

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



OPTIMIZACIÓN DE UN CULTIVO DE *Porphyridium cruentum* PARA OBTENCIÓN DE R-FICOERITRINA Y SU INCORPORACIÓN EN ALIMENTOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

ELIZABETH GARZA VALVERDE

General Escobedo, N. L.

Febrero de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**OPTIMIZACIÓN DE UN CULTIVO DE *Porphyridium cruentum* PARA OBTENCIÓN
DE R-FICOERITRINA Y SU INCORPORACIÓN EN ALIMENTOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

PRESENTA

ELIZABETH GARZA VALVERDE

General Escobedo, N. L.

Febrero de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**OPTIMIZACIÓN DE UN CULTIVO DE *Porphyridium cruentum* PARA OBTENCIÓN
DE R-FICOERITRINA Y SU INCORPORACIÓN EN ALIMENTOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

PRESENTA

ELIZABETH GARZA VALVERDE

General Escobedo, N. L.

Febrero de 2023

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

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

COMITÉ PARTICULAR

Dr. Celestino García Gómez
Director de Tesis

Dr. Guillermo Niño Medina
Co-director

PhD. Juan Antonio Vidales Contreras
Asesor Auxiliar

Dra. Julia Mariana Márquez Reyes
Asesor Auxiliar

Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirector de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios, quien ha forjado mi camino y ha estado conmigo en todo momento, por derramar sus bendiciones sobre mí, llenarme de su fuerza para vencer cualquier obstáculo y así llegar a la culminación de esta etapa.

A mi madre Eva Angelina Valverde Zavala, por ser una mujer excepcional y ayudarme a construir mis sueños, por brindarme todo el esfuerzo, sacrificio, apoyo incondicional en cada momento de mi vida y sobre todo en mis estudios universitarios.

A mis profesores, quienes han aportado sus conocimientos los cuales me permitirán desenvolverme eficientemente en el campo profesional.

A mis compañeros y amigos, con quienes compartí horas de estudio, tareas, prácticas, horas en laboratorio y buenos ratos, son experiencias de vida que no tienen precio.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de Maestría mediante una beca durante mis dos años de superación académica.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, que, por medio de la Facultad de Agronomía, motivó en mí la superación académica científica.

A mi asesor de tesis, el Dr. Celestino García Gómez por permitirme trabajar con él, por compartir conmigo su capacidad y conocimiento científico por varios años, por su infinito apoyo en todo momento, por sus enseñanzas, asesorías, sugerencias y disposición no solamente en este proyecto sino a lo largo de mis estudios. Siempre le agradeceré por compartir su tiempo, dedicación y paciencia en todo momento que necesitaba de su experiencia, lo que lo convierte en una persona digna de admiración por su dedicación profesional y calidez humana.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xx
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	4
1.1.1 Hipótesis General	4
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Microalgas.....	6
2.2.1 <i>Porphyridium cruentum</i>	7
2.2.1.1 Lípidos.....	10
2.2.1.2 Carbohidratos.....	11
2.2.1.3 Ficobiliproteínas	12
2.2.1.4 Ficoeritrina	13
2.2.1.5 Capacidad antioxidante.....	14

2.2.1.6	Métodos de extracción	15
2.2.1.7	Aplicaciones en alimentos.....	16
2.2.1.8	Normatividad de uso.....	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Localización del Estudio.....	19
3.2	Cultivo de Microalgas	20
3.3	Curva Estándar	20
3.4	Composición Bioquímica de <i>Porphyridium cruentum</i>	21
3.4.1	Humedad	21
3.4.2	Cenizas	21
3.4.3	Lípidos.....	22
3.4.3.1	Método gravimétrico para determinar el porcentaje de lípidos	22
3.4.4	Carbohidratos.....	23
3.4.4.1	Curva de calibración de carbohidratos totales.....	23
3.4.4.2	Protocolo para la determinación de carbohidratos totales	24
3.4.4.3	Ecuación para determinar el porcentaje de carbohidratos.....	25
3.4.5	Proteína	26
3.4.5.1	Curva de calibración de proteína.....	26
3.4.5.2	Protocolo para la determinación de proteína	27
3.4.5.3	Ecuación para determinar el porcentaje de proteína	28
3.4.6	Pigmentos	29
3.4.6.1	Ecuaciones para cuantificar pigmentos	29
3.5	Primera Etapa: Producción de Biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	30
3.5.1	Evaluación de Fuentes de Carbono.....	30
3.5.1.1	Sistema con aireación	30
3.5.1.2	Sistema con agitación.....	31
3.5.1.3	Diseño experimental	31
3.5.2	Optimización de un Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	32
3.5.2.1	Cuantificación de R-PE.....	32
3.5.2.2	Diseño experimental	33
3.6	Segunda Etapa: Obtención del Extracto de R-Ficoeritrina.....	35
3.6.1	Optimización de Métodos de Extracción de R-PE.....	35

3.6.1.1	Evaluación de métodos de extracción	35
3.6.1.1.1	Maceración.....	35
3.6.1.1.2	Sonicación.....	36
3.6.1.1.3	Congelación y descongelación.....	36
3.6.1.1.4	Congelación y descongelación.....	36
3.6.1.1.5	Sonicación con incubación	37
3.6.1.1.6	Sonicación con Fosfato de Sodio	37
3.6.1.1.7	Maceración y sonda ultrasónica	38
3.6.1.1.8	Maceración y sonicación	38
3.6.1.1	Selección de métodos de extracción.....	38
3.6.1.2	Cuantificación de PBP	40
3.6.1.4	Diseño Experimental.....	40
3.6.2	Estabilidad de R-PE	42
3.6.2.1	Cuantificación de PBP	42
3.6.2.2	Diseño experimental	42
3.7	Tercera Etapa: Aplicación de <i>Porphyridium cruentum</i> y R-PE en Alimentos	43
3.7.1	Hot Cakes sin Gluten.....	43
3.7.1.1	Humedad.....	44
3.7.1.2	Cenizas	44
3.7.1.3	Pérdida por cocción y pH	45
3.7.1.4	Análisis de perfil de textura	45
3.7.1.5	Medición de color	46
3.7.1.6	Evaluación sensorial	46
3.7.1.7	Diseño experimental	47
3.7.2	Yogur	47
3.7.2.1	Diseño experimental	47
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1	Composición Bioquímica de <i>Porphyridium cruentum</i>	48
4.2	Primera Etapa: Producción de Biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	49
4.2.1	Evaluación de Fuentes de Carbono.....	49
4.2.1.1	Sistema con aireación	49
4.2.1.2	Sistema con agitación.....	52

4.2.2 Optimización de un Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	55
4.3 Segunda etapa: Obtención del Extracto de R-Ficoeritrina	60
4.3.1 Optimización de Métodos de Extracción	60
4.3.1.1 Modelo matemático	60
4.3.1.2 Análisis de varianza.....	61
4.3.1.3 Tratamiento con maceración	62
4.3.1.4 Tratamientos con maceración y baño ultrasónico	66
4.3.1.5 Tratamientos con maceración y sonda ultrasónica.....	66
4.3.2 Estabilidad de R-PE	73
4.3.2.1 pH.....	73
4.3.2.2 Temperatura	75
4.3.2.3 Luz.....	78
4.4 Tercera etapa: Aplicación de <i>Porphyridium cruentum</i> y R-PE en alimentos	80
4.4.1 Hot Cakes sin Gluten.....	80
4.4.2 Yogur	85
5. CONCLUSIONES.....	88
6. BIBLIOGRAFÍA	90
7. ANEXOS	102

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Composición bioquímica de <i>Porphyridium cruentum</i>	9
2 Curva de calibración para la determinación de carbohidratos totales.	25
3 Curva de calibración para la determinación de proteína.	27
4 Rango de niveles de las variables utilizadas para la optimización del cultivo de <i>P. cruentum</i>	34
5 Diseño experimental para los tratamientos utilizados para la optimización del cultivo.	34
6 Rango de niveles de variables utilizadas para la optimización de los métodos de extracción de R-PE.	41
7 Diseño experimental para la optimización de extracciones de R-PE.	41
8 Formulación de hot cakes sin gluten con <i>Porphyridium cruentum</i>	43
9 Composición bioquímica de <i>Porphyridium cruentum</i>	48
10 Valores de respuesta de la optimización del cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	56
11 Análisis de varianza de la optimización de los métodos de extracción de R-PE.	63
12 Rendimiento de R-PE (mg g ⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración.	64

13 Rendimiento de R-PE (mg g ⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración y baño ultrasónico.	67
14 Rendimiento de R-PE (mg g ⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica.	69
15 Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente pH.	75
16 IP de la concentración de R-PE en el ensayo de estabilidad en diferente pH.	75
17 Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferentes temperaturas.	76
18 IP del extracto de R-PE en el ensayo de estabilidad en diferentes temperaturas.	77
19 Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad a pH 7 en 4°C con luz durante 72 h.	79
20 IP del extracto de R-PE en el ensayo de estabilidad a pH 7 en 4°C con luz durante 72 h.	80
21 Propiedades fisicoquímicas de hot cakes sin gluten con <i>Porphyridium cruentum</i>	81
22 Efecto de <i>Porphyridium cruentum</i> en los atributos de textura de hot cakes sin gluten.	83
23 Efecto de <i>Porphyridium cruentum</i> en el color de los hot cakes sin gluten.	84
24 Puntuaciones de la evaluación sensorial de hot cakes sin gluten con <i>Porphyridium cruentum</i>	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Aplicaciones de sustancias bioactivas de <i>Porphyridium</i> spp.....	8
2 Diagrama de las tres etapas de la estrategia experimental.....	19
3 Sistemas para evaluación de fuentes de carbono con: a) Aireación y b) Agitación.	31
4 Tratamientos utilizados en la extracción de R-PE a) Maceración b) Baño ultrasónico y c) Sonda ultrasónica.....	39
5 Concentración de biomasa (g L^{-1}) de <i>P. cruentum</i> en un sistema con aireación con a) Acetato de sodio y b) Bicarbonato de sodio.....	50
6 Concentración de biomasa (g L^{-1}) de <i>P. cruentum</i> en un sistema con aireación con a) Glicerol y b) Glucosa.....	51
7 Concentración de biomasa (g L^{-1}) de <i>P. cruentum</i> en un sistema con agitación con a) acetato de sodio y b) bicarbonato de sodio.....	53
8 Concentración de biomasa (g L^{-1}) de <i>P. cruentum</i> en un sistema con agitación con a) glicerol y b) glucosa.....	54

9	Concentración de biomasa (g L^{-1}) al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.....	57
10	Concentración de R-PE (mg g^{-1} biomasa) al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.	58
11	IP de R-PE al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.	59
12	Extracciones de R-PE de los experimentos realizados para la optimización de métodos.....	60
13	Valores pronosticados versus respuesta real en el tratamiento con maceración: a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP.	65
14	Efecto de la concentración (M) y volumen de buffer (mL) en: a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP con maceración.....	65
15	Valores pronosticados versus la respuesta real en el tratamiento con maceración y baño ultrasónico de a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP.	68
16	Efecto de la concentración (M) y volumen de buffer (mL) en a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP con maceración y baño ultrasónico.....	68
17	Valores pronosticados versus la respuesta real en el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica de a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP.	70
18	Efecto de la concentración (M) y volumen (mL) del buffer en a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP con maceración y sonda ultrasónica.	70

19	Color de R-PE de las 17 cuantificaciones de R-PE en los tratamientos de: a) Maceración, b) Maceración y baño ultrasónico y c) Maceración y sonda ultrasónica.	72
20	Extractos de R-PE en diferente pH: 3, 5, 7 y 9.....	73
21	Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente pH.....	74
22	Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente temperatura.....	77
23	Extracto de R-PE a pH 7 almacenado a 4°C expuesto a luz: a) tiempo inicial y b) 72 h.	78
24	Concentración de R-PE (mg R-PE g ⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en pH 7 almacenado a 4°C con luz durante 72 h.	79
25	Tratamientos de hot cakes sin gluten adicionados con <i>Porphyridium cruentum</i> en: a) masa cruda y b) con cocción.....	81
26	Puntuaciones de la evaluación sensorial de los hot cakes sin gluten con <i>Porphyridium cruentum</i>	85
27	Color de las muestras en yogur comercial, 2 y 4% de R-PE: a) T-0 yogur líquido, b) T-21 yogur líquido, c) T-0 yogur sólido y d) T-21 yogur sólido.	86
28	Cambios de color a) L* y b) a* durante 21 días de almacenamiento a 4°C de las muestras de yogur comercial, 2 y 4% de R-PE en yogur líquido y sólido.	87

ABREVIATURAS

a* Tendencia al rojo

AGP Ácidos grasos poliinsaturados

AOAC Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales

BSA Sero albúmina de bovino

CO₂ Dióxido de carbono

EFSA European Food Safety Authority

et al. y otros

EXP Exopolisacáridos

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

F2 Medio de cultivo

g gramos

GRAS Generalmente reconocido como seguro

L litro

L* Luminosidad

IP Índice de pureza

M molar

mL mililitros

mg miligramos

PBP Ficobiliproteínas

pH Potencial de Hidrógeno

PS Polisacáridos sulfatados

R-PE R-Ficoeritrina

UV/VIS ultravioleta visible

nm nanómetros

°C grados centígrados

RSM Metodología de Superficie de Respuesta

μmol micro mol

m metro

s segundo

RESUMEN

Las microalgas son productos naturales y valiosos para cubrir las necesidades de alimentación. *Porphyridium cruentum* es una microalga roja marina unicelular sin pared celular. La R-Ficoeritrina (R-PE) es un pigmento obtenido a partir de esta y que ha ganado interés como colorante en alimentos. La R-PE con un índice de pureza (IP) superior a 0.7 se considera de calidad alimentaria. Si embargo, debido a que es importante optimizar las condiciones de crecimiento para la producción de biomasa, en este estudio se evaluaron acetato de sodio, glicerol, glucosa y bicarbonato de sodio como fuentes de carbono a 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 g L⁻¹, con aireación y agitación. Para la optimización del cultivo se analizaron los efectos de la concentración de carbono (5, 7.5 y 10 g L⁻¹ de bicarbonato de sodio), pH (6, 7 y 8), tiempo (6, 10 y 14 días) y concentración inicial (0.1, 0.4 y 0.7 g L⁻¹). Se realizaron nueve experimentos en un biorreactor de columna tipo burbuja. En la R-PE se evaluaron tres métodos de extracción y diferentes tiempos de homogenización, concentración y volumen del buffer para encontrar las mejores condiciones para su producción. También se analizó la estabilidad: a la temperatura (20, 40, 60 y 100 °C), pH (3, 5, 7 y 9), y exposición a la luz (79 μmol m⁻² s⁻¹). Cuando se buscó aplicar la microalga en alimentos se utilizó en hot cakes sin gluten y el pigmento se agregó a un yogur natural comercial para evaluar su estabilidad durante su almacenamiento. En los resultados

obtenidos, el bicarbonato de sodio (10 g L^{-1}) con aireación obtuvo los resultados más altos (4.9 g L^{-1}) en el crecimiento de la biomasa respecto a las otras fuentes de carbono. En la optimización del cultivo, el rendimiento de biomasa fue de 6.75 g L^{-1} , que se obtuvo con 5 g L^{-1} de bicarbonato de sodio, pH 8 y una concentración inicial de 0.7 g L^{-1} ; el rendimiento de la R-PE ($\text{mg R-PE g biomasa}^{-1}$) fue de 0.23 con un IP de 0.88, esto se obtuvo con 5 g L^{-1} de bicarbonato de sodio, pH 7 y una concentración inicial de 0.4 g L^{-1} en 10 días. Las condiciones óptimas para la extracción de R-PE con maceración fueron 10 min de homogenización y 3 mL de buffer 0.1 M, para maceración con baño ultrasónico fue 5 min de homogenización con 3 mL de buffer 0.1 M y para maceración con sonda ultrasónica fueron 7.9 min de homogenización con 5.7 mL de buffer 0.8 M. Por el lado de la R-PE, el extracto tuvo una mayor estabilidad a un pH 7, se observó que en 20 y 40°C se mantuvo el pigmento; pero con luz el color desapareció. En los hot cakes sin gluten, la evaluación sensorial no tuvo diferencias estadísticas significativas (<0.05). Tampoco hubo diferencia en la pérdida por cocción ni en el contenido de humedad (%), pero las cenizas (%) si se incrementaron al aumentar en contenido de microalgas. En la textura de las muestras tampoco se vio diferencia en la elasticidad, cohesividad y resiliencia. Cuando se aplicó R-PE en un producto lácteo, el valor de L^* se mostró estable durante los 21 días de almacenamiento, pero después del día 6 el valor de a^* disminuyó. El uso de esta microalga como ingrediente alimentario es una forma prometedora de enriquecimiento, mientras que la estabilidad del pigmento natural muestra su potencial de comercialización sin necesidad de un método de conservación costoso y como una alternativa factible en la adición de diversos productos.

ABSTRACT

Microalgae are natural and valuable products to cover food needs. *Porphyridium cruentum* is a unicellular red marine microalga without a cell wall. R-Phycoerythrin (R-PE) is a pigment obtained from it and has gained interest as a food coloring. R-PE with a purity index (PI) greater than 0.7 is considered food grade. Because it is important to optimize growth conditions for biomass production, in this study sodium acetate, glycerol, glucose, and sodium bicarbonate were evaluated as carbon sources to 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10 g L⁻¹, with aeration and agitation. For culture optimization, the effects of carbon concentration (5, 7.5 and 10 g L⁻¹ of sodium bicarbonate), pH (6, 7 and 8), time (6, 10 and 14 days) and initial concentration were analyzed (0.1, 0.4 and 0.7 g L⁻¹). Nine experiments were carried out in a bubble column bioreactor. In the R-PE, three extraction methods and different homogenization times, concentration and volume of the buffer were evaluated to find the best conditions for its production. Stability was also analyzed: temperature (20, 40, 60 and 100°C), pH (3, 5, 7 and 9), and exposure to light (79 μmol m⁻² s⁻¹). When it was sought to apply the microalgae to food, it was used in gluten-free pancakes and the pigment was added to a commercial natural yogurt to evaluate its stability during storage. In the results obtained, sodium bicarbonate (10 g L⁻¹) with aeration obtained the highest results (4.9 g L⁻¹) in biomass growth compared to other carbon sources. In the optimization of the

culture, the biomass yield was 6.75 g L^{-1} , which was obtained with 5 g L^{-1} of sodium bicarbonate, pH 8 and an initial concentration of 0.7 g L^{-1} ; the yield of the R-PE ($\text{mg R-PE g biomass}^{-1}$) was 0.23 with an PI of 0.88, this was obtained with 5 g L^{-1} of sodium bicarbonate, pH 7 and an initial concentration of 0.4 g L^{-1} in 10 days. The optimal conditions for the extraction of R-PE with maceration were 10 min of homogenization and 3 mL of 0.1 M buffer, for maceration with an ultrasonic bath it was 5 min of homogenization with 3 mL of 0.1 M buffer and for maceration with an ultrasonic probe it was 7.9 min of homogenization with 5.7 mL of 0.8 M buffer. On the R-PE side, the extract had greater stability at pH 7, it was observed that the pigment was maintained at 20 and 40°C , but with light the color disappeared. In the gluten-free hot cakes, the sensory evaluation did not have significant statistical differences (<0.05). There was also no difference in cooking loss and moisture content (%), but ashes (%) increased with microalgae content. In the texture of the samples, there was no difference in elasticity, cohesiveness and resilience. When R-PE was applied to a dairy product, the L^* value was stable during 21 days of storage, but after day 6 the a^* value decreased. The use of this microalga as a food ingredient is a promising form of enrichment, while the stability of the natural pigment shows its commercialization potential without the need for an expensive preservation method and as a feasible alternative in the addition of various products.

1. INTRODUCCIÓN

El interés por problemas de salud y seguridad en el consumo de alimentos procesados ha aumentado; por lo que las microalgas se han convertido en tendencia como aditivos naturales (Levasseur *et al.*, 2020). Al incorporarlas se pueden obtener beneficios para la salud gracias a sus compuestos bioactivos (Caporgno and Mathys, 2018).

Las microalgas son un grupo de organismos eucarióticos fotosintéticos, se estima que existen más de 50 mil especies (Koutra *et al.*, 2018; Morales *et al.*, 2021). En los últimos años, el interés por su cultivo ha aumentado al reconocer que su tasa de crecimiento es rápida (Kumar *et al.*, 2021). Sus células poseen un porcentaje alto de proteínas, carbohidratos, antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados (AGP), los cuales pueden utilizarse como materia prima para productos saludables, productos farmacéuticos y cosméticos (Xu *et al.*, 2021). Sin embargo, su uso en humanos se reduce a pocas especies por las normas de seguridad alimentarias (Rendón *et al.*, 2013). La inversión de tiempo y dinero para obtener la certificación de GRAS (generalmente reconocido como seguro), hace que muy pocas especies la tengan. En Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) reconoció a la *Porphyridium cruentum* como GRAS (Enzing *et al.*, 2014).

Porphyridium cruentum es una microalga roja marina fotoautotrófica típica que puede sintetizar compuestos bioactivos (Huang *et al.*, 2021). Ha sido objeto de estudio por su capacidad de producir ficobiliproteínas (PBP) y AGP (Erol *et al.*, 2020). Además, logra producir constantemente importantes cantidades de polisacáridos sulfatados (PS) que forman cápsulas alrededor de las células como defensa de los cambios de pH, temperatura, salinidad y luz (Han *et al.*, 2020). Estos PS son una sustancia favorable para la salud y posee propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales (Huang *et al.*, 2021). El interés hacia esta especie ha ido en aumento por la extracción de R-PE, la cual se usa purificada como biomarcador fluorescente (Tran *et al.*, 2019).

La atención hacia los colorantes naturales ha cobrado fuerza, tanto para su uso en alimentos como en productos farmacéuticos, esto debido a la preocupación por mantener la salud y por la inseguridad de los colorantes artificiales. Generalmente, estos últimos son estables a la luz, calor y pH, pero los naturales no (Zhang *et al.*, 2020). Debido a que los consumidores se sienten inseguros con los colorantes sintéticos, surge la necesidad de reemplazarlos en los productos alimentarios. Sin embargo, la inestabilidad de los pigmentos naturales limita su uso a nivel industrial (García *et al.*, 2021).

La R-PE es una proteína que se obtiene de las algas con un alto potencial de mercado por ser un nuevo tipo de colorante natural con alta solubilidad en agua. También se caracteriza por poseer una alta fluorescencia y fotoestabilidad, esto hace que su valor aumente en la biología molecular y médica (Xu *et al.*, 2020). Debido a que la R-PE se encuentra ensamblada en las membranas tilacoides del cloroplasto, el procedimiento

para obtener este pigmento involucra una ruptura celular. Se han probado varios métodos para la extracción del colorante como homogenización a altas presiones, sonicación y molino de bolas (Martínez *et al.*, 2019). Aunque se ha estudiado muy poco sobre la R-PE aplicada directamente en alimentos, se ha tratado de aprovechar este pigmento por su efecto antioxidante y así agregar valor al producto. Un ejemplo de ello, son los productos lácteos, los cuales pueden mejorar sus propiedades nutricionales con extracto de R-PE (García *et al.*, 2021).

Con base a lo anterior, se busca dar un valor agregado a un alimento tradicional mediante la adición de biomasa de *Porphyridium cruentum* y R-PE. La presente investigación se divide en tres etapas principales. Inicialmente se centra en la microalga, tanto en la producción al agregarse una fuente de carbono para su crecimiento, como en la optimización de las condiciones del cultivo para obtener un mayor rendimiento de biomasa. Posteriormente se evaluó la R-PE, su estabilidad en diferentes condiciones y analizar diversos métodos de extracción. En la parte final, se aplicaron la biomasa y el pigmento en un alimento, hot cakes sin gluten y yogur respectivamente.

1.1 Hipótesis

1.1.1 Hipótesis General

La incorporación de biomasa de *Porphyridium cruentum* y R-PE da un valor agregado a un alimento tradicional.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Optimizar el crecimiento de *Porphyridium cruentum* y la extracción de R-PE para su incorporación en alimentos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Optimizar el crecimiento de biomasa de *Porphyridium cruentum* con diferente fuente de carbono, tiempo de crecimiento y pH.
- Estimar la producción de R-PE por diferentes métodos de extracción.
- Analizar la estabilidad de R-PE con diferentes temperaturas, pH y luz.
- Evaluar alimentos modificados con biomasa de *P. cruentum* y R-PE a través de análisis fisicoquímicos y evaluación sensorial.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

Se estima que la población mundial alcanzará 10 mil millones en los próximos 30 años, esto ocasionará una demanda de alimentos con un incremento hasta en un 70%. La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), afirma que la producción mundial de carne se duplicará en el 2050. Esto hará que se busquen nuevas fuentes de alimentos y sistemas alimentarios alternativos. Debido a que el 30% de los recursos terrestres de la tierra están relacionados con la producción ganadera, estos contribuyen a varios problemas ambientales. Aunque las proteínas de origen animal son las más consumidas y mejor balanceadas nutricionalmente, su progresiva demanda no será sostenible (Geadá *et al.*, 2021).

