

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CULTIVO DE *Arthrospira maxima* PARA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE C-FICOCIANINA Y SU ADICIÓN EN ALIMENTACIÓN ANIMAL Y HUMANA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO(A) EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

**PRESENTA:**

**ARELY IRASEMA RUIZ GARCÍA**

**GENERAL ESCOBEDO, N.L.**

**FEBRERO 2024**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CULTIVO DE *Arthrospira maxima* PARA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE C-  
FICOCIANINA Y SU ADICIÓN EN ALIMENTACIÓN ANIMAL Y HUMANA  
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO(A) EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

**PRESENTA:  
ARELY IRASEMA RUIZ GARCÍA**

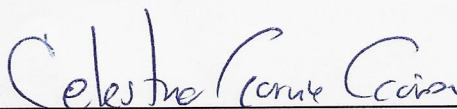
**GENERAL ESCOBEDO, N.L.**

**FEBRERO 2024**

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

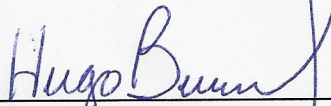
MAESTRO(A) EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS

COMITÉ PARTICULAR



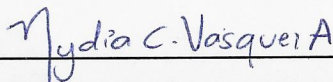
---

Dr. Celestino García Gómez  
Director de Tesis



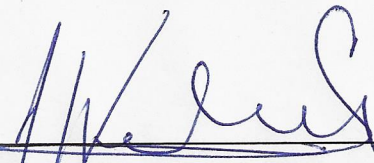
---

Dr. Hugo Bernal Barragán  
Co-Director



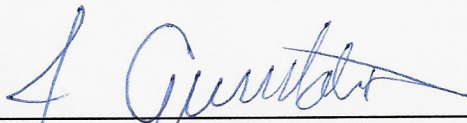
---

Dra. Nydia Corina Vásquez Aguilar  
Asesora



---

Ph.D. Juan Antonio Vidales Contreras  
Asesor



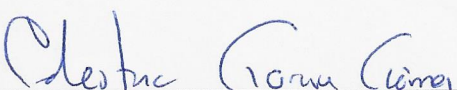
---


Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto  
Subdirectora de Posgrado e Investigación

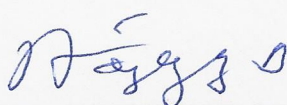
ESTA TESIS FUE APROBADA EN FORMATO, POR EL COMITÉ DE POSGRADO,  
ATENDIENDO A EL ARTÍCULO 123, DEL REGLAMENTO GENERAL DEL  
SISTEMA DE POSGRADO DE LA UANL.

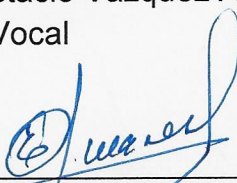
COMITÉ DE POSGRADO

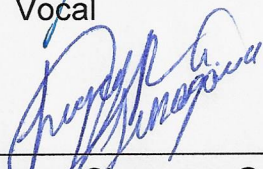
  
Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto  
Presidenta

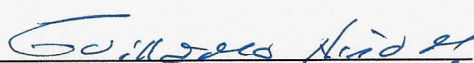
  
Dr. Celestino García Gómez  
Secretario

  
Dra. Lidia Rosaura Salas Cruz  
Vocal

  
Ph.D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado  
Vocal

  
Ph.D. Emilio Olivares Sáenz  
Vocal

  
Dra. Sughey Ramona Sinagawa García  
Vocal

  
Dr. Guillermo Niño Medina  
Vocal

## DEDICATORIA

A mi esposo Edgardo Guerrero por su apoyo incondicional. Gracias por motivarme a crecer profesionalmente y sobre todo por caminar a mi lado. Te amo con toda el alma.

A mis hijas Valeria y Victoria porque el tenerlas en mi vida me motiva a ser mejor y crecer para que con orgullo puedan decir que soy su mamá. Todo mi esfuerzo es por y para ustedes, las amo inmensamente.

A mis padres María Isabel García y Faustino Ruiz, quienes a lo largo de mi vida me han permitido elegir mi camino, apoyándome sin condiciones. Agradezco que en esta etapa me hayan permitido contar con su ayuda cuidando de sus nietas cuando las clases y el trabajo de laboratorio requerían de mi tiempo. ¡Gracias, por tanto, los amo!

A mis hermanos de quienes también recibí palabras de aliento desde que comencé esta etapa.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por bendecirme y darme la fuerza para trabajar por mis metas y sueños. Al CONACYT por la beca brindada para la realización de mis estudios de Maestría durante estos dos años. A la Facultad de Agronomía y la Universidad Autónoma de Nuevo León por hacer posible esta investigación. Al Laboratorio de Remediación Ambiental por el uso de las instalaciones e infraestructura para la parte experimental. Al Dr. Celestino García Gómez porque al trabajar con él he aprendido muchísimo. Siempre estaré agradecida por el tiempo y dedicación para revisar mis avances, resolver mis dudas, motivarme a escribir y participar activamente en la difusión de este trabajo. Al Dr. Hugo Bernal por su entera disposición y apoyo en la etapa de trabajo con las codornices y el posterior trabajo de laboratorio. Gracias por su tiempo y atenciones para hacer posible esta investigación. A la Dra. Nydia Vásquez por compartir sus conocimientos en el manejo de las aves y los análisis de laboratorio, porque siempre estuvo disponible para resolver mis dudas y aconsejándome para desempeñar un buen trabajo. Gracias por su tiempo, paciencia y dedicación. Al Dr. Juan Antonio Vidales, por el apoyo que me ha brindado desde que ingresé a la Facultad de Agronomía hace 11 años. Gracias por darme la oportunidad de desempeñarme en el laboratorio, por creer en mí y ser un gran mentor. Al Laboratorio de Nutrición y Calidad de los alimentos por ser sede de los análisis bromatológicos a las dietas y el huevo. Especialmente a todas las personas que me apoyaron en esta etapa: M.C Carlos Gaona, Ing. Valeria Morales, Ing. Estefanía Villanueva, Ing. Sebastián Sáenz y M.C. Cecilia Hernández.

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
INTRODUCCIÓN .....	17
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVOS .....	20
1.1 Objetivo General .....	20
1.1.1 Objetivos Específicos .....	20
REVISIÓN DE LITERATURA .....	21
2.1 Microalgas y Cianobacterias .....	21
2.2 Sistemas de Cultivo .....	22
2.3 Requerimientos para el Cultivo de Microalgas y Cianobacterias .....	23
2.4 Composición Bioquímica de Cianobacterias .....	26
2.5 <i>Arthrospira maxima</i> .....	27
2.5.1 Biomoléculas de Alto Valor .....	28
2.5.2 C-ficocianina .....	29
2.6 Extracción de Compuestos Celulares .....	29
2.6.1 Extracción de C-ficocianina .....	30
2.7 Cianobacterias en Nutrición Animal .....	31
2.7.1 C-ficocianina en Nutrición Animal .....	34
2.8 Cianobacterias en Nutrición Humana .....	35
2.8.1 C-ficocianina en Nutrición Humana .....	36
MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1 Localización del Estudio .....	37
3.2 Microorganismo .....	37
3.3 Etapa 1: Cultivo de <i>A. maxima</i> en un Sistema Raceway .....	38
3.3.1 Evaluación de un Fertilizante Inorgánico .....	38
3.3.1.1 Raceway Escala Piloto .....	38

3.3.1.2	Diseño Experimental.....	39
3.4	Análisis Físicoquímicos y Bioquímicos en el Cultivo de <i>A. maxima</i> .....	40
3.4.1	Curva Estándar para Crecimiento.....	40
3.4.2	Análisis Físicoquímicos del Medio y Crecimiento Celular .....	41
3.4.2.1	pH, Conductividad Eléctrica y Salinidad .....	41
3.4.2.2	Crecimiento Celular .....	41
3.4.2.3	Alcalinidad .....	41
3.4.2.4	Nitratos .....	42
3.4.2.5	Amonio.....	42
3.4.2.6	Ortofosfatos .....	43
3.4.3	Análisis Bioquímicos de la Biomasa .....	43
3.4.3.1	Clorofila.....	43
3.4.3.2	Carbohidratos .....	44
3.4.3.3	Lípidos .....	44
3.4.4	Análisis Estadístico.....	45
3.5	Etapa 2: Extracción de C-ficocianina .....	45
3.5.1	Diseño Experimental.....	45
3.5.2	Análisis Estadístico .....	48
3.6	Etapa 3: Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Animal.....	48
3.6.1	Área Experimental .....	50
3.6.2	Evaluación de Ganancia de Peso y Consumo.....	51
3.6.3	Evaluación de la Calidad Física del Huevo.....	52
3.6.4	Análisis Bromatológicos a los Huevos y las Dietas.....	54
3.6.4.1	Materia Seca y Cenizas.....	54
3.6.4.2	Grasas Cruda .....	55
3.6.4.3	Proteína Cruda .....	55
3.6.4.4	Energía Bruta.....	56
3.6.4.5	Fracciones de Fibra .....	56
3.6.5	Análisis estadístico .....	57
3.7	Etapa 3: Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Humana .....	57
3.7.1	Humedad .....	58



3.7.2 Cenizas.....	58
3.7.3 pH .....	59
3.7.4 Medición de Color .....	59
3.7.5 Medición del Perfil de Textura .....	59
3.7.6 Pruebas Sensoriales.....	59
3.7.7 Análisis estadístico .....	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	60
4.1 Análisis Físicoquímicos en el Cultivo de <i>A. maxima</i> .....	60
4.1.1 pH, Conductividad Eléctrica y Salinidad .....	60
4.1.2 Crecimiento celular .....	62
4.1.3 Alcalinidad .....	64
4.1.4 Nitratos .....	65
4.1.5 Amonio.....	66
4.1.6 Ortofosfatos .....	67
4.2 Análisis Bioquímicos de la Biomasa.....	68
4.2.1 Clorofila.....	68
4.2.2 Carbohidratos .....	69
4.2.3 Lípidos .....	70
4.3 Análisis Estadístico del Diseño Experimental Taguchi .....	71
4.3 Extracción de C-ficocianina .....	73
4.3.1 Análisis estadístico .....	78
4.4 Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Animal .....	80
4.4.1 Ganancia de Peso y Consumo .....	80
4.4.2 Evaluación de la Calidad Física del Huevo.....	85
4.4.3 Análisis Bromatológicos de los Huevos .....	87
4.5 Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Humana.....	88
4.5.1 Humedad, Cenizas y pH .....	88
4.5.2 Color .....	89
4.5.3 Perfil de textura.....	90
4.5.4 Evaluación Sensorial .....	91
CONCLUSIONES .....	93

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....94  
ANEXOS.....109

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
<b>Cuadro 1.</b> Composición bioquímica de <i>Arthrospira maxima</i> (Hajati et al., 2019).....	27
<b>Cuadro 2.</b> Biomasa de cianobacterias en la nutrición animal. ....	32
<b>Cuadro 3.</b> Rango de niveles de las variables utilizadas para la optimización del cultivo de <i>A. maxima</i> . ....	39
<b>Cuadro 4.</b> Diseño experimental para los tratamientos utilizados para la optimización del cultivo. ....	39
<b>Cuadro 5.</b> Rango de niveles de variables utilizadas para la optimización de la extracción de C-PC. ....	45
<b>Cuadro 6.</b> Diseño experimental para la optimización de la extracción de C-PC.....	46
<b>Cuadro 7.</b> Dietas experimentales para codornices en etapa de postura (preparación para 5 kg de alimento).....	48
<b>Cuadro 8.</b> Formulación de gomitas con c-ficocianina. ....	57
<b>Cuadro 9.</b> ANOVA .....	71
<b>Cuadro 10.</b> Predicción realizada por el diseño experimental Taguchi para la producción de c-ficocianina. ....	73
<b>Cuadro 11.</b> Concentración de C-PC ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) obtenidas por el método de congelación descongelación y valores de predicción del RSM. ....	74
<b>Cuadro 12.</b> ANOVA del RSM para la extracción de c-ficocianina de <i>A. maxima</i> .....	78
<b>Cuadro 13.</b> Peso de las codornices (g) durante las 5 semanas experimentales. ....	82
<b>Cuadro 14.</b> Consumo total de alimento (g) por tratamiento durante las 5 semanas experimentales .....	82
<b>Cuadro 15.</b> Datos de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC.....	85
<b>Cuadro 16.</b> Colorimetría de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC. ....	86
<b>Cuadro 17.</b> Análisis bromatológicos de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC .....	87
<b>Cuadro 18.</b> Análisis bromatológicos de las dietas formuladas con C-PC. ....	87
<b>Cuadro 19.</b> Humedad, cenizas y pH de las gomitas formuladas con C-PC.....	89

<b>Cuadro 20.</b> Colorimetría de las gomitas formuladas con C-PC. ....	89
<b>Cuadro 21.</b> Análisis del perfil de textura de las gomitas formuladas con C-PC. ....	91
<b>Cuadro 22.</b> Evaluación sensorial de las gomitas formuladas con C-PC. ....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Metabolitos producidos por <i>Arthrospira sp.</i> ....	29
<b>Figura 2.</b> Extracción de compuestos hidrofílicos por el método de congelación descongelación. ....	30
<b>Figura 3.</b> Diagrama del raceway escala piloto. ....	38
<b>Figura 4.</b> Sistema raceway escala piloto para el cultivo de <i>Arthrospira maxima</i> . ....	40
<b>Figura 5.</b> Proceso de extracción de c-ficocianina mediante el método de congelación descongelación. ....	48
<b>Figura 6.</b> Codorniz japonesa con anillo identificador. ....	50
<b>Figura 7.</b> Bloques completamente al azar en el área experimental. ....	51
<b>Figura 8.</b> Pesaje de las codornices. ....	52
<b>Figura 9.</b> Mediciones realizadas en los huevos colectados diariamente: a) largo, b) ancho y c) peso. ....	53
<b>Figura 10.</b> Monitoreo de pH en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	60
<b>Figura 11.</b> Conductividad eléctrica (ms/cm) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	61
<b>Figura 12.</b> Salinidad (%) del cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	62
<b>Figura 13.</b> Crecimiento <i>A. maxima</i> en un sistema raceway determinado por densidad óptica a 680 nm. ....	63
<b>Figura 14.</b> Recuento celular con cámara de Neubauer del cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	64
<b>Figura 15.</b> Alcalinidad (mg L <sup>-1</sup> de CaCO <sub>3</sub> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	65
<b>Figura 16.</b> Nitratos (mg L <sup>-1</sup> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	66
<b>Figura 17.</b> Amonio (mg L <sup>-1</sup> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	67
<b>Figura 18.</b> Ortofosfatos (mg L <sup>-1</sup> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	68
<b>Figura 19.</b> Clorofila (mg mL <sup>-1</sup> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	69
<b>Figura 20.</b> Carbohidratos (µg mL <sup>-1</sup> ) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway. ....	

.....	70
<b>Figura 21.</b> Contenido de lípidos (%) en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway.	71
.....	71
<b>Figura 22.</b> Efectos principales de las medias de cada variable empleadas en el cultivo de <i>A. maxima</i> en un sistema raceway.	72
<b>Figura 23.</b> Gráfica de predicción versus actual del RSM para la extracción de c-ficocianina.	74
<b>Figura 24.</b> Gráfica 3D del efecto del pH y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC (mg mL <sup>-1</sup> ).	76
<b>Figura 25.</b> Gráfica 3D del efecto de la concentración del buffer (mM) y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC (mg mL <sup>-1</sup> ).	77
<b>Figura 26.</b> Gráfica 3D del efecto del número de ciclos y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC (mg mL <sup>-1</sup> ).	77
<b>Figura 27.</b> Concentración de c-ficocianina (mg mL <sup>-1</sup> ) en los 9 tratamientos y optimizado cultivados en un sistema raceway.	79
<b>Figura 28.</b> Peso vivo de las codornices (g) en etapa de postura alimentadas con adición de cuatro niveles de C-PC (0.0, 50, 100 y 150 mg/kg dieta) durante un periodo de 5 semanas.	81
<b>Figura 29.</b> Peso vivo de las codornices (g) por tratamiento alimentadas con cuatro niveles de C-PC (0.0, 0.50, 0.100 y 0.150 mg/kg dieta).	81
<b>Figura 30.</b> Consumo promedio (g) por tratamiento durante las cinco semanas de experimentación.	83
<b>Figura 31.</b> Consumo promedio (g) por tratamiento en las cinco semanas de experimentación.	84
<b>Figura 32.</b> Postura promedio (piezas) por tratamiento en las cinco semanas de experimentación.	84
<b>Figura 33.</b> Gomas formuladas con c-ficocianina: a) control, b) T1, c) T2 y d) T3. ..	90
<b>Figura 34.</b> Perfil sensorial descriptivo de las gomas control y tratamientos con diferentes concentraciones de c-ficocianina.	92

## RESUMEN

Para disminuir problemas a la salud se ha buscado incorporar ingredientes naturales con compuestos bioactivos en la formulación alimentos funcionales. Adicionalmente, se ha incrementado la búsqueda de nuevas fuentes de proteína que permitan suplir las de origen animal cuya demanda aumenta mundialmente.

Las cianobacterias, microorganismos procariotas fotosintéticos, producen biomasa compuesta de metabolitos con grandes aplicaciones biotecnológicas. El cultivo de éstas en sistemas abiertos como los raceway es ideal para producciones a gran escala. Diversas estrategias se han implementado para maximizar la productividad, una de ellas es el empleo de fertilizantes inorgánicos como el NPK.

*Arthrospira maxima* es una cianobacteria filamentosa reconocida por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos como segura para su consumo humano. Además, es conocida por producir c-ficocianina, una proteína hidrosoluble utilizada como pigmento natural y que se ha demostrado que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

Diversos estudios se han realizado para evaluar los efectos de la adición de biomasa en nutrición animal y humana, teniendo resultados positivos. Son pocas las investigaciones con c-ficocianina, la mayoría de ellas en ratas y conejos donde se observan cambios favorables en los animales alimentados con el pigmento.

En la presente investigación se cultivó *Arthrospira maxima* en un sistema abierto tipo raceway en medio suplementado con NPK para maximizar la producción de c-ficocianina. Se encontró que las condiciones óptimas se lograron utilizando  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  del fertilizante, con  $10.5 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio, 16 h de fotoperiodo y  $0.3 \text{ g L}^{-1}$  de inóculo. Además, se evaluaron las condiciones de extracción del pigmento utilizando el método de congelación- descongelación, determinando que el buffer fosfato de potasio 100 mM a pH 5.8 es el adecuado, utilizando 150 mg de biomasa y 4 ciclos.

También, se evaluó la adición de c-ficocianina en nutrición animal y humana, adicionando la c-ficocianina extraída en dietas para codornices japonesas en etapa de postura y en gomitas para consumo humano. Para las codornices, la concentración de

150 mg/kg dieta resultó en huevos más altos y anchos, con mayor peso y menor contenido de grasas. Para las gomitas, la concentración más alta del pigmento (0.70%) derivó en gomitas con mayor dureza, gomosidad, masticabilidad y color, pero sin diferencias significativas en la aceptabilidad general.



## INTRODUCCIÓN

El interés por disminuir los problemas de salud ha llevado a la búsqueda de alimentos saludables y seguros para consumo humano. Asociado a ello, la producción de microalgas y cianobacterias ha aumentado ya que sus compuestos bioactivos ofrecen beneficios a la salud al ser incorporados como ingredientes en alimentos funcionales (Lafarga, 2019).

Las algas son un grupo de organismos fotosintéticos responsables del 50% de toda la fotosíntesis en la tierra, en el que se incluyen las microalgas eucariotas, cianobacterias y macroalgas. De miles de especies de microalgas adaptadas para crecer en diferentes condiciones ambientales, cerca de 30,000 son las que han sido estudiadas (Renuka *et al.*, 2018).

Las cianobacterias son microorganismos procariontes fotosintéticos que usando CO<sub>2</sub> y luz solar producen biomasa rica en productos químicos (Knoot *et al.*, 2017) y que son una importante fuente de metabolitos con grandes aplicaciones biotecnológicas. Producen proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas y acumulan minerales con propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales y antifúngicas (Shah *et al.*, 2017).

El cultivo de microalgas y cianobacterias puede ser en sistemas cerrados o abiertos (raceway pond). Estos últimos son más fáciles de construir y mantener e ideales para producciones masivas (Masojídek *et al.*, 2022). El uso de fertilizantes inorgánicos como el NPK en los cultivos está enfocado en la reducción de costos y el aumento en la producción de biomasa (Mtaki *et al.*, 2020).

*Arthrospira spp.* es una cianobacteria comúnmente conocida como *Spirulina*. Se dispone en filamentos multicelulares de 50-500 µm de largo y 3-12 µm de diámetro en forma espiral (Sánchez-Bayo *et al.*, 2020). Es reconocida como GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos por lo que se puede consumir sin riesgo ya que no produce toxinas (Enzing *et al.*, 2014).

El interés por su producción ha aumentado porque contiene c-ficocianina (C-PC), una biliproteína presente en las cianobacterias y que tiene propiedades antioxidantes,

antiinflamatorias y anticancerígenas (Galinyte *et al.*, 2023).

Recientemente ha incrementado la preocupación por el uso de colorantes artificiales en los alimentos y cosméticos buscando reemplazarlos por productos naturales. La ficocianina, al ser una proteína soluble en agua con un intenso color azul, ha ganado atención para su aplicación como pigmento natural en productos para consumo humano porque además de proporcionar un color atractivo mejora el valor nutricional de los alimentos (Huo *et al.*, 2022).

Está presente en la membrana citoplasmática de las cianobacterias, pero puede ser liberada de la célula cuando se rompe la membrana tilacoide (Park *et al.*, 2018). Existen diversos métodos de extracción: ciclos de congelación descongelación, molienda con perlas de vidrio, ultrasonido, campos eléctricos y métodos asistidos con enzimas. Para lograr una extracción eficiente es importante considerar factores como el método seleccionado, la biomasa (si es seca o fresca), temperatura, intensidad de luz, pH, solvente, relación biomasa/solvente (Fernandes *et al.*, 2023).

De acuerdo con lo anterior, se buscó evaluar la adición de c-ficocianina en nutrición animal y humana. Para ello, esta investigación se dividió en tres fases. Fase 1: Cultivo de la cianobacteria en un sistema abierto tipo raceway en medio suplementado con NPK optimizando las condiciones para obtener una mayor producción de c-ficocianina. Fase 2: Extracción. Evaluación de las condiciones de extracción del pigmento utilizando el método de congelación- descongelación. Fase 3: Aplicación. La ficocianina extraída se adicionó en dietas para codornices japonesas en etapa de postura y en gomitas para consumo humano.

## HIPÓTESIS

La producción sostenible y extracción de c-ficocianina de *Arthrospira maxima* es factible para su adición en nutrición animal y humana.

## OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Evaluar la producción de c-ficocianina a partir de *Arthrospira maxima* cultivada en un sistema raceway y su adición en nutrición animal y humana.

#### 1.1.1 Objetivos Específicos

- Maximizar la producción de c-ficocianina a partir de *A. maxima* cultivada en un sistema raceway.
- Estimar el efecto de c-ficocianina en dietas de postura para codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*).
- Medir la influencia de c-ficocianina en las propiedades de estabilidad, texturometría y atributos sensoriales en gomitas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La población mundial crece continuamente convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel global debido a la escasez de alimentos. La Organización de las Naciones Unidas (2018) estima que para 2050 la población mundial llegará a los 9.900 millones de personas. Con ello la demanda de alimentos se incrementará hasta en un 60% (Nosratimovafagh *et al.*, 2022).

### 2.1 Microalgas y Cianobacterias

Los organismos unicelulares fotoautótrofos utilizan energía solar y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para moléculas orgánicas. Éstos pueden ser eucariotas (microalgas) o procariotas (cianobacterias).

Las cianobacterias, los organismos más primitivos, son procariotas fotosintéticos responsables de que la atmósfera de la Tierra rica en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se transformara a una atmósfera rica en oxígeno (O<sub>2</sub>). Frecuentemente se les conoce como *algas azul verdosas* sin embargo, no tienen relación con ellas. (Mazard *et al.*, 2016).

Capturan la energía solar más eficientemente que las plantas, convirtiendo hasta el 9% de la energía solar en biomasa, mientras que las plantas superiores convierten del 0.5-3% (Knoot *et al.*, 2018).

Existen más de 6000 especies de cianobacterias de las cuales más de la mitad quedan por descubrir (Morales *et al.*, 2021). Tienen un rol fundamental en el ciclo del carbono y el nitrógeno, ya que se estima que el 20-30% del carbono orgánico presente en el planeta proviene de la fijación fotosintética del carbono por parte de las cianobacterias (El-Seedi *et al.*, 2023).

