



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

# ÍNDICE

## Resumen

1.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.- Microalgas.....	1
1.2.- <i>Arthrospira platensis</i> .....	2
1.3.- Aprovechamiento de las microalgas.....	3
1.3.1.- Carotenoides.....	4
1.3.2.- Ficobiliproteinas.....	6
1.4.- Extracción de los compuestos de interés de las microalgas.....	6
1.5.- Nuevas tecnologías para favorecer la extracción de compuestos intracelulares.....	9
1.5.1.- Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV).....	9
1.5.2.- Altas presiones hidrostáticas (APH).....	12
1.5.3.- Homogenización por alta presión (HAP).....	14
2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	16
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
3.1.- Microalga: <i>Arthrospira platensis</i> .....	18
3.1.1.- Cepa .....	18
3.1.2.- Medio de cultivo.....	18
3.1.3.- Condiciones de cultivo.....	19
3.1.4.- Curva de crecimiento.....	19
3.2.- Tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.....	21
3.2.1.- Generador de PEAV.....	21
3.2.2.- Cámara de tratamiento.....	23
3.2.3.- Condiciones de tratamiento .....	24
3.2.4.- Procedimiento del tratamiento.....	24
3.3.- Tratamiento de Altas presiones hidrostáticas (APH).....	24
3.4.- Tratamiento de Homogenización por altas presiones (HAP).....	25
3.5.- Elaboración de las curvas de extracción de ficocianina .....	25
3.6.- Elaboración de las curvas de extracción de Carotenoides y Clorofila A y B.....	26

3.7.- Modelización de la influencia de la intensidad del campo eléctrico, tiempo y temperatura de tratamiento en la extracción de ficocianina.....	26
3.8.- Análisis estadístico de los datos.....	27
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.- Curva de crecimiento de <i>Arthrospira platensis</i> y evolución del extracto seco del cultivo a lo largo del tiempo.....	28
4.2.- Extracción de ficocianina.....	29
4.2.1 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV.....	29
4.2.2 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH).....	40
4.2.3 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de homogeneización por alta presión (HAP).....	42
4.3.- Extracción de Carotenoides, Clorofila A y B.....	44
5.- CONCLUSIONES.....	46
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	47

## RESUMEN

Las microalgas son una prometedora fuente para la producción sostenible de una gran variedad de componentes como pigmentos que pueden ser utilizados como colorantes naturales y antioxidantes en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética. *Arthrospira platensis* es una microalga verde azulada que se caracteriza por la producción de ficocianina, una proteína fluorescente de color azul, y de otros pigmentos como la clorofila A y B y carotenoides. Estos metabolitos producidos por *A. platensis* se localizan en el espacio intracelular por lo que la extracción de estos componentes con unos rendimientos elevados sin provocar su degradación ni la de las estructuras celulares y reduciendo o evitando el uso de solventes orgánicos suponen uno de los principales retos de la producción de estos compuestos a partir de esta microalga.

El objetivo de esta investigación fue investigar el potencial de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), las altas presiones hidrostáticas (APH) y la homogeneización por alta presión (HAP) para mejorar la extracción de ficocianina, carotenoides y clorofila A y B de *A. platensis*.

Tras los tratamientos de PEAV, la ficocianina comenzó a extraerse a partir de los 150 minutos. El tratamiento de PEAV más intenso aplicado (25 kV/cm, 150  $\mu$ s) aumentó 40 veces la cantidad de ficocianina extraída respecto a los tratamientos menos intensos. Un aumento de la temperatura de aplicación de los tratamientos de PEAV de 25 a 40 °C incrementó la cantidad de ficocianina extraída un 20%. Los tratamientos por APH y HAP aceleraron la extracción de ficocianina. Se observó que las máximas cantidades de ficocianina extraída se obtenían tras 30 minutos de aplicar estos tratamientos. La cantidad total de ficocianina extraída tras aplicar los tratamientos de APH y HAP era del mismo orden que la obtenida al aplicar el tratamiento de PEAV, sin embargo la pureza del extracto obtenido fue menor. Mientras que la pureza del extracto obtenido al aplicar un tratamiento de PEAV era de 0,51, en el caso de aplicar un tratamiento de APH Y HAP la pureza era de sólo 0,14 y 0,21, respectivamente. Esta menor pureza probablemente fue debido a que mientras que el tratamiento de PEAV mantenía la estructura celular, los otros provocaban una completa destrucción de los microorganismos.

Las tecnologías investigadas no mejoraron la extracción de clorofilas A y B y carotenoides utilizando etanol como medio de extracción.

## ABSTRACT

Microalgae are a promising source for the sustainable production of a variety of components such as pigments which can be used as natural antioxidants and colorants in food, pharmaceutical or cosmetic industry. *Arthrospira platensis* is a blue-green microalgae characterized by producing phycocyanin, a blue fluorescent protein, and other pigments such as chlorophyll A and B and carotenoids. These metabolites produced by *A. platensis* are located in the intracellular space, so the extraction of these components with high yields, without causing their degradation or that of cell structures and reducing or avoiding the use of organic solvents represent the major challenges of producing these compounds from this microalga.

The objective of this research was to investigate the potential of pulsed electric fields (PEF), high hydrostatic pressure (HHP) and high pressure homogenization (HPH) to improve the extraction of phycocyanin, carotenoids and chlorophyll A and B from *A. platensis*.

After application of PEF treatments, phycocyanin began to be extracted after 150 minutes of incubation. The highest PEF treatment applied (25 kV / cm, 150 µs) increased the amount of extracted phycocyanin 40 times as compared to the least intense treatments. The increment of the temperature pf application of PEF treatments from 25 to 40 °C increased the amount of extracted phycocyanin 20%. HHP and HPH treatments facilitate phycocyanin extraction. It was observed that the maximum amount of phycocyanin extracted were obtained after 30 minutes of applying these treatments. The total amount of phycocyanin extracted after HHP and HPH treatments was similar as that obtained by applying the PEF treatment, however the extract purity was lower. While the extract purity obtained by applying a PEF treatment was 0.51, in the case of applying HHP and HPH treatments extract purity was only 0.14 and 0.21 respectively. This lower purity was probably because while PEF treatment maintained cell structure, the others treatments caused a complete destruction of the microorganisms.

Techiques investigated did not improve the extraction of chlorophyll A and B and carotenoids using ethanol as extraction medium.

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1 MICROALGAS

Las microalgas son organismos unicelulares que combinan propiedades típicas de las plantas superiores, como su capacidad para realizar la fotosíntesis y unos requerimientos nutricionales simples con interesantes características biotecnológicas propias de los microrganismos como su elevada velocidad de crecimiento y su capacidad para acumular distintos metabolitos de interés (Guedes et al., 2011).

El término microalga incluye microorganismos procariotas y eucariotas (Guiry y Guiry, 2012). Dentro de esta amplia denominación, podemos encontrar principalmente dos grandes grupos: las microalgas propiamente dichas y las cianobacterias.

Las **microalgas** son organismos eucariotas con núcleo y organelas diferenciadas para la fotosíntesis y la respiración celular en las que las membranas tilacoides se encuentran dentro del cloroplasto. Los pigmentos de los fotosistemas son las clorofillas A y B, el  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno y muchos tipos de xantofilas. Algunas contienen además ficobiliproteínas como ficoeritrina y ficocianina, pero en este caso, en los tilacoides del cloroplasto. Las microalgas pueden almacenar carbohidratos (como el almidón) en el interior de los orgánulos, pero en algunos casos esa reserva puede ser en forma de lípidos haciendo a estas especies muypreciadas. La mayoría tienen paredes de celulosa junto con otros polisacáridos y proteínas que las hacen muy resistentes a ataques químicos y físicos. A pesar de tratarse de organismos unicelulares, algunas especies son capaces de asociarse en colonias relativamente organizadas (Pulz y Gross, 2004; Janssen, 2011).

Las **cianobacterias** conocidas también como algas verde-azuladas son organismos procariotas sin membrana alrededor del núcleo. Se encuentran en prácticamente todos los tipos de ecosistemas y la mayoría son autótrofas obligadas. Las diferentes especies de cianobacterias pueden crecer en un gran rango de temperaturas en formas unicelulares o formando colonias o filamentos. Algunas especies pueden incluso ajustar su flotabilidad con vesículas de gas especial y otras excretan polisacáridos para formar agregados flotantes. Al carecer de cloroplastos, su maquinaria fotosintética se encuentra en las membranas tilacoides distribuidas periféricamente en el citoplasma. Estas membranas están llenas de ficobilisomas, conjuntos de proteínas que contienen pigmentos como la ficocianina dando a este grupo su color característico. El sistema fotosintético de las cianobacterias también contiene clorofila a,  $\beta$ -caroteno y varias

xantofilas y los carbohidratos se almacenan en la forma de glucógeno. Los micrororganismos del género *Arthrospira* conocido también como *Spirulina* representan un ejemplo típico de cianobacterias.

## 1.2 ARTHROSPIRA PLATENSIS

*A. platensis* es una cianobacteria planctónica que forma grandes poblaciones en aguas tropicales y subtropicales caracterizadas por su elevado pH (superior a 11) y sus altos niveles de carbonato y bicarbonato (Durand-Chastel, 1980).



**Figura 1.-** Imagen al microscopio óptico de *Arthrospira platensis* (<http://holistikhealth.com/superfoods/spirulina/>)

Se trata de cianobacterias filamentosas cuyos filamentos se disponen en tricomas cilíndricos multicelulares en una hélice abierta a la izquierda a lo largo de toda su longitud (Fig. 1). Los filamentos o tricomas azul-verdosos están constituidos por células vegetativas que se reproducen por fisión binaria y están envueltos por una vaina delgada con constricciones ligeramente pronunciadas en las paredes transversales. La anchura de los tricomas, compuestos por células de mayor anchura que longitud, varía de 6 a 12  $\mu\text{m}$ .

La organización celular de *A. platensis* es típica de los organismos procariotas, desprovistas de núcleo delimitado y sin plástidos (organelas propias de las plantas y las algas) y su envoltura celular es similar a la de las bacterias gram negativas. La pared celular tiene un grosor entre 40 y 60 nm y al microscopio se observa como una estructura mult capa con una parte electrodensa que corresponde al peptidoglicano. Las paredes transversales que dividen regularmente al tricoma están formadas por crecimientos centrípetos y extensiones hacia el interior celular tanto del peptidoglicano como de la capa más interna de la pared celular, por lo que las paredes transversales tienen una estructura triple. Justo debajo de la pared celular está la membrana plasmática, rodeando el citoplasma que contiene las inclusiones típicas de las

cianobacterias (Stolz, 1991). La región periférica de la célula tiene un citoplasma poco electrodenso ocupado mayoritariamente por gránulos de poliglicanos y vacuolas de gas. También hay pequeños gránulos osmofílicos, fibrillas y gotas de lípidos. Los tilacoides, formados por dos membranas adyacentes unidas, se disponen paralelamente a la pared longitudinal. Las membranas tilacoides están dispuestas en paralelo y tienen asociados ficobilisomas. Las ficobiliproteínas están ensambladas dentro de los ficobilisomas que están unidas en formaciones regulares a la superficie externa de la membrana tilacoide. Las ficobiliproteínas son los pigmentos más importantes responsables de la captación de la luz en cianobacterias y algas rojas (Sarada et al., 1999). Las áreas del citoplasma menos electrodensas se encuentran libres de tilacoides y en ellas se disponen los ribosomas y el ADN.

La tabla 1 muestra la composición química de *A. platensis*. Se trata de una cianobacteria con un alto contenido en proteínas ricas en aminoácidos esenciales (Richmond, 1988). Hay que destacar también en su composición la presencia de ácidos grasos poliinsaturados entre los que destacan los ácidos grasos omega-3 y la presencia de distintos pigmentos, además de la clorofila, como los carotenoides y la ficocianina (Sassano, 1999).

**Tabla 1.-** Composición química y contenido en clorofila de *A. platensis* a 3 días de inóculo (Pelizer et al., 2002)

Componentes	%
Proteínas	63,2
Lípidos	14,2
Minerales	7,2
Fibra	3,8
Humedad	4,6
Carbohidratos	7
Clorofilas (mg/g e.s.)	12,2

### 1.3 APROVECHAMIENTO DE LAS MICROALGAS

En los últimos 30 años, la industria biotecnológica de microalgas ha crecido y se ha diversificado de manera significativa. En 2006, el mercado mundial de la biomasa de microalgas produjo alrededor de 5.000 toneladas de biomasa seca y generó una facturación de aproximadamente 1.250 millones de euros (Spolaore et al., 2006). Según un proyecto cofinanciado por la empresa Algaemax y la U.E. en 2012, la producción mundial de microalgas era de alrededor de 7.000 toneladas anuales de biomasa seca y el mercado global de las microalgas estaba comprendido entre 3.000 y 5.000 millones de

euros, con un alto nivel de participación de las PYME. De este total, el sector de alimentos saludables alcanzó los 1.500 millones de euros.

El interés por las microalgas comenzó para dar respuesta a la futura posible falta de proteínas para alimentar a la población mundial. Posteriormente, debido al agotamiento de los yacimientos de petróleo y al deseo de los países de tener independencia energética, los estudios sobre la producción de microalgas se centraron en su uso para la obtención de biocombustibles. Sin embargo, en la actualidad, se ha demostrado que por el momento la obtención de biodiesel a partir de las microalgas no resulta una opción rentable debido a los altos costes de producción. En la actualidad, el interés de los consumidores por los alimentos funcionales ha abierto una nueva aplicación de las microalgas para la obtención de productos biológicamente activos con importantes beneficios para la salud (Gouveia et al., 2007). Estos microorganismos constituyen una prometedora fuente para la obtención de compuestos de elevado valor como pigmentos y ácidos grasos insaturados, los cuales presentan multitud de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Plaza et al., 2009). Además de la clorofila, las microalgas producen distintos tipos de pigmentos como carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína, astaxantina) o ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina) (Milledge, 2011; Skjanes et al., 2013). Estos pigmentos pueden utilizarse como colorantes de origen natural y presentan importantes propiedades beneficiosas para la salud debido a su elevada capacidad antioxidante y a que algunos carotenoides producidos por las algas funcionan como provitamina A. Por otro lado, las microalgas son una interesante fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que actúan reduciendo los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, previenen la artritis y determinadas enfermedades cardiovasculares y de la piel.

A continuación se describen con más detalle las características de los dos compuestos que se han investigado en este estudio: los carotenoides y la ficobiliproteína ficocianina.

### **1.3.1 Carotenoides**

Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los colores de estos pigmentos varían desde amarillo a rojo, y algunos de los ejemplos más conocidos son el licopeno que proporciona el color rojo al tomate, la zeaxantina que le da el color amarillo al maíz, el  $\beta$ -caroteno que

proporciona el característico naranja a las zanahorias y la astaxantina que otorga el conocido color rosa al salmón.

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides actúan como pigmentos auxiliares en la captación de energía lumínica, son componentes estructurales del fotosistema y regulan la disipación del exceso de energía lumínica eliminando las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Frank y Cogdell, 1996).

La capacidad antioxidante de los carotenoides junto con su color, resultan propiedades muy atractivas para su uso tanto en la industria alimentaria, como cosmética y farmacéutica (Del Campo et al., 2007; Yuan et al., 2011; Christaki et al., 2013).