No obstante, en los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de alimentos funcionales, esto se debe a los beneficios que aporta a la salud. Algunas de las razones de la demanda de estos productos es el incremento de los costos del cuidado de la salud, el mejorar la calidad de vida y el deseo de las personas mayores de mejorar su bienestar (Plaza *et al.*, 2009). Recientemente, el mercado de los productos libres de gluten ha crecido debido al aumento de patologías relacionadas con la ingesta de esta proteína, denominada alergia al trigo o enfermedad celíaca, la

que a su vez se combina con la idea de que los productos libres de gluten se asocian con un estilo de vida saludable (Khemiri *et al.*, 2020). La enfermedad celíaca es un desorden autoinmune crónico, cuyos síntomas son el resultado de la ingestión de la proteína más importante del trigo. Esto origina un proceso inflamatorio crónico en el intestino delgado (Parada & Araya, 2010).

Como posible solución a este padecimiento, se ha buscado la forma de obtener proteínas para fines alimentarios por medio de microorganismos. En algunos países se cultivan comercialmente varias especies de microalgas y la biomasa obtenida se ha usado para aplicación en alimentos. El mercado de alimentos funcionales, donde se utilizan microalgas en pastas, panes, yogures y bebidas se ha desarrollado de forma rápida en países como Francia, Estados Unidos, China y Tailandia (Figueira *et al.*, 2011). Se ha encontrado a la biomasa de microalgas como una fuente natural de compuestos biológicamente activos como carotenoides, ficobilinas, ácidos grasos, polisacáridos, vitaminas y esteroides (Plaza *et al.*, 2009).

2.2 Microalgas

Se calcula que existen más de 50 000 especies de microalgas, aunque solo se han estudiado cerca de 30 000. (Morales *et al.*, 2021). Estos microorganismos se pueden encontrar como células individuales o en pequeñas colonias; también pueden estar presentes en agua, suelo, aire, microhábitats de corteza de árboles o en algunos animales (Daneshvar *et al.*, 2021). Algunas especies poseen la capacidad de utilizar carbono orgánico, por lo que se pueden dividir en tres tipos de metabolismo:

fotoautotrófico, heterotrófico y mixotrófico (Gaignard *et al.*, 2019). Actualmente, las microalgas se pueden dividir en cuatro áreas de investigación: el tratamiento de aguas residuales, la remoción de CO₂, la producción de biocombustibles y la producción de moléculas de alto valor agregado (Levasseur *et al.*, 2020).

Específicamente, de acuerdo a su clasificación, las algas marinas se pueden dividir en Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta. La Rhodophyta es un organismo marino si flagelo, la mayoría son unicelulares esféricas u ovoides. Estas se clasifican en el grupo de las protistas con plástidos por poseer dos membranas externas, además de que pueden vivir a diversas profundidades, incluso hasta los 250 m (Gaignard *et al.*, 2019). En esta alga predominan las ficobiliproteínas. Esta presenta un pigmento rojo y azul, ficoeritrina y ficocianina respectivamente, además de clorofila a. Además, contiene galactanos sulfatados como la carragenina y agar, los cuales son biopolímeros muy utilizados con aplicación en la industria alimentaria y se consideran oligosacáridos no digeribles. Algunas de las características que poseen es que no son cariogénicos en humanos, poseen propiedades prebióticas, antitumorales, inmunomoduladoras y antioxidantes (Carina *et al.*, 2021).

2.2.1 *Porphyridium cruentum*

Porphyridium spp. es un alga roja unicelular, sus células son esféricas de aproximadamente 8 a 15 µm de tamaño y sin pared celular. Sin embargo, la capa externa de células se encuentra envuelta por una capa de cubierta adhesiva formada por polisacáridos hidrosolubles secretados por las células. En las células de esta alga

se pueden acumular de forma natural importantes cantidades de sustancias de alto valor (Fig. 1) (Li *et al.*, 2019).

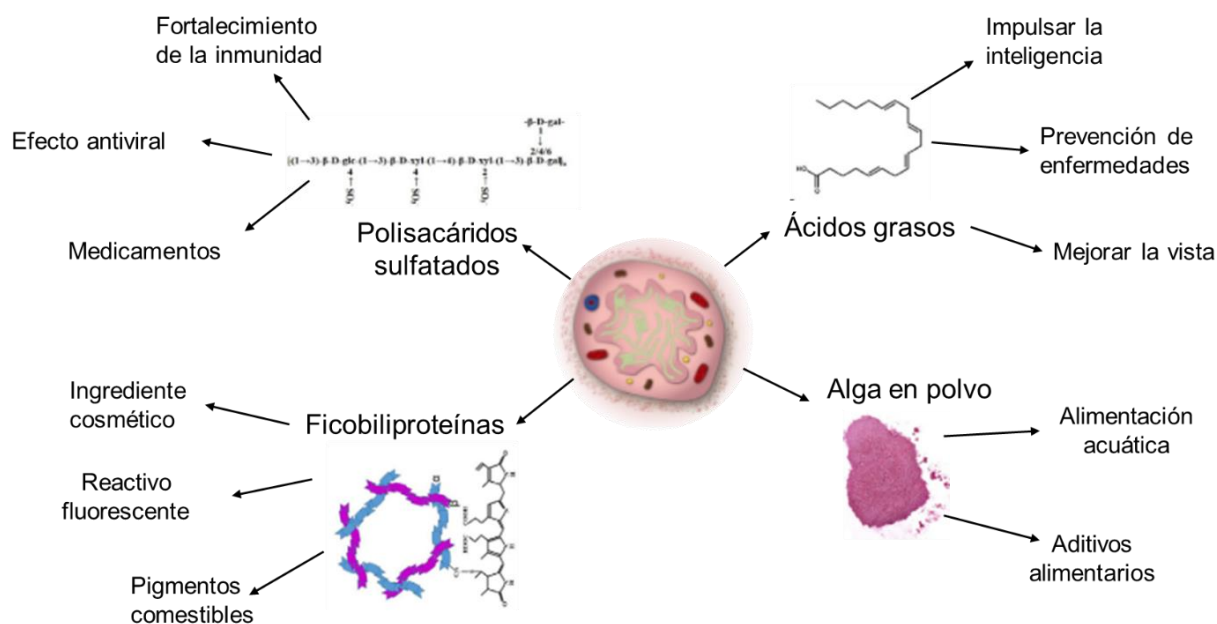


Figura 1. Aplicaciones de sustancias bioactivas de *Porphyridium* spp. (Li *et al.*, 2019).

La microalga roja marina *P. cruentum* puede sintetizar algunos compuestos bioactivos, tales como R-Ficoeritrina (R-PE), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y exopolisacáridos (EPS). Debido a que es una microalga fotoautótrofa típica, su rendimiento se puede controlar con una fuente de luz (Huang *et al.*, 2021). Esta microalga está ganando cada vez más interés, principalmente por la extracción de R-PE, ya que este pigmento proteico es usado mayormente de forma purificada como biomarcador fluorescente (Tran *et al.*, 2019). También se puede cultivar fácilmente en un medio de agua de mar artificial sin necesitar vitamina B12, lo cual es una ventaja

porque es necesaria para la mayoría de otras microalgas rojas (Pulz and Gross, 2004). Esta alga acumula ácido araquidónico, un 36% del total de ácidos grasos; además de cantidades significantes de ácido eicosapentaenoico (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2000). La FDA en Estados Unidos reconoció a la *P. cruentum* como GRAS (Enzing *et al.*, 2014). La composición general de la microalga se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición bioquímica de *Porphyridium cruentum*.

Componentes principales	Contenido, % peso seco
Proteína	33.00
Carbohidratos	35.80
Lípidos	6.70
Cenizas	19.70
Pigmentos	
Ficobiliproteínas	2.00
Clorofilas	0.65
Carotenoides	0.10

(Bermejo-Román *et al.*, 2002).

2.2.1.1 Lípidos

La fuente más común de AGP de cadena larga es el pescado y el aceite que se extrae de este, aunque el pescado adquiere sus AGP de las microalgas. Sin embargo, el ecosistema oceánico también le aporta sustancias químicas tóxicas. Debido a que estos contaminantes son hidrofóbicos, se unen a los almacenes de lípidos de los peces y esto ocasiona la acumulación. Por lo tanto, es conveniente investigar a las microalgas como fuente potencial de AGP ya que se considera una opción económica. La ventaja principal de las microalgas sobre otras fuentes de origen vegetal es la alta productividad fotosintética y el área de la superficie que puede superar diez veces a las plantas terrestres (Kavitha *et al.*, 2016).

Aunque *Porphyridium cruentum* se compone de varios ácidos grasos, los más investigados son el ácido araquidónico (ARA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA). El ARA es de los ácidos que predominan más en el cerebro, por lo que es importante para los bebés y su desarrollo mental. Este también es antecesor de regulaciones del flujo sanguíneo, función de los glóbulos blancos y la activación de plaquetas. El interés de la industria para el ARA proveniente de microalgas es considerable, esto se debe a la escasez e insostenibilidad de sus fuentes tradicionales. Por otro lado, el EPA es favorable para el sistema cardiovascular, limpia las arterias y ayuda en la presión arterial alta. Dependiendo del ambiente, la *Porphyridium* spp. puede producir grandes cantidades de ARA y EPA, se puede alcanzar hasta 211.47 mg L⁻¹ según lo reportado (Li *et al.*, 2019).

2.2.1.2 Carbohidratos

Las microalgas marinas rojas carecen de una pared celular. Estas se encuentran dentro de una capa de polisacáridos vinculados a fracciones proteicas, los cuales son de alto peso molecular, de 8.10^5 a 26.10^5 g mol⁻¹, y generalmente están conformados por xilosa, una pentosa y cuatro hexosas. Entre un 6 y 10% están sulfatados (Soanen *et al.*, 2016). Estos polisacáridos (PS) provenientes de microalgas se consideran como un compuesto natural valioso y de interés comercial (Han *et al.*, 2021).

En la *P. cruentum* se puede encontrar un polisacárido conformado por 10 tipos de azúcares, entre los que más predominan están la xilosa, galactosa y glucosa (Li *et al.*, 2019). La principal ventaja de esta microalga es que continuamente produce grandes cantidades de PS y la recolección es muy fácil, ya que no requiere destrucción celular. La producción y el rendimiento supera a otras fuentes naturales como hongos, mamíferos y macroalgas. Por otro lado, la recolección de PS es un reto al contar con una microalga de 2 a 5 μm de diámetro. Si se aplica una sedimentación simple es difícil obtener buenos resultados, por lo que es necesario aplicar procesos de separación adicionales, pero al consumir energía incrementan el costo (Han *et al.*, 2021).

El uso potencial de los polisacáridos sulfatados en el área de la medicina, el cuidado de la piel y en aplicaciones en alimentos ha recibido mucho interés. Se han explorado diferentes métodos para la separación y purificación de polisacáridos como diálisis, precipitación con disolventes y membranas (Li *et al.*, 2019). Aunque es poco lo que se ha investigado con la *P. cruentum*, se señalan a los PS con un gran potencial para reducir las enfermedades coronarias (Raposo *et al.*, 2015).

2.2.1.3 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas (PBP) son subunidades de proteínas y bilinas como su grupo prostético. Frecuentemente se encuentran en cianobacterias y microorganismos fotosintéticos eucarióticos y actúan como antenas captadoras de luz al usar su grupo prostético de tetrapirroles lineales (Montoya *et al.*, 2021). En las algas rojas, las PBP se localizan como ficobilisomas en el lado estromal de las membranas tilacoides en un cloroplasto, estas tienen un papel importante de captura de luz en la fotosíntesis (Miyabe *et al.*, 2016). Las PBP de la *Rhodophyta* están conformadas por cuatro proteínas: PE (Ficoeritrina), PC (Ficocianina), PEC (Ficoeritrocianina) y APC (Aloficocianina), las cuales absorben luz a una longitud de onda entre 490 y 650 nm. Sin embargo, en este rango, la clorofila a y los carotenoides son escasos (Gaignard *et al.*, 2019). Estas también se pueden clasificar en base a su tamaño molecular: PE de 250 kDa, APC de 105 kDa, PEC de 70 kDa y PC de 30 kDa (Balaraman *et al.*, 2021).

Los pigmentos azules (PC y APC) y fucsias (PE) que son solubles en agua, son productos valiosos con diversas aplicaciones comerciales. Estos se utilizan como colorantes naturales en cosméticos o en sondas fluorescentes (APC y PE). Los extractos acuosos de PC y APC provenientes de *Arthrospira platensis* son aprobados por la EFSA (European Food Safety Authority) como colorante en alimentos. Mientras que la FDA en Estados Unidos clasifica a la PC como colorante natural para alimentos. Por otro lado, se ha reportado la actividad antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectora, anticancerígena e inmunomoduladora de las PBP. Sin embargo, el

valor comercial de estas depende mayormente de su grado de pureza, el cual se evalúa por la relación entre el valor de absorbancia máxima de PBP: 540-570 nm para PE, 615-620 nm para PC, 650 nm para APC, y 280 nm que se relaciona a la cantidad total de proteínas detectables en el producto (Lauceri *et al.*, 2019). Visualmente la PE es roja, la PC va de un rango de púrpura (PEC, R-PC) a azul profundo (C-PC) y las APC son azul con un poco de verde (Silva *et al.*, 2009). Si la PBP tiene una pureza superior a 0.7 se considera de calidad alimentaria debido a su no toxicidad y naturaleza no cancerígena, si es mayor a 1.5 es de grado cosmético, si supera 3.9 es grado reactivo y si es por encima de 4.0 es grado analítico (Lauceri *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2020).

A pesar de que las PBP se pueden degradar de forma natural, con calor, exposición a la luz y pH, pueden ser más inestables que otros pigmentos. Por lo que la aplicación en alimentos depende principalmente de su estabilidad a las condiciones naturales, vida útil y compatibilidad con otros ingredientes. Generalmente, las PBPs muestran ser estables hasta 60°C y en un rango de pH de 3.5 a 9.5, por lo que son condiciones propicias para su aplicación en el área de cosméticos y colorantes de alimentos naturales (Pereira *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021).

2.2.1.4 Ficoeritrina

La ficoeritrina (PE) es una proteína que se encuentra abundantemente en *Porphyra* sp. y representa del 1.3 a 1.5% de la biomasa seca. Esta molécula es soluble en agua y también fluorescente, además de pertenecer a la familia de las ficobiliproteínas

(PBP). La PE posee una buena estabilidad en un pH de 3 a 10, pero un tratamiento encima de 40°C reduce notablemente la intensidad del color (Simovic *et al.*, 2022). Esta proteína posee un coeficiente de absorción molar cercano a $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y un rendimiento cuántico cerca de 0.8, lo que la hace una molécula de alta sensibilidad. Además, muestra una fluorescencia intensa y propiedades ópticas adecuadas para usarse en técnicas tridimensionales de imágenes moleculares (Fleurence, 2003).

La PE se encuentra en algunas cianobacterias unicelulares que viven en ciertas condiciones de luz, generalmente en algas rojas. Estas muestran una fuerte absorción en la región verde del espectro visible de 480 nm a 570 nm y una emisión de fluorescencia densa a 575 nm aproximadamente. Se pueden clasificar según los espectros de absorción, en tres subgrupos: B-PE (B-ficoeritrina) con un pico máximo de absorción a 545 nm y hombro a 495 nm, R-PE (R-ficoeritrina) con picos máximos de absorción a 565, 545 y 495 nm, mientras que C-PE (C-ficoeritrina) tiene picos máximos de absorción a 563 o 543 y 492 nm (Li *et al.*, 2020). Otra clasificación es según la fuente de la PE, donde “B” es para *Bangiales*, “R” para *Rhodophyta* y “C” para *Cyanobacteria* (Mittal *et al.*, 2017).

La PE es utilizada como biomarcador fluorescente en inmunología, biología celular y molecular, citometría de flujo, microscopía, inmunoquímica y reactivos biomédicos (Marcati *et al.*, 2014; Munier *et al.*, 2015).

2.2.1.5 Capacidad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son las causantes del daño a biomoléculas. Por lo general, el nivel de ROS dentro del cuerpo se controla por un sistema antioxidante. El incremento de este nivel puede ocasionar envejecimiento, cáncer, anomalías cardiovasculares y neurodegenerativas. Sin embargo, existen antioxidantes como el ácido ascórbico y el tocoferol que pueden retrasar que el envejecimiento comience. Se ha encontrado que varias PBP poseen actividad antioxidante. Cuando las PBP provienen de diferentes orígenes, sus propiedades bioquímicas son distintas por la variación de la secuencia de sus aminoácidos. Por ejemplo, se ha analizado el efecto antienvjecimiento de *Phormidium* sp., *Leptolyngbya* sp. y *Synechococcus* sp. (Patel *et al.*, 2018).

La PE está captando la atención como antioxidante, medicamento antiinflamatorio, protección contra los cambios fisiológicos bajo estrés oxidativo e importantes efectos contra el envejecimiento. También se caracteriza por tener menos efectos secundarios que una droga química (García *et al.*, 2021). La R-PE ha mostrado efectos anticancerígenos e inmunomoduladores, los cuales se originan en los cromóforos al unirse covalentemente (Simovic *et al.*, 2022).

2.2.1.6 Métodos de extracción

Las PBPs se pueden extraer solo colocando las algas en agua por varios días, esto ocurre por choque osmótico, pero las desventajas son que lleva mucho tiempo y ocurre una degradación parcial de la R-PE por las proteasas. La mayoría de los procedimientos para la extracción se basa en la ruptura de la pared celular (Fleurence,

2003). Debido a que los métodos implican ruptura de las membranas celulares y cloroplásticas, se han estudiado varias técnicas como la homogenización a altas presiones, la sonicación o molino de cuentas (Martínez *et al.*, 2019).

La R-PE se puede purificar de forma convencional con cromatografía o filtración en gel. Sin embargo, estos métodos tienen dificultades y costo excesivo a gran escala, por lo que un método basado en membranas es una alternativa para la purificación, es decir, la ultrafiltración (Mittal *et al.*, 2020). Algunas técnicas reportadas para la purificación con cromatografía son: adsorción en lecho expandido, intercambio iónico, filtración en gel, hidroxapatita, combinación de dos modos o electroforesis preparativa. Pero lo que no es claro, es que permanezca la configuración natural de la R-PE y sin ningún daño estructural serio que cause algún cambio en su conformación y función (Munier *et al.*, 2014). Sin embargo, si se desarrollan métodos de extracción como los procesos enzimáticos, esto podría disminuir el costo económico para la obtención de R-PE. La hidrólisis enzimática de la pared celular es un método competente para la extracción de proteínas de alto valor, sin que ocurra una desnaturalización (Fleurence, 2003).

2.2.1.7 Aplicaciones en alimentos

La R-PE tiene un gran potencial para utilizarse en la fortificación y coloración de los alimentos, esto se debe a los beneficios que aporta a la salud, su brillante fluorescencia, color vivo y la gran necesidad de reemplazar a los colorantes sintéticos. Por lo que se ha comenzado a utilizar como colorante alimentario en Asia (Simovic *et al.*, 2022). La aplicación en alimento de la R-PE es limitada por su baja estabilidad, ya

que sus moléculas son inestables a la luz, pH bajo, fuerzas iónicas fuertes, temperaturas altas y presencia de alcoholes. Sin embargo, se ha encontrado que el uso de aditivos como la glucosa o el ácido cítrico puede mejorar la estabilidad, preservar sus propiedades durante el procesamiento de alimentos y aumentar la vida útil (Hsieh-Lo *et al.*, 2019).

Algunas aplicaciones en alimentos de PBP son postres de gelatina, puddings, masa madre, bebidas lácteas y refrescos, pero tomando en cuenta que se necesita comprobar su uso con pruebas de toxicidad. En Europa no existe una autorización para usar B-PE como colorante o aditivo alimentario; pero, en Francia y Asia, C-PC extraída de Spirulina es autorizada para usarse en alimentos como helados, caramelos y bebidas. Por lo tanto, se necesita que en un futuro exista una mayor investigación enfocada en la interacción de PBPs con alimentos, estabilizadores y su biodisponibilidad (Pereira *et al.*, 2020).

Actualmente, la tendencia es impulsar la búsqueda de alternativas naturales para alejarse de los aditivos artificiales y así reemplazar los compuestos sintéticos. Desafortunadamente, los colorantes naturales son químicamente más inestables. Estos muestran una gran sensibilidad al calor, pH, luz, oxígeno y condiciones de procesamiento (Pereira *et al.*, 2020).

2.2.1.8 Normatividad de uso

La normativa en Europa sobre los nuevos alimentos, la seguridad alimentaria y las declaraciones de propiedades nutricionales perjudican la comercialización de los

productos a base de microalgas. Se debe evaluar la seguridad de las microalgas antes de su comercialización, pero los requisitos reglamentarios llegan a retrasar su entrada al mercado debido a los largos y costosos procesos de autorización (Geada *et al.*, 2021).

Debido a que las algas pueden acumular metales tóxicos como arsénico, plomo, mercurio, etc., Francia es el único país europeo que ha señalado regulaciones de 24 algas marinas, así como la cantidad máxima de metales tóxicos cuando se usan para consumo humano. El Reglamento de la Comisión Europea, que son las leyes vigentes en la Unión Europea, considera el uso de algas marinas como complemento alimenticio y permite un máximo de cadmio de 3 mg kg^{-1} de peso seco, mientras que el nivel máximo de arsénico en piensos y alimentos es hasta 40 y 10 mg kg^{-1} respectivamente. Sin embargo, para otros metales tóxicos no hay una legislación vigente. Esta falta de legislación ocurre en países asiáticos, Estados Unidos y América del Sur (Carina *et al.*, 2021).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

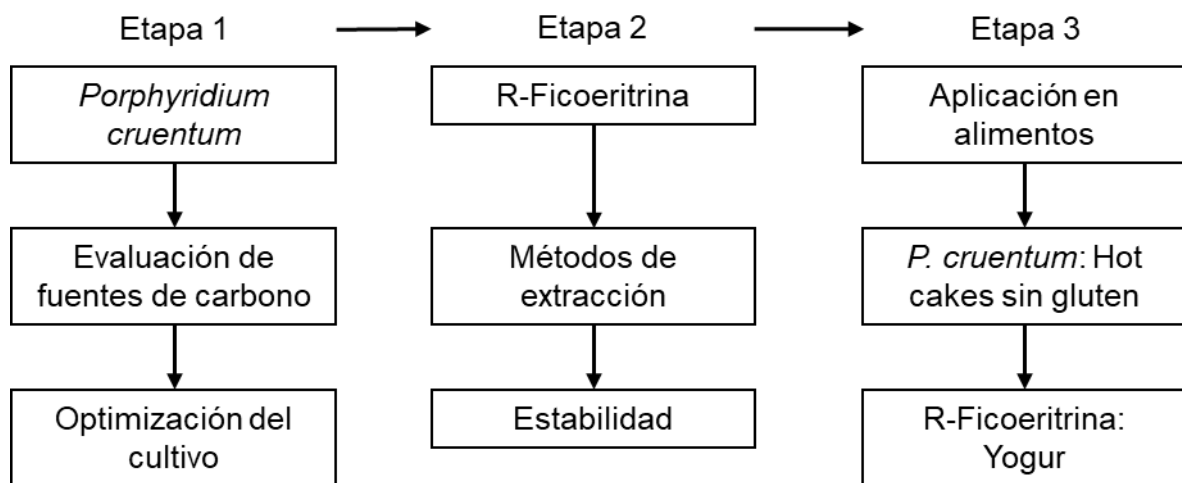


Figura 2. Diagrama de las tres etapas de la estrategia experimental.

3.1 Localización del Estudio

La investigación se realizó en la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León, México. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Aguas, Suelos y Plantas durante el periodo enero 2021 a diciembre 2022.

3.2 Cultivo de Microalgas

En este estudio se utilizó la microalga roja marina *Porphyridium cruentum*. El cultivo se preservó a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, se utilizó Medio F2 modificado como medio nutriente (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) y se ajustó el pH a 8. Se mantuvo el cultivo líquido estéril a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo aireación continua y con una iluminación intermitente de 12 h luz con una intensidad de $180\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Cuando la cepa alcanzó la fase estacionaria, se utilizó para la experimentación. El crecimiento de microalgas se evaluó mediante mediciones de densidad óptica a 680 nm usando un espectrofotómetro UV/vis (Thermo Scientific, China).

3.3 Curva Estándar

La biomasa se estimó a partir de la curva estándar construida en base a Abs_{680} vs masa seca. Para elaborar la curva estándar se tomó la lectura inicial de la cepa a una longitud de onda de 680 nm. Posteriormente se utilizó la siguiente ecuación (Ec. 1) para obtener la cantidad de medio microalgal y aforar con agua destilada.

$$V\ (\text{mL}) = \frac{(\text{Std})(\text{Volumen matraz})}{\text{Abs}} \quad (1)$$

Se aforaron matraces en estándar de 1, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 para después medir la absorbancia de cada uno. A continuación, se filtró 10 mL de cada uno de los matraces con filtros de microfibras de vidrio prepesados y con un tamaño de poro de $1.2\ \mu\text{m}$. Los filtros se secaron a 100°C durante 4 h y se enfriaron en un desecador hasta obtener

peso constante. La biomasa seca por volumen se calculó dividiendo la diferencia entre el peso del filtro seco, después y antes de la filtración, por el volumen filtrado. La curva estándar se representó con la absorbancia a 680 nm frente a la biomasa seca correspondiente*. Finalmente, con la ecuación obtenida se calculó la biomasa seca (Kumaran *et al.*, 2021).