Las cianobacterias tienen distintos metabolismos y la capacidad de cambiar de uno a otro. Todas hacen fotosíntesis oxigénica, pero pueden cambiar a fotosíntesis anoxigénica típica de las bacterias, donde utilizan sulfuros para obtención de energía. En condiciones anóxicas y sin luz, las cianobacterias llevan a cabo la fermentación. Algunas especies tienen heterocistos que les confieren la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Swain *et al.*, 2017).

Su distribución es amplia encontrándolos en ambientes acuáticos y terrestres,

con alta salinidad, temperaturas bajas y altas ya que cuentan con mecanismos de defensa para sobrevivir en condiciones ambientales extremas. Estos mecanismos de defensa incluyen metabolitos secundarios (pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos y péptidos) con propiedades antioxidantes, alelopáticas y tóxicas. Éstos tienen el potencial para utilizarse en fármacos, aditivos alimentarios, cosméticos, biocombustibles, colorantes, producción de biopolímeros y en el tratamiento de aguas residuales (Perera *et al.*, 2023).

Aunque las cianobacterias y las microalgas son grupos diferentes las condiciones y desafíos para su cultivo aplican para ambos.

## 2.2 Sistemas de Cultivo

Existen diversos sistemas de cultivo para la producción de microalgas y cianobacterias, pudiendo ser abiertos o cerrados.

Los sistemas cerrados son aquellos donde el cultivo se encuentra en recipientes transparentes y cerrados, conocidos como fotobiorreactores. Su costo es elevado y es más complejo de escalar, pero se tiene un mejor control de las condiciones de operación (luz, temperatura, agitación) y se reduce el riesgo de contaminación (Rayen *et al.*, 2019). Diferentes configuraciones de fotobiorreactores existen, tales como placa plana, tubular, columnas y tanques agitados (Kumar *et al.*, 2022)

Los sistemas abiertos tienen menor costo de producción que los sistemas cerrados, son de fácil manejo y mantenimiento, sin embargo, presentan pérdida de agua por evaporación, se dificulta la penetración de la luz al fondo y se presenta contaminación. Los sistemas abiertos más comunes son estanques circulares y estanques con canales, estos últimos conocidos como *raceway pond* (Kusmayadi *et al.*, 2020).

Un *raceway* es un estanque con un canal de flujo cerrado. Tiene una pared central e incorpora una paleta de agitación con 6-8 aspas. La profundidad del cultivo oscila entre los 0.25 y 0.30 m (Chisti, 2016).

Aunque típicamente los *raceway* consisten en una pared central y una paleta de agitación, se han realizado estudios para cambiar su configuración con el propósito de eliminar o minimizar las zonas muertas. Sompech *et al* (2012), usando Dinámica de

Fluidos Computacionales (CFD, por sus siglas en inglés), estudiaron varias configuraciones para identificar la óptima que minimizara las zonas muertas con un funcionamiento energéticamente eficiente. Determinaron que un diseño con tres deflectores semicirculares y un extremo modificado en la pared central era más eficiente energéticamente a la vez que eliminó por completo las zonas muertas.

Banerjee & Ramaswamy (2019) realizaron un estudio para comparar la productividad y los costos de cultivo de *Nannochloropsis spp* entre un sistema abierto (raceway) y uno cerrado (fotobiorreactor panel plano). Considerando distintas condiciones geográficas en los Estados Unidos, se hizo un modelo matemático y análisis económico determinando que hay mayor productividad en el fotobiorreactor en la mayoría de las localidades estudiadas, pero también los costos son significativamente más altos. Los costos dependen principalmente a la zona geográfica, tipo de reactor y los parámetros de diseño. Es importante también el propósito del cultivo, es decir, qué bioproducto quiere obtenerse del microorganismo.

### **2.3 Requerimientos para el Cultivo de Microalgas y Cianobacterias**

Diversos factores afectan el crecimiento de las microalgas y cianobacterias, entre los que destacan la temperatura, pH, intensidad de luz, aireación y disponibilidad de nutrientes (Kumar *et al.*, 2022).

La temperatura influye en el crecimiento y la acumulación de nutrientes cuando se cultiva al aire libre. Bajas temperaturas reducen la asimilación de carbono afectando la fotosíntesis; altas temperaturas inactivan proteínas fotosintéticas y alteran el equilibrio de energía en las células. El efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis se debe a la disminución de la actividad de la ribulosa-1,5-bifosfato (Rubisco), la cual actúa como oxigenasa o carboxilasa dependiendo de las cantidades de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Khan *et al.*, 2018).

Estudios han reportado que el rango óptimo es de 25-35°C para el crecimiento de *Arthrospira sp.* (Wang *et al.*, 2021). De acuerdo con AlFadhly *et al* (2022) cuando se cultiva *Arthrospira sp* al aire libre se pueden alcanzar hasta 40°C lo que permite eliminar contaminantes microbianos termófilos sin comprometer su capacidad fotosintética. Durante la noche, aumenta la respiración celular y hay pérdida de masa

vital. La temperatura más baja para cultivar esta especie es a los 15°C.

El pH es importante para el crecimiento, utilización de CO<sub>2</sub> y prevención de la contaminación. Cuando el pH está en un valor no óptimo se altera el equilibrio entre el CO<sub>2</sub> gaseoso y las especies inorgánicas disueltas en el medio lo cual afecta la disponibilidad de nutrientes dificultando la fotosíntesis. Para *Arthrospira sp.* el crecimiento es promovido con un pH alcalino que mejora la transferencia de masa del CO<sub>2</sub> lo que eleva los iones de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. (Mehar *et al.*, 2019). De acuerdo con un estudio realizado por Sornchai & lamtham en 2013 para evaluar diferentes pH iniciales (9, 9.5, 10 y 10.5) en el medio Zarrouk para el crecimiento de *Arthrospira máxima*, obtuvieron mayor tasa de crecimiento específico, producción de proteínas, clorofila, betacaroteno, ficocianina y mejor morfología celular con pH de 9, determinando que éste es el ideal para el cultivo de *A. maxima*.

La luz es un factor clave en los sistemas abiertos porque es la fuerza que impulsa la fotosíntesis. Sin embargo, una limitación es la penetrabilidad ya que si las células en el fondo de los raceway no reciben suficiente luz se tiene una baja productividad de biomasa. Una solución a este problema es la construcción de raceways con poca profundidad (rondando los 20-30 cm), así como adición de baffles y agitación adecuada para homogenizar el medio (Sun *et al.*, 2018). El mejor rango de luz para el crecimiento de *Arthrospira sp.* es de 1500 a 3500 lux (Soni *et al.*, 2019). El régimen de luz y oscuridad (fotoperiodo) influye en el crecimiento y la producción de biomasa así como en la composición bioquímica de microalgas y cianobacterias. Aumentar la frecuencia del ciclo de luz-oscuridad puede mejorar la productividad y eficiencia fotosintética (Krzeminska *et al.*, 2014).

El color de luz LED empleada en los cultivos afecta la producción de moléculas específicas. Un estudio realizado por Da Fontoura *et al.* (2018) evaluó distintos colores de luz LED y fotoperíodos, encontró que con luz LED roja y fotoperiodo de 12:12 se obtuvo mayor producción de biomasa. La luz verde, roja y blanca estimuló más la producción de lípidos. Para ficocianina, la concentración más alta fue con luz verde, hasta 2.8 veces más que en el control con luz fluorescente.

La agitación permite el intercambio gaseoso, previene la sedimentación moviendo las células del fondo del estanque (zona oscura) a la parte iluminada



evitando la fotoinhibición y la fotolimitación (Koley *et al.*, 2019). Para ello las paletas de agitación son más eficientes para impulsar el medio en el raceway (Pandey y Premalatha, 2017). Si los demás requerimientos están presentes, pero no hay aireación, la productividad disminuirá considerablemente.

Suministrar las dosis adecuadas de nutrientes es importante para tener una alta eficiencia en la producción de biomasa (Udayan *et al.*, 2022). Cada especie tiene diferentes necesidades nutrimentales pero los requerimientos básicos son los mismos. Nitrógeno, fósforo y carbono son indispensables para su crecimiento, por lo tanto, son considerados como macronutrientes. Los micronutrientes (molibdeno, potasio, cobalto, hierro, magnesio, manganeso, boro y zinc) se requieren en cantidades pequeñas, pero tienen una influencia fuerte en su crecimiento y actividad enzimática (Khan *et al.*, 2018). Según Nayak *et al.*, (2016) para proporcionarle al medio de cultivo los requerimientos de nutrientes, la adición de fertilizantes representa una medida rentable.

### **2.3.1 Fertilizantes inorgánicos en el cultivo de microalgas y cianobacterias**

El uso de fertilizantes inorgánicos como el NPK para el cultivo de microalgas y cianobacterias ha sido una estrategia estudiada para disminuir los costos de producción en comparación con medios comerciales tradicionales (Sipaúba-Tavares *et al.*, 2017).

Experimentos con *Chlorella vulgaris* mostraron que el uso NPK en el medio de cultivo llevó a una mayor tasa de crecimiento en comparación con el medio tradicional Chu.10 (Mahmood y Khudhair, 2017).

Estudios con agua residual de acuicultura (AWW) y NPK arrojaron que la mejor tasa de crecimiento para *Chlorella vulgaris* fue una combinación de AWW + 1.0 g L<sup>-1</sup> NPK en comparación con el medio basal bold (BBM) (Mtaki *et al.*, 2020).

Michael *et al.* (2019) evaluaron la formulación de un medio de cultivo con NPK 10-20-20 y solo tres compuestos del medio Zarrouk, para el cultivo de *A. fusiformis*. Encontraron que este medio, al que llamaron LCMA, obtuvo mejor producción de biomasa y acumulación de clorofila y es ideal para maximizar la producción de vitaminas y algunos minerales.

Ribeiro *et al.* (2020) estudiaron el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en fotobiorreactores utilizando un medio formulado con urea, amonio y nitrato, al cual llamaron “Blue Green Nitrogen Mix” (BGNIM). Esta combinación de fuentes de carbono incrementó la producción de proteínas un 7%, carotenoides 41% y azúcar soluble 12% en comparación con el medio BG11. Esta propuesta tiene un enfoque económico para cultivos a gran escala ya que el medio BGNIM tiene el potencial de reducir costos a la vez que conduce a productividades similares al medio estándar.

De acuerdo con Rifai *et al.* (2022), evaluaron el crecimiento de *Chlorella sp.* en un fotobiorreactor con medio que contenía un fertilizante comercial (20% N- 20%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>- 20%K<sub>2</sub>O). La mayor producción de biomasa para el medio F2 estándar fue de 0.80 g L<sup>-1</sup> y para el medio con fertilizante comercial fue de 0.76 g L<sup>-1</sup>. No hubo diferencia significativa, por lo que el uso de este fertilizante se propone como una fuente alternativa de nutrientes para el cultivo de microalgas.

Ezeani y Abu (2019) estudiaron el crecimiento de *Chlorella sp.* en fertilizante NPK 15:15:15, NPK 20:20:20 utilizando 0.5 g L<sup>-1</sup> de cada uno y medio BG11 como control. Los medios formulados con 0.5 g L<sup>-1</sup> de NPK proporcionan nutrientes a bajo costo para producciones de biomasa a gran escala, ya que una baja concentración de nitrógeno estimula la biomasa celular y la clorofila. Por lo tanto, el fertilizante inorgánico puede utilizarse para la producción comercial de biomasa microalgal con reducción de costos.

## **2.4 Composición Bioquímica de Cianobacterias**

Las cianobacterias son una de las fuentes principales de compuestos naturales bioactivos tales como ácidos grasos, aminoácidos y lipopéptidos, que han sido encontrados en especies de *Oscillatoria sp.*, *Arthrospira sp.* y *Anabaena sp.* Los lipopéptidos tienen el potencial de actuar como medicamentos, ya que funcionan como agentes antiinflamatorios, antivirales y antibióticos, tienen capacidad anticancerígena, citotóxica y antimicótica (Bishoyi *et al.*, 2022).

Los carbohidratos provenientes de las cianobacterias pueden utilizarse para la producción de biopolímeros, biofertilizantes, biocombustibles, nutracéuticos y enzimas. También la producción de combustibles como el etanol, biodiesel, biogás y biohidrógeno. (Singh *et al.*, 2023).

El bioetanol es un biocombustible limpio con grandes ventajas sobre los combustibles fósiles. Por ejemplo, el bioetanol tiene alto índice de octanaje que evita golpeteo en los cilindros de los motores, tiene mayor contenido de oxígeno que al quemarse produce menos gases de efecto invernadero. Se puede utilizar en la industria automotriz sin ninguna modificación y puede mezclarse con el aceite.

Los biocombustibles de segunda generación (a partir de plantas terrestres especialmente cultivos alimentarios) requieren de grandes cantidades de tierra cultivable y agua; por ello, su cultivo con el único propósito de producir combustibles es insostenible. (Khan *et al.*, 2018)

El biocombustible a partir de cianobacterias es mejor para el medio ambiente ya que presenta bajas emisiones de azufre, sin producción de hidrocarburos aromáticos, emanaciones de oxígeno y buena capacidad de combustión (Singh *et al.*, 2023).

## 2.5 *Arthrospira maxima*

*Arthrospira* es rica en proteínas, aminoácidos esenciales, lípidos, vitaminas, minerales y antioxidantes de alto valor con grandes aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Fig. 1). Debido a esto, es considerada un alimento nutracéutico (Yousefi *et al.*, 2019). De acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, *Arthrospira maxima* es considerada como GRAS (Generally Recognized as Safe) junto con *Arthrospira platensis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella protothecoides*, *Dunaliella bardawil*, *Haematococcus pluvialis*, *Prototheca moriformis*, *Schizochytrium sp.* Y *Ulkenia sp.* (de Oliveira & Ariseto, 2022).

La composición química de *Arthrospira maxima* se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Composición bioquímica de *Arthrospira maxima* (Hajati *et al.*, 2019)

Componentes principales	Contenido, % peso seco
Proteína	49-54
Carbohidratos	13-15

Entre las ventajas de cultivar *Arthrospira*, destacan su rápido crecimiento, su alta tolerancia a la salinidad y el pH alcalino, fácil recuperación de su biomasa y digestión (Kumari *et al.*, 2015). El medio de cultivo más utilizado para *Arthrospira sp* es el medio Zarrouk, que contiene nutrientes esenciales como el carbono, nitrógeno y fósforo (Andrade *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Biomoléculas de Alto Valor

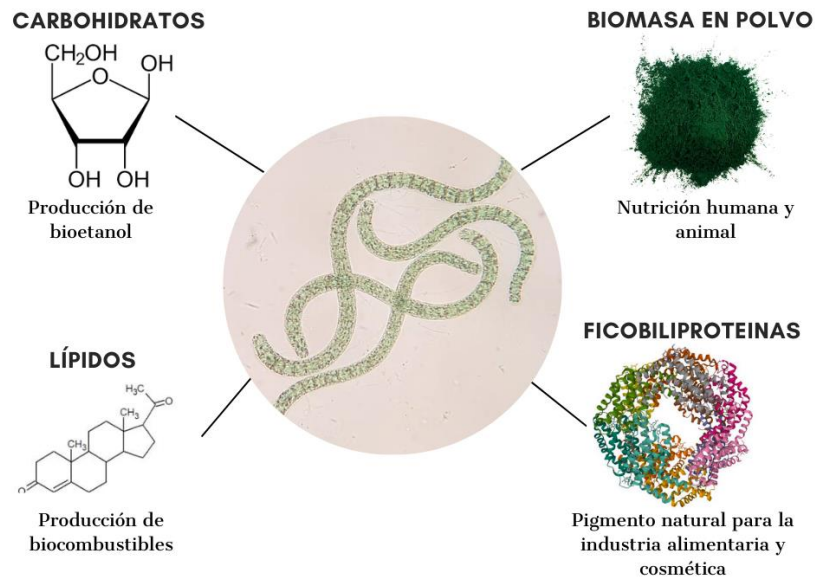
La clorofila a es un pigmento abundante y con un rol importante en la absorción de luz solar, transferencia de energía y transporte de electrones en el proceso fotosintético. Se ha utilizado como colorante en alimentos, centro ópticamente activo en paneles solares y fotosensibilizadores en terapia fotodinámica (Martins *et al.*, 2021).

*Arthrospira* tiene grandes cantidades (hasta un 2% del total de lípidos) de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's). También es rica en ácido linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA) (Jung *et al.*, 2019). Los ácidos grasos libres son una fuente de antibióticos tópicos que regulan la microbiota de la piel. Específicamente los PUFA's previenen enfermedades cardiovasculares (Wils *et al.*, 2022).

Adicionalmente, los lípidos extraídos de la biomasa pueden utilizarse para la producción de biodiesel. Producir biodiesel a partir de microalgas y cianobacterias es más competitivo que el producido por cultivos terrestres, por su tasa de crecimiento alta, gran acumulación intracelular de lípidos y producción no estacional (López *et al.*, 2022).

También contiene abundantes proteínas (55-70% MS) que contienen aminoácidos esenciales que las hacen superiores a las proteínas vegetales habituales (Jung *et al.*, 2019). Las proteínas extraídas de las microalgas y cianobacterias son de fácil disponibilidad para las enzimas digestivas, incrementado su digestibilidad hasta un 82%. Adicionalmente, contienen grandes cantidades de vitaminas A, B1, B2 y B12. Una cucharada de 7 g de biomasa de *Arthrospira sp* contiene aproximadamente 4 g de proteínas (Dolganyuk *et al.*, 2023).

Produce dos ficobiliproteínas: c-ficocianina (C-PC) que es el pigmento principal y aloficocianina (APC), ésta última en pequeñas cantidades. Las cantidades de c-ficocianina varían de acuerdo con las condiciones de crecimiento de la cianobacteria pudiendo llegar hasta un 20% de su peso seco. (Stanic-Vucinic et al., 2018).



**Figura 1.** Metabolitos producidos por *Arthrospira* sp.

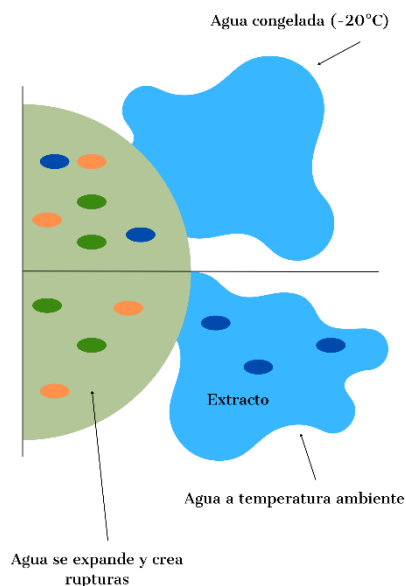
### 2.5.2 C-ficocianina

La ficocianina es una proteína hidrofílica de color azul intenso que es estable en pH de 5 a 8 y que tiene propiedades antioxidantes, antivirales y antitumorales. Se ha probado que estimula el sistema inmunológico y tiene actividad hepatoprotectora, antiplaquetaria y neuroprotectora. Según Park *et al.*, (2018) estos beneficios se deben a la reducción del estrés oxidativo.

## 2.6 Extracción de Compuestos Celulares

La extracción de compuestos celulares puede verse afectada por factores tales como el tipo de microorganismo utilizado, el compuesto objetivo, tecnología disponible y precios. Para la extracción se requiere de un método de alteración celular y un

disolvente. De manera general existen dos tipos de métodos para la extracción: 1) no mecánica: métodos químicos, térmicos y enzimáticos y 2) mecánicos: sistemas presurizados, ultrasonidos, microondas, campos eléctricos y extracción supercrítica (Pagels *et al.*, 2021).



**Figura 2.** Extracción de compuestos hidrofílicos por el método de congelación descongelación.

### 2.6.1 Extracción de C-ficocianina

Choi y Lee (2018) evaluaron un proceso de extracción ultrasónica (UE) para obtención de c- ficocianina de *A. maxima* a distintas frecuencias (20, 40, 60, 80 y 100 kHz) a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 h), utilizando agua a 25°C y como control, extracción con agua a 4 y 25°C sin frecuencia durante 24 h. De acuerdo con sus resultados, la concentración más alta de C-PC (11.3 mg mL<sup>-1</sup>) se obtuvo con 60 kHz de frecuencia durante 3 h. Con esto concluyeron que la extracción por ultrasonidos es un método prometedor para tratar a *Arthrospira* incluso si se desea bajar las temperaturas.

Chittapun *et al.* (2020) extrajeron c-ficocianina de las cianobacterias *Nostoc commune* y *Oscillatoria okeni* utilizando el método de ciclos de congelación descongelación y campo eléctrico pulsado. Determinaron que existe influencia

significativa del número de ciclos de congelación descongelación, la solución de extracción utilizada y el número de pulsos eléctricos sobre la concentración de C-PC, su pureza y el rendimiento. Concluyeron que utilizar ciclos de congelación descongelación es mejor para lograr una mayor extracción con mejor concentración de C-PC mientras que los campos eléctricos brindan un producto con alta pureza.

Ayekpam *et al.* (2021) realizaron una investigación para estandarizar la extracción de c-ficocianina partir de *Arthrospira platensis* evaluando tres métodos: nanopartículas (plata, oro y óxido de aluminio de 10, 20 y 40 nm respectivamente), polietilenglicol (peso molecular de 200, 400 y 600 Da) y extracción a base de sales (CaCl<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub>). Considerando el rendimiento y la pureza, los mejores resultados fueron con la extracción basada en nanopartículas (47.68 mg/g base seca y 0.98, respectivamente). Con esto, sus condiciones estandarizadas fueron: 10 µg/mL de nanopartículas de plata, buffer fosfato de potasio, 160 min de tiempo de extracción a 35°C.

## **2.7 Cianobacterias en Nutrición Animal**

Se ha incrementado el interés por las microalgas y cianobacterias en la nutrición animal debido a sus capacidades nutricionales y propiedades funcionales. La capacidad de utilizar estos nutrientes depende de la especie animal que los consuma: animales herbívoros, como los rumiantes, utilizan mejor las microalgas que especies monogástricas altamente carnívoras (Galanakis, 2020).

Entre los animales de ganado, los rumiantes presentan ventajas ya que tienen la capacidad de usar el nitrógeno no proteico y digerir la pared celular de las microalgas. Diversos estudios se han realizado para evaluar la inclusión de microalgas en dietas sobre la producción y composición de la leche, crecimiento del animal y composición de la carne (Lum *et al.*, 2013; Tsiplakou *et al.*, 2018).

Los cerdos son los competidores principales con la cadena alimenticia humana ya que sus dietas están compuestas principalmente por cereales (maíz) y harina de soya. Las microalgas y cianobacterias podrían ser la solución a este problema. (Galanakis, 2020).

Las aves de corral proveen productos sanos como la carne y los huevos, básicos

para consumo humano a nivel mundial. La preocupación por el medio ambiente y el cambio climático ha conducido a una conciencia sobre la sostenibilidad en la industria avícola. La nutrición de aves de corral demanda mucho maíz y soya, que requieren grandes cantidades de tierra para crecer. Dado que la proteína en las microalgas puede alcanzar hasta un 75% mientras que en la soya ronda el 45%, las microalgas y cianobacterias son una alternativa sobre las plantas (Madeira *et al.*, 2017).

La codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) pertenece al orden Galliformes como los pollos y fue domesticada en Japón en el siglo XV. Aunque la industria de la codorniz es menor, su producción de huevo y carne han sido utilizadas para consumo humano principalmente en China, Japón, Brasil, España y Francia. También se han utilizado como animales de laboratorio para la ciencia. Entre las ventajas de utilizar esta especie para la investigación destacan su tamaño corporal pequeño, bajo consumo, maduración rápida y alta producción de huevos (Goto *et al.*, 2023).

Específicamente *Arthrospira spp* ha sido considerada por los nutricionistas de aves como un ingrediente eficiente por sus altas concentraciones de proteínas, vitaminas y minerales (Hajati y Zaghari, 2019).

En el Cuadro 2 se muestran algunas investigaciones realizadas con biomasa de cianobacterias adicionadas en alimentos para nutrición animal.

**Cuadro 2.** Biomasa de cianobacterias en la nutrición animal.

Cianobacteria	Especie animal	Suplementación	Resultados	Referencia
<i>A. platensis</i>	Conejos	0, 50, 100 y 150 g/kg de dieta	Disminuyeron índices aterogénicos y trombogénicos beneficiando la calidad nutricional de la carne	Peiretti y Meineri, 2011.
<i>Arthrospira sp</i>	Gallinas en etapa de postura	0, 40, 80, 120 y 160 mg/kg dieta	Mayor peso en los huevos suplementados con 40 y 160 mg/kg dieta.	Iraqi <i>et al.</i> , 2017.



