

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS LÍQUIDOS DE *Limnospira maxima* (*Spirulina*) MEDIANTE TRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS

J.P. Schujman¹, M. Zermatten², R.J. Leonardi²

¹ Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina
(juanpschujman@hotmail.com)

² Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

Limnospira maxima constituye una biomasa con potencial para la obtención de productos de valor. En este trabajo se evaluó la producción de extractos mediante estrategias de acondicionamiento fisicoquímico e hidrólisis enzimática, contemplando temperatura, pH y agregado de proteasas. Se utilizó el nitrógeno amino libre como medida de eficiencia del proceso. Se identificaron condiciones potencialmente escalables para producir extractos con aplicación en biotecnología y agricultura.

Palabras clave: *Limnospira maxima*; extractos líquidos; acondicionamiento térmico; acondicionamiento físico químico; hidrólisis enzimática

INTRODUCCIÓN

La valorización integral de biomásas microalgales y cianobacterianas constituye una estrategia de interés dentro del concepto de biorrefinería, orientada a transformar recursos biológicos renovables en productos de mayor valor agregado. En este contexto, *Limnospira maxima* -previamente conocida como *Arthrospira maxima* y comercialmente asociada a “Spirulina”- representa una plataforma biotecnológica atractiva debido a su elevado contenido de proteínas y a la presencia de compuestos bioactivos, tales como aminoácidos, vitaminas, pigmentos, fitohormonas y otros metabolitos de interés funcional (Mishra et al., 2022).

Además de su composición, esta biomasa presenta ventajas productivas asociadas a su capacidad de crecimiento en distintos sistemas de cultivo, incluyendo el uso de medios alternativos y corrientes residuales de bajo costo (Kumar et al., 2020). Estas características favorecen su incorporación en esquemas de producción sostenible, en los cuales la biomasa obtenida no se limita a su empleo como material íntegro, sino que puede ser selectivamente fraccionada,

acondicionada o hidrolizada para recuperar componentes solubles con potencial aplicación en áreas como la biotecnología, la nutrición y la agricultura.

Los extractos de *L. maxima* corresponden a fracciones líquidas obtenidas mediante procesos que promueven la solubilización y liberación de componentes celulares. Estos extractos pueden contener péptidos, aminoácidos, compuestos nitrogenados solubles y otras moléculas bioactivas de interés. En el sector agropecuario, su utilización ha despertado interés como bioestimulantes y fertilizantes biológicos, debido a su capacidad para favorecer el crecimiento vegetal y mejorar la respuesta de los cultivos frente a condiciones de estrés (Su et al., 2023). Paralelamente, en el ámbito biotecnológico, pueden emplearse como suplementos nutricionales para cultivos microbianos, aportando fuentes orgánicas de nitrógeno y otros compuestos requeridos para el crecimiento celular y la síntesis de productos. En este sentido, la obtención de extractos enriquecidos en nitrógeno soluble representa una estrategia de interés para la formulación de medios de cultivo y procesos fermentativos, en los que la disponibilidad de nitrógeno amino constituye un factor clave para el desempeño microbiano (Leonardi et al., 2025).

Entre las estrategias disponibles para la obtención de extractos, los tratamientos físico-químicos y enzimáticos representan alternativas de interés debido a su capacidad para modificar la estructura de la biomasa y promover la liberación o hidrólisis de macromoléculas celulares. La eficiencia de extracción depende de las condiciones de procesamiento empleadas, tales como temperatura, pH, naturaleza del tratamiento físico-químico y tipo de enzima hidrolítica utilizada. En particular, las proteasas pueden favorecer la hidrólisis de proteínas y péptidos, incrementando la liberación de nitrógeno amino libre, parámetro asociado al grado de solubilización y conversión de la fracción proteica.