3.4 Composición Bioquímica de *Porphyridium cruentum*

3.4.1 Humedad

El contenido de humedad se analizó por gravimetría. Se colocaron 3 g de la muestra en un crisol previamente pesado y a peso constante. Posteriormente se llevó a la estufa a 105°C por 12 h. Al terminar el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó de nuevo para obtener el peso final* (Diprat *et al.*, 2020). Se calculó con la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 - P_2)}{m} (100) \quad (2)$$

Donde:

P₁=Peso del crisol más muestra.

P₂=Peso del crisol más muestra seca.

m= Peso de la muestra.

3.4.2 Cenizas

Para determinar las cenizas se colocó el crisol en la estufa de secado a 105°C a peso constante, luego se llevó a un desecador y se dejó enfriar para posteriormente registrar el peso y número de crisol. Se agregó 1 g de muestra y se pesó nuevamente. El crisol se metió a la mufla a 550°C por 3 h y se dejó enfriar en el desecador y se registró el peso final*. Para calcular las cenizas de la muestra en porcentaje según el método 923.03 de la A.O.A.C. (Duarte *et al.*, 2019) se utilizó la siguiente ecuación (Ec. 3):

$$\%Cenizas = \frac{\text{Peso final de crisol} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{Peso muestra}} (100) \quad (3)$$

3.4.3 Lípidos

Para la extracción de lípidos de microalgas se utilizó el método de Bligh y Dyer (1959). Se pesó 0.1 g de microalga liofilizada y se colocó en un tubo falcon con 6 mL de cloroformo y 3 mL de etanol. Posteriormente se puso en un sonicador por 30 min y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 5°C. En crisoles, a peso constante y previamente pesados se colocó el sobrenadante para después introducirlos a una estufa de secado a 70°C. Cuando transcurrieron las 24 h y se evaporó el sobrenadante, se dejó enfriar en desecador y se registró el peso final*.

3.4.3.1 Método gravimétrico para determinar el porcentaje de lípidos

Por diferencia de pesos se cuantifica el porcentaje de lípidos (%) (Ec. 4) y la productividad lipídica (mg L⁻¹ d⁻¹) (Ec. 5) con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Contenido lipídico (\%)} = \frac{W_L}{W_A} 100\% \quad (4)$$

$$\text{Productividad lipídica} = \frac{W_A \times \text{Contenido lipídico}}{\text{Volumen (L)} \times \text{tiempo (d)}} \quad (5)$$

Donde:

W_L es el peso del extracto lipídico.

W_A es el peso de la biomasa seca.

3.4.4 Carbohidratos

Para determinar el contenido de carbohidratos se utilizó el método colorimétrico de la antrona (Yemm and Willis, 1954; Parsons *et al.*, 1984), donde el H_2SO_4 hidroliza los enlaces glucosídicos y la antrona reacciona con el monosacárido que resulta para producir un producto con color. Este método mide solamente los carbohidratos totales y destruye el biopolímero en el proceso de hidrólisis.

3.4.4.1 Curva de calibración de carbohidratos totales

La curva de calibración se obtuvo utilizando un gradiente de concentraciones de glucosa anhidra preparada a partir de una solución de $120 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se utilizaron concentraciones de 0, 12, 36, 60, 84 y $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ para la curva de calibración y a cada concentración se le dio el mismo tratamiento que a las muestras (Cuadro 2). Todas las diluciones se prepararon por triplicado.

3.4.4.2 Protocolo para la determinación de carbohidratos totales

Se preparó una solución de antrona (CAS 90-44-8, Sigma-Aldrich) al 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Esta solución es estable por 12 h y se almacenó en oscuridad. En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 mL de H₂O destilada y 0.5 mL de la muestra ya diluida. Después de enfriar por 10 min se le agregó 4 mL de la solución de antrona, pero cuidando de inclinar el tubo y que baje lentamente. El reactivo debe estratificar y aparecer una capa inferior amarilla y una superior blanca lechosa, si en el tubo apareció un color verde o no hubo separación de las capas, éste se debe descartar. El tubo se tapó y se metió a un baño de hielo por 5 min. Posterior a este tiempo, se agitó el tubo de manera que se mezclaran perfectamente las dos capas y adquiriera un color amarillo homogéneo. Se debe eliminar el tubo que se torne verde. El tubo con la muestra y la solución se colocó en baño María 10 min a 100°C, pero para evitar la evaporación se tapó. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente para leer a 640 nm*.

Cuadro 2. Curva de calibración para la determinación de carbohidratos totales.

Concentración de glucosa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solución de glucosa a $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μL)	H ₂ O destilada (μL)
0	0	1000
12	100	900
36	300	700
60	500	500
84	700	300
120	1000	0

3.4.4.3 Ecuación para determinar el porcentaje de carbohidratos

Los cálculos para obtener el contenido relativo (% de peso seco) se realizan considerando el peso de la muestra de microalga liofilizada, volumen total del extracto ácido, volumen del extracto ácido utilizado y la ecuación de la recta de calibración (Arredondo & Voltolina, 2017). La ecuación para cuantificación es la siguiente (Ec. 6):

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\left[\frac{(m \times Abs_{640nm})}{V_m} \right] V_E}{P_s} 100 \quad (6)$$

Donde:

P_s es el peso seco (mg)

V_E es el volumen del extracto ácido (mL)

V_m es el volumen de la muestra (mL)

m es la pendiente de la curva de calibración

Abs es la absorbancia a 640 nm

3.4.5 Proteína

La cuantificación de proteína total se llevó a cabo utilizando el método de Bradford (6104-59-2, Sigma Aldrich) (1976). El método se basa en la unión del colorante azul brillante (Coomasie G-250) a los residuos básicos y aromáticos de esta, lo que da como resultado un complejo con color, cuyo pico máximo de absorbancia es a una longitud de onda de 595 nm, en la cual se realizan las lecturas.

3.4.5.1 Curva de calibración de proteína

La curva de calibración se preparó con una solución concentrada de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albúmina de suero bovino (BSA) (9048-46-8, Sigma-Aldrich) a partir de la cual se prepara un gradiente de concentración de 0 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Curva de calibración para la determinación de proteína.

Concentración de BSA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volumen BSA ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) (μg)	Volumen H ₂ O destilada (μL)
0	0	1000
15	50	950
30	100	900
45	150	850
60	200	800
75	250	750
90	300	700
105	350	650
120	400	600
135	450	550
150	500	500

3.4.5.2 Protocolo para la determinación de proteína

Para la extracción de la muestra se tomaron 5 mL de *Porphyridium cruentum* directamente del cultivo y se concentró la biomasa en filtros de fibra de vidrio GF de 47 mm de diámetro. El filtro se dobló y se colocó en un tubo de vidrio limpio. Se agregó 1 mL de NaOH 1 N y se maceró con varilla de vidrio y se agregaron los 4 mL de NaOH restantes lavando la extremidad de la varilla. Se tapó la boca del tubo. Se sometió a una hidrólisis alcalina la muestra en baño maría a 100°C por 60 min. Transcurrido el tiempo se retiraron los tubos y se dejaron enfriar. Se centrifugaron (Civeq 80-2,

Velaquin) las muestras a 4000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (Lowry *et al.*, 1951).

Para preparar el reactivo Bradford se disolvieron 20 mg de azul de Coomasie G-250 en 10 mL de etanol al 96% y 20 mL de ácido fosfórico al 85%, se aforó hasta 200 mL con H₂O destilada. Se tomó 1 mL del extracto de la muestra y se colocó en un tubo de vidrio limpio para agregar 5 mL del reactivo. Se dejó en reposo en oscuridad por 5 min y se leyó la absorbancia a 595 nm* (Arredondo & Voltolina, 2017).

3.4.5.3 Ecuación para determinar el porcentaje de proteína

Los cálculos para obtener el % de proteína total se realizan considerando la siguiente ecuación propuesta por Arredondo & Voltolina (2017) (Ec. 7):

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\left[\frac{(m \times \text{Abs}_{595 \text{ nm}})}{V_m} \right] V_E}{P_s} 100 \quad (7)$$

Donde:

P_s es el peso seco (mg)

V_E es el volumen del extracto alcalino (mL)

V_m es el volumen de la muestra (mL)

m es la pendiente de la curva de calibración

Abs es la absorbancia a 595 nm

3.4.6 Pigmentos

Para la extracción de pigmentos liposolubles se utilizaron 10 mL del cultivo de microalgas y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se suspendió la biomasa en 10 mL de agua destilada con la finalidad de remover las sales. Posteriormente se agitó en el vórtex 15 s y se centrifugó para desechar el sobrenadante. El pellet fue suspendido en 10 mL de acetona al 90% y se agitó por 15 s. La mezcla se almacenó a 4°C por 24 h en oscuridad. Finalmente se centrifugó a 4000 rpm por 15 min y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro UV-vis a 510, 630, 664 y 480 nm* usando acetona al 90% como blanco (Jeffrey and Humphrey, 1975; Humphrey, 1979; Strickland and Parsons, 1972).

3.4.6.1 Ecuaciones para cuantificar pigmentos

Para cuantificar la concentración de las clorofilas se utilizan las ecuaciones señaladas por Jeffrey and Humphrey, 1975 (Ec. 8) y Humphrey, 1979 (Ec. 9), mientras que para los carotenoides se usan las ecuaciones de Strickland and Parsons, 1972 (Ec. 10).

$$\text{Clorofila } a = 11.47 * A_{664} - 0.4 * A_{630} \quad (8)$$

$$\text{Clorofilas } c_1 + c_2 = 24.36 * A_{630} - 3.73 A_{664} \quad (9)$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6(A_{480} - 1.49A_{510}) \quad (10)$$

*Para todos los análisis, las mediciones se realizaron por triplicado.

La experimentación constó de tres etapas principales que se detallan en la Figura 2. La primera etapa se centró en la microalga *Porphyridium cruentum*, posteriormente siguió el pigmento R-PE y finalmente la aplicación en alimentos para cada uno. Para todos los análisis realizados en las etapas, las mediciones se realizaron por triplicado.

3.5 Primera Etapa: Producción de Biomasa de *Porphyridium cruentum*

3.5.1 Evaluación de Fuentes de Carbono

Para la evaluación del efecto de fuentes de carbono como acetato de sodio, bicarbonato de sodio, glicerol y glucosa a diferentes concentraciones en el crecimiento de la biomasa de la microalga *Porphyridium cruentum*, se utilizó un sistema con aireación y otro con agitación.

3.5.1.1 Sistema con aireación

La microalga se cultivó en botellas de vidrio de 500 mL a temperatura ambiente, flujo de aire de $3.2 \text{ cm}^3 \text{ seg}^{-1}$, iluminación artificial de $420 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con una concentración inicial de 0.3 g L^{-1} , fotoperiodo de 12 h, medio de cultivo F2 modificado y un volumen final de 250 mL (Figura 3a). Se agregaron diferentes concentraciones de glicerol, glucosa, bicarbonato de sodio y acetato de sodio (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 g L^{-1}). Se midió el pH inicial y final, además de la absorbancia cada dos días con una longitud de onda de 680 nm, los experimentos tuvieron una duración de 14 días.

3.5.1.2 Sistema con agitación

Para la experimentación con agitación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL en una incubadora de agitación orbital NB-60C, con una velocidad de 140 rpm, 25°C, fotoperiodo de 12 h y una iluminación de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3b). La concentración inicial fue de 0.3 g L^{-1} , medio de cultivo F2 modificado y un volumen final de 150 mL. Se agregaron diferentes concentraciones de acetato de sodio, bicarbonato de sodio, glicerol y glucosa ($0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5$ y 10 g L^{-1}). Se midió el pH inicial y final, además de la absorbancia cada dos días con una longitud de onda de 680 nm, los experimentos tuvieron una duración de 14 días.

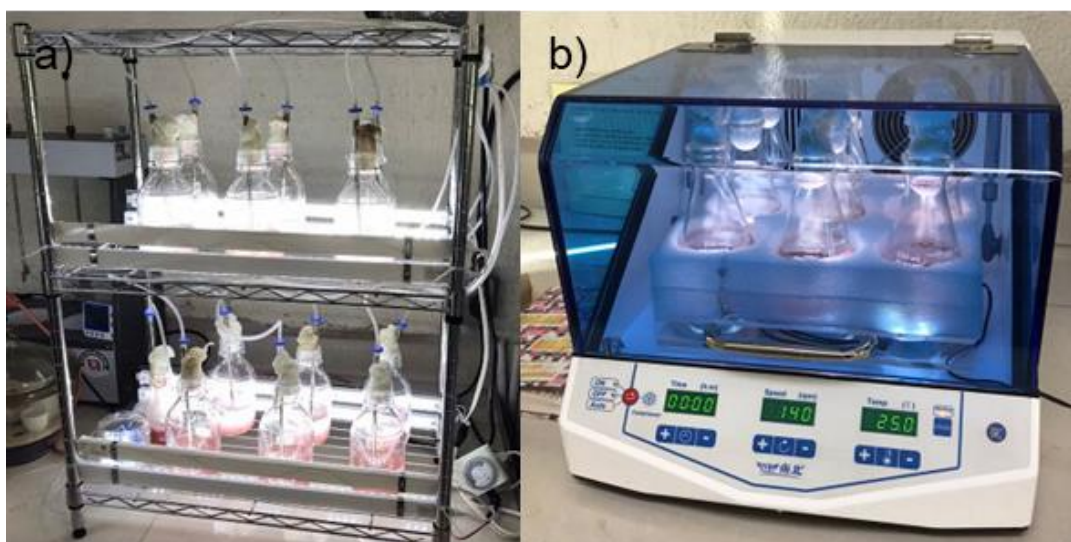


Figura 3. Sistemas para evaluación de fuentes de carbono con: a) Aireación y b) Agitación.

3.5.1.3 Diseño experimental

Se realizó un análisis de varianza de un factor y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 19.

3.5.2 Optimización de un Cultivo de *Porphyridium cruentum*

Los experimentos se realizaron en reactores de columna tipo burbuja a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante de $8.33 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, fotoperiodo 12 h con $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un volumen de trabajo de 3 L. Se midió el pH inicial y final con un potenciómetro Orion Star A215 (Thermo Scientific, Indonesia) y se monitoreó el crecimiento de la biomasa cada dos días a 680 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, China)*. Para la extracción de R-PE se utilizaron 0.1 g de biomasa seca lavada con 10 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó y centrifugó (Civeq 80-2, Velaquin) 10 min a 4000 rpm a temperatura ambiente. El pellet se suspendió en 3 mL de buffer fosfato NaH_2PO_4 0.1 M pH 6.8, posteriormente se homogenizó con un agitador magnético a temperatura ambiente durante 10 min. La suspensión se maceró por 10 min y se leyeron a 280, 455, 564 y 592 nm* (Pereira *et al.*, 2020b).

3.5.2.1 Cuantificación de R-PE

La cuantificación de la R-PE extraída se hizo con la ecuación (Pereira *et al.*, 2020a):

$$R - PE = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) * 0.2] * 0.12 \quad (11)$$

Donde A_{564} es la absorbancia máxima de R-PE. A_{592} y A_{455} son las absorbancias mínimas para la corrección de línea base, 0.12 es el coeficiente de absorción para R-

PE y 0.2 es la constante de corrección. El rendimiento de R-PE se expresó en mg R-PE g⁻¹ de biomasa. Mientras que la pureza de los extractos se determinó mediante el índice de pureza:

$$IP = A_{564}/A_{280} \quad (12)$$

Donde A₅₆₄ es la absorbancia máxima de R-PE y A₂₈₀ es la absorbancia de proteínas totales (Pereira *et al.*, 2020a).

3.5.2.2 Diseño experimental

Se utilizó el método de Taguchi para el diseño, donde se estudió el efecto de la concentración de carbono (bicarbonato de sodio), pH, concentración inicial del cultivo y tiempo de crecimiento. Una matriz L9 (3³) estimó el efecto de los parámetros en el estudio y así encontrar la combinación óptima. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados con el software estadístico Minitab 19. Los rangos de las variables independientes entre los límites superior e inferior se establecieron de acuerdo al Cuadro 4, resultando 9 cuantificaciones (Cuadro 5).

Cuadro 4. Rango de niveles de las variables utilizadas para la optimización del cultivo de *P. cruentum*.

Variables Independientes	Factor	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Concentración de carbono (g L ⁻¹)	A	5	7.5	10
pH	B	6	7	8
Concentración inicial (g L ⁻¹)	C	0.1	0.4	0.7
Tiempo (días)	D	6	10	14

Cuadro 5. Diseño experimental para los tratamientos utilizados para la optimización del cultivo.

Run	A	B	C	D
Control	0	8	0.3	16
1	5	6	0.1	6
2	10	8	0.4	6
3	7.5	6	0.4	14
4	5	7	0.4	10
5	5	8	0.7	14
6	10	7	0.1	14
7	7.5	7	0.7	6
8	10	6	0.7	10
9	7.5	7	0.7	10

3.6 Segunda Etapa: Obtención del Extracto de R-Ficoeritrina

3.6.1 Optimización de Métodos de Extracción de R-PE

3.6.1.1 Evaluación de métodos de extracción

Se han reportado varios métodos de extracción de R-PE y entre los más utilizados se encuentran el calentamiento a 40°C de la suspensión celular, suspensión en frío, varios ciclos de congelamiento y descongelamiento, sonicación y la combinación entre alguno de ellos (Arredondo & Voltolina, 2017). Por lo tanto, se evaluaron diferentes métodos de extracción para seleccionar los mejores resultados para la optimización de extracción de R-PE. Todos los métodos se evaluaron utilizando 0.1 g de biomasa seca, 0.1 g de biomasa liofilizada y 15 mL de biomasa húmeda.

3.6.1.1.1 Maceración

Se pesaron 0.1 g de biomasa seca y liofilizada, mientras que para la biomasa húmeda se utilizaron 15 mL colectados directamente del cultivo. Se lavó la muestra con H₂O y se suspendió en 5 mL de buffer 0.1 M NaH₂PO₄, se agitó y maceró 10 min. Posteriormente se centrifugó 10 min y se cuantificó a 564, 592, 455 y 280 nm* (Pereira *et al.*, 2020b).

3.6.1.1.2 Sonicación

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y suspendida en 10 mL de Na₂HPO₄ 10 mM con pH 7. Se sonicó por 30 min y posteriormente fue centrifugada 10 min a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Bennett & Bogorad, 1973).

3.6.1.1.3 Congelación y descongelación

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y suspendidas en 5 mL de buffer Na₂HPO₄ 0.1 M pH 7.17. Se congeló y descongeló la muestra a -20°C, cada uno de ellos duró 12 h con 3 ciclos en total. Durante 15 min fue centrifugada a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se cuantificó a 564, 592, 455 y 280 nm* (Huang *et al.*, 2021).

3.6.1.1.4 Congelación y descongelación

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y suspendidas en 10 mL de solución PBS (KH₂PO₄ 10 mM y NaCl 100 mM, pH 7). Las muestras fueron congeladas y descongeladas a -20°C por 3 ciclos, los primeros dos duraron 2 h y el último toda la noche. Se centrifugó 15 min a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Lauceri *et al.*, 2019).

3.6.1.1.5 Sonicación con incubación

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y colocadas en un tubo de ensayo con tapa y cubierto con aluminio. De la mezcla de extracción (2:3:5 H₂O:CH₃OH:CH₃COCH₃ v/v) se añadieron 2.5 mL, después fue homogenizada 2 min y colocada en un baño frío por 15 min para aplicar sonicación. Al terminar, fue incubada a temperatura ambiente 1 h con agitación suave. Por 15 min fue centrifugada a 4000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y al pellet se añadieron 10 mL de K₂HPO₄ pH 7. Fue aplicada sonicación por 30 min y centrifugada 10 min 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Lugo *et al.*, 2017).

3.6.1.1.6 Sonicación con Na₂HPO₄

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y colocadas en un tubo de ensayo con tapa y cubierto con aluminio. Se agregaron 2.5 mL de la mezcla de extracción (2:3:5 H₂O:CH₃OH:CH₃COCH₃ v/v), la mezcla fue homogenizada 2 min y sonicada en un baño frío por 15 min. Al terminar, se incubó a temperatura ambiente 1 h con agitación suave. Fue centrifugada 15 min a 4000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante fue descartado y el pellet suspendido en 10 mL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7. Durante 30 min se aplicó sonicación y centrifugada 10 min a una velocidad de 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Lugo *et al.*, 2017; Bennet & Bogorad, 1973).

3.6.1.1.7 Maceración y sonda ultrasónica

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y suspendidas en 6 mL de NaH₂PO₄ 0.1 M con pH 6.8 y posteriormente maceradas 10 min. En un baño frío se colocó la muestra con una sonda ultrasónica por 4 min. Fue centrifugada 15 min a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Mittal *et al.*, 2017).

3.6.1.1.8 Maceración y sonicación

La biomasa seca, liofilizada y húmeda fueron lavadas con H₂O y suspendidas en 6 mL de Na₂HPO₄ 0.1 M con pH 6.8 y maceradas por 10 min. En un baño frío fue colocada la muestra y sonicada por 30 min. Durante 15 min fue centrifugada a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm* (Mittal *et al.*, 2017).

3.6.1.1 Selección de métodos de extracción

Para la obtención de R-PE fueron seleccionaron tres métodos de extracción previamente analizados: maceración, maceración con baño ultrasónico y maceración con sonda ultrasónica (Pereira *et al.*, 2020b). Para todos los experimentos fue utilizada 0.1 g de biomasa liofilizada de *P. cruentum* lavada con 10 mL de agua destilada y homogenizada. La muestra fue centrifugada por 10 min a 4000 rpm a temperatura

ambiente y el pellet se suspendió en diferentes concentraciones de buffer NaH_2PO_4 (0.1, 0.5 y 1 M, pH 6.8) con diferentes volúmenes (3, 5 y 7 mL), posteriormente fue homogenizada con la ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente a diferentes periodos de tiempo (5, 10 y 15 min).

En la segunda parte de las extracciones los tratamientos fueron separados. El tratamiento 1 correspondió a la maceración, donde la suspensión se maceró por 10 min (Fig. 4a). El tratamiento 2 que corresponde al baño ultrasónico, la suspensión ya macerada fue sometida a un baño ultrasónico frío (PS-08A, Generic) por 30 min (Fig. 4b). Para el tratamiento 3 con sonda ultrasónica, la suspensión macerada fue colocada en un baño frío y con una sonda ultrasónica (8M2004, Generic) por 4 min (Fig. 4c).



Figura 4. Tratamientos utilizados en la extracción de R-PE a) Maceración b) Baño ultrasónico y c) Sonda ultrasónica.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 10 min a temperatura ambiente y 4000 rpm (Civeq 80-2, Velaquin). El sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm*.

3.6.1.2 Cuantificación de PBP

La cuantificación de la R-PE extraída fue realizada con la ecuación propuesta por Pereira *et al* (2020b) (Ec. 11). Mientras que la pureza de los extractos fue determinada con la ecuación 12.

3.6.1.4 Diseño Experimental

Se utilizó Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) con un diseño compuesto central y tres puntos centrales. Diferentes condiciones de tiempo de homogenización, concentración y volumen de buffer fueron evaluadas. Los rangos de las variables independientes se establecieron entre los límites superior e inferior (Cuadro 6). Mediante el software Design Expert (Versión 12) fueron investigados los efectos y la predicción de las condiciones óptimas. Los experimentos estuvieron diseñados con diferentes condiciones, resultando 17 cuantificaciones (Cuadro 7).

Cuadro 6. Rango de niveles de variables utilizadas para la optimización de los métodos de extracción de R-PE.

VARIABLES INDEPENDIENTES	FACTOR	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Tiempo de homogenización (min)	A	5	10	15
Concentración buffer (M)	B	0.1	0.5	1
Volumen buffer (mL)	C	3	5	7

Cuadro 7. Diseño experimental para la optimización de extracciones de R-PE.

Run	A	B	C
1	15	1	7
2	10	0.5	3
3	10	0.5	5
4	10	0.5	5
5	15	0.1	3
6	10	0.1	5
7	10	0.5	5
8	5	1	7
9	15	0.5	5
10	5	1	3
11	5	0.1	7
12	15	0.1	7
13	10	0.5	7
14	5	0.1	3
15	15	1	3
16	10	1	5
17	5	0.5	5

3.6.2 Estabilidad de R-PE

Para evaluar la estabilidad del pigmento, la extracción fue realizada a partir de 0.1 g de biomasa seca de *P. cruentum*, la cual fue lavada con agua destilada y suspendida en 3 mL de buffer NaH₂PO₄, 0.1 M y pH 6.8. Posteriormente fue agitada y macerada durante 10 min. Después de centrifugar la muestra a 4000 rpm, el sobrenadante fue cuantificado a 564, 592, 455 y 280 nm. Con las ecuaciones propuestas por Pereira *et al.* (2020b) se obtuvo la concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) y el índice de pureza (IP). Los extractos fueron ajustados a diferentes pH (3, 5, 7 y 9). La R-PE fue cuantificada durante los tiempos 0, 3, 6, 18, 24, 48 y 72 h. Posteriormente el extracto con pH 7 a 4, 20, 40, 60 y 100°C fue evaluado y finalmente con un pH 7 a 4°C y con una intensidad de 79 μmol m⁻² s⁻¹ (Munier *et al.*, 2014).