El mercado de carotenoides en 2010 se situó en los 1.200 millones de dólares y se espera que alcance los 1.400 millones de dólares en el 2018 con un crecimiento del 2,3% (BCC, 2011). Hasta ahora, la mayoría de los carotenoides se obtenían sintéticamente; sin embargo, la creciente preocupación de los consumidores por los aditivos sintéticos ha provocado una progresiva demanda de carotenoides de origen natural.

Las microalgas podrían resultar una buena fuente de estos pigmentos. Un claro ejemplo de la producción de carotenoides a partir de microalgas es la producción de luteína (Fernández-Sevilla et al., 2010). Este carotenoide ha generado especial interés en los últimos años debido a estudios que demuestran que una ingesta adecuada de luteína podría prevenir o reducir los efectos de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como la degeneración macular, las cataratas o algunas enfermedades de la piel. Sus efectos se deben a que es el único carotenoide que se absorbe en el torrente sanguíneo tras su ingestión y se acumula en la retina, ejerciendo un papel protector por su capacidad para filtrar la luz azul y actuar como antioxidante frente a los ROS.

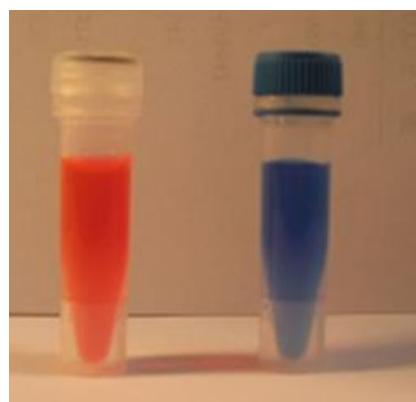
La producción de  $\beta$ -caroteno a partir de microalgas también está ganando importancia a nivel industrial. El  $\beta$ -caroteno es la mayor fuente de vitamina A y es ampliamente utilizado como colorante alimentario. Además, como el resto de carotenoides tiene un potente efecto antioxidante por lo que puede prevenir los efectos de los radicales libres implicados en el cáncer gastrointestinal, la artritis, o el envejecimiento prematuro debido a la luz UV (Miyashita, 2009). El mercado mundial de este carotenoide se estima que sobrepasara los 280 millones en 2015. La mayor parte del  $\beta$ -caroteno comercializado se obtiene por síntesis química a partir del  $\beta$ -ionone (Ribeiro et al., 2011). Alternativamente, el  $\beta$ -caroteno se puede producir

biotecnológicamente a partir de hongos, levaduras, bacterias, microalgas o extracción del aceite de palma. La obtención de  $\beta$ -caroteno a partir de microalgas es el principal procedimiento para la producción natural de  $\beta$ -caroteno. Este carotenoide puede ser obtenido principalmente de *Dunaliella spp* que puede contener hasta 140 g/kg de peso seco o de *A. platensis* que contiene hasta 296 mg/kg (Metting, 1996; Del Campo et al., 2007).

### 1.3.2 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son proteínas hidrosolubles con brillantes colores y con una elevada fluorescencia que forman parte del complejo fotosintético de las cianobacterias y algas rojas (Glazer, 1994). Según su color, se clasifican en ficoeritrina (roja) y ficocianina (azul) (Fig. 2).

La fluorescencia natural que presentan esas proteínas ha provocado que se utilicen en diagnóstico clínico y para investigación. Actualmente, las ficobiliproteínas se emplean como fluorocromos en citometría de flujo, histoquímica y análisis inmunológicos ya que poseen un amplio espectro de emisión y una elevada fluorescencia (Kronick, 1986; Glazer y Stryer, 1990).



**Figura 2.-** Solución de ficoeritrina (izquierda) y ficocianina (derecha) (imagen obtenida de Cai et al., 2012)

## 1.4 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS DE LAS MICROALGAS

A pesar de los múltiples estudios que reflejan posibles beneficios de la incorporación de productos obtenidos de las microalgas en la dieta, hoy en día, la forma

más habitual de incorporar las microalgas en la dieta sigue siendo en forma de tabletas, cápsulas o en polvo (Molina-Grima et al., 2003) (Fig. 3). Durante las últimas décadas, las microalgas han sido utilizadas casi exclusivamente en el mercado alimentario y aproximadamente un 75 % de la producción anual se emplea para la elaboración de estos formatos (Pulz y Gross, 2004). La incorporación de microalgas como ingrediente en la formulación de alimentos tradicionales, posee varios inconvenientes como el intenso color verde, el sabor y el olor a pescado y su consistencia pulverulenta (Becker, 2007). Por lo tanto, para poder incorporar estos compuestos en las formulaciones alimentarias, una de las principales estrategias es la extracción de los mismos (Gantar y Svircev, 2008).



**Figura 3.-** *Arthrospira* deshidratada y en tabletas  
[\(http://holistikhealth.com/superfoods/spirulina/\)](http://holistikhealth.com/superfoods/spirulina/)

La obtención de los componentes de las microalgas requiere su cultivo, la recuperación de la biomasa, la extracción de los componentes y su posterior purificación. La viabilidad comercial de la obtención de compuestos de interés a partir de las microalgas depende de los costes derivados de todas estas etapas. La extracción y posterior purificación de los metabolitos pueden resultar más costosas que el propio cultivo. Un estudio realizado para estimar los costes de la producción del ácido graso eicosapentanoico a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* puso de relieve que el 60% de los costes de producción procedían de los procesos de extracción y purificación de dicho ácido graso (Molina Grima et al., 2003). Por ello, se requiere optimizar estos procesos para que la obtención de compuestos de interés a partir de las microalgas sea económicamente viable. Por lo tanto, las estrategias que se están investigando en los últimos años para poder utilizar las microalgas como fuente de recursos se basan en una reducción de la energía implicada en el proceso, optimizando desde la elección del microorganismo, su cultivo y la recuperación de la biomasa hasta la obtención y purificación del metabolito.

La extracción de los componentes de interés producidos por las microalgas sin provocar su degradación y sin contaminar el extracto con otros compuestos es uno de los principales retos para poder utilizar estos componentes en distintos sectores industriales. Aunque para algunas aplicaciones pueden utilizarse directamente las microalgas deshidratadas, es conocido que la bioaccesibilidad de los valiosos componentes que producen es mayor una vez extraídos (Fernández-Sevilla et al., 2010). La presencia en la mayoría de las especies de microalgas de una pared celular, pero especialmente de una membrana citoplasmática que actúa como una barrera semipermeable influencia, en gran medida, la extracción de los compuestos de su interior. Se estima que el coeficiente de difusión de un soluto de bajo peso molecular en una membrana es alrededor de un millón de veces inferior que en el solvente adyacente (Nobel, 1999).

Generalmente, en la actualidad la extracción de los componentes de interés producidos por las microalgas se realiza tras la deshidratación de la biomasa utilizando solventes orgánicos o agua dependiendo de la polaridad de los compuestos que se quiere extraer. Aunque a escala de laboratorio el proceso habitualmente utilizado para la deshidratación de la biomasa es la liofilización, a escala industrial resulta un proceso muy costoso por lo que se suele utilizar la deshidratación por atomización. El secado de la biomasa de las algas por atomización requiere un consumo energético elevado y puede causar la pérdida de alguno de los componentes de interés por oxidación. Actualmente, la recuperación y la deshidratación de la biomasa supone aproximadamente un 20-30 % de los costes de producción (Molina-Grima et al., 2003). Con objeto de mejorar el rendimiento del proceso de extracción, la biomasa deshidratada se suele romper mecánicamente utilizando distintas técnicas como los molinos de bolas, los ultrasonidos u homogeneizadores a alta presión. Estas técnicas, aunque se muestran eficaces para destruir la estructura de las microalgas deshidratadas presentan el inconveniente de que su acción es inespecífica provocando la liberación no sólo del producto de interés sino de restos celulares e impurezas que contaminan el extracto dificultando la posterior purificación. Otros inconvenientes de estas técnicas de destrucción de la biomasa seca es que algunas de ellas como los molinos de bolas no se pueden aplicar en flujo continuo y otras como los ultrasonidos requieren elevados consumos energéticos.

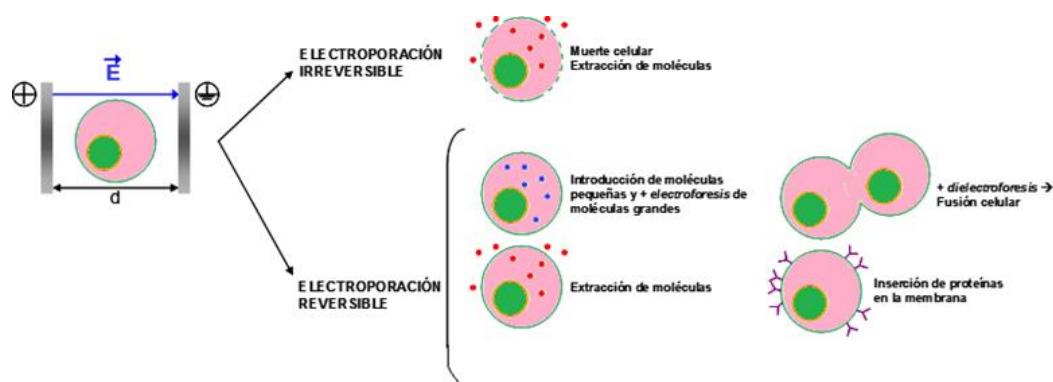
Debido a los problemas derivados de la extracción de los componentes de las microalgas a partir de la biomasa seca, una estrategia para reducir los costes, evitar

pérdidas de componentes por oxidación y obtener extractos con una mayor pureza podría ser la extracción de estos componentes a partir de la biomasa húmeda. La permeabilización o destrucción de las envolturas celulares de las microalgas sin deshidratar permitiría acelerar el proceso de extracción y mejorar su rendimiento. Para ello, se podría utilizar alguna de las nuevas técnicas no-térmicas de procesado que se están investigando en la actualidad en la industria alimentaria como los pulsos eléctricos de alto voltaje, las altas presiones hidrostáticas o la homogeneización por altas presiones.

## 1.5 NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA FAVORECER LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS INTRACELULARES

### 1.5.1 Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)

Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) es una nueva tecnología de procesado que consiste en la aplicación intermitente de un voltaje de alta intensidad y muy corta duración entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas et al., 2001). El voltaje aplicado genera un campo eléctrico cuya intensidad depende tanto del propio voltaje como de la separación entre los electrodos. Estos campos eléctricos producen un fenómeno denominado electroporación que consiste en el incremento de la permeabilidad de las membranas celulares al paso de iones y macromoléculas. Dependiendo de los parámetros de aplicación de los tratamientos la electroporación puede ser reversible manteniéndose la viabilidad de las células o irreversible.



**Figura 4.-** Esquema que muestra la creación de un campo eléctrico entre dos electrodos y las aplicaciones del fenómeno de electroporación (Rebersek y Miklavcic, 2010)

La electroporación reversible es una técnica de uso habitual en el campo de la ingeniería genética para la introducción de DNA, plásmidos u otros componentes en el interior celular. Más recientemente se está utilizando como una herramienta en aplicaciones clínicas (electroquimioterapia) para el tratamiento de células tumorales “in

vivo” con objeto de facilitar la entrada de compuestos anticancerígenos en su interior (Kotnik et al., 2013). En la industria alimentaria, las aplicaciones de esta tecnología están basadas en la electroporación irreversible. Este tipo de electroporación provoca la inactivación de las células vegetativas de los microorganismos permitiendo la pasteurización no térmica de alimentos sensibles al calor (Saldaña et al., 2013) o la permeabilización permanente de células eucariotas de tejidos vegetales favoreciendo la transferencia de masa en la extracción de distintos componentes intracelulares de interés (Puértolas et al., 2012). Aunque la aplicación de esta tecnología para mejorar la velocidad de transferencia de masa y el rendimiento en la extracción de diferentes componentes de interés (sacarosa, polifenoles, betanina, carotenoides, etc.) de matrices vegetales ha sido ampliamente investigado, apenas se ha estudiado el potencial de los PEAV para la extracción de componentes intracelulares de interés producidos por células microbianas como las microalgas.

#### 1.5.1.1 Mecanismo de acción

Desde que se descubrió el fenómeno de la electroporación, se han propuesto diversas teorías con el objetivo de explicar el mecanismo por el cual la aplicación de un campo eléctrico externo provoca un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares. Una de las primeras teorías propuestas es la denominada “ruptura dieléctrica de la membrana celular” (Zimmermann 1974). Según esta teoría, la aplicación de un campo eléctrico externo produciría un acúmulo de cargas de signo opuesto a ambos lados de la membrana celular. Las fuerzas electrostáticas entre estas cargas de signos opuestos comprimirían la membrana bajo la acción de un campo eléctrico. Si estas fuerzas son suficientemente intensas, se produciría la aparición de poros en las membranas.

Sin embargo, en la actualidad, la teoría más aceptada para explicar el fenómeno de electroporación es la formación de poros hidrofílicos. Esta teoría considera que en condiciones normales, en ausencia de un campo eléctrico externo, se producen en las membranas la formación y cierre de poros hidrofílicos de tamaño muy pequeño (< 1 nm) y de una vida media inferior a 1 nanosegundo como consecuencia de fluctuaciones térmicas y mecánicas. La formación de estos poros se apoya en el hecho de que se ha observado que el agua y algunos iones penetran a través de las membranas a una velocidad demasiado elevada para tratarse de un fenómeno de difusión a través de una bicapa lipídica intacta. Según estas teorías, el potencial transmembrana provocado por

la aplicación del campo eléctrico externo disminuye la energía que se requiere para la formación de estos poros hidrofílicos que se forman espontáneamente favoreciendo la formación de un mayor número de poros y más estables, es decir, que permanecen abiertos durante más tiempo (Weaver y Chizmadzhev, 1996). En opinión de algunos autores (Tsong, 1991), los canales proteicos que participan en el transporte de sustancias a través de las membranas también pueden ser responsables por el incremento de su permeabilidad cuando se exponen a la acción de un campo eléctrico externo. Algunos sistemas de transporte activo requieren la existencia de un potencial transmembrana inferior al potencial transmembrana crítico que se requiere para que se inicie la electroporación. Por lo tanto, la aplicación de un tratamiento de PEAV debería provocar la apertura de estos canales proteicos. Una vez abiertos estos canales, el paso de corriente eléctrica podría provocar su desnaturaleza irreversible al aumentar la temperatura por efecto Joule o por el propio efecto de la corriente eléctrica.

#### 1.5.1.2. Parámetros del tratamiento

Los principales parámetros de tratamiento que determinan la eficacia de los PEAV son: la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la temperatura y la energía específica.

La **intensidad del campo eléctrico** se define como la diferencia de potencial (V) existente entre dos electrodos donde se coloca el material, dividido por la distancia que los separa. Existe un campo eléctrico crítico para que se produzca la electroporación de las membranas; una vez superado dicho valor, un incremento del campo se asocia con un aumento de la eficacia del proceso. Sin embargo se ha constatado que por encima de un determinado valor este aumento no provoca una mejora sustancial en la eficacia del tratamiento.

