillo Canario	Rojo Indio	Rojo Grana	Vino Oscuro	Rojo Carruajes	Rojo Burdeos
Piña	Sahara Amarillo Natural	Amarillo Limón	Lima	Papaya Tierra	Burdeos				
Ojo De Tigre	Caribe Verde Lima	Amarillo Pistacho	Como						

### Anexo 13. Tabla Internacional de Colores.

Fuente: Bruguier, 2015.