3.6.2.1 Cuantificación de PBP

La cuantificación de la R-PE extraída fue realizada con la ecuación 11, mientras que la pureza de los extractos fue medida con la ecuación 12 (Pereira *et al.*, 2020b).

3.6.2.2 Diseño experimental

Los resultados fueron analizados con el software estadístico Minitab 19 y se hizo un análisis de varianza de un factor y la comparación de medias de Tukey.

3.7 Tercera Etapa: Aplicación de *Porphyridium cruentum* y R-PE en Alimentos

3.7.1 Hot Cakes sin Gluten con *Porphyridium cruentum*

La incorporación de *P. cruentum* se realizó mezclando la biomasa liofilizada en 2 y 4% directamente en una masa sin gluten para hot cakes (Cuadro 8). Se pesaron 50 g de masa por pieza de 8 cm de diámetro y se cocieron en una sartén a $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 17 min por cada lado.

Cuadro 8. Formulación de hot cakes sin gluten con *Porphyridium cruentum*.

Ingredientes (g)	Control	2%	4%
Fécula de papa	85.93	84.22	82.50
Harina de arroz integral	84.15	82.47	80.78
Harina de arroz	63.49	62.23	60.96
Linaza molida	10.45	10.25	10.04
Chía	5.35	5.25	5.14
Polvo para hornear	2.29	2.25	2.20
Goma xantana	2.55	2.52	2.50
Sal de grano	2.04	2.00	1.96
Stevia	3.00	3.00	3.00
Huevo	126.00	126.00	126.00
Leche (mL)	362.00	362.00	362.00
Biomasa <i>P. cruentum</i>	0.00	5.10	10.20

3.7.1.1 Humedad

Este método se basó en el 930.15 de la A.O.A.C. y consistió en evaporar por medio de secado el agua de una muestra bajo condiciones normales. Para la determinación fueron colocados 3 g de la muestra en un crisol a peso constante. Posteriormente se llevó a la estufa a 105°C por 12 h y al terminar el tiempo fue colocada en un desecador por 10 min para enfriar. La muestra fue pesada para registrar su valor final (Khemiri *et al.*, 2020). Se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{m} (100) \quad (13)$$

Donde:

P₁= Peso del crisol más la muestra húmeda (g)

P₂=Peso del crisol más la muestra seca (g)

m=Peso de la muestra húmeda (g)

3.7.1.2 Cenizas

Este método se basó en el 942.05 de la A.O.A.C. y consiste en someter la muestra a una combustión para oxidar la materia orgánica y las cenizas resultantes se consideran la parte mineral. Después de secar las muestras a 110°C, se calcinaron los crisoles en la mufla a 550°C durante 5 h. Después de enfriar los crisoles se pesaron y se registró el valor final (Diprat *et al.*, 2020). Se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_1 - P_2) \times 100}{m} \quad (14)$$

Donde:

P_1 = Peso del crisol con las cenizas (g)

P_2 =Peso del crisol vacío (g)

m =Peso de la muestra seca (g)

3.7.1.3 Pérdida por cocción y pH

La medición del pH se basó en el método 943.02 de la AOAC. En muestras de 10 g se agregó 100 mL de agua destilada a 25°C, se agitó hasta disolver y la mezcla estuviera libre de grumos. Se siguió agitando 30 min y se dejó reposar 10 min. Se realizó la medición del pH previamente calibrado el equipo con las soluciones tampón de 4, 7 y 10 (Zhou *et al.*, 2022). Para calcular la pérdida por cocción (%) se calculó la diferencia entre el peso de la masa después de la cocción y el peso de la masa obtenida (Ec. 15) (Khemiri *et al.*, 2020).

$$\text{Pérdida cocción}(\%) = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} (100) \quad (15)$$

3.7.1.4 Análisis de perfil de textura

La textura de las muestras se determinó con una prueba de análisis de perfil de textura (TPA) con un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA-XT plus (Surrey, UK), comprimiendo la muestra en el centro a 30% de su altura y a una velocidad de 1 mm s⁻¹ con un plato de compresión de 75 mm. En el análisis se determinaron las

características de dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia. Además, se realizó el análisis de fuerza máxima de corte con una cuchilla de aluminio a una velocidad de 1 mm s^{-1} y una distancia total de 50 mm. Se hicieron cinco repeticiones de cada tratamiento en el día cero y tres (Luo *et al.*, 2021).

3.7.1.5 Medición de color

Con un colorímetro digital Konica Minolta CR-410 se midió la parte central. Las muestras se midieron por triplicado los días 0 y 3. El análisis se basó en el sistema $L^* a^* b^*$, donde L^* es la luminosidad en una escala que varía desde cero a cien (brillo mínimo es cero y brillo máximo es 100), a^* indica la intensidad de los colores verde y rojo (valores negativos es tendencia a verde y valores positivos es tendencia a rojo) y b^* indica la intensidad de los colores amarillo y azul (valores negativos es tendencia a azul y valores positivos es tendencia a amarillo), también se obtuvieron los valores de Hue (tono) y Cromo (Różyło *et al.*, 2017; Arquelau *et al.*, 2019).

3.7.1.6 Evaluación sensorial

Se realizó una prueba hedónica de 7 puntos con 25 panelistas semi entrenados, donde 1 corresponde a me disgusta muchísimo y 7 es para me gusta muchísimo. El objetivo fue determinar el grado de aceptación en olor, color, sabor, dureza y aceptabilidad general para los tres tratamientos. Las muestras se ofrecieron a los panelistas 30 min después de su cocción (Khemiri *et al.*, 2020).

3.7.1.7 Diseño experimental

Los resultados se analizaron con el software Minitab 19, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95%.

3.7.2 Yogur

Se utilizó yogur comercial para evaluar la estabilidad de la R-PE. Se incorporó el pigmento (2 y 4%) en yogur natural comercial sólido y líquido y fue almacenado a 4°C en frascos de vidrio cerrados. El color se monitoreó utilizando un colorímetro digital Konica Minolta CR-410 durante 21 días frente a un control, un yogur comercial sabor fresa. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.7.2.1 Diseño experimental

Se realizó un análisis de varianza de un factor y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición Bioquímica de *Porphyridium cruentum*

El contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas, clorofila y carotenoides de *P. cruentum* se muestra en el cuadro 9. Bermejo *et al.* (2002) obtuvieron 33% en proteína, 35.8% de carbohidratos, 6.7% de lípidos, 19.7% en cenizas, 0.65% de clorofila y 0.1% en carotenoides. Reboloso *et al.* (2000) encontraron en esta microalga 29.8% de proteína, 33.5% de carbohidratos, 6.48% de lípidos y 18.1% de cenizas. Todos los resultados coinciden en que los carbohidratos representan el mayor porcentaje, seguido de la proteína.

Cuadro 9. Composición bioquímica de *Porphyridium cruentum*.

Componente	Contenido, % p. s.
Proteína	27.84 ± 0.32
Carbohidratos	48.24 ± 1.80
Lípidos	8.46 ± 0.35
Cenizas	19.63 ± 0.15
Clorofila a	0.65 ± 0.00
Carotenoides	0.16 ± 0.00

4.2 Primera Etapa: Producción de Biomasa de *Porphyridium cruentum*

4.2.1 Evaluación de Fuentes de Carbono

4.2.1.1 Sistema con aireación

En el sistema con aireación se evaluó el efecto de las fuentes de carbono en el crecimiento de la biomasa de la microalga *P. cruentum*. El acetato de sodio, bicarbonato de sodio, glicerol y glucosa se evaluaron a ocho diferentes concentraciones que variaron entre 0.25 g L⁻¹ y 10 g L⁻¹. El incremento en la concentración de la biomasa durante los 14 días se muestra en la Fig. 5a para el acetato de sodio y Fig. 5b para el bicarbonato de sodio. La tasa de crecimiento de la biomasa fue mayor en bicarbonato de sodio y al utilizarlo se alcanzó la fase estacionaria en el día 6. El valor más alto obtenido fue de 4.94 g L⁻¹ con 10 g L⁻¹ de bicarbonato de sodio, pero las concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 g L⁻¹ de bicarbonato se mantuvieron muy parecidas y no presentaron resultados notables al tener concentraciones menores a 3 g L⁻¹. En cambio, el acetato de sodio a 0.75 g L⁻¹ tuvo una concentración final de 4.43 g L⁻¹, pero la mayoría de las concentraciones a los 14 días tuvieron resultados menores al tratamiento control, el cual finalizó con 3.59 g L⁻¹.

El efecto del acetato de sodio como fuente de carbono ha sido estudiado y comparado con otras fuentes. Por ejemplo, en 10 días se obtuvo una concentración de 0.4 g L⁻¹ con acetato de sodio el cual estuvo por debajo de la glucosa, 0.5 g L⁻¹, y fue el doble que el obtenido por el bicarbonato de sodio, que fue de 0.2 g L⁻¹ (Vo *et al.*, 2020). Sin

embargo, Chang *et al.* (2017) obtuvieron resultados mayores con la microalga *Porphyridium purpureum* con menores concentraciones de bicarbonato de sodio. Se obtuvieron 9.5 g L^{-1} con 0.8 g L^{-1} de bicarbonato a los 14 días, ya que utilizaron un flujo de aire de $5000 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ para un volumen de 50 L.

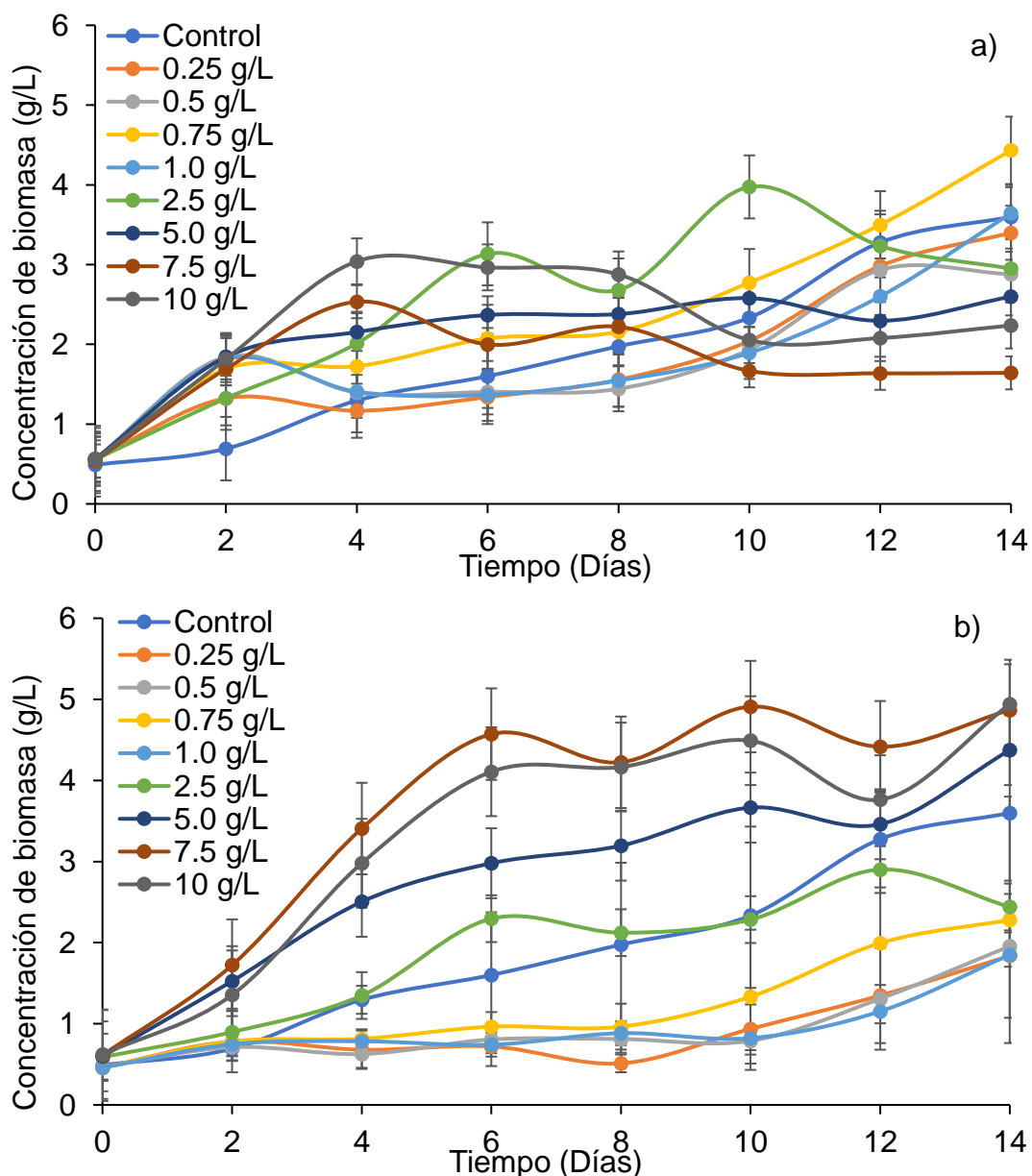


Figura 5. Concentración de biomasa (g L^{-1}) de *P. cruentum* en un sistema con aireación con a) Acetato de sodio y b) Bicarbonato de sodio.

Los resultados para el glicerol y la glucosa se muestran en la Fig. 6a y 6b respectivamente. Al utilizar el glicerol si se vio un aumento, pero fue lo contrario para la glucosa al finalizar los 14 días.

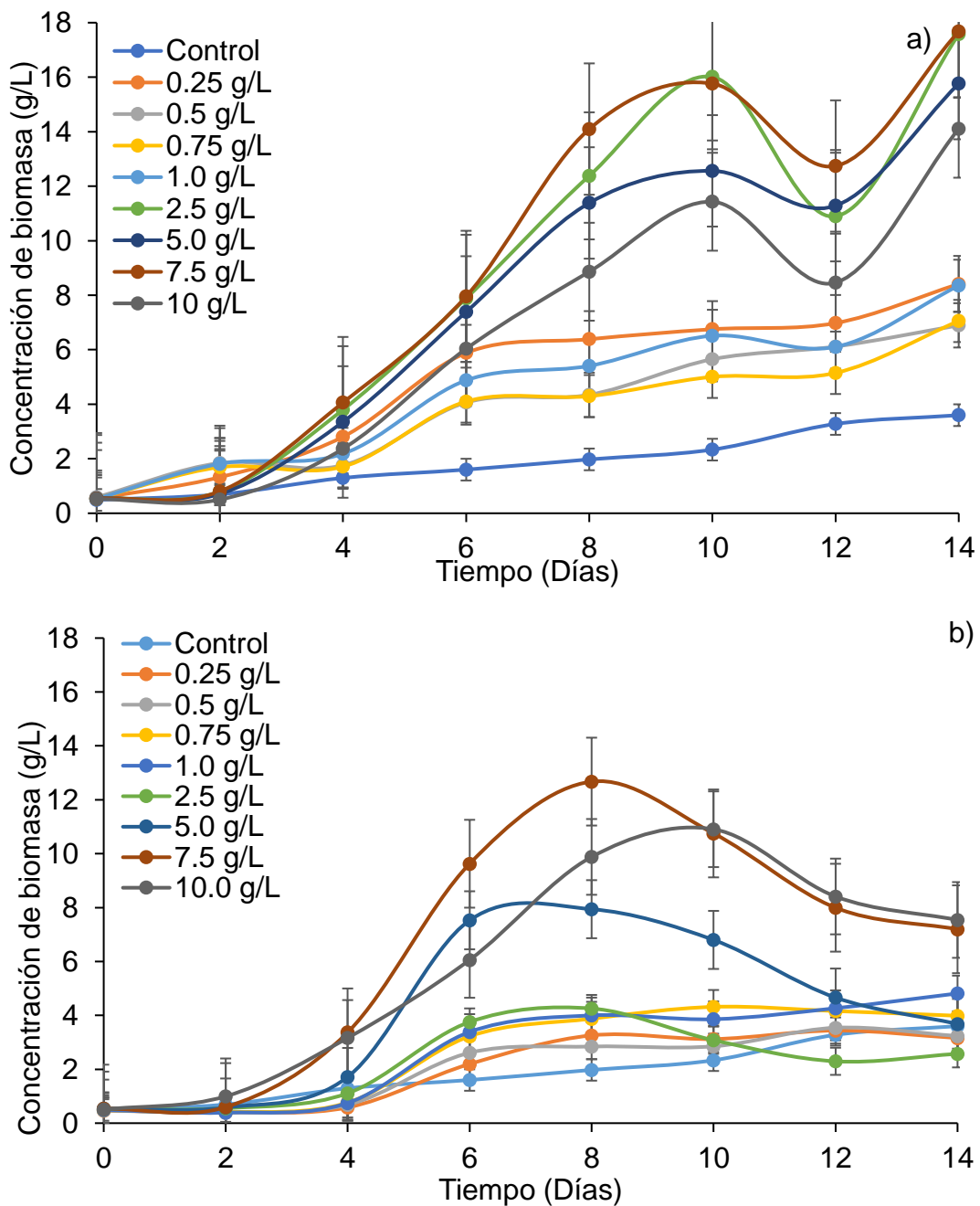


Figura 6. Concentración de biomasa (g L⁻¹) de *P. cruentum* en un sistema con aireación con a) Glicerol y b) Glucosa.

Al utilizar 2.5 y 7.5 g L⁻¹ de glicerol se obtuvieron 17.57 y 17.67 g L⁻¹ respectivamente. Mientras que con glucosa se consiguieron 7.19 y 7.54 g L⁻¹ al agregarse 7.5 y 10 g L⁻¹. Sin embargo, con concentraciones menores de glucosa no se observó un crecimiento notorio, excepto con 1.0 g L⁻¹ cuyo rendimiento fue de 4.8 g L⁻¹. También Jiao *et al.*, (2018) estudiaron el efecto del glicerol como fuente de carbono sobre el crecimiento de *Porphyridium purpureum*, ya que este puede promover el crecimiento de la biomasa y ayudar en la acumulación de ácidos poliinsaturados y ácido araquidónico; sin embargo obtuvieron 15.72 g L⁻¹ con 0.5% en 18 días. Oh *et al.*, (2009) utilizaron 5, 10 y 15 g L⁻¹ de glucosa y obtuvieron 0.5, 2.8 y 3.2 g L⁻¹ respectivamente. Mientras que Přebyl & Cepák (2019) reportaron que no hubo crecimiento en *Porphyridium purpureum* con 20 g L⁻¹ de glucosa.

4.2.1.2 Sistema con agitación

En el sistema con agitación se evaluaron las mismas fuentes de carbono y concentraciones utilizadas que en el sistema anterior. En la Fig. 7a se muestra el crecimiento de la biomasa con acetato de sodio. Cuando se utilizó 0.25, 0.5 y 0.75 g L⁻¹ de acetato de sodio no se vio crecimiento, mientras que en el resto de las concentraciones aumentó muy poco y el más alto fue con 1.0 g L⁻¹ al obtenerse 2.58 g L⁻¹. El bicarbonato de sodio (Fig. 7b) tampoco mostró crecimiento, excepto con 10 g L⁻¹ y se obtuvo 1.77 g L⁻¹. Sobezuk *et al.*, (2006) reportaron una concentración de biomasa en *P. cruentum* de 0.14 g L⁻¹ con una agitación de 150 rpm.

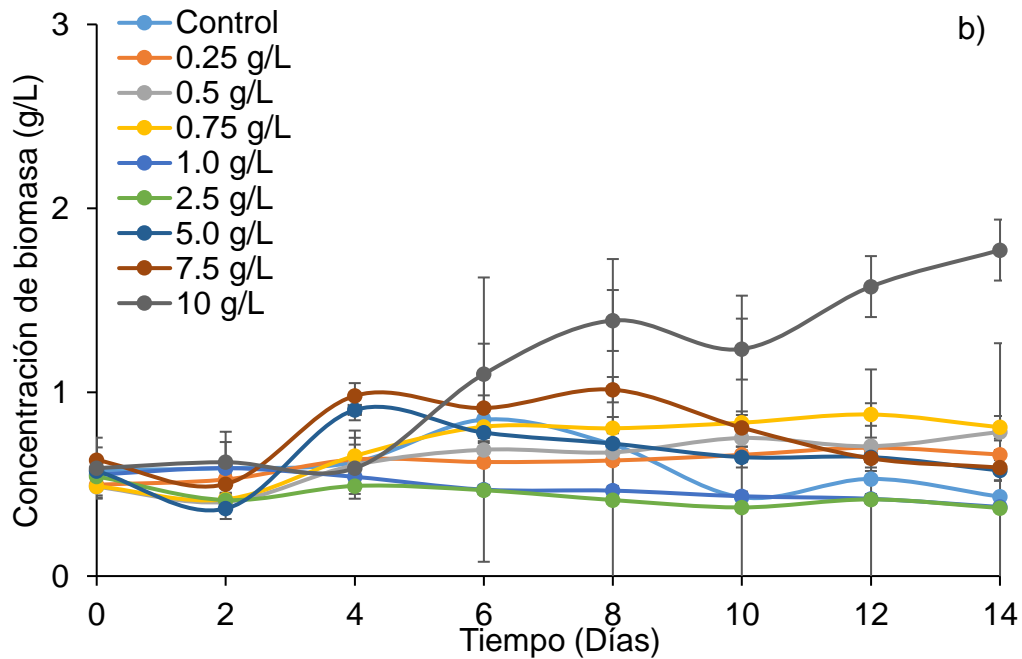
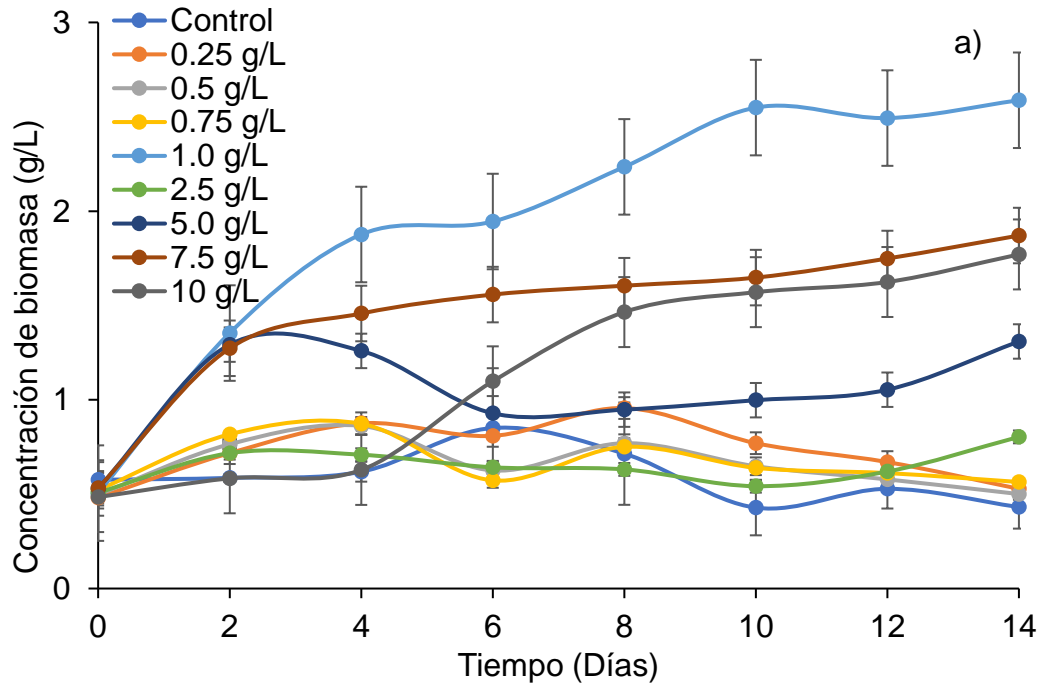


Figura 7. Concentración de biomasa (g L^{-1}) de *P. cruentum* en un sistema con agitación con a) acetato de sodio y b) bicarbonato de sodio.

En la Fig. 8a se muestra el crecimiento de la biomasa con glicerol, el cual mostró al día 14 valores de 18.74, 20.77 y 16.32 g L⁻¹ correspondientes a las concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 g L⁻¹.

