

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos
Informe final de proyectos de investigación y extensión

DOCUMENTO I

Alimentómica de microalgas: determinación de metabolitos primarios y secundarios en biomasas microalgales para la elaboración de alimentos funcionales.

Julio 2024

Contenido

1.	Tabla de contenido	2
2.	Código y Título del proyecto	3
3.	Autores y direcciones	3
4.	Resumen	4
5.	Palabras clave	4
6.	Introducción	4
7.	Marco Teórico	5
8.	Metodología	7
	OE1: Potenciar la producción de metabolitos en biomasa de microalgas como fuente de componentes funcionales alimenticios	7
	OE2: Cuantificar en las biomasas producidas el perfil nutricional y capacidad antioxidante.....	8
	OE3: Establecer un prototipo de alimento funcional conforme al RTCA y Códex alimenticio.....	10
9.	Resultados.....	15
	OE1: Potenciar la producción de metabolitos en biomasa de microalgas como fuente de componentes funcionales alimenticios.....	15
	OE2: Cuantificar en las biomasas producidas el perfil nutricional y capacidad antioxidante.....	28
	OE3: Establecer un prototipo de alimento funcional conforme al RTCA y Códex alimenticio.....	32
10.	Discusión y conclusiones	52
11.	Recomendaciones	53
12.	Agradecimientos.....	53
13.	Referencias	53
14.	Apéndices	57

Código y Título del proyecto

Código: 1510135

Nombre del proyecto o actividad: Alimentómica de microalgas: determinación de metabolitos primarios y secundarios en biomasas microalgales para la elaboración de alimentos funcionales.

Autores y direcciones

Departamento Académico responsable: Escuela de Biología

Investigador	Escuela	Correo
Ing. Francinie Murillo Vega (Coordinadora)	Biología	frmurillo@itcr.ac.cr
PhD. Fabián Villalta Romero	Biología	fvillalta@itcr.ac.cr
M.Eng. Mauricio Chicas Romero	Biología	mchicas@itcr.ac.cr
PhD Fabio David Araya Carvajal	Química	fdaraya@itcr.ac.cr
PhD Nancy Ariza Castro	Química	nariza@itcr.ac.cr
PhD Andrés Sánchez Kopper	Química	ansanchez@itcr.ac.cr
Máster Raquel Lafuente Chrysosopoulos	Producción	rlafuente@itcr.ac.cr

Resumen

El estudio evaluó el impacto de la incorporación de minerales en el medio de cultivo con el objetivo de producir microalgas enriquecidas con oligoelementos como suplementos alimenticios. Se desarrolló el protocolo para los medios de cultivo para las especies *Arthrospira maxima*, *Scenedesmus dimorphus*, *Isochrysis galbana* y *Chlorella vulgaris*. Se realizaron pruebas de toxicidad y DLS para diseñar medios de cultivo con sales comerciales de selenio, zinc, cobalto y manganeso. La cinética de crecimiento de las microalgas fue evaluada en pequeña escala, seleccionando y escalando las microalgas *I. galbana* y *C. vulgaris*, especies con mayor potencial de bioacumulación de oligoelementos para continuar el estudio. La composición elemental de las células microalgales se obtuvo mediante microscopía electrónica de barrido con microanálisis por separador de energías (SEM/EDS). Las pruebas indicaron absorción sinérgica positiva de selenio y manganeso, con toxicidad observada en concentraciones superiores a 100 ppm. EDS mostró mejor metabolización de metales en *I. galbana* y *C. vulgaris*, con una suplementación que afectó las concentraciones de proteínas, carbohidratos, clorofilas y carotenoides. El tratamiento con cobalto incrementó clorofila c, clorofilas totales y carotenoides en *I. galbana*, mientras que en *C. vulgaris*, el selenio aumentó la concentración general de estos metabolitos intracelulares. Se realizaron tratamientos de desodorización de la biomasa para su incorporación en una barra de cereal, utilizando como modelo la microalga *A. maxima*. La biomasa microalgal enriquecida con Mn y Se mostró potencial como suplemento para alimentos acuícolas y avícolas, además de aceptación general de la microalga tras los tratamientos de desodorización para su aplicación en alimentos humanos, en barras de cereal y cumpliendo con las expectativas y regulaciones.

Palabras clave

Microalgas, oligoelementos, selenio, manganeso, zinc, cobalto, alimento.

Introducción

La utilización de microalgas como fuente alimentaria, destacando principalmente su aporte en proteínas y lípidos, ha sido objeto de estudio tanto en la nutrición humana como en la de peces, aves, cerdos y bovinos [1]–[3]. No obstante, los elevados costos asociados con las tecnologías desarrolladas en diversas regiones han restringido su accesibilidad para el consumidor final, a pesar de los numerosos beneficios demostrados. Estos costos elevados se deben, en gran medida, al uso de medios de cultivo sintéticos, la necesidad de fotobioreactores, y la implementación de sistemas de calefacción e iluminación para compensar la falta de condiciones óptimas durante todo el año [4].

En respuesta a esta problemática, el grupo de investigación de Microalgas ha orientado sus esfuerzos hacia las necesidades específicas del país, con resultados que han permitido adaptar el cultivo de microalgas nativas costarricenses a medios orgánicos, utilizando aguas agroindustriales limpias y ciertos lixiviados. Esto ha resultado en una reducción de hasta el 70% en los costos de producción de biomasa microalgal, que puede ser utilizada como sustituto de algunas materias primas en alimentos [5]. Este avance ha captado el interés del sector agroindustrial, iniciándose un estudio preliminar de viabilidad con la empresa Carnes Zamora para incorporar estas prácticas en sus procesos productivos.

Además de su contenido en proteínas y lípidos, las microalgas ofrecen otros metabolitos con potenciales beneficios para la salud, tanto en animales como en humanos, lo que podría posicionarlas como un alimento funcional de alto valor [6]–[8]. La necesidad de desarrollar alternativas alimentarias más eficientes y de menor costo, como antioxidantes, pigmentos y antiinflamatorios a partir de biomasa

microalgal y la elaboración de prototipos de alimentos funcionales, es imperativa. Por ello, a través de la alimentómica, se valoró el impacto de la incorporación de minerales en el medio de cultivo sobre los perfiles de metabolitos en estas biomásas, contribuyendo así a la mejora de la harina resultante y por consiguiente generar protocolos de cultivos efectivos para producir microalgas enriquecidas con oligoelementos como suplementos alimenticios que mejoren la calidad de vida de los consumidores a nivel nacional e internacional.

La importancia de la investigación en alimentos continúa creciendo ante las altas tasas de enfermedades crónicas [9], la necesidad de reducir el uso de aditivos como antibióticos en la alimentación animal [10], la incorporación de sustancias que fortalezcan el sistema inmunológico [11] y la provisión de fuentes orgánicas de minerales para una mejor absorción de nutrientes [12], [13]. Además, los sectores avícola y acuícola buscan innovaciones tecnológicas que les permitan ser productivos y competitivos frente a desafíos externos, como sequías, escasez de forrajes o incrementos en los costos de las materias primas.

Continuando con la labor del grupo de investigación transdisciplinario, que integró las competencias necesarias para abordar estos desafíos, la presente investigación se enfocó en el desarrollo de conocimientos y productos a partir de microalgas con potencial innovador para el sector productivo nacional y la salud de los consumidores [14].

Utilizando el potencial biotecnológico de las microalgas y estrategias innovadoras en cultivos, como el aprovechamiento de residuos agroindustriales y su suplementación con micro minerales, esta investigación se alineó con prioridades clave de la FAO para reducir las formas de malnutrición, un desafío también presente en el sector avícola [15]. Se propuso escalar las microalgas *Arthrospira maxima*, *Isochrysis galbana* en medios alternativos suplementados con micronutrientes como selenio, magnesio y zinc, para caracterizar la toxicidad en la microalga, la productividad de la biomasa y la bioadsorción de dichos minerales en las biomásas como en los productos desarrollados a partir de ellas.

Marco Teórico

El término "foodomics" o su traducción al español como "Alimentómica" se refiere a un campo de estudio emergente que se centra en la aplicación de tecnologías ómicas, como la proteómica y metabolómica, al análisis de los alimentos y su relación con la salud. Este enfoque integral permite estudiar cómo los componentes de los alimentos interactúan con los sistemas biológicos a nivel molecular. Entre los objetivos principales de la Foodomics o alimentómica se señalan 1) el descubrimiento de biomarcadores moleculares en los alimentos que puedan indicar efectos sobre la salud o el estado nutricional, 2) Estudiar cómo la genética individual influye en la respuesta a los componentes dietéticos y cómo los alimentos pueden afectar la expresión genética. 3) Mejorar la calidad y seguridad de los alimentos y 4) Formular alimentos que puedan beneficiar específicamente la salud en base a conocimientos científicos detallados. A nivel práctico este campo contribuye en la seguridad alimentaria al detectar y describir detalladamente agentes contaminantes o alérgenos, en el desarrollo de productos alimenticios que contengan componentes bioactivos beneficiosos para la salud y en la creación de dietas personalizadas basadas en la información genética y metabólica de los individuos.

El uso de tecnologías integradas para mejorar la nutrición ha contribuido a suplir un alto porcentaje de la demanda creciente de alimentos. A pesar de ello, 462 millones de personas tienen insuficiencia ponderal y 1900 millones de adultos tienen sobrepeso o son obesos. Estas situaciones conllevan a una malnutrición la cual se entienden por las carencias, los excesos o los desequilibrios de la ingesta de energía y/o nutrientes. A su vez este término se puede dividir en dos grupos; uno es la desnutrición que comprende el retraso del crecimiento, la emaciación la insuficiencia ponderal y las carencias o insuficiencias de micronutrientes (falta de vitaminas y minerales importantes). El otro es el del

sobrepeso, la obesidad y las enfermedades no transmisibles relacionadas con el régimen alimentario (cardiopatías, accidentes cerebrovasculares, diabetes y cánceres) [15], [16].

Para el año 2016, la Asamblea General de las ONU aprobó una resolución en la que se proclamaba el Decenio de Acción de las Naciones Unidas sobre la Nutrición de 2016 a 2025. El Decenio tiene el objetivo de catalizar los compromisos políticos que desembocan en actuaciones mensurables contra todas las formas de malnutrición. La finalidad es que todas las poblaciones tengan acceso a dietas más sanas y sostenibles para erradicar todas las formas de malnutrición en el mundo entero [17], [18].

El aspecto nutricional es vital para garantizar una adecuada producción y rentabilidad. Por medio de avances en estudios de nutrición animal se han alcanzado optimizar la demanda de nutrientes en cada explotación productiva [19]–[21]. En la elaboración de piensos se requiere proporcionar de forma adecuada cada uno de los nutrientes de acuerdo a las especies y etapa productiva. Gran parte de estos minerales presentan problemas de asimilación, en comparación con los minerales denominados orgánicos, en donde por medio de la coordinación de los elementos con algunas biomoléculas como ácidos grasos, aminoácidos o proteínas se logra una mayor eficiencia en la adsorción [12], [13]. Algunos productos innovadores han posibilitado la incorporación de minerales orgánicos con levaduras [22], pero suponen un aumento en el precio final de los piensos [23]. El uso de microalgas para la generación de minerales orgánicos tanto para humanos como para animales se ha limitado a escala de laboratorio. Contemplando este escenario se han desarrollado esfuerzos para poder producir a mayor escala biomásas microalgales para que estas se aprovechen como un alimento funcional, tanto para humanos o animales. Para ello se han analizado las limitaciones que han enfrentado los sistemas de cultivo de microalgas, como es el alto costo de producción lo que ha reducido su uso en Latinoamérica.

La integración de otras disciplinas y tecnologías de alto desempeño han permitido avanzar en el conocimiento detallado a nivel molecular en diferentes campos, para ello se han combinado herramientas de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Estas herramientas tecnológicas se han aplicado en diferentes áreas y ha permitido identificar genes, proteínas o metabolitos que pueden estar relacionados a patologías en plantas, animales, humanos y pueden ser de interés comercial. Las nuevas técnicas también proporcionan una imagen detallada de la calidad de los alimentos y encontrar alternativas para otros desafíos en la producción de alimentos. Los resultados en esta investigación tienen un impacto directo en los consumidores, la industria alimentaria y la sociedad [24]–[26].

Al mismo tiempo la Alimentómica se vuelve una disciplina importante cuando se contempla el desarrollo de economías circulares, que permite la producción sostenible de alimentos al aprovechar y reutilizar las aguas de procesos y los flujos de residuos. Con la utilización de estos residuos se debe garantizar la inocuidad y la ausencia de sustancias nocivas que en procesos posteriores podrían estar presentes en las materias primas destinadas a la elaboración de alimentos [27].

La composición de nutrientes y presencia de otras sustancias depende de las condiciones de crecimiento de las especies de microalgas. Algunas investigaciones han demostrado que la inclusión de microalgas en dietas para animales podría mejorar el crecimiento y la calidad de la carne en rumiantes, cerdos, aves de corral y conejos [28], [29]. Estos hallazgos dependen en gran medida de la composición propia de las microalgas y su cantidad en la dieta. La utilización de microalgas ha mostrado una mejora en la composición de los ácidos grasos en carne, esencialmente debido a su alto contenido en ácido decosahexaenoico (DHA) [30].

El alga verde *Chlorella*, en porcentajes muy bajos en alimento, beneficia los parámetros de rendimiento de crecimiento de las aves de corral. El uso de microalgas como ingredientes para piensos es muy prometedor como alternativa sustitutiva parcial del maíz y de la soya, mitigando así la competencia actual entre las industrias de alimentos y piensos. Las microalgas también proporcionan una alternativa sostenible para la disponibilidad de ácidos grasos del tipo PUFA n-3, protegiendo así las reservas mundiales de peces grasos [31]. Además, las microalgas contribuyen a la protección del medio ambiente y los recursos naturales, como la degradación de la tierra y la privación de agua. Para ello, la tecnología actual de cultivo de microalgas debe mejorarse para reducir sus costos de producción.

Metodología

OE1: Potenciar la producción de metabolitos en biomasa de microalgas como fuente de componentes funcionales alimenticios

Actividad 1.1 Formular medios de cultivos con sales de zinc, manganeso y selenio.

Se realizó una reformulación de los medios desarrollados por el grupo de investigación en Microalgas del ITCR, protegidos bajo secreto industrial. Esta reformulación incluyó la incorporación de los microminerales manganeso (Mn), selenio (Se), cobalto (Co) y zinc (Zn) utilizando sales minerales industriales, primeramente, se realizaron evaluaciones de letalidad de los elementos químicos en las microalgas, en placas de 6 pozos, con un volumen de trabajo de 5 ml, evaluando concentraciones desde 0 a 2500 ppm, durante 48 h y 96 h. Este experimento permitió ajustar la concentración de elementos para cada medio de cultivo y cada cepa microalgal en las fases posteriores del escalamiento.

Actividad 1.2 Evaluar el crecimiento de las microalgas en los medios formulados.

Tarea 1.2.1 Cultivo a escala de laboratorio y **Tarea 1.2.2** Evaluación de los cultivos celulares a escala de laboratorio

Pruebas de toxicidad en Placas de 6 Multi-pozo

Se establecieron los cultivos de las microalgas *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris*, *Isocrysis galbana* y *Arthrospira máxima* en los medios convencionales y en los medios suplementados con microminerales para establecer la toxicidad, en placas de 6 multipozo, con un volumen de cultivo de 5 ml, incubado por 48 h, con concentraciones desde 1 a 100 ppm.

Cultivo en matraz

Determinadas las concentraciones idóneas para el cultivo de las microalgas sin afectar el crecimiento, se establecieron cultivos de las dos cepas que presentaron mayor adaptación, mediante un diseño factorial a escala de laboratorio. Se iniciaron los cultivos a nivel de matraz (150 ml).

Análisis de la asimilación de los oligoelementos en las biomásas

Las biomásas cosechadas de los experimentos en matraz en a concentración de prueba de 10 ppm se analizaron en Microscopio electrónico de Barrido mediante EDS para estudiar la concentración porcentual del oligoelemento en la biomasa, tras realizar lavados del medio de cultivo y la deshidratación por liofilización. Un mg de la biomasa se colocó en un disco adherente de carbono, se colocó en bloques de acero inoxidable de 1 cm de radio y se colocaron en el microscopio para su análisis.

Tarea 1.2.3 Estudio de la cinética celular

Escalamiento de I. galbana y C. vulgaris.

Las microalgas seleccionadas para continuar la producción y estudio detallado fueron la especie *I. galbana* y *Chlorella vulgaris*. Se determinaron los parámetros de la cinética de crecimiento.

Esta actividad fue contemplada en el TFG del estudiante Jose Gabriel Tablada Serrano (Apéndice 1). La formulación mineral óptima se estableció mediante análisis estadístico de la tasa de crecimiento durante cinco días, utilizando un análisis de varianza y las pruebas de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov para verificar la homogeneidad de la varianza y la distribución normal, respectivamente. Con los datos obtenidos se prepararon curvas de crecimiento de las especies tomando las lecturas del conteo celular de cada día, con la media y error estándar de la media. Se calcularon los parámetros de cinética celular en fase exponencial: velocidad específica de crecimiento (μ), y productividad en biomasa (P).

Velocidad de crecimiento específico μ (d^{-1}). (Quesada, 2013)

$$\mu = 1 \cdot \frac{dX}{dt}$$

Dónde: X= concentración de biomasa al final de la fase exponencial, dX = diferencial de la biomasa desde el inicio hasta el final de la fase exponencial, dt = diferencial del tiempo desde el inicio hasta el final de la fase exponencial.

Tarea 1.2.4 Recolección, lavado y secado de biomasa microalgal.

El proceso se realizó por centrifugación usando 1000 a 5000 rpm durante un periodo de 5 min. Se realizaron tres lavados con agua destilada a la biomasa cosechada para eliminar restos de sales minerales externas. Estas biomazas se analizaron mediante SEM y ERS para realizar análisis de perfiles minerales.

Actividad 1.3 Analizar los puntos críticos en la generación de metabolitos primarios y secundarios en biomazas microalgales.

Para la determinación de puntos críticos se tomó como punto de partida las condiciones establecidas en los cultivos microalgales a escala laboratorio. Se realizaron ensayos en fotobiorreactores controlando parámetros de iluminación y salinidad, además de la concentración de nitrógeno. Se fijaron para la especie *I. galbana*, las condiciones que permitieron el mayor crecimiento.

OE2: Cuantificar en las biomazas producidas el perfil nutricional y capacidad antioxidante.

Actividad 2.1 Determinar el Perfil de metabolitos secundarios de las biomazas microalgales.

Tarea 2.1.1 Cuantificación de clorofila a

Partiendo de 5 ml de la muestra de cultivo, se cosechó un botón celular a 3500 rpm por 5 minutos. Se descartó el líquido sobrenadante y al pellet se le adicionó 5 L de metanol al 90%. Se agita en el tubo y se coloca a baño María a 60°C por 10 minutos. La muestra se refrigera a 4°C por 20 horas. Posteriormente se completa con metanol frío para recuperar el volumen evaporado, se centrifuga nuevamente a 5000 x g por 10 minutos y se recupera el sobrenadante. Se mide la densidad óptica usando un blanco de metanol a 665 y 750 nm.

La concentración de clorofila se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{Clorofila a (mg/L)} = 13.9 * (D.O_{665} - D.O_{750}) - U/V$$

Donde U es el volumen final de metanol y V es el volumen de la muestra.

