



Artículo

Preparación ventajoso de digeridas proteicos Extractos de *Spirulina platensis* biomasa

Carlos M. Verdasco-Mart y o n, Lea Echevarrieta y Cristina Otero *

Departamento de biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleochemistry, CSIC, C / Marie Curie 2 L10, Madrid 28049, España; c.verdasco@csic.es (CV); leaech01@ucm.es (LE)

* Correspondencia: coter@icp.csic.es ; Tel .: + 34-91-5854805 / 5854800

Recibido: November 26 de 2018; Aceptado: 21 Enero 2,019 mil; Publicado 2 de febrero 2019



Resumen: *Spirulina* biomasa tiene un gran valor nutricional, pero sus proteínas no están tan bien adsorbido como los animales son. Nuevos ingredientes de alimentos funcionales y metabolitos se pueden obtener de la espirulina, el uso de diferentes biodegradación selectivos de su biomasa. Cuatro métodos de extracción de enzimas asistida se estudiaron de forma independiente, y se determinaron sus mejores condiciones de funcionamiento. Se emplearon enzimas para aumentar el rendimiento de los extractos proteicos fácilmente adsorbidos. A la biomasa **pre-tratamiento usando Alcalase® (pH 6,5, 1% v/w, y 30 · C) se describe, que aumentó el rendimiento de extracción de biocomponentes hidrófilos por 90% w/w en comparación a la simple extracción con disolvente. Alcalase® da lugar a**

2,5-6,1 veces más aminoácidos que los otros y ocho péptidos cortos diferenciales (438 a 1.493 Da). Estos procesos se escalaron y se analizaron los extractos. la destrucción de la integridad celular más alta en el caso de Alcalase® También se visualizó mediante microscopía electrónica de transmisión. La tecnología de extracción descrito los usos, las, enzimas vuelos comerciales de calidad alimentaria y hexano, aceptadas para la alimentación y la seguridad del fármaco. Es un proceso prometedor para un biofactoría competitivo, gracias a una producción e fi ciente de extractos con alto potencial aplicada en las industrias de alimentación, cosméticos, y farmacéuticos.

palabras clave: microalgas; *Spirulina*; Alcalase®; aminoácidos; extracción; nutracéutico

1. Introducción

Nuevos productos funcionales son cada vez más demandados por las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. los procesos de degradación de enzimas de biomasa vegetales son una 'biotecnología blanca' para la producción sostenible de estos nuevos productos funcionales [1]. La degradación de la membrana celular antes de la extracción de biocomponentes facilita la recuperación de productos citoplasmáticas [2]. Dado que la gran parte de biocomponentes Las cianobacterias son dentro de la célula [3 , 4]. Su extracción se puede mejorar a través de pre-tratamiento destructivo de las estructuras celulares y subcelulares [2 , 5]. Para recuperar los constituyentes de biomasa, herramientas enzimáticas proporcionan ahorros de energía en comparación con los procesos de tratamiento mecánico o hidrólisis catalítica química a altas temperaturas. También compiten bien en la selectividad de biocomponentes extraídos. Dependiendo del tipo de enzima, los componentes de la membrana y de la célula celulares pueden ser degradados de diferentes maneras. En consecuencia, el potencial de esta tecnología es alta, teniendo en cuenta la gran variedad de productos de degradación que se pueden obtener a través de la acción de los diferentes tipos de catalizadores selectivos. Este hecho abre muchas oportunidades para la tecnología de enzimas. Ejemplos de procesos enzimáticos ventajosas capaz de extraer productos de alto valor a partir de vegetales y animales biomasa son: (i) degradación de la celulosa a glucosa usando celulasas,

La cadena alimentaria se basa en algas y productos de microalgas. Las microalgas son buenas fuentes de proteínas y metabolitos. Los suplementos dietéticos se obtienen de ellos [6].

Las cianobacterias (también llamado algas azules) son, fotosintética, microorganismos unicelulares procariotas. A este grupo pertenecen *platensis Arthrospira* y *Arthrospira máximos* (comúnmente llamado

Spirulina platensis y *Spirulina maxima*). *Spirulina platensis* crece en África, Asia y América del Sur, con una morfología característica helicoidal [7]. *Spirulina* biomasa (espirulina) tiene un gran potencial para su composición y propiedades nutricionales [8]. Hace más de dos mil años, ya estaba siendo consumida por los aztecas. *Spirulina* propiedades son muy apreciados por la sociedad moderna, que se consumen ampliamente para diferentes tipos de dietas saludables. *Spirulina* es una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas, carbohidratos, macro y minerales traza, y otros nutrientes. El peso en seco composición ciento de espirulina es la proteína de 64-73%, 12-17% de hidratos de carbono, 5-7% de lípidos, 0,9% de P, y 10.3 a 11.6% N. [9]. pigmentos azules (phycocianins) de la espirulina contribuyen a aumentar la proteína y la disponibilidad de hierro [10]. Desde 2011, la espirulina se considera un ingrediente seguro en los suplementos adiet clase [11]. *Spirulina* mejora el sistema inmunológico [12], Y tiene efectos terapéuticos contra el cáncer y virus diferente, microbiano, y en los procesos inflamatorios [1]. *Spirulina* proporciona altas cantidades de un aminoácido antioxidante único: L-ergotioneina (EGT; 2-mercaptohistidine trimethylbetaine) [13]. suplementación *Spirulina* proporciona proteínas vegetales para el organismo. Para aumentar bioasimilación de su material proteico, se deben obtener los extractos de sus biocomponentes proteicos degradados [14]. Además, la extracción e fi ciente de componentes intracelulares está limitada por la membrana celular.

La membrana celular de *Spirulina* es análoga a la de las bacterias Gram-negativas [15]; tienen dos capas de membrana lipídica (celulares y citoplásmicos), separadas por la capa de mureína. Mureína es una estructura macromolecular rígida formada por polímeros complejos de peptidoglicanos y lipopolisacáridos. Peptidoglicanos están unidos covalentemente disacáridos y tetrapéptidos. Se colocan entre las membranas celulares y citoplásmicos, y vinculados a la capa de membrana externa por las lipoproteínas. Los lipopolisacáridos están formados por un lípido y un complejo de cadenas de polisacáridos. La membrana celular tiene proteínas no unidas covalentemente a los lípidos, mientras que la membrana citoplasmática está formada por las lipoproteínas (proteínas unidos covalentemente a lípidos). Los complejos de azúcar de las membranas celulares funcionan como reservas de energía (por ejemplo, glucógeno) [12].

Los métodos para la degradación de la membrana celular puede ser física (ultrasonidos, microondas [dieciséis , 17], Calceín osmótica, pulso campo eléctrico, el tratamiento térmico [18], Etc.), pero también puede ser química o enzimática [19 , 20]. La recuperación de biocomponentes se puede lograr por diferentes métodos, tales como los basados en la separación de fases con disolventes [21 , 22], Fluidos supercríticos, pervaporación, etc. Sa fi et al. compararon diferentes microalgas de células frágil de paredes utilizando varios [física 23] Y química [24] métodos de ruptura celular. Fueron atacados de acuerdo con el siguiente orden: *Haematococcus pluvialis* < *Nannochloropsis oculata* < *Chlorella vulgaris* < *cruentum Porphyridium* ≤ *Arthrospira platensis*. Estos autores determinaron que entre los métodos físicos utilizados para la extracción de proteínas, la ruptura celular de alta presión fue la más ef uno deficiente, aunque no fue suficiente para recuperar más de 50% de las proteínas a partir de estas microalgas verde, lo que indica que se requieren más pases a interrumpir por completo su macroestructura, y por lo tanto más energía de entrada es necesario [23]. El uso de varios ciclos, tratamientos mecánicos liberan más proteínas de todo el microalgas en comparación con tratamientos químicos. Los porcentajes de proteína extraída de *Spirulina* biomasa utilizando un pre-tratamiento alcalino o el método de homogeneización a alta presión fueron 68% y 75%, respectivamente [24]. Por otro lado, algunos informes describen diferentes tratamientos enzimáticos de extractos de proteína de la espirulina, la obtención de varios productos bioactivos. En todos los casos, los extractos de proteína se obtuvieron por métodos mecánicos, antes de ser sometido a una degradación de la enzima dada. Más precisamente, el péptido quelante de hierro Thr-Asp-Pro-Ile (Leu) Ala-Ala-Cys-Ile (Leu), con un peso molecular de 802 Da, se obtuvo a través de la acción combinada de dos proteasas [25]. El extracto de proteína fue primero obtenido por homogeneización de la suspensión celular, centrifugación y precipitación adicional del sobrenadante con sulfato de amonio. Después, el material extraído se sometió consecutivamente a dos pasos proteolíticas por dos proteasas diferentes. En otro estudio, el péptido antihipertensivo Ile-Gln-Pro se preparó a través de Alcalase® la digestión de las proteínas previamente extraídos mediante procedimientos de congelación-descongelación y sonicación [26]. Del mismo modo, dos péptidos anti-inflamatorio potenciales (LDAVNR andMMLDF) se obtuvieron mediante la posterior proteólisis con tripsina, quimotripsina, pepsina y de las proteínas que se extrajeron previamente de espirulina por congelación-descongelación y sonicación procedimientos [27]. Todos estos estudios se han centrado en la purificación y caracterización de