El **tiempo de tratamiento** se corresponde con el número de pulsos aplicados multiplicado por la anchura del pulso. Generalmente se utilizan pulsos de una duración entre 1 y 20  $\mu$ s y el número total de pulsos aplicados no suele ser superior a los 100 por lo que el tiempo efectivo de tratamiento es muy pequeño.

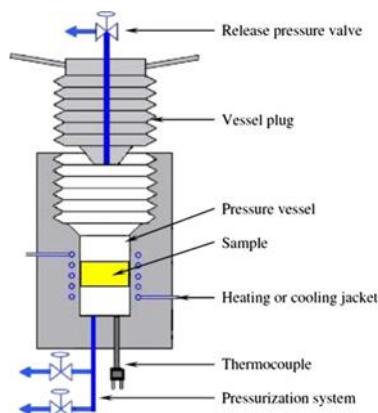
Otro parámetro importante de procesado es la **temperatura** a la que se aplica el tratamiento. Se ha observado que al aumentar la temperatura se consigue una mayor electroporación de las membranas celulares. Este efecto se ha asociado al hecho de que el incremento de la fluidez de la membrana al aumentar la temperatura favorece su electroporación.

Finalmente, la **energía específica** es un parámetro de procesado que indica el gasto energético por masa de producto requerido para generar los campos eléctricos de alto voltaje responsables de la electroporación de las membranas. Además de depender del voltaje aplicado y del número de pulsos, está condicionado por la resistencia de la cámara de tratamiento que a su vez es función de sus dimensiones y de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento. Este parámetro permite estimar el coste energético de los tratamientos y compararlo con otras tecnologías de procesado.

### 1.5.2 Altas presiones hidrostáticas (APH)

El procesado por APH consiste en someter a un producto a presiones hidrostáticas comprendidas entre 100 y 900 MPa durante períodos de tiempo que generalmente se encuentran entre 1 y 30 minutos.

A pesar de ser considerada una nueva tecnología de procesado de los alimentos, que se empezó a utilizar comercialmente a principios de los noventa, la idea de su utilización tiene más de un siglo. Actualmente, su principal aplicación es prolongar la vida útil de los alimentos y garantizar su seguridad microbiológica debido a que estos tratamientos provocan la inactivación tanto de microorganismos patógenos como alterantes. Sin embargo, en los últimos años, se han propuesto otras aplicaciones como la aceleración de procesos de difusión de solutos, la mejoría de los procesos de congelación-descongelación o la modificación de la textura de los alimentos debido a los cambios que provocan fundamentalmente en las proteínas y otras macromoléculas como el almidón (San Martín et al., 2002).



**Figura 5.-**Diagrama esquemático de un sistema de extracción de altas presiones (Huang et al., 2011)

El equipo para la aplicación de altas presiones consta de una cámara cilíndrica de tratamiento de acero inoxidable; un fluido para transmitir la presión –habitualmente agua, o mezclas que incluyen diferentes aceites y/o glicoles- y un sistema de generación de las altas presiones constituido por un conjunto de bombas e intensificadores de presión.

El tratamiento por APH es generalmente un proceso discontinuo por lotes. El producto se introduce envasado en la cámara, se bombea el fluido de compresión hasta alcanzar la presión de tratamiento y se cierran las válvulas durante el periodo de tiempo deseado. Una vez que el producto ha recibido el tratamiento, se abren las válvulas y se extrae. En el caso de que se procesen alimentos líquidos como una suspensión de microalgas, el propio producto podía actuar como fluido de compresión, optimizando de esta manera el volumen de tratamiento. Una de las ventajas de la aplicación de APH es que todo el producto se somete a la misma presión durante exactamente el mismo tiempo, a diferencia de lo que ocurre con otras tecnologías, como el calor, en la que se establecen gradientes de intensidad.

#### 1.5.2.1. Mecanismo de acción

Se considera que los tratamientos por altas presiones hidrostáticas, al igual que el calor, ejercen su efecto simultáneamente sobre diversos componentes de las células como las envolturas celulares, el ADN, los ribosomas, el ARN, proteínas y enzimas.

Por lo que respecta al uso de esta tecnología para facilitar la posterior extracción de componentes intracelulares de interés de las microalgas es importante su efecto sobre las envolturas celulares. La membrana citoplasmática es una de las principales estructuras afectadas por estos tratamientos (Pagán y Mackey, 2000; Mañas y Mackey, 2004). Se han descrito tanto alteraciones a nivel estructural detectadas mediante técnicas de microscopía, como pérdidas de la permeabilidad selectiva y de determinadas funciones asociadas a la membrana, tras la aplicación de APH.

Las altas presiones hidrostáticas podrían provocar que la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática pasara de estado líquido cristalino a gel, lo que podría conducir a la formación de poros o rupturas en la misma (Mackey y Mañas, 2008). Como consecuencia de estos cambios en la membrana provocados por las altas presiones hidrostáticas se ha observado tras tratar suspensiones microbianas una liberación al medio extracelular de componentes intracelulares como aminoácidos, proteínas, DNA, RNA, ATP e iones metálicos (Smelt et al., 1994; Perrier-Comet et al.,

1999). Los daños a la membrana también se han demostrado mediante la utilización de marcadores fluorescentes como el yoduro de propidio, colorante que se une al DNA y RNA, pero que únicamente penetra en el interior celular si la membrana citoplasmática está permeabilizada (Shigehisa et al., 1991; Mañas y Mackey, 2004).

#### 1.5.2.2 Parámetros de tratamiento

Los parámetros de procesado más importantes a controlar en un tratamiento por altas presiones hidrostáticas son la presión, el tiempo y la temperatura.

La **presión** de tratamiento se corresponde con la presión final que se alcanza en la cámara de tratamiento una vez que se detienen las bombas responsables del incremento de la presión. Generalmente, para conseguir los efectos deseados, se aplican presiones comprendidas entre los 100 y los 600 MPa. La aplicación de presiones superiores conlleva numerosos problemas técnicos relacionados tanto con el sistema de generación de la presión como con la propia cámara de tratamiento.

Se considera como **tiempo** efectivo de procesado al periodo de tiempo que se mantiene el producto en la cámara de tratamiento una vez alcanzada la presión de tratamiento. La presión de tratamiento no se puede alcanzar instantáneamente en la cámara por lo que ésta aumenta gradualmente a una velocidad que depende tanto del propio sistema de generación de la presión como del volumen de la cámara de tratamiento. Por lo tanto, el tiempo de tratamiento a presión constante será el comprendido entre el final de la compresión y el principio de la descompresión, que suele ser más corta que la compresión.

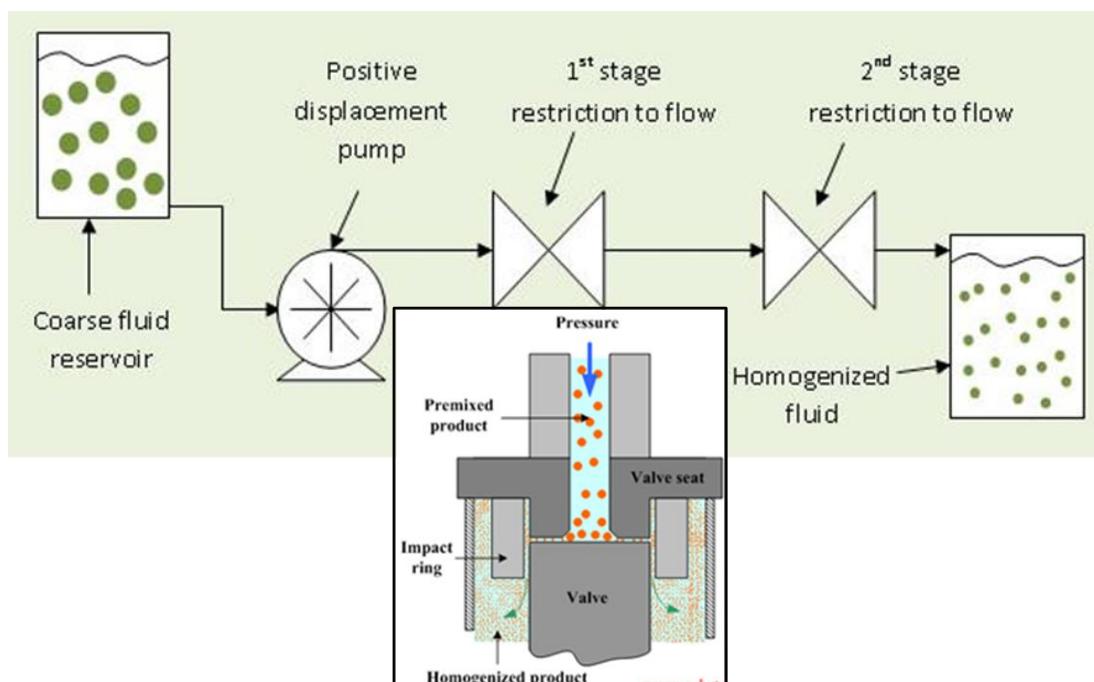
Finalmente, durante el proceso de compresión adiabática se produce un incremento de **temperatura**, tanto del fluido de compresión como del producto que se procesa. Este aumento, que depende de las propiedades termodinámicas de ambos, puede afectar a la eficacia del proceso. Al igual que ocurre con los tratamientos de PEAV se ha observado que los tratamientos por altas presiones son más eficaces al aumentar la temperatura de procesado.

#### 1.5.3 Homogenización por alta presión (HAP)

El procesado mediante homogenización por alta presión es un proceso que se caracteriza por forzar a un producto líquido a pasar por una restricción por acción de unas bombas capaces de alcanzar presiones superiores a 100 MPa. Dependiendo de la

presión que son capaces de alcanzar las bombas que fuerzan a pasar al líquido por la restricción el tratamiento se denomina homogeneización por alta presión (150-200 MPa) o ultrahomogeneización por alta presión (350-400 MPa).

El proceso se aplica a alimentos líquidos mediante un equipo que consta de una bomba de desplazamiento positivo y una o más restricciones al flujo del producto creada por unas válvulas o boquillas (Fig. 6). Al pasar el líquido por la restricción se crean fuertes turbulencias, fuerzas de cizalla como consecuencia del impacto del producto sobre la válvula y la posterior caída de presión.



**Figura 6.-Esquema de un equipo de homogenización por alta presión (Dumay et al 2013)**

Se trata de una tecnología que se está estudiando para su aplicación en distintos sectores como el alimentario, el cosmético o el farmacéutico. Se aplica para fragmentar partículas en dispersiones o emulsiones, producir emulsiones finas y estables, modificar las propiedades viscosas de los fluidos, gracias a la reducción del tamaño de partícula, facilitar la extracción de metabolitos, así como inactivar microorganismos, enzimas o virus. Al igual que el tratamiento por PEAV esta tecnología presenta la ventaja de ser un proceso continuo.

#### 1.5.3.1 Mecanismo de acción

La homogenización de alta presión es una técnica que provoca la ruptura de las células microbianas facilitando la salida de los componentes intracelulares (Middelberg,

1995). Se cree que las turbulencias y fuerzas de cizalla que se producen en las válvulas o boquillas del homogeneizador provocan alteraciones a nivel de las membranas celulares y la ruptura mecánica de las células. De hecho, se han observado, utilizando técnicas de microscopía electrónica, alteraciones y roturas mecánicas de las paredes celulares microbianas, restos de membranas y células colapsadas después del tratamiento con homogenización de alta presión (Tribst et al., 2009; Vachon et al., 2002).

#### 1.5.3.2 Parámetros de tratamiento

Los principales parámetros de procesado que determinan la eficacia de los tratamientos por homogeneización por altas presiones son: la presión de homogeneización, el número de ciclos de homogeneización y la temperatura.

La **presión** de homogeneización es el principal parámetro de procesado que determina la eficacia del tratamiento para la destrucción celular aumentando el efecto al aumentar la presión (Donsí et al., 2009).

El tratamiento por homogeneización por alta presión es instantáneo por lo que el procedimiento para prolongar el tiempo del procesado es aumentar el **número de ciclos de homogeneización**. Es decir hacer pasar el producto por el equipo más de una vez. Aumentar el número de ciclos de presurización a través del homogeneizador aumenta la eficacia del proceso (Maresca et al., 2011).

Finalmente, la **temperatura** es otro parámetro que influye en la eficacia del tratamiento de homogeneización por alta presión. El incremento de la temperatura a la que el producto entra en el homogeneizador incrementa la eficacia del proceso. A parte de la temperatura de entrada hay que tener en cuenta que la temperatura del producto puede aumentar como consecuencia del propio tratamiento sobre todo cuando se aplican los tratamientos a las presiones más elevadas. Un salto total de aproximadamente 19 °C por cada 100 MPa fue medido en el procesado de emulsiones cuya temperatura inicial era 4 °C (Cortés-Muñoz et al., 2009).

## 2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las microalgas son una fuente natural y disponible de forma continua de compuestos de interés como pigmentos y ácidos grasos insaturados con multitud de aplicaciones para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Aunque para algunas aplicaciones es suficiente el uso de las microalgas deshidratadas en otras es necesario utilizar los compuestos puros por lo que es necesario su extracción y posterior purificación. La posibilidad de extraer estos compuestos con unos rendimientos elevados, sin provocar su degradación, sin contaminar el extracto con otros compuestos y reduciendo o evitando el uso de solventes orgánicos suponen uno de los principales retos de la industria de las microalgas.

La presencia en la mayoría de las microalgas de una pared celular, pero especialmente de una membrana citoplasmática que actúa como una barrera semipermeable dificulta, en gran medida, la extracción de los metabolitos que se suelen encontrar en el citoplasma bien libres o en el interior de vesículas. Por ello, el incremento de la permeabilidad o la destrucción de estas envolturas mediante el uso de nuevas tecnologías de procesado como los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), las altas presiones hidrostáticas (APH) o la homogeneización por alta presión (HAP) podría facilitar la extracción de estos compuestos.

El **objetivo** de esta investigación fue investigar el potencial de los PEAV, las APH y la HAP para mejorar la extracción de ficocianina, carotenoides y clorofila a y b de *Arthrospira platensis*. Para la consecución de este objetivo general fue necesario la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Identificar los principales parámetros de tratamiento de las tres tecnologías que influyen en su efecto sobre *A. platensis*.
- Desarrollar, siempre que fuera posible, modelos matemáticos que permitieran cuantificar la influencia de los distintos parámetros e identificar las condiciones óptimas de tratamiento.
- Identificar y comparar los beneficios derivados del uso de las tres tecnologías en términos de rendimiento del proceso de extracción, pureza del extracto y costes energéticos.

## **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 MICROALGA: *ARTHROSPIRA PLATENSIS***

#### **3.1.1 Cepa**

La cepa de *Arthospira platensis* (BEA 0007B) fue adquirida del Banco Nacional de Algas (Isla Canarias, España).

#### **3.1.2 Medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue *Spirulina Medium modificado* (Aiba and Ogawa 1977, Schlösser 1994) (Tabla 2) recomendado por el Banco Nacional de Algas (Isla Canarias, España).