Tarea 2.1.2 Cuantificación de carotenoides

Pesar 5 g de muestra, colocarla en un embudo de separación y adicionar 50 mL de agua y 50 mL de acetona. Agitar, decantar y agregar más acetona para realizar una extracción. Repetir el proceso hasta extraer completamente los pigmentos. Llevar al rotaevaporador hasta lograr concentrar la solución. Pesar la muestra para obtener el valor de peso de los pigmentos totales. Agregar 15 mL de hexano. Agregar una pequeña cantidad de Na_2SO_4 anhidro. Dejar la solución con el agente desecante unos 15 min. Agitar ocasionalmente. Transferir cuantitativamente la solución que contiene el hexano a un matraz aforado de 100 mL y completar hasta el aforo con hexano. Tomar aproximadamente 2mL de

esta solución con una pipeta y transferir a un tubo de ensayo. Agregar 8 mL de hexano y medir la absorbancia a 490 nm. Llevar al rotaevaporador la solución que contiene hexano. Pesar la muestra para obtener el peso de los carotenos totales. Calcular la concentración de los carotenos con la ecuación:

$$\mu g = \frac{A_{490} * VF * 10^4}{2592 * PM}$$

donde

A₄₉₀: Absorbancia medida a 490 nm

VF: volumen final (mL)

PM: peso de la muestra (g)

Tarea 2.1.3 Cuantificación de carbohidratos

Se pesa aproximadamente 5 mg de muestra de microalga liofilizada y se le adiciona 2 mL de agua destilada y 1 mL de solución acuosa de fenol al 5%. Posteriormente, se añade 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se deja en reposo durante 10 min y posteriormente se agita durante 30 segundos y se colocan 20 min en un baño de agua a temperatura ambiente para desarrollar el color. Se prepara una curva de calibración usando como patrón azúcar. Se mide la absorbancia a 490 nm.

Tarea 2.1.4 Determinación de Humedad

Se enciende la Termobalanza y establecer las condiciones de secado (temperatura y tiempo) Se abre la tapa del analizador de humedad y coloque el platillo de aluminio en el asidero porta platillo. Se tara el equipo. Pesar de 5 g de muestra sobre el platillo de aluminio formando una capa lo más homogénea posible. Cerrar la tapa del equipo y pulsar botón de START/STOP para iniciar el proceso de desecación y medición.

Tarea 2.1.5 Cuantificación de lípidos totales

Se pesa aproximadamente 500 mg de muestra de microalga liofilizada, posteriormente se añade 4 mL de una mezcla de metanol-cloroformo (2:1, v/v). La muestra se sonifica por 4 min en baño frío a 30 kHz, parando 1 min parando 1 min transcurrido 2 min. La muestra sonicada se mantiene a 4°C durante 24 horas en oscuridad, después se sonifica bajo las mismas condiciones. Se centrifuga a 4000 x g por 5 min y el sobrenadante se pasa a un tubo limpio. Se añade 3 mL de cloroformo:metanol 2:1 al sobrenadante y se somete al Vortex por 2 minutos, se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se colecta la fase de cloroformo y se evapora a 30°C.

Tarea 2.1.6 Índice de yodo

Para inferir el índice de yodo a partir del perfil de ácidos grasos, se utilizaron los siguientes factores de conversión aproximados para cada tipo de ácido graso, considerando sus dobles enlaces:

1. Ácidos grasos saturados: Índice de yodo = 0 (no contienen dobles enlaces).
2. Ácidos grasos monoinsaturados: Índice de yodo ≈ 1 (un doble enlace).
3. Ácidos grasos poliinsaturados: Índice de yodo ≈ 2 (dos dobles enlaces).

El índice de yodo se calcula usando la fórmula:

$$\text{Índice de yodo} = (\% \text{ de grasa monoinsaturada} * 1) + (\% \text{ de grasa poliinsaturada} * 2)$$

Tarea 2.1.7 Caracterización del perfil lipídico

Los análisis lipídicos se realizaron utilizando espectrometría de masas por ionización electrospray (ESI- MS/MS). Los lípidos serán disueltos en 500 µL de metanol:cloroformo (9:1, v/v) conteniendo 7.5 mM de acetato de amonio y 5 µL de la muestra de lípidos. Se seguirá el procedimiento descrito por Kim y colaboradores (Kim et al, 2013).

A partir de los valores obtenidos de m/z se determinara la categoría, clase, subclase y especie de lípido presente, este análisis se realizará con herramientas bioinformáticas tales como LipidHome (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights/lipidhome/>) y Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>). Se detalló el perfil de lípidos por sus insaturaciones, para la microalga MT09

Tarea 2.1.8 Cuantificación de proteínas

Se toma 0,5 g de biomasa liofilizada y se disuelve en 1 mL de agua destilada. La muestra se sonifica por 4 min en baño frío a 30 kHz, parando 1 min parando 1 min transcurrido 2 min. Se toma una alícuota de 150 µL y se coloca en un tubo tipo Eppendorf. Se agrega 150 µL de reactivo de Coomassie y se mezcla con en el vortex durante 30 segundos. Se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Se mide la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro. Se prepara una curva estándar usando albúmina bovina

Tarea 2.1.9 Perfil de aminoácidos

Se pesa 1 mg de muestra y se coloca en tubos para hidrólisis (Pierce 29560) y se les adicionó 3 mL de HCl 6M. Se aplica vacío durante 3 min; posteriormente, los tubos se colocaron en baño seco a 150°C durante 6 h y se enfriaron a temperatura ambiente. El hidrolizado se transfiere a un matraz 5 mL y el volumen del hidrolizado se iguala con agua. La muestra se evapora en un Rotavapor® a 65°C (Brinkmann Buchi RE 121). Una vez evaporada la muestra se agrega 3 mL de agua y se evapora nuevamente. Para recuperar la muestra del matraz balón, se agrega 1 mL de Buffer de citrato de sodio 0,2N, pH 2,2 y se transfiere a un tubo Eppendorf color ámbar. Para derivatizar se tomaron 70 µL de la muestra hidrolizada y se le agregaron 70 µL de reactivo OPA. La mezcla se dejó reposar por 2 min, posteriormente se filtra (0,2 µm) y se inyectó al cromatógrafo. El perfil de AA se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Thermo Scientific Accela) equipado con un detector de fluorescencia (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000). La separación de AA se realiza en una columna Microsorb (100- 3 C18 100 X 4.6 mm). Se utiliza metanol como fase móvil y la solución buffer fue acetato de sodio (0,1M) a un flujo de 1,2 mL min⁻¹. La identificación se realizó usando un λ de 340 nm y emisión de 455 nm, acorde al tiempo de retención de los estándares. Se procesa con un estándar con una mezcla de 16 aminoácidos de concentración conocida, para obtener un factor para cada uno de los AA.

Tarea 2.1.10 Determinación de calcio, magnesio, sodio, selenio, potasio, zinc, manganeso, arsénico, cromo, níquel, cobre, hierro, mercurio y cadmio

Se estableció un protocolo de determinación de las sales y composición elemental mediante Microscopio electrónico de Barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva (EDS) (TX100). Para este ensayo se seleccionaron los sensores de carbono, hidrógeno, selenio, manganeso, zinc y cobalto para obtener el valor porcentual de la presencia de cada elemento en la muestra, por lo que se tomó aproximadamente 1 mg de biomasa liofilizada de cada uno de los cultivos para ser analizada en el SEM:EDS. La determinación de los minerales presentes en el medio de cultivo de *Chlorella vulgaris* se determinó por medio de Espectroscopía de Emisión atómica (ICP-MS) a través de la venta servicios del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Los elementos: arsénico, cromo, níquel, cobre y cadmio no se detectaron en las biomásas producidas.

OE3: Establecer un prototipo de alimento funcional conforme al RTCA y Códex alimenticio.

Actividad 3.1 Desarrollar un núcleo proteico mineralizado para aves y peces.

Tarea 3.1.1 Análisis de perfiles de aminoácidos, lípidos y minerales

Tras determinar que *Isocrysis galbana* es la especie con mayor capacidad para la absorción de minerales y oligoelementos, se empleó en el diseño de un prototipo de alimento para peces. Esta actividad estuvo a cargo de la empresa VIMYSA, que colaboró durante el año 2020 y 2021, con el aporte de fertilización para la producción de la biomasa, tras la pandemia, se retiró del proyecto. A partir de los perfiles de aminoácidos, lípidos y minerales se determinó el diseño de los núcleos de minerales para las formulaciones de piensos. Con la información nutricional disponible para *I. galbana*, se siguió el siguiente protocolo para generar un alimento completo con pre y probióticos (figura 1).

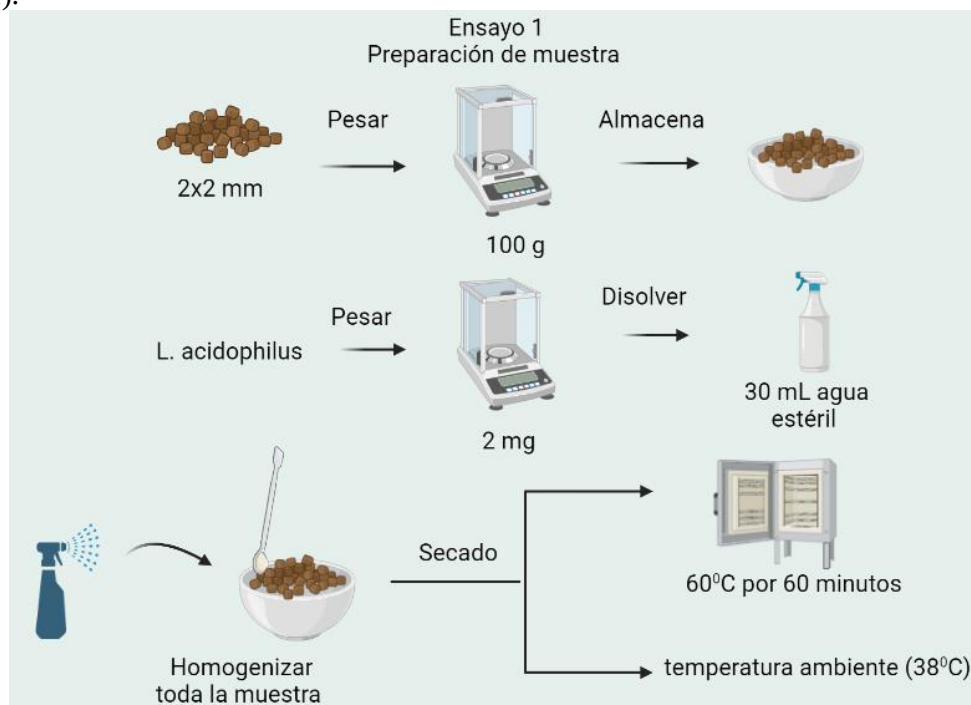


Figura 1. Preparación de la muestra por triplicada.

Se realiza una comparación de condiciones de secado para evaluar que el alimento tenga las condiciones óptimas para su almacenamiento. Donde se compara el alimento comercial y tres condiciones de adherencia del probiótico y microalga a diferentes condiciones (temperatura ambiente 38 °C, temperatura a 60 °C por 1 hora y 3 horas).

Posteriormente se realiza un ensayo de viabilidad a las muestras preparadas para determinar la concentración del probiótico de aproximadamente 1×10^5 en el alimento de pez (Figura 2).

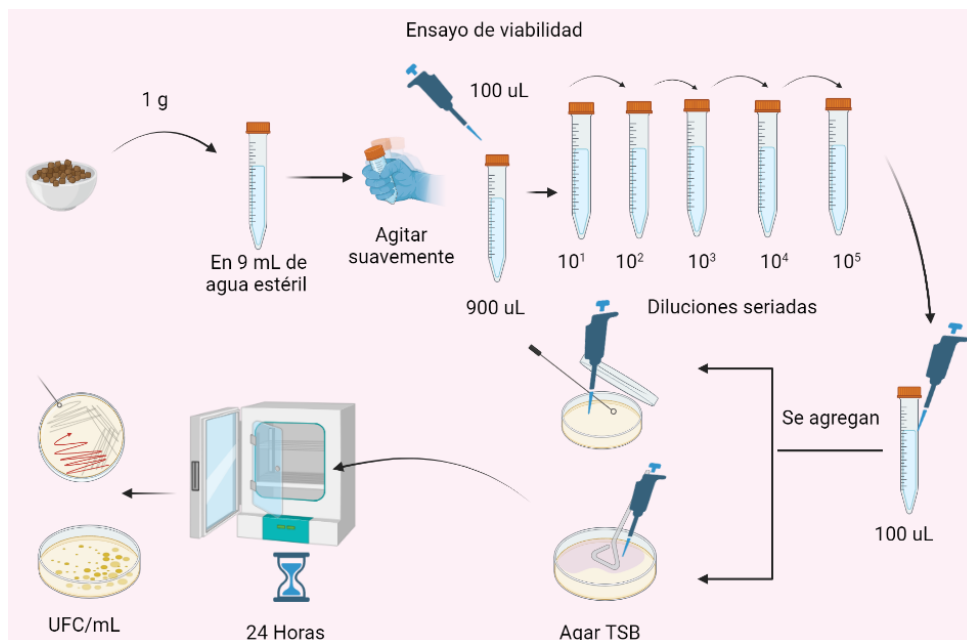


Figura 2. Determinación de UFC/mL de *Lactobacillus acidophylus*.

Desarrollo de fitoplancton para uso acuícola.

Con el objetivo de obtener una formulación en pasta con un contenido de proteínas de 50-70%, carbohidratos 15 y presencia de EPA y DHA, **se realiza el cultivo de la cepa de *I. galbana* según las condiciones definidas en el objetivo OE2**. Se produce el concentrado de células enteras de la microalga marina a escala de producción de 5000 L, en donde se alimenta bajo las condiciones adecuadas, una vez obtenido una contracción de $2,1 \times 10^9$ cel /mL (doscientos diez millones de células por mililitro), se procede a cosechar por centrifugación, se almacena en refrigeración.

Se realizó análisis bromatológico para determinar sus funcionalidades en la formulación animal como sustituto proteico. Así mismo se observan oportunidades a nivel funcional con el uso de las microalgas tanto a nivel de salud y ambiental.

Los pasos realizados:

- Determinar las microalgas de interés en la primera etapa.
- Análisis de laboratorio: proximales, aminogramas, fragmentación de grasas, microbiológicos.
- Validación de la dosificación a utilizar
- Formulación y balance de ración
- Evaluación de su uso de planta, análisis de fluidez, mezclado
- Diseño del Protocolo de campo
- Revisión de los resultados y conclusiones.

Actividad 3.2 Desarrollar un prototipo de alimento funcional para humanos

Se elaboró un Snack donde se incorporó biomasa microalgal que se ajuste a los requerimientos del Reglamento RTCA y Códex alimenticio.

El proceso de desarrollo incluyó una etapa inicial para la obtención de *nibs* de microalgas a partir de biomasa en pasta dispuesta en un deshidratador de alimentos, extruidos a modo de cilindros de 5 mm

de diámetro, durante 6 h a 60°C. Los *nibs* desarrollados a partir de la biomasa de *A. maxima* e *I. galbana* se perfilaron en una formulación para una barra de cereal.

Un paso intermedio permitió desarrollar protocolos de desodorización de la biomasa, aplicable a ambas biomasas, se escogió para el desarrollo de las pruebas, la biomasa de *A. maxima*, debido a sus características organolépticas más intensas, este proceso permite seleccionar condiciones para generar *nibs* de biomasa microalgal sensorialmente aceptables para su inclusión en la barra de cereal.

Esta actividad se abordó con el TFG del Estudiante Caleb Corrales Picado (Apéndice 2).

Para el desarrollo de la barra de cereal se realizó una revisión bibliográfica de formulaciones publicadas en revistas científicas, blogs de alimentos saludables y el portal web de la FDA sobre productos registrados con microalgas incorporadas, se probaron 5 formulaciones base (cuadro 1).

Cuadro 1. Formulaciones prototipadas para el proceso de degustación y selección de la formula final de una barra de cereal suplementada con microalgas.

Ingrediente	M1	P1	M2	P2	M3	P3
Avena Molida	27,1	27,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Avena Hojuela	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	30,0
Granola	0,0	0,0	30,0	30,0	0,0	0,0
hojuelas de arroz	11,7	11,7	13,0	13,0	13,0	13,0
Azúcar morena	11,9	11,9	13,2	13,2	13,2	13,2
Sirope de Glucosa	14,5	14,5	16,0	16,0	16,0	16,0
Agua	18,0	18,0	9,2	9,2	9,2	9,2
Grasa Vegetal	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4
Lecitina de soya	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0
Miel de abeja	3,8	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Glucosa alta dextrosa	0,0	0,0	4,2	4,2	4,2	4,2
Microalga	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Coco rayado	4,5	4,5	5,0	5,0	5,0	5,0
Pasas	0,0	5,4	6,0	3,0	0,0	3,0
Maní	5,4	0,0	0,0	3,0	6,0	3,0

El diagrama de flujo para la producción se muestra a continuación (Figura 3)

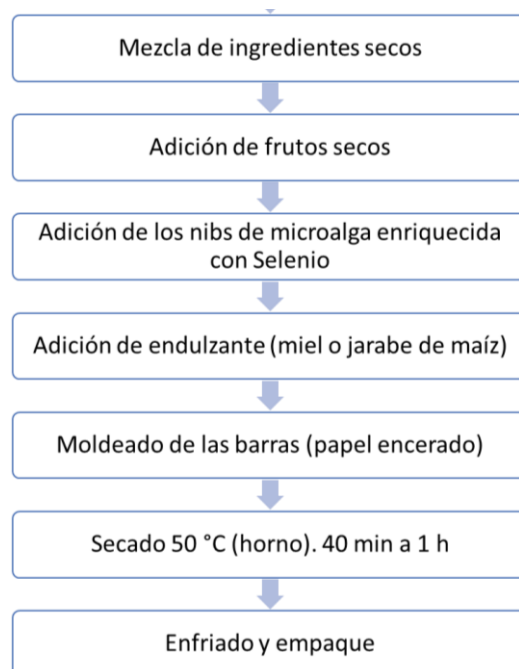


Figura 3. Diagrama de flujo para la producción de barras de cereal suplementada con nibs de microalgas enriquecidas con selenio.

Tarea 3.2.1 Recuento de Mesófilos Aerobios

Se empleó el kit de petrifilm 3M para el recuento de Arobeos siguiendo las instrucciones del Fabricante. Patiendo de 25 g de biomasa, disuelta en 225 g de agua peptonada estéril, se elaboró diluciones seriadas, de las cuales, 1 mL por triplicado de cada dilución, se virtió sobre la placa y se llevó a incubar por 24 h, a 35°C. Se reporta la cantidad de UFC/ g de muestra.

Tarea 3.2.2 Recuento de *E. coli*, *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes* por petrifilm 3M.

A partir de la dilución de 10^{-1} - 10^{-2} , se inoculó por cada una, 1 ml en 3 tubos 2 placas de Petrifilm (total 6 placas), incubados a 35 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo se contaron las colonias azules con gas y se reportará las UFC/g de *E.coli*. El recuento total de las colonias se reporta como UFC/g de coliformes fecales. Para las placas de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes* se reporta la ausencia o presencia.

Tarea 3.2.3 Test organoléptico con un panel de jueces no entrenados

Tanto para el desarrollo de los nibs como para la fórmula de la barra de cereal se llevaron a cabo test organolépticos, del tipo Bench testing para las formulaciones preliminares y con al menos 30 consumidores para el prototipado de los nibs desodorizados, previo a la incorporación en la barra de cereal como producto mínimo viable (PMV). Dentro de los descriptores empleados se consideraron los siguientes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Registro de percepción sensorial de prototipo de alimento elaborado con microalgas.