En este trabajo se evaluaron estrategias físico-químicas y enzimáticas para la obtención de extractos líquidos de *L. maxima*, empleando el nitrógeno amino libre como indicador de eficiencia del proceso. El estudio busca aportar criterios para el desarrollo de condiciones potencialmente escalables, orientadas a la valorización de esta biomasa en el marco de procesos sostenibles y de generación de productos de valor agregado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y obtención de biomasa de *L. maxima*

La cepa BEA 0009B de *L. maxima* fue adquirida en el Banco Español de Algas (BEA, <https://marinebiotechnology.org/es/>) y mantenida en el laboratorio mediante repiques periódicos en medio Zarrouk. La obtención de biomasa se llevó a cabo en un fotobiorreactor (FBR) de 30 L (Figura 1), empleando el mismo medio de cultivo. El inóculo para los ensayos en FBR fue generado en frascos Schott de 2 L, agitados magnéticamente, a 30 °C.

El FBR se operó dentro de una cámara de cultivo DEMETRA (J3 Desarrollos, Software Rubisco), a una temperatura constante de 30 °C, con un fotoperíodo de 16:8 h (luz) y una intensidad lumínica en el rango de 80–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suministrada mediante tiras de LED blanco neutro. La suspensión fue mantenida en agitación mediante una corriente de aire proveniente de un compresor, ingresada a través de un difusor ubicado en la base del FBR. La aireación se reguló para generar la turbulencia mínima necesaria para evitar la sedimentación de la biomasa.

El crecimiento del cultivo se monitoreó cualitativamente mediante observación microscópica y cuantitativamente mediante determinación gravimétrica de biomasa y medición de densidad óptica (DO) a 750 nm. El cultivo se mantuvo hasta alcanzar una concentración de

biomasa de 2–3 g L⁻¹, condición seleccionada para obtener biomasa con adecuada integridad celular y evitar el ingreso a etapas avanzadas de envejecimiento del cultivo.

Finalmente, la cosecha se realizó por filtración empleando una tela de nylon de 30 μm . La biomasa retenida fue lavada con agua destilada para eliminar sales remanentes del medio de cultivo, obteniéndose una biomasa concentrada final de 60–90 g L⁻¹, con un contenido de humedad de 85–93%.

Diseño experimental y pretratamiento de la biomasa

El diseño experimental se estructuró en una secuencia de bloques de ensayos independientes orientados a evaluar distintas estrategias de valorización de la biomasa de *L. maxima* para la obtención de extractos líquidos enriquecidos en nitrógeno soluble. En una primera etapa, se estudió el efecto de variables asociadas a la hidrólisis enzimática, incluyendo la naturaleza de la proteasa, el pH y la temperatura de incubación, con el objetivo de identificar condiciones favorables para la liberación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN). A partir de estos resultados, se evaluó posteriormente la incorporación de una etapa de acondicionamiento térmico-alcalino previa a la hidrólisis enzimática, con el fin de favorecer la solubilización de componentes celulares y analizar su impacto sobre la recuperación de FAN y sólidos solubles. Finalmente, se estudió el efecto de un tratamiento térmico en autoclave a 121 °C, simulando una condición compatible con procesos de esterilización de medios de cultivo, para analizar la posibilidad de incorporar la biomasa directamente como fuente de nutrientes en bioprocesos.

Ensayos de hidrólisis enzimática: efecto de la naturaleza de la proteasa, la temperatura y el pH

Para los ensayos de hidrólisis enzimática se utilizaron proteasas de uso industrial, clasificadas como ácida y alcalina, comercializadas por un proveedor nacional (Química Ecológica, Buenos Aires, Argentina). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en tubos de borosilicato con tapa roscada. Los ensayos se realizaron bajo agitación orbital constante de 150 rpm, control de temperatura mediante estufa o cámara de cultivo orbital, y una dosis de enzima de 0,5% p/v.

Alícuotas de la suspensión de biomasa concentrada fueron acondicionadas a pH 4,5; 7,0 y 9,5 mediante la adición de H₃PO₄ o NaOH, según correspondiera. Se analizó el efecto de la naturaleza de la enzima, el pH y la temperatura de incubación -35, 45 y 55 °C-

mediante un diseño experimental que contempló todas las combinaciones posibles de estos factores.