particulares péptidos bioactivos [25 - 27]. En estos casos, sólo las fracciones de proteínas previamente obtenidos por los métodos físicos o mecánicos se trataron con las enzimas, y en ninguno de los casos ni los autores tienen en cuenta la ventaja de que la acción directa de las enzimas en las células de espirulina proporciona: mayor recuperación de los componentes intracelulares (por ejemplo, proteínas). Por lo tanto, se requieren más estudios basados en protocolos de extracción de la enzima directa. Con el fin de sacar el máximo provecho de las extracciones de enzimas asistida de las proteínas, los estudios directos de la digestión de *Spirulina* las células por las enzimas deben llevarse a cabo. A este respecto, el uso apropiado de la tecnología de enzima requiere determinar para cada biocatalizador la influencia de diferentes parámetros de funcionamiento en la actividad de la enzima degradante para cada biomasa específica.

En este trabajo, la aplicación de diferentes enzimas para la obtención de extractos proteicos fácilmente adsorbido se estudió. Diferentes procesos de degradación enzimática selectiva de *Spirulina* biomasa fueron investigados para la extracción de biocomponentes espirulina polares. La biomasa se degrada enzimáticamente usando cuatro preparaciones de enzimas comerciales baratos y de fácil acceso diferentes. Estos procesos en sus correspondientes mejores condiciones de operación se compararon con la extracción de hecho sin ningún tratamiento enzimático previo de la biomasa. En particular, dos tratamientos enzimáticos diferentes, basados en la degradación de proteínas de membrana, lipoproteínas, y peptidoglucano por dos proteasas (Alcalase® y Flavourzyme®), y otros dos tratamientos de biomasa utilizando endo y exo-glucanasas (Ultra flo® Vino y flujo®) a la ruptura de la estructura de polímero de azúcar, se estudiaron comparativamente. Se determinaron los mejores valores de los parámetros más importantes de todos los pre-tratamientos enzimáticos para la degradación de la biomasa. Los correspondientes rendimientos de extracción en peso seco de extractos acuosos se determinaron para los cuatro procesos de extracción de enzimas en sus respectivos mejores condiciones, y se compararon con los del extracto de control (sin la ayuda de la enzima). Los cambios que ocurren en el nivel celular después de los diferentes procesos de extracción se analizaron comparativamente por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se compararon los contenidos totales de aminoácidos de todos los extractos hidrófilos.

2. Resultados y Discusión

Una biomasa seca comercial de la cianobacteria *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) fue sometido a diferentes degradaciones enzimáticas. *S. platensis* extracciones después de cuatro enzimas diferentes pre-tratamientos fueron estudiados de forma independiente. Estos procesos se llevaron a cabo en sus respectivos mejores condiciones de funcionamiento y se compararon con el control (sin enzima añadida) de extracción. Dos proteasas distintas y dos glucanasas distintas se utilizaron para favorecer la recuperación biocomponente a través de la degradación enzimática de la membrana. Los cuatro extracciones de enzimas diferentes se analizaron en términos tanto de los rendimientos en peso de los extractos acuosos secos y sus respectivos contenidos aminoácidos.

2.1. La extracción de la enzima-Assisted

Se estudiaron los parámetros más importantes de la degradación enzimática asistida de espirulina. Las mejores condiciones de operación para cada extracción de la enzima se determinaron siguiendo los cambios en cada valor de área de pico de la cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de dispersión de luz evaporativa (HPLC-ELSD) cromatogramas de la fase acuosa. En todos los casos, se inspeccionaron los cambios de área en todas las fi picos significativos (véase más adelante). Todos los picos significativos del cromatograma HPLC mostró la misma dependencia de los parámetros estudiados, es decir, la misma variación (aumento o disminución) de sus valores de área con el valor del parámetro estudiado, y el mismo valor óptimo. Por lo tanto, en aras de la claridad, las influencias de pH, tiempo, temperatura, y carga enzimática se representan con respecto a los valores de área total de todos los picos significativos. Sin embargo,

2.1.1. Influencia de pH figura 1 representa el cambio de las áreas total de los picos en el cromatograma (Figura 1 A), y el

área de un pico individuo representativo (Figura 1 C) obtenida después de 4h de la biomasa pre-tratamiento con Alcalase®. La velocidad inicial máxima (4h) de la extracción de biocomponente con Alcalase® fue obtenido

a pH 6,5. El proceso de degradación de la enzima era más rápido en este valor de pH, dando lugar al valor del área de pico total de máxima obtenida por un corto tiempo pre-tratamiento (4H, figura 1 UNA). Para las extracciones con Flavourzyme®, Ultra flo®, Vño y flujo®, los correspondientes mejores valores de pH determinados fueron 6,0, 7,0, y 6,5, respectivamente (no mostrados).

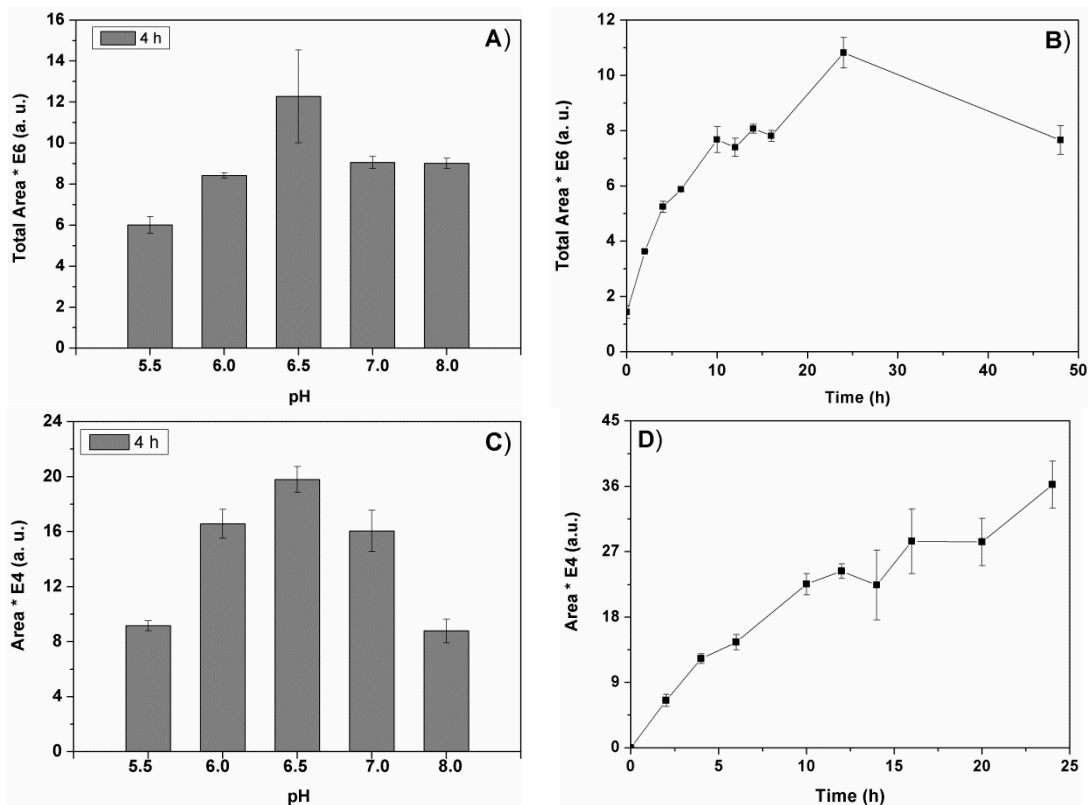


Figura 1. extracción de la enzima asistida con Alcalase® de los biocomponentes espirulina polares. Las variaciones de área de pico total en el HPLC-ELSD análisis: (una) efecto del pH sobre la superficie total de productos de pico extraídos a las 4 h de tratamiento enzimático. (segundo) Evolución temporal de la extracción a pH óptimo 6,5, para el área de pico total. (do) Variación del valor área del pico en el tiempo de retención de 67,83 min, durante 4 h de tratamiento enzimático. (re) Evolución temporal de la extracción a pH óptimo 6,5, para el pico a un tiempo de retención 5,5 min. Otras condiciones: 1% (v/w) carga enzimática y 40 · CAU: unidades de área arbitrarias.