Marino / Mar	Plantas / Vegetales	Animal	Miscelánea
Pescado fresco	Hierba fresca	Carne cruda	Chocolate

Pescado hervido (sopa)	Verduras crudas (lechuga)	Carne hervida	Café
Pescado seco / salado	Perejil	Carne asada / frita	Dulce, azúcar, miel, vainilla
Pescado asado	Té	Carne ahumada	Azúcar tostada, caramelo
Pescado ahumado	Vegetales hervidos (sopa)	Carne podrida	Pan tostado
Pescado podrido	Vegetales asados (cebolla)	Piel	Especias (clavo, orégano)
Crustáceos (langostinos), crudo/fresco	Flores		
Crustáceos (langostinos), hervido/cocinado	Fruta		
Moluscos (mejillones), crudo/fresco	Hierba húmeda		
Moluscos (mejillones), hervido/cocinado	Champiñones, líquenes		
Algas (verdes, rojas)	Hongos / moho		
Costa (agua costera)			
Lodos (estancadas)			

Resultados

OE1: Potenciar la producción de metabolitos en biomasa de microalgas como fuente de componentes funcionales alimenticios

Actividad 1. Formular medios de cultivos con sales de zinc, manganeso y selenio

La elección de sales de los macrominerales para la reformulación de los medios de cultivo se fundamentó en la disponibilidad comercial y se compilaron las principales características químicas esencial para la compra de los reactivos a emplear (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los productos comerciales de los oligoelementos

Oligoelemento y código asignado	Producto comercial	Concentración producto comercial	Fórmula producto comercial	Pureza del elemento (%m/m)	Peso molecular
Selenio (S17)	Selenito de Sodio	99,00%	NaSeO3	46%	172,96
Manganeso (S 19)	Sulfato de manganeso	98,00%	MnSO4	33%	169,01
Zinc (S 18)	Sulfato de zinc	32,00%	ZnSO4	36%	179,5
Cobalto (S 20)	Cloruro de cobalto (II) hexahidratado	95,00%	CoCl2 *6H2O	25%	237,9

Para la fase de estudio de toxicidad, se estableció los cálculos para la preparación de las soluciones madre de cada reactivo, tomando en cuenta la concentración anteriormente indicada, un ejemplo del orden del cálculo se muestra a continuación (Figura 3).

#

Figura 3. Base de cálculo para formular los medio de cultivo a partir de sales comerciales de oligoelementos de selenio, cobalto, zinc y manganeso.

Para los cultivos a escala de 15 L, se estableció una tabla de pesaje de los reactivos acorde a la concentración a emplear en (ppm) de cada oligoelemento en el medio de cultivo (Cuadro 4-8).

Los cultivos deben de pasar por un periodo de mínimo un mes de adaptación a nivel de matraz, durante este periodo se alimentan y se le añade el oligoelemento a una concentración de 5 ppm una vez por semana. Transcurrido un mes de adaptación se puede iniciar con el proceso de escalamiento siguiendo las reglas y estándares previamente estipulados en el laboratorio con la única diferencia de que la dosis del oligoelemento se añade cada 15 días, esto debido a la tasa de consumo del oligoelemento por parte de las microalgas de acuerdo con las pruebas realizadas. Esto significa que el cultivo se alimenta semanalmente y cada 15 días se añade la dosis respectiva del oligoelemento.

Cuadro 4. Masa a pesar (mg/L) de cada oligoelemento de acuerdo con la concentración final en el medio de cultivo.

Código de Reactivo	5 ppm	10 ppm	20 ppm
S17	15,69580106	31,39160211	62,78320422
S19	11,06161015	22,1232203	44,2464406
S18	21,2221231	42,44424621	84,88849242
S20	42,8982487	85,7964974	0171592995

Cuadro 5: Cantidad de reactivo S17 añadido de acuerdo con el volumen de trabajo para el medio industrial.

S17	1 L (mg)	15 L (mg)	150 L (mg)	400 L (g)	800 L (g)	30 000 L (g)
5 ppm	15,69580106	235.437016	2354.37016	6.27832042	12.5566408	470.874032
10 ppm	31,39160211	470.874032	4708.74032	12.5566408	25.1132817	941.748063
20 ppm	62,78320422	941.748063	9417.48063	25.1132817	50.2265634	1883.49613

Cuadro 6: Cantidad de reactivo S18 añadido de acuerdo con el volumen de trabajo para el medio industrial.

S18	1 L (mg)	15 L (mg)	150 L (mg)	400 L (g)	800 L (g)	30 000 L (g)
5 ppm	318.331847	3183.31847	8.48884924	16.9776985	636.663693	318.331847
10 ppm	636.663693	6366.63693	16.9776985	33.955397	1273.32739	636.663693
20 ppm	1273.32739	12733.2739	33.955397	67.9107939	2546.65477	1273.32739

Cuadro 7: Cantidad de reactivo S18 a añadir a añadir de acuerdo con el volumen de trabajo para el medio industrial.

S19	1 L (mg)	15 L (mg)	150 L (mg)	400 L (g)	800 L (g)	30 000 L (g)
5 ppm	165.924152	1659.24152	4.42464406	8.84928812	331.848305	165.924152
10 ppm	331.848305	3318.48305	8.84928812	17.6985762	663.696609	331.848305
20 ppm	663.696609	6636.96609	17.6985762	35.3971525	1327.39322	663.696609

Cuadro 8: Cantidad de reactivo S20 a añadir de acuerdo con el volumen de trabajo para el medio industrial.

S20	1 L (mg)	15 L (mg)	150 L (mg)	400 L (g)	800 L (g)	30 000 L (g)
5 ppm	643.473731	6434.73731	17.1592995	34.318599	1286.94746	643.473731
10 ppm	1286.94746	12869.4746	34.318599	68.6371979	2573.89492	1286.94746
20 ppm	2573.89492	25738.9492	68.6371979	137.274396	5147.78984	2573.89492

Actividad 1.2 *Evaluar el crecimiento de las microalgas en los medios formulados.*

Tarea 1.2.1 Cultivo a escala de laboratorio y **Tarea 1.2.2** Evaluación de los cultivos celulares a escala de laboratorio

Pruebas de toxicidad en Placas de 6 Multi-pozo

El experimento para determinar la letalidad de las microalgas a las diferentes concentraciones evidenció que los minerales de Zinc y Cobalto son los que representan mayor toxicidad para las cepas de microalgas evaluadas, además se observó un efecto promotor del crecimiento del selenio en *I. galbana* y *Chlorella vulgaris*, no así para *S. dimorphus*, la cual mostró menor crecimiento. Para las siguientes etapas de cultivo en matraz, este experimento permitió definir las concentraciones de prueba con los elementos selenio y manganeso en concentraciones de 1 y 10 ppm, debido a que son las condiciones que mostraron menor limitación en el crecimiento microalgal (Figura 4).

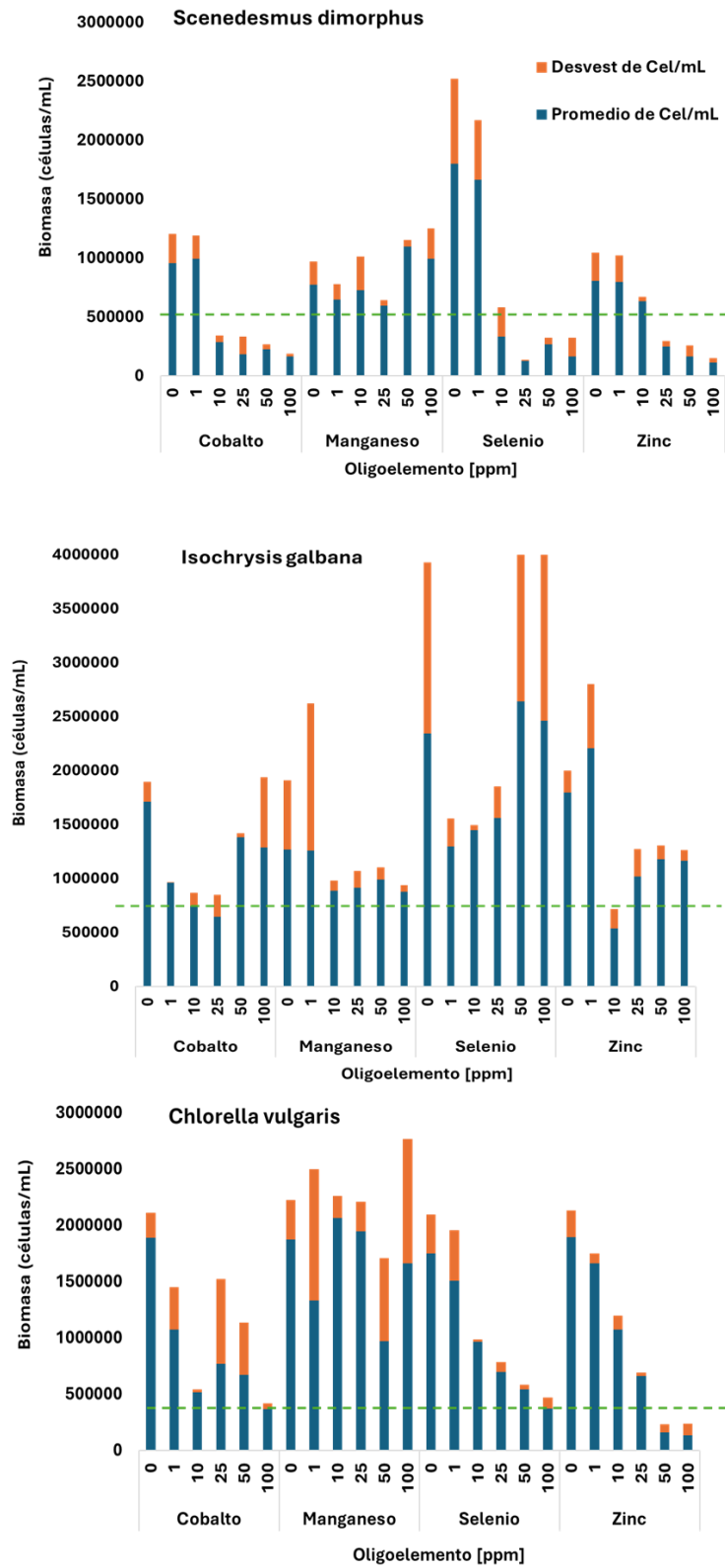


Figura 4. Recuento de la biomasa de las especies *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana*, expuestas a concentraciones de 0, 1, 10, 25, 50 y 100 ppm de cobalto, manganeso, selenio y zinc, incubadas en placas multipozo en 5 mL con fotoperiodo 16:8, durante 48

h. Promedio de 3 muestras (barra azul) y la desviación estándar (barra naranja). La línea verde punteada corresponde a la media de la población inicial para definir la dosis letal media (DLM).

Cultivo en matraz

El cultivo en matraces con la especie *Scenedesmus dimorphus* propició mayor concentración de biomasa en el tratamiento suplementado con selenio a 1ppm (Figura 5), manteniendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos (tanto a 1 como a 10, 25, 50 y 100 ppm de cada microelemento). Sin embargo, al comparar los resultados del tratamiento de Se (1ppm) con los de su respectivo control negativo, no se observaron diferencias significativas entre ellos. Esto demuestra que una aplicación baja de Se podría estimular el crecimiento en *Scenedesmus* (Figura 6.B)

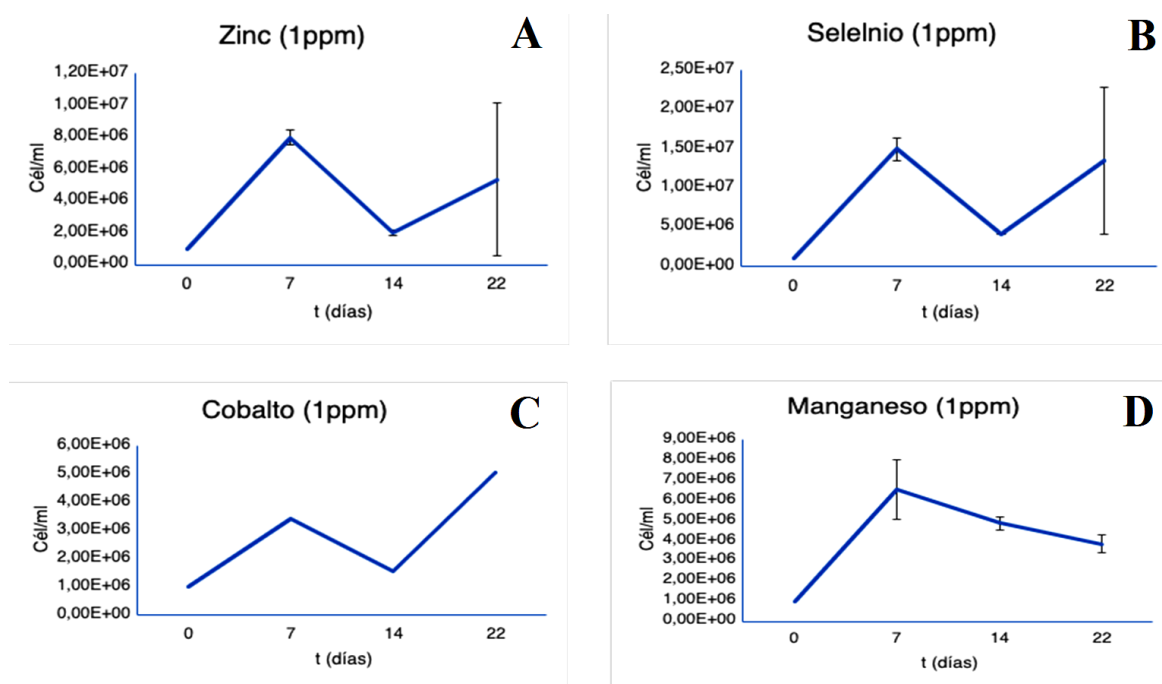


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus* para los tratamientos con 1ppm de A) Zinc, B) Selenio, C) Cobalto y D) Manganeso durante 22 días.

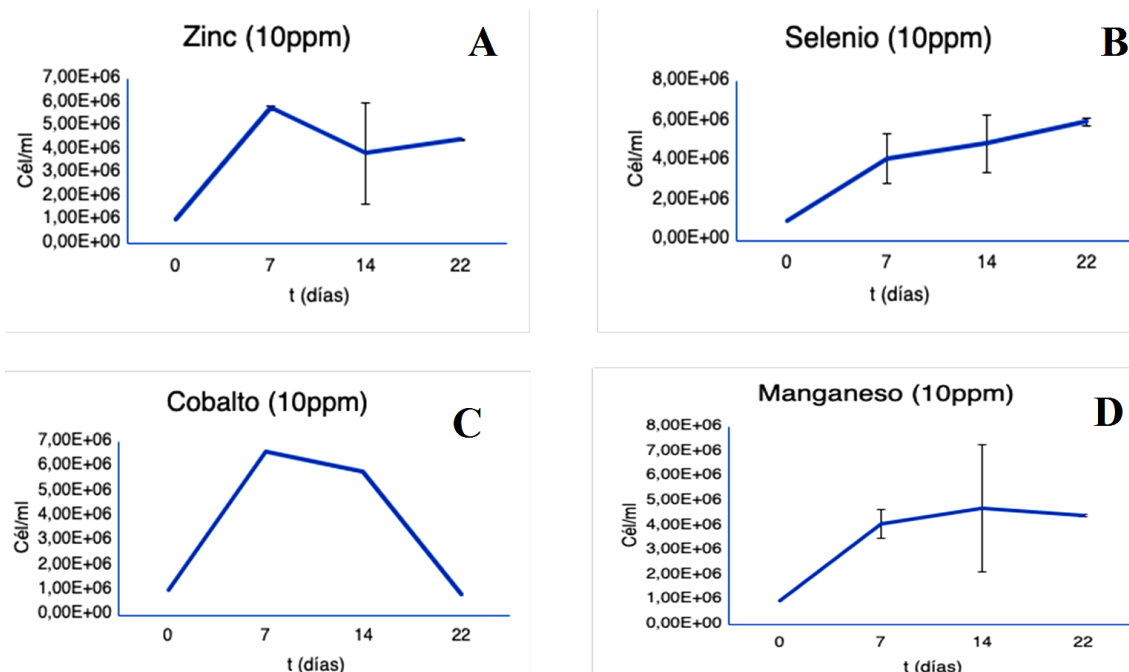


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Scenedesmus* para los tratamientos con 10 ppm de A) Zinc, B) Selenio, C) Cobalto y D) Manganeso durante 22 días.

Las curvas de crecimiento de las microalgas *I. galbana* y *A. maxima* en matraces, durante 8 días, evidencian que el cultivo en concentraciones de 1 ppm de oligoelementos, la microalga es capaz de crecer de forma exponencial, sin embargo cuando la concentración de los metales se incrementa a 10 ppm, se evidencia un efecto adverso, especialmente en *A. maxima*. Para el caso de *I. galbana*, cuando se expuso a 10 ppm de manganeso, se observó un periodo de descenso de la población durante los primeros 5 días, posteriormente un crecimiento exponencial, lo que sugiere un periodo de adaptación al metal en dicha concentración por lo que podría tolerar concentraciones mayores (Figura 7). Este experimento permitió seleccionar la microalga *I. galbana* y *Chlorella vulgaris* para las pruebas posteriores de crecimiento en 15 L.

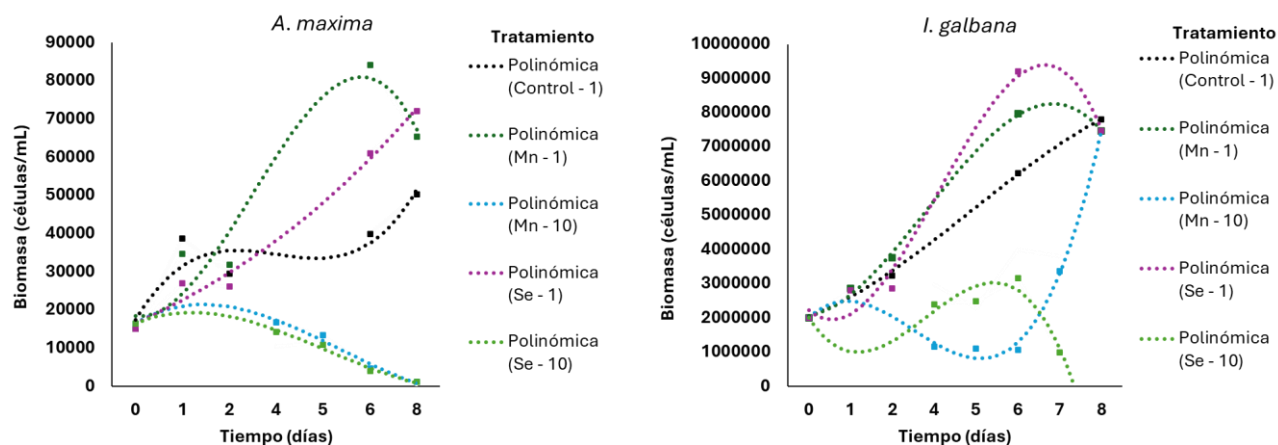


Figura 7. Cinética de crecimiento de *A. maxima* y *I. galbana* para los tratamientos Control [Polinómica (Control - 1)]; 1 y 10 ppm Selenio [Polinómica (Se-1) y Polinómica (Se-10)]

respectivamente, y 1 y 10 ppm de Manganeso [Polinómica (Mn-1) y Polinómica (Mn-10)] respectivamente durante 8 días.

Los cultivos de *C. vulgaris* a nivel de matraz de los tratamientos con y sin oligoelementos a 10 y 20 ppm, exceptuando los cultivos suplementados con selenio, no presentaron fase de adaptación, iniciando el primer día en fase exponencial e iniciando la fase estacionaria en el 10 aproximadamente (Figura 8). Por otro lado, en los tratamientos de selenio se observó una disminución en las densidades celulares, sin embargo, se presentó un incremento del día 17 al día 18 en los matraces con 20 ppm y una tendencia a incrementar la densidad celular en los matraces con 10 ppm a partir del día 14. Por otro lado, se observó que en el día 10 los cultivos suplementados con Cobalto a nivel de matraz empezaron a disminuir su densidad celular (Figura 9).