**Tabla 2.-Medio de cultivo *Spirulina Medium***

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	13,61
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	0,08
METALES TRAZA*	1 ml

#### **\*SOLUCIÓN METALES TRAZA**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	0,8
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,002
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,001
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,000005

Para elaborar la solución de metales traza, primero se disolvió el EDTA en 900 ml de agua destilada y después se disolvieron los componentes restantes, llevando el volumen final a un litro. Para elaborar el medio de cultivo sólido, se adicionaron 15 g de

agar técnico (Biolife, Milán, Italia) a 1 L de medio de cultivo *Spirulina medium modificado*. Tanto el medio líquido como el medio sólido se autoclavaron a 121 °C durante 20 min.

### 3.1.3 Condiciones de cultivo

Las células de *Arthrospira platensis* se cultivaron en probetas cilíndricas de 8 cm de diámetro y 53 cm de altura, con un volumen de 2 L (Fig. 7), en las condiciones recogidas en la tabla 3. Los cultivos se inocularon para conseguir una concentración inicial correspondiente a una absorbancia a 560 nm de aproximadamente 0,05. La oxigenación se conseguía mediante un tubo que burbujeaba aire desde el fondo de la probeta (aireación ascendente), consiguiendo además un ligero mezclado de las células.

**Tabla 3.-Condiciones de cultivo**

Parámetros	Probeta 2 L
Temperatura	30 °C
Luz	930 lux
	Ciclos de luz:oscuridad (12h:12h)
Aire	6 mL/s



**Figura 7.-**Estufa de incubación de los cultivos de *A. platensis* en probetas de 2 L.

### 3.1.4. Curva de crecimiento

Para elaborar la curva de crecimiento de *Arthrospira platensis* a 30 °C se tomaron muestras de 10 mL a lo largo del tiempo y midieron la densidad óptica (DO) a 560 nm (relacionada directamente con la densidad celular), el peso seco y la concentración de ficocianina.

### 3.1.4.1 Densidad óptica

La densidad óptica del cultivo se midió a temperatura ambiente con un espectrofotómetro (Libra S12, Biochrom, Reino Unido) a una longitud de onda de 560 nm.

### 3.1.4.2 Extracto seco

Para la determinación del extracto seco por volumen de cultivo, se tomaron 10 mL del cultivo y se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Heraeus Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Alemania). Se retiró el sobrenadante y el pellet se deshidrató hasta peso constante en un deshidratador a vacío (GeneVac Ltd, Reino Unido). El peso seco se determinó por duplicado.

### 3.1.4.3 Determinación de la concentración total de ficocianina y de la pureza del extracto

La concentración total de ficocianina en el cultivo se determinó tras la completa ruptura de las células utilizando el equipo Mini Beadbeater 3110 Bx (BioSpec Products Inc, Estados Unidos). Para ello, 150 µl del cultivo se añadieron a un criovial que contenía 1350 µl de PBS y 0,5 g de perlas de vidrio de 0,1 mm (BioSpec Products Inc, Estados Unidos). El criovial se agitó a 4800 rpm en ciclos de 10 segundos, 10 veces. Tras cada ciclo, la muestra se enfriaba durante 2 minutos en agua con hielo para evitar el calentamiento excesivo por el rozamiento y la desnaturización de la ficocianina. Trascurrida una hora después del tratamiento, la muestra se centrifugó a 10.000xg durante 90s en una centrífuga Minispin®plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se retiró el sobrenadante. A continuación, se realizó la medida de la absorbancia del sobrenadante a 615 y 652 nm utilizando un espectrofotómetro Libra S12 (Biochrom, Reino Unido) y se calculó la concentración de ficocianina utilizando la siguiente ecuación (Bennett et Bogorad, 1973):

$$PC = \frac{(DO_{615} - 0,474 DO_{652})}{5,34} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde PC es la concentración de ficocianina (mg/mL), DO<sub>615</sub> es la densidad óptica de la muestra a 615 nm y DO<sub>652</sub> es la densidad óptica a 652 nm. La concentración se expresó en mg de ficocianina por gramo de peso seco.

También se midió la absorbancia a 280 nm utilizando cubetas de espectrofotómetro para longitudes de onda ultravioleta. Esta absorbancia es debida a la concentración total de proteínas, mientras que la absorbancia a 615 nm indica la concentración de ficocianina (Liu et al., 2005), por lo tanto la pureza del extracto se calculó como:

$$EP = \frac{OD_{615}}{OD_{280}} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde EP es la pureza del extracto, DO<sub>615</sub> es la densidad óptica de la muestra a 615 nm y DO<sub>280</sub> es la densidad óptica de la muestra a 280nm.

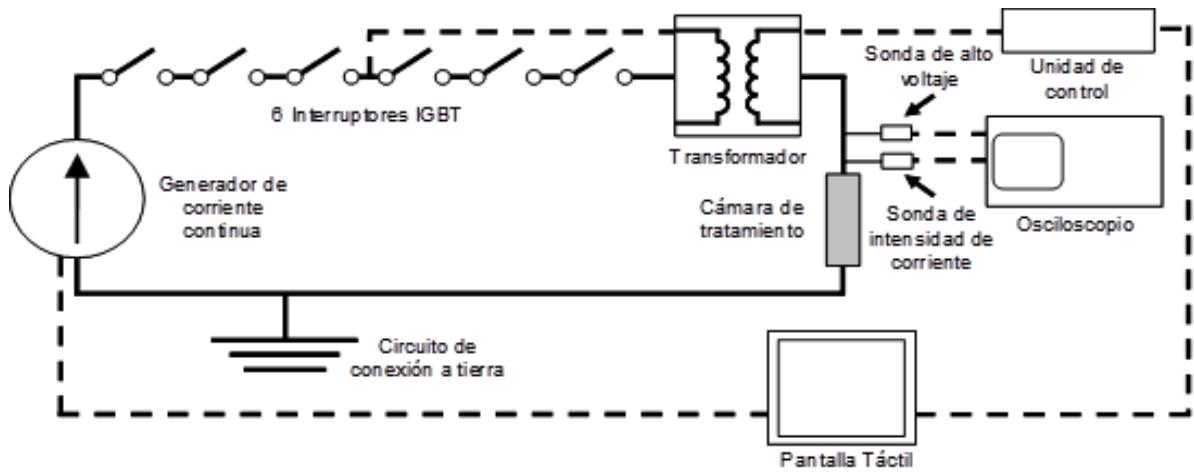
## 3.2 TRATAMIENTO DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)

### 3.2.1 Generador de PEAV

Para la aplicación de los tratamientos de PEAV, se utilizó un generador suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), cuyo esquema eléctrico se muestra en la Fig. 8. Este consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal pulsante de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulsos (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada.

Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3  $\mu$ s de duración (Fig. 9) de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz.

El equipo está diseñado para trabajar con una cámara de tratamiento con una resistencia eléctrica óptima entre 100 y 170  $\Omega$ . En estas condiciones, se consigue un pulso totalmente cuadrado, en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido a una velocidad de 47 kV/ $\mu$ s y, una vez terminado el pulso, la velocidad de descenso es de 56 kV/ $\mu$ s. A lo largo de toda la duración del pulso, el voltaje alcanzado oscila menos de un 2 %.



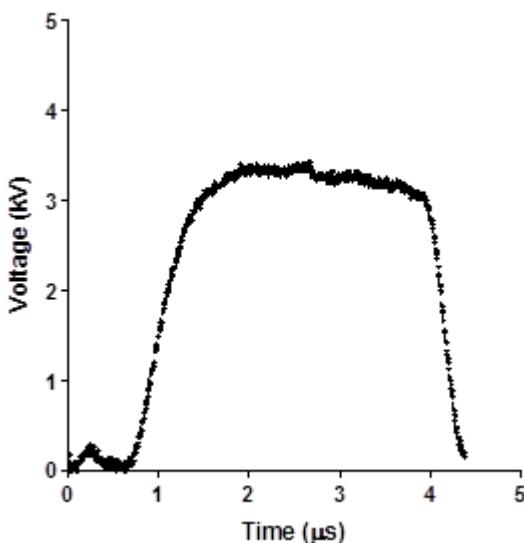
**Figura 8.-Configuración eléctrica del equipo de PEAV**

Durante la aplicación de los tratamientos, parte de la energía eléctrica generada se disipa en forma de calor (hasta 1 kW). Para evitar el sobrecalentamiento del sistema, el equipo posee un sistema de refrigeración mediante aceite dieléctrico de baja conductividad eléctrica. Dicho aceite es enfriado mediante un intercambiador de calor en el que el fluido refrigerante es agua. Ésta debe circular a un flujo mínimo de 9 l/min, a una presión de entre 3 y 8 bares, y su temperatura debe estar comprendida entre los 10 y los 40 °C. Para que las condiciones de trabajo del equipo sean estables, la temperatura del agua durante la aplicación de los tratamientos debe ser igual a su temperatura inicial  $\pm 2,5$  °C.

El control del equipo se realiza mediante un software específico diseñado por la empresa fabricante (K1-15m, ScandiNova) a través de una pantalla táctil de cristal líquido (Simatic panel, Siemens, Munich, Alemania). Debido a que el equipo aplica altos voltajes e intensidades de corriente, se integró un sistema de seguridad que permite la desconexión manual del circuito eléctrico en caso de emergencia. Éste consta de un pulsador externo de fácil accionamiento (RS Amidata, Pozuelo de Alarcón, España), conectado al equipo mediante una clavija tipo RS-232 (RS Amidata). Al accionar el pulsador, el circuito se cierra impidiendo el paso de corriente a través de él, de modo que la manipulación de sus componentes externos es segura.

Para determinar el voltaje y amperaje realmente aplicados y así conocer las condiciones efectivas de tratamiento, el sistema se completa con una sonda de alto voltaje (P6015A, Tektronix, Wilsonville, Oregon, EE.UU.) y una sonda de medida de la intensidad de la corriente eléctrica (Stangenes Industries, Palo Alto, California, EE.UU.)

conectadas a la salida del equipo, cuyas lecturas son registradas en un osciloscopio digital de dos canales (TDS 220, Tektronix).

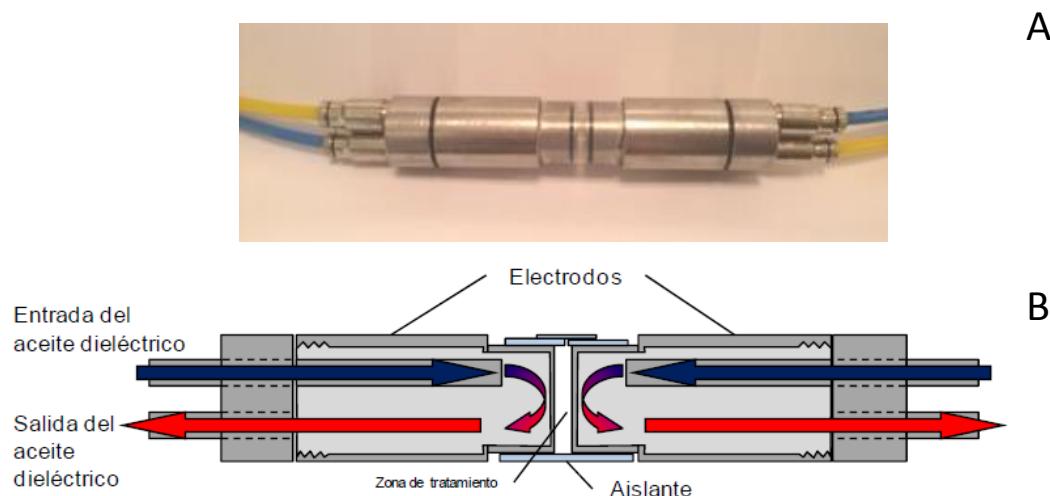


**Figura 9.-** Ejemplo de los un pulso registrado por un osciloscopio generado por el equipo de PEAV

### 3.2.2 Cámara de tratamiento

La cámara utilizada para aplicar los tratamientos de PEAV en las investigaciones llevadas a cabo con *A. platensis* fue una cámara estática de electrodos paralelos termostatada. La cámara consiste en un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable de 16 mm de diámetro y 4 cm de longitud, separados una distancia de 2,5 mm. El interior de los electrodos es hueco, lo que permite la circulación de aceite dieléctrico ( $1,4 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) atemperado a diferentes temperaturas (Fig. 10). El aceite se impulsa con una bomba peristáltica que, previamente a su paso por los electrodos, se atempera haciendo circular por el interior de un serpentín de acero inoxidable ( $\varnothing$  interno 2 mm,  $\varnothing$  externo 3mm, 200 cm longitud) que está sumergido en un baño termostático. Este sistema permite atemperar el medio de tratamiento a distintas temperaturas y evita que la temperatura del medio de tratamiento apenas incremente durante la aplicación de los PEAV permitiendo que la temperatura permanezca constante durante la aplicación del tratamiento (Saldaña, 2011).

Para el llenado y vaciado de la cámara, se dispone de un orificio en el tubo de polietileno de 1,0 mm de diámetro, el cual se mantiene cerrado durante el tratamiento con cinta adhesiva.



**Figura 10.-** Cámara (A) y esquema (B) de la cámara de tratamiento estática con electrodos paralelos termostatados utilizada para los tratamientos de microsegundos. Las flechas indican la dirección y el sentido del flujo del aceite dieléctrico por el interior de los electrodos. Separación entre electrodos: 2,5 mm; Longitud del electrodo: 40,0 mm; diámetro del electrodo: 16,0 mm. (imagen cedida por el Dr. Saldaña).

### 3.2.3 Condiciones de tratamiento

La suspensión de *A. platensis* se sometió a tratamientos de hasta 50 pulsos de 3  $\mu$ s de 10, 15, 20 y 25 kV/cm correspondientes a energías específicas por pulso de 0,30, 0,66, 1,2, 1,86 kJ/L de cultivo. La frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 0,5 Hz. Las temperaturas del medio de tratamiento investigadas fueron 10, 25 y 40 °C.

### 3.2.4 Procedimiento del tratamiento de PEAV

Previamente a cada tratamiento de PEAV, el cultivo de *A. platensis* se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 25 ± 1°C (Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Alemania) y se resuspendió en agua destilada en varios ciclos hasta conseguir una conductividad de 1 mS/cm. La suspensión se introdujo en la cámara para su tratamiento, mediante una jeringuilla estéril de 1 mL (TERUMO, Lovaina, Bélgica), como ha sido descrito por Raso *et al.* (2000). Tras cada tratamiento, se extraía la muestra con una jeringuilla hipodérmica estéril.

## 3.3 TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH)

Para la aplicación de los tratamientos de APH, se utilizó el equipo “Food Lab” 900®, modelo S-FL-850-9-W (Stansted Fluid Power Ltd., UK). Muestras de 1 mL de la

suspensión de *A. platensis* en PBS se introdujeron en bolsas de plástico que se cerraron con una termoselladora. Dichas muestras se trajeron en el equipo de APH a 50, 100 y 150 MPa durante 3 minutos.

### **3.4 TRATAMIENTO POR HOMOGENEIZACIÓN POR ALTAS PRESIONES (HAP)**

Para la aplicación de los tratamiento de HAP se utilizó el homogeneizador Panda 2002 (Gea Niro Soavi, Parma, Italia). Este equipo, que puede proporcionar una presión máxima de 150MPa, consiste en un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones elevadas. En la válvula, el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula y luego se expande.