Lu et al. utilizado un valor de pH diferente para la extracción de un péptido anti-hipertensiva de espirulina usando Alcalase® (pH 8,5 a 50 · C durante 10 h) después de tres ciclos de congelación-descongelación de la biomasa [26]. Kim et al. también utilizado diferentes condiciones de operación para obtener el péptido quelante de hierro con una degradación de la biomasa multi-enzimática (Alcalase® pH 8,0 a 50 · C durante 1 h + Flavourzyme® pH 7,0 a 50 · C durante 8 h) [25]. Los productos obtenidos de su degradación péptido también eran diferentes de los de este estudio (trabajo en progreso, comunicación personal).

La dependencia de la rendimiento de extracción en el parámetro de pH es una consecuencia del efecto del pH sobre el proceso de degradación de la biomasa por la enzima. Las variaciones en la carga total de proteínas con pH deben determinar su interacción mutua y la interacción con el biocatalizador empleado. Para la extracción de biocomponentes anti-cáncer de espirulina, papaína presentó un pH óptimo de 6,5, mientras que otras enzimas exhiben muy diferentes valores de pH óptimos (pH 2-8,5) [28]. Los valores óptimos en la gama básica de pH se describieron anteriormente para la extracción de antioxidantes de espirulina con diferentes enzimas, aunque otro grupo de enzimas exhibió actividades bajas en estas condiciones [29]. Proteasas diferentes de los utilizados aquí fueron estudiados antes de extraer el aceite de la espirulina, informar de un rango de pH óptimo de 7,5-10 para el mejor biocatalizador [30].

El curso temporal de la extracción enzimática asistida en el mejor valor pH se estudió durante los primeros 48 h. Los resultados obtenidos con Alcalase® para todos los picos del cromatograma se representan en la figura 1 B, y para un pico de representación en la figura 1 D. De manera similar a Alcalase® extracción, los otros tres tipos de extracciones enzima requerida de 24 h de pre-tratamiento enzimático de la espirulina para alcanzar la recuperación máxima de biocomponentes (no mostrados). Estos resultados (figura 1 B, D) se obtuvieron a través de análisis de alícuotas tomadas de las mezclas de reacción en los tiempos indicados, mientras que los de la figura 1 A, B corresponden a los análisis de extractos liofilizados. Los dos estudios corresponden a muestras de diferentes concentraciones de extracto, por lo que los valores de área de estas dos figuras no se pueden comparar (véase Materiales y Métodos Sección 3.3.1).

2.1.2. Efecto de la Temperatura

El efecto de la temperatura de la biomasa pre-tratamiento en la extracción de biocomponentes polares se llevó a cabo en los respectivos valores de pH óptimos de cada enzima (Alcalase® a pH 6,5; Flavourzyme® a pH 6,0; Ultra flo® a pH 7,0; Vino flujo® a pH 6,5) y una carga enzimática de 1% (v/w) en el rango de 30-50 ° C después de 24 h de tratamiento de biomasa (Figura 2). Los valores de área total de productos de pico de los extractos acuosos correspondientes se calcularon a partir de los cromatogramas de HPLC-ELSD obtenidos. El valor de área correspondiente a 1 g de espirulina se calculó y se representó frente a la temperatura. Figura 2 representa los valores del área total de los picos obtenidos para Alcalase®.

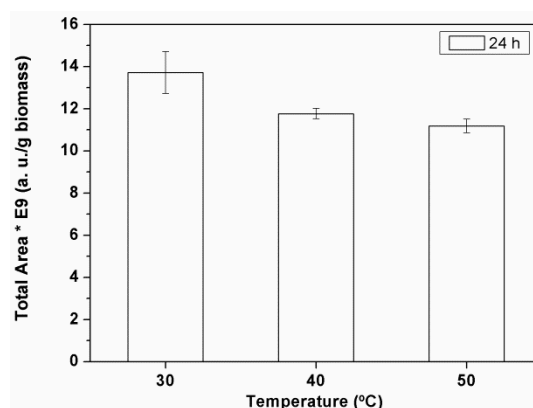


Figura 2. Efecto de la temperatura en el Alcalase® la extracción asistida de los biocomponentes espirulina polares. Variación de áreas totales de los picos en la HPLC-ELSD analiza con respecto a 1 g de biomasa. Condiciones: 1% (v/w) carga enzimática y pH 6,5; AU: unidades arbitrarias.

Teniendo en cuenta el error experimental, 30 ° C fue la mejor temperatura determinada para las extracciones con Alcalase®. Se obtuvieron resultados similares con los otros tres enzimas (no mostrados). A partir de estos resultados, el 30 ° C se determinó que era la mejor temperatura para las dos proteasas (Alcalase® y Flavourzyme®) y Ultra flo®, este último uno que tiene β- glucanasa y las actividades de xilanasas, así como varias actividades laterales (celulasa, hemicelulasa, y Pentosanasa). El valor óptimo de temperatura determinado para Vino flujo® fue de 40 ° C (no mostrado). En todos los casos, la mejor temperatura para lograr la máxima recuperación de biocomponentes en el extracto acuoso fue relativamente baja. Las vitaminas, antioxidantes y otros componentes termo-lábil de los extractos se relativamente bien conservados en este rango de temperatura. A temperaturas suaves se redujeron los gastos de energía y la labilidad producto, mientras que se incrementó la estabilidad operativa de los biocatalizadores empleadas. De hecho, la disminución observada en la extracción de biocomponentes a las temperaturas más altas (Figura 2), Podría explicarse por un deterioro de la estabilidad operacional de la enzima.

En el caso de las proteasas, Zhang y Zhang informaron más altas temperaturas óptimas para la extracción de enzima-asistida de polipéptidos anti-tumorales de espirulina con tripsina, pepsina, y papaína, a saber 42 ° C, 37 ° C, y 55 ° C, respectivamente, que los determinados en el presente documento [28].

2.1.3. Efecto de la enzima Cargando

carga de catalizador afecta a la velocidad de biodegradación de la biomasa antes de la extracción con disolvente, la determinación del valor de rendimiento de extracción obtenida en un momento dado.

Los resultados obtenidos con diferentes Alcalase[®] cargas (0-2% v/w enzima) están representados en la figura 3. Estos resultados se compararon con los de un ensayo de extracción de control, donde, en lugar de la solución de enzima, se utilizó un volumen equivalente de solución de agua (0% de carga de enzima en la figura 3).

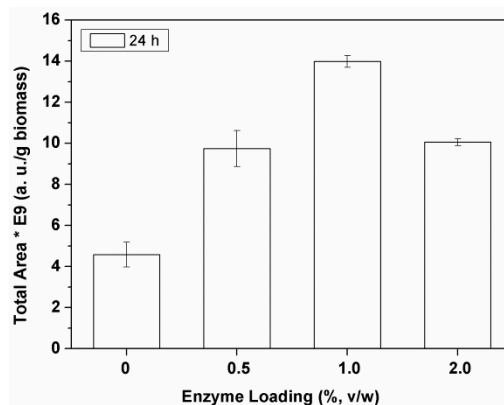


Figura 3. Efecto de la carga enzimática en la Alcalase[®] la extracción asistida de los biocomponentes espirulina polares. Variación de áreas totales de los picos en la HPLC-ELSD analiza con respecto a 1 g de biomasa. Condiciones: 30 ° C y pH 6,5; AU: unidades arbitrarias.

La extracción de biocomponentes polares aumentó con el aumento de la carga de enzima a partir de 0,5% a 1% (v/w) Alcalase[®], pero disminuyó dramáticamente con una cantidad más alta de la enzima (es decir, 2% v/w; Figura 3). Se encontró que el mismo mejor valor para Flavourzyme[®] y Ultra fl o[®]. La mejor carga enzimática de flujo Vino[®] era 2% (v/w) (no mostrado). Estos valores corresponden a 1.2 hasta 2.4% (w/w), teniendo en cuenta los valores de densidad correspondientes.

Nuestros resultados están en buen acuerdo con los de la literatura, donde la dependencia de la eficiencia de la extracción exhibe un valor máximo, con un valor de carga biocatalizador por encima del cual el proceso se vuelve menos eficiente [31]. La disminución de la recuperación del producto cuando se utiliza cargas altas de enzimas sugiere que las concentraciones elevadas de enzimas podrían favorecer una biodegradación excesiva de la biomasa. Los diferentes tipos de biomasa requieren diferentes cantidades de biocatalizadores. Todos estos informes y los resultados de este trabajo indican que la carga óptima de enzima requerida depende del tipo de biomasa, el tipo del biocatalizador, y los biocomponentes a ser extraídos.