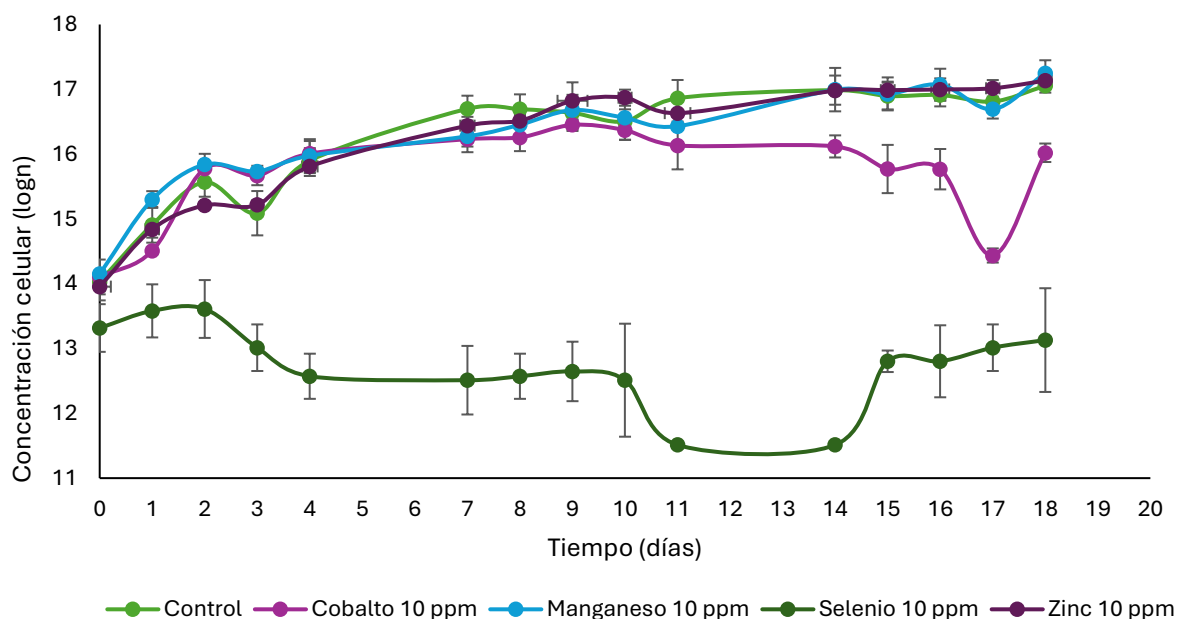


Figura 8: Concentración celular expresada en logaritmo de *C. vulgaris* en medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 10 ppm a nivel de matraz (350 ml).

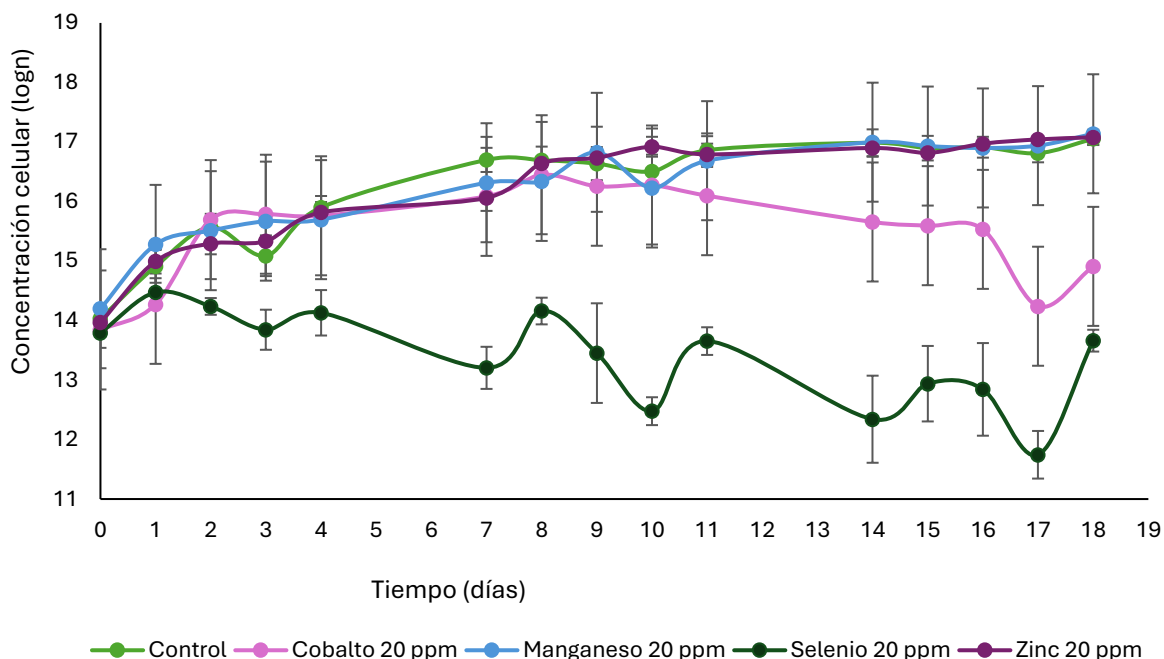


Figura 9: Concentración celular expresada en logaritmo de *C. vulgaris* en medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 20 ppm a nivel de matraz (350 ml).

Análisis de la asimilación de los oligoelementos en las biomásas.

El resultado indica que la biomasa de *I. galbana* es la microalga que mejor metaboliza los metales suministrados, pues logra absorber la mayor concentración, respecto a las demás cepas estudiadas (Cuadro 9). En este estudio a nivel de matraz se evidenció la capacidad de esta cepa para adaptarse a concentraciones mayores del metal y metabolizarlos de forma intracelular, con un incremento porcentual de 2,4 MS de Mn y 0,18 MS de Se.

Cuadro 9. Determinación del porcentaje elemental de la biomasa liofilizada de *I. galbana* usando Microscopía electrónica de Barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva

Elemento	Control (%MS)	Mn 10 ppm (%MS)	Se 10 ppm (%MS)
C	74.22 ± 2.91	71.94 ± 0.29	70.37 ± 1.65
O	23.57 ± 3.35	23.48 ± 1.09	21.72 ± 1.70
K	0.55 ± 0.08	0.84 ± 0.01	0.29 ± 0.08
Ca	0.21 ± 0.03	ND	0.65 ± 0.23
Mg	0.32 ± 0.06	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.09
P	0.71 ± 0.14	1.29 ± 0.09	ND
Mn	0.05 ± 0.01	2.45 ± 0.08	0.15 ± 0.08
Se	ND	ND	0.18 ± 0.06

La microalga *A. maxima* no muestra una asimilación intracelular de los oligoelementos, se observó que es capaz de crecer en presencia de estos, sin embargo, no se observa un potencial de absorción mediante el análisis realizado por EDS (Cuadro 10).

Cuadro 10. Determinación del porcentaje elemental de la biomasa liofilizada de *A. maxima* usando Microscopía electrónica de Barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva

Elemento	Control (%MS)	Mn 10 ppm (%MS)	Se 10 ppm (%MS)
C	64.04 ± 0.71	64.04 ± 0.71	55.995 ± 3.825
O	32.28 ± 1.64	32.28 ± 1.64	33.69 ± 1.3
Na	1.355 ± 0.165	1.355 ± 0.165	4.815 ± 1.745
K	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01	2.375 ± 0.995
Mg	0.63 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.465 ± 0.135
Se	N.D	N.D	N.D
Mn	0.03 ± 0	0.03 ± 0	0.01 ± 0.01

Tarea 1.3.3 Estudio de la cinética celular y **Tarea 1.3.4** Recolección, lavado y secado de biomasa microalgal.

Escalamiento de I. galbana.

Esta actividad fue contemplada en el TFG del estudiante Jose Gabriel Tablada Serrano (Apéndice 1). Se resumen a continuación los principales resultados.

Se realizó el análisis del crecimiento de *I. galbana* en placas de 5 mL en el medio industrial con y sin los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 100, 300 y 500 ppm y reveló que los cultivos presentaron poco crecimiento a 500 ppm para todos los oligoelementos estudiados. El tratamiento con Cobalto a 100 ppm demostró un incremento en la tasa de crecimiento entre el día 0 y 2, mientras no se denota crecimiento para las concentraciones de 300 y 500 ppm. Para los tratamientos de Manganeseo no se evidencia crecimiento exponencial.

A nivel de tubos de ensayo (35 ml), para esta especie, el crecimiento fue mayor en los tratamientos de Cobalto, con el menor tiempo de duplicación, mientras que el tratamiento con selenio obtuvo los mayores tiempos para la duplicación. Así mismo, se determinó la velocidad de crecimiento en la fase exponencial en los diferentes cultivos microalgales y se obtuvo que los tratamientos de Cobalto (100 y 500 ppm) poseen las mayores velocidades de crecimiento en la fase exponencial respectivamente. Se observó una tendencia de reducción de productividad biomásica a mayor concentración del oligoelemento. Los tratamientos a 100 ppm mostraron un efecto promotor de la productividad, como se observó anteriormente en las pruebas de toxicidad. Se obtuvo que los cultivos con un crecimiento en la fase exponencial más extenso fueron los de Se a 500ppm, el Control y Co a 100ppm, mientras el tratamiento con Co a 500 ppm mostró la fase exponencial más corta (Cuadro 11).

Cuadro 11. Determinación de parámetros de cinética microbiana en cultivo de *Isochrysis galbana* en tubos de ensayo con medio industrial con y sin los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 100, 300 y 500 ppm.

Tratamiento	Velocidad de máxima de crecimiento (d-1)	Generaciones	Tiempo de duplicación (día)	Velocidad de crecimiento en fase exponencial (d-1)	Productividad de biomasa (cel/ml d-1)	Duración fase exponencial (día)
Control	3.55	1.48	0.20	3.55	4.33E+05	4.00
Co 100	13.14	0.85	0.07	13.14	6.00E+05	2.67
Co 300	6.88	1.15	0.10	6.88	5.75E+05	2.00
Co 500	12.93	0.85	0.05	12.93	3.50E+05	2.00
Mn 100	9.65	0.81	0.38	3.13	4.67E+05	2.67
Mn 300	4.50	0.86	0.17	4.50	5.17E+05	2.67
Mn 500	5.55	0.34	0.14	5.55	2.92E+05	2.67
Se 100	3.47	1.00	0.20	3.47	5.25E+05	2.67
Se 300	5.10	0.81	0.16	5.10	5.17E+05	2.00
Se 500	3.61	0.73	0.24	3.61	1.65E+05	4.67
Zn 100	6.89	0.87	0.10	6.89	5.67E+05	2.00
Zn 300	5.56	0.68	0.15	5.56	4.57E+05	2.00
Zn 500	5.73	1.00	0.13	5.73	4.42E+05	2.67

Las curvas de crecimiento de *I. galbana* a nivel de matraz en 350 mL evidenciaron un crecimiento por encima del tratamiento control para la mayoría de tratamientos en los primeros 4 días, a excepción de los tratamientos con cobalto a 300 ppm, selenio a 100 ppm y Se a 300 ppm, que mantuvieron un crecimiento similar al control, con una tendencia a la disminución de la biomasa en los días posteriores (Cuadro 12). La mayor velocidad de crecimiento se dio en el tratamiento de cobalto a 300 ppm (μ_{max} de 3.06 d-1), con una tendencia incrementar proporcionalmente con la concentración de los oligoelementos, a excepción del tratamiento de Manganeseo que 100 ppm obtuvo una μ_{max} de 3.56(d-1). Además, al calcular el número de generaciones en los cultivos a nivel de matraz se obtuvo el Control con el valor más alto, siguiéndole los tratamientos de Se a 100ppm y 300 ppm. El tratamiento Control mostró la productividad biomásica más alta, mientras el Tratamiento de Selenio a 100 ppm resultó con la menor productividad de biomasa, de igual manera se obtuvo que a mayor ppm de los oligoelementos (Zn, Mn, Se y Co), se propició la mayor productividad de biomasa, con una fase exponencial menor a excepción de los tratamientos con Manganeseo.

Cuadro 12. Determinación de parámetros de cinética microbiana en cultivo de *I. galbana* en matraz (350 ml) con medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos a Co, Mn, Se y Zn a 100 y 300 ppm.

Tratamiento	Velocidad máxima de crecimiento (d-1)	Generaciones	Tiempo de duplicación (día)	Velocidad de crecimiento en fase exponencial	Productividad de Biomasa (cel/ml d-1)	Duración fase exponencial (día)
Control	4.91	2.39	0.16	4.91	8.42E+05	3.33
Co 100	4.81	1.27	0.17	4.81	4.18E+05	3.33
Co 300	6.85	1.38	0.10	6.85	4.50E+05	2.00
Mn 100	3.56	1.33	0.19	3.56	3.83E+05	4.00
Mn 300	3.06	1.55	0.24	3.06	4.00E+05	5.00
Se 100	5.44	0.97	0.14	5.44	2.42E+05	2.67
Se 300	6.78	0.86	0.10	6.78	4.67E+05	2.00
Zn 100	3.97	1.19	0.24	3.97	3.33E+05	5.00
Zn 300	4.45	1.74	0.18	4.45	3.82E+05	4.33

El crecimiento de *I. galbana* a escala de 15 L, se realizó con la concentración de 100 ppm de CO, Se, Mn, Zn y el Control, debido a los mejores resultados de estos tratamientos en los experimentos anteriores. Las curvas de crecimiento evidenciaron que esta microalga crece por encima del tratamiento control en medios con Co y Mn, presentando una fase de adaptación en los días 2-4 (Cuadro 13). Se logró determinar la mayor velocidad de crecimiento en los cultivos con selenio y la menor en los tratamientos con Co, en cambio para el número de generaciones se obtuvo valores mayores en los tratamientos Control y Co. Respecto al tiempo de duplicación, los tratamientos del control y Co tuvieron la fase exponencial mayor y el Se fue el tratamiento con TD menor. Además, el selenio fue el tratamiento con mayor de productividad de biomasa, seguido del cobalto y el control (Cuadro 13).

Cuadro 13. Determinación de parámetros de cinética microbiana en cultivo de *I. galbana* en bidones (15 l) con medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos a Co, Mn, Se y Zn a 100 ppm.

Tratamiento	Velocidad máxima de crecimiento (d-1)	Generaciones	Tiempo de duplicación (h)	Velocidad de crecimiento en fase exponencial	Productividad de Biomasa (cel/ml d-1)	Fase exponencial (días)
Control	2.90	1.12	0.25	2.90	1.79E+05	4.33
Co 100	4.24	0.99	0.19	4.24	2.42E+05	3.67
Mn 100	4.87	1.26	0.16	4.87	1.67E+05	3.00
Se 100	6.26	1.86	0.12	6.26	1.43E+06	2.67
Zn 100	5.62	0.60	0.13	5.62	1.50E+05	2.33

Escalamiento de *Chlorella vulgaris*

Al evaluar los cultivos con medio industrial y medio industrial suplemento con los oligoelementos Zn, Mn, Se y Co a 20 ppm a nivel de bidón se determinó que el tratamiento con Zinc presentó una mayor productividad de biomasa y número de generaciones respecto a los tratamientos, incluyendo

el control. La productividad de los cultivos control en bidones fue la menor de todas a diferencia en Erlenmeyer que fue el tratamiento con mayor productividad (Cuadro 14).

Respecto a la Velocidad máxima de crecimiento se obtuvo que el selenio a nivel de bidones sigue siendo el tratamiento con el valor más alto y por ende menor tiempo de duplicación, por lo que se puede inferir que el selenio hace que *C. vulgaris* se multiplique en un corto lapso, pero a una velocidad mayor. A nivel de bidones los cultivos suplementados con Cobalto no presentaron fase exponencial (Cuadro 14) por lo que no se pudieron calcular los parámetros de la cinética de crecimiento ya que no aplica (NA).

Cuadro 14. Determinación de parámetros de cinética microbiana en cultivos de *C. vulgaris* a nivel de bidón (15 L) con medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos Zn, Mn, Se y Co a 20 ppm.

Tratamiento	Concentración oligoelemento (ppm)	Velocidad máxima de crecimiento	Generaciones	Tiempo de duplicación (días)	Velocidad de crecimiento en fase exponencial	Productividad de Biomasa (cel/ml d-1)
Control	0	6.3238591	2.50973787	0.11361072	6.3238591	7.11E+05
Cobalto	20	NA	NA	NA	NA	NA
Manganeso	20	4.79547199	1.85661854	0.1447966	4.79547199	7.22E+05
Selenio	20	8.33832495	2.389975	0.09823663	8.33832495	8.00E+05
Zinc	20	5.50096394	2.71549744	0.13578052	5.50096394	1.50E+06

Se observó un comportamiento diferente en los cultivos de selenio y cobalto a nivel de bidón respecto a los cultivos en matraz. Como el selenio no tiende a disminuir la densidad celular, el cultivo empezó a incrementar su población desde el primer día, aunque siga estando entre los más bajos, las microalgas se comportaron con mayor estabilidad. A diferencia de los cultivos de Cobalto, que a nivel de matraz presentaron un crecimiento durante los primeros 9 días de cultivo y a nivel de bidones su densidad celular no logró superar la concentración celular inicial (Figura 10).

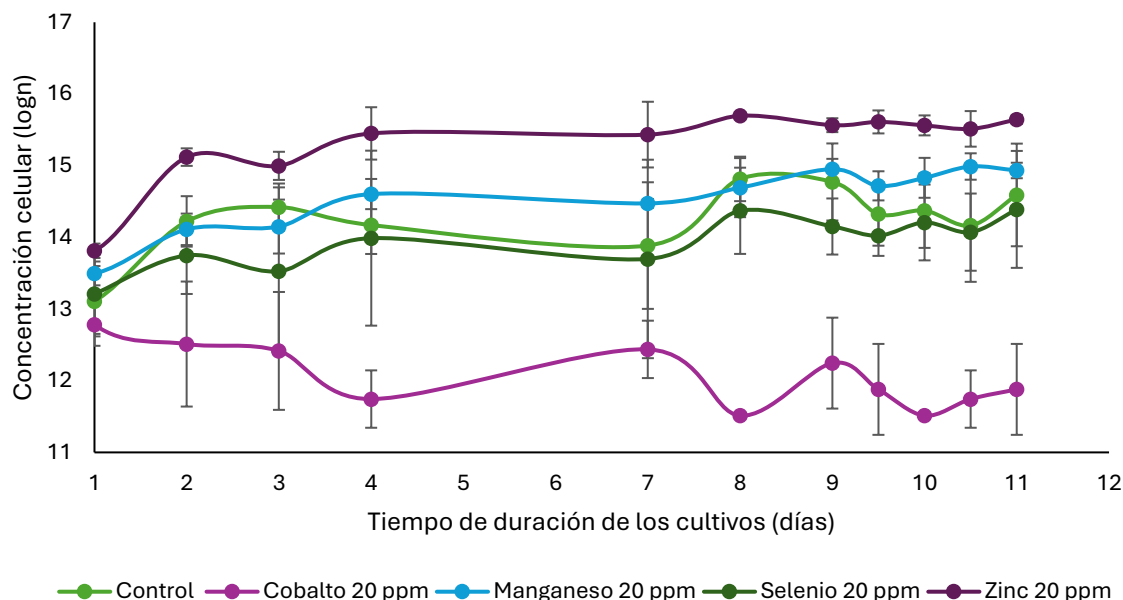


Figura 10: Concentración celular expresada en logaritmo de *C. vulgaris* en medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 20 ppm a nivel de bidón (15 l).

OE2: Cuantificar en las biomásas producidas el perfil nutricional y capacidad antioxidante.

Actividad 2.1 Determinar el Perfil de metabolitos secundarios de las biomásas microalgales.