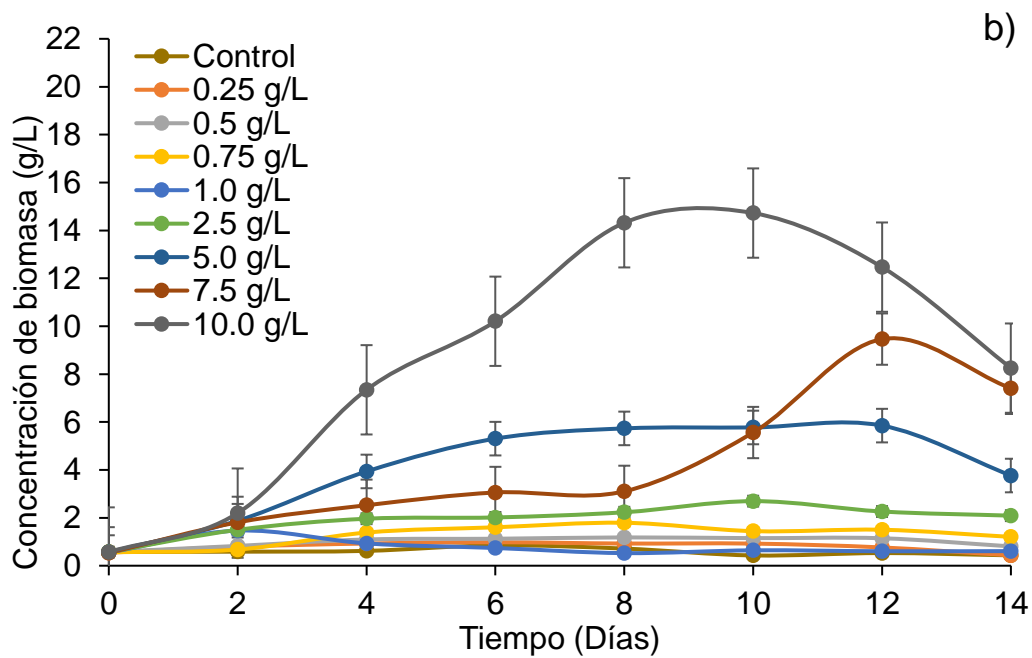
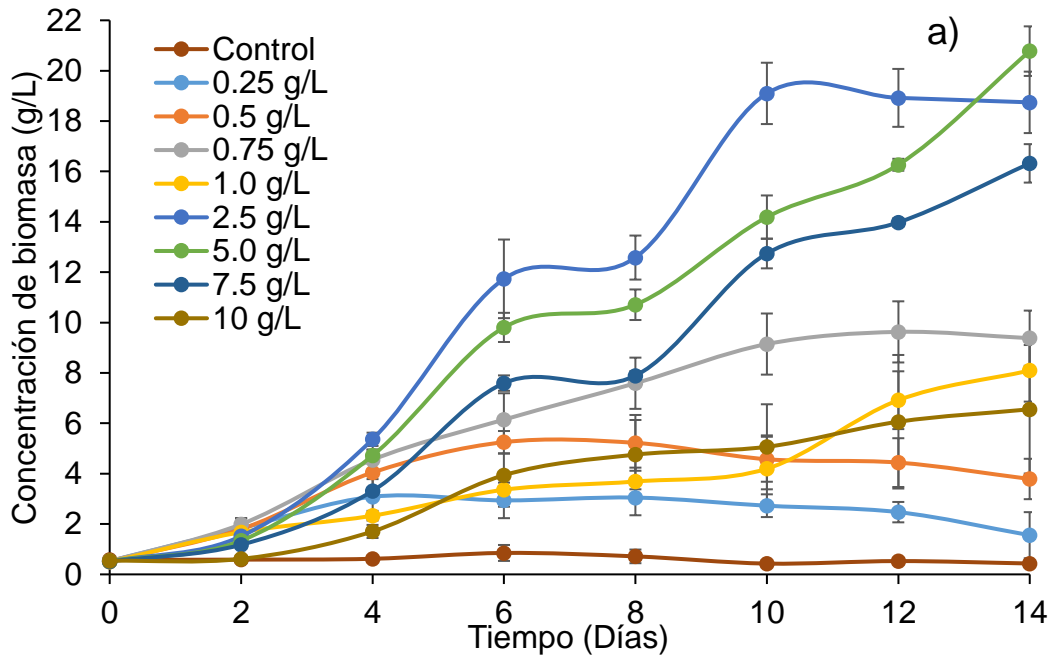


Figura 8. Concentración de biomasa (g L⁻¹) de *P. cruentum* en un sistema con agitación con a) glicerol y b) glucosa.

En cambio, la glucosa (Fig. 8b) no mostró crecimiento en concentraciones menores a 2.5 g L^{-1} , pero al utilizar 10 g L^{-1} se alcanzó 8.25 g L^{-1} y disminuyó a partir del día 10. Aunque se ha propuesto que la microalga *Porphyridium cruentum* es más resistente al daño hidrodinámico que otras especies, Sobezuk *et al.* (2006) reportaron una concentración de biomasa de 0.14 g L^{-1} con una agitación de 150 rpm. Esto sugiere que la agitación mecánica excesiva consigue dañar las microalgas y podría ocasionarse por la reducción del tamaño de las burbujas de gas, ya que la ruptura en la superficie del medio es más perjudicial para las células, Sin embargo, la tolerancia al daño puede variar según la especie. García-Camacho *et al.* (2000) encontraron que *P. cruentum* fue muy sensible a diferentes esfuerzos cortantes como los usados en biorreactores con agitación, por lo que sugieren que se debe evaluar tanto mecánica e hidrodinamicamente el efecto de cizallamiento en el uso de biorreactores.

4.2.2 Optimización de un Cultivo de *Porphyridium cruentum*

En el cuadro 10 se muestra los resultados de la optimización del cultivo con el tratamiento control y las nueve corridas experimentales. En él se observa que la concentración de biomasa más alta fue de 6.75 g L^{-1} para el experimento 5. La mayor producción de R-PE e IP correspondió al experimento 4 con $0.23 \text{ mg R-PE g}^{-1}$ y 0.884 , respectivamente.

Cuadro 10. Valores de respuesta de la optimización del cultivo de *Porphyridium cruentum*.

Corrida	Biomasa (g L ⁻¹)	R-PE (mg g ⁻¹ biomasa)	IP
Control	4.705±0.342	0.201±0.029	0.787±0.069
1	0.611±0.053	0.002±0.000	0.143±0.001
2	1.429±0.252	0.000±0.000	0.000±0.000
3	2.977±0.323	0.075±0.004	0.511±0.004
4	1.343±0.359	0.230±0.005	0.884±0.007
5	6.758±1.283	0.118±0.001	0.568±0.048
6	3.793±0.342	0.000±0.001	0.000±0.000
7	1.432±0.111	0.001±0.000	0.162±0.001
8	2.060±0.433	0.002±0.000	0.151±0.000
9	1.314±0.398	0.046±0.001	0.359±0.007

En la Figura 9 se muestra la gráfica de efectos principales, donde se aprecia que el tiempo fue la variable más significativa en el crecimiento de la biomasa. Cuando se utilizó *Porphyridium purpureum* y bicarbonato de sodio (0.8 g L⁻¹) se obtuvo 9.5 g L⁻¹ de biomasa en 14 días, pero el flujo de aire fue de 5000 cm³ s⁻¹ en 50 L (Chang *et al.*, 2017).

La respuesta en la producción de R-PE se muestra en la figura 10. La gráfica de efectos principales muestra que una concentración de carbono alta no favoreció y fue significativa. Esto puede relacionarse con el experimento 6 que no mostró valores en R-PE e IP, una alta concentración de carbono con una concentración inicial baja pudo

afectar esos resultados. Pereira *et al.* (2020a) alcanzaron 3.6 mg PE g⁻¹ de biomasa con el alga *Gracilaria gracilis* con 10 min de maceración y buffer 0.1 M.

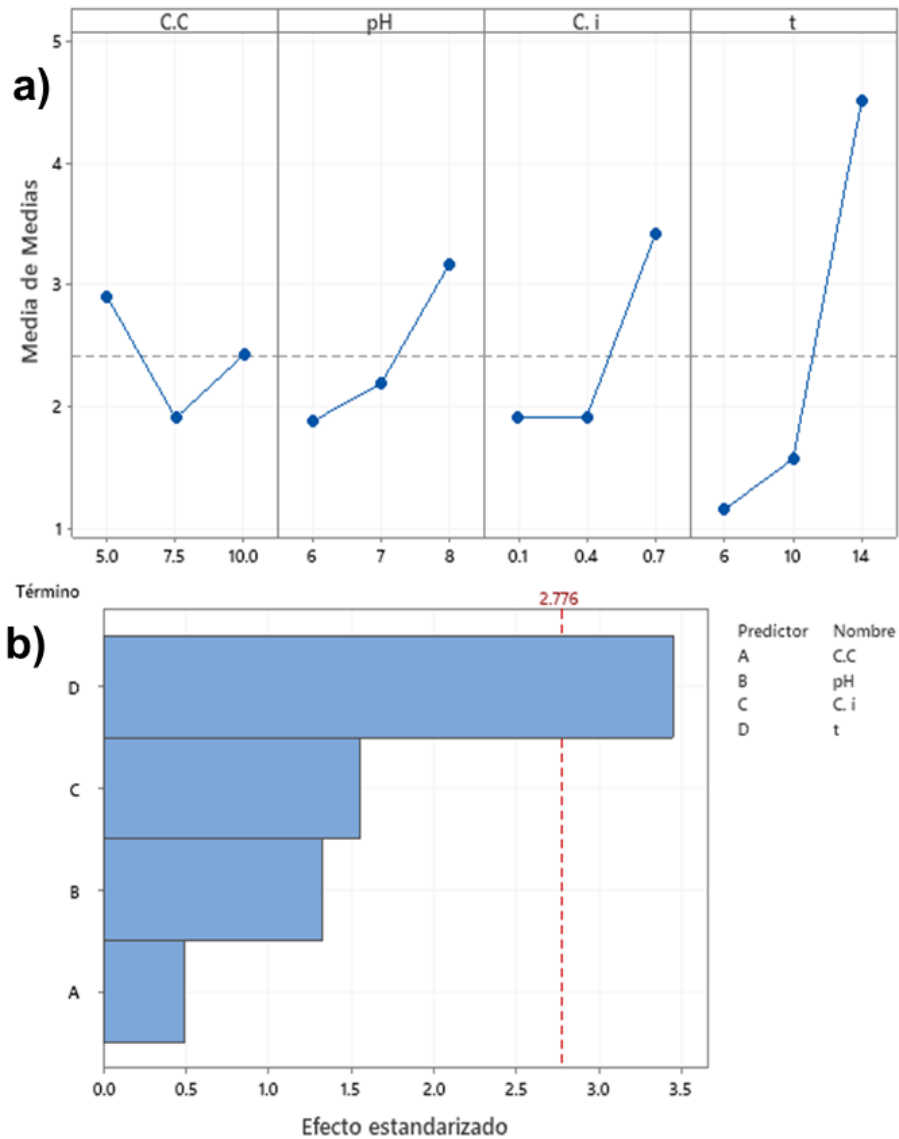


Figura 9. Concentración de biomasa (g L⁻¹) al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.

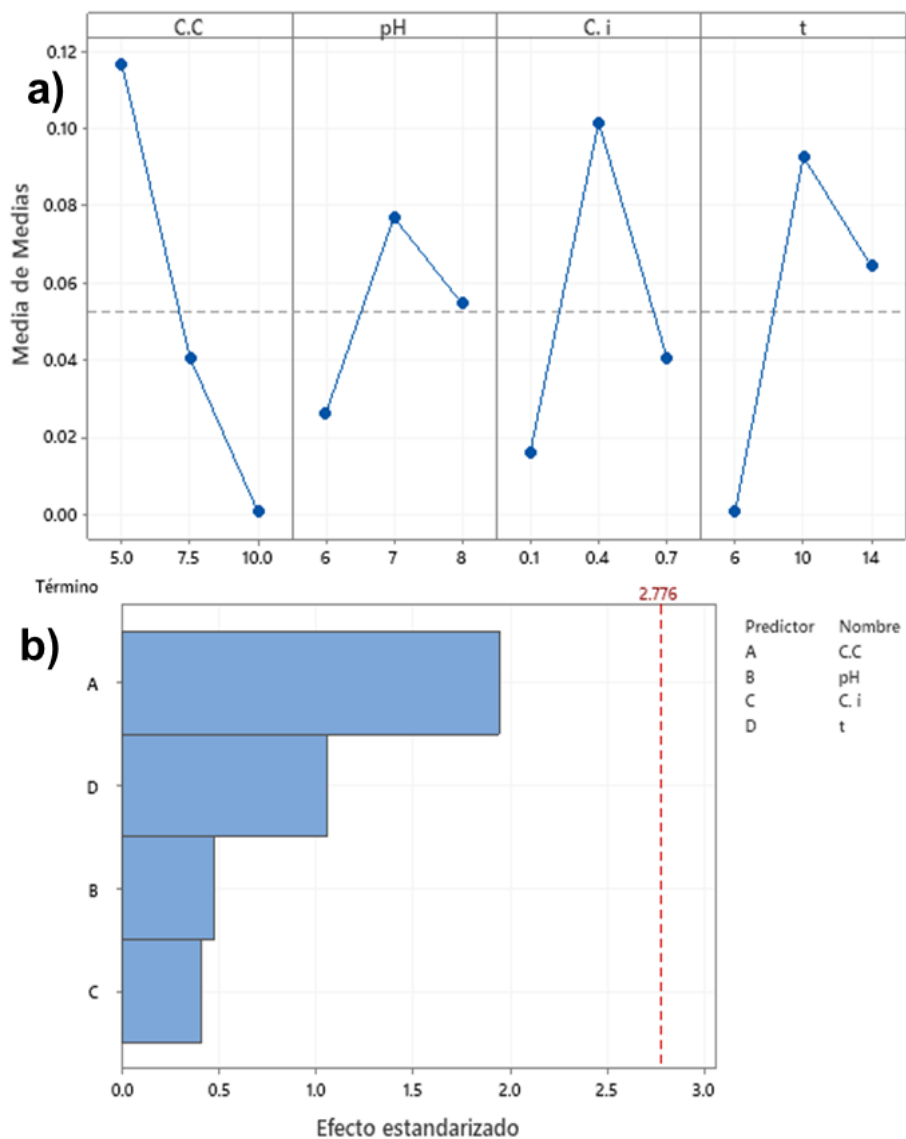


Figura 10. Concentración de R-PE (mg g^{-1} biomasa) al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.

Para IP, se muestra en la gráfica de efectos principales (Figura 11) que una concentración de carbono baja ayudó al igual que un valor medio en las otras variables, dicho comportamiento fue similar a los resultados de la concentración de R-PE. Sin embargo, otras investigaciones mostraron que con *P. purpureum* y congelación-descongelación a -80°C se obtuvo R-PE con un IP de 5.6, estos resultados pueden ser ocasionados por la ausencia de luz en este método de extracción, ya que cuando

la luz disminuye, el contenido de R-PE aumenta junto con la clorofila al ser complejos captadores de luz (Ji *et al.*, 2022). En la Figura 12 se muestra la intensidad del color del extracto de R-PE, donde es notoria la similitud de la concentración entre control y el experimento 4, los cuales tuvieron los valores más altos.

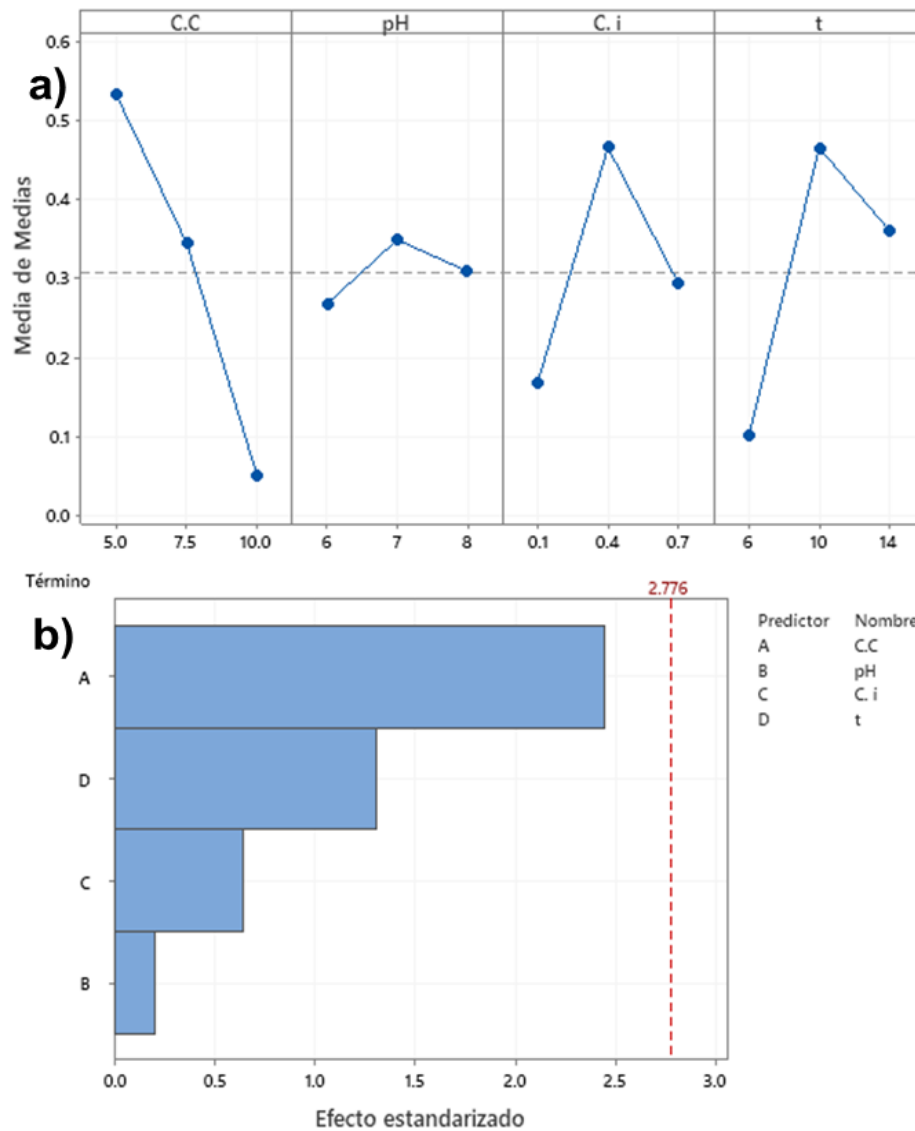


Figura 11. IP de R-PE al finalizar los experimentos en: a) Gráfica de efectos principales y b) Diagrama de Pareto.

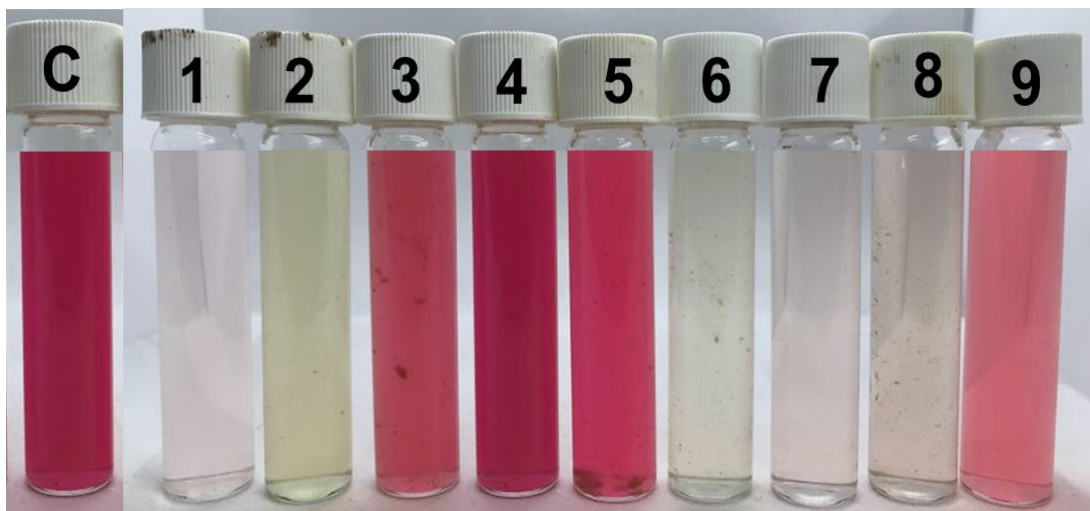


Figura 12. Extracciones de R-PE de los experimentos realizados para la optimización de métodos.

4.3 Segunda etapa: Obtención del Extracto de R-Ficoeritrina

4.3.1 Optimización de Métodos de Extracción

4.3.1.1 Modelo matemático

Para las variables respuesta analizadas se utilizaron ecuaciones polinomiales de segundo orden. Para el tratamiento con maceración las Ec. (16) y (17) corresponden a R-PE e IP respectivamente. Las Ec. (18) y (19) presentan el tratamiento con maceración y baño ultrasónico, tocante a R-PE e IP. Para el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, la Ec. (20) corresponde a R-PE y la Ec. (21) a IP.

$$R - PE_M = +0.223067 + 0.001504(A) - 0.181295(B) - 0.051083(C) + 0.00226(A)(B) + 0.000473(A)(C) + 0.022629(B)(C) - 0.000138(A^2) + 0.043217(B^2) + 0.002712(C^2) - 0.000666(A)(B)(C) \quad (16)$$

$$PI_M = +0.834922 + 0.025673(A) - 0.534188(B) - 0.200066(C) + 0.006284(A)(B) + 0.001429(A)(C) + 0.086424(B)(C) - 0.001411(A^2) + 0.052029(B^2) + 0.012478(C^2) - 0.002036(A)(B)(C) \quad (17)$$

$$R - PE_{M+B=} + 0.225493 - 0.003535(A) - 0.166264(B) - 0.042258(C) + 0.002536(A)(B) + 0.000216(A)(C) + 0.017579(B)(C) + 0.000125(A^2) + 0.040599(B^2) + 0.002265(C^2) - 0.000459(A)(B)(C) \quad (18)$$

$$PI_{M+B} = +0.820108 + 0.012034(A) - 0.334381(B) - 0.169899(C) + 0.000194(A)(B) - 0.001099(A)(C) + 0.031307(B)(C) - 0.000541(A^2) + 0.040362(B^2) + 0.013475(C^2) - 0.001085(A)(B)(C) \quad (19)$$

$$R - PE_{M+S=} + 0.170090 - 0.008748(A) - 0.184203(B) - 0.014912(C) + 0.007213(A)(B) + 0.001023(A)(C) + 0.026074(B)(C) + 0.000178(A^2) + 0.040229(B^2) - 0.001227(C^2) - 0.001382(A)(B)(C) \quad (20)$$

$$PI_{M+S} = +0.260159 + 0.008317(A) - 0.172152(B) + 0.054068(C) + 0.018901(A)(B) - 0.001660(A)(C) - 0.026801(B)(C) - 0.000572(A^2) + 0.181331(B^2) - 0.005896(C^2) + 0.000425(A)(B)(C) \quad (21)$$

4.3.1.2 Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se muestran en el cuadro 11. Si p-Value<0.05, indica que las variables son significativas. En nuestro trabajo, los valores p-Value de R-PE con maceración, maceración y baño ultrasónico mostraron un valor

p-Value menor a 0.05, además IP con maceración y baño ultrasónico mostraron el mismo comportamiento de significancia estadística. Al ser estos parámetros significativos, influyen en la extracción de R-PE e IP. De igual manera, los valores de p-Value por variable y por tratamiento mostraron comportamientos significativos. La variable A que corresponde al tiempo de homogenización (5, 10 y 15 min) mostró no ser significativa para la extracción de R-PE ni para el IP en ningún tratamiento, ya que todos los valores fueron mayores a 0.05. Respecto a la variable B, que corresponde a la concentración del buffer (0.1, 0.5 y 1 M) la R-PE con maceración, R-PE con maceración y baño ultrasónico e IP con maceración y baño ultrasónico resultaron significantes. Finalmente, la variable C, que corresponde al volumen de buffer utilizado (3, 5 y 7 mL), solamente el IP con sonda ultrasónica resultó no ser significativo.

4.3.1.3 Tratamiento con maceración

Los resultados obtenidos de los experimentos y las predicciones de las 17 corridas experimentales se muestran en el Cuadro 12 para el tratamiento con maceración. La extracción de R-PE de *P. cruentum* fue optimizada y RSM resultó ser útil al proporcionar modelos matemáticos con buena concordancia entre los resultados experimentales y predichos, lo cual se puede observar en el gráfico de residuos para R-PE e IP (Figura 13). La correlación lineal entre los residuos estudiados se graficó contra la probabilidad normal y demostró un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales del tratamiento con maceración, donde se observa que los datos se distribuyen sobre una línea. Por lo tanto, este modelo matemático puede usarse para predecir la obtención de R-PE e IP con maceración.

En la Fig. 14a se muestra el efecto de la concentración y volumen del buffer en el tratamiento con maceración, donde se aprecia que la disminución en la concentración del buffer hasta 0.1 M incrementó la obtención de R-PE al igual que al disminuir el volumen de buffer. En los valores de IP con maceración (Fig. 14b) se vio un incremento al disminuir el volumen del buffer, pero aumentar la concentración.

Cuadro 11. Análisis de varianza de la optimización de los métodos de extracción de R-PE.