La duración de la enzima pre-tratamiento es un parámetro importante, que implica consideraciones importantes en el proceso de aumento de escala. En este trabajo, 24 h parecían ser necesario para obtener la máxima extracción de biocomponentes intra y extracelulares de la espirulina. Liang et al. [5] Estudiado una extracción enzimática asistida de aceite de microalgas, donde la extracción de rendimiento óptimo se encontró a las 12 h de la biodegradación de la biomasa. Estos resultados y los de la literatura, sugieren que el tiempo necesario para degradar la biomasa depende tanto de la enzima y la biomasa estudiada. También varía sustancialmente con el método utilizado para degradar la biomasa y el producto a extraer. Extracciones basado en el uso de ultrasonidos y la irradiación de microondas de uso degradación de biomasa tiempos relativamente cortos (20 min-4 h) para las extracciones antioxidantes y pigmentos frommicroalgae [dieciséis].

2.2. La escala y rendimientos de extracción

Los cuatro procesos de extracción de la enzima asistida diferentes se llevaron a cabo en sus correspondientes condiciones de operación óptimas a escala aumentado por un factor de 2,5. Diez gramos de *Spirulina* biomasa se usaron para cada experimento. Todos los extractos se prepararon en sus respectivas condiciones óptimas (pH 6,5, 1% v/w y 30 ° C para Alcalase[®]; pH 6,0, 1% v/w y 30 ° C para Flavourzyme[®]; pH 7,0, 1% v/w

y 30 ° C para Ultra fl o ®, pH 6,5, 2% v / w y 40 ° C para el flujo Vino ®). El extracto de control se obtuvo en esta escala sin ninguna asistencia de la enzima, el uso de agua milli-Q en lugar de la solución de enzima, en 30 ° C y 24h. Los extractos acuosos obtenidos con los diferentes métodos enzimáticos asistida se liophylyzed y se mantuvieron a -70 ° C. Tabla 1 resume los rendimientos de recuperación de los extractos acuosos obtenidos. Se expresan en porcentaje en peso seco (calculado con respecto a la partida *Spirulina* biomasa).

Tabla 1. rendimiento de la extracción y el contenido total de aminoácidos de los extractos acuosos obtenidos con los procedimientos de extracción de enzimas asistida y de control en sus respectivas condiciones de funcionamiento óptimas.

Muestra	rendimiento		Contenido total de Aminoácidos			R 3
	(%, w / w) 1	% (w / w)	μ mol / g de extracto	mg / g de biomasa	μ mol / g de biomasa	
Controlar 2	19.20 ± 0.20	34.4 ± 0.5	2986 ± 47	66.0 ± 1.0	573 ± 9	1.0
Alcalase ®	36.50 ± 0.10	45.0 ± 7.1	3907 ± 69	164 ± 26.0	1426 ± 25	2.5
Flavourzyme ®	31.80 ± 0.10	16.9 ± 0.2	1471 ± dieciséis	53.8 ± 0.5	468 ± 5	0.8
Ultra fl o ®	19.70 ± 0.10	13.7 ± 0.5	1189 ± 40	27.0 ± 0.91	234 ± 8	0.4
Vino flujo ®	26.30 ± 0.10	13.5 ± 0.1	1172 ± 9	35.5 ± 0.3	308 ± 3	0.5

1 Por ciento en peso con respecto a la partida *Spirulina* biomasa. 2 No enzima pre-tratamiento. 3 relación molar de los aminoácidos totales obtenidos por gramo de extracto con y sin ayuda de enzimas. Los valores medios de los contenidos de aminoácidos individuales de todos los extractos resultaron estadísticamente no es igual en el *t*-prueba (*p*ag ≤ 0,05).

Todos los procesos de extracción de la enzima asistida habilitadas mayores rendimientos de extractos acuosos que la extracción de control, siendo mayor los rendimientos obtenidos con las dos proteasas (Alcalase ® y Flavourzyme ®). El rendimiento de la extracción más alta se obtuvo con Alcalase ®. Este biocatalizador permite un aumento en 1,9 veces el peso del extracto obtenido, en comparación con la obtenida en el proceso de extracción de control sin ninguna ayuda de la enzima (Tabla 1).

2.3. Análisis de la composición de extractos polares

Se analizaron todos los extractos secos (obtenidos en sus respectivos mejores condiciones) para determinar sus composiciones de ácidos y péptidos amino. Los extractos eran ricos en aminoácidos libres y péptidos cortos. Los valores totales obtenidos para ambos aminoácidos hidrolizados y libres se dan en la Tabla 1 . Alcalase ® extracto tenía una significativamente mayor contenido de aminoácidos (45% w / w extracto seco) que el extracto obtenido sin ninguna ayuda de la enzima (34% w / w), y también más alto que los otros tres extractos enzimáticos (13-17% w / w). Alcalase ® extracto tiene mayor interés nutricional, y algunos de los péptidos podría exhibir bioactividades de interés terapéutico. Este valor corresponde a la mayoría de los aminoácidos de la espirulina (50-65% w / w, Mesa 2).

Tabla 2. Composición de la espirulina de ASN LEADER SL, proporcionado por el fabricante.

Composición general					
proteínas	Los lípidos	Los hidratos de carbono	minerales	Fibra	Energía
50-65%	6-7,5%	18-22%	15%	0,2%	390 cal / 100 g

Totales (hidrolizados + libres) aminoácidos valores de contenido también se calcularon por la espirulina seca gramof. La relación entre cantidades de aminoácidos extraídos para cada método en particular y la cantidad obtenida con la extracción de control era mayor que 1 sólo en el caso de Alcalase ®, lo que indica la superioridad de Alcalase ® método no sólo con respecto a la extracción de control, sino también con respecto a los otros métodos enzimáticos (*p*ag ≤ 0,05). Cabe destacar, entre las dos enzimas proteolíticas y los dos glucanasas estudiados, solamente Alcalase ® significativamente aumentó el porcentaje de recuperación de los aminoácidos con respecto al ensayo de control (853 μ mol / g espirulina más). Estos resultados sugieren que la extracción de aminoácidos que no se mejora necesariamente por cualquier tipo de extracción de proteasa-asistida. Sin embargo, sólo el

proceso con Alcalase ® cedido un peso de aminoácidos 2,5 veces mayor que la extracción de control, y 3,1 veces mayor que la extracción con la otra proteasa (Flavourzyme ®). De 1 g de biomasa, la Alcalase ® método de extracción obtenida 1426 μ mol aminoácidos, una cantidad 2,5-6,1 veces mayor que la cantidad total obtenida con los otros métodos (control sin enzima y métodos enzimáticos asistida). La extracción de control sólo 573 obtiene μ aminoácidos mol / g de biomasa.

cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de ionización por electrospray en modo de ionización positivo (LC ESI-MS / MS) análisis revelaron que los péptidos más abundantes en los extractos de espirulina obtenidos con cuatro enzimas y sin una enzima pre-tratamiento (control) fueron todos diferentes de un extracto a otro. Más específicamente, los ocho péptidos presentes en Alcalase ® extracto fueron: MKKIEAIRPF, LPPL, ALAVGIGSIGPLGQGQ, TTAASVIAAL, DFPGDDIPIVS, LELL, WKLLP, y CHLLLSM (438 a 1.493 Da).

Por el contrario, el control extracto contenía 12 péptidos, a saber: NGDPFVGH, VFETGIKVDL, DFFVDKL, SGPPLDIKL, DVNETVLDNLPKTRTQI, DVNETVLDNLP, DSLISGAAQAVY, GIGNDPLEIQF, GLILLPHLTL, GLILLPHLA, AVLGAGALFHTF, y DVNETVLDNLP (851 a 1955 Da).

2.4. Análisis de la biomasa por TEM

Los cambios estructurales en la espirulina se investigaron mediante análisis de TEM (Figuras 4 y 5).