Isochrysis galbana

Durante el análisis de la concentración de biomoléculas presentes en la biomasa de *I. galbana* (Cuadro 15) se determinó que el tratamiento Control presentó mayor concentración de Proteínas, Carbohidratos, Clorofila a y Clorofila b. Además, que el tratamiento suplementado con Cobalto fue el segundo en la concentración más alta de Carbohidratos y Clorofila a, así mismo, este tratamiento presentó la mayor cantidad de clorofila c, clorofilas totales y carotenoides.

Cuadro 15. Concentración de proteínas, carbohidratos, clorofila a, clorofila b, clorofila c, clorofilas totales y carotenoides determinada en biomasa liofilizada de *I. galbana* en tratamientos con y sin los oligoelementos en concentraciones de 100 ppm en el medio de cultivo.

Tratamiento	Concentración (µg/mg)						
	Proteínas	Carbohidratos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c	Clorofilas totales	Carotenoides
Cobalto	418.03	159.42	4.87	6.18	3.24	15.14	2.57
Manganeseo	420.63	10.91	3.3	3.3	1.97	7.49	1.67

Selenio	407.05	137.95	1.48	1.48	2.34	6.53	1.52
Zinc	418.53	146.37	1.05	1.05	2.34	6.53	1.52
Control	428.30	218.11	6.18	6.18	2.18	5.40	1.34

El espectro de rayos X en la determinación obtenida en el equipo para una de las muestras analizadas para *I. galbana* se muestra a continuación. (Figura 11).

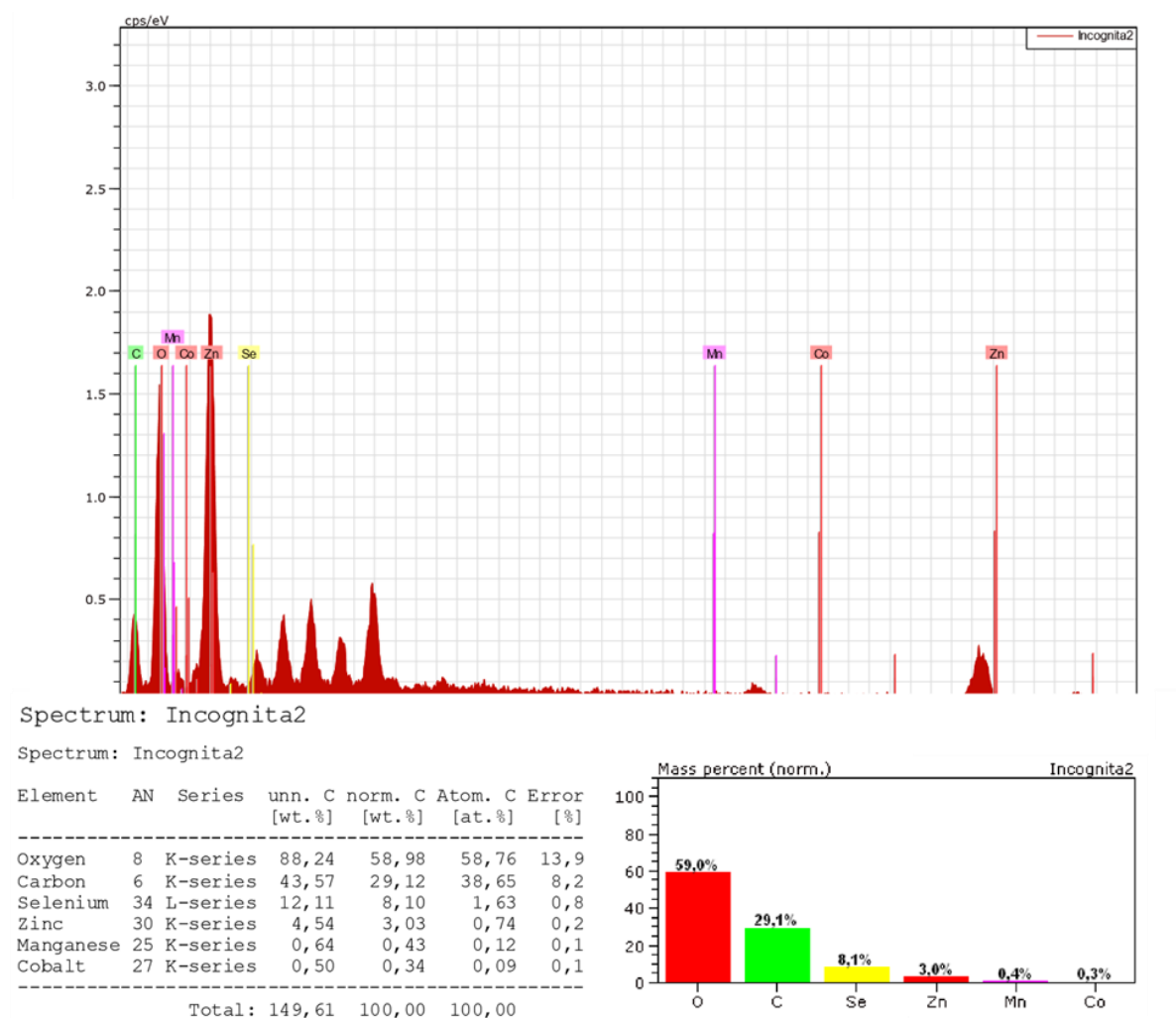


Figura 11. Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva en la muestra de *I. galbana* con Cobalto, se muestra el cuadro con la composición porcentual de la biomasa y el gráfico de barras con los porcentajes elementales de la composición de la muestra.

Se determinó el porcentaje elemental presente de los oligoelementos en la biomasa recuperada a nivel de bidones por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con energía dispersiva (Cuadro 16). Los análisis de la incorporación porcentual de los oligoelementos demostraron que los tratamientos suplementados con Se y Mn fueron los que bioasimilaron la mayor proporción de Se, Mn y Co. El tratamiento suplementado con Manganese presento mayor porcentaje de Manganese, duplicando el contenido de este elemento en comparación a los otros tratamientos.

Respecto al porcentaje elemental de Zinc en la biomasa de los diferentes tratamientos se definió que el tratamiento de Manganeso y Zinc consecutivamente son los que poseen mayor porcentaje de este oligoelemento, y se determinó que los tratamientos de Selenio, Cobalto y Control poseen valores menores al 1%.

Cuadro 16. Determinación del porcentaje elemental de la biomasa liofilizada de *I. galbana* usando Microscopía electrónica de Barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva en la biomasa obtenida de los cultivos en bidones (15 L) con medio industrial MT09 y medio industrial suplementado con los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 100 ppm

Oligoelemento	Repetición	Porcentaje elemental de (%)											
		C	O	Co	Se	Mn	Zn	Ca	Si	S	P	Al	Na
Co	A	75,8	24,1	0,1									
Co	B	73,6	20,1	0,4	1,7	0,2	0,9	0,4				2,7	
Co	C	55,1	40,5	0,2	3,2	0,2	0,2	0,1				0,4	
Mn	A	61,4	23,6	0,4	8,9	0,6	3,8	0,2	0,2		0,2		
Mn	B												
Mn	C	58,7	28,9	0,3	3,4	0,4	3,1		1,7		1,5		
Se	A	54,6	21,4	0,4	5,8	0,2	0,6	16,1				0,8	
Se	B	51,4	21,1	0,5	6	0,3	0,8	19,8					
Se	C	58,6	24,9	0,3	5,8	0,2	0,5	9,4			0,5		
Zn	A	54,3	33,2	0,3	6,4	0,4	2,1		1,8				
Zn	B	54,2	37,1	0,2	3	0,1	1,4		1,2	1,4	1,3		
Zn	C	58,4	26,6	0,4	3,1	0,2	1,4	6	1,4	1,1	0,8		
Control	A	56,90	35,6	0,18	1,55	0,12	0,95		0,47	3,44	0,49		0,26
Control	B	63,2	30,6	0,1	1,7	0,1	0,2		0,5	2,2	0,3		1,2
Control	C	63,4	33,4	0,1	1,2	0,1	0,2		0,2	0,9			

Tras el análisis de las biomásas se determina que el tratamiento con Se proporcionó el mayor crecimiento celular, productividad de biomasa y mayor abundancia de oligoelementos, por lo que se analizó en esta biomasa el perfil de lípidos por sus insaturaciones. La concentración de lípidos de la biomasa de la cepa MT09 de *I. galbana* cultivada en el medio suplementado con el oligoelemento selenio, evidenció una pobre acumulación de grasa, siendo 0,709 0,057) g/100 g. El perfil de lípidos obtenido evidencia mayor contenido de Grasa Saturada ($31,6 \pm 3,0$) g/100 g de grasa, Grasa Monoinsaturada ($25,2 \pm 1,9$) g/100 g de grasa y Grasa Poliinsaturados ($43,2 \pm 4,1$) g/100 g de grasa. El índice de yodo calculado a partir del perfil de lípidos es de 111.6.

Chlorella vulgaris

Para el análisis de biomoléculas y pigmentos presentes en la biomasa se determinó que el medio industrial sin suplementar (Control) presentó mayor contenido de clorofila a (3.82 µg/mg), clorofila b (3.82 µg/mg), clorofilas totales (5.22 µg/mg) y carotenoides (1.032 µg/mg) ya que ningún cultivo suplementado con oligoelementos superó la producción de pigmentos del tratamiento control (Cuadro 17). Sin embargo, se determinó que los tratamientos con selenio, zinc y manganeso presentaron Clorofila c.

Por otro lado, los cultivos suplementados con selenio presentaron una mayor producción de proteínas (35.91 µg/mg) y carbohidratos (254,26 µg/mg) y los cultivos con Manganeso fueron los segundos más bajos en producción de pigmentos (excepto Clorofila C) y carbohidratos, y los más bajos en proteínas (19.48 µg/mg). Además, otra peculiaridad es que los cultivos de Cobalto en bidones no presentaron incremento en su densidad celular, sin embargo, aun así, se obtuvo una producción de 30.08 µg/mg de proteína, una producción cercana al control (30.96 µg/mg) y cerca de la mitad de producción de carbohidratos (93.07 µg/mg) respecto control (203.07 µg/mg), por lo que el tratamiento con Cobalto presentó una mayor proporción de proteína/carbohidrato (Cuadro 17).

Cuadro 17: Concentración de clorofila a, clorofila b, clorofila c, clorofilas totales, carotenoides, proteínas y carbohidratos presente en la biomasa liofilizada de los cultivos de *C. vulgaris* a nivel de bidón en medio industrial con y sin los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 20 ppm.

Tratamiento	Concentración (µg/mg)						
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c	Clorofilas totales	Carotenoides	Proteína	Carbohidratos
Control	3.82	3.82	0	5.22	1.032	30.96	203.07
Cobalto	0.41	0.41	0	0.29	0.081	30.08	93.07
Selenio	1.46	1.46	0.21	2.27	0.447	35.91	254.26
Zinc	1.90	1.90	0.17	3.20	0.588	30.25	204.66
Manganeso	1.43	1.43	0.19	2.67	0.5625	19.48	100.90

Referente al cultivo de *C. vulgaris*, la concentración elemental por EDS en la biomasa liofilizada, indica que el tratamiento con Mn permite el aumento de este elemento, no detectado en los demás tratamientos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Determinación del porcentaje elemental de la biomasa liofilizada de *C. vulgaris* y su desviación estándar (n=3) usando Microscopía electrónica de Barrido (SEM): Fluorescencia de Rayos X con Energía dispersiva en la biomasa obtenida de los cultivos en bidones (15 L) con medio industrial y medio industrial suplementado con los oligoelementos Co, Mn, Se y Zn a 20 ppm.

Elemento (%MS)	Control	Cobalto	Selenio	Manganeso	Zinc
Oxígeno	41,37 ± 4,42	N.D	43,10 ± 9,14	50,60 ± 4,10	43,23 ± 5,25
Carbono	49,80 ± 1,73	N.D	50,10 ± N.D.	28,10 ± 0,01	40,86 ± 6,09
Calcio	0,37 ± 0,21	2,10	2,67 ± 1,63	1,17 ± 1,15	0,20 ± 0,14

Elemento (%MS)	Control	Cobalto	Selenio	Manganeso	Zinc
Selenio	N.D	N.D	3,00 ± 0,01	2,00 ± 0,01.	5,20 ± 0,01
Manganeso	N.D	N.D	N.D	19,60 ± 14,31	N.D
Cobalto	N.D	26,70 ± 2,08	N.D	N.D	N.D
Zinc	N.D	N.D	N.D	N.D	2,70 ± 1,44

El análisis de la proteína de *Chlorella vulgaris* revela una abundancia de aminoácidos esenciales, destacándose el Glu (2.38%) y la Ala (1.57%), mientras la Tyr y la Phe es el aminoácido con menor concentración. El total de proteína cuantificada como aminoácidos es del 11.29% en biomasa (Cuadro 19).

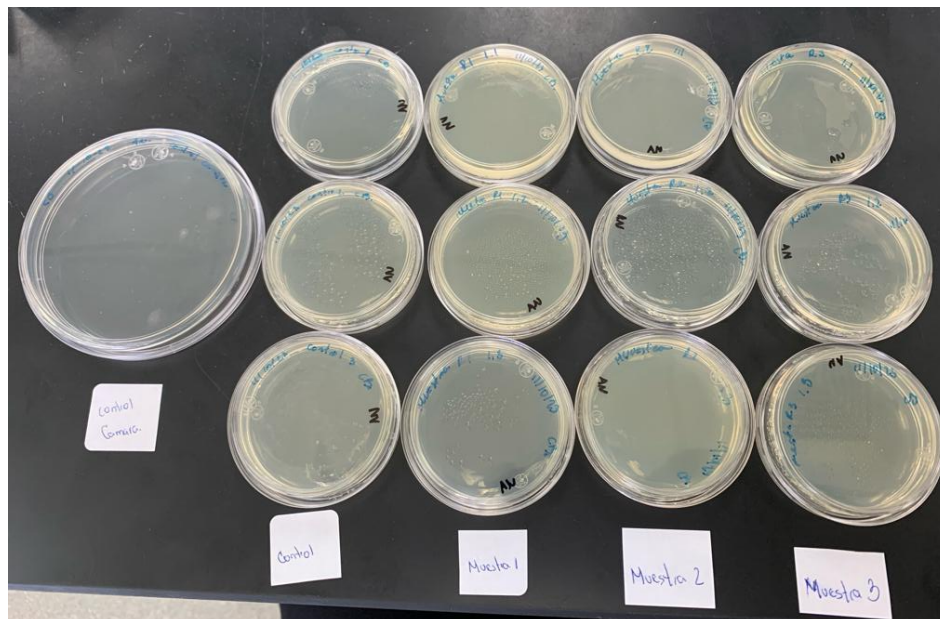
Cuadro 19. Porcentaje de aminoácidos en la biomasa de *C. vulgaris*.

Aminoácido	% en Biomasa
Phe (Fenilalanina)	0.67%
Leu/Isoleu (Leucina/Isoleucina)	1.02%
Pro (Prolina)	0.72%
Met (Metionina)	0.46%
Val (Valina)	0.54%
Tyr (Tirosina)	0.12%
His (Histidina)	0.26%
Ser (Serina)	0.85%
Glu (Glutamato)	2.38%
Ala (Alanina)	1.57%
Asp (Aspartato)	0.95%
Lys (Lisina)	0.92%
Arg (Arginina)	0.85%
Suma Total	11.29%

OE3: Establecer un prototipo de alimento funcional conforme al RTCA y Códex alimenticio.

Actividad 3.1 Desarrollar un núcleo proteico mineralizado para aves y peces.

Con el objetivo de desarrollar un prototipo de un núcleo como suplemento proteínico y probiótico para aves y peces a con microalgas y probióticos, tras implementar el protocolo de inoculación y activación en el alimento, las muestras preparadas no presentan crecimiento en medio TSB a las 24 y 48 horas. En este caso se concluye que no se activó el probiótico correctamente como se demuestra en la figura 12.



Figuras 12. Muestras de platos sin crecimiento de probiótico en alimento.

Se logro observar que los tratamientos inoculados con el probiótico, deshidratadas en el sol, son más propensas a que se genere hongo, en comparación a las secadas en el horno a 60 °C por 60 minutos, para su almacenamiento se recomienda secar el alimento y asegurar que su porcentaje de humedad sea aproximadamente 5 a 10 % (Figura 13).



Muestras secado solar



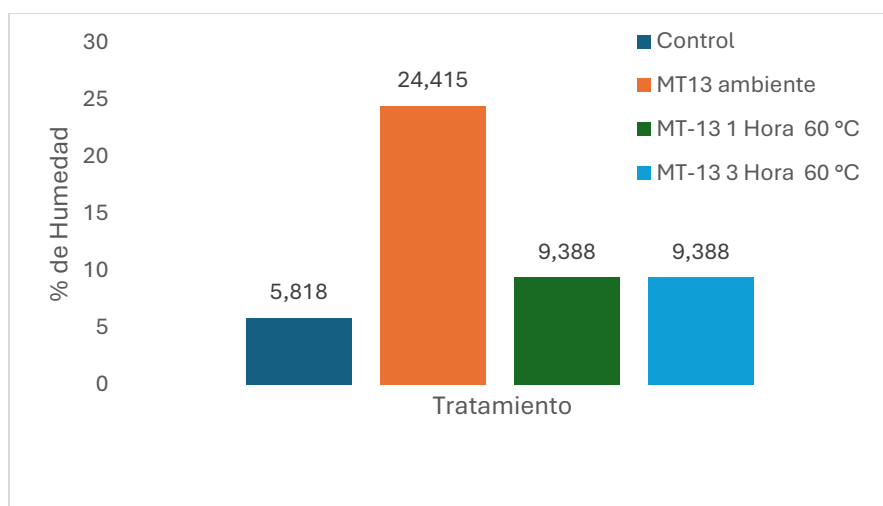
Muestras a 60°C

Figuras 13. Comparación de almacenamientos de muestras a condiciones de secado diferentes.

La comparación de condiciones de secado de los tratamientos suplementados con el probiótico y la microalga para definir condiciones óptimas para su almacenamiento resultó que las muestras a 60 °C se logran reducir su humedad hasta 9 % (Cuadro 20, Figura 14).

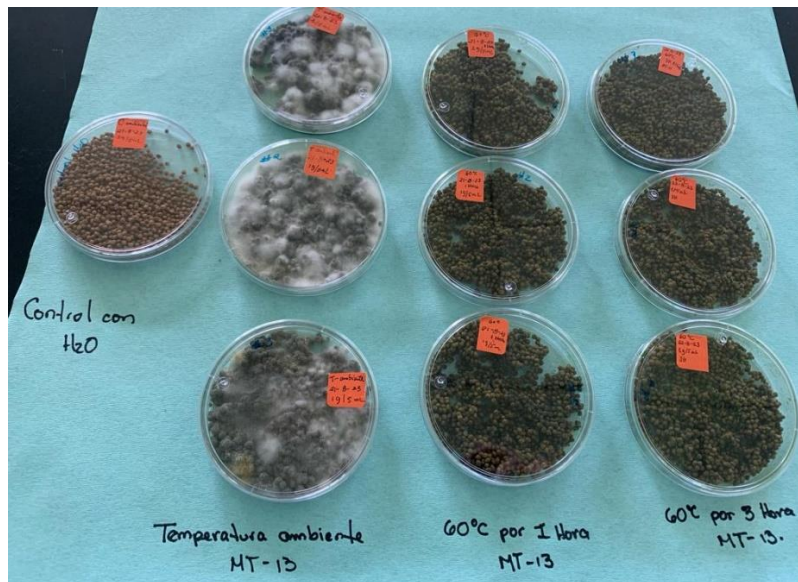
Cuadro 20. Comparación de condiciones de secado de alimento.