<i>A. platensis</i>	Pollos de engorda	0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1%	Aumento en actividad de enzimas antioxidantes aumenta conforme se incrementan niveles de <i>A. platensis</i> . Aumento en el color de la yema y disminución de los ácidos grasos saturados y poliinsaturados.	Park <i>et al.</i> , 2018.
<i>A. platensis</i>	Codorniz japonesa en etapa de postura	0, 5, 10 y 15%	La capacidad antioxidante incrementó. Disminuyó recuento de <i>E. coli</i> en el íleon (0.5%).	Boiago <i>et al.</i> , 2018.
<i>A. platensis</i>	Codorniz japonesa en etapa de postura	0, 0.1, 0.3 y 0.5 %	Incrementaron linfocitos.	Hajati <i>et al.</i> , 2020.
<i>A. platensis</i>	Codorniz japonesa en etapa de postura	0, 1, 2, 3, y 4%	Mayor producción de huevos y con mayor peso en tratamiento con 4%	Abbass <i>et al.</i> , 2022.
<i>A. platensis</i>	Gallinas en etapa de postura	0, 3, 6, 9 y 12%	Mayor ganancia de peso con 12%; mayor producción de huevos y con mayor peso con 9%	Abbas <i>et al.</i> , 2022
<i>A. platensis</i>	Pollos de engorda sometidos a estrés por calor	0 y 3%	Vellosidades del íleon mejoraron en los pollos alimentados con <i>A.</i>	Chaudhary <i>et al.</i> , 2023.

### **2.7.1 C-ficocianina en Nutrición Animal**

Pocos estudios se han realizado para investigar los efectos de suplementar c-ficocianina en nutrición animal. La mayoría están enfocados en la adición de biomasa de microalgas o cianobacterias.

Abdelnour *et al.*, (2020) exploraron el impacto de incorporar C-PC a concentraciones de 0, 50, 100 y 150 mg/kg de dieta sobre el rendimiento, variables hematológicas, antioxidantes, respuesta inflamatoria y microbiota cecal en conejos en crecimiento criados en verano. Los animales suplementados con C-PC tuvieron mejor peso corporal vivo, aumento de peso diario promedio e índice de conversión alimenticia, que el grupo control. Los eritrocitos aumentaron significativamente al adicionar CPC y disminuyeron las citocinas proinflamatorias (IL-4 e IFN-c) en el plasma. Concluyeron que dietas con ficocianina pueden ayudar a que los conejos superen impactos adversos de estrés por calor mejorando su salud.

Memije *et al.*, (2018) condujeron una investigación para comparar la administración de biomasa seca de *A. maxima* y de c-ficocianina, sobre la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) y sus complicaciones cardiovasculares en ratas. La biomasa se incorporó en concentración de 1g/kg y la ficocianina 100mg/kg. Encontraron que tanto la biomasa como la ficocianina redujeron la hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, disfunción renal y estrés oxidativo, concluyendo que pueden usarse para retrasar la ERC y las complicaciones cardiovasculares asociadas.

Un estudio llevado a cabo por Xie *et al.* (2019) evaluó la microbiota y morfología intestinal en ratones con una dieta suplementada con c-ficocianina (50 y 100 mg/kg dieta), la cual fue administrada por medio de una sonda nasogástrica. El peso corporal de los ratones no tuvo diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos experimentales. Sin embargo, al adicionar C-PC aumentó la riqueza y diversidad en la microbiota intestinal y aumentó la abundancia de la familia Lactobacillaceae, que contiene bacterias probióticas que benefician la salud del huésped. También aumentó la descomposición de los carbohidratos y el número de bacterias productoras de

ácidos grasos de cadena corta. Además, los tejidos ileales y colónicos en los grupos con dietas C-PC mostraron una mayor altura de las vellosidades. Adicionalmente, incrementó la función de la barrera epitelial del colon evitando que las endotoxinas ingresaran a la circulación sistémica. Esto se reflejó en mejores efectos en la concentración de 50 mg/kg dieta que en la dosis más alta.

Hao *et al.* (2022) evaluaron las funciones antidiabéticas y el mecanismo de acción de la c-ficocianina en ratones con una dieta alta en glucosa y grasas, adicionada en 100 y 200 mg/kg de peso vivo. Sus resultados muestran que la C-PC redujo la hipoglucemia inducida por una dieta alta en glucosa y grasas, mejoró la tolerancia a la glucosa y los cambios histológicos en el hígado y el páncreas. Disminuyó los triglicéridos, colesterol total, aspartato transaminasa y la transaminasa glutámico-pirúvica. Este fue el primer estudio que indicó que la c-ficocianina regula la función antidiabética en ratones con diabetes mellitus 2 inducida por una dieta alta en glucosa y grasas, así como en células resistentes a la insulina, sentando así una base para el tratamiento potencial de la diabetes usando productos naturales.

## **2.8 Cianobacterias en Nutrición Humana**

Algunos estudios se han realizado utilizando biomasa de *Arthrospira spp* en alimentos para consumo humano.

Raczyk *et al.*, (2022) evaluaron el efecto sobre las propiedades físicas y químicas en pasta fresca a base de sémola al añadir *A. platensis*. a razón de 3, 5, 7 y 10% de biomasa en polvo. La adición de la cianobacteria influyó en el color del producto final y en la evaluación sensorial, habiendo obtenido la pasta con 7% de *A. platensis* la puntuación más alta entre los tratamientos analizados.

Saharan y Jood (2017) estudiaron las propiedades fisicoquímicas de *A. platensis* y su incorporación en harina de trigo para el desarrollo de productos con valor agregado (pasta y productos de panadería). La digestibilidad *in vitro* de la proteína de la cianobacteria en polvo fue de 92.6%, lo que se considera altamente digerible. Además, el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble fue de 15, 5.5 y 9.5% respectivamente. El contenido de ácido gamma linolénico (GLA) fue de 30%, del total

de ácidos grasos. También tuvieron 13.6% de carbohidratos y 353 Kcal/100 g en contenido energético. Con esto concluyeron que el polvo de *A. platensis* incorporado a la harina de trigo sería ventajoso para mejorar la calidad nutricional de los productos elaborados a base de trigo. Estos productos con biomasa incorporada hasta un 6% fueron aceptados moderadamente de acuerdo con las pruebas sensoriales.

En una investigación de Almeida *et al.*, (2021) se evaluaron durante 45 días de almacenamiento las propiedades fisicoquímicas, sensoriales, antioxidantes y microbiológicas en una salsa enriquecida con 0, 2, 3 y 4% biomasa de *Arthrospira sp.* La formulación con 4% de biomasa presentó las mejores características evaluadas: un aumento significativo de proteínas (34%), fibra (57%), cenizas (40%), ácidos grasos monoinsaturados (240%) y minerales (192%) respecto al control. La estabilidad de almacenamiento por hasta 45 días se observó en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Además, la actividad antioxidante aumentó hasta 12 veces. Con esto concluyeron que la biomasa de *Arthrospira sp* se puede utilizar como ingrediente natural para elaborar una salsa funcional con potencial antioxidante y nutricional.

### **2.8.1 C-ficocianina en Nutrición Humana**

El uso específico de c-ficocianina para su adición en alimentos para consumo humano ha incrementado paulatinamente.

Hadiyanto *et al.*, (2019) evaluaron la calidad y valores organolépticos de fideos secos con c-ficocianina incorporada (0.5, 1.0 y 1.5%). Sus resultados mostraron que la c-ficocianina conduce a un aumento del índice de hinchamiento de los fideos, así como la pérdida por cocción. Con la adición de 0.5% de C-PC se obtuvieron los fideos más preferidos según lo indicado por las pruebas organolépticas de los consumidores.

García *et al.*, (2021) estudiaron la adición de c-ficocianina de *A. platensis* como colorante azul en bebidas (isotónicas, tónicas y vino), para evaluar si las muestras con C-PC tienen un color similar a las bebidas comerciales con colorantes artificiales. Los ensayos realizados con un colorímetro indicaron que el color de las muestras adicionadas con c-ficocianina es similar al de las muestras comerciales de referencia, demostrando así que la C-PC puede usarse como colorante natural ampliando la lista de productos naturales disponibles actualmente.

Vázquez y Escalante (2022) evaluaron la estabilidad de c-ficocianina en caramelos de gelatina cuando se adiciona trehalosa y ácido cítrico posteriormente digeridos en jugo gástrico sintético con pepsina. Observaron que la C-PC combinada con trehalosa puede soportar el jugo gástrico y la pepsina durante el tiempo suficiente para pasar por el tracto digestivo. Concluyeron que la inclusión de trehalosa en la formulación proporciona mayor estabilidad del pigmento y que los caramelos de gelatina son un buen vehículo para llevar la c-ficocianina al intestino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación consta de tres etapas experimentales:

Etapas 1. Evaluación de un fertilizante inorgánico y optimización del cultivo.

Etapas 2. Optimización de la extracción de c-ficocianina.

Etapas 3. Aplicación de c-ficocianina en alimentación animal y humana.

### **3.1 Localización del Estudio**

La investigación se realizó en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La etapa 1 y 2 en el Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos, Plantas y Aguas, durante el período de enero de 2022 a abril de 2023. La etapa 3 (nutrición animal) durante mayo a agosto de 2023, en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos y en el área de Nutrición Experimental, ubicada en el Centro de Exposiciones del Campus de Ciencias Agropecuarias UANL. La parte de nutrición humana, también se realizó en el laboratorio de Remediación Ambiental.

### **3.2 Microorganismo**

Se utilizó la cianobacteria *Arthrospira maxima* preservada en medio Zarrouk (Zarrouk, 1966) a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y pH ajustado a 9 con NaOH 5N. El cultivo se mantuvo con aireación continua y fotoperiodo de 12 h luz con una intensidad de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El crecimiento se evaluó midiendo la densidad óptica a 680 nm usando un espectrofotómetro de UV/Vis (Thermo Scientific, China).

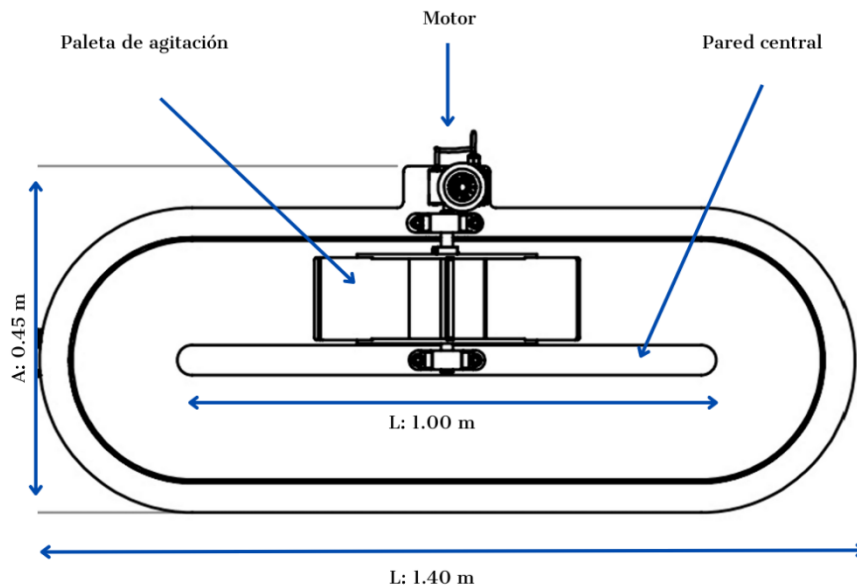
### 3.3 Etapa 1: Cultivo de *A. maxima* en un Sistema Raceway

#### 3.3.1 Evaluación de un Fertilizante Inorgánico

Para evaluar el efecto de un fertilizante inorgánico (NPK 18-18-18 marca Ultrasol) a diferentes concentraciones en el crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira maxima*, se utilizó un sistema abierto tipo raceway escala piloto con agitación mecánica.

##### 3.3.1.1 Raceway Escala Piloto

La cianobacteria se cultivó en un raceway fabricado en acrílico, de 1.40 m de largo, 0.45 m de ancho y 0.25 m de profundidad (Fig. 3). Consta de una pared central de 1 m de largo, paleta de agitación con 6 aspas y un motor reductor. La capacidad máxima es de 100 L siendo operado a 80 L a temperatura ambiente, con 8 h de agitación diaria a 15 rpm. Para la iluminación se utilizaron luces LED con intensidad constante de  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se agregaron diferentes concentraciones de NPK, bicarbonato de sodio, inóculo inicial y fotoperíodo. Los experimentos tuvieron una duración de 12 días.



**Figura 3.** Diagrama del raceway escala piloto.

### 3.3.1.2 Diseño Experimental

Se empleó la Metodología Taguchi en el software Minitab (Versión 17.1.0) para evaluar el efecto de la concentración de NPK, bicarbonato de sodio, inóculo y fotoperíodo. Una matriz L9 permitió estimar las condiciones óptimas de estas variables para maximizar la producción de la variable dependiente (c-ficocianina). Las variables independientes fueron evaluadas en 3 niveles: bajo, medio y alto (Cuadro 3) resultando en una combinación de 9 experimentos mostrados en el Cuadro 4.

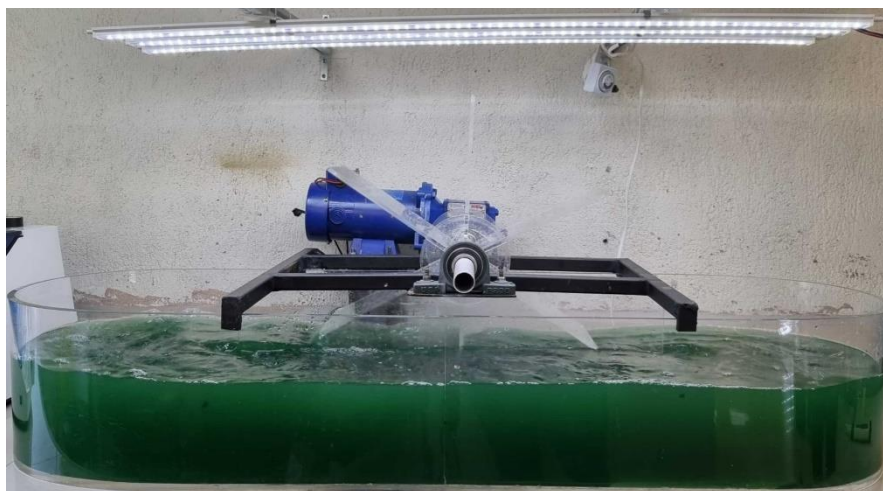
**Cuadro 3.** Rango de niveles de las variables utilizadas para la optimización del cultivo de *A. maxima*.

<b>Variables independientes</b>	<b>Factor</b>	<b>Bajo (-1)</b>	<b>Medio (0)</b>	<b>Alto (+1)</b>
Concentración de NPK (g L <sup>-1</sup> )	A	0.0	0.5	1.0
Fotoperíodo (h)	B	8	12	16
Concentración de inóculo (g L <sup>-1</sup> )	C	0.1	0.2	0.3
Concentración de NaHCO <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	D	4.2	10.5	16.8

**Cuadro 4.** Diseño experimental para los tratamientos utilizados para la optimización del cultivo.

<b>Run</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Control	0.0 (-1)	16 (+1)	0.3 (+1)	16.8 (+1)
1	0.0 (-1)	8 (-1)	0.1 (-1)	4.2 (-1)
2	1.0 (+1)	8 (-1)	0.3 (+1)	10.5 (0)
3	0.0 (-1)	12 (0)	0.2 (0)	10.5 (0)
4	0.5 (0)	16 (+1)	0.1 (-1)	10.5 (0)
5	1.0 (+1)	12 (0)	0.1 (-1)	16.8 (+1)
6	0.0 (-1)	16 (+1)	0.3 (+1)	16.8 (+1)

7	0.5 (0)	12 (0)	0.3 (+1)	4.2 (-1)
8	0.5 (0)	8 (-1)	0.2 (0)	16.8 (+1)
9	1.0 (+1)	16 (+1)	0.2 (0)	4.2 (-1)



**Figura 4.** Sistema raceway escala piloto para el cultivo de *Arthrospira maxima*.

### 3.4 Análisis Fisicoquímicos y Bioquímicos en el Cultivo de *A. maxima*

#### 3.4.1 Curva Estándar para Crecimiento

La biomasa se determinó a partir de la curva estándar elaborada previamente con el equipo de trabajo, realizando lecturas a longitud de onda de 680 nm vs materia seca. Para ello, se tomó una lectura inicial de la cepa a 680 nm. Después se utilizó la ecuación (Ec. 1) para conocer la cantidad de medio necesario y aforar con agua destilada.

$$V (mL) = \frac{(Std)(Vol.matraz)}{Abs} \quad (1)$$

Donde:



V= volumen (ml)

Std= estándar

Abs= absorbancia

### **3.4.2 Análisis Físicoquímicos del Medio y Crecimiento Celular**

Cada tres días se tomaron muestras directamente del raceway para medir pH y conductividad eléctrica, así como crecimiento celular (por densidad óptica y recuento celular). Adicionalmente, se tomaron muestras de 40 ml que fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 minutos y después filtradas en filtros de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro; para realizar análisis físicoquímicos del medio (alcalinidad, nitratos, ortofosfatos y amonio).

#### **3.4.2.1 pH, Conductividad Eléctrica y Salinidad**

Cada tres días se midió el pH y la conductividad eléctrica en muestras tomadas directamente del raceway, utilizando un potenciómetro modelo STARA-2155 (Thermo Scientific, Indonesia). Para medir la salinidad se utilizó un medidor multiparamétrico modelo EZ-9909SP (Walfront, China).

#### **3.4.2.2 Crecimiento Celular**

El crecimiento celular se determinó cada tres días por espectrofotometría a 680 nm\* utilizando un espectrofotómetro Evolution 201 (Thermo Scientific, China) y se calculó la concentración ( $\text{g L}^{-1}$ ) empleando la ecuación de la curva obtenida de la gráfica de crecimiento. También se realizó recuento celular con una cámara de Neubauer y microscopio marca modelo CxL (Labomed, USA).

#### **3.4.2.3 Alcalinidad**

De acuerdo con la NOM-AA-036-SCFI-2001 se determinó alcalinidad realizando una titulación con ácido sulfúrico 0.2 N, con fenolftaleína y anaranjado de metilo como indicador. La alcalinidad total se expresa en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  de acuerdo con la ecuación 2:

$$\text{Alcalinidad total como CaCO}_3 \text{ en } \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{(A)(N)}{m} (50)(1000) \quad (2)$$

Donde:

*A* es el volumen gastado de ácido sulfúrico (ml) en la titulación al vire del anaranjado de metilo

*N* es la normalidad de la solución de ácido

*m* es el volumen de muestra utilizado en ml

50 el factor para convertir eq/L a mg CaCO<sub>3</sub>/ L

1000 el factor para convertir ml a L.

#### 3.4.2.4 Nitratos

La determinación de nitratos se realizó conforme a lo establecido en el método 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B (APHA, 2017). A una porción de muestra (5 ml) directa o diluida se le adicionan 0.1 ml de una solución de HCl 1N. Después de mezclar bien se leen en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Evolution 201 (Thermo Scientific, China) a 220 y 275 nm\*.

Una curva patrón fue realizada a partir de una solución madre de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>). La concentración de nitratos se expresó en mg L<sup>-1</sup> y se calculó de acuerdo con la ecuación de la curva.

#### 3.4.2.5 Amonio

La concentración de amonio se determinó únicamente en los tratamientos donde hubo adición de NPK, utilizando el método del fenol establecido en APHA (2017). Se tomaron 2.5 ml de muestra diluida 1:50 y se agregaron 1.0 ml y 1.5 ml de la solución de fenol-nitroprusiato y 1.5 ml de solución oxidante. Después de 45 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad, se midió la absorbancia a 635 nm\*.

La curva de calibración se realizó con una solución de cloruro de amonio utilizando 7 puntos en un rango de 0.1 ppm de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. En base a la ecuación de la curva, se calculó la concentración de amonio en mg L<sup>-1</sup>.

### **3.4.2.6 Ortofosfatos**

Para determinar ortofosfatos se utilizó el método del ácido ascórbico (4500-P) estipulado en (APHA, 2017). Se tomaron 5 ml de muestra diluida 1:100 y se adicionaron 0.8 ml de la solución combinada. Posteriormente se agitó en vortex y se dejó reposar 10 minutos antes de ser leídos a 880 nm\* en el espectrofotómetro de UV-Vis.

Para la curva de calibración se preparó una solución madre con fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Con 5 puntos de calibración, se realizó la gráfica y se obtuvo la ecuación de la curva, con ella se calculó la concentración (mg L<sup>-1</sup>) de ortofosfatos.

### **3.4.3 Análisis Bioquímicos de la Biomasa**

Al final de los 12 días de cultivo, se cosechó por filtración con una malla de serigrafía de 165 hilos y fue secada a 30°C en un deshidratador para alimentos marca Septree. En muestras de cultivo fresco se analizaron clorofila y carbohidratos, mientras que con la biomasa seca se determinaron lípidos y ficocianina, como se describe a continuación.

#### **3.4.3.1 Clorofila**

La cuantificación de clorofila a se realizó por espectrofotometría de UV-Vis utilizando acetona al 90% como solvente. Para ello, se tomaron 10 ml de muestra antes de la cosecha y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de agua destilada para remover las sales. Después se agitó en el vórtex 15 s, se centrifugó y desechó el sobrenadante. Este proceso se repitió 2 veces más. Finalmente, al pellet se le añadieron 10 ml de acetona al 90% y se agitó por 15 s. La mezcla se almacenó a -20°C por 24 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro UV-vis a 510, 630, 664 y 480 nm\* usando acetona al 90% como blanco (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

Para calcular la concentración de clorofila a se utilizó la ecuación establecida por Lichtenthaler (Ec. 3).

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/mL)} = (11.75 \times A_{662}) - (2.35 \times A_{645}) \quad (3)$$

### 3.4.3.2 Carbohidratos

Para determinar carbohidratos totales se utilizó el método de la Antrona (Dimler *et al.*, 1952). Se preparó una solución de antrona al 0.2% con ácido sulfúrico concentrado. Esta solución es estable por 12 h en oscuridad y refrigeración.

Se tomó 1 ml de muestra y se colocó en un tubo de ensayo con tapa. En otros tubos se colocaron por separado 1 ml de agua destilada (blanco) y 1 ml de glucosa (como estándar). Todos los tubos se llevaron al congelador a -20°C durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron a cada uno 4 ml de la solución de antrona, inclinando los tubos para que ésta bajara lentamente y logrando la formación de una capa inferior amarilla y una superior blanca (si no se formaron estas capas o el tubo se tornó verde, se debe descartar). Los tubos se taparon y se llevaron al congelador a -20°C durante 5 min. Al término del tiempo, fueron agitados en vortex para mezclar las dos capas. Posteriormente, se llevaron a baño María a 100°C por 10 min. Al finalizar, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron leídos a 640 nm\*.

### 3.4.3.3 Lípidos

Los lípidos se cuantificaron por el método de Bligh y Dyer (1959). Para ello se tomaron 0.1 g de biomasa seca de *A. maxima* y se colocaron en un tubo Falcon; se agregaron 6 ml de cloroformo y 3 ml de etanol. Posteriormente se colocó esta muestra en un sonicador durante 30 min y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 5°C. El sobrenadante se colocó en crisoles a peso constante y previamente pesados. Después se llevaron a la estufa de secado a 70°C. Transcurridas 24 h y con el sobrenadante completamente evaporado, se dejó enfriar en desecador y se registró el peso final.

El cálculo de % lipídico de acuerdo con la ecuación 4.

$$\text{Contenido lipídico (\%)} = \frac{WL}{WA} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

$W_L$  es la diferencia de peso de los crisoles (g)

$W_A$  es el peso de la muestra (g)

\*para todos los análisis, se realizaron mediciones por quintuplicado.

#### 3.4.4 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados en el programa estadístico Minitab. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey.

### 3.5 Etapa 2: Extracción de C-ficocianina

Se evaluó el método de ciclos de congelación descongelación para extraer c-ficocianina a partir de *Arthrospira maxima* con la finalidad de seleccionar las mejores condiciones para optimizar su extracción. Después de mezclar la biomasa con el buffer en tubos Falcon, se congelaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente los tubos se pusieron a descongelar a temperatura ambiente completando así un ciclo.

#### 3.5.1 Diseño Experimental

Utilizando la biomasa del control se empleó la Metodología Superficie de Respuesta (RSM) con un diseño compuesto central y tres puntos centrales. Se evaluaron diferentes condiciones de pH, concentraciones de buffer fosfato de potasio (BFP), cantidad de biomasa y número de ciclos. Las variables independientes se establecieron en tres niveles: bajo, medio y alto (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Rango de niveles de variables utilizadas para la optimización de la extracción de C-PC.