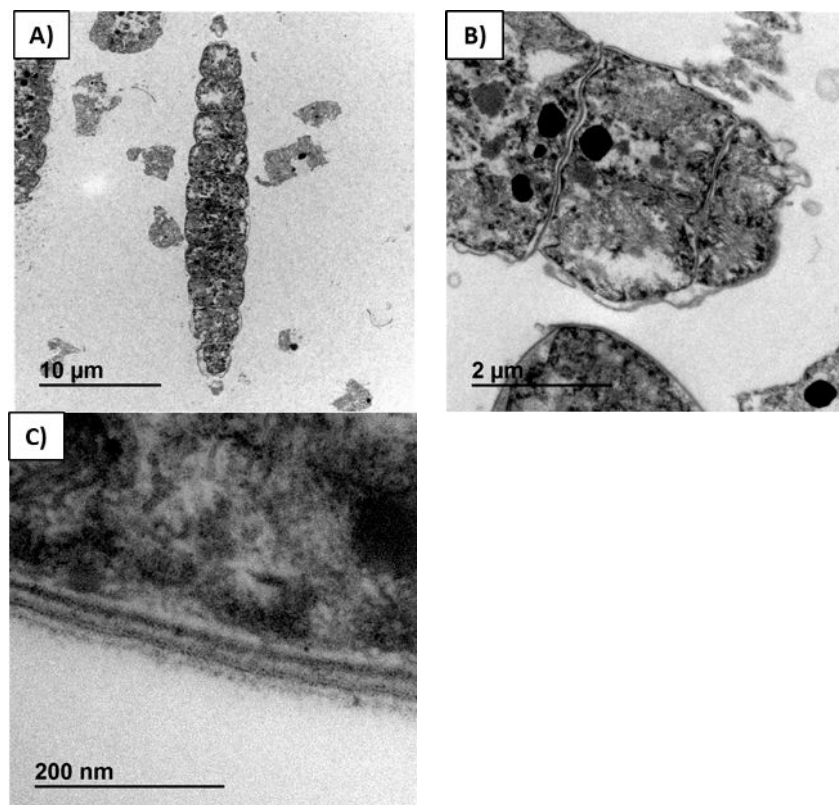


Figura 4. micrografías de *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomasa seca, ni trata con cualquier enzima ni extraído por cualquier disolvente; (**UNA**) un tricomas corte longitudinal y varios tricomas transversalmente de corte; (**SEGUNDO**) tres cianobacterias contiguos de una de tricomas separados por sus paredes celulares; (**DO**) detalle de la pared celular.

Figura 4 A es una micrografía de biomasa seca comercial no tratado con enzimas ni se extrajo con cualquier disolvente, en donde se visualiza una sección longitudinal a través de un tricomas con doce células. integridad completa del material celular, incluyendo la membrana, se visualiza claramente en la figura 4 ANTES DE CRISTO. Las cuatro capas de membrana celular se identi fi ed (Figura 4 DO). En la espirulina de partida, el citoplasma y systemwere tilacoide comprimen contra la membrana interna de la célula.

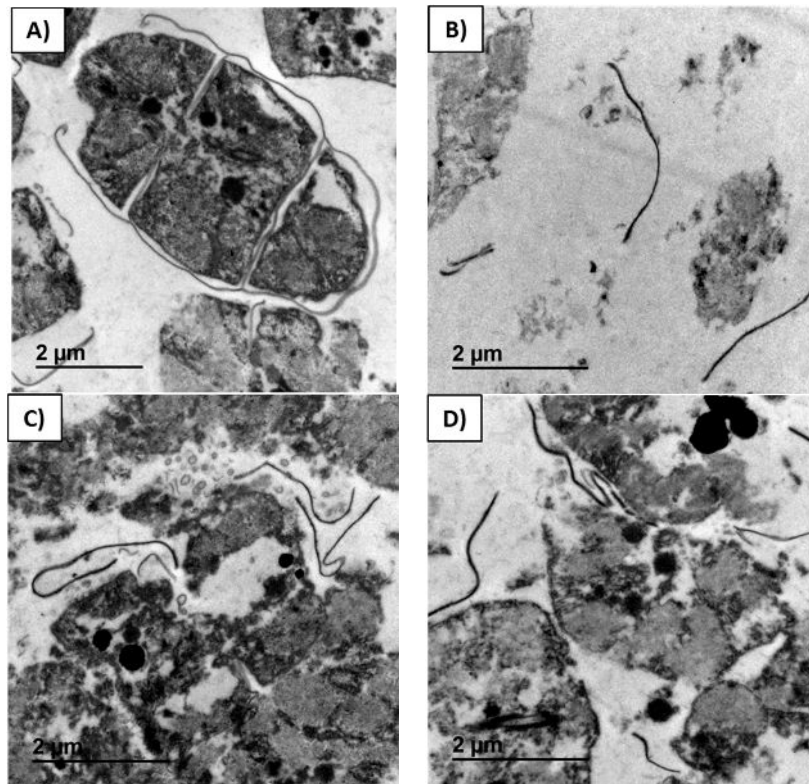


Figura 5. Microscopio electrónico de transmisión (TEM) micrografías de biomasa residual de *Arthrospira pag.*, obtenido después de la extracción de control (UNA) y las extracciones con Alcalase® (SEGUNDO), Ultraflo® (DO), Vinoflow® (RE) pretratamientos. Los extractos se obtuvieron en sus condiciones óptimas (pH 6,5, 1% v/w Alcalase® y 30 · DO; pH 7,0, 1% v/w Ultraflo® y 30 · DO; pH 6,5, 2% v/w Vinoflow® y 40 · C), y el control de experimento se realizó con agua milli-Q en lugar de la solución de enzima a 30 · C y 24 h.

En figura 5, Las micrografías de la biomasa residual obtenido después de la extracción de control (Figura 5 UNA), y biomasa residual obtenidos después de la extracción con Alcalase® (Figura 5 B), Ultraflo® (Figura 5 C), y Vinoflow® (Figura 5 D) asistencia se comparan a la misma escala. Trichomes todavía se observaron después de la extracción de control de la biomasa, aunque sus systemwas tilacoides no comprimen más contra la membrana interna de la célula (Figura 5 UNA). Las células después de la extracción de control exhibían un fenómeno de hinchamiento, y un fewwere separado de la tricomas. Por el contrario, después de todas las extracciones de enzimas estudiadas, el número de tricomas observada fue mínima y degradación celular fue evidente (Figura 5 B-D). Se obtuvo una dispersión de restante (no extraído) restos de material y de membrana intracelulares después del tratamiento de la biomasa con Alcalase® (Figura 5 SEGUNDO). Después de la extracción con Alcalase® la asistencia, la mayor parte del material celular desaparecieron. En consecuencia, la biomasa residual es más transparente (Figura 5 B) que los otros (figura 5 A, C, D). Este hecho se debe a la mayor recuperación de biocomponentes con Alcalase® que con el control y otras extracciones de enzimas (Figura 5 A, B). Estas observaciones están de acuerdo con estudios anteriores, donde las células de cianobacterias modificaron su forma y tamaño, hinchazón después de un tratamiento con lisozima [32]. Menos material celular permaneció en las biomasa residual extraídos con Ultraflo® y Vinoflow® (Figura 5 C, D) que en el experimento de control (menor densidad electrónica observada). Sin embargo, en todos estos casos la cantidad de residuos de células fue significativamente mayor que en el caso de la Alcalase® extracción (Figura 3 SEGUNDO). Estos resultados están en buena correspondencia con los valores de rendimientos de extracción obtenidos (Tabla 1), Donde el Alcalase®

proceso de extracción fue el más eficaz para la recuperación biocomponente de espirulina.

Las micrografías de este estudio muestran que Alcalase® pre-tratamiento de la biomasa es la fi ciente más ef, lo que resulta en la mayoría de tricomas y esferoplastos degradados. Vladimirescu reveló la existencia de diferencias en la sensibilidad enzimática de las células [33]. En comparación con otras bacterias, *Spirulina*

sp. tiene una membrana celular más gruesa que hace difícil más difícil para desprender las células o esferoplastos de las tricomas. Debido a eso, la desintegración celular no es tan eficaz alcanzado de manera suficiente con el tratamiento lisozima [34].

La inspección comparativa de micrografías de biomasa residual obtenidas con los diferentes procedimientos de extracción de enzimas asistida (figura 5) Revela que la enzima pre-tratamiento de la biomasa que permitió la recuperación más alta de biocomponente (Alcalase®) produce la mayor degradación celular. En comparación con los otros tipos de extracción de enzimas asistida, la biomasa se extrae después de Alcalase®

tratamiento apareció casi completamente desintegrado y con muy baja densidad electrónica, como resultado de la mayor extracción de sus biocomponentes (Figura 5 B-D).

Los resultados aquí descritos apoyan la implementación de la tecnología de enzimas para reemplazar los procesos de extracción convencionales. el Alcalase® extracción en el presente documento informó significativamente aumentó el rendimiento y la calidad de los extractos acuosos de *A. (Spirulina) platensis* biomasa. La tecnología de enzimas desarrollada utiliza enzimas de calidad alimentaria y hexano, que son aceptadas por las agencias reguladoras para la alimentación y la seguridad del fármaco. Esta tecnología enzima parece prometedora para una producción más eficiente, segura y ambientalmente limpia la producción industrial de extractos de cianobacterias de alto valor en la nutrición, cosmética, y las industrias farmacéuticas [14]. El potencial de este método de extracción será más evidente una vez que los biocomponentes extraídos son molecularmente y funcionalmente caracterizados. se informó una caracterización completa de los diferentes extractos acuosos obtenidos con todas las enzimas en sus respectivas condiciones de funcionamiento óptimas.