Muestras	Masa (g)	% Humedad	Promedios	desviaciones
Alimento sin agua (Control)	1,2550	5,732	5,818	0,0620
Alimento sin agua (Control)	1,0025	5,846		
Alimento sin agua (Control)	1,3320	5,876		
Microalga- temperatura ambiente	1,0076	24,281	24,415	0,1289
Microalga- temperatura ambiente	1,0247	24,589		
Microalga- temperatura ambiente	1,0254	24,375		
Microalga- temperatura 60 °C 1 hora	1,0190	9,305	9,388	0,0682
Microalga- temperatura 60 °C 1 hora	1,0266	9,472		
Microalga- temperatura 60 °C 1 hora	1,0041	9,387		
Microalga-temperatura 60 °C 3 hora	1,0097	9,305	9,388	0,0682
Microalga-temperatura 60 °C 3 hora	1,0068	9,387		
Microalga-temperatura 60 °C 3 hora	1,0015	9,472		



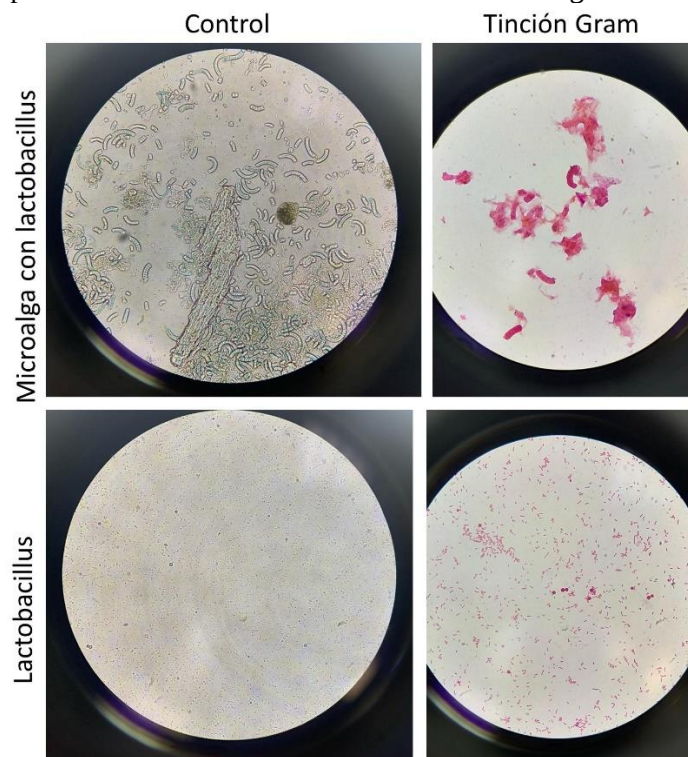
Figuras 14. Porcentaje de humedad promedios de las muestras de alimento. Los tratamientos con microalga se abrevian como MT13 a temperatura ambiente, y el secado a 60°C en diferentes tiempos: MT13 1 hora y MT13 3 horas.

Se logro observar que no hay crecimiento de hongos en el alimento, las muestras secadas en el horno de convección a 60 °C entran en el rango de la temperatura adecuada para almacenamiento de alimento (Figura 15).



Figuras 15. Muestras de alimento a diferentes condiciones de secado.

Se ajusta la activación de probiótico en medio ácido a pH=2 en donde se deja reposar por un periodo de media hora mínimo para poder realizar su aplicación en el alimento. Se realizan unos ensayos de La tinción de Gram para saber si se activó correctamente el microorganismo en estudio (Figura 16).



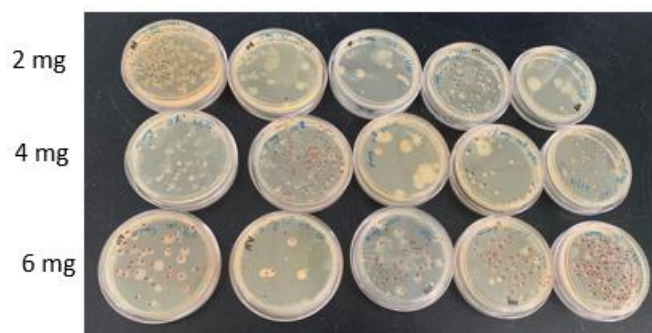
Figuras 16. Conformación de activación de Lactobacillus en agua estéril a pH=2.

Se realiza la inoculación de alimento a tres concentraciones 2 mg/mL, 4 mg/mL y 6 mg/mL como se indica en el Cuadro 21, Figura 17 y se secaron a 60 °C por una hora. Se evidenció la presencia del

probiótico en el alimento a las diferentes concentraciones estudiadas, siendo la concentración 2 mg/mL la recomendada por el proveedor. Se realizaron dos concentraciones más de prueba con la finalidad de ver si era necesario ajustar la inoculación y asegurar la presencia del probiótico en el alimento. La concentración se estima a partir de la primera dilución como 470 UFC/mL, 310 UFC/mL y 380 UFC/mL al inocular 2, 4 y 6 mg/mL de la bacteria liofilizada.

Cuadro 21. Resultados del recuento de colonias de *Lactobacillus* en las diluciones seriadas.

Muestras	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
2 mg/mL	47	20	7	58	12
4 mg/mL	31	121	11	25	35
6 mg/mL	38	9	147	49	105



Figuras 17. Diluciones seriadas realizadas para las muestras de alimento.

Desarrollo de fitoplancton para uso acuícola.

El proceso de cultivo y cosecha permitió la obtención de biomasa concentrada mediante centrifugación (Figura 18). El ajuste del pH permite una conservación en refrigeración para su uso directo en cultivos acuícolas como alimento vivo para larvas de especies comerciales como el camarón, el pargo o especies ornamentales.



Figura 18. Formulación acuosa en pasta.

Se obtiene un concentrado, 1 kg de producto (empacado en presentación de 100 g) se envió para análisis y el resultado revela una densidad: 1.01 g/mL, un pH elevado, la conductividad: 11.9 μ S y la Humedad: 89% (m/v). El resultado de análisis es:

Lote 2023.02.20
Temperatura de almacen 2-6°C
CAS Number N.A

Especificaciones Fisicoquímicas:

Ensayo	SPECIFICATION	RESULTS
Densidad	1.01 g/mL	Pasa
pH	9-10	9,8
Concentración Celular (85% humedad)	2 x 10 ⁹ cel/mL	Pasa
Apariencia Color* Textura	Verde brillante Producto líquido espeso	
Olor	césped	césped
Insolubles (exceptuando el alga)	Ninguno	Pasa
Análisis Nutricional del producto líquido		
Extracto grasa g/100 g		Menor a 0,1
Proteínas (N x 6,25) g/100 g		5,342 $\pm$ 0,073
Carbohidratos		2,49 $\pm$ 0,26
Humedad (g/100 g)		89%
Minerales como cenizas (g/100 g)		1,769 $\pm$ 0,064
Calcio (mg/100 g)		36,4 $\pm$ 6,2
Sodio (mg/100 g)		444 $\pm$ 59
Carotenoides (mg equivalentes de b-caroteno)		37,0 $\pm$ 3,7
Valor energético total	Sola para información	131 (31) kJ/100 g (kcal/100 g)
Valor energético por grasa	Sola para información	0(0) kJ/100 g (kcal/100 g)

* Color escala RGB

Información de Uso

Entre las recomendaciones para su uso es importante mantener a una temperatura de 2 a 6 ° C de refrigeración

Vida Útil: En refrigeración, después de abierto, el producto puede permanecer viable para uso por 5 semanas.

El producto se puede congelar para extender su vida útil si no se consume dentro de las próximas 4 semanas después de abierto. Se aconseja el uso del producto refrigerado, pues el congelamiento puede afectar la integridad celular.

Dosis de aplicación: A criterio técnico del productor, en base a la concentración celular informada, tomando en cuenta la especie acuícola y estadio de crecimiento

Otras notas:

Tamaño celular: 1 a 3 μ m

El producto puede emitir dimetilsulfoniopropionato, naturalmente producido por la especie de microalga, que se percibe como un olor a azufre, acelerado por la pérdida de la cadena de frío.

Actividad 3.2 Desarrollar un prototipo de alimento funcional para humanos

Problema y oportunidades

Actualmente se busca el desarrollo de productos estables en estantería y ricos en nutrientes, ideales para contribuir a la nutrición del consumidor en el mundo en desarrollo. Las microalgas son una fuente alimenticia variada que ofrecen altos niveles de proteínas, vitaminas y minerales y se proponen como un ingrediente funcional en la formulación de un alimento de baja humedad. Se identifican como tendencias de mercado 5 tendencias (Figura 19).



Figura 19. Necesidad por segmento de cliente

El producto que se desea desarrollar obedece a las características de alto contenido proteico y es viables para la elaboración de cereales y snacks enfocado en las necesidades de un segmento de consumidor según se resalta

B to B.

- Industrias de alimentos buscan nuevos ingredientes para innovar en sus productos dirigidos a consumidor vegetarianos, veganos.
- Industrias de alimentos buscan nuevos sabores (asiáticos, marinos) para innovar en sus productos del tipo snack

B to C

- Personas veganas buscan productos ricos en proteínas vegetales con otros beneficios alimenticios adicionales para cubrir sus necesidades nutricionales en los tiempos de merienda
- Personas sin preferencias alimentarias buscan productos ricos en proteínas con beneficios alimenticios adicionales para cubrir sus necesidades nutricionales después de ejercitarse

Inteligencia competitiva

Esta sección presenta un resumen de los diferentes grupos de productos alimenticios a base de espirulina que se encuentran en el mercado. Se realizó una búsqueda contemplando fuentes comerciales, científicas y tecnológicas para obtener la información. La forma del producto más frecuente en los resultados de la búsqueda fue la harina o nutracéutico.

Inteligencia Comercial

Se realizó la búsqueda de productos comerciales ricos en proteína, con la espirulina como ingrediente principal, con los términos de búsqueda: Spirulina, Arthrospira sp, microalgae + rich protein product, protein food.

Los sitios de búsqueda fueron el portal sobre información nutricional del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=spirulina> y Google imágenes.

Se encontraron resultados de diferentes productos a base de la microalga, en su forma pura como harina y en productos más procesados con ciertos porcentajes de inclusión, usualmente no indicado.

Inteligencia Científica

Se realizó búsqueda de artículos científicos en los sitios: Web of Science, Scopus, Google académico y otras bases de datos académicos sobre la investigación reciente (últimos 5 años) en torno a la elaboración de productos que incorporan la espirulina.

Los principales resultados demuestran la mayor tendencia de incorporar la harina de espirulina en panes, pastas, galletas. Otro grupo de alimentos donde se incorpora es en barras de cereal. También se está implementando en fermentaciones lácteas, con un efecto promotor del crecimiento en las bacterias ácido lácticas, donde el alga es viable para crecer.

Una menor aplicación se refleja en productos extruidos, sin embargo, es la técnica de procesamiento que ha permitido una mayor inclusión (hasta 40% de la composición) al logra enmascarar las cualidades sensoriales, que son el principal factor limitante para lograr altos niveles de inclusión en los alimentos

Inteligencia Tecnológica

Se recurrió a la información contenida en patentes. Se acceso a través de los sitios de patentes Patent Scope, Google patents y Derwent.

Se encuentran resultados sobre cientos de patentes en los temas de desarrollo de tecnologías para la producción, enfocadas en vencer las barreras climáticas, principalmente estacionales en países como España, Francia, Estados Unidos y China. Se encuentran resultados para los procesos de extracción y purificación de moléculas de interés. Para el caso de las proteínas se realiza ruptura de pared celular, se extraen lípidos y clorofila con solventes etanoicos. Sobre los productos alimenticios, se escogen aquellas patentes que ya comercializan el producto.

Productos a base de microalgas en el mercado

Con base en la revisión de información de inteligencia competitiva se indican los productos más populares:

Harina: La búsqueda de productos comerciales evidenció una alta oferta de productos de microalgales, especialmente espirulina en forma de harina, de color verde azulado oscuro, característico de la microalga. La presentación usualmente es de 250g a 500 g en bolsas metalizadas resellables o en frascos de tapa ancha.

Suplementos: La presentación nutracéutica es bastante común en el mercado, se presenta como pastillas (tabletas) que incorporan la carboximetil celulosa como ingrediente aglomerante. También es frecuente el resultado de productos en forma de cápsulas de gelatina o de celulosa. El peso de cada cápsula usualmente es de 500 mg y se recomienda el consumo diario de 3 cápsulas (Figura 20).

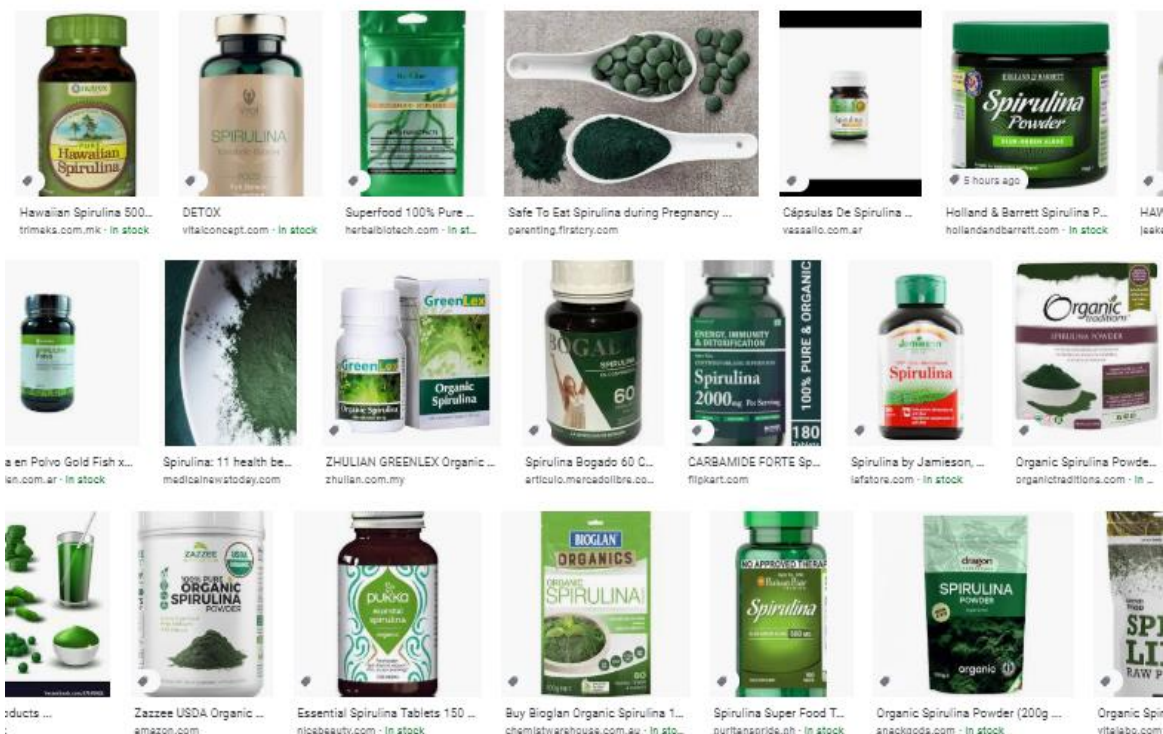


Figura 20. Imagen de los resultados generales de Google imágenes al ingresar el término “Spirulina+food”.

Panadería y repostería: Los principales resultados demuestran la mayor tendencia de incorporar la harina de imcroalgas en panes, pastas, galletas. Otro grupo de alimentos donde se incorpora es en barras de cereal. También se está implementando en fermentaciones lácteas, con un efecto promotor del crecimiento en las bacterias ácido lácticas, donde el alga es viable para crecer.

Una menor aplicación se refleja en productos extruidos, sin embargo, es la técnica de procesamiento que ha permitido una mayor inclusión (hasta 40% de la composición) al logra enmascarar las cualidades sensoriales, que son el principal factor limitante para lograr altos niveles de inclusión en los alimentos. Los panes, queques y galletas con espirulina se encuentran principalmente en artículos científicos, y son escasos los resultados de un producto empacado en el mercado (Figura 21).

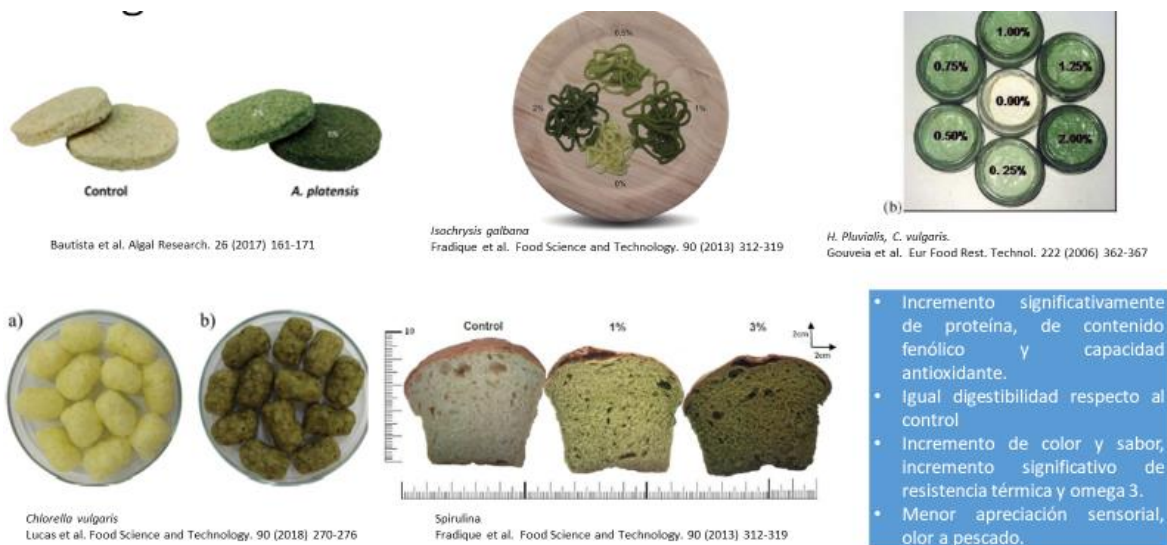


Figura 21. Resultado de productos elaborados con la inclusión de espirulina como ingrediente funcional.

Nibs: Este producto se formula en la etapa previa al secado mediante la extrusión fría de la pasta, cosechada por métodos de filtración. Las temperaturas de secado no superan los 50 °C, lo que permite conservar el valioso perfil nutricional funcional de la espirulina fresca, además se mantienen cualidades de sabor y aroma suave con tonos costeros y a hierbas. Esta forma de la espirulina es menos disponible en el mercado, usualmente el proceso de producción es en escala piloto, no industrializado y se resalta el proceso artesanal y térmicamente menos invasivo en la calidad nutricional (Figura 22).



Figura 22. Pellets, nibs o sticks de diferentes marcas en el mercado.

Bebidas: Las bebidas con microalgas emplean espirulina usualmente el extracto de ficocianina que es de un color azul brillante, pocos productos comerciales incorporan el alga entera. A continuación, se muestran los resultados de los productos identificados mediante la inteligencia competitiva (Figura 23).



Figura 23. Bebidas comerciales a base de microalgas que cuentan con una patente asociada.

La bebida de True fruits incorpora la espirulina entera, mientras que B.Blue y Smart-chimp son a base de la ficocianina presente hasta en 14% en la espirulina.

Snacks Extruididos y Barras de cereal

La elaboración de productos tipo snack es numerosa, principalmente se incluye como ingrediente colorante y para aportar proteína, sin ser un ingrediente destacado en la formula del snack. Algunos de los productos que rescatan la inclusión del alga y con grados de inclusión mayores al 3% se dirigen a un público deportista o atleta y otros se elaboran como objeto de investigación sin llegar a recomendar una inclusión mayor al 6% debido a las propiedades colorantes y sabor intenso (Figura 24).