Previamente a la aplicación de los tratamientos, la suspensión de *A. platensis* se concentró dos veces y se resuspendió en PBS. Las muestras se trajeron en flujo continuo en un sólo pase a 10, 25 y 50 MPa.

### **3.5 ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA**

Tras aplicar los correspondientes tratamientos, 1 mL de la muestra tratada se añadió a 9 mL de PBS contenidos en recipientes de 20 mL. Durante todo el periodo de extracción, los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente en agitación a una velocidad de 600 rpm (Vibramax 100, Heidolph instruments, Schwabach, Alemania). A intervalos de tiempo predeterminado se tomó 1 mL del medio de extracción. Tras su centrifugación a 14.000 x g durante 2 minutos en la centrífuga Minispin®plus se retiró el sobrenadante. En dicho sobrenadante, se cuantificó la ficocianina por espectrofotometría como se ha indicado anteriormente en el apartado 3.1.4.3.

### **3.6 ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES Y CLOROFILA A Y B.**

Tras aplicar los correspondientes tratamientos, 1 mL de la muestra tratada se añadió a 9 mL de etanol al 96 % contenidos en recipientes de 20 mL. Durante todo el periodo de extracción, los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente en la oscuridad. A intervalos de tiempo predeterminado, se tomó 1 mL del medio de extracción. Tras su centrifugación a 10.000 x g durante 90 segundos en la centrífuga Minispin®plus se retiró el sobrenante.

La cuantificación de los pigmentos extraídos en el etanol se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro (Libra S12). Para ello, se midió la absorbancia del extracto a 470, 649 y 664 nm y se calculó la concentración de clorofilas y carotenoides con las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila a (Ca) } (\mu\text{g/ml}): (13,36 \times A_{664}) - (5,19 \times A_{649}) \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Clorofila b (Cb) } (\mu\text{g/ml}): (27,43 \times A_{649}) - (8,12 \times A_{664}) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/ml}): (1000 \times A_{470} - 2,13 \times Ca - 97,64 \times Cb) / 209 \quad \text{Ecuación 5}$$

### **3.7 MODELIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DEL CAMPO ELÉCTRICO, TIEMPO Y TEMPERATURA DE TRATAMIENTO EN LA EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA**

Con el fin de describir la influencia de las condiciones de procesado por PEAV (intensidad del campo eléctrico, tiempo y temperatura) en la mejora de la extracción de ficocianina de *A. platensis*, se aplicaron técnicas de regresión múltiple que permitieran obtener la correspondiente función de respuesta. La función de respuesta de las variables ensayadas se estableció en base a componentes lineales, cuadráticos y sus interacciones según la siguiente expresión:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

donde  $Y$  es la variable de respuesta;  $X_i$  y  $X_j$  son factores independientes;  $\beta_0$  es la ordenada en el origen;  $\beta_i$  son los coeficientes de las relaciones lineales;  $\beta_{ii}$  los

coeficientes de las relaciones cuadráticas;  $\beta_{ij}$  los coeficientes de las relaciones de interacción; y  $k$  el número total de factores independientes. Los términos de la ecuación final obtenida fueron analizados estadísticamente en base a los valores F de cada término para un nivel de significancia de  $p=0,05$ .

Para la obtención de los parámetros del modelo, se utilizó el método de regresión por “pasos hacia atrás”, que consiste en comenzar con el modelo incluyendo todas las variables e interacciones y a continuación se van eliminando aquellos factores independientes cuya presencia no mejora la calidad del modelo según el criterio especificado ( $p<0,05$ ).

El modelo de regresión fue realizado con el programa informático Desing-Expert ® Version 8.0.5 (Stat-Ease, Inc.2011, Minneapolis, EE.UU.).

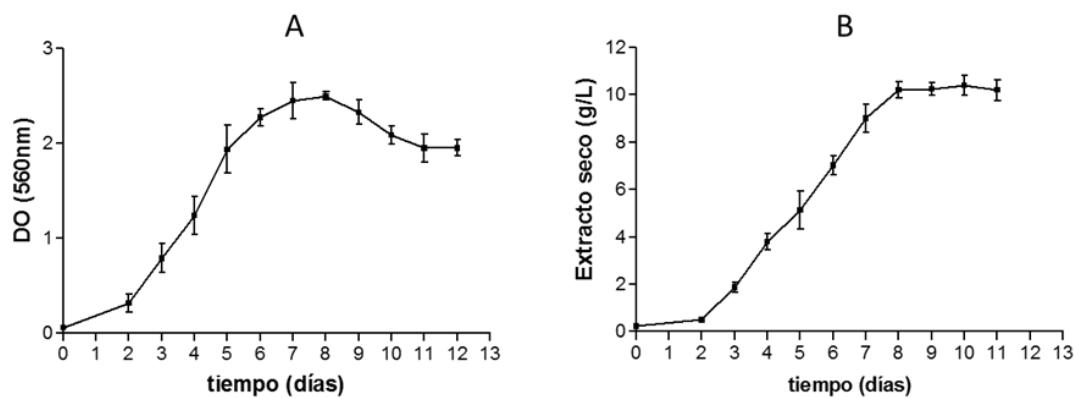
### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los cálculos de los valores medios, el error estándar de la media y los intervalos de confianza para el 95% se realizaron con el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Todos los resultados representan la media de al menos tres experimentos independientes.

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* Y EVOLUCIÓN DEL EXTRACTO SECO DEL CULTIVO A LO LARGO DEL TIEMPO

Con objeto de establecer las condiciones de cultivo para realizar los experimentos para evaluar la eficacia de las distintas tecnologías en la mejora de la extracción de componentes de interés de *A. platensis*, se elaboró la curva de crecimiento de este microorganismo. Debido a que esta cianobacteria no produce colonias definidas en medios de cultivos sólidos y a la dificultad de determinar la concentración celular mediante técnicas de recuento microscópico, la curva de crecimiento se elaboró midiendo la evolución de la densidad óptica (figura 11A) y del extracto seco (figura 11B).



**Figura 11.**- Evolución de la densidad óptica (DO) a 560 nm (A) y del extracto seco (B) a lo largo del tiempo de cultivo de *Arthrospira platensis* a 30 °C en 2 L de medio de cultivo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Las figuras 11A y 11B muestran que tras una fase de latencia que duró aproximadamente 2 días tanto la densidad óptica como el extracto seco aumentaron linealmente. El valor máximo de la densidad óptica se alcanzó entre los 7 y 8 días de incubación y a partir del 8 día este valor comenzó a disminuir probablemente provocado por la precipitación de parte de las células en el fondo de la probeta donde se cultivaban. Por lo que respecta al extracto seco, éste alcanzó el valor más elevado a los 8 días de incubación y dicho valor se mantuvo constante al prolongar el tiempo de incubación. La discrepancia entre la evolución de la densidad óptica y el extracto seco del cultivo tras alcanzarse el valor máximo podría ser debido a un incremento de los componentes que

*A. platensis* acumula en su citoplasma tras alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento.

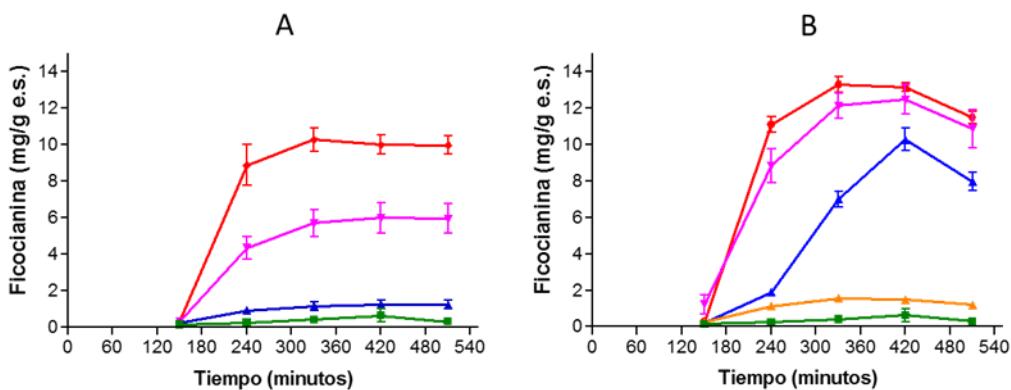
A la vista de los resultados obtenidos para evaluar el potencial de las distintas tecnologías en la mejora de la extracción se decidió trabajar con un cultivo con un tiempo de incubación entre 7 y 9 días.

## 4.2 EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA

### 4.2.1 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV

La figura 12 muestra las gráficas de extracción de ficocianina tras tratar el cultivo de *A. platensis* por PEAV de distintas intensidad (15, 20 y 25 kV/cm) y una duración de 75  $\mu$ s (25 pulsos de 3  $\mu$ s) y 150  $\mu$ s (50 pulsos de 3  $\mu$ s). Debido a que la ficocianina es una proteína hidrosoluble, la extracción se realizó en PBS no siendo necesario el uso de solventes orgánicos que se requieren para la extracción de otros componentes producidos por las microalgas como los carotenoides o las clorofilas. En la figura 12, se observa que para extraer la ficocianina fue necesario electroporar previamente las células de *A. platensis* mediante el tratamiento de PEAV. Se observa que no se detectó la presencia de ficocianina en el medio de extracción tras 8,5 horas en la muestra control sin tratar por PEAV. Independientemente del tiempo de tratamiento por PEAV, la ficocianina comenzó a extraerse a partir de los 150 minutos, siendo mayor la extracción al aumentar la intensidad del campo eléctrico aplicada. Cuando el tiempo de tratamiento aplicado fue de 75  $\mu$ s (Figura 12A) el tratamiento de 15 kV/cm fue insuficiente para electroporar las células de *A. platensis*; sin embargo, al aumentar el tiempo de tratamiento a 150  $\mu$ s las células tratadas a 15 kV/cm se electroporaron detectándose la presencia de ficocianina en el medio de extracción. Por lo tanto, el campo eléctrico crítico, que se define como la intensidad mínima de campo eléctrico que es necesario aplicar para electroporar las células, no sólo dependió del campo eléctrico sino también de la duración del tratamiento. Cuando el tiempo de tratamiento fue de 75  $\mu$ s fue necesario aplicar tratamientos superiores a los 15 kV/cm para electroporar *A. platensis* mientras que al duplicar la duración del tiempo de tratamiento (150  $\mu$ s) intensidades de campo eléctrico superiores a 10 kV/cm fueron suficientes para permeabilizar la microalga. Efectos similares han sido observados por otros autores en la electroporación

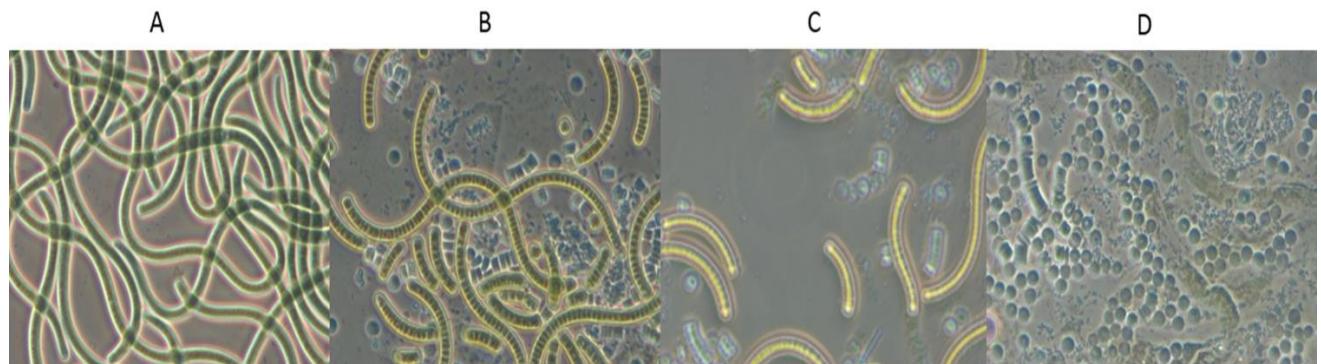
de bacterias y microalgas como *Chlorella vulgaris* (Aronson et al., 2005; García et al., 2007 y Luengo et al., 2014).



**Figura 12.**-Curvas de extracción de ficocianina tras tratar las células de *A. platensis* por PEAV de distinta intensidad de campo eléctrico ( $\blacklozenge$  25,  $\blacktriangledown$  20,  $\blacktriangle$  15 y  $\blacktriangleleft$  10 kV/cm y  $\blacksquare$  Control) y distinta duración: 75 $\mu$ s (A) y 150 $\mu$ s (B). Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Por otro lado, se observa que cuando la duración del tratamiento fue de 75  $\mu$ s el aumento de la intensidad del campo eléctrico desde 20 a 25 kV/cm duplicó el contenido de ficocianina en el medio de extracción mientras que al aumentar la duración del tratamiento de 75 a 150  $\mu$ s apenas se obtuvo mejora en la extracción de ficocianina. Finalmente, por lo que respecta a la máxima extracción de ficocianina obtenida a la intensidad del campo eléctrico más elevada (25 kV/cm) el aumento del tiempo de tratamiento de 75 a 150  $\mu$ s aumentó la cantidad de ficocianina extraída un 30 % aproximadamente.

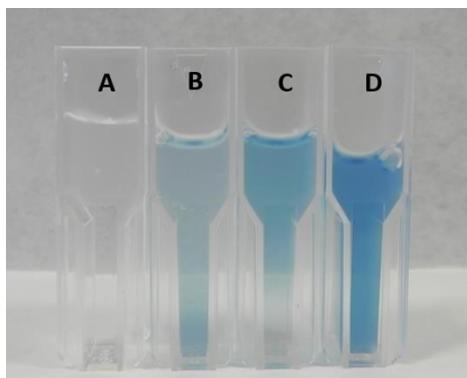
Por lo que respecta a la pureza de ficocianina del extracto, calculada según la ecuación 2, para las condiciones en las que la extracción fue máxima (25 kV/cm, 150  $\mu$ s) tras 400 minutos de extracción se obtuvo una pureza de 0,51.



**Figura 13.**-Imágenes al microscopio óptico (x40 aumentos) de las células control (A) y tratadas por PEAV de distinta intensidad: 10 kV/cm (B), 15 kV/cm (C) y 25 kV/cm (D)

La figura 13 muestra unas imágenes al microscopio óptico de las células de *A. platensis* tratadas por PEAV de distinta intensidad. Se observa que el tratamiento provocó la disgregación de los tricomas, siendo este efecto mayor cuanto más intenso fue el tratamiento. Sin embargo, incluso tras la aplicación del tratamiento más intenso (25 kV/cm) se mantuvo la estructura de las células que constituyen los tricomas.

Finalmente, la figura 14 muestra el aspecto del medio de extracción que contenía células de *A. platensis* previamente tratadas por PEAV de distintas intensidades.



**Figura 14.-**Aspecto del líquido de extracción que contenía células de *A. platensis* control (A) y tratadas a 15 (B), 20 (C) y 25 kV/cm (D) durante 75  $\mu$ s tras 400 minutos de extracción.