Variables Independientes	Factor	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
pH	A	5.5	6.75	8.0

Concentración buffer (mM)	B	100	300	500
Número de ciclos	C	1	3	5
Cantidad de biomasa (mg)	D	50	100	150

Utilizando el software Design Expert (Versión 12) se diseñaron 29 experimentos (cuadro 6) los cuales fueron realizados por triplicado para predecir las condiciones óptimas de extracción.

**Cuadro 6.** Diseño experimental para la optimización de la extracción de C-PC.

Run	A	B	C	D
1	6.75 (0)	100 (-1)	3 (0)	150 (+1)
2	6.75 (0)	300 (0)	1 (-1)	150 (+1)
3	5.5 (-1)	300 (0)	5 (+1)	100 (0)
4	8 (+1)	300 (0)	1 (-1)	100 (0)
5	8 (+1)	300 (0)	3 (0)	150 (+1)
6	6.75 (0)	300 (0)	3 (0)	100 (0)
7	6.75 (0)	100 (-1)	1(-1)	100 (0)
8	6.75 (0)	300 (0)	3 (0)	100 (0)
9	6.75 (0)	300 (0)	1 (-1)	50 (-1)
10	5.5 (-1)	300 (0)	3 (0)	50 (-1)
11	5.5 (-1)	300 (0)	3 (0)	150 (+1)
12	6.75 (0)	500 (+1)	3 (0)	150 (+1)
13	6.75 (0)	300 (0)	3 (0)	100 (0)
14	5.5 (-1)	300 (0)	1 (-1)	100 (0)
15	6.75 (0)	100 (-1)	5 (+1)	100 (0)

16	8 (+1)	500 (+1)	3 (0)	100 (0)
17	6.75 (0)	300 (0)	5 (+1)	50 (-1)
18	8 (+1)	300 (0)	5 (+1)	100 (0)
19	8 (+1)	100 (-1)	3 (0)	100 (0)
20	6.75 (0)	300 (0)	3 (0)	100 (0)
21	5.5 (-1)	100 (-1)	3 (0)	100 (0)
22	6.75 (0)	300 (0)	5 (+1)	150 (+1)
23	6.75 (0)	500 (+1)	3 (0)	50 (-1)
24	8 (+1)	300 (0)	3 (0)	50 (-1)
25	6.75 (0)	500 (+1)	5 (+1)	100 (0)
26	6.75 (0)	100 (-1)	3 (0)	50 (-1)
27	6.75 (0)	500 (+1)	1 (-1)	100 (0)
28	5.5 (-1)	500 (+1)	3 (0)	100 (0)
29	6.75 (0)	300 (0)	3 (0)	100 (0)

Al término del ciclo correspondiente, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue leído a 652, 615, 562 y 280 nm en el espectrofotómetro de UV-Vis, como se muestra en la Figura 5. Para calcular la concentración de c-ficocianina, se utilizó la ecuación 5 propuesta por Bennett y Bogorad (1973).

$$C - PC (mg/ml) = (A_{620} - 0.474 \times A_{652})/5.34 \quad (5)$$



**Figura 5.** Proceso de extracción de c-ficocianina mediante el método de congelación descongelación.

### 3.5.2 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de la extracción en las 29 corridas se analizaron por el programa Design Expert. Se obtuvieron el análisis de varianza, el modelo matemático y se determinaron las condiciones óptimas de cada variable para maximizar la concentración extraída de c-ficocianina. Dichas condiciones fueron aplicadas en la extracción del pigmento en los nueve tratamientos cultivados en el raceway.

### 3.6 Etapa 3: Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Animal

La c-ficocianina de *A. maxima* se adicionó en dieta basal para codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) en etapa de postura a concentraciones de: 0.0, 50, 100 y 150 mg/kg de dieta, como se muestra en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Dietas experimentales para codornices en etapa de postura (preparación para 5 kg de alimento).

	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Concentración de C-PC (mg/ kg dieta)	0.0	50	100	150
Maíz	2730.00	2730.00	2730.00	2730.00
Harina de soya	1617.9	1617.9	1617.9	1617.9
Aceite vegetal	165	165	165	165



Fosfato monocálcico	10	10	10	10
Carbonato de calcio	425	425	425	425
Sal	20	20	20	20
Lisina (78%)	6	6	6	6
Metionina (99%)	15.5	15.5	15.5	15.5
Treonina (99%)	1.5	1.5	1.5	1.5
Sulfato ferroso (30% Fe)	0.8	0.8	0.8	0.8
Óxido de manganeso (60% Mn)	0.9	0.9	0.9	0.9
Sulfato de cobre (25% Cu)	0.3	0.3	0.3	0.3
Sulfato de zinc (36% Zn)	1.2	1.2	1.2	1.2
Selenito de sodio (1% Se)	0.125	0.125	0.125	0.125
EDDI (10% I)	0.075	0.075	0.075	0.075
Cloruro de colina	4.5	4.5	4.5	4.5
Núcleo vitamínico (250g/ton)	1.25	1.25	1.25	1.25
Ficocianina	-	0.25	0.50	0.75

Un total de 64 aves de 10 semanas de edad se utilizaron durante cinco semanas para la experimentación. Se asignaron en bloques completamente al azar acomodadas en cuatro tratamientos. Cada tratamiento tuvo cuatro jaulas con cuatro aves cada una. Se le colocaron anillos numerados a cada una para una mejor identificación, como se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Codorniz japonesa con anillo identificador.

Las dietas experimentales fueron formuladas para cubrir los requerimientos nutricionales y de energía de codornices en la etapa de postura, de acuerdo con lo sugerido por el National Research Council (1994). Fueron elaboradas en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la FAUANL y almacenadas en cubetas de 20 L de capacidad, correctamente identificadas y cerradas para protegerlas de la humedad.

Las dietas experimentales fueron suministradas y evaluadas durante 35 días. Se ofrecieron diariamente agua y alimento, registrando diariamente el peso de este. Semanalmente se registraron el peso de las aves y del alimento rechazado.

### **3.6.1 Área Experimental**

El experimento se llevó a cabo en el área de investigación en Nutrición Experimental, ubicada en el Centro de Exposiciones del Campus de Ciencias Agropecuarias UANL. Se utilizaron 16 jaulas que median 80 cm de ancho, 33 cm de alto y 60 cm de profundidad. Cada jaula tenía un bebedero y dos comederos. (Fig. 7)

Antes del comienzo del experimento, las aves fueron asignadas al azar a las

jaulas para su adaptación.



**Figura 7.** Bloques completamente al azar en el área experimental.

### **3.6.2 Evaluación de Ganancia de Peso y Consumo**

El alimento fue ofrecido diariamente, aproximadamente 160 g por jaula. Al finalizar la semana, se pesó el alimento rechazado utilizando una báscula electrónica (marca Trupper) con capacidad de 5 kg.

También al final de la semana se pesaron las codornices individualmente con la báscula electrónica (Marca Trupper) utilizando un recipiente para el manejo adecuado de las aves (Figura 8).



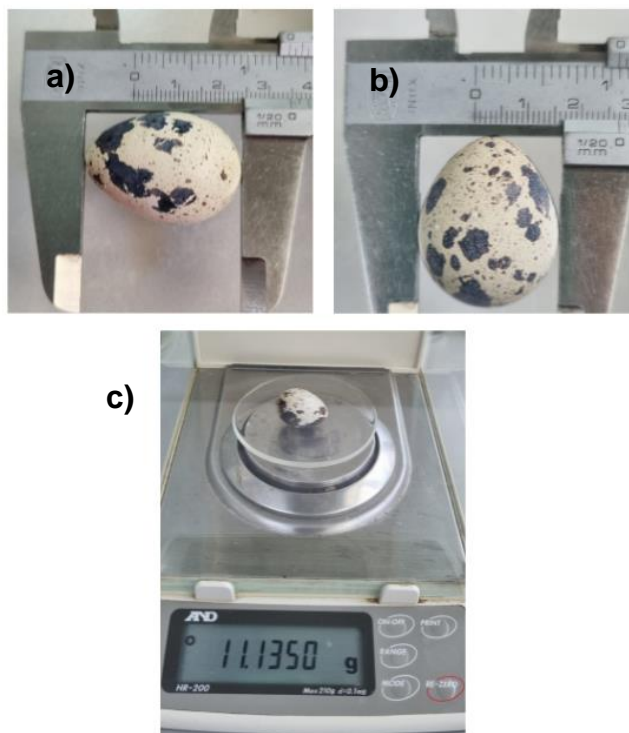
**Figura 8.** Pesaje de las codornices.

En esta etapa se registraron como variables: consumo de alimento (CA), ganancia de peso (GP) y producción de huevo (PH).

### 3.6.3 Evaluación de la Calidad Física del Huevo

Diariamente se registraron la cantidad de huevos así como su peso y medidas (largo y ancho). Para ello se utilizó un vernier (Fig. 9). Con estos datos se calculó el índice de forma mediante la ecuación 6.

$$\text{Índice de forma} = \frac{\text{ancho}}{\text{largo}} \times 100 \quad (6)$$



**Figura 9.** Mediciones realizadas en los huevos colectados diariamente: a) largo, b) ancho y c) peso.

Para determinar la proporción de clara- yema, peso y grosor del cascarón, las muestras frescas fueron abiertas utilizando unas tijeras para huevo y se utilizó un separador de clara. El peso de cada uno fue medido con una balanza analítica (A&D, HR-200, Estados Unidos). El grosor del cascarón se midió con un micrómetro de tornillo.

La colorimetría de la yema fue registrada con los valores  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (colores rojo-verde),  $b^*$  (colores amarillo-azul), C (saturación de color) y H (tono de color) utilizando un colorímetro digital HP-2131 Spec Chin (China).

Para el análisis de materia seca y cenizas, de los huevos recolectados se seleccionaron piezas al azar de los días 1, 6, 13, 20, 27 y 34. Para determinación de grasa, proteína y energía se utilizaron huevos de los días 27 y 34.

### 3.6.4 Análisis Bromatológicos a los Huevos y las Dietas

Los análisis proximales a los huevos y las dietas experimentales se realizaron en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la Facultad de Agronomía, U.A.N.L.

#### 3.6.4.1 Materia Seca y Cenizas

Se realizó de acuerdo con lo descrito en el método 930.15 por la AOAC (2005). Aproximadamente 1 g de muestra fue secado a 100°C por 24 h en crisoles a peso constante para evaporar el agua de la muestra. Posteriormente los crisoles se colocaron en un desecador; después la muestra fue pesada para registrar el peso final. El porcentaje de materia seca se determinó con la ecuación 7.

$$\% MS = \frac{(W3-W1)}{W2} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

W3= peso del crisol con la muestra seca (g)

W1 = peso del crisol vacío (g)

W2 = peso de la muestra (g)

Para calcular el porcentaje de humedad se utilizó la ecuación 8.

$$\% Humedad = 100 - MS \quad (8)$$

Después de determinar materia seca, los mismos crisoles con muestra se llevaron a la mufla para su incineración a 550°C durante 6 h (método 942.05 de la AOAC, 2005). Al someter la muestra a combustión se oxida la materia orgánica obteniendo cenizas que consisten en minerales. Al término del tiempo, las muestras se pasaron a desecadores y después se pesaron. Se calculó el porcentaje de cenizas de acuerdo con la ecuación 9.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(W4-W1)}{W2} \times 100 \quad (9)$$

Donde:

W4= peso del crisol con las cenizas(g)

W1 = peso del crisol vacío (g)

W2 = peso de la muestra (g)

#### 3.6.4.2 Grasas Cruda

Utilizando un equipo ANKOM XT10 y éter de petróleo como solvente, se extrajo la grasa de las muestras de alimento y huevo. Se pesaron entre 1 y 2 g de muestra seca dentro de la bolsa de filtro. Posteriormente se llevaron a la estufa a 100°C durante 3 h. Después se pesó nuevamente la bolsa con la muestra seca y se llevó al equipo agregando 350 ml del solvente. La extracción tuvo una duración de 40 min a 90°C. Al finalizar, las bolsas se llevaron a secar a la estufa a 100°C durante 24 h. El porcentaje de grasa se calculó con la ecuación 10.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(W2-W3)}{W1} \times 100 \quad (10)$$

Donde:

W1= peso de la muestra (g)

W2 = peso de la bolsa con la muestra seca (g)

W3 = peso de la bolsa seca con muestra después de la extracción (g)

#### 3.6.4.3 Proteína Cruda

La proteína cruda (PC) se determinó por el método de Kjeldahl que cuantifica el nitrógeno total de la muestra (Etheridge *et al.*, 1998). Digestión: 1 g de muestra se digiere a 400 °C durante 30 min, en presencia de un catalizador (CuSO<sub>4</sub>: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 98%) concentrado. La muestra digerida debe tomar un color verde esmeralda. Fase destilación: a matraces bola de 800 ml se añaden 300 ml de agua destilada, tres perlas de vidrio, la muestra digerida de la fase anterior, 100 ml de

hidróxido de sodio (NaOH, 40%) para alcalinizar la muestra digerida y se llevan al destilador donde el nitrógeno se desprende en amoníaco el cual se recoge en un matraz Erlenmeyer con ácido bórico al 4% y 1' gotas de indicador (rojo de metilo: verde bromocresol). Para cuantificar el nitrógeno amoniacal se realiza una titulación con ácido clorhídrico al 0.1 N con rojo de metilo como indicador hasta el vire de verde a gris oscuro.

Para calcular el contenido de proteína cruda se utiliza la ecuación 11 de acuerdo con McDonald (2002).

$$\text{Proteína cruda (g/kg)} = \frac{\text{g N}}{\text{Kg}} \times 6.25 \quad (11)$$

#### **3.6.4.4 Energía Bruta**

La determinación de energía en las dietas y los huevos se hizo por combustión utilizando una bomba adiabática calorimétrica marca Parr, de acuerdo con lo descrito con Saldaña *et al.*, (2016). Se pesaron aproximadamente 0.20 g de muestra dentro de cápsulas de gelatina dura, la cual se coloca dentro de una cámara de combustión de acero inoxidable con tapa de rosca. Para asegurar una ignición completa, se inyecta oxígeno a la cámara de combustión.

#### **3.6.4.5 Fracciones de Fibra**

La determinación de fracciones de fibra se realizó únicamente en las dietas experimentales.

Se colocaron aproximadamente de 0.45-0.55 g de la muestra dentro de bolsas de filtro previamente pesadas y se acomodaron dentro del equipo ANKOM<sup>2000</sup>. Fibra detergente neutro: Primero, las muestras fueron tratadas con una solución detergente neutro y se adicionó 4 ml de amilasa, para que los azúcares, el almidón y las pectinas sean solubles. Con la finalidad de eliminar los residuos de detergente se realizaron cuatro lavados con agua, los primeros dos con amilasa y los otros dos sin amilasa. Los residuos restantes son sustancias menos o no digeribles de pared celular (hemicelulosa, celulosa y lignina). Fibra detergente ácido: las muestras se someten a



cocción con detergente ácido para que la hemicelulosa sea soluble. Nuevamente se hicieron cuatro lavados con agua destilada. Lignina: Finalmente, ya que el residuo contiene celulosa y lignina, éste se trata con ácido sulfúrico al 72% para disolver la celulosa dejando únicamente la lignina.

### 3.6.5 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables y comparación de medias por el método de Tukey. Para determinar si existen diferencias significativas se consideró  $P < 0.05$ . Un intervalo de confianza del 95% se utilizó para todas las pruebas. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS®, versión 22.

### 3.7 Etapa 3: Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Humana

Se elaboraron gomitas adicionadas con c-ficocianina en polvo en diferentes concentraciones como se muestra en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Formulación de gomitas con c-ficocianina.

	<b>Control</b>	<b>T1 0.30% C-PC</b>	<b>T2 0.50% C-PC</b>	<b>T3 0.70% C-PC</b>
<i>Ingredientes</i>	%	%	%	%
<i>Agua</i>	75	74.70	74.50	74.30
<i>Grenetina</i>	15	15	15	15
<i>Edulcorante</i>	10	10	10	10
<i>C-ficocianina</i>	0	0.30	0.50	0.70
<i>Total</i>	100	100	100	100

Se calentó agua a 80°C después se agregaron la grenetina y el edulcorante previamente pesados. Se mezcló hasta disolver completamente y cuando la mezcla alcanzo la temperatura ambiente se agregó la c-ficocianina. Se agitó para disolver y cuando se incorporó por completo, se pasó a los moldes. Se dejó reposar durante

treinta minutos a temperatura ambiente, posteriormente se llevó a refrigeración a 4°C durante 12 horas.

### 3.7.1 Humedad

En base al método 930.15 de la AOAC (2005) se colocaron entre 1 y 2 gramos de muestra en crisoles a peso constante. Después se llevaron a una estufa a 105°C por 12 horas; al término del tiempo se colocaron en un desecador para dejarlos enfriar y posteriormente fueron pesados en una balanza analítica. El cálculo se realizó de acuerdo con la ecuación 12:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_3} \times 100 \quad (12)$$

Donde:

W1= peso del crisol con la muestra húmeda (g)

W2 = peso del crisol con la muestra seca (g)

W3 = peso de la muestra húmeda (g)

### 3.7.2 Cenizas

El contenido de cenizas se determinó en base al método 942.05 de la AOAC (2005), que consiste en incineración de la muestra en una mufla, a 550 °C durante 4 horas. Las cenizas resultantes son consideradas parte mineral de la muestra. Finalmente, se dejaron enfriar los crisoles y su peso se registró. El cálculo se realizó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_3} \times 100 \quad (13)$$

Donde:

W1= peso del crisol con las cenizas (g)

W2 = peso del crisol vacío (g)

W3 = peso de la muestra seca (g)

### **3.7.3 pH**

Utilizando un potenciómetro para alimentos (Hanna Instruments modelo HI 84532, Estados Unidos) se determinaron por triplicado los valores de pH de cada tratamiento.

### **3.7.4 Medición de Color**

Se utilizó un colorímetro digital HP-2131 Spec Chin (China) para medir por triplicado el color de las muestras. El análisis fue basado en espacio del color CIELab, donde L\* es luminosidad en escala del cero a cien, a\* es la intensidad de los colores verde y rojo (valor negativo tiene tendencia al verde y positivo al rojo) y b\* indica la intensidad del amarillo y el azul (valores negativos tienen tendencia al azul y positivos al amarillo). También fueron obtenidos los valores H (Hue, que es el tono) y c (croma).

### **3.7.5 Medición del Perfil de Textura**

La textura de las muestras se determinó con un perfil de textura (TPA) con un texturómetro (modelo TA. XT Plus de Stable Micro Systems, Inglaterra), comprimiendo la muestra en el centro a 40% de su altura. Se utilizó una sonda cilíndrica plana P/75 con un plato de compresión de 75 mm de diámetro, con una fuerza de disparo de 0.05 N. La velocidad previa a la prueba fue de 2.00 mm/s, la velocidad de la prueba fue de 1.00 mm/s y la velocidad posterior a la prueba fue de 1.00 mm/s. En el TPA se determinaron la dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia.

### **3.7.6 Pruebas Sensoriales**

Se realizó con una prueba hedónica de 5 puntos con 30 panelistas semi entrenados, donde 1 indica me disgusta muchísimo y 5 me gusta muchísimo. La finalidad fue determinar el grado de aceptación en color, olor, textura, sabor y aceptabilidad general para los tres tratamientos.

### 3.7.7 Análisis estadístico

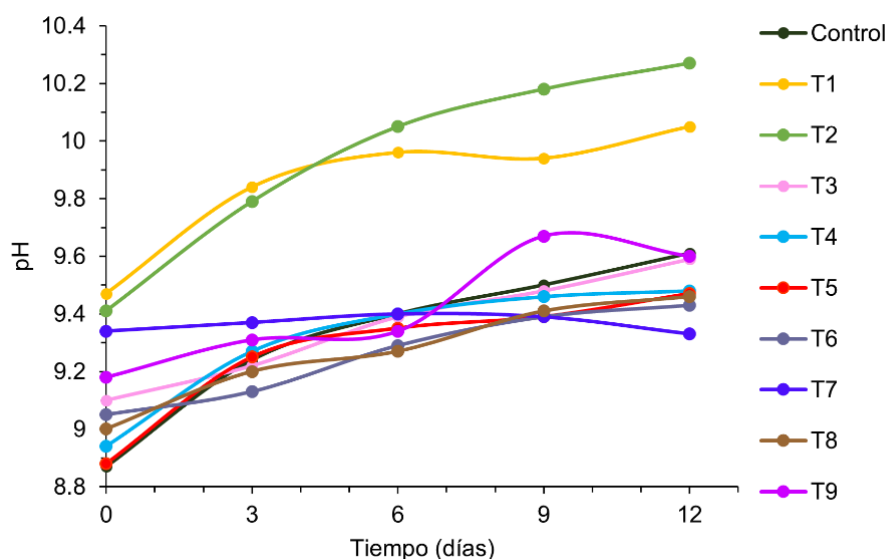
Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SPSS®, versión 22, para cada una de las variables, y se hizo comparación de medias por el método de Tukey, considerando  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis Físicoquímicos en el Cultivo de *A. maxima*

#### 4.1.1 pH, Conductividad Eléctrica y Salinidad

El pH aumentó en todos los tratamientos a lo largo de los doce días de cultivo de *A. maxima* en el raceway (Fig. 10). Probablemente esto se debió a la disociación del bicarbonato de sodio en iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), los cuales al estar disponibles en el medio elevan el pH.

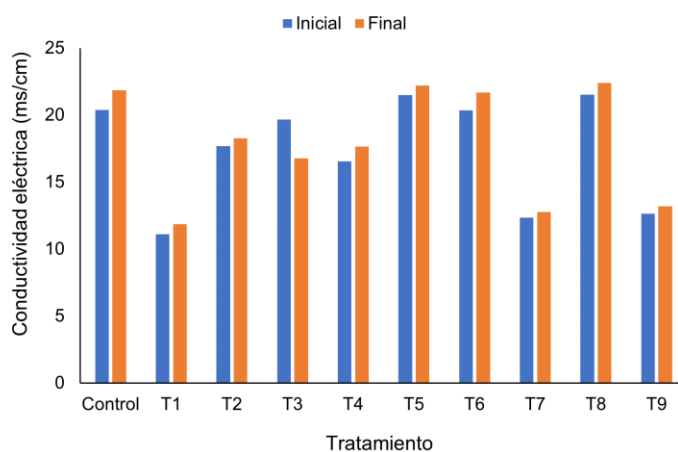


**Figura 10.** Monitoreo de pH en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

Michael *et al.*, (2019) cultivaron *Arthorspira fusiformis* en un medio de bajo costo formulado con NPK, cloruro de sodio y bicarbonato de sodio. Tanto en el medio

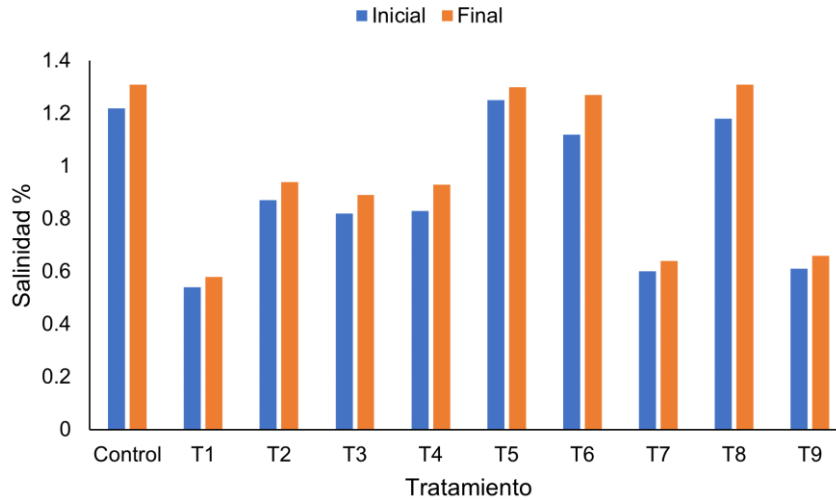
formulado como en el Zarrouk se incrementó el pH. Esto coincide con lo observado en el cultivo de *A. maxima* en los tratamientos con y sin NPK. A pesar de ello, no se altera el crecimiento de la cianobacteria porque *Arthrospira* es un género alcalófilo, que crece sin afectaciones con el aumento en el pH del medio.

En la Fig. 11. muestra la conductividad eléctrica inicial y final de los nueve tratamientos. Al término de los experimentos (día 12) fue más alta que al inicio. Esto se debe a los iones que se van disolviendo en el medio con el paso de los días. Los tratamientos 1, 7 y 9 tuvieron la conductividad eléctrica inicial y final con menores valores con respecto a todos los demás. Estos tratamientos se cultivaron con la concentración de bicarbonato de sodio más baja ( $4.2 \text{ gL}^{-1}$ ) lo que explica los valores bajos de conductividad eléctrica.