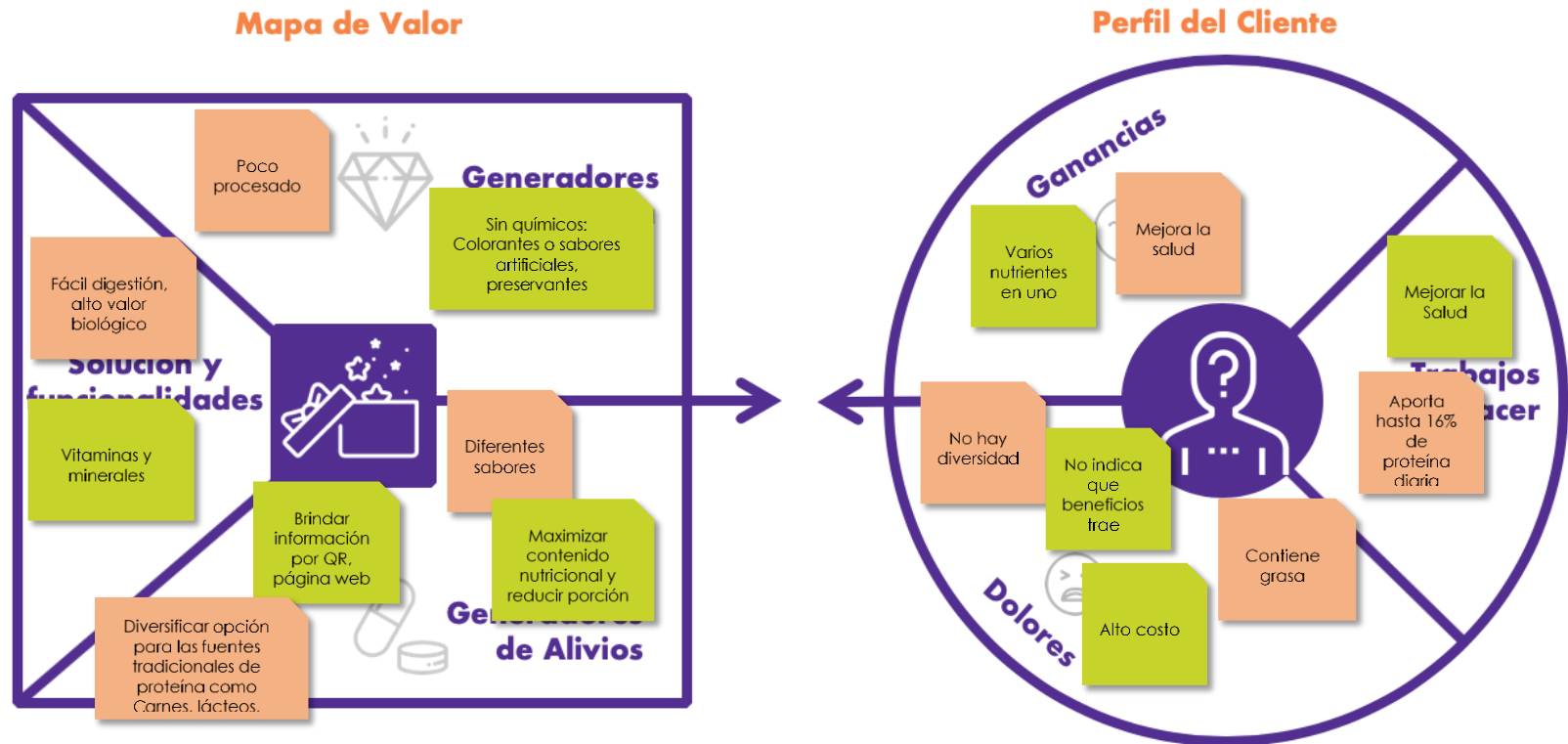


Figura 24. Imágenes de productos snack comerciales que contienen espirulina

Canvas de la propuesta de valor

Se construyeron las propuestas de valor para dos perfiles de consumidor potenciales.

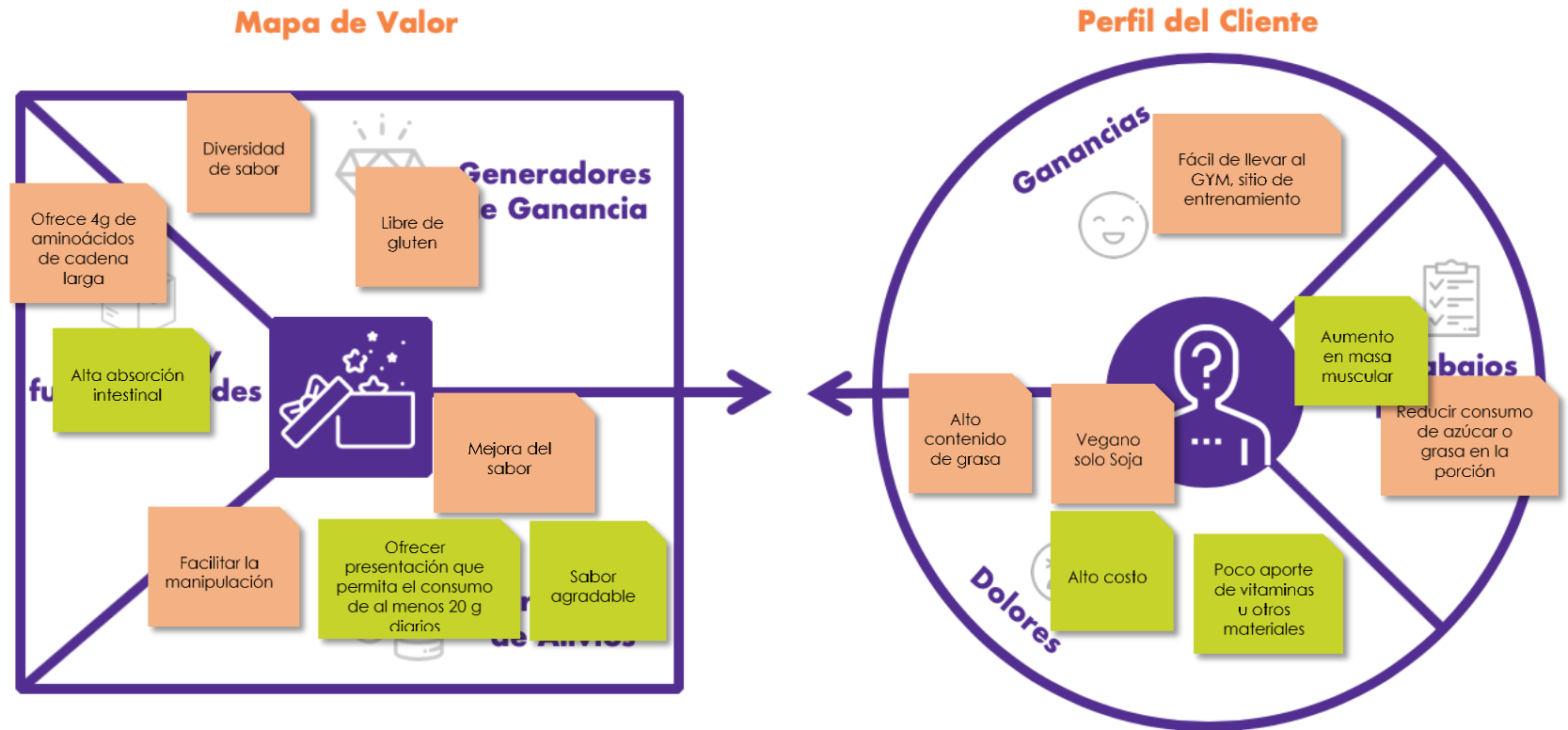
Cliente 1. Personas entre 20 a 35 años sin problemas evidentes de salud, cuidan la apariencia física a través de la dieta y necesitan fuentes de proteína versátil para preparar platillos en su casa.



Declaración de la propuesta de valor:

Fuente de proteína a partir de Spirulina en forma de nibs que permite su uso en recetas como batidos y ensaladas

Cliente II: Personas mayores de 17 años que practican actividad física de alto rendimiento, se ejercitan al menos 3 veces a la semana y requieren mantener o aumentar masa muscular.



Declaración de la propuesta de valor:

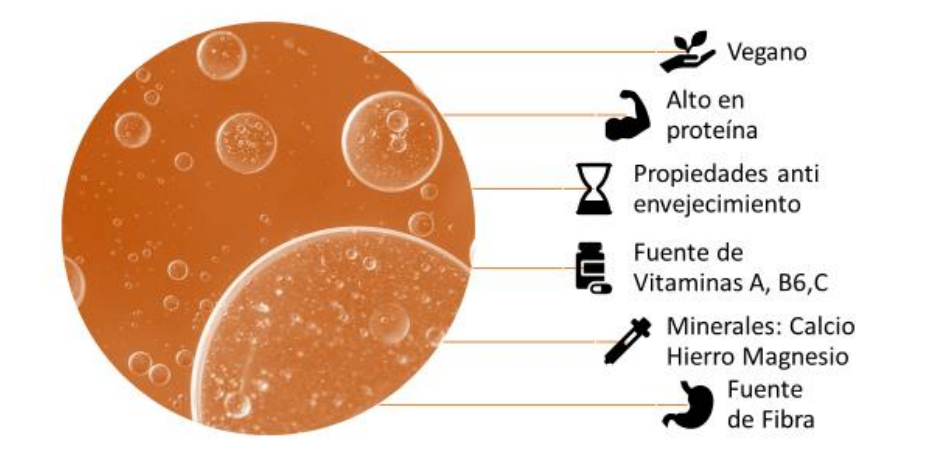
Producto en polvo, rico en proteína hasta 65% de la composición con 150 kcal y carbohidratos de hasta 20%, con al menos tres sabores

Validación de la propuesta a través de entrevistas y ejercicios de innovación

Se construyeron 2 ejercicios de innovación para productos genéricos ricos en proteína, que permitan modelar las características de una formulación del producto. Los juegos se realizaron a través de la plataforma virtual Menti.com en forma de enunciados con opciones de respuesta abiertas, para lo cual se generan los resultados de forma práctica e interactiva.

El primero juego consiste en descubrir atributos importantes para los consumidores finales (Figura 25). Se presenta algunos atributos generales y se solicita la indicación de otros atributos.

Atributos del producto



Se presentan los atributos de un producto rico en proteína. Si pudieras agregar más atributos, cuáles serían?



Figura 25. Atributos importantes según los consumidores para un producto rico en proteína

Libre de Gluten. Los resultados evidencian un atributo importante, como lo es la formulación libre de gluten, lo que sugiere que el producto no debería contemplar el uso de trigo, cebado o derivados en su formulación.

Suplemento muscular y fuente de energía. Entre los resultados, también es importante que el producto favorezca el desarrollo muscular y se presente como fuente de energía. Los productos que se enfocan en promover el desarrollo muscular (hipertrofia) contienen entre 60 y 80% de proteína en la

formulación del producto, para consumo en porciones de 30 a 50 g, para un aporte proteico entre 20 a 30 g de proteína, por lo que el perfil nutricional del producto podría cumplir con dichos atributos.

Un segundo juego contempló los atributos mencionados por los consumidores potenciales para contrastar la importancia de los atributos del producto respecto al costo que podría implicar dicho atributo en el prototipo de producto a formular (Figura 26).

Dispones de 3800 colones para comprar características de un producto rico en proteína. ¿Cómo gastarías tu dinero? ¿Qué compras primero?

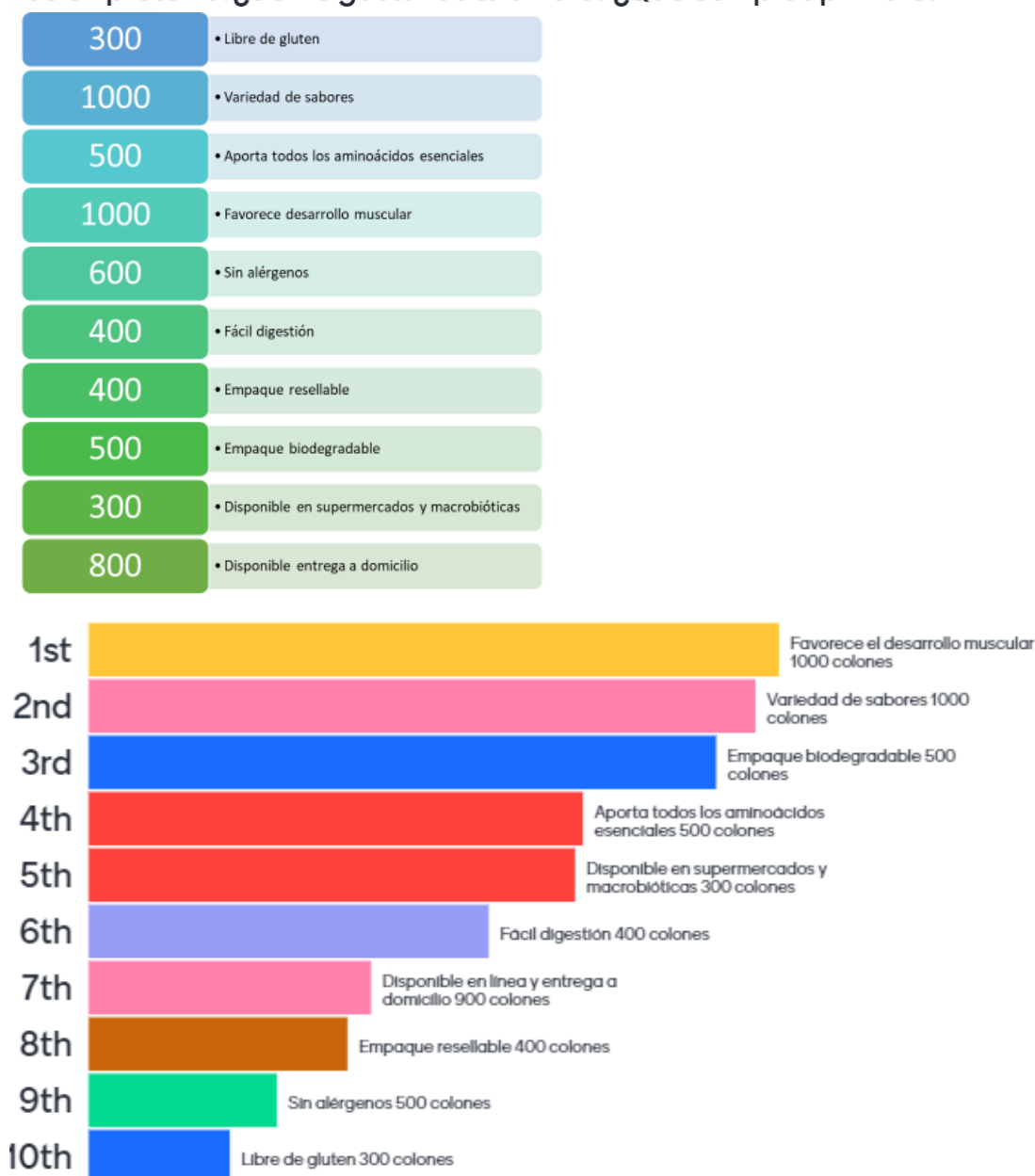


Figura 26. Importancia para el cliente del orden de los atributos de un producto rico en función del precio

El resultado indica la importancia de que el producto pueda favorecer el desarrollo muscular. Para lograr este objetivo en el cliente, se debe aportar principalmente leucina, isoleucina y valina en la composición de aminoácidos (al menos 4 g por porción). El perfil proteico de la espirulina contiene un 6% de leucina, 3% de isoleucina y 5% de valina, aunados aportan un 15% de aminoácidos de cadena ramificada que en un tamaño de porción de 40 g aporta 4g de estos aminoácidos, por lo que es factible tener este atributo en el prototipo de producto.

La variedad de sabores es otro de los atributos importantes. A nivel tecnológico este aspecto se puede desarrollar durante el procesamiento previo al secado del producto.

El tercer atributo importante es el empaque biodegradable y se podría superar al ofrecer el producto en una bolsa de papel resellable con un forro interno de plástico biodegradable

Validación del producto mínimo viable

Producción

El proceso para la producción de los nibs se muestra en el siguiente diagrama (Figura 27).

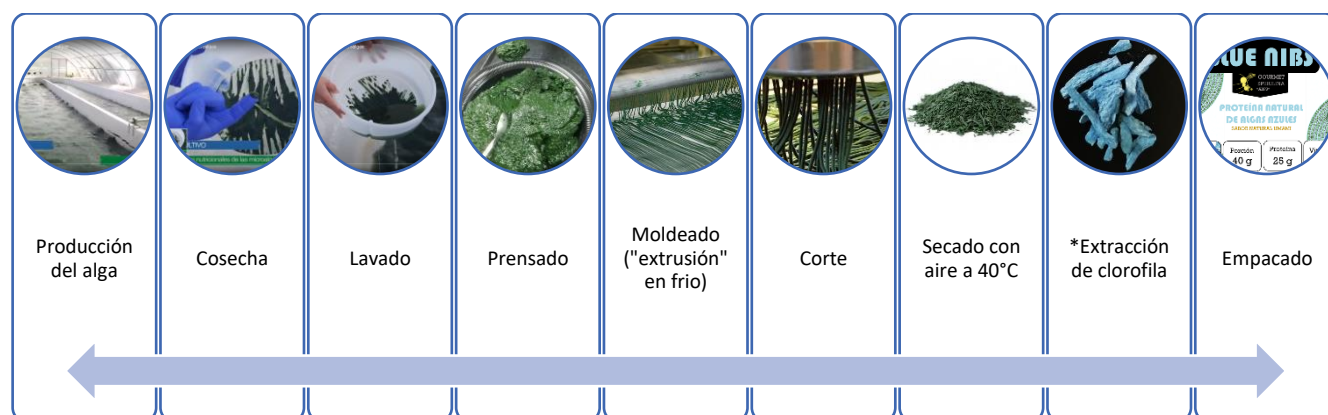


Figura 27. Etapas generalizadas para la producción de nibs de microalgas.

Tras las pruebas de elaboración del producto es importante mencionar que el proceso debe realizarse de forma continua, evitando una fase de refrigeración o congelamiento de la biomasa antes del secado (Figura 28), ya que se generan procesos de oxidación y pérdida de la estructura que permite el moldeado. Para el producto en polvo el efecto del congelamiento en el sabor es menor.



Figura 28. Proceso de secado de los nib en deshidratador vertical

Empaque sugerido

Se sugiere el empaque de los Nibs en bolsas de papel externamente con forro interno de material bio-compostable o biodegradable. Las bolsas se venden en paquetes de 100 unidades a un costo de 25 000 colones al por menor. También se indica el uso de bolsa metalizada pensada en la comercialización del producto en polvo (Figura 13). La porción con mayor aceptación por parte de los consumidor potenciales es la de 40 a 60 g de producto.



Figura 29. Empaques sugeridos

Pruebas con el producto.

Respecto al sabor se indica:

- “No es un sabor desagradable, pero es un sabor diferente y algo extraño”
- “Sabe ligeramente a menta, el sabor es prolongado”
- “Pensé que contenía chile, tuve la sensación de que iba a picar, pero no fue así, fue una sensación extraña pero agradable”
- “No es delicioso, pero tampoco sabe feo, el sabor es intermedio”.
- “Pensé que sabía similar al pescado, pero el sabor es diferente, lo consumiría después del ejercicio”

Respecto al olor se indicaron diferentes descriptores indicado en paréntesis la cantidad de personas que coincidieron su descripción de olor:

- Hierbas secas (1)
- Condimentos (1)
- Marisco (2)
- Pescado (3)
- Café (1)

El resultado de la encuesta empleando la escala hedónica permitió conocer el grado de aceptación en cuanto a olor, textura y sabor (Figura 30).