#### 4.2.1.2 Influencia de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento en la mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV

Una vez obtenidas las curvas de extracción, para cuantificar la influencia de la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento con objeto de optimizar las condiciones de tratamiento para conseguir la máxima extracción de ficocianina con un menor consumo energético, se realizó un diseño experimental de composición central con dos factores numéricos (intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento). Los factores numéricos variaron entre 15 y 25 kV/cm para la intensidad del campo eléctrico y entre 30 y 150  $\mu$ s para el tiempo de tratamiento. En función de las curvas de extracción que se muestran en la figura 15, se fijó como tiempo de extracción 400 minutos ya que a este tiempo se alcanzaba la máxima extracción de ficocianina independientemente de la intensidad de campo eléctrico aplicada.

**Tabla 4** Influencia de la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento en la cantidad de ficocianina extraída tras 400 minutos de extracción.

Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo de tratamiento(μs)	*Ficocianina extraída (mg/g e.s.)
15	30	0,3±0,04
15	90	0,9±0,3
15	150	6,2±0,2
20	30	3,5±0,03
20	90	5,1±0,9
20	150	11,4±1,7
25	30	4,5±0,05
25	90	9,8±1,2
25	150	12,7±0,8

\*Valor medio ± Intervalo de confianza al 95%

La tabla 4 muestra los valores de la cantidad de ficocianina extraída expresada en mg por gramo de extracto seco de cultivo de *A. platensis* en las condiciones experimentales correspondientes al diseño experimental de composición central. Como se observa, la cantidad de ficocianina extraída varió de 0,3 a 12,7 mg/g e.s. Es decir, que la cantidad de ficocianina extraída puede aumentar más de 40 veces si se logra una adecuada permeabilización de sus envolturas celulares mediante la aplicación del tratamiento de PEAV.

La cantidad total de ficocianina extraída del cultivo utilizando el molino de perlas de vidrio fue 24,42 mg/g e.s. Este contenido en ficocianina en nuestro cultivo es inferior al obtenido por otros autores. Por ejemplo, Moraes et al. (2010) determinaron una máxima concentración de 43,75 mg/g e.s. extrayendo la ficocianina con un tratamiento ultrasónico en presencia de perlas de vidrio durante 40 minutos. Sin embargo, estas técnicas utilizadas para determinar la cantidad de ficocianina total presente en los cultivos no pueden ser utilizadas a escala industrial.

En nuestro estudio, con las condiciones de tratamiento por PEAV más intensas utilizadas se consiguió extraer aproximadamente el 50% del contenido total de ficocianina que había en las células de *A. platensis*.

Los resultados que se muestran en la tabla 4 se ajustaron a un modelo cuadrático utilizando técnicas de regresión múltiple. La ecuación 6 muestra la ecuación obtenida que relaciona la variable dependiente (cantidad de ficocianina extraída) con las variables independientes (intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento) tras la eliminación de los términos de la ecuación cuadrática que no eran significativos mediante la técnica de regresión hacia atrás.

$$CP = -12,40524 + 0,64753 E + 0,06124 t$$

Ecuación 6

CP= cantidad de ficocianina extraída (mg/g e.s.)

E= intensidad del campo eléctrico (kV/cm)

T= tiempo de tratamiento ( $\mu$ s)

Como se observa, el procedimiento utilizado eliminó de la ecuación cuadrática inicial los términos elevados al cuadrado y el producto del campo eléctrico por el número de pulsos.

**Tabla 5**-Análisis ANOVA del modelo correspondiente a la ecuación 6

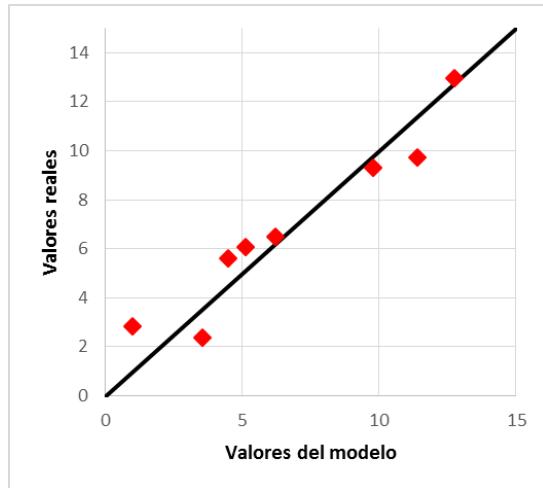
	Valor F	Valor p
Modelo	37,88	0,0004
E	33,11	0,0012
t	42,64	0,0006

R<sup>2</sup>= 0,93  
R<sup>2</sup>adj = 0,91  
ECM=1,1

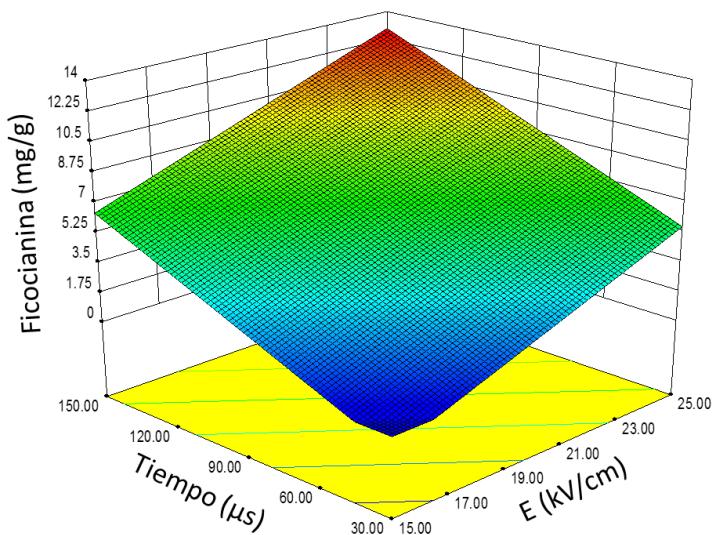
ECM: Error cuadrático medio

La tabla 5 muestra el análisis ANOVA para el modelo de regresión múltiple lineal obtenido. Tanto el valor R<sup>2</sup> como R<sup>2</sup>-ajustado, que corrige el valor R<sup>2</sup> en función del número de términos del modelo, eran superiores a 0,90, lo que indica que solo el 10% de la variación total observada al modificar los parámetros del modelo no es explicada por el modelo. El valor F del modelo (37,88) indica que el modelo es significativo (p<0,001). En función de los valores F de los parámetros del modelo, la influencia de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento fue del mismo orden. La ausencia del término de interacción entre E y tiempo de tratamiento indica que la influencia de uno no depende del valor de otro, sino que la influencia del E es la misma para distintos tiempos de tratamiento.

En la figura 15, donde se comparan los valores obtenidos experimentalmente con los estimados por el modelo desarrollado, se observa que el modelo obtenido describe adecuadamente la influencia de los parámetros investigados en la extracción de ficocianina de *A. platensis*.



**Figura 15.-** Relación entre los valores obtenidos experimentalmente y los estimados con el modelo desarrollado.

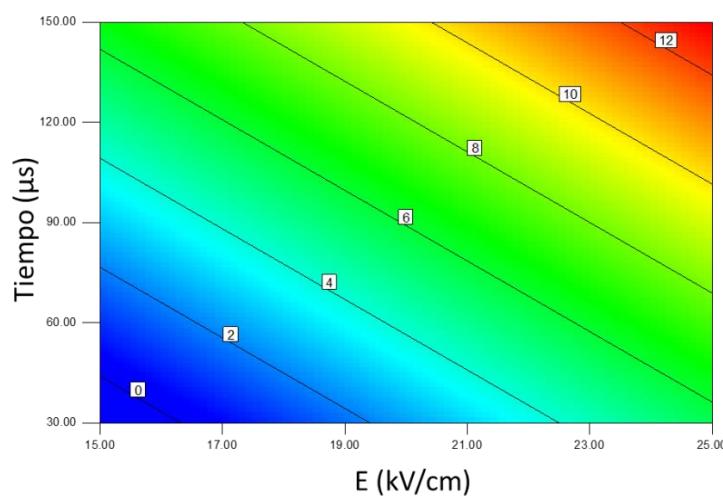


**Fig.16-** Gráfica de superficie de respuesta que relaciona la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento con la cantidad de ficocianina (mg/g) extraídos de *A. platensis*.

La figura 16 se corresponde con una gráfica de superficie de respuesta que muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento en la cantidad de ficocianina extraída. Esta figura ilustra las conclusiones obtenidas del análisis de los parámetros del modelo de regresión múltiple obtenido (ecuación 6). Se

observa que tanto al aumentar el campo eléctrico como el tiempo de tratamiento aumenta linealmente la cantidad de ficocianina extraída y que el incremento observado al aumentar uno de los dos factores es similar.

La figura 17 se corresponde con una gráfica de contorno en la que se muestran combinaciones de intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento para extraer una determinada cantidad de ficocianina. Se observa que en todos los casos al aumentar el campo eléctrico se reducía el tiempo de tratamiento para extraer una determinada cantidad de ficocianina. Por ejemplo, para extraer 8 mg/g e.s. el aumento de la intensidad del campo eléctrico de 18 a 25 kV/cm redujo el tiempo de tratamiento de 150 a 80  $\mu$ s. En términos energéticos, esta reducción del tiempo de tratamiento supone una disminución de la energía específica de los tratamientos de 141,9 J/ml a 116,8J/m. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio confirman las conclusiones obtenidas por otros autores que indican que aquellos tratamientos a mayor campo eléctrico y de menor duración son más eficientes desde el punto de vista energético que los tratamientos aplicados a campos eléctricos más bajos y de mayor duración. (Saldaña et al., 2013)



**Figura 17.-** Gráfica de contorno en la que se muestran combinaciones de intensidad de campo eléctrico con tiempo de tratamiento para extraer una determinada cantidad de ficocianina (indicada por los números que se muestran en los cuadros blancos)

#### 4.2.1.3 Influencia de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y de la temperatura en la mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de PEAV

Como se indica en la introducción, diferentes estudios han demostrado que la temperatura de aplicación de los PEAV es un parámetro que influye en la electroporación de las envolturas celulares observándose un efecto mayor al aumentar la temperatura. Con objeto de evaluar la influencia de este parámetro en la extracción de ficocianina de *A. platensis* y determinar las condiciones óptimas para conseguir la máxima extracción con el menor consumo energético, se realizó un diseño experimental de composición central con tres factores numéricos (intensidad de campo eléctrico, tiempo de tratamiento y temperatura). Los factores numéricos variaron entre 15 y 25 kV/cm para la intensidad del campo eléctrico, entre 60 y 150  $\mu$ s para el tiempo de tratamiento y entre 10 y 40°C para la temperatura. Al igual que en el experimento anterior, se fijó como tiempo de extracción tras la aplicación del tratamiento de PEAV 400 minutos.

Los valores de la cantidad de ficocianina extraída expresada en mg por gramo de extracto seco de cultivo de *A. platensis* en las condiciones experimentales correspondientes al diseño experimental de composición central se muestran en la tabla 6. Como se observa, la cantidad de ficocianina extraída varió de 0,65 a 15,15 mg/g e.s. La máxima cantidad de ficocianina se extrajo en las condiciones de tratamiento más intensas aplicadas (25 kV/cm, 150  $\mu$ s) cuando la temperatura del medio de tratamiento era 40°C. En estas condiciones, se extrajo aproximadamente un 20% más de ficocianina que en las mejores condiciones del experimento anterior que se correspondían con la misma intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento pero aplicando el tratamiento a 25°C. Por lo tanto, se extrajo el 70% de la cantidad de ficocianina total contenida en las células de *A. platensis*.

Los resultados que se muestran en la tabla 6 también se ajustaron a un modelo cuadrático obteniéndose la siguiente ecuación tras eliminar los términos de la ecuación cuadrática que no eran significativos mediante la técnica de regresión hacia atrás:

$$CP = -14,97912 - 0,32377 T + 0,80307 E + 0,058795 t + 0,096 T^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

donde CP se corresponde con la concentración de ficocianina extraída expresada en mg/g e.s., T se corresponde con la temperatura de tratamiento E, con la intensidad

del campo eléctrico aplicado en kV/cm y t se corresponde con el tiempo de tratamiento expresado en  $\mu$ s

**Tabla 6.** Influencia de la temperatura, la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, en la cantidad de ficocianina extraída

Temperatura (C°)	Campo eléctrico (kV/cm)	Tiempo ( $\mu$ s)	Ficocianina (mg/g)
40	25	150	15,15±2,12
40	25	60	11,80±0,87
40	20	105	11,78±0,87
40	15	150	8,07±3,66
40	15	60	1,57±1,1
25	25	105	9,85±0,87
25	20	150	8,63±0,86
25	20	105	4,01±0,75
25	20	60	1,70±0,75
25	15	105	1,63±1,25
10	25	150	12,81±1,73
10	25	60	4,46±0,87
10	20	105	4,99±0,35
10	15	60	0,65±0,43
10	15	150	1,98±0,88

\*Valor medio ± Intervalo de confianza al 95%

Como se deduce de la ecuación obtenida, el procedimiento de regresión múltiple eliminó de la ecuación cuadrática inicial los términos E y tiempo de tratamiento elevados al cuadrado y los productos de temperatura por tiempo, temperatura por campo y campo eléctrico por tiempo de tratamiento por no ser significativos.

La tabla 6 muestra el análisis ANOVA para el modelo de regresión múltiple lineal obtenido. Tanto el valor  $R^2$  como  $R^2$ -ajustado eran cercanos a 0,90, lo que indica que solo el 10% de la variación total observada al modificar los parámetros del modelo no es explicada por el modelo. El valor F del modelo (30,24) indica que el modelo es significativo ( $p<0,0001$ ). En función de los valores F de los parámetros del modelo, la intensidad del campo eléctrico fue el parámetro que tuvo más influencia siendo la influencia del tiempo de tratamiento y la temperatura del mismo orden. La ausencia de términos de interacción indica que la influencia de unos no depende del valor de otros.

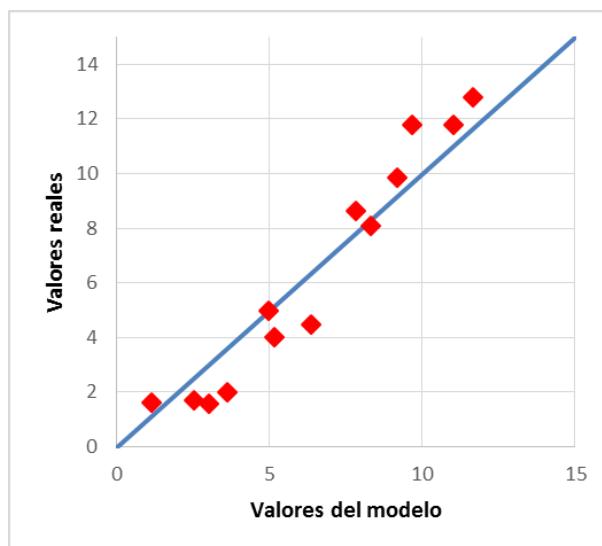
**Tabla 6.** Análisis ANOVA del modelo correspondiente a la ecuación 7.