Cada condición contó con un control en paralelo sin adición de enzima. Una vez finalizado el tiempo de reacción, de 48 h, el sistema se inactivó

térmicamente a 80 °C y se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se recolectó la fracción sobrenadante para la determinación de FAN.

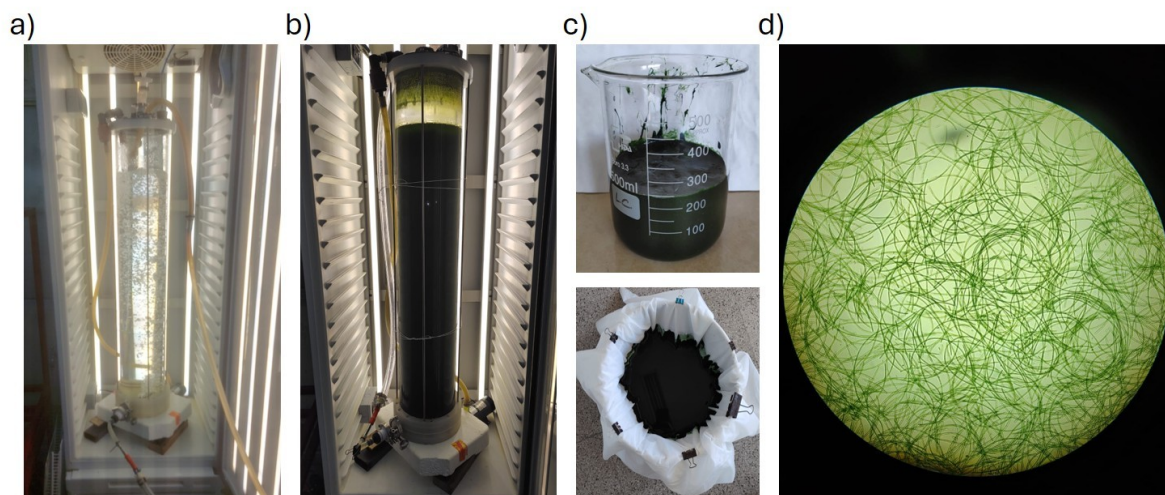


Figura 1. a y b) Sistema utilizado para la generación de biomasa de *L. maxima*. c) Fotografías de la tela de filtración y de una suspensión concentrada de biomasa de 10% p/v. d) Fotografía microscópica a 10X.

Efecto de una etapa de acondicionamiento térmico previo a la hidrólisis enzimática

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, en los que se observó un efecto favorable de la temperatura y del pH alcalino sobre la concentración de FAN, se diseñó un ensayo complementario para evaluar el efecto de una etapa de acondicionamiento térmico previa a la hidrólisis enzimática. Para ello, la biomasa fue sometida a 70 °C durante 2 h, a pH 7 y 12, y posteriormente incubada a 55 °C con proteasa alcalina.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- SA-SE: sin acondicionamiento previo y sin enzima proteasa alcalina, incubado a pH 7.
- SA-CE: sin acondicionamiento previo y con proteasa alcalina, incubado a pH 7.
- CA-SE (7): con acondicionamiento previo a pH 7 y sin agregado de proteasa alcalina. Luego del acondicionamiento, el sistema fue mantenido a pH 7.
- CA-CE (7): con acondicionamiento previo y con agregado de proteasa alcalina. Luego del acondicionamiento, el sistema fue mantenido a pH 7..

- CA-SE (12): con acondicionamiento previo a pH 12 y sin enzima proteasa alcalina, el sistema fue neutralizado a pH 7
- CA-CE (12): con acondicionamiento previo a pH 12 y con agregado de proteasa alcalina, el sistema fue neutralizado a pH 7

En los tratamientos incubados a pH 7, la neutralización se realizó mediante la adición de H₃PO₄. La enzima proteasa se adicionó a una concentración de 0,5 % p/v en todos los tratamientos.