3. Materiales y Métodos

3.1. materiales

Arthrospira (Spirulina) platensis biomasa seca fue adquirida de ASN Líder SL (Murcia, España). Composición de la biomasa cianobacterias proporcionado por el fabricante se da en la Tabla 2 . La biomasa cianobacterias era un polvo seco liofilizado para el uso de la nutrición. Los disolventes fueron de grado HPLC. N-hexadecano fue utilizado como un estándar interno, y sulfato de sodio como un desecante. Todas ellas fueron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las soluciones tampón utilizadas fueron CH₃COONa / CH₃COOH (pH 5-6), Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH 6,5-8), y Na₂CO₃ / NaHCO₃ (pH 8,5-9). Alcalase® 2.4 L FG, Flavourzyme®, Ultraflo® L, y el flujo Vino® Max A fueron generosamente donados por Novozymes A / S (Kalundborg, Dinamarca). Alcalase® tiene una actividad de 2,4 AU A / g. Flavourzyme® tiene al menos 1.000 LPU / g (unidades de leucina aminopeptidasa / g determinado con Leu-pNA), no siendo el único tipo de actividad en esta preparación. La actividad principal de Ultraflo® L es β- glucanasa (45 fúngica β- glucanasa (FBG) por g). Además, contiene aproximadamente 470 unidades de xilanasa Farbe (FXU) por g. Vino flujo® Max A tiene una actividad declarada de 46 BGXU / ml.

Alcalase® es una preparación comercial de una serina endo-peptidasa (EC 3.4.21.62) a partir de *Bacillus licheniformis* (principalmente subtilisina A). Alcalase® actúa como una esterasa, que catalizan la hidrólisis estereoselectiva de ésteres, e hidroliza ésteres de aminoácidos incluyendo ésteres de aminoácidos heterocíclicos. Flavourzyme® es una preparación peptidasa de *Aspergillus oryzae*, amplia y diversa utilizado para la hidrólisis de proteínas en aplicaciones industriales y de investigación. Ocho enzimas han sido identificados en Flavourzyme®, es decir, dos aminopeptidasas, dos dipeptidil peptidasas, tres endopeptidasas, y uno α-amilasa. purificada Flavourzyme® enzimas se caracterizaron bioquímicamente con respecto a los perfiles de pH y temperatura y tamaños moleculares [35]. Ultraflo® L es una preparación de enzima multicomponente que contiene 5-10% (w / w) β- glucanasa (endo-1,3 (4) -) y 1-5% (w / w) xilanasa (endo-1,4-) como los principales componentes activos (EC 3.2.1.6 y EC 3.2.1.8), producidas por una cepa de *Humicola insolens*. La preparación de enzima se utiliza en la industria cervecera para hidrolizar gomas de polisacáridos y para descomponer los materiales de la pared celular en cereales como el beta-glucano y xilanos [36]. Estos dos tipos de actividades enzimáticas en Ultraflo® son acción de celulosa y la catálisis de la hidrólisis de los azúcares complejos en las regiones amorfas de la membrana celular. Ultraflo® L también se comercializa en la Unión Europea como una alimentación de aditivos bajo el nombre de Pentopan / Biofeed Plus. Hay una enzima más abundante, mientras que una segunda actividad se debe a otras dos enzimas. Vinoflow® Max A es una

β - glucanasa (exo-1,3-) la preparación, que se utiliza en el vino para acelerar el proceso de envejecimiento [37]. Todas estas preparaciones de enzimas son de tipo GRAS hidrolasas.

3.2. La extracción de la enzima-Asistida de *Spirulina Biocomponentes*

Los métodos de extracción de enzimas asistida de la biomasa cianobacterias estudiados usando Alcalase® 2.4 L FG, Flavourzyme®, Ultra flo®, y el flujo Vino® Max A difieren en la etapa de degradación celular (proteína o hidrólisis de azúcar). Todas las biomásas degradados fueron siguiente extraen con disolventes. Estas extracciones se compararon con el mismo procedimiento de extracción por solvente llevado a cabo sin ninguna ayuda de la enzima (experimento control).

La influencia de los parámetros más importantes de la etapa enzimática se estudió: pH 5.5-8, temperatura 30-50 ° C, y la enzima de carga 0,5-2 (v/w, volumen de enzima preparación / peso de enzima + suspensión de biomasa). Se determinaron las condiciones de funcionamiento óptimo de los cuatro procesos de extracción de la enzima-asistida.

Una suspensión de la biomasa (/ tampón acuoso 0,2 g ml) que contiene la carga correspondiente de preparación de la enzima (o un volumen equivalente de agua milli-Q, en el caso del experimento de control), se mantuvo bajo agitación magnética durante el tiempo indicado en una temperatura controlada. Salvo que se indique, el estudio se llevó a cabo por triplicado a los tiempos de reacción cortos y largos (duración de la enzima pre-tratamiento: 4 y 24 h), como sigue:

- **Efecto del pH:** Este estudio se llevó a cabo a 40 ° C y 1% (v/w) solución de enzima
- **Efecto de la temperatura:** Este estudio se llevó a cabo a temperaturas relativamente suaves (30-50 ° C) al valor de pH óptimo determinado previamente.
- **Efecto de la carga enzimática:** Este estudio se realizó a los valores óptimos de pH y de la temperatura previamente determinado en el intervalo de 0,5-2% (v/w) solución de enzima. La extracción proceso fue seguido a las 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h.
- **Disolvente etapa de extracción:** Cada parte alícuota (0,5 ml) de la suspensión de enzima-biomasa se disolvió en 1 mezcla de hexano-isopropanol ml (3: 2, v/v). La solución resultante se centrifugó durante 15 min a 10.000 rpm, y se dejó separar por completo en las fases de dos líquidos (acuosos y aceite). A continuación, la biomasa residual se separa de la fase líquida. A continuación, la solución líquida se colocó en un embudo de decantación. Después de la separación del aceite y fases acuosas, se recogió la fase de aceite. A continuación, el protocolo de extracción de fase de aceite se repitió dos veces más mediante la adición de 0,25 ml de mezcla de hexano-isopropanol al embudo de decantación. Finalmente, los extractos dos líquidos (acuosos y aceite) obtenidos se secaron por congelación.
- **Ampliarse extracción:** Con el fin de obtener mayores cantidades de extractos, todos los procesos de extracción (enzima-asistidos y extracciones de control) se llevaron a cabo en un factor de escala de 2,5 en sus respectivas condiciones óptimas para 24 h enzima pre-tratamiento con agitación magnética (500 rpm). Scaled hasta procesos de extracción se llevaron a cabo como sigue: pH 6,5, 30 ° C y 1% v/w Alcalase®, pH 6,0, 30 ° C y 1% v/w Flavourzyme®, pH 7,0, 30 ° DO; y 1% v/w Ultra flo®, pH 6,5, 40 ° C y 2% v/w

Vino flujo®. La extracción sin digestión con enzimas (control) se llevó a cabo usando milli-Qwater en lugar de la preparación enzimática en tampón a 30 ° C y 24h. Después del tiempo indicado, la mezcla de enzimas en la biomasa se centrifugó durante 30 min a 14.000 rpm y 10 ° C. Todos los extractos acuosos correspondientes se liofilizaron durante 4 días y después se pesaron. Todos los valores de peso en seco de los extractos acuosos se corrigieron por sustracción del peso correspondiente de la solución de enzima tampón (inferior al 1% w/w). biomásas residuales obtenidos se secaron bajo nitrógeno. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

3.3. Análisis y Caracterización de extractos acuosos

3.3.1. Los análisis de HPLC

Un aparato de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de dispersión de luz evaporativa (HPLC-ELSD) se utiliza para la optimización del proceso de extracción enzimática. estos análisis

permitió la determinación de los cambios relativos de las concentraciones biocomponente en los extractos acuosos obtenidos a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.

Los análisis se llevaron a cabo con un aparato de Hitachi D-7000IF (Alemania) con una columna de sílice de Kromasil C18 (5 μ m, 250 \times 4,6 mm) conectado a un detector ELSD Sedex 55 (SEDERE, Francia). Solución acuosa de las muestras liofilizadas (20 μ se inyectó L de 50 mg / ml) y se analizó en 30 \cdot C para 83 min con una fase móvil de gradiente en 1,5 mL / min, fase A ser agua milliQ (100% v/v) y la fase B es acetonitrilo / agua milliQ (80:20 v/v). La composición de las fases (A: B) variaron como sigue: 96: 4 para el primer 5 min, aumentando a 60:40 en 60 min, seguido por un aumento lineal de la fase B hasta el 95% en 1 min. entonces Composición se mantuvo durante los siguientes 7 min (hasta 23 min), entonces la fase móvil volvió a la primera composición (96: 4) y se mantuvo constante para el resto del análisis. El análisis de cada muestra se replicó tres veces. Para los análisis de los extractos acuosos líquidos obtenidos después de 4 h enzima pre-tratamiento, 0,5 ml de fase acuosa se mezcló con 1 ml de agua destilada, y 20 μ L de la solución resultante se inyectó en el HPLC.