**Figura 11.** Conductividad eléctrica (ms/cm) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

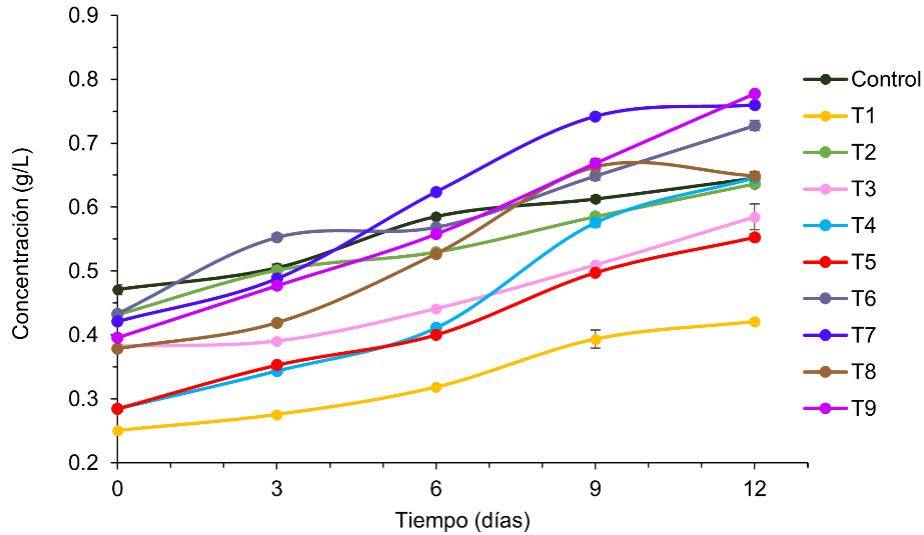
Esto se relaciona con la salinidad (Fig. 12) la cual aumenta a medida que pasan los días. Al finalizar el experimento se registran los valores máximos. Se puede observar que, al igual que en la conductividad eléctrica, en el control y los tratamientos 5, 6 y 8 se tienen las salinidades más altas, debido a que fueron cultivados con la concentración más alta de bicarbonato de sodio ( $16.8 \text{ g L}^{-1}$ ).



**Figura 12.** Salinidad (%) del cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway

#### 4.1.2 Crecimiento celular

En la Fig. 13 se muestra el crecimiento de *A. maxima* en los nueve tratamientos durante los 12 días experimentales, medido por densidad óptica a 680 nm. Se observa que, sin importar la concentración inicial, la tendencia es aumentar el crecimiento especialmente al sexto día. Evaluando estadísticamente la concentración de cada tratamiento al término de cultivo, existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p= 0.000$ ).



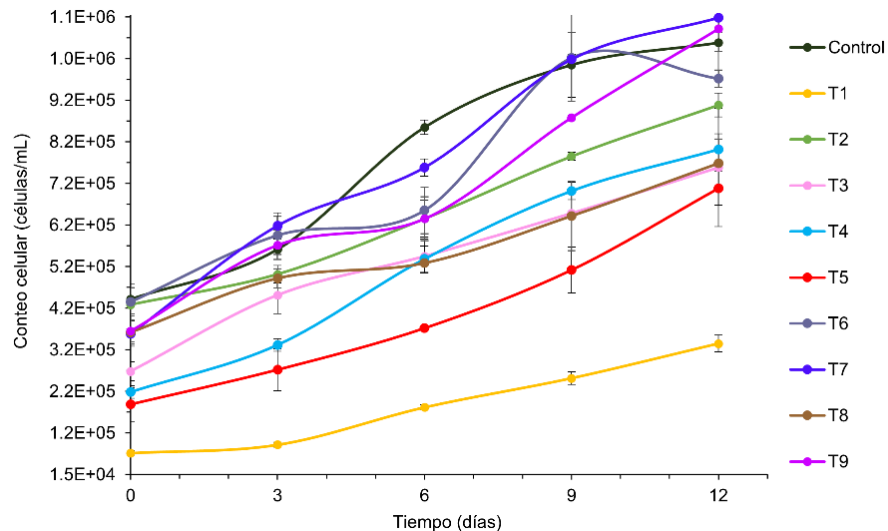
**Figura 13.** Crecimiento *A. maxima* en un sistema raceway determinado por densidad óptica a 680 nm.

El T1 fue el tratamiento con menor crecimiento porque tenía las menores concentraciones de inóculo, bicarbonato de sodio y NPK (0.1, 4.2 y 0.0 g L<sup>-1</sup> respectivamente) y el menor fotoperiodo, teniendo las condiciones más desfavorables.

El T7 fue el tratamiento con mayor crecimiento a pesar de contener 4.2 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio, pero contenía 0.5 g L<sup>-1</sup> de NPK superando el crecimiento mostrado por el control (0.0, 0.3 y 16.8 g L<sup>-1</sup> de NPK, inóculo y bicarbonato de sodio respectivamente, con 16 horas de fotoperiodo).

Esto se ajusta con lo mencionado por Parmar *et al.*, (2011) en el sentido que la intensidad de la luz y el fotoperiodo son los factores principales que determinan la tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas, lo cual es aplicable también a las cianobacterias.

El recuento celular mostrado en la Fig. 14 coincide con la tendencia observada en las mediciones ópticas realizadas a 680 nm. Evaluando el número de células al día 12, existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.000$ ). El T1 tuvo menor número de células y el T7 presentó más células, seguido del control y el T9. Estos últimos tres fueron cultivados con fotoperiodo de 12 y 16 h.



**Figura 14.** Recuento celular con cámara de Neubauer del cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

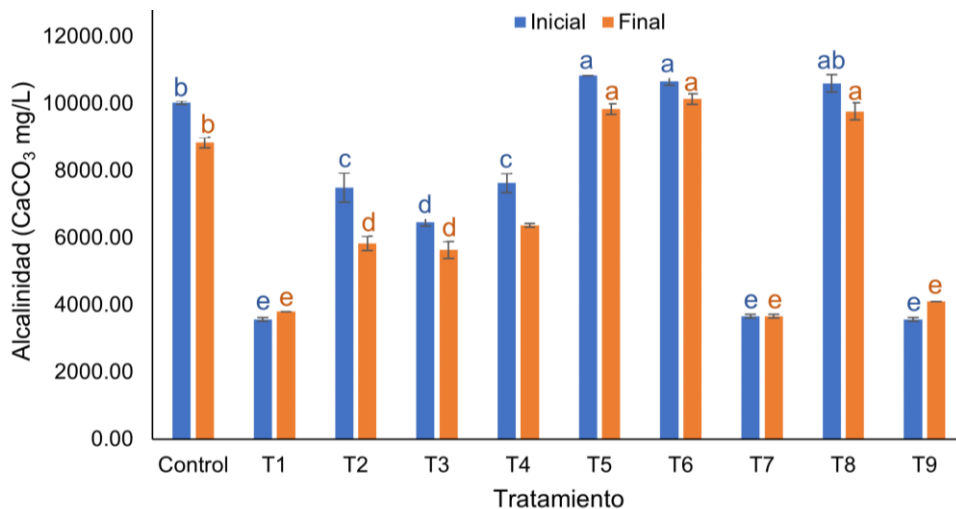
Esto coincide con lo reportado por Junique *et al.*, (2021) quienes cultivaron *A. platensis* en un sistema raceway variando la intensidad de luz y fotoperiodo para encontrar las condiciones óptimas para producción de C-PC, clorofila, carotenoides y proteínas. Observaron que el crecimiento celular aumentaba con la duración de la fase luminosa hasta una exposición máxima de 14 h a la luz.

Bhat *et al.*, (2023) cultivaron *A. platensis* en un sistema cerrado para evaluar distintos fotoperiodos (12:12, 10:14 y 14:10 luz: oscuridad) con luz blanca emitiendo constantemente 2000 lux. Reportaron que aumentando el periodo de luz a 14 h se obtenía mayor densidad óptica y contenido de proteínas.

#### 4.1.3 Alcalinidad

La alcalinidad inicial y final del medio (expresada en  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) se muestra en la Fig. 15. Existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.000$ ), en todos la alcalinidad disminuyó, pero en el T7 se mantuvo igual. Se puede observar que fue más alta en los tratamientos 5, 6 y 8 así como en el control. Todos ellos contenían la concentración más alta de bicarbonato de sodio probada ( $16.8 \text{ g L}^{-1}$ ) lo cual explica la alta alcalinidad.



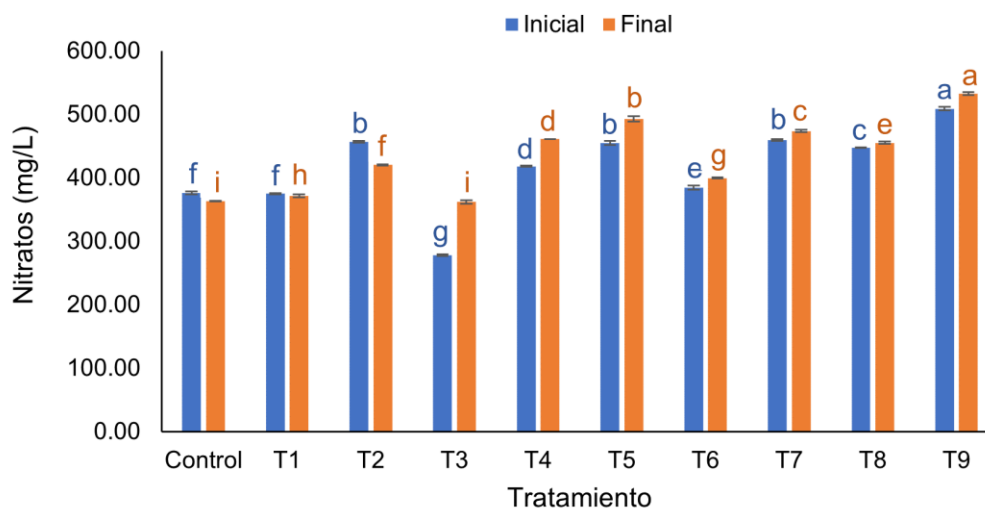


**Figura 15.** Alcalinidad ( $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

Papadopoulos *et al* (2022) mencionan que el medio alcalino es óptimo para el crecimiento de *A. platensis* e ideal para cultivo en escala piloto porque se reduce la contaminación bacteriana. Bajo condiciones alcalinas *A. platensis* puede realizar la fotosíntesis de manera más eficiente debido a los elevados niveles de carbono inorgánico disuelto.

#### 4.1.4 Nitratos

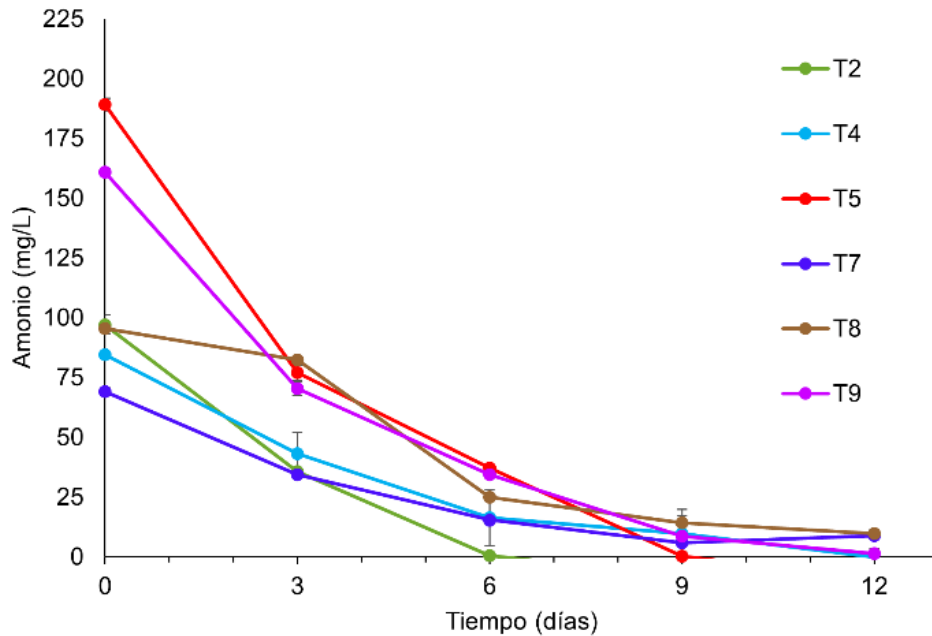
Las concentraciones iniciales y finales de nitratos se muestran en la Fig. 16 donde se observa que existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.000$ ). Los que contenían NPK (T2, T4, T5, T7, T8 y T9) tuvieron las concentraciones iniciales de nitratos más elevadas. Esto se debe a que el fertilizante está compuesto por nitratos, amonio y urea.



**Figura 16.** Nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

#### 4.1.5 Amonio

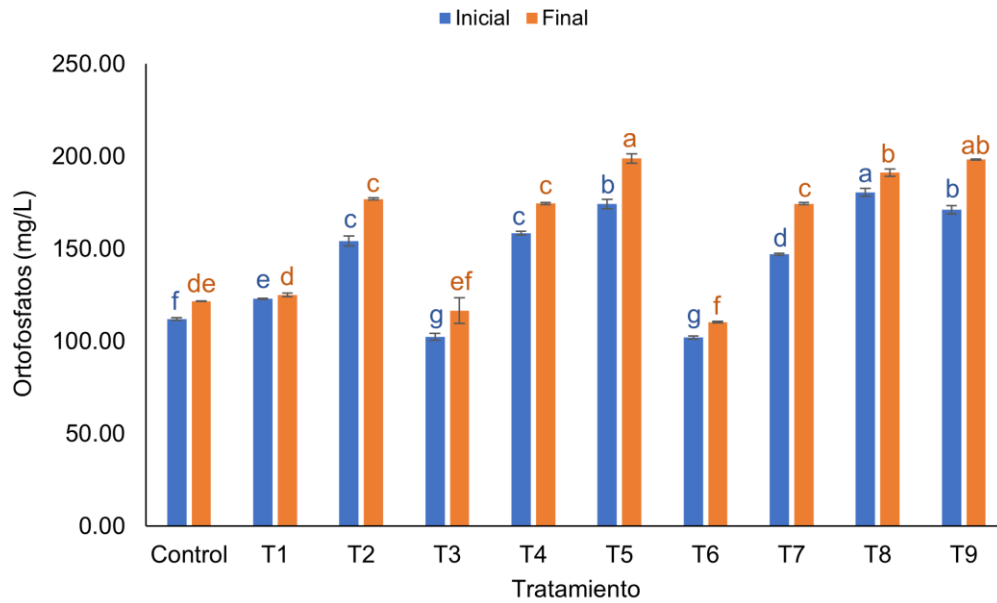
La concentración de amonio en los tratamientos que contenían NPK se muestra en la Fig. 17. En todos ellos la concentración disminuye hasta agotarse en el día 9 ( $p=0.000$ ). Solamente en el T2 se consume por completo en el día 6. El amonio es la fuente de nitrógeno más asimilable. Converti *et al.*, (2006) mencionan que la urea como fuente de nitrógeno proporciona ganancia energética por su posible hidrólisis a amonio en medio alcalino, haciéndolo más fácilmente asimilable. El nitrógeno del fertilizante NPK adicionado al medio



**Figura 17.** Amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

#### 4.1.6 Ortofosfatos

La concentración inicial y final de ortofosfatos se muestra en la Fig. 18, mostrando diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.000$ ). La concentración inicial es más alta en los tratamientos que contenían NPK (T2, T4, T5, T7, T8 y T9), debido al fósforo presente en el fertilizante ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Este elemento es importante porque forma parte de lípidos, enzimas y ácidos nucleicos.

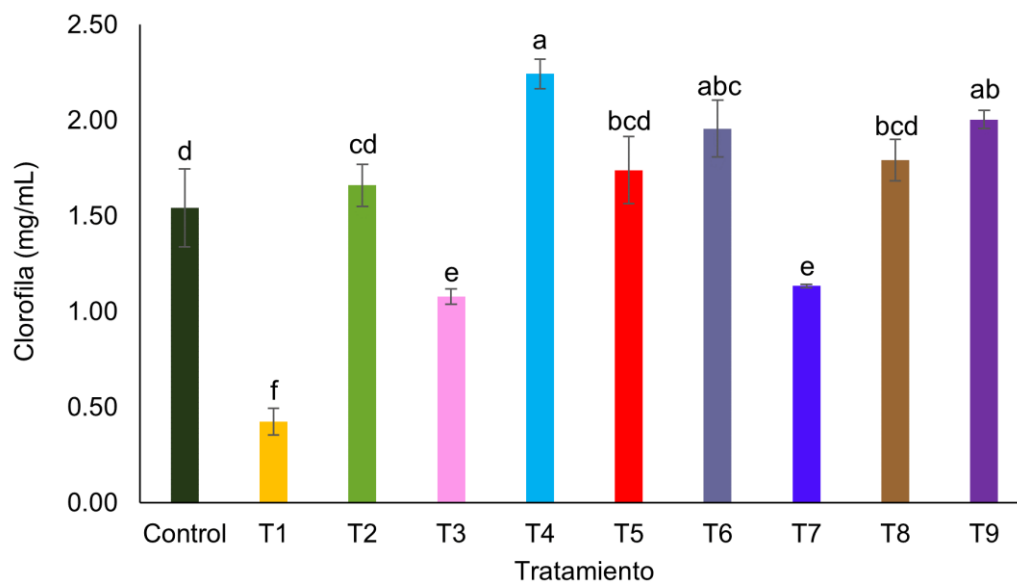


**Figura 18.** Ortofosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

## 4.2 Análisis Bioquímicos de la Biomasa

### 4.2.1 Clorofila

El contenido de clorofila medido en la biomasa de *A. maxima* al término del tiempo de cultivo se muestra en la Fig. 19. Existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p= 0.000$ ).



**Figura 19.** Clorofila ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

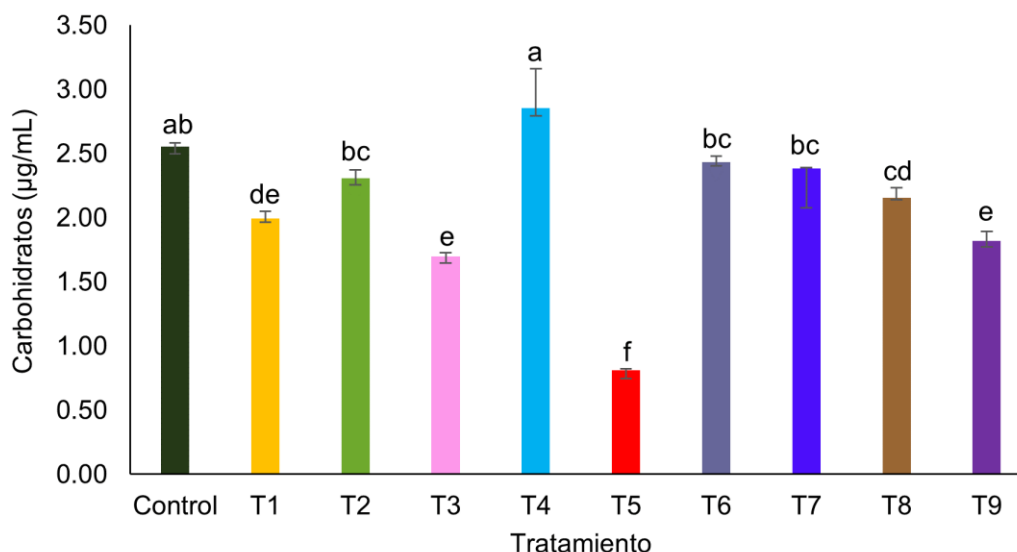
El T4 fue el que obtuvo la mayor concentración ( $2.24 \text{ mg mL}^{-1}$ ), siendo formulado con  $0.5$  y  $10.5 \text{ g L}^{-1}$  de NPK y bicarbonato de sodio, respectivamente. El T1 produjo  $0.42 \text{ mg mL}^{-1}$ , formulado sin NPK,  $4.2 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio y  $8 \text{ h}$  de fotoperiodo.

Sánchez-Bayo *et al.*, (2020), mencionan que el fotoperíodo adecuado para *Arthrospira sp* es de  $12$  a  $18$  horas luz. Tiempos cortos de exposición a la luz conllevan a una baja captura de energía. De acuerdo con Junique *et al.*, (2021), la cantidad de pigmentos está fuertemente influenciada por las condiciones de la luz. En estudios con *A. platensis* ellos encontraron que para clorofila las condiciones óptimas fueron una intensidad de  $6.2 \text{ Klux}$  y fotoperíodo de  $12.6 \text{ h}$  luz. Sus resultados también demostraron que el crecimiento, producción de proteínas y pigmentos tienen todos diferentes condiciones óptimas específicas.

#### 4.2.2 Carbohidratos

En la Fig. 20 se observa el contenido de carbohidratos en los tratamientos. Existen diferencias significativas ( $p= 0.000$ ), mostrando una mayor concentración en el T4 ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de NPK,  $16 \text{ h}$  fotoperiodo,  $0.1$  y  $10.5 \text{ g L}^{-1}$  de inóculo y bicarbonato de sodio respectivamente) y menor en el T5 ( $1 \text{ g L}^{-1}$  de NPK,  $12 \text{ h}$  fotoperiodo,  $0.1$  y  $16.8$

g L<sup>-1</sup> de inóculo y bicarbonato de sodio).

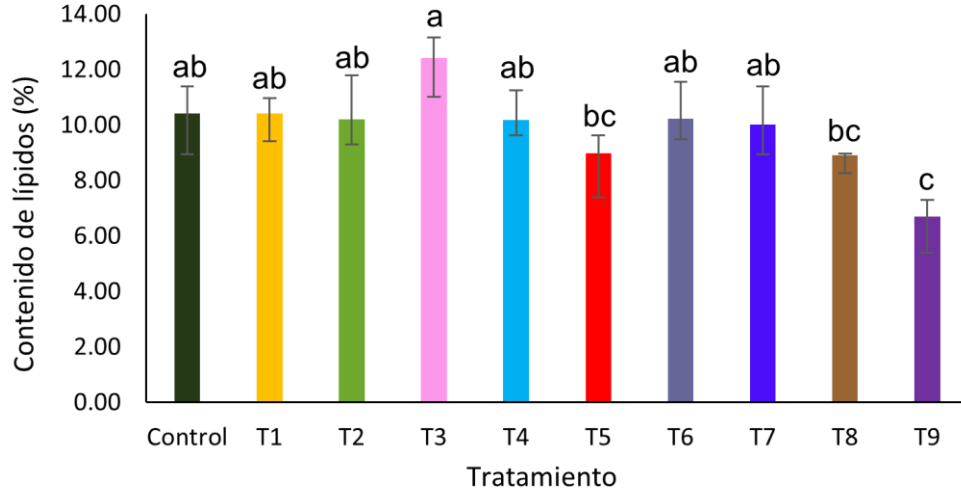


**Figura 20.** Carbohidratos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

Esto coincide con los resultados de Tourang *et al.*, (2019) quienes evaluaron el efecto de las concentraciones de fosfato de potasio y bicarbonato de sodio sobre la producción de carbohidratos en *A. platensis*. Encontraron que, a altas concentraciones de bicarbonato de sodio y bajas de fosfatos, el contenido de carbohidratos disminuye.

#### 4.2.3 Lípidos

El contenido lipídico de la biomasa de *A. maxima* se muestra en la Fig. 21, mostrando diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.000$ ). El T3 obtuvo el mayor contenido lipídico (12.43%). Este tratamiento no contenía NPK y tenía 10.5 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio. Esto se debe a que el nitrógeno, esencial para la producción de proteínas, tiene un impacto significativo en la acumulación de lípidos. De acuerdo con Udayan *et al.*, (2022) estos se incrementan cuando se limita el nitrógeno, esto explica porque los tratamientos 2, 5 y 9 obtuvieron las concentraciones menores de lípidos, ya que fueron los que tuvieron mayor presencia de nitrógeno por su alta concentración de NPK (1 g L<sup>-1</sup>).



**Figura 21.** Contenido de lípidos (%) en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

### 4.3 Análisis Estadístico del Diseño Experimental Taguchi

El ANOVA del diseño experimental Taguchi se describe en el Cuadro 9. Todas las variables son significativas ( $P < 0.05$ ) pero la interacción entre ellas no. La variable con mayor contribución es del fotoperiodo (39.34%) y la menor del NPK (16.73%).