La eficiencia de solubilización de sólidos fue cuantificada inmediatamente post acondicionamiento térmico con el fin de evaluar si la etapa de hidrólisis enzimática posterior ejerce un incremento en los rendimientos de sólidos.

Efecto de un tratamiento térmico en autoclave a 121 °C previo a la hidrólisis enzimática

Durante los bioprocesos de propagación celular de microorganismos de interés biotecnológico, los medios de cultivo y biorreactores suelen ser esterilizados mediante tratamientos térmicos, comúnmente empleando vapor saturado. En procesos a mayor escala, los tiempos efectivos de exposición térmica pueden incrementarse debido a la mayor inercia térmica del sistema y al tiempo

requerido para alcanzar las condiciones de esterilización.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de incorporar biomasa de *L. maxima* directamente como componente de un medio de cultivo y analizar su contribución potencial como fuente de nitrógeno asimilable luego de la esterilización, se diseñó un ensayo de tratamiento térmico en autoclave. Para ello, suspensiones de biomasa fueron acondicionadas a pH 7 y sometidas a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, se evaluó el efecto de este tratamiento sobre la liberación de sólidos.

Determinación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN) y solubilización de sólidos

La concentración de FAN en los sobrenadantes se determinó mediante el método espectrofotométrico de la ninhidrina, de acuerdo con Lie (1973). Para ello, alícuotas de sobrenadante fueron mezcladas con el reactivo de ninhidrina en solución tampón e incubadas a ebullición para permitir el desarrollo de color. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas y se registró la absorbancia a 570 nm utilizando un espectrofotómetro VIS BOECO S-20. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración construida con glicina como patrón de referencia, expresando los resultados como mg L⁻¹ de FAN.

La eficiencia de solubilización de sólidos se determinó a partir de la medición de sólidos totales y sólidos suspendidos en las fracciones correspondientes. Este parámetro fue calculado en relación con el contenido inicial de biomasa presente en cada ensayo, con el fin de estimar la proporción de material transferido desde la fracción particulada hacia la fracción soluble.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de hidrólisis enzimática: efecto de la naturaleza de la proteasa, la temperatura y el pH

Los perfiles de liberación de FAN a partir de la biomasa nativa de *L. maxima* revelaron un predominio aparente de las variables fisicoquímicas sobre la acción enzimática directa (Figura 2). Se observó una tendencia positiva general entre el incremento del pH y la temperatura y la concentración de FAN en el sobrenadante, alcanzándose los valores máximos bajo la combinación de pH 9,5 y 55 °C en los tratamientos sin enzima (Figura 3).

La comparación entre los tratamientos con proteasa alcalina y sus respectivos controles no mostró una

mejora consistente en la liberación de FAN asociada al agregado de la enzima. Si bien se observaron diferencias entre algunos valores medios, estas fueron variables entre las condiciones evaluadas y deben interpretarse considerando la dispersión experimental. En este sentido, el efecto del pH y la temperatura parecería enmascarar la contribución adicional de la proteasa exógena.

La recuperación de FAN en los controles sin enzima indica que la propia combinación de pH y temperatura fue capaz de promover la liberación de compuestos amino nitrogenados hacia la fase soluble. Este comportamiento podría estar asociado con una mayor permeabilización o desestabilización de la biomasa, la solubilización de componentes celulares y, eventualmente, la actividad de mecanismos hidrolíticos endógenos. En conjunto, los resultados permitieron identificar las condiciones alcalinas y las mayores temperaturas evaluadas como las más favorables para la obtención de extractos enriquecidos en FAN, motivando el estudio posterior de un acondicionamiento térmico-alcalino más intenso.

Efecto de una etapa de acondicionamiento térmico previo a la hidrólisis enzimática

El segundo bloque experimental permitió evaluar el impacto de una etapa de acondicionamiento térmico sobre la liberación FAN a partir de biomasa de *L. maxima*. Se observó un incremento marcado en la concentración de FAN en las muestras sometidas al tratamiento a 70 °C y pH 7 o 12 durante 2 h, en comparación con los tratamientos sin acondicionamiento previo incubados a 55 °C y pH 7 (Figura 4). Este resultado indica que la combinación de temperatura y alcalinidad favoreció la transferencia y/o generación de compuestos amino nitrogenados hacia la fase soluble.