3.3.2. Composición de aminoácidos y de péptidos

Se analizaron los extractos obtenidos en las respectivas condiciones óptimas para determinar su composición en aminoácidos, utilizando un procedimiento de cromatografía desarrollado por Spackman et al. [38]. Las soluciones de los diferentes extractos acuosos (1-2.6 mg / ml) se prepararon por triplicado y se colocan en los tubos de hidrólisis. Norleucina se utilizó como estándar interno en este ensayo. El aparato analizador se calibró con tres tubos de hidrólisis que contiene cantidades conocidas del estándar y norleucina. Las soluciones estándar se sometieron al mismo tratamiento de hidrólisis como las soluciones de extracto. Por último, todos los tubos de hidrólisis se secaron en un Speed Vac de vacío.

Los tubos de hidrólisis que contienen las soluciones de muestra se colocaron en botellas de vidrio con una válvula para hacer el vacío, y se purgó con gas nitrógeno inerte. A cada matraz, 200 μ Se añadieron L HCl 6 N y 50 mg de fenol. A continuación, se aplicó un vacío a cada matraz durante 20 segundos y luego se purgó con gas inerte de nitrógeno durante 20 seg. Este proceso se repitió tres veces. Cada matraz se introdujo en un horno a 110 \cdot C durante 21 h. Después de eso, los tubos de hidrólisis se secaron en el Speed Vac. muestras hidrolizadas y estándar se disolvieron en tampón, y después se inyectaron en el analizador.

El análisis cuantitativo de mezclas de aminoácidos se llevó a cabo en un Biochrom 30 serie del ácido Analizador Amino, con una reproducibilidad > 0,5 CV a 10 nmoles. Biochrom 30 utiliza la metodología clásica para análisis de aminoácidos, basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico y una reacción post-columna hecha continua con ninhidrina, con una sensibilidad de \sim 10 pmol.

Todos los extractos acuosos se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de ionización por electrospray en modo de ionización positivo (LC ESI-MS / MS) para identificar sus respectivos componentes peptídicos. Antes del análisis, las muestras se limpiaron con consejos C18. LC ESI-MS / MS análisis se llevaron a cabo en un último nanoHPLC 3000 (Dionex, Sunnyvale, California) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Amazon velocidad (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La fase reversa **columna analítica usada fue una PepMap Acclaim C18 de 75 μ metro \times 15 cm, 3 μ m tamaño de partícula y 100 de tamaño de un poro (ThermoScientific, EE.UU.). La columna trampa era un PepMap C18 de 5 μ m diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro, conectado en serie con la columna analítica. La bomba de carga barrió una solución de ácido trifluoroacético 0,1% en 98% de agua / 2% de acetonitrilo (Scharlab, Barcelona, España) a 3 μ L / min El NanoPump funcionar a una flujo de 300 nL / min en condiciones de gradiente, usando 0,1% de ácido fórmico (Fluka, Buchs, Suiza) en agua (fase A), y 0,1% de ácido fórmico en 80% de acetonitrilo / 20% de agua (fase B). El esquema de la gradiente de elución fue: modo isocrática con 96% de A, 4% de B durante 5 min, un aumento lineal a 40% de B en 60 min, un aumento lineal a 95% de B en 1 min, condiciones isocráticas de 95% de B durante 7 min, y volver a las condiciones iniciales en 10 min. Cinco μ L de soluciones de extracto (4 μ sol/ μ L) se inyectaron, y se detecta en 214 y 280 nmwavelengths. En un segundo análisis, 5 μ L de soluciones de extracto (10 μ sol/ μ L) se inyectaron. Los systemwas LC conectados por una fuente CaptiveSpray (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) para el espectrómetro de trampa de iones, que opera en modo positivo con un conjunto de voltaje capilar de 1400 V. La adquisición automática de datos permite la observación secuencial de ambos espectros de MS (m / z 350-1500) y la MS CID**

Los espectros de los 8 iones más abundantes. En los análisis de 10 µ sol/ µ L muestras, la gama de espectros de MS fue 100-1000 m / z. dinámica de exclusión se aplicaron para evitar el aislamiento de la misma m / z para 1 min después de su fragmentación.

Por péptido identificación, datos de MS y MS / MS de las fracciones individuales de HPLC fueron procesados con DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Espectros MS / MS (en forma de genérico Mascot files) se analizaron frente a una base de datos obtenida a partir de NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) que contiene 68623 entradas de proteínas a partir de ambos *Spirulina* y *Arthrospira*.

La búsqueda de base de datos se llevó a cabo con la mascota v.2.6.0 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) [39]. parámetros de búsqueda se establecen como sigue: oxidados metionina como la variable de modificación sin la enzima de restricción. La tolerancia para la masa del péptido de 0,3 Da y 0,4 Da en la EM y en los modos de MS / MS, respectivamente.

En la mayoría de los casos, una precisión de ± 0,1-0,2 Da se obtuvo para ambos MS y

Espectros MS / MS.

Además, en el caso de Alcalase® extraer todos MS y MS / MS Los espectros se analizaron usando la herramienta 'de novo' del software Peaks (soluciones de Bioinformática, Inc) .Este programa combina tanto el análisis no condicionado 'de novo' de espectros MS / MS con la búsqueda más convencional contra organismo específico (es decir, *Arthrospira-Spirulina*) bases de datos de secuencia. Sólo asignaciones de secuencia con valores de confianza igual o superior a 80 se han incluido, para evitar secuencias dudosas. Tenga en cuenta que este enfoque no puede distinguir las siguientes identidades: I y L, K y Q, F y M.

3.3.3. Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, informar de los resultados como sus valores medios correspondientes con sus errores estándar, que se compararon en con nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$) utilizando el programa SPSS.

3.4. Microscopía Electrónica de Transmisión análisis, TEM

(extraídos) muestras biomasa fresca y residual se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión. Los cambios morfológicos de la biomasa residual después del proceso de extracción enzimática asistida se visualizaron y se compararon mediante análisis de TEM. Un aparato de Jeol 1010 Jem (100kV, Yokyo, Japón), acoplado a una cámara digital Orius SC200 (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EE.UU.) y el software Digital Micrografía v 3.4 para la adquisición de imágenes, se utilizó. Antes del análisis, todas las muestras se trataron como sigue: primero que se lavaron tres veces con tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, a continuación, se transfirieron a 2% w / w agar bacteriológico en tampón y fijada en glutaraldehído (2,5% w / w)

durante 2 h 40 min, y finalmente se lavó con 0,1 M de tampón de cacodilato (pH 7,3). Post- fijación de las muestras se realizó en bloques de agar 1-2 mm con tetróxido de osmio (1% w / w) durante 1 h 40 min. Las muestras se deshidrataron luego en un horno con etanol absoluto y embebidos en una resina Durcupan, y luego se polimerizaron a 60 ° C durante 48 h. Las muestras se cortaron en capas de ultra finas (60 nm) con un Leica ultracut S. Finalmente las rodajas de la muestra se tiñe con uranio y conducen acetatos.

4. Conclusiones

Diferentes métodos de extracción de alto valor biocomponentes espirulina hidrófilo se llevaron a cabo a través de cuatro degradaciones enzimáticas selectivos de biomasa espirulina. La comparación de los extractos obtenidos en sus condiciones de operación óptimas demostró que diferentes productos se pueden obtener a través de la degradación de espirulina por diferentes tipos de enzimas. Los cuatro procesos de extracción de la enzima asistida fueron superiores al proceso de extracción correspondiente sin enzima-asistencia para la degradación de la biomasa antes. Entre las dos proteasas y la endo y exoglucanasas, Alcalase®

dio el rendimiento de extracción más alta de extracto hidrófilo, como resultado de su degradación eficaz de las proteínas de membrana, lipoproteínas, y peptidoglucano. Tanto la composición del extracto y la cantidad de biocomponentes extraídos dependían de la temperatura, la carga de la enzima y el tipo, el pH, y la duración del pre-tratamiento enzimático de la biomasa. En comparación con los procesos de extracción convencionales, rendimientos de extracción más altos se obtuvieron en condiciones suaves; Alcalase® extracto era el que tenía el más alto

contenido de proteínas. Todos los extractos de proteínas obtenidos podrían aplicarse para la construcción de la sociedad y el músculo en los deportes / nutrición activo, para la población geriátrica, los pacientes convalecientes, etc.

Contribuciones de autor: Este trabajo fue diseñado y supervisado por CO; CMV-M. y LE llevó a cabo el trabajo experimental; Los análisis estadísticos fueron realizados por CMV-M.