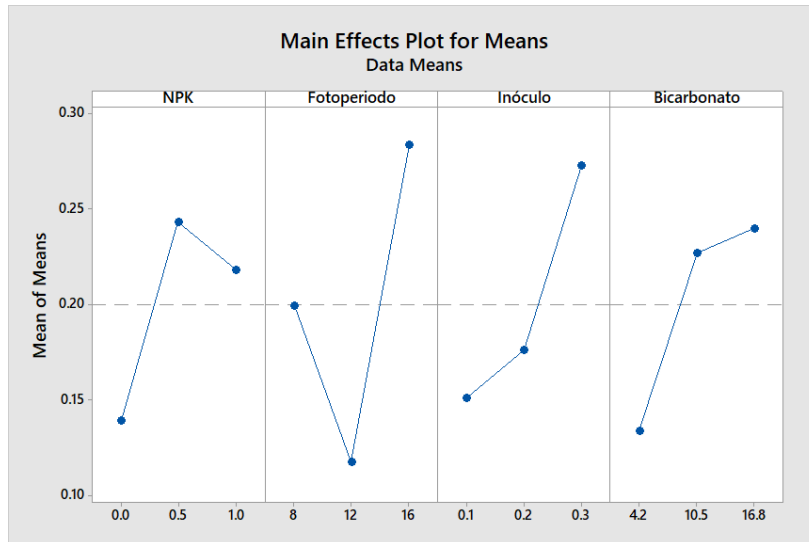
**Cuadro 9.** ANOVA

Fuente	gl	% Contribución	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Valor de P
NPK	2	16.73	0.0520	0.0264	137.31	0.000
Fotoperiodo	2	39.34	0.1241	0.0621	322.78	0.000
Inóculo	2	23.68	0.0747	0.0374	194.27	0.000
Bicarbonato	2	19.15	0.0604	0.0302	157.14	0.000
Error	18	1.10	0.0035	0.0002		
Total	26	100.00	0.3156			

De la evaluación estadística del diseño experimental utilizado para el cultivo en

sistema raceway se obtuvo la gráfica de efectos principales para la c-ficocianina (Fig. 22). Se puede observar que el fotoperiodo es la variable más significativa, seguida del inóculo, bicarbonato de sodio y finalmente, el NPK, confirmando los datos arrojados por el análisis de varianza.

Esta gráfica permite conocer el nivel de cada variable, que maximiza la variable respuesta (c-ficocianina). Para el NPK es la concentración de 0.5 g L<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 16 h, inóculo y bicarbonato de sodio de 0.3 y 16.8 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores pueden considerarse como los óptimos para lograr una producción más elevada de C-PC.



**Figura 22.** Efectos principales de las medias de cada variable empleadas en el cultivo de *A. maxima* en un sistema raceway.

Las predicciones realizadas por el análisis considerando estos valores, pero variando el bicarbonato de sodio (16.8 y 10.5 g L<sup>-1</sup>) se describen en el Cuadro 10. Dado que la concentración de c-ficocianina predicha es similar usando 16.8 y 10.5 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio, se eligió cultivar un tratamiento optimizado con los valores de la predicción 2, con el propósito de disminuir los costos en reactivos.



**Cuadro 10.** Predicción realizada por el diseño experimental Taguchi para la producción de c-ficocianina.

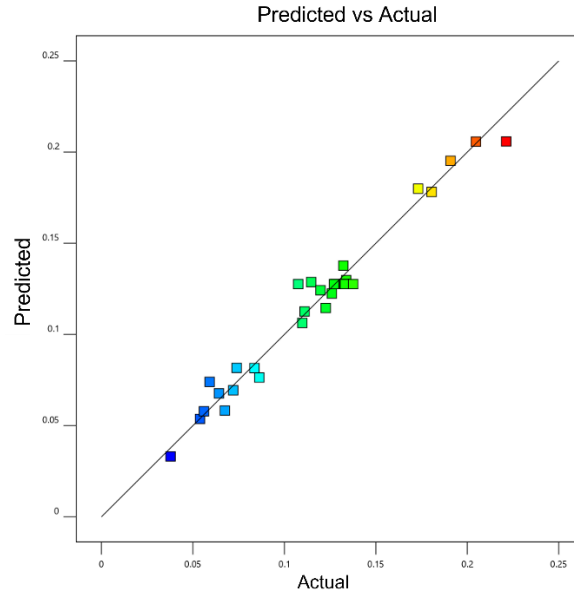
	<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
Predicción 1 (0.439 ± 0.008 mg ml <sup>-1</sup> de C-PC)	NPK	0.5 g L <sup>-1</sup>
	Fotoperiodo	16 h
	Inóculo	0.3 g L <sup>-1</sup>
	Bicarbonato	16.8 g L <sup>-1</sup>
Predicción 2 (0.426 ± 0.023 mg ml <sup>-1</sup> de C-PC)	NPK	0.5 g L <sup>-1</sup>
	Fotoperiodo	16 h
	Inóculo	0.3 g L <sup>-1</sup>
	Bicarbonato	10.5 g L <sup>-1</sup>

### 4.3 Extracción de C-ficocianina

Para la variable respuesta (c-ficocianina) se utilizó una ecuación polinomial de segundo orden (Ecuación 14).

$$\begin{aligned}
 \text{C-PC} = & +0.1276 - 0.0233(\text{A}) - 0.0029(\text{B}) + 0.0078(\text{C}) + 0.0630(\text{D}) + 0.0003(\text{AB}) - \\
 & 0.0008(\text{AC}) - 0.0107(\text{AD}) + 0.0012(\text{BC}) - 0.0110(\text{BD}) - 0.0001(\text{CD}) - 0.0228(\text{A}^2) - \\
 & 0.0025(\text{B}^2) - 0.0069(\text{C}^2) + 0.0039(\text{D}^2). \quad (14)
 \end{aligned}$$

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos de los experimentos y los valores de predicción de las 29 corridas. El RSM permitió obtener el modelo matemático con buena concordancia entre los resultados experimentales y predichos, lo cual puede comprobarse en la Fig. 23 donde se observa un patrón lineal indicando que es un buen modelo para el conjunto de datos.



**Figura 23.** Gráfica de predicción versus actual del RSM para la extracción de c-ficocianina.

**Cuadro 11.** Concentración de C-PC ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) obtenidas por el método de congelación descongelación y valores de predicción del RSM.

Run	Exp. <sup>a</sup>	Pred. <sup>b</sup>
1	0.221	0.206
2	0.173	0.180
3	0.134	0.130
4	0.064	0.068
5	0.132	0.138
6	0.133	0.128
7	0.123	0.115
8	0.133	0.128
9	0.054	0.054
10	0.067	0.058

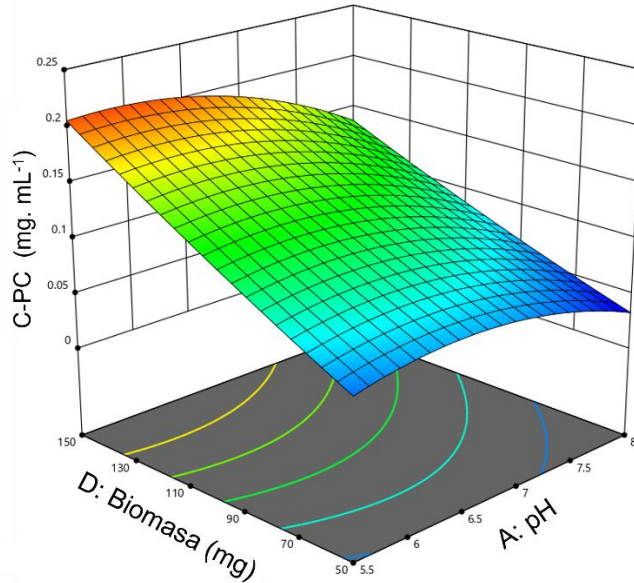
11	0.205	0.206
12	0.181	0.178
13	0.138	0.128
14	0.111	0.113
15	0.128	0.128
16	0.086	0.076
17	0.072	0.069
18	0.084	0.082
19	0.074	0.082
20	0.127	0.128
21	0.115	0.129
22	0.191	0.195
23	0.059	0.074
24	0.038	0.033
25	0.120	0.124
26	0.056	0.058
27	0.110	0.106
28	0.126	0.122
29	0.108	0.128

---

<sup>a</sup> Valores experimentales

<sup>b</sup> Valores de predicción

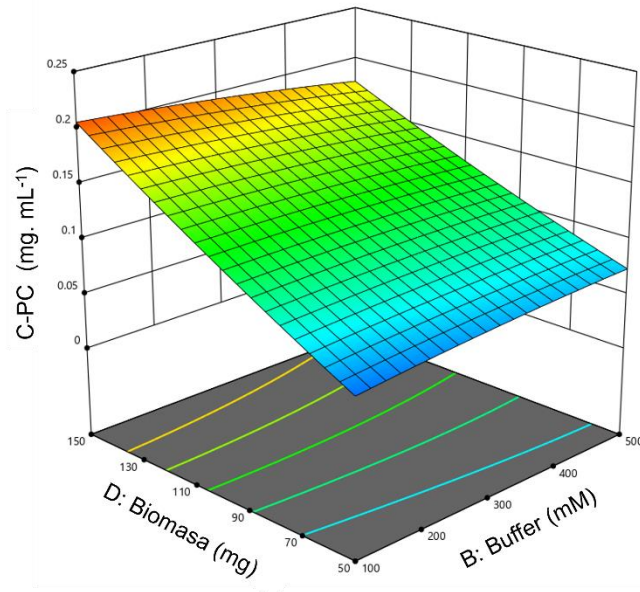
El RSM también permite observar el efecto de la interacción de dos variables sobre la variable respuesta. En la Fig. 24 se muestra la interacción del pH y la biomasa.



**Figura 24.** Gráfica 3D del efecto del pH y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

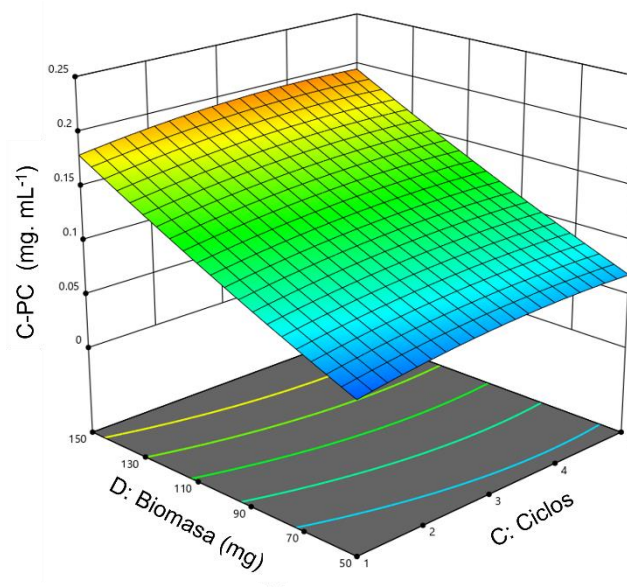
El área roja indica una mayor concentración de c-ficocianina. Como es de esperar, a mayor cantidad de biomasa se obtiene más ficocianina, pero el efecto del pH es importante porque la ficocianina es inestable a valores de pH inferiores a 4.8. Yuan *et al.*, (2022) reportaron que en condiciones acidas la c-ficocianina es insoluble.

El efecto de la interacción de la concentración del buffer y la biomasa se muestra en la Fig. 25. Una menor concentración de buffer con mayor cantidad de biomasa extrajo mayores concentraciones de C-PC. Un resultado similar fue obtenido por Manirafasha *et al.*, (2017), quienes después de probar diferentes concentraciones de buffer fosfato de potasio, determinaron que la mejor concentración fue 0.125 M.



**Figura 25.** Gráfica 3D del efecto de la concentración del buffer (mM) y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

El efecto del número de ciclos y la cantidad de biomasa se muestra en la Fig. 26. Se aprecia que aumentando el número de ciclos de 1 a 5 y los mg de biomasa de 50 a 150 mg, se obtiene más c-ficocianina.



**Figura 26.** Gráfica 3D del efecto del número de ciclos y la cantidad de biomasa (mg) sobre la concentración de C-PC ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Esto coincide con lo reportado por Chittapun *et al.*, (2020) quienes evaluaron el método congelación- descongelación y campo eléctrico en *Nostoc commune* encontrando que las mayores concentraciones de C-PC se consiguieron con el primer método, especialmente aumentando el número de ciclos.

Tavanandia *et al.*, (2018) probaron distintos métodos de extracción en *A. platensis* y determinaron que se obtiene mayor rendimiento aumentando el número de ciclos hasta un máximo de cinco.

#### 4.3.1 Análisis estadístico

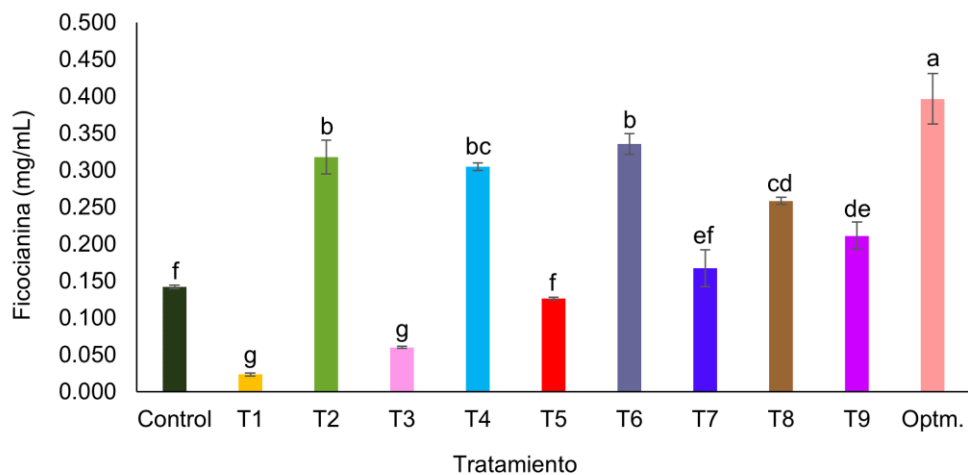
Un valor de  $P < 0.05$  indica que la variable es significativa. De acuerdo con el ANOVA (Cuadro 12) se observa que las variables A, C y D (pH, número de ciclos y cantidad de biomasa, respectivamente) son significativas, por lo tanto, influyen en la extracción de C-PC.

**Cuadro 12.** ANOVA del RSM para la extracción de c-ficocianina de *A. maxima*.

ANOVA	C-PC
R2	0.9718
p- value del modelo	0.0001
F- value del modelo	34.48
Desviación estándar	0.0111
Media	0.1159
C. V %	9.61
df	14
F- value de A	52.46
F- value de B	0.8114
F- value de C	5.82
F- value de D	384.22

p- value de A	0.0001
p- value de B	0.3829
p- value de C	0.0301
p- value de D	0.0001
Suma de cuadrados	0.0599
Adeq. precision	21.5647

Con las condiciones óptimas para la extracción de c-ficocianina (150 mg de biomasa, buffer 100 mM a pH 5.8 y 4 ciclos de congelación descongelación) se realizó la extracción de los 9 tratamientos y el optimizado cultivados en el raceway. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 27.



**Figura 27.** Concentración de c-ficocianina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) en los 9 tratamientos y optimizado cultivados en un sistema raceway.

La concentración de c-ficocianina fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el cultivo optimizado que en los tratamientos de la matriz experimental Taguchi. Con esto se confirma que aplicando las condiciones óptimas de cultivo y extracción del pigmento se logra obtener una mayor concentración.

## 4.4 Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Animal

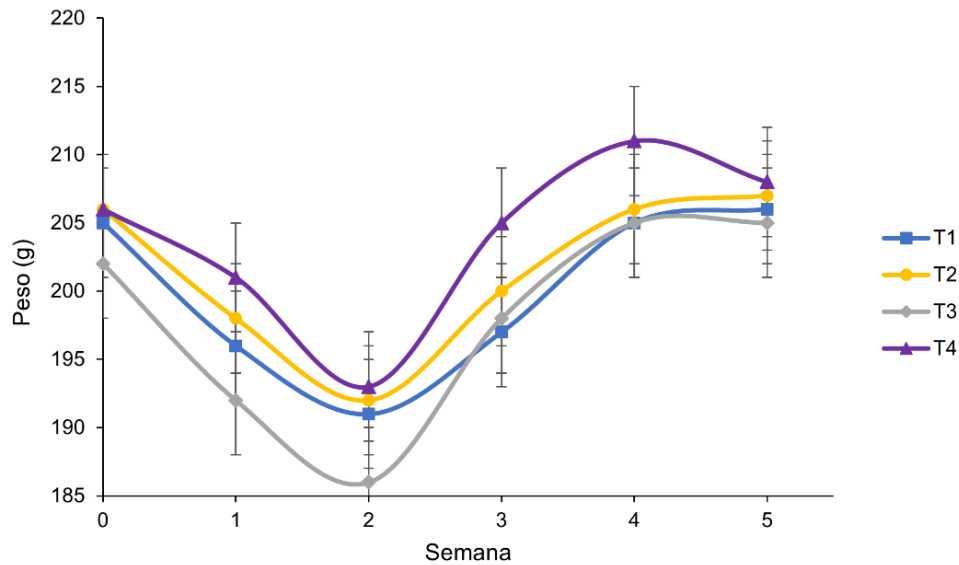
### 4.4.1 Ganancia de Peso y Consumo

El peso de las aves durante todo el periodo experimental se muestra en la Fig. 28. La semana cero es el peso inicial de las codornices justo antes de comenzar la suplementación con las dietas experimentales. Después, se muestra el peso al término de cada semana. Al finalizar la semana 2 se observa disminución del peso en todos los tratamientos, probablemente debido al estrés por calor. Durante las primeras dos semanas del experimento, se registraron temperaturas ambientales cercanas a los 40°C a causa de una ola de calor, condiciones que condujeron a una disminución de peso.

Hajati *et al.*, (2020) mencionan que el estrés por calor altera el comportamiento normal de las codornices, así como los procesos bioquímicos y fisiológicos de las aves, conduciendo a una alteración en la homeostasis del cuerpo. Esto compromete la productividad avícola y beneficios económicos en épocas de verano.

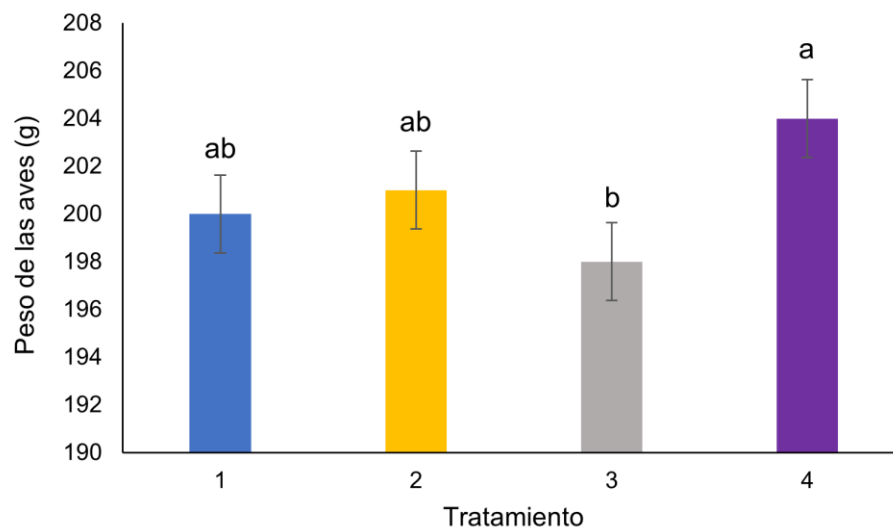
Para contrarrestar estos efectos, se han llevado a cabo estudios suplementando dietas con biomasa de *Arthrospira platensis*. Nassar *et al.*, (2023) evaluaron la incorporación de biomasa de *A. platensis* en 0, 5, 10 y 15 g/kg de dieta en codornices sometidas a estrés por calor. Determinaron que la adición de la cianobacteria alivió los efectos nocivos del estrés por calor en comparación con el control, concluyendo que *A. platensis* puede utilizarse como suplemento potencial en dietas para codornices para mejorar aspectos productivos y homeostasis de manera general, especialmente cuando sufren de estrés por calor.





**Figura 28.** Peso vivo de las codornices (g) en etapa de postura alimentadas con adición de cuatro niveles de C-PC (0.0, 50, 100 y 150 mg/kg dieta) durante un periodo de 5 semanas.

El peso promedio de las aves durante el experimento durante las 5 semanas mostró diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 29), dado que las aves de T4 fueron las más pesadas y las de T3 fueron las de menor peso. Ibrahim *et al* (2018) vieron incrementado el peso en codornices alimentadas con adición en agua de biomasa de *A. platensis* en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 g/ L.



**Figura 29.** Peso vivo de las codornices (g) por tratamiento alimentadas con cuatro niveles de C-PC

(0.0, 0.50, 0.100 y 0.150 mg/kg dieta).

El cuadro 13 muestra el peso semanal de las aves por tratamiento durante las 5 semanas experimentales. No hubo interacción significativa ( $P > 0.05$ ) de tratamiento x semana.

**Cuadro 13.** Peso de las codornices (g) durante las 5 semanas experimentales.

Semana	T1	T2	T3	T4
0	205.00	205.87	201.87	205.56
1	196.06	198.25	191.81	201.12
2	191.06	192.12	185.81	193.50
3	197.37	200.31	198.37	204.94
4	204.75	206.06	204.81	211.31
5	206.12	206.87	205.12	208.25

P= 1.00; EEM 4.00

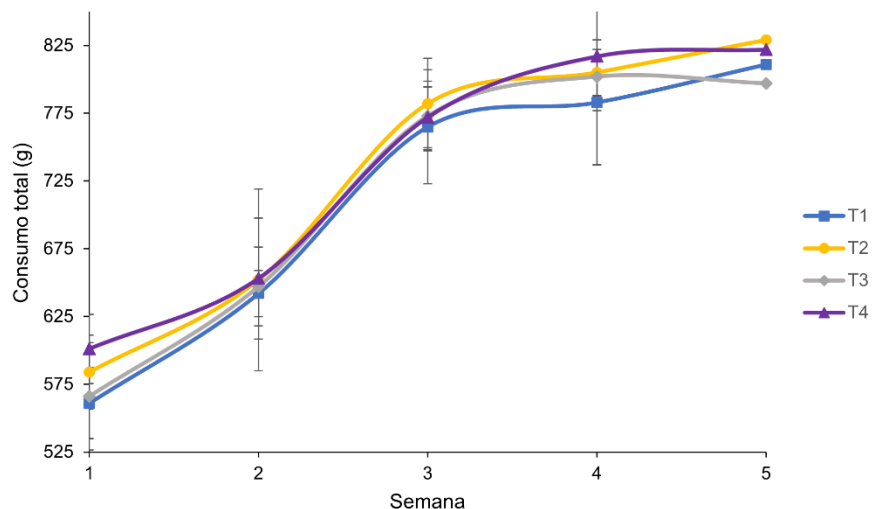
El consumo por tratamiento durante las 5 semanas se muestra en el Cuadro 14. Para esta variable no hubo interacción significativa de tratamiento por semana.

**Cuadro 14.** Consumo total de alimento (g) por tratamiento durante las 5 semanas experimentales

Tratamiento	1	2	3	4	5
T1	561.00	641.75	765.25	783.25	810.75
T2	584.00	652.25	782.25	805.00	828.75
T3	566.50	647.00	773.75	802.25	797.25
T4	601.25	653.25	772.25	816.75	822.25

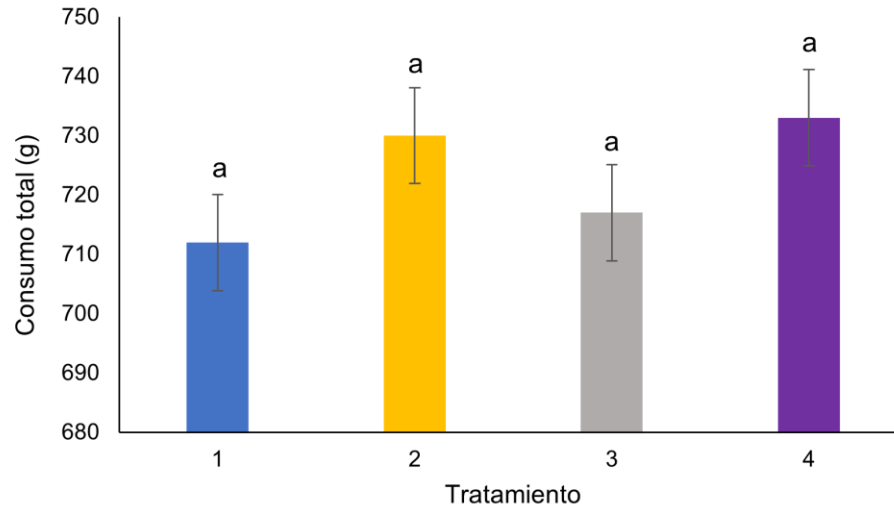
P= 0.997; EEM 0.648.

El consumo durante las cinco semanas se muestra en la Fig. 30.