En los tratamientos sin acondicionamiento previo, la comparación entre el control sin enzima y el tratamiento con proteasa alcalina (SA-SE vs SA-CE) no mostró una mejora aparente en la liberación de FAN asociada al agregado enzimático. Esta tendencia resulta consistente con lo observado en el primer bloque experimental, donde el efecto de las variables fisicoquímicas pareció predominar sobre la contribución de la proteasa exógena.

Por otra parte, el acondicionamiento a pH 12 no produjo una mejora evidente respecto al realizado a pH 7. Esto sugiere que la temperatura en la etapa de acondicionamiento inicial, en los respectivos pH, pareciera ser el factor determinante en la liberación de FAN.

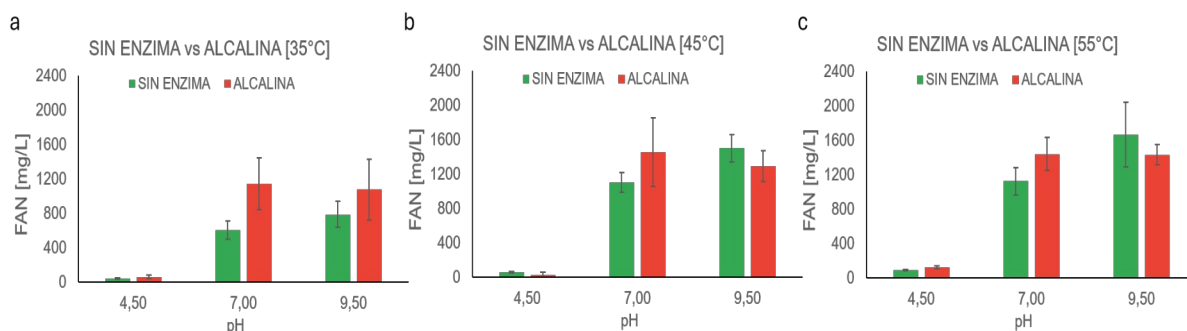


Figura 2. Concentraciones de FAN obtenidas en los sobrenadantes de hidrolizados efectuados sin el agregado de enzimas y con proteasa alcalina.

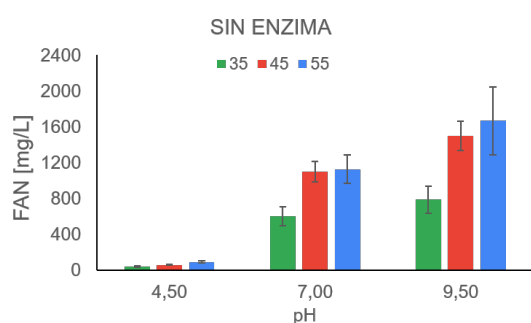


Figura 3. Concentraciones de FAN alcanzadas en los sobrenadantes de hidrolizados efectuados sin el agregado de enzimas.

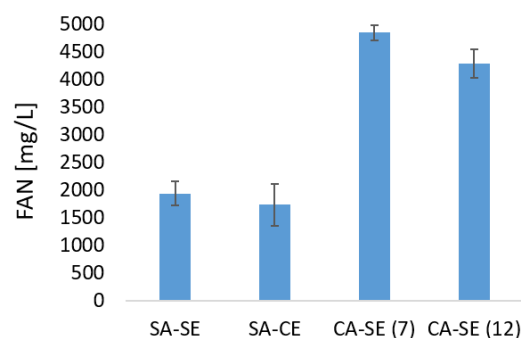


Figura 4. Concentración de FAN en sobrenadantes obtenidos con diferentes estrategias de acondicionamiento e incubación. SA: sin acondicionamiento térmico-alcalino previo; CA: con acondicionamiento a 70 °C a pH 7 o 12 durante 2 h; SE: sin enzima; CE: con proteasa alcalina. En los tratamientos CA-SE (7) y CA-SE (12), los tratamientos indicados como (7) y (12) corresponden al pH empleado durante el acondicionamiento. La incubación posterior se realizó a 55 °C durante 48 h a pH 7