Anova	Maceración		Mac.+ baño ultrasónico		Mac.+ sonda ultrasónica	
	R-PE	IP	R-PE	IP	R-PE	IP
	R ²	0.891	0.800	0.900	0.890	0.828
p-value del modelo	0.032	0.147	0.026	0.033	0.104	0.581
F-value del modelo	4.900	2.410	5.350	4.850	2.880	0.898
Desv. Est.	0.014	0.057	0.013	0.035	0.014	0.103
Mean	0.040	0.287	0.041	0.293	0.035	0.327
C. V.%	34.570	19.960	30.580	11.820	40.920	31.380
df	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
F-value de A	0.361	0.457	0.047	0.295	0.012	0.000
F-value de B	10.570	4.350	12.440	10.100	0.422	2.060
F-value de C	23.370	7.440	26.660	17.620	20.230	4.360
p-value de A	0.570	0.524	0.835	0.607	0.915	0.984
p-value de B	0.017	0.082	0.012	0.019	0.540	0.201
p-value de C	0.003	0.034	0.002	0.006	0.004	0.082
Sum of squares	0.009	0.079	0.009	0.058	0.006	0.095
AP	7.322	5.641	7.852	7.362	6.976	4.259

Cuadro 12. Rendimiento de R-PE (mg g⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración.

Run	R-PE (mg g ⁻¹ biomasa)		IP	
	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b
1	0.019	0.024	0.237	0.267
2	0.046	0.062	0.330	0.371
3	0.039	0.030	0.282	0.272
4	0.016	0.030	0.206	0.272
5	0.101	0.097	0.461	0.452
6	0.045	0.053	0.283	0.320
7	0.045	0.030	0.327	0.272
8	0.024	0.027	0.263	0.272
9	0.030	0.029	0.291	0.249
10	0.040	0.037	0.251	0.240
11	0.015	0.016	0.202	0.193
12	0.032	0.034	0.247	0.259
13	0.032	0.020	0.314	0.272
14	0.101	0.095	0.465	0.435
15	0.043	0.041	0.249	0.259
16	0.028	0.025	0.282	0.245
17	0.019	0.024	0.182	0.224

^aValores experimentales.

^bValores de predicción.

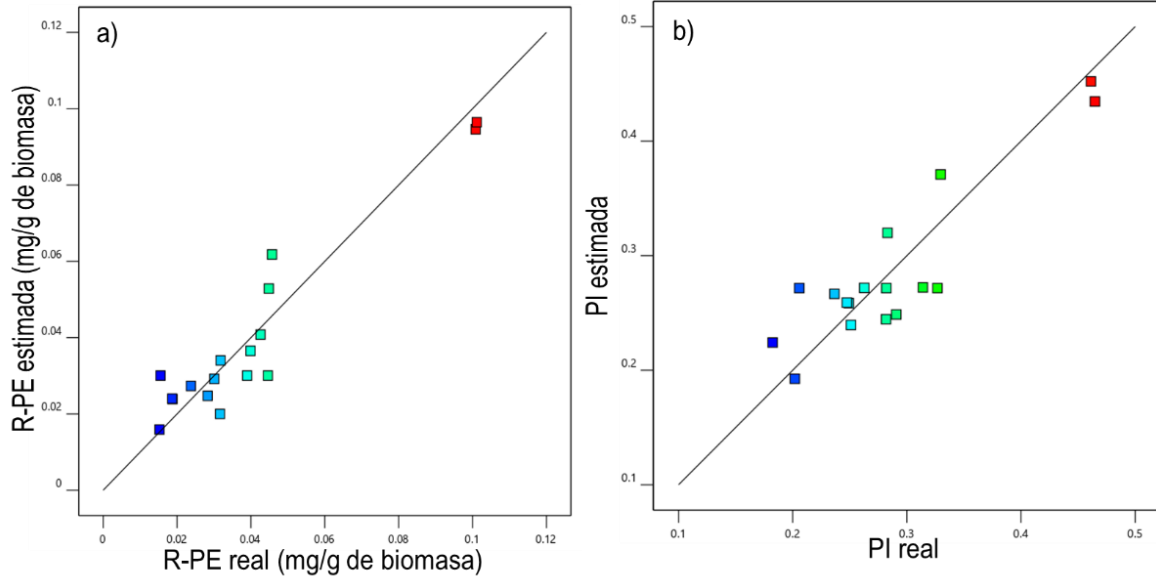


Figura 13. Valores pronosticados versus respuesta real en el tratamiento con maceración: a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP.

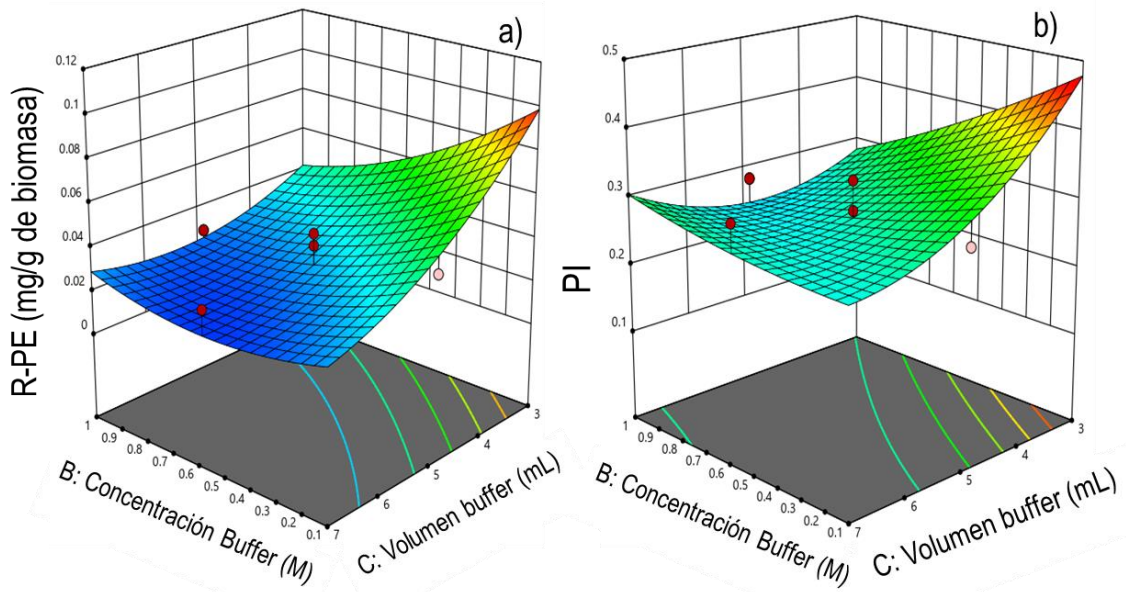


Figura 14. Efecto de la concentración (M) y volumen de buffer (mL) en: a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP con maceración.

4.3.1.4 Tratamientos con maceración y baño ultrasónico

Los resultados reales y predichos del rendimiento de R-PE e IP con el tratamiento de maceración y baño ultrasónico se muestran en el Cuadro 13. Para este tratamiento se realizó un gráfico de residuos donde se muestra un ajuste cercano a la línea de 45 grados. Esto indica un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales de R-PE e IP (Fig. 15), por lo que este modelo matemático es útil para predecir la obtención de R-PE e IP con maceración y baño ultrasónico.

En la Fig. 16a se muestra el efecto de la concentración y volumen del buffer en el tratamiento con maceración y baño ultrasónico, donde se aprecia que la disminución en la concentración del buffer hasta 0.1 M y 3 mL de buffer incrementó la obtención de R-PE. En IP (Fig. 16b) los mejores resultados fueron con los valores más bajos de concentración y volumen de buffer.

4.3.1.5 Tratamientos con maceración y sonda ultrasónica

Los resultados de los tratamientos con maceración y sonda ultrasónica, se muestran en el Cuadro 14. Además, se realizó un análisis de la aproximación adecuada de los modelos sugeridos utilizando un gráfico de residuos para R-PE e IP (Fig. 17). La correlación lineal demostró un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales del tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, ya que los datos se distribuyen sobre una línea de 45 grados. Por lo tanto, este modelo matemático puede usarse para predecir la obtención de R-PE e IP con maceración y sonda ultrasónica.

Cuadro 13. Rendimiento de R-PE (mg g⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración y baño ultrasónico.

Run	R-PE (mg/g)		IP	
	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b
1	0.021	0.026	0.260	0.276
2	0.045	0.059	0.332	0.364
3	0.040	0.029	0.288	0.264
4	0.015	0.029	0.227	0.264
5	0.100	0.095	0.437	0.423
6	0.044	0.052	0.274	0.307
7	0.038	0.029	0.282	0.264
8	0.023	0.028	0.250	0.263
9	0.033	0.033	0.250	0.245
10	0.043	0.041	0.281	0.279
11	0.028	0.029	0.294	0.292
12	0.032	0.034	0.234	0.235
13	0.030	0.018	0.301	0.272
14	0.103	0.097	0.457	0.440
15	0.050	0.048	0.291	0.293
16	0.029	0.023	0.268	0.237
17	0.030	0.032	0.248	0.257

^aValores experimentales.

^bValores de predicción.

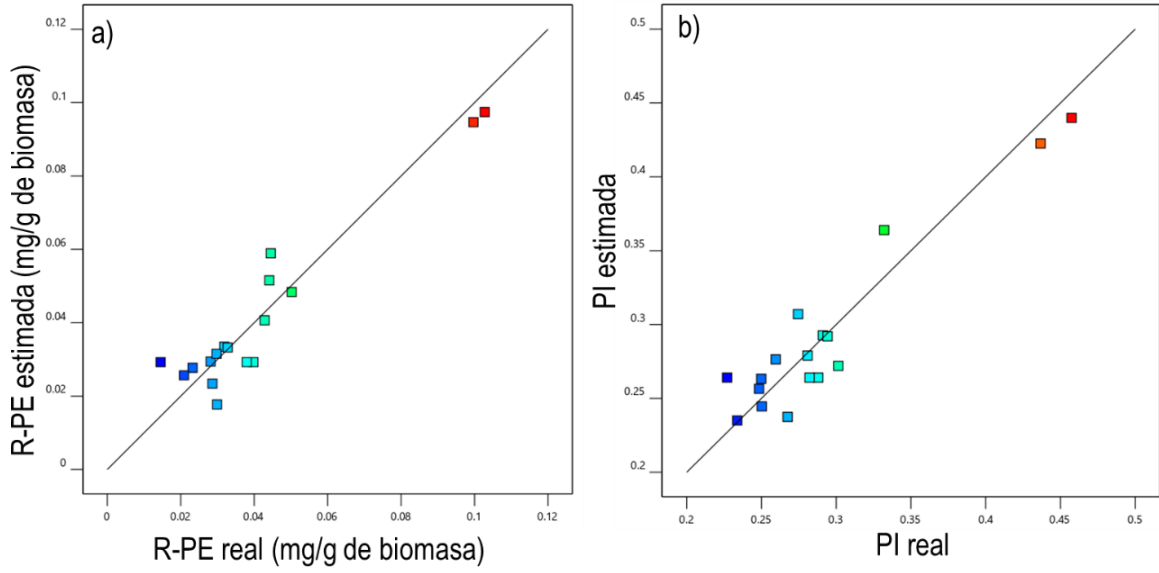


Figura 15. Valores pronosticados versus la respuesta real en el tratamiento con maceración y baño ultrasónico de a) R-PE (mg g⁻¹ biomasa) e b) IP.

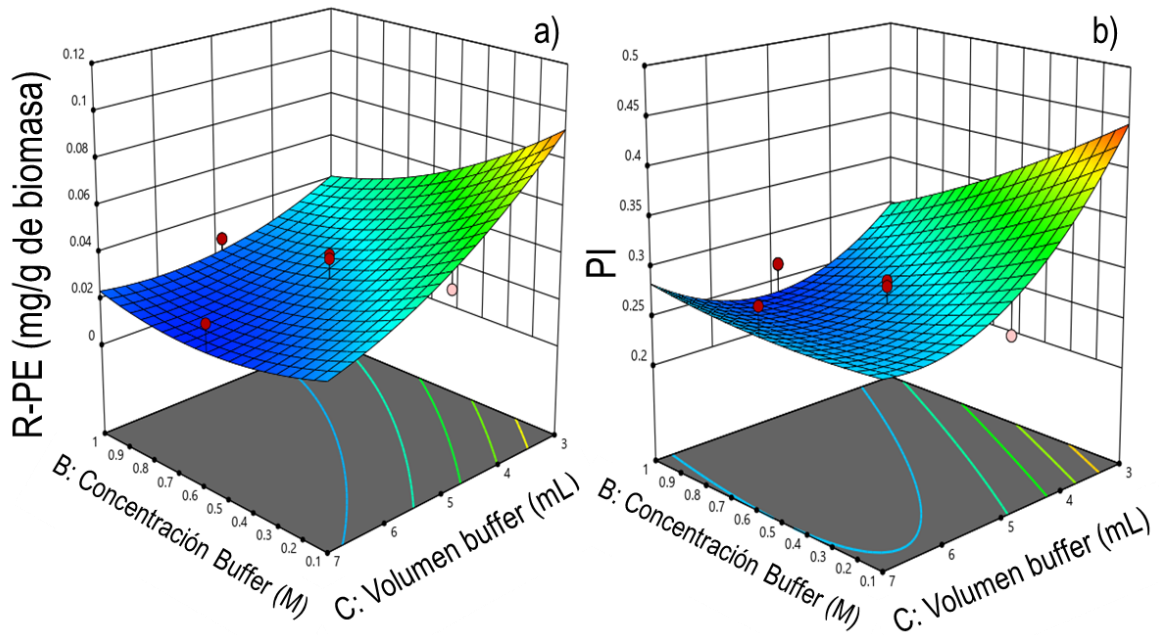


Figura 16. Efecto de la concentración (M) y volumen de buffer (mL) en a) R-PE (mg g⁻¹ biomasa) e b) IP con maceración y baño ultrasónico.

Cuadro 14. Rendimiento de R-PE (mg g⁻¹ biomasa) e IP para el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica.

Run	R-PE (mg/g)		IP	
	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b
1	0.019	0.023	0.307	0.322
2	0.027	0.046	0.238	0.373
3	0.044	0.031	0.432	0.328
4	0.020	0.031	0.365	0.328
5	0.070	0.064	0.342	0.298
6	0.030	0.042	0.216	0.318
7	0.042	0.031	0.426	0.328
8	0.023	0.028	0.235	0.251
9	0.032	0.035	0.252	0.315
10	0.043	0.040	0.424	0.402
11	0.000	0.001	0.302	0.296
12	0.018	0.018	0.178	0.170
13	0.017	0.005	0.251	0.237
14	0.088	0.082	0.402	0.358
15	0.052	0.049	0.545	0.522
16	0.040	0.036	0.395	0.412
17	0.031	0.035	0.256	0.313

^aValores experimentales.

^bValores de predicción.

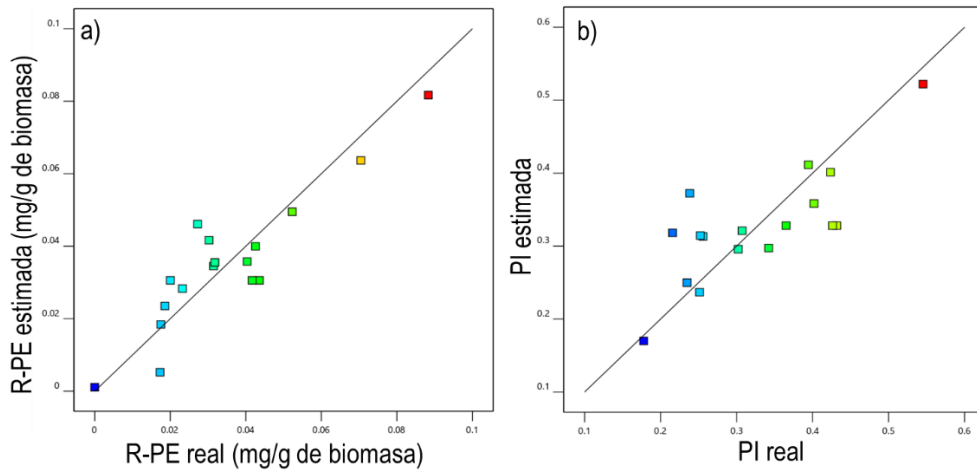


Figura 17. Valores pronosticados versus la respuesta real en el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica de a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP.

La Figura 18a muestra el efecto de la concentración y volumen del buffer en el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, donde se aprecia que los resultados más altos corresponden a una mayor concentración y menor volumen de buffer. En los valores de IP (Fig. 18b) la tendencia fue similar a los obtenidos en R-PE.

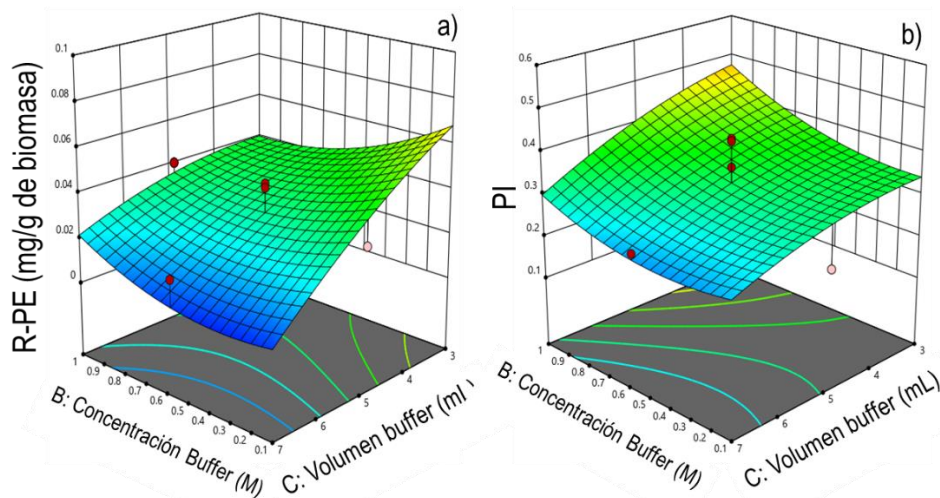


Figura 18. Efecto de la concentración (M) y volumen (mL) del buffer en a) R-PE (mg g^{-1} biomasa) e b) IP con maceración y sonda ultrasónica.

Los resultados obtenidos mostraron que la maceración es un método eficiente por sí solo o combinado con el baño ultrasónico. El uso de buffer 0.1 M es también parte de las condiciones óptimas encontradas, mientras que lo menos significativo fue el tiempo de homogenización. Estos resultados se comparan con lo reportado por Pereira *et al.* (2020b), quienes obtuvieron 3.6 mg R-PE/g de biomasa con la misma concentración de buffer y 10 min de homogenización, pero lo que menos influyó fue el tiempo de homogenización. Sin embargo, utilizaron la macroalga roja *Gracilaria gracilis*, lo cual pudo influir en que los resultados que obtuvieron fueron mayores que con la microalga *P. cruentum*. En los resultados de Mittal *et al.* (2017) se encontró que con la maceración sola y un buffer 0.1 M hubo una producción de 1.19 mg R-PE/g de biomasa, que fueron más altos de los obtenidos, pero utilizaron la macroalga *Gelidium pusillum*. En los estudios anteriores, al utilizarse una macroalga, la ruptura celular fue mayor que con una microalga, por lo que la concentración de R-PE también se incrementó.

En la Fig. 19 se muestran los colores obtenidos de las extracciones de las corridas experimentales. Algunos de los tratamientos con maceración y sonda ultrasónica (Fig. 17c) tuvieron un color ligeramente naranja, por lo que se descartaron al no ser similares al color natural del pigmento. Pereira *et al.* (2020b) mencionan que cuando hay un periodo largo de extracción, esto ocasiona una degradación de PBP, lo cual puede afectar el color. También se ha reportado que el uso de la sonda ultrasónica no dio buenos resultados cuando se empleó sola (Mittal *et al.*, 2017). Sin embargo, los colores más intensos y resultados más altos fueron los experimentos 5 y 14, maceración y

baño ultrasónico con maceración (Fig. 17. 5 a y b, 14 a y b), quienes también mostraron los resultados más altos en la producción de R-PE.

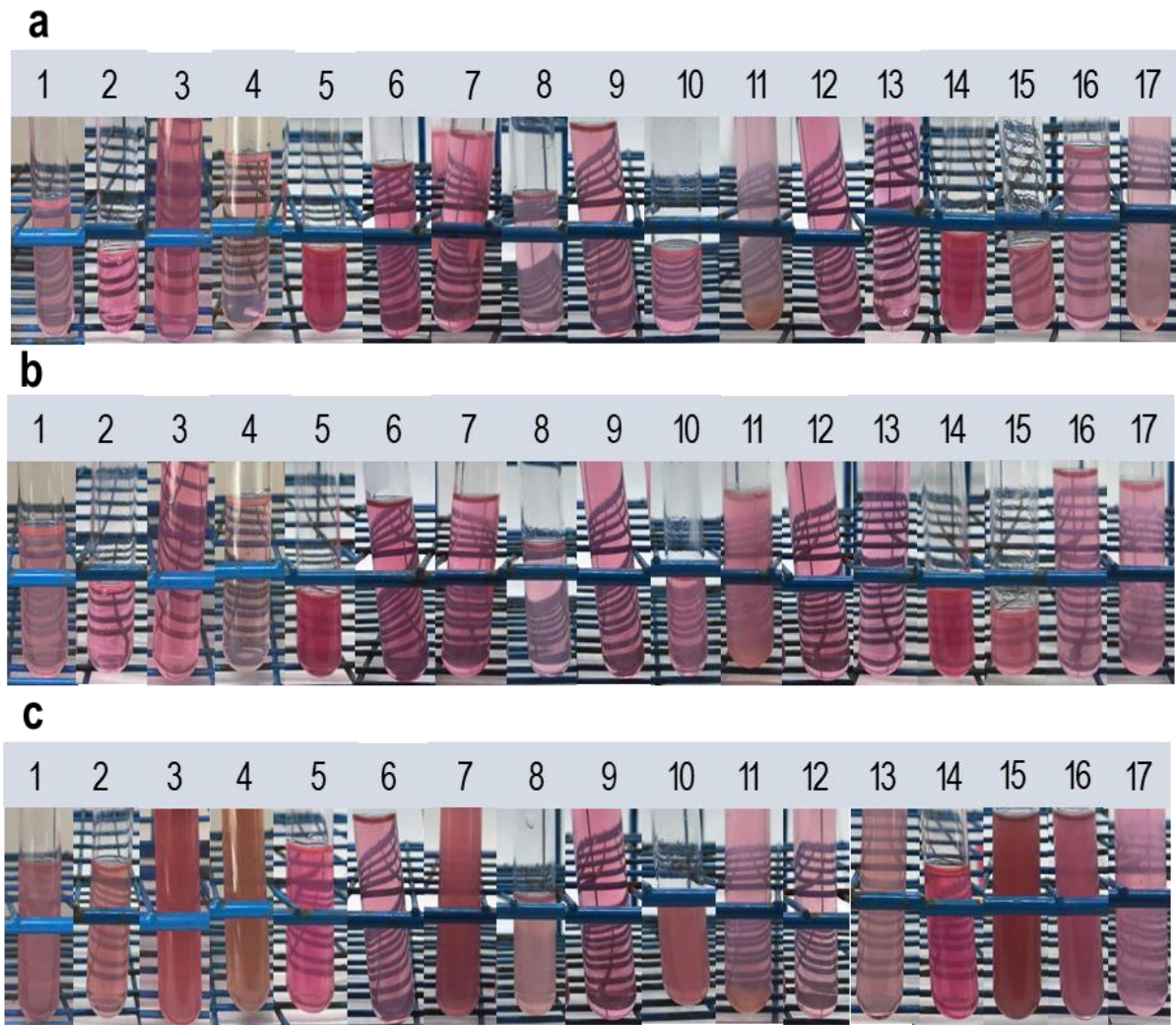


Figura 19. Color de R-PE de las 17 cuantificaciones de R-PE en los tratamientos de: a) Maceración, b) Maceración y baño ultrasónico y c) Maceración y sonda ultrasónica.

4.3.2 Estabilidad de R-PE

4.3.2.1 pH

En pH 5, 7 y 9 no se observó un cambio de color, mientras que a un pH 3 el extracto inicialmente tuvo un color morado (Fig. 20). Aunque los extractos con pH 5, 7 y 9 mostraron una tendencia similar (Fig. 21), se eligió el pH 7 como más estable para evaluarlo bajo diferentes temperaturas. El pH 3 disminuyó su concentración hasta un 50% en las primeras 3 h de almacenamiento. Pereira *et al.* (2020b) tuvieron mayor estabilidad a pH 7 y en las primeras 6 h no hubo diferencia significativa. De igual manera, González-Ramírez *et al.* (2014) en pH 3 tuvieron un cambio de color rosa a morado y una alta inestabilidad.



Figura 20. Extractos de R-PE en diferente pH: 3, 5, 7 y 9.