	Valor F	Valor p
Modelo	30,24	<0,0001
T <sup>a</sup>	22,11	0,0008
E	64,57	<0,0001
t	28,03	0,0004
T <sup>a2</sup>	6,24	0,0316

R<sup>2</sup>:0,9236  
R<sup>2</sup>-adj:0,8931  
ECM: 1,33

ECM: Error cuadrático medio

En la figura 18, donde se comparan los valores obtenidos experimentalmente con los estimados por el modelo desarrollado, se observa que el modelo obtenido describe adecuadamente la influencia de los parámetros investigados en la extracción de ficocianina de *A. platensis*.

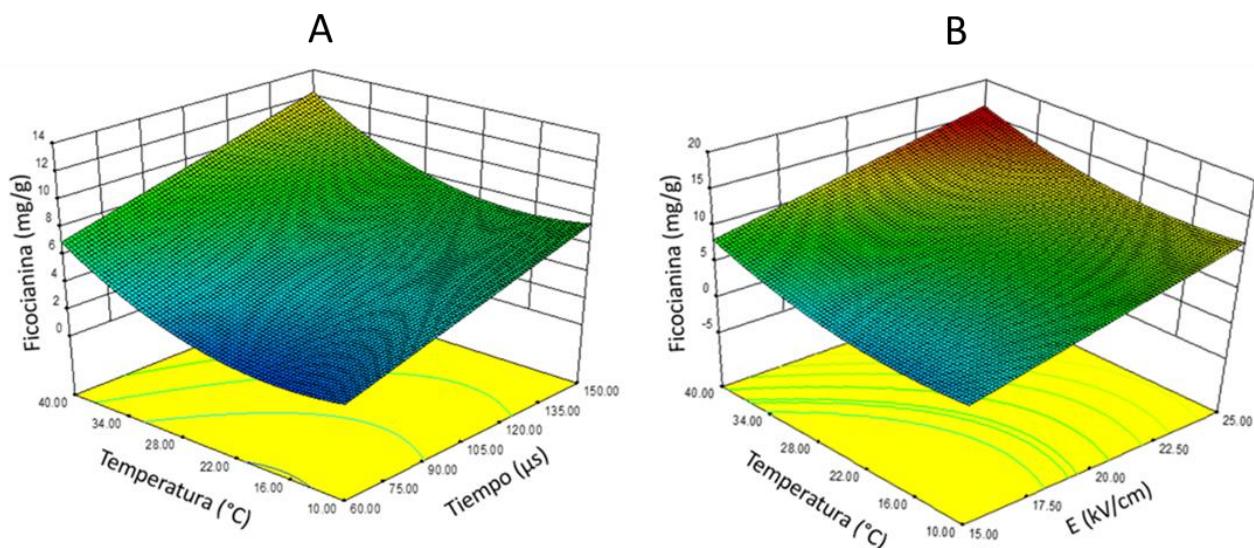


**Figura 18.-** Relación entre los valores obtenidos experimentalmente y los estimados con el modelo desarrollado.

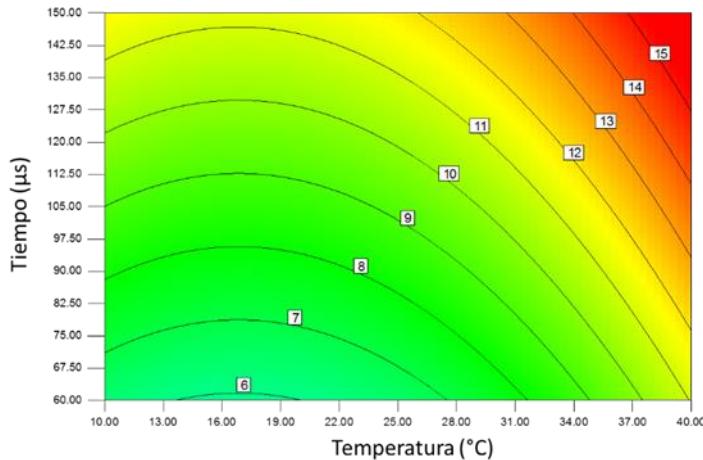
Con objeto de ilustrar la influencia de la temperatura de aplicación de los PEAV de distinta intensidad de campo eléctrico y duración, en la figura 19 se muestran dos gráficas de superficie de respuesta. La figura 19A muestra la influencia de la temperatura y el tiempo de tratamiento para una intensidad de campo eléctrico constante

de 20 kV/cm y la figura 19B muestra la influencia de la temperatura y la intensidad del campo eléctrico para un tiempo de tratamiento constante de 105  $\mu$ s. Se observa que al aumentar el tiempo de tratamiento (Fig.19A) o la intensidad del campo eléctrico (Fig.19B) la cantidad de ficocianina extraída aumenta linealmente. También se observa en ambas gráficas que entre 10 y 20°C la temperatura no influyó en la cantidad de ficocianina extraída, mientras que a partir de 20°C el aumento de la temperatura de tratamiento provocó un incremento en la cantidad de ficocianina extraída.

La influencia de la temperatura también se ilustra en la gráfica de contorno que se muestra en la figura 20. En esta gráfica, se representa las combinaciones de temperatura y tiempo de tratamiento para extraer una cantidad determinada de ficocianina a la intensidad de campo eléctrico más elevada (25 kV/cm). Por ejemplo, el aumento de la temperatura de tratamiento de 26 a 40°C redujo el tiempo de tratamiento para extraer 12 mg/g es de ficocianina de 150 a 75  $\mu$ s. Mientras que la energía específica del tratamiento de 150  $\mu$ s era 224,64 J/ml, la del tratamiento de 75  $\mu$ s era de 121,68 J/ml. Por lo tanto, el aumento de la temperatura de 26 a 40°C permitió reducir la energía específica del tratamiento un 45% sin afectarse el rendimiento de la extracción.



**Figura 19.-** Gráficas de superficie de respuesta que relacionan el tiempo de tratamiento (A) o la intensidad del campo eléctrico (B) y la temperatura de tratamiento con la cantidad de ficocianina (mg/g) extraída de *A. platensis*.



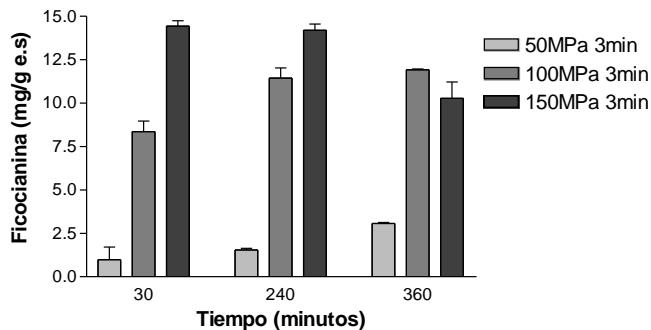
**Figura 20.-** Gráfica de contorno que muestra las combinaciones de temperatura y tiempo de tratamiento para extraer determinadas cantidades de ficocianina ((indicada por los números que se muestran en los cuadros blancos).

#### 4.2.2 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH)

Se ha descrito en la literatura que el tratamiento de APH provoca, entre otros efectos, la permeabilización de la membrana citoplasmática de los microorganismos (Pagán et Mackey, 2000). Por ello, se decidió investigar si estos tratamientos podrían ser una alternativa a los tratamientos tradicionales para mejorar la extracción de ficocianina de *A. platensis*.

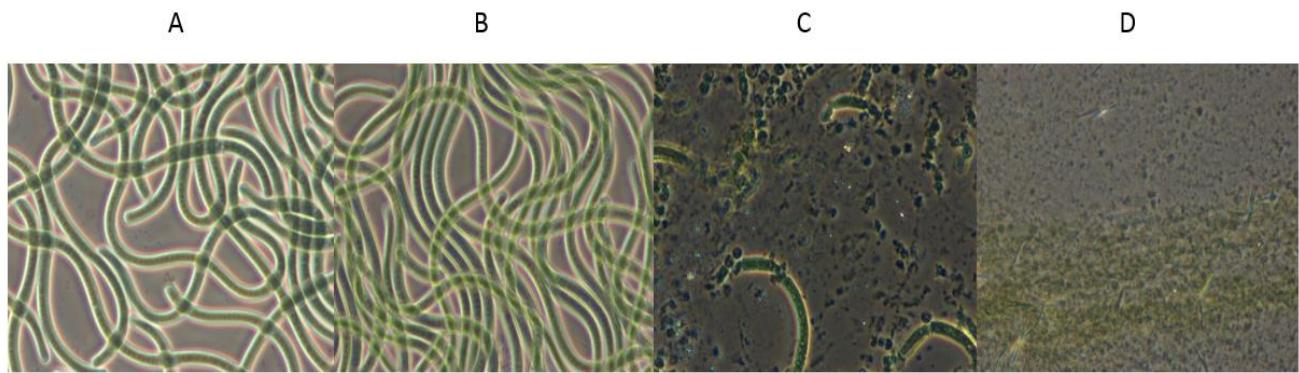
La figura 21 muestra la cantidad de ficocianina extraída a distintos tiempos de extracción (30, 240 y 360 min) tras la aplicación de tres tratamientos de altas presiones de distinta intensidad (50, 100 y 150 MPa) y una duración de 3 minutos. Se observa que, cuando se aplicó la intensidad de tratamiento más baja, la cantidad de ficocianina extraída aumentó al hacerlo el tiempo de tratamiento. Sin embargo, cuando el tratamiento aplicado fue de 100 MPa no se observó un incremento significativo en la cantidad de ficocianina extraída al aumentar el tiempo de extracción de 240 a 360 minutos. Finalmente, en el caso del tratamiento más intenso aplicado, el tiempo de extracción más bajo fue suficiente para extraer la máxima cantidad de ficocianina observándose un descenso en la concentración con el incremento del tiempo de extracción e incluso la disminución de la cantidad de ficocianina extraída. Según estos resultados, a diferencia del tratamiento de PEAV, 30 minutos de extracción serían suficientes para conseguir la máxima extracción de ficocianina. Utilizando este tiempo

de tratamiento, el incremento de la intensidad de tratamiento de 50 a 150 MPa aumentó la cantidad total de ficocianina extraída 15 veces aproximadamente. Por lo que respecta a la máxima cantidad de ficocianina extraída se observa que ésta (14,9 mg/g e.s.) es similar a la que se obtuvo utilizando como tratamiento previo los PEAV:



**Figura 21.-** Extracción de ficocianina a 30, 240 y 360 minutos tras tratamientos de altas presiones de 3 minutos entre 50 y 150 MPa.

La figura 22 muestra las imágenes al microscopio óptico de las células de *A. platensis* tratadas a 50, 100 y 150 MPa durante 3 minutos. Se observa que tras el tratamiento más bajo aplicado se mantenía la estructura de los trisomas mientras que a 150 MPa se observa la completa desintegración no solo de los trisomas sino también de las células que los constituyen. A la vista de esta observación, cabría esperar que la cantidad total de ficocianina extraída tras el tratamiento de 150 MPa fuera similar a la máxima que se obtenía tratando previamente las células con el molino de bolas. Sin embargo, la cantidad extraída tras el tratamiento de altas presiones fue sólo del 70% respecto a la que se obtuvo con el molino de bolas. Estos resultados parecen indicar que los tratamientos de APH más intensos podrían provocar algún tipo de degradación de la ficocianina. Es conocido que uno de los efectos de estos tratamientos es la desnaturización proteica. Para comprobar esta hipótesis, se presurizó (150 MPa, 3 minutos) una solución de ficocianina por un lado y la misma solución que contenía en suspensión células de *A. platensis*. Mientras que cuando se presurizó la solución de ficocianina no se detectó tras el tratamiento ninguna modificación de la densidad óptica de la solución (615 y 652 nm), al presurizarla en presencia de las células de *A. platensis* se observó un descenso significativo de dicha densidad óptica. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que durante la presurización de las células se produce algún tipo de degradación de la ficocianina disminuyendo el rendimiento de la extracción.

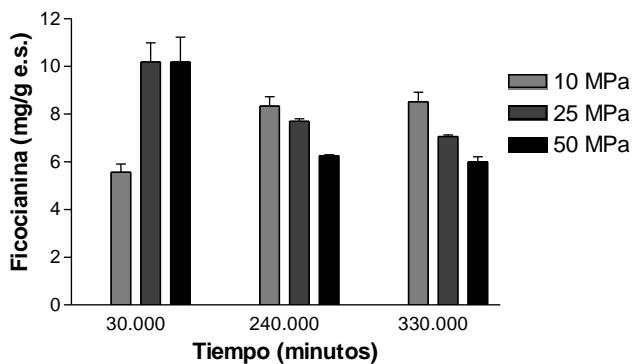


**Figura 22.-** Imagen al microscopio (x40 aumentos) de *A. platensis* control (A) y tratada a 50 (B), 100 (C) y 150 (D) MPa durante 3minutos.

Por lo que respecta a la pureza del extracto, se observó que la obtenida en las condiciones donde la extracción era máxima fue de 0,14. Esta pureza es mucho menor a la que se obtuvo cuando previamente se aplicó un tratamiento de PEAV. Esta menor pureza del extracto se puede achacar al efecto del tratamiento sobre las células de *A. platensis*. Mientras que en el caso de los PEAV se mantenía la estructura celular incluso tras aplicar el tratamiento más intenso, en el caso de las APH se producía una completa degradación de las células con la consiguiente liberación de otro tipo de proteínas distintas de la ficocianina responsables de que la pureza fuera menor. Esta menor pureza podría dificultar las siguientes etapas de purificación de la proteína.

#### **4.2.3 Mejora en la extracción de ficocianina mediante la aplicación de un tratamiento de homogeneización por alta presión (HAP)**

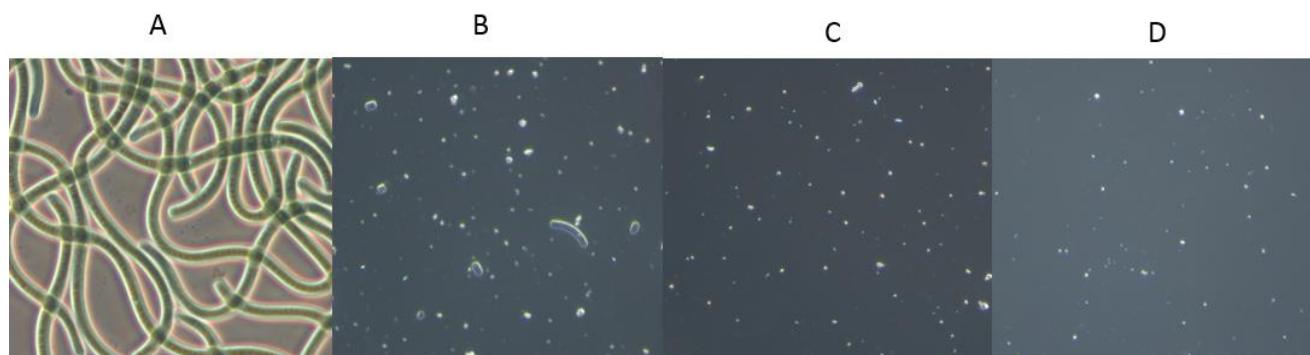
El tratamiento de HPA se caracteriza porque provoca la destrucción mecánica de las células. Frente a otras técnicas que se utilizan para la destrucción mecánica de las células como los molinos de bolas tiene la ventaja de que el tratamiento se puede aplicar en flujo continuo. La figura 23 muestra los resultados obtenidos en la extracción de ficocianina para distintos tiempos de extracción (30, 240 y 330 min) tras tratar las células de *A. platensis* con tres intensidades de presión (10, 25 y 50 MPa).