La evaluación de la solubilización de sólidos mostró que los tratamientos a pH 7 presentaron valores similares, en el rango de 44-48%, independientemente de la aplicación del acondicionamiento térmico previo, o del agregado de proteasa alcalina (Figura 5). En contraste, los sometidos a pH 12 durante la etapa de acondicionamiento alcanzaron valores superiores de solubilización, cercanos al 57-60%. Estos resultados indican que la alcalinidad en los acondicionamientos favoreció la transferencia de material desde la fracción particulada hacia la fase soluble.

Sin embargo, este incremento en la solubilización de sólidos no se correspondió necesariamente con una mayor concentración de FAN, según lo observado en la Figura 4. Por lo tanto, la solubilización global de sólidos y la liberación de FAN no parecen responder de manera directamente proporcional. En este sentido, el tratamiento a pH 12 podría promover la solubilización de componentes celulares no necesariamente asociados a compuestos FAN, mientras que la generación de FAN estaría más vinculada al efecto inicial del acondicionamiento térmico sobre la fracción proteica o peptídica de la biomasa.

Efecto de un tratamiento térmico en autoclave a 121 °C previo a la hidrólisis enzimática

El ensayo en autoclave fue concebido para analizar la posibilidad de utilizar biomasa nativa de *L. maxima* como fuente de nitrógeno orgánico en bioprocesos de cultivo microbiano que requieren la esterilización térmica del medio de cultivo. Bajo las condiciones evaluadas, correspondientes a 121 °C durante 15 min, se obtuvieron valores de solubilización de sólidos en el rango de 16–20 %. Si bien estos valores fueron inferiores a los observados en los tratamientos térmico-alcalinos, resultan relevantes considerando que se alcanzaron mediante

un tratamiento térmico breve y sin ajuste alcalino del medio.

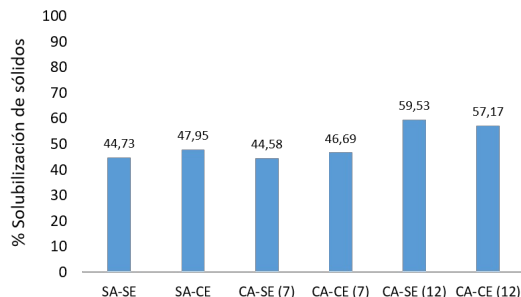


Figura 5. Solubilización de sólidos en tratamientos de *L. maxima* sometidos a distintas condiciones de acondicionamiento e incubación. SA: sin acondicionamiento térmico previo; CA: con acondicionamiento a 70 °C, a pH 7 y 12 durante 2 h; SE: sin enzima; CE: con proteasa alcalina. Los tratamientos indicados como (7) y (12) corresponden al pH empleado durante el acondicionamiento. La incubación posterior se realizó a 55 °C durante 48 h a pH 7.

Desde una perspectiva de aplicación, estos resultados sugieren que la incorporación directa de biomasa de *L. maxima* en medios de cultivo podría contribuir parcialmente a la generación de fracciones solubles durante la etapa de esterilización. En sistemas de mayor escala, donde los tiempos efectivos de exposición térmica pueden incrementarse debido a la inercia térmica del volumen tratado, este efecto podría adquirir mayor relevancia. No obstante, dicha posibilidad debería evaluarse experimentalmente bajo condiciones representativas de esterilización en biorreactores de escala piloto o industrial.

CONCLUSIONES

Los ensayos iniciales de hidrólisis enzimática permitieron identificar que las variables fisicoquímicas, particularmente el pH y la temperatura, tuvieron un efecto determinante sobre la liberación de FAN a partir de biomasa nativa de *L. maxima*. Las condiciones alcalinas y las mayores temperaturas evaluadas favorecieron la obtención de extractos enriquecidos en compuestos amino nitrogenados, incluso en ausencia de proteasa exógena.