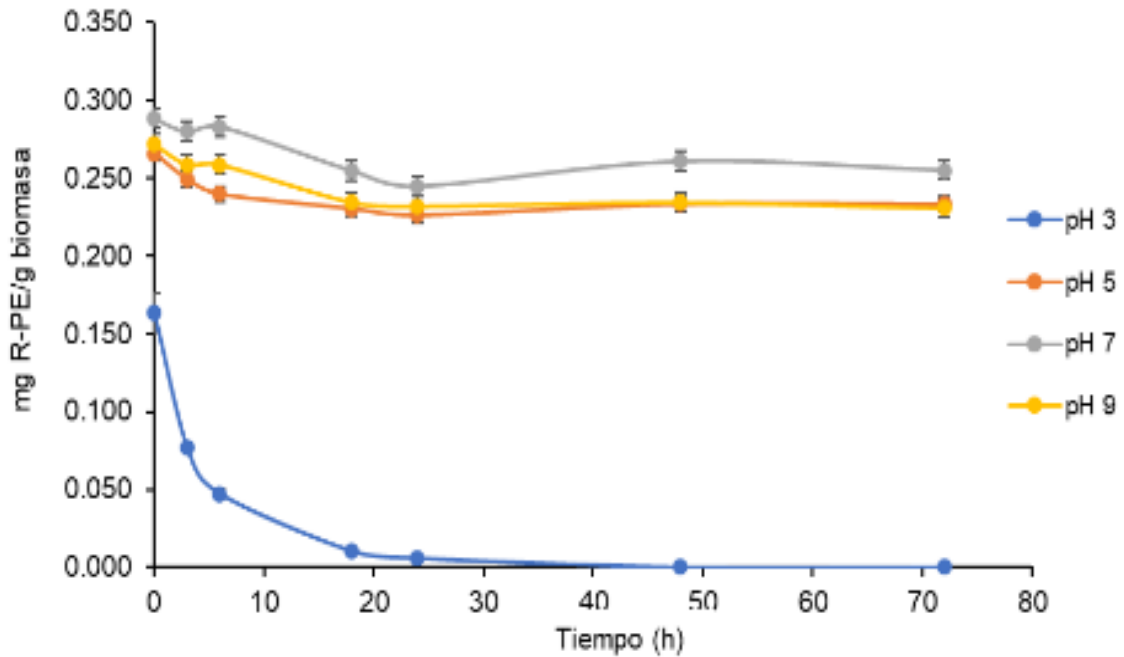


Figura 21. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente pH.

El Cuadro 15 muestra que el extracto en diferentes pH fue significativamente diferente entre tratamientos y en el tiempo de medición, excepto el pH 7 el cual no presentó diferencia estadística durante sus mediciones. El cuadro 16 muestra el IP para el pH 7 el cual no tuvo diferencia, pero si para el resto de los tratamientos, los cuales disminuyeron; además el pH 3 no se mantuvo en una pureza grado alimenticio.

Cuadro 15. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente pH.

T (h)	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
0	0.16±0.01 ^{cA}	0.26±0.01 ^{bA}	0.29±0.01 ^{aA}	0.27±0.01 ^{abA}
3	0.08±0.00 ^{cB}	0.25±0.01 ^{bAB}	0.28±0.01 ^{aAB}	0.26±0.01 ^{bB}
6	0.05±0.00 ^{dC}	0.24±0.01 ^{cBC}	0.28±0.00 ^{aA}	0.26±0.01 ^{bB}
18	0.01±0.00 ^{cD}	0.23±0.01 ^{bBC}	0.25±0.00 ^{aC}	0.23±0.00 ^{bC}
24	0.00±0.00 ^{cD}	0.22±0.01 ^{bC}	0.24±0.01 ^{aC}	0.23±0.01 ^{abC}
48	0.00±0.00 ^{cD}	0.23±0.01 ^{bBC}	0.26±0.01 ^{aBC}	0.23±0.01 ^{bC}
72	0.00±0.00 ^{cD}	0.23±0.01 ^{bBC}	0.25±0.01 ^{aC}	0.23±0.01 ^{bC}

*Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

*Superíndice en mayúscula significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de medición.

Cuadro 16. IP de la concentración de R-PE en el ensayo de estabilidad en diferente pH.

pH	0 h	72 h
3	0.75±0.11 ^{bA}	0.27±0.01 ^{dB}
5	0.89±0.01 ^{abA}	0.83±0.02 ^{bB}
7	0.91±0.02 ^{aA}	0.88±0.01 ^{aA}
9	0.89±0.02 ^{abA}	0.79±0.01 ^{cA}

*Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

*Superíndice en mayúscula significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de medición.

4.3.2.2 Temperatura

En la evaluación a diferentes temperaturas, con 100°C se perdió el color completamente en las primeras 3 h. Con 60°C hubo una disminución del color, mientras que 4, 20 y 40°C tuvieron un comportamiento similar al mantenerse a pesar de la diferencia de temperatura (Fig. 22). En el cuadro 17 se observa que las temperaturas que tuvieron menos diferencia estadística significativa fueron 40°C seguida por 4°C durante los 3 días de medición. El IP inicial fue de 0.88 y el cuadro 18 muestra los valores después de 72 h. El extracto a 60 y 100°C fueron diferentes estadísticamente y estuvieron por debajo del IP para considerarse grado alimenticio. Munier *et al.* (2014) tuvieron resultados estables hasta 40°C. Los cambios visibles en el extracto fueron cuando se alcanzaron 45-50°C. Mientras que Pereira *et al.* (2020b) incorporaron R-PE en hot cakes (75°C) y vieron una pérdida del color durante la cocción.

Cuadro 17. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferentes temperaturas.

T (h)	4°C	20°C	40°C	60°C	100°C
0	0.23±0.06 ^{aA}	0.23±0.06 ^{aA}	0.23±0.06 ^{aA}	0.23±0.06 ^{aA}	0.23±0.06 ^{aA}
3	0.18±0.02 ^{bcA}	0.23±0.02 ^{aA}	0.20±0.02 ^{aA}	0.15±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}
6	0.21±0.02 ^{aA}	0.20±0.00 ^{aA}	0.21±0.02 ^{aA}	0.15±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}
18	0.21±0.01 ^{aA}	0.19±0.01 ^{bA}	0.21±0.00 ^{aA}	0.14±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}
24	0.21±0.04 ^{aA}	0.18±0.01 ^{abA}	0.20±0.02 ^{aA}	0.14±0.01 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}
48	0.23±0.01 ^{aA}	0.20±0.02 ^{aA}	0.22±0.00 ^{aA}	0.14±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}
72	0.21±0.02 ^{aA}	0.21±0.01 ^{aA}	0.22±0.00 ^{aA}	0.13±0.01 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}

*Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

*Superíndice en mayúscula significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de medición.

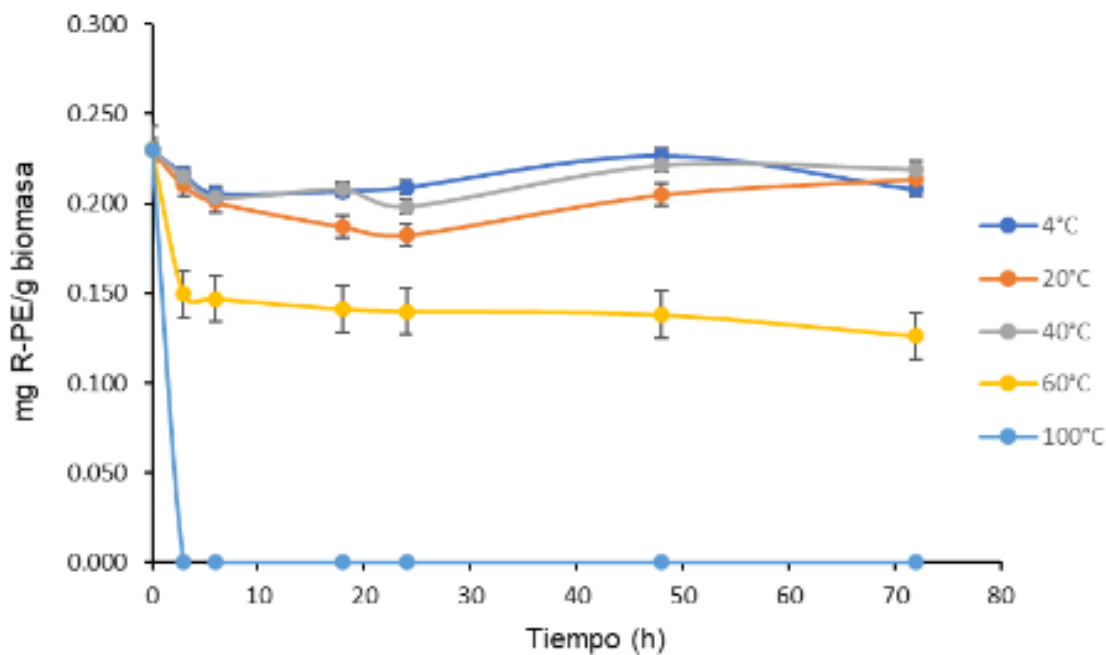


Figura 22. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en diferente temperatura.

Cuadro 18. IP del extracto de R-PE en el ensayo de estabilidad en diferentes temperaturas.

T	72 h
4°C	0.84±0.02 ^{aA}
20°C	0.85±0.04 ^{aA}
40°C	0.84±0.06 ^{aA}
60°C	0.56±0.05 ^{bB}
100°C	0.21±0.04 ^{cB}

*Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

*Superíndice en mayúscula significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de edición.

4.3.2.3 Luz

Cuando el extracto de R-PE estuvo expuesto a la luz a 4°C fue estable hasta las 6 h y sin diferencia. En el cuadro 19 se aprecia que a las 18 h tuvo una disminución estadísticamente significativa y al llegar a 72 h se perdió el color totalmente (Fig. 23 y 24). El IP (Cuadro 20) también fue diferente estadísticamente. Munier *et al.* (2014) observaron una disminución del 68% de R-PE a partir de *P. cruentum* después de 48 h a $79 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

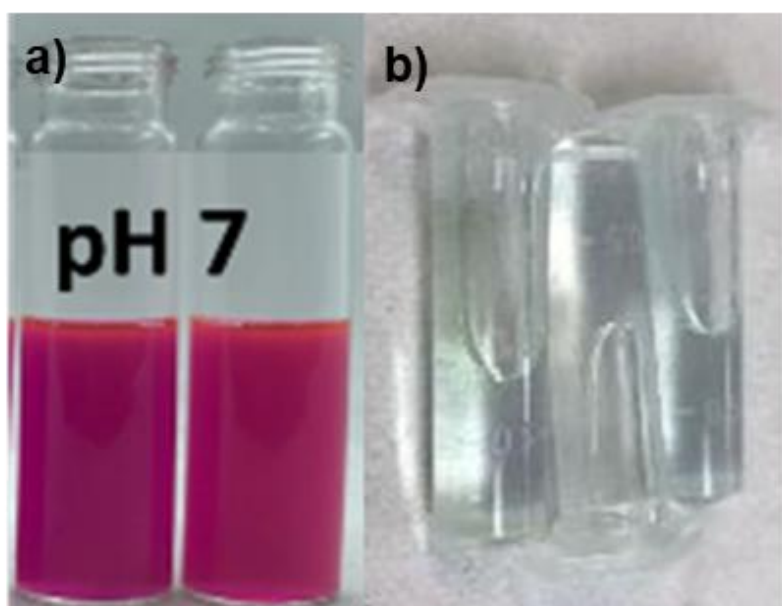


Figura 23. Extracto de R-PE a pH 7 almacenado a 4°C expuesto a luz: a) tiempo inicial y b) 72 h.

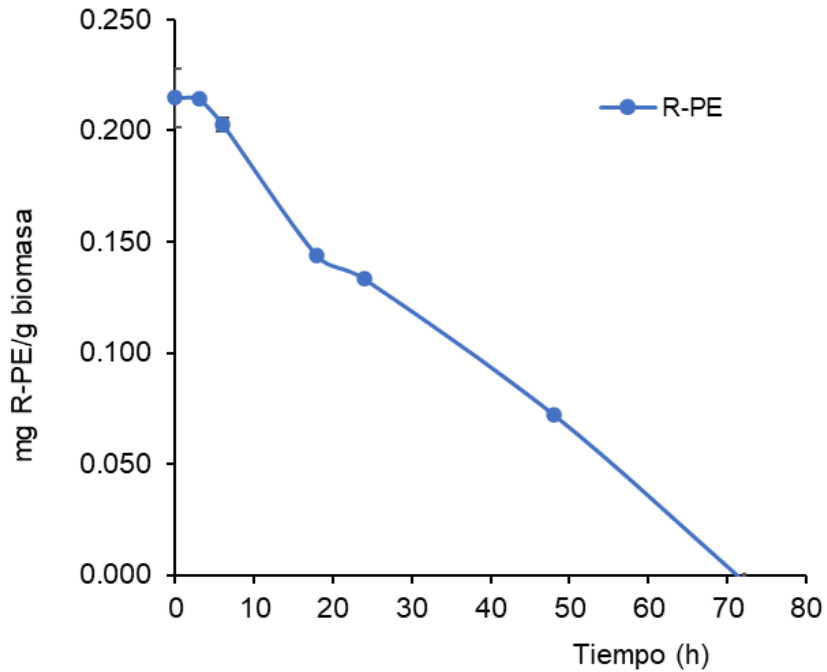


Figura 24. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad en pH 7 almacenado a 4°C con luz durante 72 h.

Cuadro 19. Concentración de R-PE (mg R-PE g⁻¹ biomasa) en el ensayo de estabilidad a pH 7 en 4°C con luz durante 72 h.

T (h)	R-PE (mg g ⁻¹ biomasa)
0	0.21±0.00 ^a
3	0.20±0.01 ^a
6	0.21±0.01 ^a
18	0.14±0.02 ^b
24	0.13±0.02 ^b
48	0.07±0.02 ^c
72	0.00±0.00 ^d

*Superíndice diferente significa diferencia estadística significativa.

Cuadro 20. IP del extracto de R-PE en el ensayo de estabilidad a pH 7 en 4°C con luz durante 72 h.

T (h)	IP
0	0.87 ± 0.03 ^a
72	0.20 ± 0.00 ^b

*Superíndice diferente significa diferencia estadística significativa.

4.4 Tercera etapa: Aplicación de *Porphyridium cruentum* y R-PE en alimentos

4.4.1 Hot Cakes sin Gluten

La Figura 25 muestra el color de la masa de hot cakes antes y después de la cocción para los tres tratamientos. El Cuadro 21 muestra los resultados de pérdida por cocción, pH, humedad y cenizas. La pérdida por cocción y humedad (%) no tuvieron diferencia estadística significativa. Sin embargo, el pH de las muestras se incrementó conforme aumentó la adición de biomasa al igual que el porcentaje de cenizas. Un factor a tomar en cuenta es que el pH del medio donde creció la microalga fue de 8 y este se puede incrementar gradualmente cuando la célula crece debido a la acumulación de CO₂ que produce un aumento en la tasa fotosintética (Chhandama *et al.*, 2021). Figueira *et al.* (2011) elaboraron pan sin gluten con *Spirulina platensis*, pero en cenizas ellos obtuvieron 1.92, 2.16 y 2.11% para el tratamiento control, 2 y 4%, mientras que para humedad fue 52.38, 51.67 y 49.06% respectivamente. Esta diferencia puede ser por la variación en el tipo de muestra. Además, la pérdida por cocción fue mayor a la

reportada por Diprat *et al.* (2020), quienes en un pan sin gluten con *Chlorella sorokiniana* tuvieron 13.4% en sus tratamientos.

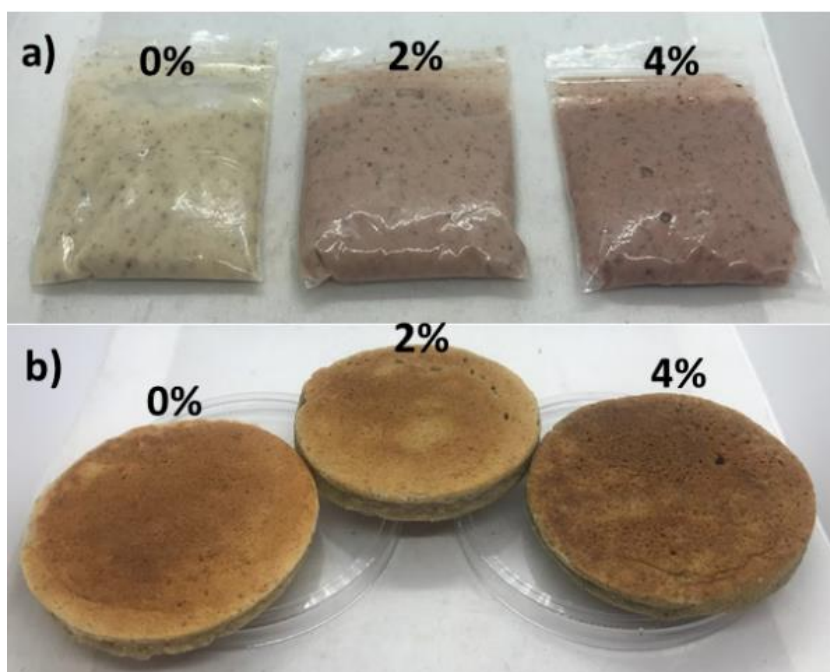


Figura 25. Tratamientos de hot cakes sin gluten adicionados con *Porphyridium cruentum* en: a) masa cruda y b) con cocción.

Cuadro 21. Propiedades fisicoquímicas de hot cakes sin gluten con *Porphyridium cruentum*.

Parámetro	Control	2%	4%
Pérdida por cocción (%)	22.00±2.11 ^a	22.20±3.05 ^a	22.60±2.99 ^a
pH	6.80±0.01 ^c	8.02±0.04 ^b	8.52±0.04 ^a
Humedad(%)	46.92±0.44 ^a	47.08±0.79 ^a	44.29±2.74 ^a
Cenizas(%)	0.90±0.05 ^c	1.29±0.05 ^b	1.83±0.05 ^a

*Superíndice diferente significa diferencia estadística significativa.

Los resultados de textura de las muestras de hot cakes sin gluten se muestran en el Cuadro 22. La elasticidad, cohesividad y resiliencia no fueron diferentes estadísticamente entre los tratamientos ni en los días de almacenamiento. La incorporación de la microalga hizo que la dureza aumentara conforme se incrementaba en la preparación. Pero para el día 3 disminuyó para el tratamiento control y 2%, pero fue lo opuesto cuando se agregó 4% de *Porphyridium cruentum*. Un comportamiento similar presentó la gomosidad y masticabilidad, ya que disminuyeron del día cero al tres en el tratamiento control y 2% pero aumentaron con 4% de microalga. Todos los valores de cohesividad fueron menores a 1. Khemiri *et al.* (2020) tuvieron la misma tendencia, pero ellos utilizaron *Chlamydomonas sp.* y *Nannochloropsis gaditana* en 1 y 3%. Estos resultados en dureza y cohesividad pueden ser ocasionados por la microalga *P. cruentum*, ya que esta no presenta una pared celular como tal, sino que está formada por una membrana constituida de PS y generalmente, la pared celular de las algas comprende más del 40% de estos. Los PS son muy utilizados en la industria alimentaria por potenciar y estabilizar la estructura de los alimentos. La carga negativa de los PS interactúa con los cationes presentes en solventes alimentarios como leche o agua, por lo que esta unión ocasiona la gelificación (Muthukumar *et al.*, 2021).

Cuadro 22. Efecto de *Porphyridium cruentum* en los atributos de textura de hot cakes sin gluten.

T	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad	Masticabilidad	Resiliencia
Día 0						
Control	122.00±	0.92±	0.87±	10792±	9973±	0.57±
	52.10 ^{aA}	0.01 ^{aA}	0.03 ^{aA}	4378 ^{aA}	403 ^{aA}	0.02 ^{aB}
2%	38.20±	0.92±	0.90±	3493±	3200±	0.59±
	4.70 ^{bA}	0.01 ^{aA}	0.01 ^{aA}	393 ^{bA}	346 ^{bA}	0.01 ^{aB}
4%	28.12±	0.91±	0.89±	2546±	2317±	0.58±
	9.91 ^{bB}	0.02 ^{aB}	0.00 ^{aA}	888 ^{bA}	841 ^{bA}	0.01 ^{aA}
Día 3						
Control	27.30±	1.02±	0.90±	1489±	1202±	0.65±
	18.30 ^{aB}	0.07 ^{aA}	0.02 ^{aA}	351 ^{bB}	94 ^{bB}	0.02 ^{aA}
2%	11.36±	1.07±	0.91±	1385±	1484±	0.63±
	4.90 ^{aB}	0.14 ^{aA}	0.02 ^{aA}	163 ^{bB}	251 ^{bB}	0.01 ^{aA}
4%	37.40±	0.96±	0.84±	3786±	3662±	0.57±
	17.00 ^{aA}	0.02 ^{aA}	0.07 ^{aA}	148 ^{aA}	95 ^{aA}	0.10 ^{aA}

* Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de medición.







*Superíndice en mayúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

El Cuadro 23 muestra los resultados de color donde los valores de L* a* y b* disminuyeron conforme se agregó la biomasa de microalgas. La luminosidad solo fue diferente estadísticamente en el tratamiento 4% en el tiempo 0. El tratamiento control y 2% disminuyó su luminosidad conforme los días de almacenamiento. En el valor de a* no hubo diferencia significativa en el día 3 pero si en el día de elaboración, en todos los tratamientos hubo un incremento en sus valores del día cero a tres. Esto

fue similar para el valor b* quien tampoco fue diferente en el día 3, pero si disminuyeron los valores en el tratamiento control y 2%. En los resultados de Rózyło *et al.* (2017), L* y b* también disminuyeron al agregar algas pardas a un pan sin gluten.

La Figura 26 y el Cuadro 24 muestran los resultados de la evaluación sensorial, los cuales no tuvieron diferencia estadística significativa entre ninguno de los tratamientos en las variables evaluadas. Esto indicó que el tratamiento con 4% de *Porphyridium cruentum* tuvo buena aceptación por parte de los panelistas.

Cuadro 23. Efecto de *Porphyridium cruentum* en el color de los hot cakes sin gluten.

T	Variable ¹					Vista
	L*	a*	b*	C*	H*	
Día 0						
Control	45.66±	13.11±	25.99±	29.14±	63.06±	
	3.21 ^{aA}	0.08 ^{aB}	3.00 ^{aA}	2.62 ^{aA}	2.84 ^{aA}	
2%	43.80±	11.18±	24.22±	26.68±	65.21±	
	1.37 ^{aA}	0.26 ^{bA}	0.92 ^{abB}	0.74 ^{aA}	1.28 ^{aA}	
4%	38.31±	10.28±	19.65±	22.19±	62.39±	
	0.87 ^{bB}	0.79 ^{bA}	0.63 ^{bB}	0.51 ^{bB}	2.26 ^{aA}	
Día 3						
Control	41.27±	15.07±	22.37±	27.00±	55.83±	
	3.15 ^{aA}	0.55 ^{aA}	2.70 ^{aA}	2.34 ^{aA}	3.01 ^{aB}	
2%	40.83±	13.27±	22.50±	26.33±	59.30±	
	7.18 ^{aA}	3.06 ^{aA}	2.44 ^{aB}	0.45 ^{aA}	8.49 ^{aA}	
4%	44.77±	12.07±	23.47±	26.47±	62.67±	
	2.55 ^{aA}	1.70 ^{aA}	1.57 ^{aA}	0.67 ^{aA}	4.83 ^{aA}	

¹L=luminosidad; a=tendencia a rojo; b=tendencia a amarillo; Cromo=saturación; Hue=Tono

* Superíndice en minúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de medición.

*Superíndice en mayúscula diferente significa diferencia estadística significativa entre tiempo de medición en el mismo tratamiento.

Cuadro 24. Puntuaciones de la evaluación sensorial de hot cakes sin gluten con *Porphyridium cruentum*.

Tratamiento	Olor	Color	Sabor	Dureza	Aceptabilidad general
Control	5.24±1.20 ^a	3.92±1.32 ^a	4.36±1.19 ^a	4.20±1.26 ^a	4.44±0.96 ^a
2%	4.96±1.69 ^a	4.24±1.53 ^a	4.80±1.50 ^a	4.24±1.61 ^a	4.32±1.49 ^a
4%	5.44±1.12 ^a	4.24±1.64 ^a	5.28±1.40 ^a	4.72±1.51 ^a	4.68±1.41 ^a

*Superíndice diferente significa diferencia estadística significativa.

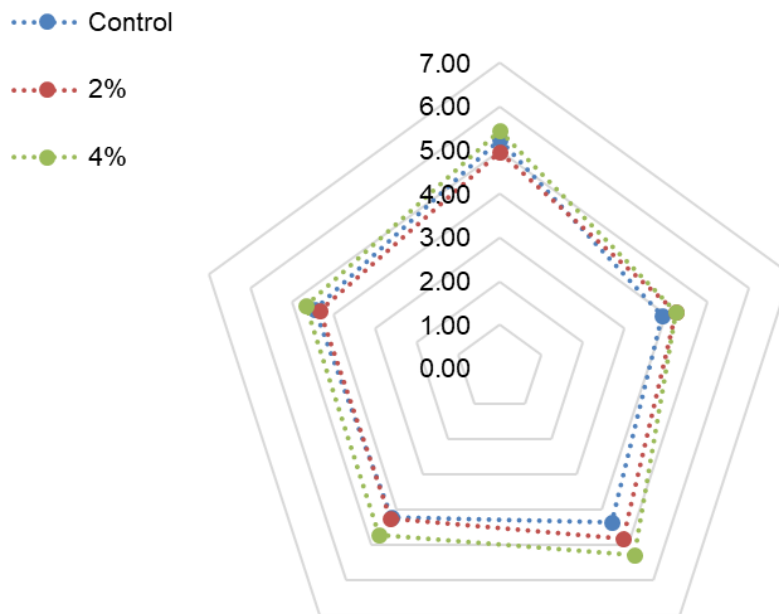


Figura 26. Puntuaciones de la evaluación sensorial de los hot cakes sin gluten con *Porphyridium cruentum*.