**Figura 23.**--Extracción de ficocianina a 30, 240 y 360 minutos tras tratamientos de homogenización por alta presión entre 10 y 50 MPa

Al igual que se observó en el caso del tratamiento con APH, la máxima cantidad de ficocianina extraída tras los tratamientos se observó a 30 minutos de extracción. En este caso, para los tratamientos a 25 y 50 MPa la cantidad de ficocianina extraída disminuyó al incrementar el tiempo de extracción. A pesar de que el tratamiento de HAP provoca la completa destrucción de las células, como se confirma en las fotografías que se muestran en la figura 24, la cantidad total de ficocianina extraída fue menor que la que se consiguió extraer cuando la suspensión de *A. platensis* se trató previamente con PEAV o APH.

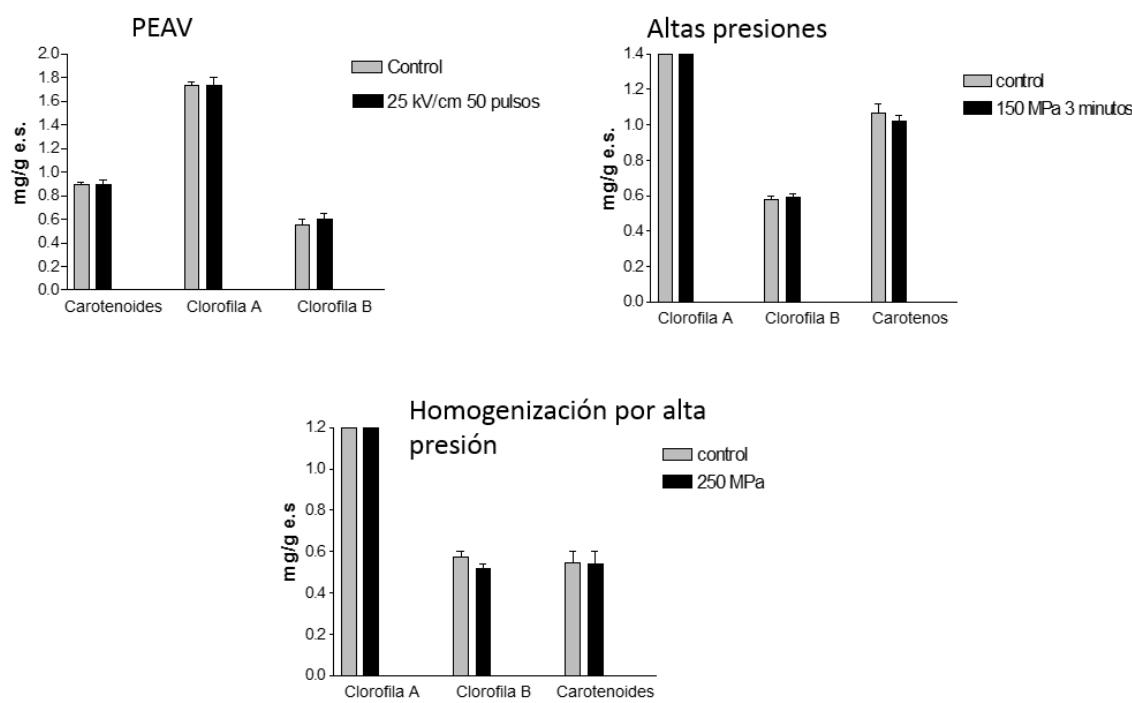
Estos resultados parecen indicar que por algún mecanismo desconocido y que necesitaría ser investigado, el tratamiento por HAP al igual que el tratamiento por APH provoca cierta degradación en la ficocianina. Además la pureza del extracto extraído resultó ser 0,21.



**Figura 24.**- Imagen al microscopio (x40 aumentos) de *A. platensis* control (A) y tratada por homogeneización a 10 (B), 25 (C) y 50 (D) MPa

#### 4.3 EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES, CLOROFILA A Y B

Además del estudio en el que se compararon distintas tecnologías novedosas de procesado en la mejora de la extracción de ficocianina de *A. platensis*, también se exploró el potencial de estas tecnologías para mejorar la extracción de otros componentes de interés producidos por esta cianobacteria como son los carotenoides y la clorofila a y b. En este caso, debido a que estos compuestos no son solubles en agua la extracción se realizó utilizando etanol como solvente.



**Figura 25.-**Cantidad de Clorofilas A y B y Carotenoides extraídos expresados en mg/g e.s., transcurridos 15 minutos de extracción en etanol tras tratamientos de PEAV, APH y HAP.

La figura 25 compara respectivamente la extracción de estos tres componentes en una muestra control y tras aplicar un tratamiento de PEAV, APH y HAP. Aunque se investigaron varias condiciones de tratamiento, en la figura se muestran los resultados obtenidos al aplicar las condiciones de tratamiento más intensas tras 15 minutos de extracción. En todos los casos, se observó que la extracción de estos tres componentes en etanol en la muestra control fue muy eficaz. A los 15 minutos de extracción ya se alcanzó la máxima concentración de los tres componentes en el medio de extracción. Por lo tanto, el tratamiento previo por ninguna de las tres tecnologías no mejoró ni la cantidad total extraída ni aceleró significativamente el tiempo necesario para extraer los

compuestos. Estos resultados obtenidos con la cianobacteria *A. platensis* difieren de los obtenidos por otros autores en la extracción de estos compuestos en la microalga *Chlorella vulgaris* (Luengo et al., 2014, Goetel et al., 2013). En estas investigaciones, se observó que el tratamiento de esta microalga por PEAV previo a la posterior extracción de carotenoides, clorofila A y B incrementaba significativamente la cantidad de estos compuestos en el medio de extracción. Las diferencias entre las envolturas celulares de *A. platensis* y *C. vulgaris* podrían explicar estas discrepancias.

## 5. CONCLUSIONES

1º Tras 8,5 horas de extracción en PBS no se detectó la presencia de ficocianina en el medio de extracción que contenía células de *A. platensis* por lo que la extracción de este compuesto requiere aplicar un tratamiento previo.

2º El tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) provocó la separación de las células que forman los tricomas pero no afectó a la estructura celular de *A. platensis*. La electroporación de las células de *A. platensis* mediante PEAV previamente a la extracción de ficocianina permitió extraer el 50 % de la cantidad de este compuesto presente en las células de esta microalga cuando el tratamiento se aplicó a 25°C. Al aumentar la temperatura hasta los 40°C se logró extraer hasta el 70%. La cantidad de ficocianina extraída aumentó linealmente con la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento. Por otra parte, mientras que el aumento de la temperatura de aplicación del tratamiento de PEAV de 25 a 40°C aumentó la cantidad de ficocianina extraída, este incremento no se observó al aumentar la temperatura de 10 a 25°C.

3º Las observaciones microscópicas mostraron que los tratamientos por altas presiones hidrostáticas (APH) y homogeneización por alta presión (HAP) provocaron una completa destrucción de las células de *A. platensis*. Sin embargo, la cantidad total de ficocianina extraída fue menor que la contenida en las células por lo parece que estos tratamientos provocan la desnaturalización de parte de la ficocianina.

4º El extracto de ficocianina obtenido tras la aplicación de un tratamiento de PEAV previo a la extracción resultó más puro que el obtenido tras la aplicación de un tratamiento de APH o de HAP.

5º La aplicación de un tratamiento previo de PEAV, APH o HAP no mejoró la extracción de clorofilas A y B y carotenoides utilizando etanol como solvente.

## 6.-BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, S. y Ogawa, T.** (1977) Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *Journal of General Microbiology*. 102:179-182.
- Barbosa-Cánovas, GV., Fernández-Molina, JJ. y Swanson, BG.** (2001). Pulsed electric fields: A novel technology for food preservation. *Agro Food Industry Hi-Tech* 12:9-14.
- BCC** (2011) The global market for carotenoids. En M Wellesley (Eds)
- Becker, EW.** (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25:207–210
- Bennett, A. y Bogorad, L.** (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The journal of cell biology*. 58:419-435.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., Duma, E.** (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids* 23:640–654.
- Christaki E., Bonos E. y Giannenas I.** (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:5-11.
- Del Campo, JA., García-González, M. y Guerrero, MG.** (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production:current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 1163-1174.
- Donsì, F., Ferrari, G., Lenza, E. y Maresca, P.** (2009). Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: operating parameters and scale of operation. *Chemical Engineering Science*, 64: 520-532.
- Durand-Chastel, H.** (1980). *Spirulina platensis (Arthrosphaera)* Physiology Cell-Biology and Biotechnology. Ed Avigad, Vonshak, USA.
- Fernandez-Sevilla, JM., Acién Fernandez, FG. y Molina Grima, E.** (2012) Obtaining lutein-rich extract from microalgal biomass at preparative scale. *Methods in Molecular Biology* 892:307-314.
- Fernández-Sevilla, JM., Acién, FG., Molina Grima, E.** (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology Biotechnology* 86:27–40
- Frank, HA. y Codgell, RJ.** (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 63:257-264.
- Gantar, M. y Svircev, Z.** (2008) Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *Journal of phycology*. 44: 260–268
- Glazer, AN.** (1994). Phycobiliproteins- a Family of Valuable, Widely Used Fluorophores. *Journal of Applied Phycology* 6:105-112.

- Glazer, AN. y Stryer, L.** (1990). Phycobiliprotein Avidin and Phycobiliprotein Biotin Conjugates. *Methods in Enzymology* 184:188-194.
- Gouveia, L., Nobre, BP., Marcelo, FM. y Mrejen, S.** (2007). Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*. 101:717-723.
- Guedes, AC., Amaro, HM. y Malcatet, FX.** (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs* 9:625-644
- Guiry, MD. y Guiry, GM.** (2012). AlgaBase, Ed National University of Ireland, Galway.
- Huang, HW., Hsu, CP., Yang, BB., Wang, CY.** (2013) Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in food science and technology*. 33:54-62.
- Janssen, M.** (2011). Microalgae Biotechnology. Ed BPE 32803, Wageningen University, Países Bajos.
- Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavcic, E. y Tarek, M.** (2012). Cell membrane electroporation –Part 1: The Phenomenon. *Ieee Electrical Insulation Magazine* 28:14-23.
- Kronick, MN.** (1986). The Use of Phycobiliproteins as Fluorescent Labels in immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 92:1-13.
- Lichtenthaler, HK.** (1987). Chlorophyll Fluorescence Signatures of Leaves during the Autumnal Chlorophyll Breakdown. *Journal of Plant Physiology*. 131:101–110.
- Liu, LN., Chen, X. y Zhang, XI.** (2005) One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*. 116:91–100.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I. y Raso, J.** (2014) Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. *Membrane Biology* 247:114-122.
- Mañas, P. y Mackey, B.** (2004) Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential- and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:1545-1554.
- Mañas, P. y Mackey, B.** (2008) The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International journal of food microbiology*. 137:214-220.
- Maresca, P., Donsìb, F. y Ferrari, G.** (2011) Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *Journal of Food Engineering*. 104:364–372.
- Metting, FB.** (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17:477-489.

**Middleberg, APJ.** (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology advances*. 13:491-551.

**Milledge, JJ.** (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 10: 31-41.

**Miyashita, K.** (2009). Function of Marine Carotenoids, En: T Yoshikawa (Eds) Food Factors for Health Promotion, Karger medical and Scientific Publishers, Basilea, 136-146.

**Molina Grima, E., Belarbia, E.H., Acién Fernández, F.G. y Robles Medina A.** (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*. 20:491-515

**Nobel, PS.** (1999). Physiochemical and environmental plant physiology 2<sup>a</sup>ed. Ed Academic Press, Londres.

**Pagán, R. y Mackey, B.** (2000) Relationship between Membrane Damage and Cell Death in Pressure-Treated Escherichia coli Cells: Differences between Exponential- and Stationary-Phase Cells and Variation among Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2829-2834.

**Pelizer, LH., Danesi, EDG. y de O Rangel C.** (2002). Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of food engineering*. 56:371-375.

**Perrier-Cornet, JM., Hayert, M., Saurat, E., Milesse, C. y Gervais, P.** (1999) Interaction Between Osmotic and Hydrostatic Pressure in Yeast Inactivation. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology* 1999:27-30.

**Plaza, M., Herrero, M. y Cifuentes, A.** (2009). Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 57: 7159-7170.

**Puértolas, E., Luengo, E., Álvarez, I. y Raso, J.** (2012) Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications. *Annual Review of Food Science and Technology* 3: 263-282

**Pulz, O. y Gross, W.** (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:635-648.

**Pulz, O. y Gross, W.** (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:635-648.

**Raso J., Álvarez, I., Condón, S. y Sala Trepaut, FJ.** (2000) Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 1:21-29.

**Ribeiro, BD., Barreto, DW. y Coelho M.** (2011). Technological Aspects of beta-Carotene Production. *Food and Bioprocess Technology* 4:693-701.

**Richmond, A. y Vonshak, A.** (1998). Mass production of the blue-green alga *Spirulina*. An overview. *Biomass*. 15:233-247.

- Saldaña, G.**, (2011) Criterios de procesado para la pasteurización de alimentos por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Saldaña, G., Álvarez, I., Condón, S., y Raso, J.** (2013) Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:1415-1426
- San Martína, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G.**(2002) Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:627-645.
- Sarada, R., Pillai, M.G. y Ravishankar, A.** (1999). Phycocyanin from *Spirulina sp.* Influence of processing of biomass on phycocyanin yield. *Proc. Biochem.* 24:795-801.
- Sassano, C.E.N.** (1999). Influencia de la urea en el crecimiento y la producción de ácido linolénico de biomasa de *Spirulina platensis*. M.Sc. Thesis, University of São Paulo, S. Paulo, Brasil. 144 p.
- Schlösser, UG.** (1994) SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains UG Schlösser Botanica Acta 107:113-186.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A. y Taji, S.** (1991) Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology.* 12:207-215
- Skjånes, K., Rebours, C. y Lindblad, P.** (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology.* 33:172-215.
- Smelt, J., Rijke, AGF. y Hayhurst, A.**(1994) Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research: An International Journal* 12:199-203.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C. y Duran, E.** (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 101:87-96
- Stolz, J.F.** (1991). The cyanobacteria. Structure of Phototrophic Prokaryotes. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Tribst, AA. y Cristianini, M.** (2012). High pressure homogenization of a fungi  $\alpha$ -amylase. *Innovative Food Science & Emerging technologies.* 13:107-111.
- Tsong, TY.** (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophysical journal.* 60(2): 297-306.
- Vachon, JF., Kheadr, E., Giasson, J. y Paquin, P.** (2002) Fliss Inactivation of Foodborne Pathogens in Milk Using Dynamic High Pressure. *Journal of Food Protection* 2:345-352
- Weaver, J. y Chizmadzhev, Y.**(1996) Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 41:135-160

**Yuan, JP., Peng, J., Yin, K. y Wang, JH.** (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research* 55. 150-165.

**Zimmermann, U., Pilwat, G. y Riemann, F.** (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Membrane Transport in Plants*. 74:146-153