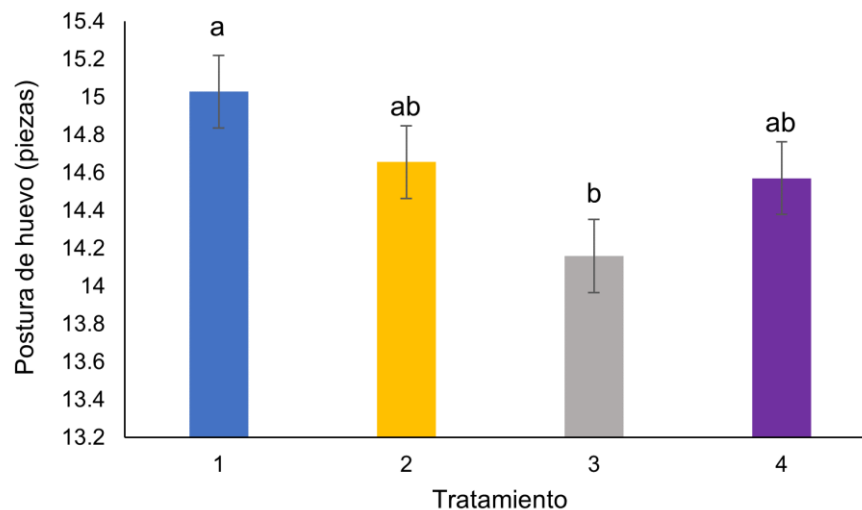
**Figura 30.** Consumo promedio (g) por tratamiento durante las cinco semanas de experimentación.

El consumo de alimento aumentó en todos los tratamientos a partir de la semana 2 siendo más notorio este efecto en T2 y T4, aunque las diferencias entre tratamientos fueron no significativas (Fig. 31) por lo que se puede concluir que la adición de C-PC no afectó en el consumo de alimento. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Dogan *et al.*, (2016) quienes al suplementar codornices con *A. platensis* no registraron diferencias significativas en el consumo entre la dieta control y las que contenían biomasa de la cianobacteria.



**Figura 31.** Consumo promedio (g) por tratamiento en las cinco semanas de experimentación.

La postura de las codornices asignadas a los cuatro tratamientos durante las 5 semanas experimentales se muestra en la Fig. 32. Las aves del tratamiento 1 fueron las de mayor postura mientras que las codornices de T3 pusieron menos ( $P < 0.05$ ) huevos.



**Figura 32.** Postura promedio (piezas) por tratamiento en las cinco semanas de experimentación.

#### 4.4.2 Evaluación de la Calidad Física del Huevo

Los datos productivos y de calidad del huevo se muestran en el Cuadro 15. Los huevos del T4 fueron los más pesados, más largos y anchos ( $P < 0.05$ ). Conforme aumenta el índice de forma (%), los huevos van perdiendo su característica forma elíptica y se tornan más redondeados, como ocurrió con los del tratamiento 3.

El porcentaje de la proporción de clara y yema resultó similar en todos los tratamientos, sin diferencias significativas. Esto coincide con los resultados obtenidos por Santana *et al.*, (2021) quienes adicionaron *Schizochytrium sp* (0, 10, 20, 30, y 40 g/kg dieta) en codornices japonesas.

De igual manera, el peso y grosor del cascarón fueron estadísticamente similares en los cuatro tratamientos. Gaona *et al.*, (2021) mencionan que la cáscara de huevo está compuesta hasta en un 93% por carbonato de calcio. De acuerdo con Park *et al.*, (2015), cuando se adiciona la biomasa, rica en minerales, se puede apreciar un aumento en el grosor del cascarón, pero en la presente investigación, se adicionó una proteína y no una biomasa rica en minerales. La c-ficocianina es una proteína compuesta principalmente por ácido aspártico y glutámico, lisina, serina, treonina, prolina, glicina, entre otros (Osman *et al.*, 2019) pero no contiene calcio. Se especula que esto haya determinado la falta de efecto en el grosor del cascarón.

**Cuadro 15.** Datos de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC.

	T1	T2	T3	T4	EEM	Valor P
Índice de forma (%)	78.45 <sup>c</sup>	78.89 <sup>b</sup>	79.46 <sup>a</sup>	78.63 <sup>bc</sup>	0.123	0.000
Peso huevo (g)	10.88 <sup>bc</sup>	11.00 <sup>b</sup>	10.79 <sup>c</sup>	11.49 <sup>a</sup>	0.040	0.000
Largo huevo (cm)	3.18 <sup>b</sup>	3.19 <sup>b</sup>	3.15 <sup>b</sup>	3.24 <sup>a</sup>	0.005	0.000
Ancho huevo (cm)	2.49 <sup>c</sup>	2.51 <sup>b</sup>	2.50 <sup>c</sup>	2.55 <sup>a</sup>	0.004	0.000
% yema	33.96 <sup>a</sup>	34.17 <sup>a</sup>	32.19 <sup>a</sup>	32.45 <sup>a</sup>	0.737	0.137
% clara	46.37 <sup>a</sup>	47.75 <sup>a</sup>	47.78 <sup>a</sup>	47.90 <sup>a</sup>	0.927	0.613
Peso cascarón (g)	1.55 <sup>a</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	1.52 <sup>a</sup>	0.034	0.611

Grosor cascarón ( $\mu\text{m}$ )      273.68<sup>a</sup> 295.06<sup>a</sup> 276.86<sup>a</sup> 262.36<sup>a</sup> 10.95 0.213

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa. EEM: Error Estándar de la Media.

El cuadro 16 muestra la colorimetría medida en los huevos. Se puede observar que no hay diferencias significativas en ninguno de los valores del sistema CIELAB. La adición de C-PC no tuvo efecto sobre el color de la yema.

**Cuadro 16.** Colorimetría de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC.

	T1	T2	T3	T4	EEM	Valor P
a	2.73 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	0.432	0.160
b	26.03 <sup>a</sup>	25.77 <sup>a</sup>	28.12 <sup>a</sup>	27.98 <sup>a</sup>	1.295	0.429
L	29.23 <sup>a</sup>	28.09 <sup>a</sup>	31.18 <sup>a</sup>	31.97 <sup>a</sup>	1.588	0.298
H	82.97 <sup>a</sup>	81.91 <sup>a</sup>	84.94 <sup>a</sup>	84.99 <sup>a</sup>	1.146	0.163
c	26.48 <sup>a</sup>	26.06 <sup>a</sup>	28.35 <sup>a</sup>	28.23 <sup>a</sup>	1.240	0.444

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa. EEM: Error Estándar de la Media.

Boiago *et al.*, (2019) adicionaron biomasa de *A. platensis* y observaron incremento del color de la yema. De igual forma Khan *et al.*, (2021) suplementaron la dieta basal para gallinas ponedoras con 0.0, 0.1, 0.2 y 0.3% de biomasa de *A. platensis* y observaron aumento de los valores de L\* y a\* conforme aumentaba la concentración de cianobacteria. También determinaron que la presencia de carotenoides, especialmente  $\beta$  caroteno, influyó en la pigmentación ya que éste se acumula en la yema. Los carotenoides de *Arthrospira sp* son bien absorbidos por el tracto gastrointestinal de las aves. La c-ficocianina utilizada en la presente investigación es una ficobiliproteína y no un carotenoide (responsable de coloración amarilla-anaranjada), lo cual pudo ocasionar que su absorción no haya impactado directamente en el color de la yema.

#### 4.4.3 Análisis Bromatológicos de los Huevos

Los análisis bromatológicos realizados a los huevos se muestran en el cuadro 17. Los contenidos de materia seca, cenizas, proteína y energía de los huevos fueron similares entre tratamientos.

Los huevos de T4 tuvieron menor contenido de grasa que los otros tres tratamientos. Esto puede deberse a que fueron huevos con mayor peso (g) de clara, la cual tiene un alto porcentaje de agua y menos contenido de lípidos que la yema.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Boiago *et al.*, (2019) quienes al adicionar biomasa de *A. platensis* en dietas de codornices obtuvieron huevos con una disminución de los ácidos grasos saturados y poliinsaturados.

Nagaoka *et al.*, (2005) condujeron la primera investigación que determinó que la c-ficocianina es una proteína hipocolesterolémica, por su efecto reductor del colesterol sérico.

**Cuadro 17.** Análisis bromatológicos de los huevos obtenidos de la suplementación con C-PC

	T1	T2	T3	T4	EEM	Valor P
MS total (%)	27.52 <sup>a</sup>	27.28 <sup>a</sup>	27.33 <sup>a</sup>	27.03 <sup>a</sup>	0.328	0.765
Cenizas (%)	4.10 <sup>a</sup>	4.83 <sup>a</sup>	4.34 <sup>a</sup>	4.48 <sup>a</sup>	0.196	0.112
Grasa (%)	37.15 <sup>a</sup>	35.94 <sup>a</sup>	38.36 <sup>a</sup>	27.06 <sup>b</sup>	0.809	0.000
Proteína (%)	51.85 <sup>a</sup>	50.84 <sup>a</sup>	49.84 <sup>a</sup>	50.33 <sup>a</sup>	1.903	0.892
Energía (kcal/kg)	7305.48 <sup>a</sup>	7162.45 <sup>a</sup>	7476.13 <sup>a</sup>	7387.11 <sup>a</sup>	284.33	0.714

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa. EEM: Error Estándar de la Media.

**Cuadro 18.** Análisis bromatológicos de las dietas formuladas con C-PC.

	T1	T2	T3	T4	EEM	Valor P
MS total (%)	89.21 <sup>a</sup>	89.22 <sup>a</sup>	89.06 <sup>a</sup>	88.88 <sup>a</sup>	0.311	0.854
Cenizas (%)	11.29 <sup>a</sup>	12.06 <sup>a</sup>	11.03 <sup>a</sup>	11.50 <sup>a</sup>	0.381	0.332

Grasa (%)	2.71 <sup>ab</sup>	2.14 <sup>b</sup>	2.32 <sup>b</sup>	3.39 <sup>a</sup>	0.178	0.005
Proteína (%)	19.19 <sup>a</sup>	19.22 <sup>a</sup>	19.30 <sup>a</sup>	20.62 <sup>a</sup>	0.792	0.543
Energía (kcal/kg)	5173.07 <sup>a</sup>	5008.60 <sup>a</sup>	5294.06 <sup>a</sup>	4957.60 <sup>a</sup>	130.06	0.310
FDN (%)	13.41 <sup>a</sup>	14.06 <sup>a</sup>	15.28 <sup>a</sup>	16.09 <sup>a</sup>	1.49	0.604
FDA (%)	3.03 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>	3.29 <sup>a</sup>	3.33 <sup>a</sup>	0.402	0.131
Lignina (%)	0.484 <sup>a</sup>	0.432 <sup>ab</sup>	0.344 <sup>ab</sup>	0.326 <sup>b</sup>	0.032	0.026
Hemicelulosa (%)	10.38 <sup>a</sup>	12.09 <sup>a</sup>	11.99 <sup>a</sup>	12.76 <sup>a</sup>	1.49	0.720
Celulosa (%)	2.54 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>	3.01 <sup>a</sup>	0.407	0.109

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa. MS: Materia Seca. EEM: Error Estándar de la Media.

## 4.5 Aplicación de C-ficocianina en Nutrición Humana

### 4.5.1 Humedad, Cenizas y pH

No existieron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 19) respecto a la humedad y las cenizas. Los resultados de humedad obtenidos en la presente investigación oscilaron entre los 71.37- 72.56%. Delgado y Bañón (2018) mencionan que las gomitas son un alimento con humedad intermedia. Al añadir c-ficocianina incrementa la humedad porque es una proteína hidrosoluble y al igual que el azúcar, higroscópica. En cambio, Dewi *et al.*, (2017) añadieron diferentes concentraciones (0, 1, 3 y 5%) de c-ficocianina micro encapsulada en gomitas y observaron que el contenido de humedad aumentaba conforme se incrementaba la concentración del pigmento.

El contenido de cenizas fue estadísticamente similar en todos los tratamientos. Dewi *et al.*, (2017) reportaron un contenido de cenizas máximo de 1.76% en el tratamiento sin C-PC y mínimo de 0.897% con el 5% de pigmento. Ellos determinaron que la adición de c-ficocianina redujo el contenido de cenizas y aumentaba la humedad en las gomitas, cual en el presente trabajo no fue el caso.

El pH muestra diferencias significativas, incrementando conforme aumenta la concentración de C-PC. Esto concuerda con lo reportado por Dewi *et al.*, (2017),



quienes también vieron incrementado el pH con el creciente porcentaje de c-ficocianina encapsulada.

**Cuadro 19.** Humedad, cenizas y pH de las gomitas formuladas con C-PC.

	Control	T1	T2	T3	Valor P
Humedad (%)	72.18±2.41 <sup>a</sup>	72.38±1.63 <sup>a</sup>	72.56±1.02 <sup>a</sup>	71.37±2.04 <sup>a</sup>	0.807
Cenizas (%)	0.508±0.281 <sup>a</sup>	0.467±0.030 <sup>a</sup>	0.622±0.057 <sup>a</sup>	0.752±0.061 <sup>a</sup>	0.072
pH	5.10±0.100 <sup>c</sup>	5.40±0.000 <sup>b</sup>	5.60±0.000 <sup>a</sup>	5.70±0.000 <sup>a</sup>	0.000

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa.

#### 4.5.2 Color

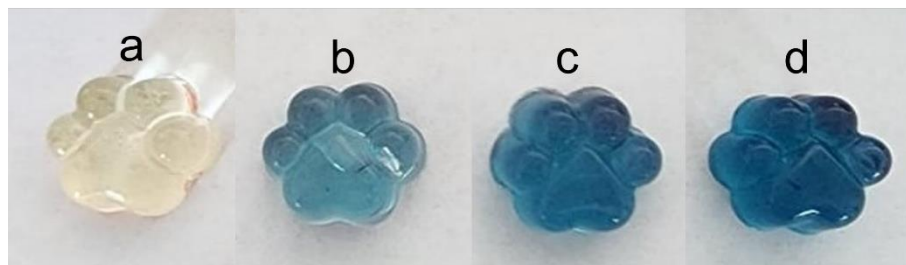
La colorimetría de las gomitas se muestra en el Cuadro 20. Conforme aumentó el contenido de c-ficocianina, incrementó el color azul de las gomitas. El valor de b disminuyó ( $P < 0.05$ ) cuando aumenta la C-PC, lo cual indica la tendencia hacia el color azul. Esto ocurrió asociado a una disminución del valor de L (luminosidad), lo cual contrasta con lo reportado por Dewi *et al.*, (2017), quienes determinaron que el valor de donde L aumentaba asociado a una mayor concentración de C-PC micro encapsulada.

**Cuadro 20.** Colorimetría de las gomitas formuladas con C-PC.

	Control	T1	T2	T3	Valor P
a	1.73±0.814 <sup>a</sup>	-3.00±1.38 <sup>b</sup>	-0.70±0.000 <sup>ab</sup>	0.433±0.814 <sup>a</sup>	0.002
b	15.40±1.31 <sup>a</sup>	10.63±0.289 <sup>b</sup>	7.53±0.058 <sup>bc</sup>	5.30±2.42 <sup>c</sup>	0.000
L	15.57±1.27 <sup>a</sup>	11.17±0.115 <sup>b</sup>	7.60±0.000 <sup>c</sup>	5.43±2.31 <sup>c</sup>	0.000
H	15.87±1.05 <sup>a</sup>	11.60±0.173 <sup>b</sup>	10.20±0.000 <sup>b</sup>	8.60±0.173 <sup>c</sup>	0.000
c	83.30±3.29 <sup>b</sup>	105.80±7.10 <sup>a</sup>	95.50±0.000 <sup>ab</sup>	81.17±13.28 <sup>b</sup>	0.015

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa.

En el presente trabajo, los valores de  $a^*$  son negativos en T1 y T2 (tratamientos con menor concentración de pigmento); la C-PC en esas dosis, tiende más al verde que al azul en la mezcla con la grenetina y el edulcorante. Concuerta con Dewi *et al.*, (2017), que en su menor porcentaje de C-PC (1%) obtuvieron valor negativo en  $a^*$ .



**Figura 33.** Gomitas formuladas con c-ficocianina: a) control, b) T1, c) T2 y d) T3.

#### 4.5.3 Perfil de textura

El perfil de textura analizado en las muestras de gomitas se detalla en el Cuadro 21. La mayor concentración de c-ficocianina (0.70%) aumentó la dureza, gomosidad y masticabilidad. La dureza es una medida de la resistencia a la primera mordida utilizando los incisivos, mientras que la gomosidad representa la elasticidad durante la masticación utilizando molare. La masticabilidad indica una referencia al número de masticaciones necesarias para tragar. En el presente estudio, la elasticidad y cohesividad no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre tratamientos, al igual que Rivero *et al.*, (2019) quienes reportaron una cohesividad (0.92) y elasticidad (0.94) similares en gomitas preparadas con miel y propóleo.

En el Cuadro 21 se muestra que en el presente estudio la resiliencia fue mas alta ( $P<0.05$ ) en las gomitas del T2 y menor en el control. Teixeira *et al.*, (2021) realizaron dos formulaciones de gomitas, una con jugo de naranja y otra con una mezcla de frutos. Reportaron una masticabilidad de 3.40 y 4.68 respectivamente, muy inferior a las obtenidas en nuestras gomitas (17.44- 22.93). La resiliencia fue de 63.95 (gomitas con jugo de naranja) y 48.51 (mezcla de frutos), mientras que la más alta obtenida fue de 0.776 (T2 con 0.30% de C-PC).

Delgado y Bañón (2018) evaluaron gomitas formuladas con inulina en sustitución

de almidón como agente co-gelificante. La dureza de las gomitas (24.5 N) fue similar a la obtenida en el T3 de la presente investigación (25.23 N). La gomosidad de las gomitas con inulina fue de 17.4, similar a la obtenida por el T2 (0.50% C-PC).

**Cuadro 21.** Análisis del perfil de textura de las gomitas formuladas con C-PC.

	<b>Control</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>Valor P</b>
Dureza (N)	19.96±1.01 <sup>b</sup>	21.53±1.04 <sup>b</sup>	18.48±1.67 <sup>b</sup>	25.23±0.840 <sup>a</sup>	0.001
Elasticidad	0.948±0.02 <sup>a</sup>	0.958±0.028 <sup>a</sup>	1.01±0.097 <sup>a</sup>	0.978±0.004 <sup>a</sup>	0.541
Cohesividad	0.960±0.018 <sup>a</sup>	0.978±0.025 <sup>a</sup>	0.934±0.016 <sup>a</sup>	0.929±0.016 <sup>a</sup>	0.048
Gomosidad	19.17±1.26 <sup>bc</sup>	21.06±1.54 <sup>ab</sup>	17.26±1.69 <sup>c</sup>	23.45±1.19 <sup>a</sup>	0.004
Masticabilidad	18.16±1.03 <sup>b</sup>	20.16±1.02 <sup>ab</sup>	17.44±2.83 <sup>b</sup>	22.93±1.14 <sup>a</sup>	0.017
Resiliencia	0.723±0.024 <sup>b</sup>	0.762±0.014 <sup>ab</sup>	0.776±0.023 <sup>a</sup>	0.760±0.012 <sup>ab</sup>	0.046

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa.

#### 4.5.4 Evaluación Sensorial

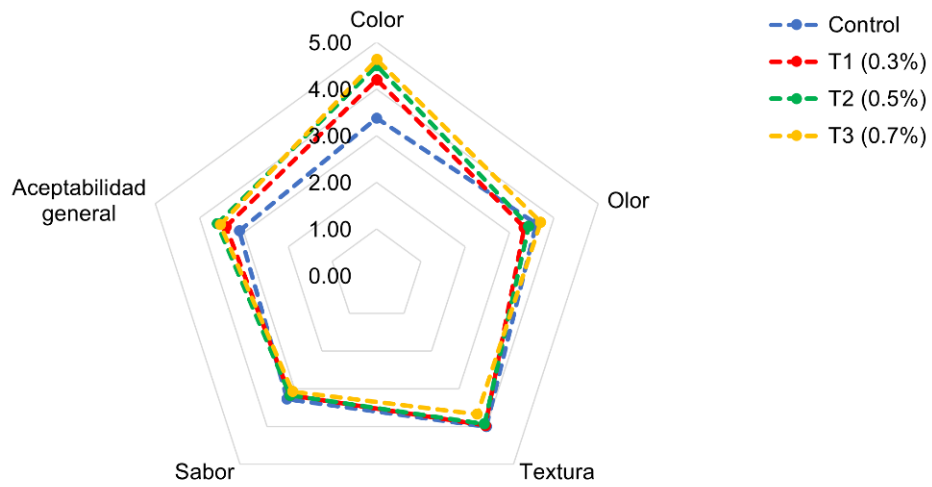
Los datos resultantes de la evaluación sensorial se detallan en el Cuadro 22. Se presenta el promedio de las puntuaciones de los panelistas para cada atributo de cada muestra. La escala de evaluación fue de 1 (me disgusta muchísimo) a 5 (me gusta muchísimo). Para los atributos olor, textura, sabor y aceptabilidad general no existen diferencias significativas entre tratamientos. El color fue más alto en el tratamiento 3 (4.63) y menor en el control (3.37).

**Cuadro 22.** Evaluación sensorial de las gomitas formuladas con C-PC.

	<b>Control</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>Valor P</b>
Color	3.37±0.964 <sup>b</sup>	4.20±0.610 <sup>a</sup>	4.50±0.630 <sup>a</sup>	4.63±0.615 <sup>a</sup>	0.000
Olor	3.60±0.932 <sup>a</sup>	3.33±0.711 <sup>a</sup>	3.43±0.774 <sup>a</sup>	3.70±0.915 <sup>a</sup>	0.330
Textura	4.00±1.02 <sup>a</sup>	3.97±1.00 <sup>a</sup>	3.93±0.907 <sup>a</sup>	3.67±1.15 <sup>a</sup>	0.575

Sabor	3.27±1.39 <sup>a</sup>	3.17±0.874 <sup>a</sup>	3.17±0.986 <sup>a</sup>	3.07±1.20 <sup>a</sup>	0.925
Aceptabilidad Gral	3.10±1.12 <sup>a</sup>	3.40±0.814 <sup>a</sup>	3.60±0.968 <sup>a</sup>	3.53±0.973 <sup>a</sup>	0.206

Diferente letra en la misma fila indica diferencia significativa.



**Figura 34.** Perfil sensorial descriptivo de las gomitas control y tratamientos con diferentes concentraciones de c-ficocianina.

## CONCLUSIONES

El uso del fertilizante inorgánico NPK ayudó a incrementar la producción de c-ficocianina ya que contiene nitrógeno, elemento esencial en la producción de proteínas.

Para conseguir una mayor producción de c-ficocianina en el cultivo de *Arthrospira maxima* es un sistema abierto tipo raceway con medio suplementado con NPK se puede lograr utilizando  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  del fertilizante, inóculo de  $0.3 \text{ g L}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 horas y disminuir el bicarbonato de sodio a  $10.5 \text{ g L}^{-1}$ .

Para maximizar la extracción del pigmento aplicando ciclos de congelación descongelación, es adecuado el uso de buffer fosfato de potasio 100 mM con pH de 5.8 utilizando 150 mg de biomasa seca y 4 ciclos.

La adición del pigmento en dietas para codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) en etapa de postura en concentración de 150 mg/ kg de dieta permite obtener huevos más largos, anchos y con mayor peso, disminuyendo el contenido de grasas. La c-ficocianina no afecta en la colorimetría de la yema; su color y olor no influye en el consumo del alimento.

Gomitas elaboradas con 0.70 % de C-PC tienen un color más intenso, sin afectar las propiedades de textura del producto ni la aceptabilidad general de los consumidores.

Por lo tanto, los resultados de esta investigación demuestran que es factible cultivar la cianobacteria en medio suplementado con un fertilizante inorgánico y emplear la biomasa en nutrición animal y humana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbass, M. S., Bandr, L. K., & Alkhalani, F. M. *Effect of Adding Different Levels of Spirulina Algae (Spirulina platensis) To the Diet of Japanese Quail on the Productive Performance*
- Abdelnour, S. A., Swelum, A. A., Salama, A., Al-Ghadi, M. Q., Qattan, S. Y., Abd El-Hack, M. E., & El-Saadony, M. T. (2020). *The beneficial impacts of dietary phycocyanin supplementation on growing rabbits under high ambient temperature*. Italian Journal of Animal Science, 19(1), 1046-1056.
- AlFadhly, N. K., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., & Cacciola, F. (2022). *Tendencies affecting the growth and cultivation of genus Spirulina: An investigative review on current trends*. Plants, 11 (22), 3063. doi.org/10.3390/plants11223063.
- Almeida, L. M. R., da Silva Cruz, L. F., Machado, B. A. S., Nunes, I. L., Costa, J. A. V., de Souza Ferreira, E., & de Souza, C. O. (2021). *Effect of the addition of Spirulina sp. biomass on the development and characterization of functional food*. Algal Research, 58, 102387.
- Andrade, B. B., Cardoso, L. G., de Jesus Assis, D., Costa, J. A. V., Druzian, J. I., & da Cunha Lima, S. T. (2019). *Production and characterization of Spirulina sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor*. Bioresource Technology, 284, 340-348. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.144.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Ayekpam, C., Hamsavi, G. K., & Raghavarao, K. S. M. S. (2021). *Efficient extraction of food grade natural blue colorant from dry biomass of Spirulina platensis using eco-friendly methods*. Food and Bioproducts Processing, 129, 84-93.
- Banerjee, S., & Ramaswamy, S. (2019). *Comparison of productivity and economic analysis of microalgae cultivation in open raceways and flat panel photobioreactor*. Bioresource Technology Reports, 8, 100328. doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100328.

- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). *Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga*. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.
- Bhat, O., Unpaprom, Y., & Ramaraj, R. (2023). *Spirulina Cultivation Under Different light-emitting Diodes for Boosting Biomass and Protein Production*. *Molecular Biotechnology*, 1-9.
- Bishoyi, A. K., Sahoo, C. R., & Padhy, R. N. (2022). *Recent progression of cyanobacteria and their pharmaceutical utility: an update*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 9 (41), 4219-4252. doi.org/10.1080/07391102.2022.2062051.
- 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
- Boiago, M. M., Dilkin, J. D., Kolm, M. A., Barreta, M., Souza, C. F., Baldissera, M. D., & Da Silva, A. S. (2019). *Spirulina platensis in Japanese quail feeding alters fatty acid profiles and improves egg quality: Benefits to consumers*. *Journal of food biochemistry*, 43(7), e12860.
- Chaudhary, A., Mishra, P., Al Amaz, S., Mahato, P. L., Das, R., Jha, R., & Mishra, B. (2023). *Dietary supplementation of microalgae mitigates the negative effects of heat stress in broilers*. *Poultry Science*, 102(10), 102958.
- Chisti, Y. (2016). *Large-scale production of algal biomass: raceway ponds*. *Algae Biotechnology: Products and processes*. Springer. Suiza. (pp 21-40). Recuperado de: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-12334-9>
- Chittapun, S., Jonjaroen, V., Khumrangsee, K., & Charoenrat, T. (2020). *C-phycoyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity*. *Algal Research*, 46, 101789.
- Choi, W. Y., & Lee, H. Y. (2018). *Effect of ultrasonic extraction on production and structural changes of C-phycoyanin from marine Spirulina maxima*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 220.
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., & Carvalho, J. C. M. D. (2006). *Ammonium and urea removal by Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 8-16.

- da Fontoura Prates, D., Radmann, E. M., Duarte, J. H., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). *Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production*. *Bioresource technology*, 256, 38-43. doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122
- de Oliveira, A. P. F., & Arisseto A. P. A. (2022). *Microalgae-based products: Food and public health*. *Future Foods*, 6, 100157. doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157.
- Delgado, P., & Bañón, S. (2018). *Effects of replacing starch by inulin on the physicochemical, texture and sensory characteristics of gummy jellies*. *CyTA- Journal of Food*, 16(1), 1-10.
- Dewi, E. N., Kurniasih, R. A., & Purnamayati, L. (2017). *The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 116, p. 012047). IOP Publishing.
- Dogan, S. C., Baylan, M., Erdogan, Z., Akpinar, G. C., Kucukgul, A., & Duzguner, V. (2016). *Performance, egg quality and serum parameters of Japanese quails fed diet supplemented with Spirulina platensis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(25), 5857-62
- Dolganyuk, V., Sukhikh, S., Kalashnikova, O., Ivanova, S., Kashirskikh, E., Prosekov, A., ... & Babich, O. (2023). *Food Proteins: Potential Resources*. *Sustainability*, 7 (15), 5863. doi.org/10.3390/su15075863.
- El Iraqi, E. (2017). *Effect of supplementing the diet with carotenoids-enriched spirulina algae on productive performance and physiological response of developed chickens*. *Egyptian Poultry Science Journal*, 37(2), 603-622.
- El-Seedi, H. R., El-Mallah, M. F., Yosri, N., Alajlani, M., Zhao, C., Mehmood, M. A. & Shou, Q. (2023). *Review of Marine Cyanobacteria and the Aspects Related to Their Roles: Chemical, Biological Properties, Nitrogen Fixation and Climate Change*. *Marine Drugs*, 21(8), 439. doi.org/10.3390/md21080439
- 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.
- Etheridge, R., Pesti, G. y Foster, H. 1998. *A comparison of nitrogen values obtained*



- utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. Animal Feed Science and Technology. 73(1-2):21-28*
- Ezeani, S., & O Abu, G. (2019). *Commercial Microalgae Culture in Inorganic Fertilizer Media*. Current Journal of Applied Science and Technology, 4 (38), 1-9. doi:10.9734/CJAST/2019/v38i430372.
- Fernandes, R., Campos, J., Serra, M., Fidalgo, J., Almeida, H., Casas, A. & Barros, A. I. (2023). *Exploring the Benefits of Phycocyanin: From Spirulina Cultivation to Its Widespread Applications*. Pharmaceuticals, 16(4), 592. doi.org/10.3390/ph16040592.
- Galanakis, C. M. (Ed.). (2020). *Microalgae: Cultivation, Recovery of Compounds and Applications*. Academic Press.
- Galinytė, D., Balčiūnaitė-Murzienė, G., Karosienė, J., Morudov, D., Naginienė, R., Baranauskienė, D. & Savickienė, N. (2023). *Determination of Heavy Metal Content: Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Cyano-Phycocyanin Isolated from the Cyanobacterial Biomass*. Plants, 12(17), 3150. doi.org/10.3390/plants12173150.
- Gaona Rodríguez, C. A., Bernal Barragán, H., Vásquez Aguilar, N. C., Garza Brenner, E., Arce Vázquez, N., & Sánchez Dávila, F. (2021). *Metabolizable utilization of energy and protein for egg production by addition of dried citrus pulp and eggshell into diet for laying quails (Coturnix japonica)*. Journal of Animal Science, 99.
- García, A. B., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). *The application of a phycocyanin extract obtained from Arthrospira platensis as a blue natural colorant in beverages*. Journal of Applied Phycology, 33(5), 3059-3070.
- Goto, T., Konno, S., & Konno, M. (2023). *Establishment of Wild-Derived Strains of Japanese Quail (Coturnix japonica) in Field and Laboratory Experiments*. Biology, 8 (12) 1080. doi.org/10.3390/biology12081080.
- Hadiyanto, H., Aziz, M. L., Joelyna, F. A., Sa'Adah, A. N., Putra, M. S., Filardli, A. M., & Suzery, M. (2019). *The nutritional enrichment of dried noodles by using phycocyanin extracted from Spirulina sp as an effort of food fortification. In*

- Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1295, No. 1, p. 012036). IOP Publishing.
- Hajati, H & Zaghari, M. (2019). *Spirulina platensis in poultry nutrition*. (1). Cambridge Scholars Publishing. Reino Unido. 173.
- Hao, S., Li, F., Li, Q., Yang, Q., & Zhang, W. (2022). *Phycocyanin Protects against High Glucose High Fat Diet Induced Diabetes in Mice and Participates in AKT and AMPK Signaling*. *Foods*, 11(20), 3183.
- Huo, Y., Hou, X., Yu, Y., Wen, X., Ding, Y., Li, Y., & Wang, Z. (2022). *Improving the thermal and oxidative stability of food-grade phycocyanin from Arthrospira platensis by addition of saccharides and sugar alcohols*. *Foods*, 11(12), 1752. doi.org/10.3390/foods11121752.
- Ibrahim, N.S., Wakwak, M.M., & Al-Gamal, M.A. (2018). *Productive performance and immune response in growing japanese quail supplemented with spirulina algae extract (Arthrospira platensis) in drinking water*. *Egyptian Poultry Science Journal*. 38 (2), 409-426.
- Jung, F., Krüger-Genge, A., Waldeck, P., & Küpper, J. H. (2019). *Spirulina platensis, a super food?* *Journal of Cellular Biotechnology*, 1 (5), 43-54. doi:10.3233/JCB-189012.
- Junique, L., Watier, L., Lejeune, H., Viudes, F., Deblieck, M., & Watier, D. (2021). *Determination by response surface methodology of optimal protein and phycocyanin productivity conditions in Arthrospira (Spirulina) platensis under different combinations of photoperiod variation and lighting intensity*. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100763.
- Khan, F., Shuvo, A. A. S., Khan, M. J., & Islam, K. M. S. (2021). *Effects of dietary inclusion of Spirulina platensis on egg yolk pigmentation*. *Development*, 33, 8.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). *The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products*. *Microbial cell factories*, 17 (1), 1-21. doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x.
- Knoot, C.J., Ungerer, J., Wangikar, P.P. & Pakrasi H. B. (2018) *Cyanobacteria: promising biocatalysts for sustainable chemical production*. *Journal of*

- Biological Chemistry. 14 (293) 5044-5052. doi.org/10.1074/jbc.R117.815886
- Koley, S., Mathimani, T., Bagchi, S. K., Sonkar, S., & Mallick, N. (2019). *Microalgal biodiesel production at outdoor open and polyhouse raceway pond cultivations: a case study with Scenedesmus accuminatus using low-cost farm fertilizer medium*. Biomass and Bioenergy, 120, 156-165. doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.002
- Kumar, A., Ramamoorthy, D., Verma, D. K., Kumar, A., Kumar, N., Kanak, K. R. & Mohan, K. (2022). *Antioxidant and phytonutrient activities of Spirulina platensis*. Energy Nexus, 6, 100070. doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100070
- Kumar, R., Katam, K., Loke, P., Gadhamshetty, V., Kumar, K & Bhattacharyya, D. (2022) *A comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant removal*, Bioengineered, 13 (4) pp. doi.org/10.1080/21655979.2022.2056823.
- Kumari, A., Pathak, A. K., & Guria, C. (2015). *Cost-effective cultivation of Spirulina platensis using NPK fertilizer*. Agricultural research, 4, 261-271. doi.org/10.1007/s40003-015-0168-4
- Kusmayadi, A., Agus, E., Nagarajan, D., Chang, J. & Yen, H. (2020). *Application of computational fluid dynamics (CFD) on the raceway design for the cultivation of microalgae: a review*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 5 (47), 373–382 pp. doi.org/10.1007/s10295-020-02273-9.
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., & Tys, J. (2014). *Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae*. Bioprocess and biosystems engineering, 37, 735-741. doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J.M., González-López, C. & Acien-Ferández F.G. (2020). *Spirulina for the food and functional food industries*. Food Research International. (137), 109356. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*.
- López-Hernández, J. F., Kean-Meng, T., Asencio-Alcudia, G. G., Asyraf-Kassim, M., Alvarez-González, C. A., & Márquez-Rocha, F. J. (2022). *Sustainable*

- Microalgae and Cyanobacteria Biotechnology*. Applied Sciences, 14 (12), 6887. doi.org/10.3390/app12146887.
- Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). *Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed*. Journal of animal science and biotechnology, 4, 1-7.
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., & Prates, J. A. (2017). *Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review*. Livestock Science, 205, 111-121. doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020
- Mahmood, K. A., & Khudhair, E. M. (2017). *Experimental study for commercial fertilizer NPK (20: 20: 20+ TE N: P: K) in microalgae cultivation at different aeration periods*. Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering, 18 (1), 99-110. Recuperado de: <https://www.iasj.net/iasj/download/51d0bee307745cc1>
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Yue, Q., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2017). *Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from Arthrospira (Spirulina) platensis*. Journal of Applied Phycology, 29, 1261-1270.
- Martins, M., Albuquerque, C. M., Pereira, C. F., Coutinho, J. A., Neves, M. G. P., GA Pinto, D. C., ... & Ventura, S. P. (2021). *Recovery of chlorophyll a derivative from spirulina maxima: its purification and photosensitizing potential*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 4 (9), 1772-1780. doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07880.
- Masojídek, J., Gómez-Serrano, C., Ranglová, K., Cicchi, B., Encinas Bogeat, Á., Câmara Manoel, J. A., & Acién-Fernández, F. G. (2022). *Photosynthesis monitoring in microalgae cultures grown on municipal wastewater as a nutrient source in large-scale outdoor bioreactors*. Biology, 11(10), 1380. doi.org/10.3390/biology11101380
- Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I. T., & Egan, S. (2016). *Tiny microbes with a big impact: the role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future*. Marine drugs, 14(5), 97. doi.org/10.3390/md14050097
- Mehar, J., Shekh, A., Nethravathy, M. U., Sarada, R., Chauhan, V. S. & Mudliar, S.

- (2019). *Automation of pilot-scale open raceway pond: A case study of CO<sub>2</sub>-fed pH control on Spirulina biomass, protein and phycocyanin production*. Journal of CO<sub>2</sub> utilization, 33, 384-393. doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.006.
- Memije-Lazaro, I. N., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M., & Cano-Europa, E. (2018). *Arthrospira maxima (Spirulina) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications*. Journal of Functional Foods, 43, 37-43.
- Michael, A., Kyewalyanga, M. S., & Lugomela, C. V. (2019). *Biomass and nutritive value of Spirulina (Arthrospira fusiformis) cultivated in a cost-effective medium*. Annals of Microbiology, 69, 1387-1395. doi.org/10.1007/s13213-019-01520-4.
- Morales, M., Aflalo, C., & Bernard, O. (2021). *Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species*. Biomass and Bioenergy, 150, 106108. doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. (2020). *Assessment of antioxidant contents and free radical-scavenging capacity of Chlorella vulgaris cultivated in low cost media*. Applied Sciences, 10(23), 8611. doi.org/10.3390/app10238611
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. (2021). *Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (Chlorella vulgaris)*. Annals of Microbiology, 71, 1-13. doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0.
- Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., & Kato, T. (2005). *A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina*.
- Nassar, F. S., Alaqil, A. A., El-Sayed, D. A., Kamel, N. N., & Abbas, A. O. (2023). *Effects of Dietary Intervention Using Spirulina at Graded Levels on Productive Performance and Physiological Status of Quail Birds Reared under Elevated Temperatures*. Agriculture, 13(4), 789.
- National Research Council, NRC. 1994. Nutrient requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nayak, M., Thirunavoukkarasu, M., & Mohanty, R. C. (2016). *Cultivation of freshwater*

- microalga Scenedesmus sp. using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. The Journal of general and applied microbiology, 1 (62), 7-13. doi.org/10.2323/jgam.62.7*
- Nosratimovafagh, A., Fereidouni, A. E., & Krujatz, F. (2022). *Modeling and Optimizing the Effect of Light Color, Sodium Chloride and Glucose Concentration on Biomass Production and the Quality of Arthrospira platensis Using Response Surface Methodology (RSM)*. *Life, 12(3), 371. doi.org/10.3390/life12030371.*
- Osman, A., Abd-Elaziz, S., Salama, A., Eita, A. A., & Sitohy, M. (2019). *Health protective actions of phycocyanin obtained from an Egyptian isolate of Spirulina platensis on albino rats*. *EurAsian Journal of BioSciences, 13(1), 105-112. platensis concentrate in rats. The Journal of nutrition, 135(10), 2425-2430.*
- Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Guedes, A. C. (2021). *Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria—A review on current methodologies*. *Applied Sciences, 11 (11), 5187. doi.org/10.3390/app11115187*
- Pandey, R., & Premalatha, M. (2017). *Design and analysis of flow velocity distribution inside a raceway pond using computational fluid dynamics*. *Bioprocess and Biosystems engineering, 40, 439-450. doi.org/10.1007/s00449-016-1712-8.*
- Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Markou, G., Nicodemou, A., Koutinas, M., Tekerlekopoulou, A. G., & Vayenas, D. V. (2022). *Cultivation of Arthrospira platensis in Brewery Wastewater*. *Water, 14(10), 1547.*
- Park, J. H., Lee, S. I., & Kim, I. H. (2018). *Effect of dietary Spirulina (Arthrospira) platensis on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens*. *Poultry science, 97(7), 2451-2459.*
- Park, J. H., Upadhaya, S. D., & Kim, I. H. (2015). *Effect of dietary marine microalgae (Schizochytrium) powder on egg production, blood lipid profiles, egg quality, and fatty acid composition of egg yolk in layers*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 28(3), 391.*
- Park, W. S., Kim, H. J., Li, M., Lim, D. H., Kim, J., Kwak, S. S. & Ahn, M. J. (2018). *Two*

- classes of pigments, carotenoids and c-phycoyanin, in spirulina powder and their antioxidant activities.* Molecules, 23(8), 2065. doi.org/10.3390/molecules23082065.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). *Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels.* Bioresource technology, 102(22), 10163-10172.
- Peiretti, P. G., & Meineri, G. (2011). *Effects of diets with increasing levels of Spirulina platensis on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits.* Livestock science, 140(1-3), 218-224.
- Perera, R. M. T. D., Herath, K. H. I. N. M., Sanjeeva, K. A., & Jayawardena, T. U. (2023). *Recent Reports on Bioactive Compounds from Marine Cyanobacteria in Relation to Human Health Applications.* Life, 13 (6), 1411. doi.org/10.3390/life13061411.
- Raczyk, M., Polanowska, K., Kruszewski, B., Grygier, A., & Michałowska, D. (2022). *Effect of spirulina (Arthrospira platensis) supplementation on physical and chemical properties of semolina (Triticum durum) based fresh pasta.* Molecules, 27(2), 355.
- Rayen, F., Benham, T. & Dominique, P. (2019). *Optimization of a raceway pond system for wastewater treatment: a review.* Critical Reviews in Biotechnology. 39 (3), 422-435 pp. doi.org/10.1080/07388551.2019.1571007.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P & Bux, F. (2018). *Microalgae as multi-functional options in modern agricultura: current trends, prospects and challenges.* Biotechnology Advances. 4 (36), 1255-1273 pp. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
- Ribeiro, D. M., Roncaratti, L. F., Possa, G. C., Garcia, L. C., Cançado, L. J., Williams, T. C. R., & Brasil, B. D. S. A. F. (2020). *A low-cost approach for Chlorella sorokiniana production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers.* Bioresource Technology Reports, 9, 100354. doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100354
- Rifai, A., Jamilah, S., Admirasari, R., & Prayitno, J. (2022). *Alternative Source of Nutrients for Microalgae Cultivation in a Photobioreactor System.* In IOP

- Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1034, No. 1, p. 012005). IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/1034/1/012005.
- Rivero, R., Archaina, D., Sosa, N., Leiva, G., Baldi Coronel, B., & Schebor, C. (2019). *Development of healthy gummy jellies containing honey and propolis*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(3), 1030-1037.
- Saharan, V., & Jood, S. (2017). *Nutritional composition of Spirulina platensis powder and its acceptability in food products*. Int. J. Adv. Res, 5(6), 2295-2300.
- Saldaña, B., Gewehr, C., Guzman, P., Garcia, J. y Mateos, G. 2016. *Influence of feed form and energy concentration of the rearing phase diets on productivity, digestive tract development and body measurements of brown-egg laying 70 hens fed diets varying in energy concentration from 17 to 46 wk of age*. Animal Feed Science and Technology. 221, 87-100.
- Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). *Cultivation of microalgae and cyanobacteria: Effect of operating conditions on growth and biomass composition*. Molecules, 25(12), 2834. doi.org/10.3390/molecules25122834.
- Santana, L. D. C., Mendonça, M. D. O., Silva, V. R. O., Castro, M. D. D. A., Costa, P. K. F., Moura, G. D. S., & Bertechini, A. G. (2021). *Performance and egg quality of Japanese quail fed diets containing microalgae Schizochytrium sp.* Revista Brasileira de Zootecnia, 50, e20200161.
- Shah, S., Akhter, N., Auckloo, B., Khan, I., Lu, Y., Wang, K., Wu, B. & Guo, Y. (2017). *Structural diversity, biological properties and applications of natural products from cyanobacteria. A review*. Marine drugs. 15 (11), 354 pp. doi.org/10.3390/md15110354.
- Singh, K. B., Kaushalendra, Verma, S., Lalnunpuii, R., & Rajan, J. P. (2023). *Current Issues and Developments in Cyanobacteria-Derived Biofuel as a Potential Source of Energy for Sustainable Future*. Sustainability, 13 (15), 10439. doi.org/10.3390/su151310439
- Sipaúba-Tavares, L. H., Segali, A. M. D. L., Berchielli-Morais, F. A., & Scardoeli-Truzzi, B. (2017). *Development of low-cost culture media for Ankistrodesmus gracilis based on inorganic fertilizer and macrophyte*. Acta Limnologica Brasiliensia,



29. doi.org/10.1590/S2179-975X3916

- Sompech, K., Chisti, Y., & Srinophakun, T. (2012). *Design of raceway ponds for producing microalgae*. *Biofuels*, 3(4), 387-397. doi.org/10.4155/bfs.12.39
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). *Influence of Temperature and Light Intensity on the Growth Performance of Spirulina platensis*. *International Journal on Emerging Technologies*, 10(2), 19-22.
- Sornchai, P., & Iamtham, S. (2013). *Effects of Different Initial pH of Modified Zarrok Medium on Large-scale Spirulina maxima Culture*. *Journal of Medical and Bioengineering Vol, 2 (4)*. doi:10.12720/jomb.2.4.266-269
- Stanic-Vucinic, D., Minic, S., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. C. (2018). *Spirulina phycobiliproteins as food components and complements*. *Microalgal biotechnology*, Intech Open (129-149). doi.org/10.5772/intechopen.73791
- Sun, Y., Huang, Y., Liao, Q., Xia, A., Fu, Q., Zhu, X., & Fu, J. (2018). *Boosting Nannochloropsis oculata growth and lipid accumulation in a lab-scale open raceway pond characterized by improved light distributions employing built-in planar waveguide modules*. *Bioresource technology*, 249, 880-889. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.013
- Swain, S. S., Paidesettyb, S. K. & Padhy, R. N. (2017). *Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 90, 760-776. doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.030.
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). *Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of Arthrospira platensis*. *Algal research*, 31, 239-251.
- Teixeira-Lemos, E., Almeida, A. R., Vouga, B., Morais, C., Correia, I., Pereira, P., & Guiné, R. P. (2021). *Development and characterization of healthy gummy jellies containing natural fruits*. *Open Agriculture*, 6(1), 466-478.
- Tourang, M., Baghdadi, M., Torang, A., & Sarkhosh, S. (2019). *Optimization of carbohydrate productivity of Spirulina microalgae as a potential feedstock for bioethanol production*. *International journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1303-1318.
- Tsiplakou, E., Abdullah, M. A. M., Mavrommatis, A., Chatzikonstantinou, M., Skliros,

- D., Sotirakoglou, K., *et al.* (2018). *The effect of dietary Chlorella vulgaris inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation.* Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 102, 142–151.
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B. I., Sim, S. J. & Pandey, A. (2022). *Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals.* Phytochemistry Reviews, 1-28. doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y.
- Vázquez-Rodríguez, J. A., & Escalante, F. M. E. (2022). *Analysis of the stability of phycocyanin when trehalose and citric acid are used as protectants in nutraceutical gelatin candies under in vitro digestion assays.* Food Science and Technology, 42.
- Wang, X., Jin, G., Pan, K., Zhu, B., & Li, Y. (2021). *Effects of fluctuating temperature in open raceway ponds on the biomass accumulation and harvest efficiency of Spirulina in large-scale cultivation.* Environmental Science and Pollution Research, 28, 20794-20802. doi.org/10.1007/s11356-020-11914-6
- Wils, L., Yagmur, M., Phelippe, M., Montigny, B., Clément-Larosière, B., Jacquemin, J., & Boudesocque-Delaye, L. (2022). *Alternative Solvents for the Biorefinery of Spirulina: Impact of Pretreatment on Free Fatty Acids with High Added Value.* Marine Drugs, 10 (20), 600. doi.org/10.3390/md20100600.
- Xie, Y., Li, W., Zhu, L., Zhai, S., Qin, S., & Du, Z. (2019). *Effects of phycocyanin in modulating the intestinal microbiota of mice.* Microbiologyopen, 8(9), e00825.
- Yousefi, R., Saidpour, A., & Mottaghi, A. (2019). *The effects of Spirulina supplementation on metabolic syndrome components, its liver manifestation and related inflammatory markers: A systematic review.* Complementary therapies in medicine, 42, 137-144. doi.org/10.1016/j.ctim.2018.11.013
- Yuan, B., Li, Z., Shan, H., Dashnyam, B., Xu, X., McClements, D. J., & Cao, C. (2022). *A review of recent strategies to improve the physical stability of phycocyanin.* Current Research in Food Science, 5, 2329-2337.





## ANEXOS