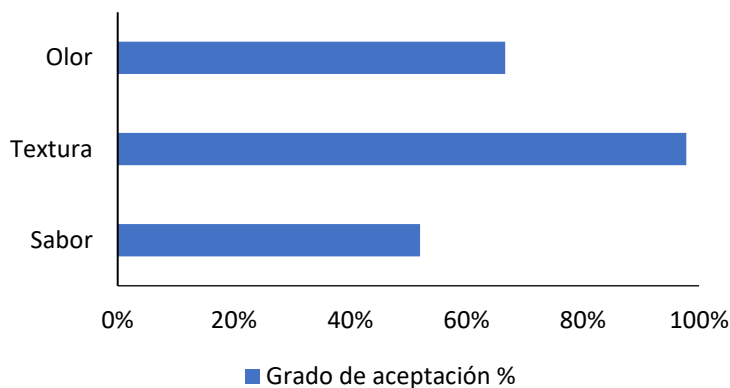


Figura 30. Grado general de aceptación de los Nibs en el consumo directo.

Entrevista con expertos

Se mostró el producto a dos empresarios locales que producen alimentos y comercializan los productos Online.

Se proponen los Nibs como PMV para el perfil de Cliente I, que opta por el producto en forma de Nibs (granulado y se puede incorporar en diferentes preparaciones caseras) como Early Adopters con un empaque en bolsa de papel, de 60 g, con porciones de consumo de 10 gramos diarios para incorporar en recetas caseras, donde se sugieran formas de consumo o preparación a través de un sitio web o en el empaque. El precio de una bolsa de 60 g es de 4000 colones.

2. Se descarta el Canvas de propuesta de valor de los Nibs como producto para deportistas que practican gimnasio o CrossFit, ya que necesitan variedad de sabores y un producto en polvo que es la opción que buscan regularmente para preparar después de ejercitarse, se propone en esta línea la elaboración de un producto tecnológicamente más complejo, que involucra la mezcla con sabores como chocolate o banano para enmascarar el sabor y ofrecerse en forma de polvo para preparar en forma de shake. Para el desarrollo de este producto se requiere más investigación y desarrollo para poderse ofrecer.

3. Se tuvo acercamiento con dos Pymes que producen alimentos y desean diversificar sus productos para lo que los Nibs de micrialgas les parece una opción versátil para incorporar en chocolates o en una barra de proteína dirigida a deportistas de alto rendimiento como triatlón o ciclismo y para lo cual esperan tener muestras para realizar pruebas en la elaboración de este tipo de productos. Se propone este perfil de Cliente en el Lean Canvas como Early Adopter del producto en forma de Nibs para suplementar barras de cereal

Aplicación final en una Barra de cereal

De acuerdo a los bajos puntajes en la característica del sabor, se vio la necesidad de hacer investigación adicional para mejorar este aspecto en el proceso de fabricación de Nibs para posteriormente generar una barra de cereal como aplicación final propuesta en la presente investigación, esta actividad se abordó como parte del TFG del estudiante Caleb Corrales Picado (Apéndice 2). La aplicación final de la biomasa es la barra de cereal, se elaboraron los prototipos en la planta de Alimentos de la Escuela de Agronegocios (Figura 31).

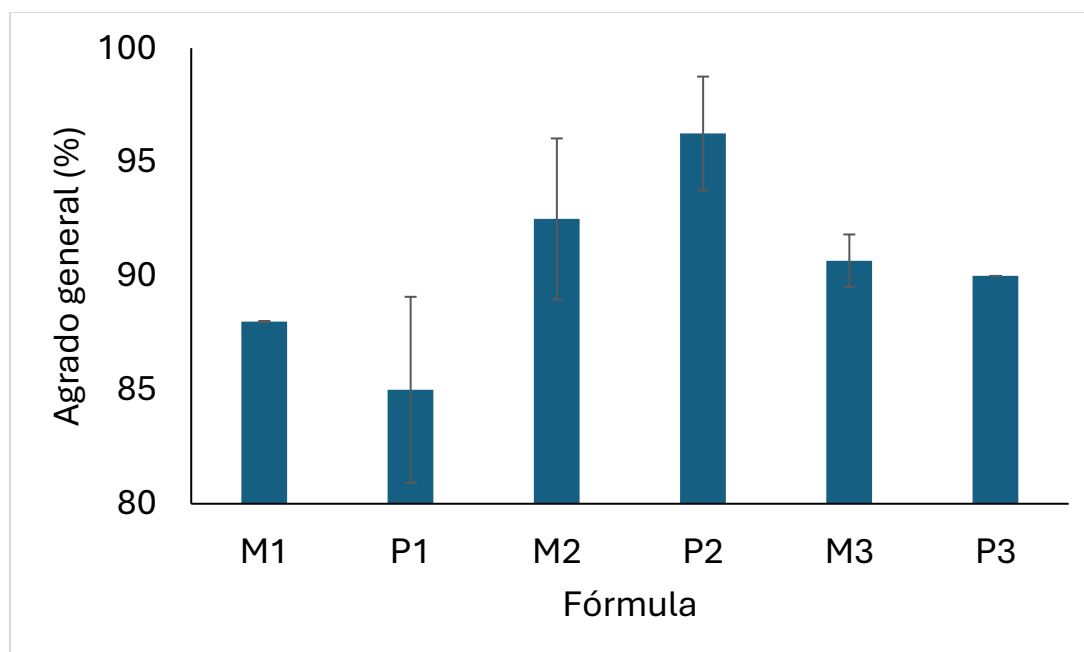


Figura 31. Elaboración y evaluación del agrado general de 6 formulas de una barra de cereal para suplementar con biomasa de microalgas enriquecidas con selenio.

Formula seleccionada ajustada

La formula de P2 fue la que obtuvo mayor puntuación del agrado general, ajustada contiene un 4% de biomasa microalgal, entre las sugerencias de mejora se indica añadir el maní troceado para facilitar la masticabilidad, a la vez que se puede mejorar la crujencia asegurando las condiciones de horneado definidas (Cuadro 22).

Cuadro 22. Formula alimenticia para una barra de cereales suplementada con nibs de microalgas.

Ingrediente	P2
Granola	26,0
hojuelas de arroz	13,0
Azúcar morena	13,2

Sirope de Glucosa	16,0
Agua	9,2
Grasa Vegetal	1,4
Lecitina de soya	2,0
Glucosa de alta dextrosa	4,2
Microalga <i>I. galbana</i>	4,0
Coco rayado	5,0
Pasas	3,0
Maní tostado	3,0

El resultado del perfil nutricional de la barra de cereal indica que una porción de 40 g aporta 154 kcal, además de ser fuente de fibra, y su contenido de proteína aporta el doble del contenido promedio de barras de cereal (Cuadro 23).

Cuadro 23. Información nutricional de la utilizando la formulación seleccionada.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL			
Tamaño de la porción:	40	g	
Porciones por envase:	1		
		Cantidad por porción	%VD*
Energía	644	kJ (154 kcal)	
Grasa total	4,2	g	5,4 %
Grasa saturada	0	g	0 %
Sodio	0	mg	0 %
Carbohidratos totales	26,7	g	9,7 %
Azúcares totales	14	g	28 %
Fibra	1,5	g	5,3 %
Proteína	2,3	g	4,6 %

*Porcentaje basado en los Valores Diarios para una dieta de 2000 kcal (8368 kJ) según recomendaciones de la FDA

Se analizó microbiológicamente la barra suplementada y el resultado se muestra a continuación (Cuadro 24).

Cuadro 24. Recuento microbiológico en una barra cereal suplementada con *I. galbana*.

Microorganismos	UFC/g	Limites por el RTCA
<i>E. coli</i>	0	>NMP/g
<i>Salmonella</i>	ausente	No normado
Mohos y levaduras	1,56E+03	No normado
Aerobios totales	5,28E+03	No normado

Discusión y conclusiones

En los últimos años, las microalgas, especialmente *Isochrysis galbana*, han captado considerable atención en el ámbito biotecnológico debido a su capacidad para producir una variedad de compuestos de alto valor, incluyendo proteínas, lípidos y pigmentos. La optimización del crecimiento y la composición nutricional de estas microalgas es fundamental para maximizar su utilidad en aplicaciones como la producción de alimentos, biocombustibles y nutraceuticos [32, 36].

Se observaron niveles significativamente más altos de Se y Mn en las microalgas tratadas en comparación con el control, lo que refuerza la idea de una respuesta robusta a la suplementación con estos oligoelementos. Estos resultados subrayan la importancia de optimizar los niveles de Se y Mn en los medios de cultivo para maximizar tanto el crecimiento como la calidad nutricional, con especial énfasis en *I. galbana* [32, 35]. Los resultados obtenidos indican que *I. galbana* exhibió una notable capacidad de asimilación de Se y Mn, sugiriendo una potencial sinergia entre estos elementos en la fijación celular, lo cual podría ser crucial para el diseño de estrategias de suplementación que maximicen la biodisponibilidad y la utilización de Se y Mn en las microalgas [38]. Se ha demostrado que ambos oligoelementos son cruciales para el metabolismo y la fisiología de las microalgas. Este hallazgo puede estar relacionado con la co-regulación de genes de transporte y asimilación, así como con la interacción física de proteínas involucradas en estos procesos [33].

Los resultados de la producción de esta microalga enriquecida con oligoelementos funcionalizados se aplicaron en la formulación de prototipos de alimentos para peces y humanos, con importantes aplicaciones alimentarias, siendo el Se un micronutriente esencial en humanos y animales, mientras que el Mn actúa como cofactor para varias enzimas clave [32, 35]. El estudio de rutas metabólicas para fundamentar los resultados observados reveló que las microalgas de la división Hapthophyta, entre otras habituadas en ambientes marinos, como *Nannochloropsis* sp o *Emylina* sp, metabolizan selenoproteínas, en particular *I. galbana*, expresa la glutatión peroxidasa (GPx), selenoproteína W (SelW), selenoproteína P (SelP) y la tioredoxina reductasa (TrxR), que explican los mecanismos moleculares detrás de la asimilación y el metabolismo del Se en esta microalga [36, 32]. Estas proteínas desempeñan roles cruciales en la protección contra el estrés oxidativo y en la regulación del metabolismo del Se, subrayando la importancia de continuar investigando sus funciones específicas en el contexto de la suplementación con Se y Mn.

Los resultados de este estudio sientan las bases para la producción de microalgas con alto valor nutricional y funcional en el laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología del TEC. La optimización de los tratamientos con Se y Mn podría conducir a la producción de microalgas enriquecidas con estos micronutrientes, con aplicaciones potenciales en la prevención y

tratamiento de deficiencias de Se y Mn en humanos y animales [32, 33]. Además, estas microalgas podrían ser utilizadas como ingredientes en alimentos funcionales y nutraceuticos, ofreciendo una alternativa natural y sostenible a los suplementos químicos, además del potencial de incrementar la asimilación del consumidor por estos oligoelementos funcionalizados en aminoácidos, los cuales son metabólicamente más biodisponibles que los compuestos químicos de estos elementos.

Recomendaciones

A nivel técnico los próximos pasos incluyen la evaluación de la viabilidad de estos resultados en otras cepas de microalgas, como *Chlamydomonas* y *Emiliana huxleyi*, que según la literatura poseen alta capacidad de bioacumular oligoelementos y funcionalizarlos en aminoácidos, seguido de la optimización de las condiciones de cultivo para mejorar la eficiencia de la asimilación de Se y Mn. Asimismo, la identificación y caracterización de selenoproteínas específicas involucradas en estos procesos serán cruciales para entender mejor los mecanismos moleculares subyacentes. Técnicas avanzadas como la espectrometría de masas, la inmunoprecipitación y la transcriptómica pueden ser empleadas para este propósito. Pruebas de validación de los productos desarrollados en el tercer objetivo de la investigación son potencialmente interesantes para conocer el efecto en animales al consumir oligoelementos funcionalizados. Se requiere hacer difusión de los resultados para determinar si existe potencial de transferencia al sector productivo.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y extensión por financiar este proyecto bajo el CF 1510125. Al investigador Luis Alonso Jiménez (q. e. p. d.) por el apoyo en la fase de investigación con consumidores para el desarrollo de producto alimenticio para consumo humano. A la empresa VYMISA por el financiamiento parcial de la investigación, aun cuando se enfrentó la crisis por la pandemia.

Referencias

- [1] L. E. Rioux *et al.*, “Commercial and industrial applications of micro algae – A review,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, no. 1, pp. 52–63, 2014.
- [2] Abdel-Raouf N, “Agricultural importance of algae,” *AFRICAN J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 54, 2012.
- [3] R. Rayfuse and N. Weisfelt, *The Challenge of Food Security*, vol. 327, no. February. Edward Elgar Publishing, 2012.
- [4] M. G. Barrantes, “Desarrollan sistema integrado para la producción de microalgas acoplado a un biodigestor y a un emisor de CO₂,” *Investiga.TEC*, vol. 0, no. 19, p. 21, 2014.
- [5] B. A. Abdulmajeed and A. R. Ibrahim, “Potential of Microalgae Cultivation in Dairy Wastewater as a Step in Low-Cost Biofuel Production,” *J. Eng.*, vol. 24, no. 4, p. 58, 2018.
- [6] A. C. Guedes *et al.*, “Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae,” *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 4, pp. 1256–1270, 2013.
- [7] H. Safafar, J. Van Wagenen, P. Møller, and C. Jacobsen, “Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 12, pp. 7339–7356, 2015.

- [8] C. Premkumar, M. Divya, N. Krishnaveni, P. Santhanam, and P. Pachiappan, "An estimation of antimicrobial and antioxidant activity of microalgae," in *Basic and Applied Phytoplankton Biology*, 2018, pp. 303–314.
- [9] B. A. Laraia, "Food Insecurity and Chronic Disease," *Adv. Nutr.*, vol. 4, no. 2, pp. 203–212, 2013.
- [10] M. K. Srivastava, "Antibiotic growth-promoters in food animals," *Pharma Times*, vol. 42, no. 3, pp. 17–21, 2010.
- [11] F. Saeed, M. Nadeem, R. S. Ahmed, M. Tahir Nadeem, M. S. Arshad, and A. Ullah, "Studying the impact of nutritional immunology underlying the modulation of immune responses by nutritional compounds – a review," *Food and Agricultural Immunology*, vol. 27, no. 2, pp. 205–229, 2016.
- [12] J. W. Spears, "Organic trace minerals in ruminant nutrition," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 58, no. 1–2, pp. 151–163, 1996.
- [13] H. Hellman and M. Carlson, "Feeding organic and inorganic sources of trace minerals for swine production," *Swine Nutr.*, p. , 2007.
- [14] C. Hug and D. von der Weid, "Algae as an Approach to Combat Malnutrition in," *Bioresour. Technol.*, pp. 16–22, 2012.
- [15] FAO and WHO, "The Nutrition Challenge - Food System Solutions," *World Heal. Organ. Food Nutr. policies*, 2018.
- [16] S. Horton, H. Alderman, and J. A. Rivera, "Hunger and malnutrition," in *Global Crises, Global Solutions*, 2009, pp. 305–333.
- [17] D. Cárdenas *et al.*, "Declaración de Cartagena. Declaración Internacional sobre el Derecho al Cuidado Nutricional y la Lucha contra la Malnutrición," *Nutr. Hosp.*, 2019.
- [18] OMS, "Decenio de las Naciones Unidas de acción sobre a la nutrición (2016-2025)," vol. 259, no. 2016, p. 3, 2016.
- [19] M. Blümmel, "Animal Nutrition and Feed Technology," *Spec. Issue Food-Feed Crop. Off. Publ. Anim. Nutr. Assoc. India.*, vol. 10S, p. 185 pp, 2010.
- [20] H. Yirga, "The Use of Probiotics in Animal Nutrition," *J. Probiotics Heal.*, vol. 3, no. 2, 2015.
- [21] D. Konkol and K. Wojnarowski, "The use of nanominerals in animal nutrition as a way to improve the composition and quality of animal products," *Journal of Chemistry*, vol. 2018, 2018.
- [22] M. Briens, Y. Mercier, F. Rouffineau, V. Vacchina, and P. A. Geraert, "Comparative study of a new organic selenium source v. seleno-yeast and mineral selenium sources on muscle selenium enrichment and selenium digestibility in broiler chickens," *Br. J. Nutr.*, vol. 110, no. 4, pp. 617–624, 2013.
- [23] C. Kiefer, "Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos," *Rev. Eletrônica Nutr.*, vol. 2, no. 3, pp. 206–220, 2005.

- [24] D. Josić, Peršurić, D. Rešetar, T. Martinović, L. Saftić, and S. Kraljević Pavelić, "Use of Foodomics for Control of Food Processing and Assessing of Food Safety," in *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 81, 2017, pp. 187–229.
- [25] F. Puiggròs, R. Solà, C. Bladé, M. J. Salvadó, and L. Arola, "Nutritional biomarkers and foodomic methodologies for qualitative and quantitative analysis of bioactive ingredients in dietary intervention studies," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 42, pp. 7399–7414, 2011.
- [26] U. Andjelkovic, T. Martinovic, and D. Josic, "Foodomic investigations of food allergies," *Current Opinion in Food Science*, vol. 4, pp. 92–98, 2015.
- [27] F. Gaitis, G. Ouzounidou, D. B. Sup, and I. Economics, "FOOD SAFETY: STRENGTHENING THE PRESENT WITH AN EYE TO THE FUTURE," 2017.
- [28] I. Altomonte, F. Salari, R. Licitra, and M. Martini, "Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality – A review," *Livestock Science*, vol. 214, pp. 25–35, 2018.
- [29] M. S. Madeira *et al.*, "Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review," *Livestock Science*, vol. 205, pp. 111–121, 2017.
- [30] Janječić, Z., Bedeković, D., Kljak, K., Gorupić, M., Musulin, M., "Effects of supplementing microalgae in laying hen diets on productive performance, color and content of carotenoids and fatty-acid profile of yolks," in *World's Poultry Science Journal ; Conference Information and Proceedings The XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Croatia*, 2018, p. 54.
- [31] G. Lenihan-Geels, K. S. Bishop, and L. R. Ferguson, "Alternative sources of omega-3 fats: Can we find a sustainable substitute for fish?," *Nutrients*, vol. 5, no. 4, pp. 1301–1315, 2013.
- [32] Chen, Y., Liu, H., & Zheng, Y. (2021). Selenium bioaccumulation in microalgae: Potential applications in nutrition and environment. *Journal of Cleaner Production*, 312, 127685. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127685>
- [33] Farhat, N., Joubert, A., & Perreault, F. (2022). Synergistic effects of selenium and manganese on microalgae: Enhancing productivity and nutritional quality. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19*(5), 2367-2378. <https://doi.org/10.1080/10889868.2022.2040414>
- [34] Li, X., Zhang, Y., & Wu, H. (2022). The role of trace elements in algal growth and biofuel production: A review. *Environmental Science and Ecotechnology*, 10*, 100146. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2022.100146>
- [35] Schomburg, L., & Schweizer, U. (2011). Selenoproteins: Functions and role in human health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 347*(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.026>
- [36] Shchedrina, V. A., & Gladyshev, V. N. (2018). Selenoproteins in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75*, 365-388. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2745-8>
- [37] Zhang, W., & Amemiya, Y. (2009). Selenium and the biology of microalgae: Insights from proteomics. *Cell*, 139*(5), 861-873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.009>

- [38] Zhang, Y., & Gladyshev, V. N. (1996). Role of selenoproteins in redox homeostasis and signaling. *Journal of Biological Chemistry, 271*(48), 29303-29309. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.29303>

Apéndices

Apéndice 1. Informe Trabajo Final de Graduación. Estudiante José Serrano Tablada

Apéndice 2. Informe Trabajo Final de Graduación. Estudiante Caleb Corrales Picado