4.4.2 Yogur

La figura 27 muestra el color inicial y final de cada uno de los tratamientos. Los valores de L^* observados en la figura 28a muestran un comportamiento similar en la estabilidad del color, el cual no tuvo un cambio notorio. Sin embargo, el valor de a^* (Fig. 28b) se mantuvo estable hasta el día 6 posteriormente fue disminuyendo hasta el final de la experimentación (21 días), esto debido a una degradación escalonada del pigmento ocasionado por la fermentación del yogurt. Por su parte, L^* fue estable debido a la capacidad antioxidante de la R-PE, pero el valor de a^* no tuvo los mismos resultados ya que el pigmento es propenso a una fácil decoloración en condiciones extremas como luz intensa o un pH inapropiado (Zhang *et al.*, 2023). Pereira *et al.* (2020b) también evaluaron la estabilidad en yogurt y observaron un color visible durante 2 meses a 4°C. García *et al.* (2021) tuvieron valores de L^* y a^* estables durante 11 días también en yogurt.

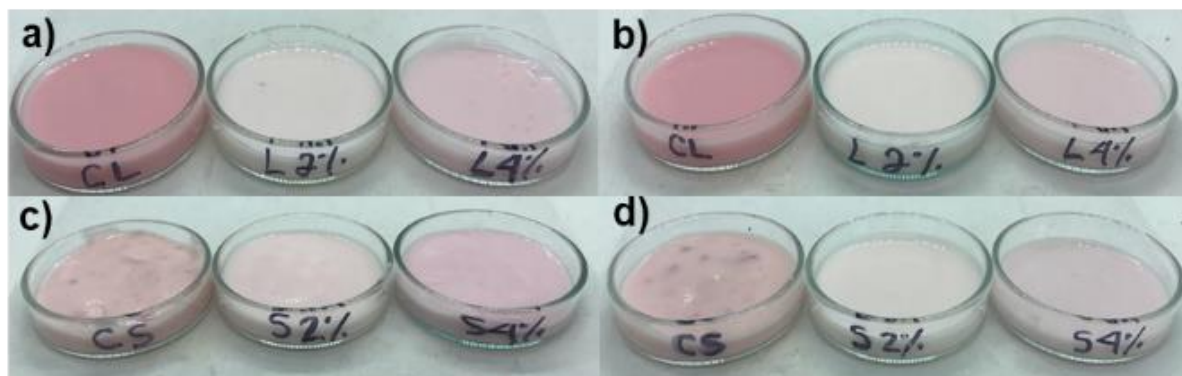


Figura 27. Color de las muestras en yogurt comercial, 2 y 4% de R-PE: a) T-0 yogurt líquido, b) T-21 yogurt líquido, c) T-0 yogurt sólido y d) T-21 yogurt sólido.

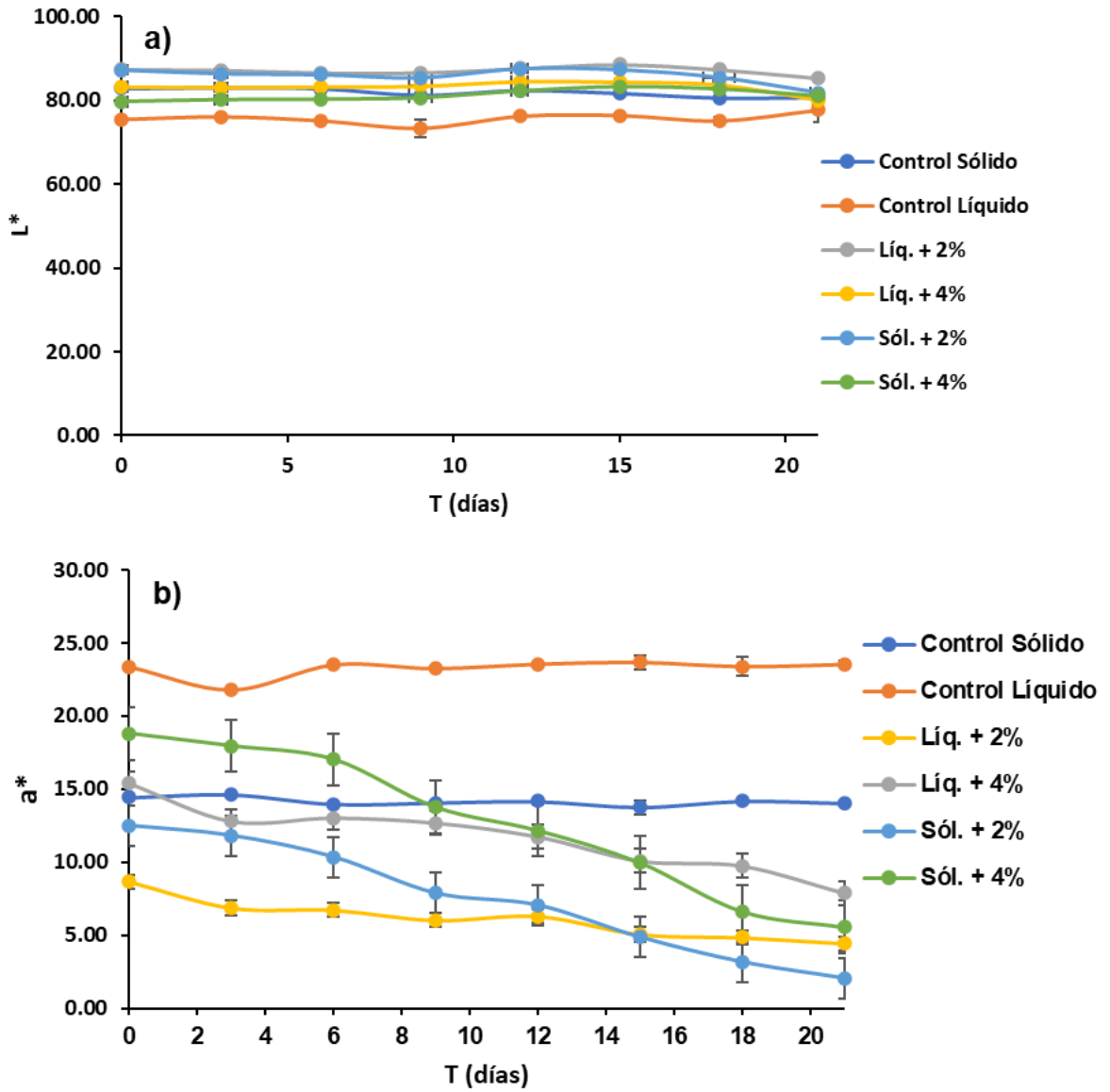


Figura 28. Cambios de color a) L^* y b) a^* durante 21 días de almacenamiento a 4°C de las muestras de yogur comercial, 2 y 4% de R-PE en yogur líquido y sólido.

5 CONCLUSIONES

1. El bicarbonato de sodio (10 g L^{-1}) ayudó al crecimiento de la biomasa de *Porphyridium cruentum*.
2. Para la optimización del cultivo se puede obtener un rendimiento de biomasa de 6.75 g L^{-1} con pH 8, 5 g L^{-1} de bicarbonato de sodio y una concentración inicial de 0.7 g L^{-1} en 14 días. En la producción de R-PE e IP, una concentración de carbono baja (5 g L^{-1}) incrementó la concentración de biomasa final.
3. En la optimización de los métodos de extracción de R-PE, la maceración y el baño ultrasónico con maceración resultaron ser los mejores para potencializar la extracción de R-PE.
4. Con el tratamiento de maceración con 10 min de homogenización y 3 mL de buffer 0.1 M se obtuvieron 0.099 mg R-PE/g y un IP de 0.48. Cuando también se utilizó baño ultrasónico con 5 min de homogenización y 3 mL de buffer 0.1 M se alcanzaron 0.097 mg R-PE/g y una pureza de 0.44.
5. El extracto de R-PE mostró estabilidad a pH 7 y a una temperatura de 4 y 40°C , pero no cuando fue expuesto a la luz.
6. La evaluación sensorial de los hot cakes sin gluten no tuvo diferencias significativas, se obtuvo una aceptación al agregar 4% de *Porphyridium cruentum*.

7. Al aplicar R-PE en un producto lácteo, mostró estabilidad en L* durante 21 días a 4°C, pero después del día 6 el valor de a* disminuyó.
8. Los resultados mostraron el potencial de los métodos de extracción en la biomasa de *P. cruentum* para ser una buena fuente de R-PE y usarse como un colorante alimenticio natural.

6 BIBLIOGRAFÍA

AOAC (Ed.). 1995. Official Methods of Analysis of the association of analytical chemists international (16th ed.). Arlington: AOAC International.

Arredondo, B. O., B. Cordero y D. Voltolina. 2017. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. En: B. O. Arredondo y D. Voltolina (ed.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigadores Biológicas del Noroeste, S. C. pp. 27-34.

Balaraman, H. B., A. Sivasubramanian and S. K. Rathnasamy. 2021. Sustainable valorization of meat processing wastewater with synergetic eutectic mixture based purification of R-Phycoerythrin from *porphyridium cruentum*. Bioresource Technology. 336: 1-10.

Bennett, A. and L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. Journal Cell Biology. 58: 419-435.

Bermejo-Román, R., J. M. Álvarez-Pez, F. G. Ación-Fernández and E. Molina-Grima. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology. 93: 73-85.

- Bligh, G. E. and J. W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Caporgno, M. and A. Mathys. 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in nutrition*. 5: 1-10.
- Carina, D., S. Sharma, A. K. Jaiswal and S. Jaiswal. 2021. Seaweeds polysaccharides in active food packaging: A review of recent progress. *Trends in Food Science & Technology*. 110: 559-572.
- Chang, J., K. Le, X. Song, K. Jiao, X. Zeng, X. Ling, T. Shi, X. Tang, Y. Sun and L. Lin. 2017. Scale-up cultivation enhanced arachidonic acid accumulation by red microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 40: 1763-1773.
- Chhandama, M. V. L., K. B. Satyan, B. Changmai, C. Vanlalveni and S. L. Rokhum. 2021. Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*. 15: 1-13.
- Daneshvar, E., Y. S. Ok, S. Tavakoli, B. Sarkar, S. M. Shaheen, H. Hong, Y. Luo, J. Rinklebe, H. Song and A. Bhatnagar. 2021. Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*. 329: 1-16.
- Diprat, A. B., R. C. Silveira, E. Rodrigues and R. Rech. 2020. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. *Food Science and Technology*. 134: 1-7.

- Duarte, J. H., L. G. Cardoso, C. O. Souza, I. L. Nunes, J. I. Druzian, M. G. Morais and J. A. Vieira. 2019. Brackish Groundwater from Brazilian Backlands in *Spirulina* Cultures: Potential of Carbohydrate and Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 190: 907-917.
- Enzing, C., M. Ploeg, M. Barbosa, and L. Sijtsma. 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Joint Research Centre. 82 p.
- Erol U., H. B., M. L. Menegazzo, H. Sandefur, E. Gottberg, J. Vaden and J. Hestekin. 2020. *Porphyridium cruentum* Grown in Ultra-Filtered Swine Wastewater and Its Effects on Microalgae Growth Productivity and Fatty Acid Composition. *Energies*. 13: 1-9.
- Figueira, F., T. M. Crizel, C. R. Silva and M. M. Salas-Mellado. 2011. Elaboration of gluten-free bread enriched with the microalgae *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Food Technology*. 14 (4): 308-316.
- Fleurence, J. 2003. R-phycoerythrin from red macroalgae: strategies for extraction and potential application in biotechnology. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*. 1 (1): 1-7.
- Gaignard, C., N. Gargouch, P. Dubessay, C. Delattre, G. Pierre, C. Laroche, I. Fendri, S. Abdelkafi and P. Michaud. 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*. 37: 193-222.
- García, A. B., E. Longo, M. C. Murillo and R. Bermejo. 2021. Using a B-Phycoerythrin Extract as a Natural Colorant: Application in Milk-Based Products. *Molecules*. 26: 1-13.

- García-Camacho, F., A. Contreras G., T. M. Sobczuk and E. Molina-Grima. 2000. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochemistry*. 35: 1045-1050.
- Geada, P., C. Moreira, M. Silva, R. Nunes, L. Madureira, C. Rocha, R. Pereira, A. Vicente and J. A. Teixeira. 2021. Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties. *Bioresource Technology*. 332: 1-22.
- González-Ramírez, E., M. Andújar-Sánchez, E. Ortiz-Salmerón, J. Bacarizo, C. Cuadri, T. Mazzuca-Sobczuk, M. Ibañez, A. Cámara-Artigas and S. Martínez-Rodríguez. 2014. Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. *Food Biophysics*, 9, 184-192.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Cultures of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press. 26-60 pp.
- Han, S., M. Jeon, Y. Heo, S. Kim and Y. Choi. 2020. Effect of *Pseudoalteromonas* sp. MEBiC 03485 on biomass production and sulfated polysaccharide biosynthesis in *Porphyridium cruentum* UTEX 161. *Bioresource Technology*. 302: 1-8.
- Han, S., M. Jeon, Y. Park, S. Kim and Y. Choi. 2021. Semi-continuous immobilized cultivation of *Porphyridium cruentum* for sulfated polysaccharides production. *Bioresource Technology*. 341: 1-12.

- Hsieh-Lo, M., G. Castillo, M. A. Ochoa-Becerra and L. Mojica. 2019. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve Production yield and chemical stability. *Algal Research*. 42: 1-11.
- Huang, Z., C. Zhong, J. Dai, S. Li, M. Zheng, Y. He, M. Wang and B. Chen. 2021. Simultaneous enhancement on renewable bioactive compounds from *Porphyridium cruentum* via a novel two-stage cultivation. *Algal Research*. 55: 1-10.
- Humphrey, G. F. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology*. 40: 63-70.
- Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiology Pflanze*. 167: 191-194.
- Ji, L., Y. Liu, J. Luo and J. Fan. 2022. Freeze-thaw-assisted aqueous two-phase system as a green and low-cost option for analytical grade B-phycoerythrin production from unicellular microalgae *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*. 67: 1-15.
- Jiao, K., W. Xiao, Y. Xu, X. Zeng, S. Ho, E. A. Laws, Y. Lu, X. Ling, T. Shi, Y. Sun, X. Tang and L. Lin. 2018. Using a trait-based approach to optimize mixotrophic growth of the red microalga *Porphyridium purpureum* towards fatty acid production. *Biotechnology for Biofuels*. 11: 1-11.
- Kavitha, M., S. Kathiresan, S. Bhattacharya and R. Sarada. 2016. Culture media optimization of *Porphyridium purpureum*: production potential of biomass, total

- lipids, arachidonic and eicosapentaenoic acid. *J. Food Sci Technol.* 53 (5): 2270-2278.
- Khemiri, S., N. Khelifi, M. C. Nunes, A. Ferreira, L. Gouveia, I. Smaali and A. Raymundo. 2020. Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research.* 50: 1-13.
- Koutra, E., C. Economou, P. Tsafrakidou and M. Kornaros. 2018. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology.* 36: 819-833.
- Kumar, V., N. Sharma, K. K. Jaiswal, M. S. Vlaskin, M. Nanda, M. K. Tripathi and S. Kumar. 2021. Microalgae with a truncated light-harvesting antenna to maximize photosynthetic efficiency and biomass productivity: Recent advances and current challenges. *Process Biochemistry.* 104: 83-91.
- Kumaran, J., S. Poulouse, V. Joseph and I. S. Bright S. 2021. Enhanced biomass production and proximate composition of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by optimization of medium composition and culture conditions using response surface methodology. *Animal Feed Science and Technology.* 271: 1-15.
- Lee, M., H. Yeh, F. Jhang, P. Lee, Y. Lin and F. Nan. 2021. Enhancing growth, phycoerythrin production, and pigment composition in the red alga *Coelaconema* sp. Through optimal environmental conditions in an indoor system. *Bioresource Technology.* 333: 1-11.
- Levasseur, W., P. Perré and V. Pozzobon. 2020. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances.* 41: 1-21.

- Lauceri, R., G. C. Zittelli and G. Torzillo. 2019. A simple method for rapid purification of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* and *Porphyridium cruentum* biomass. *Algal Research*. 44: 1-17.
- Li, S., L. Ji, Q. Shi, H. Wu and J. Fan. 2019. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresource Technology*. 292: 1-16.
- Li, W., Y. Pu, Z. Tang, F. Zhao, M. Xie and S. Qin. 2020. Energy transfer dynamics in B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium purpureum*. *Chinese Journal of Physics* 66: 24-35.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193: 265-272.
- Lugo, O., T. Zenteno S., F. Hernández U. & B. O. Arredondo V. 2017. Determinación de la capacidad antioxidante por métodos espectrofotométricos. En: B. O. Arredondo y D. Voltolina (ed.). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigadores Biológicas del Noroeste, S. C. pp. 111-115.
- Luo, S., X. Yan, Y. Fu, M. Pang, R. Chen, Y. Liu, J. Chen and C. Liu. 2021. The quality of gluten-free bread made of brown rice flour prepared by low temperature impact mill. *Food Chemistry*. 348, 1-8.
- Marcati, A., A. V. Ursu, C. Laroche, N. Soanen, L. Marchal, S. Jubeau, G. Djelveh and P. Michaud. 2014. Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Research*. 0: 1-6.

- Martínez, J. M., C. Delso, I. Álvarez and J. Raso. 2019. Pulsed electric field permeabilization and extraction of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Algal Research*. 37: 51-56.
- Mittal, R., H. A. Tavanandi, V. A. Mantri and K. S. M. S. Raghavarao. 2017. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macroalgae, *Gelidium pusillum* (*Rhodophyta*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 38: 92-103.
- Mittal, R., A. G. Lamdande, R. Sharma and K. Raghavarao. 2020. Membrane processing for purification of R-Phycoerythrin from marine macro-alga, *Gelidium pusillum* and process integration. *Separation and Purification Technology*. 252: 1-11.
- Miyabe, Y., T. Furuta, T. Takeda, G. Kanno, T. Shimizu, Y. Tanaka, Z. Gai, H. Yasui and H. Kishimura. 2016. Structural Properties of Phycoerythrin from *Dulse Palmaria palmata*. *Journal of Food Biochemistry*. 41: 1-11.
- Montoya, E. J. O., S. Dorion, L. Atehortua-Garcés and J. Rivoal. 2021. Phycobilin heterologous production from the *Rhodophyta Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*. 341: 30-42.
- Morales, M., C. Aflalo and O. Bernard. 2021. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*. 150: 1-25.
- Munier, M., S. Jubeau, A. Wijaya, M. Morançais, J. Dumay, L. Marchal, P. Jaouen and J. Fleurence. 2014. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*. 150: 400-407.

- Munier, M., M. Morancais, J. Dumay, P. Jaouen and J. Fleurence. 2015. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B*. 0: 1-31.
- Muthukumar, J., R. Chidambaram and S. Sivaramakrishnan. 2021. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries -A review. *J. Food Sci. Technol.* 58, 7: 2453-2466.
- Oh, S., J. G. Han, Y. Kim, J. H. Ha, S. S. Kim, M. H. Jeong, H. S. Jeong, N. Y. Kim, J. S. Cho, W. B. Yoon, S. Y. Lee, D. H. Kang and H. Y. Lee. 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108: 429-434.
- Parada, A. y M. Araya. 2010. El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celíaca. *Rev. Med. Chile.* 138: 1319-1325.
- Parsons, T. R., Y. Maita and C. M. Lalli. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press. 173 pp.
- Patel, S., R. Sonani, K. Jakharia, B. Bhastana, H. Patel, M. Chaubey, N. Singh and D. Madamwar. 2018. Antioxidant activity and associated structural attributes of *Halomicronema* phycoerythrin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 111: 359-369.
- Pereira, T., S. Barroso, S. Mendes and M. M. Gil. 2020a. Stability, kinetics, and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis*. *Journal of Food Science*. 0: 1-5.

- Pereira, T., S. Barroso, S. Mendes, R. Amaral, J. Dias, T. Baptista, J. Saraiva, N. Alves and M. Gil. 2020b. Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. *Food Chemistry*. 321: 1-9.
- Plaza, M., M. Herrero, A. Cifuentes and E. Ibáñez. 2009. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 7159-7170.
- Přibyl, P. and V. Cepák. 2019. Screening for heterotrophy in microalgae of various taxonomic positions and potential of mixotrophy for production of high-value compounds. *Journal of Applied Phycology*, 31: 1555-1564.
- Pulz, O. and W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-648.
- Raposo, M., A. Morais and R. Morais. 2015. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine Drugs*. 13: 2967-3028.
- Reboloso-Fuentes, M. M., G. G. Acién-Fernández., J. A. Sánchez-Pérez. and J. L. Guill-Guerrero. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*. 70: 345-353.
- Rendón C., L., C. Ramírez and Y. Vélez. 2013. *Microalgas para la industria alimenticia*. 1^a. Ed. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. 71 p.
- Różyło, R., W. H. Hassoon, U. Gawlik-Dziki, M. Siastala and D. Dziki. 2017. Study on the physical and antioxidant properties of gluten-free bread with brown algae. *Journal of Food*. 15, 2: 196-203.

- Silva, L. A., K. R. Kuhn, C. C. Moraes, C. A. V. Burkert and S. J. Kalil. 2009. Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. Journal of the Brazilian Chemical Society 20: 5-12.
- Simovic, A., S. Combet, T. C. Velickovic, M. Nikolic and S. Minic. 2022. Probing the stability of the food colourant R-phycoerythrin from dried Nori flakes. Food Chemistry. 374: 1-10.
- Soanen, N., E. Da Silva, C. Gardarin, P. Michaud and C. Laroche. 2016. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. Bioresource Technology. 213: 231-238.
- Sobezuk, T., F. García C., E. Molina G. and Y. Chisti. 2006. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. Bioprocess
- Strickland, J. D. and T. R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis Pigments analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. Fish Resource Building Canada Bulletin. 167: 185-199.
- Tran, T., E. Denimal, C. Lafarge, L. Journaux, J. A. Lee, P. Winckler, J. Perrier-Cornet, R. Pradelles, C. Loupiac and N. Cayot. 2019. Effect of high hydrostatic pressure on extraction of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*: Use of confocal microscopy and image processing. Algal Research. 38: 1-8.
- Vo, H. N. P., H. H. Ngo, W. Guo, Y. Liu, S. W. Chang, D. D. S. Nguyen, X. Zhang, H. Liang and S. Xue. 2020. Selective carbon sources and salinities enhance enzymes and extracellular polymeric substances extrusion of *Chlorella* sp. for potential co-metabolism. Bioresource Technology. 303: 1-10.

- Xu, K., X. Zou, W. Chang, Y. Qu and Y. Li. 2021. Microalgae harvesting technique using ballasted flotation: A review. *Separation and Purification Technology*. 276: 1-13.
- Xu, Y., K. Jiao, H. Zhong, S. Wu, S. Ho, X. Zeng, J. Li, X. Tang, Y. Sun and L. Lin. 2020. Induced cultivation pattern enhanced the phycoerythrin production in red alga *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 43: 347-355.
- Yemm, E. W. and A. J. Willis. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by antrone. *Biochemistry*. 57: 508-514.
- Zhang, S., Z. Zhang, Y. Dadmohammadi, Y. Li and A. Jaiswal. 2020. Whey protein improves the stability of C-phycoerythrin in acidified conditions during light storage. *Food Chemistry*. 344: 1-8.
- Zhang, Y., L., Zhang, J. Hua, Z. Wang, D. Meng, H. Li, Z. Zhou and R. Yang. 2023. The structural characterization and color stabilization of the pigment protein-phycoerythrin glycosylated with oligochitosan. *Food Hydrocolloids*. 136: 1-8.
- Zhou, X., M. Duan, S. Gao, T. Wang, Y. Wang, X. Wang and Y. Zhou. 2022. A strategy for reducing acrylamide content in wheat bread by combining acidification rate and prerequisite substance content of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Research in Food Science*. 5, 1054-1060.

7 ANEXOS

1. Medio F2 modificado

Componente	Solución stock (g L ⁻¹)	Cantidad
NaCl		18 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	260	10 mL L ⁻¹
KCl	60	10 mL L ⁻¹
NaNO ₃	100	10 mL L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30	10 mL L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	5	10 mL L ⁻¹
NaNO ₃	75	1 mL L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	3.842	1 mL L ⁻¹

2. Solución de elementos traza

Componente	Solución stock (g L ⁻¹)	Cantidad
Na ₂ EDTA	0.436	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.315	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	1 mL L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18	