La incorporación de proteasa alcalina no produjo una mejora consistente respecto de los controles sin enzima, lo que sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, la solubilización e hidrólisis parcial de la

biomasa estuvo principalmente asociada al efecto combinado del pH y la temperatura. Estos resultados indican que el uso de enzimas comerciales debería ser optimizado cuidadosamente para justificar su incorporación al proceso.

El acondicionamiento térmico-alcalino previo, realizado a 70 °C y pH 12 durante 2 h, resultó la estrategia más efectiva para incrementar la concentración de FAN en los sobrenadantes. Esta etapa permitió mejorar la liberación de compuestos nitrogenados solubles y se presenta como una alternativa simple y potencialmente escalable para la obtención de extractos líquidos de *L. maxima*.

La solubilización de sólidos no mostró una relación directamente proporcional con la concentración de FAN. Si bien acondicionar el sistema a pH 12 aumentó la transferencia de material hacia la fase soluble, este incremento no se tradujo necesariamente en una mayor liberación de nitrógeno amino libre. Esto evidencia que la calidad química del extracto depende no sólo de la cantidad de sólidos solubilizados, sino también de la naturaleza de los compuestos liberados. Sería de interés la realización de futuras experiencias en donde se explore el efecto del tiempo de acondicionamiento térmico y temperaturas en el rango de 70 a 100 °C

El tratamiento térmico en autoclave a 121 °C permitió solubilizar parcialmente la biomasa de *L. maxima* sin necesidad de acondicionamiento alcalino. Aunque los valores obtenidos fueron inferiores a los alcanzados mediante tratamientos térmico-alcalinos, estos resultados sugieren que la incorporación directa de esta biomasa en medios de cultivo podría contribuir a la generación de fracciones solubles durante la etapa de esterilización.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la biomasa de *L. maxima* puede ser valorizada mediante estrategias físico-químicas simples para la generación de extractos líquidos con contenido de nitrógeno soluble. Las condiciones térmico-alcalinas se destacan como las más prometedoras para futuros desarrollos orientados a aplicaciones biotecnológicas y agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto “Desarrollo de un Bioinsumo Innovador para el Tratamiento Sostenible de Semillas de Soja, IO_200”, financiado mediante el instrumento “Proyectos de Investigación Orientada (IO) 2025, Modalidad A” de la Agencia Santaefesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTeI) de la Provincia

de Santa Fe. Su aporte económico resultó fundamental para el desarrollo de las líneas de investigación vinculadas al presente trabajo.

Se agradece a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB).

REFERENCIAS

KUMAR, Ramesh; GHOSH, Alak Kumar; PAL, Parimal. Synergy of biofuel production with waste remediation along with value-added co-products recovery through microalgae cultivation: A review of membrane-integrated green approach. *Science of the Total Environment*, [S.L.], v. 698, 134169, 2020. Elsevier.

LEONARDI, Rodrigo Jorge; RACCA, Sofia; COMELLI, Raúl Nicolás; SELUY, Lisandro Gabriel. Liquid extract with high amino nitrogen obtained by autolysis of brewing yeast can be used as supplement for bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, [S.L.], v. 60, 103397, 2025. Elsevier.

LIE, Svein. The Ebc-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 37–41, 1973. Wiley.

MISHRA, Pragya; MISHRA, Raghvendra Raman; PRASAD, Sheo Mohan; NATH, Gopal. Isolation and molecular characterization of nutritionally potent *Arthrospira maxima* from Indian paddy field. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, [S.L.], v. 42, 102338, 2022. Elsevier.

SU, Min; BASTIAENS, Leen; VERSPREET, Joran; HAYES, Maria. Applications of Microalgae in Foods, Pharma and Feeds and Their Use as Fertilizers and Biostimulants: Legislation and Regulatory Aspects for Consideration. *Foods*, [S.L.], v. 12, n. 20, 3878, 2023. MDP