Fondos: Esta investigación fue parcialmente apoyado por el Programa de I + D Actividades de la Comunidad Autónoma de Madrid, España: Tecnolog y o un 2013 (Proyecto INSPIRA1-CM Ref. S2013 / ABI-2783 "Aplicaciones Industriales de la Espirulina" con financiación del fondo estructural Encontrado (Fondo Social Europeo y -EFS- encontrado Europeo de Desarrollo-regional FEDER-), y por MINECO del Gobierno español (subvención Ref. CTQ2017-86170-R).

Expresiones de gratitud: Los autores desean agradecer a Rafael Montoro Carrillo (director de ASN Líder SL) por el generoso apoyo de una *Spirulina* muestra gratuita y la información proporcionada. Agradecemos también a Ramiro Martínez y nez (Novozymes, España) para suministrar la amabilidad de las enzimas utilizadas en esta investigación.

Los conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses. Los proveedores de fondos no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio; en la recogida, análisis, o interpretación de los datos; en la redacción del manuscrito o en la decisión de publicar los resultados.

referencias

1. Singh, R .; Parihar, P .; Singh, M .; Bajguz, A .; Kumar, J .; Singh, S .; Singh, vicepresidente; Prasad, SM El descubrimiento de las posibles aplicaciones de las cianobacterias y algas metabolitos en la biología, la agricultura y la medicina: Situación actual y perspectivas de futuro. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fleurence, J. La degradación enzimática de las paredes celulares de algas: Un enfoque útil para mejorar la accesibilidad de proteína? *J. Appl. Phycol.* **1999**, *11*, 313-314. [[CrossRef](#)]
3. Beveridge, Estructuras TJ de las paredes celulares Gram-negativas y sus derivados vesículas de membrana. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 4725 a 4733. [[PubMed](#)]
4. Zheng, H .; Yin, J .; Gao, Z .; Huang, H .; Ji, X .; Dou, C. La alteración de las células *Chlorella vulgaris* para la liberación de los lípidos de biodiesel productoras: Una comparación de molienda, ultrasonificación, molienda con perlas, lisis enzimática, y las microondas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164*, 1215-1224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Liang, K .; Zhang, Q .; Cong, W. Enzyme-asistido extracción acuosa de frommicroalgae lípidos. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11771-11776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vilas, MVA; Hernandez, CO *En el cruce entre la nutrición y farmacología*; Bentham Science Publishers: Sharjah, EAU, 2017; Volumen 2.
7. Vonshak, A. *Spirulina platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biología y Biotecnología*; Taylor & Francis: Milton Park, Oxfordshire, Reino Unido, 1997.
8. El-Baz, FK; El-Senousy, WM; El-Sayed, AB; Kamel, MM En actividades antivirales y antimicrobianas in vitro de extracto de *Spirulina platensis*. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 52-56. [[CrossRef](#)]
9. Clemente, G. Une nouvelle algue alimentaire: La *Spirulina*. *Rev. Inst. Pasteur de Lyon* **1971**, *4*, 103-114.
10. Campanella, L .; Crescentini, G .; Avino, P. composición química y la evaluación nutricional de algunos productos alimenticios naturales y comerciales sobre la base de *Spirulina*. *Analisis* **1999**, *27*, 533-540. [[CrossRef](#)]
11. Hsueh, YC; Wang, BJ; Yu, ZR; Wang, CC; Koo, M. Optimización de un método de preparación continua de *Spirulina platensis* y- ácido linoléico por la tecnología de dióxido de carbono supercrítico usando la metodología de superficie de respuesta. *Sains Malaysiana* **2015**, *44*, 1739-1744.
12. Singh, S .; Kate, BN; Banerjee, UC compuestos bioactivos a partir de cianobacterias y microalgas: Una visión general. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2005**, *25*, 73-95. [[CrossRef](#)]
13. Pfeiffer, C .; Bauer, T .; Surek, B .; Schömig, E .; Gründemann, D. cianobacterias producen altos niveles de ergotoneína. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1766-1769. [[CrossRef](#)]
14. Lupatini, AL; Colla, LM; Canan, C .; Colla, E. La aplicación potencial de la microalga *Spirulina platensis* como un fuente de proteína. *J. Sci. Agric Food.* **2017**, *97*, 724-732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Palinska, KA; Krumbein, WE perforación patrones en la pared de peptidoglicano o fi cianobacteria filamentosas. *J. Phycol.* **2000**, *36*, 139-145. [[CrossRef](#)]
16. Bermúdez Hombres Méndez, JM; Arenillas, A .; Hombres Méndez Díaz, JA; Boffa, L .; Mantegna, S .; Binello, A .; Cravotto, G. Optimización de la extracción de aceite de microalgas bajo ultrasonido y la irradiación de microondas. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 1779-1784. [[CrossRef](#)]

17. Hahn, T. ; Lang, S. ; Ulber, R. ; er fl Muf, procedimientos K. novedosos para la extracción de fucoïdan de algas pardas. *Proceso Biochem.* **2012**, *47*, 1691-1698. [[CrossRef](#)]
18. Postma, PR; Pataro, G. ; Capitoli, M. ; Barbosa, MJ; Wijffels, RH; Eppink, MHM; Olivieri, G. ; Ferrari, G. extracción selectiva de componentes intracelulares de la microalga *Chlorella vulgaris* por tratamiento ELD-temperatura fi eléctrico pulsado combinado. *Bioresour. Technol.* **2016**, *203*, 80-88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Neves, VTDC; Ventas, EA; Perelo, LW Influencia de los métodos de extracción de lípidos como pre-tratamiento de biomasa de microalgas para la producción de biogás. *Renovar. Sostener. Rev. energía* **2016**, *59*, 160-165. [[CrossRef](#)]
20. Rosenthal, A. ; Pyle, DL; Niranjana, K. acuoso y procesos enzimáticos para la extracción de aceite comestible. *Enzima Microb. Technol.* **1996**, *19*, 402-420. [[CrossRef](#)]
21. Bligh, EG; Dyer, WJ Un método rápido de extracción de lípidos total y purificación. *Poder. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911-917. [[CrossRef](#)]
22. Folch, J. ; Lees, M. ; Sloane Stanley, GH Un método simple para el aislamiento y purificación de lípidos totales de los tejidos animales. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497-509.
23. Sa fi, C. ; Ursu, AV; Laroche, C. ; Zebib, B. ; Merah, O. ; Pontalier, PY; Vaca-Garcia, extracción C. acuosa de proteínas frommicroalgae: Efecto de diferentes métodos de disrupción celular. *Res algal.* **2014**, *3*, 61-65. [[CrossRef](#)]
24. Safi, C. ; Charton, M. ; Ursu, AV; Laroche, C. ; Zebib, B. ; Pontalier, PY; Vaca-Garcia, C. liberación de proteínas de microalgas hidro-soluble usando tratamientos mecánicos y químicos. *Res algal.* **2014**, *3*, 55-60. [[CrossRef](#)]
25. Kim, NH; Jung, SH; Kim, J. ; Kim, SH; Ahn, HJ; Song, KB La purificación de un péptido quelante de hierro a partir de hidrolizados de proteínas espirulina. *J. coreana Soc. Appl. Biol. Chem.* **2014**, *57*, 91-95. [[CrossRef](#)]
26. Lu, J. ; Ren, DF; Xue, YL; Sawano, Y. ; Miyakawa, T. ; Tanokura, M. El aislamiento de un péptido antihipertensivo de Alcalase Recopilación de Spirulina platensis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7166 hasta 7171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vo, TS; Ryu, B. ; Kim, SK La purificación de nuevos péptidos anti-inflamatorio de hidrolizado enzimático de la microalgas comestible *Spirulina maxima*. *J. Funct. alimentos* **2013**, *5*, 1336-1346. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, B. ; Zhang, X. Separación y nanoencapsulación de polipéptido antitumoral de *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 1230-1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ismaiel, MMS; El-Ayouty, YM; Piercey-Normore, M. Papel de pH en la producción de antioxidantes por *Spirulina platensis* (Arthrospira). *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 298-304. [[CrossRef](#)]
30. En, MJ; Gwon, SY; Chae, HJ; Kim, DC; Kim, DH La producción de Spirulina extracto mediante hidrólisis enzimática. *J. coreana Soc. Appl. Biol. Chem.* **2007**, *50*, 304-307.
31. Mushtaq, M. ; Sultana, B. ; Anwar, F. ; Adnan, A. ; Rizvi, SSH Enzyme-asistido supercrítico extracción de fluido de antioxidantes fenólicos de la cáscara de la granada. *J. Supercrit. fluidos* **2015**. [[CrossRef](#)]
32. Lindsey, JK; Vance, BD; Keeter, JS; Scholes, VE formación de esferoplastos y cambios ultraestructurales asociados en un cultivo sincrónico de *Anacystis nidulans* tratado con lisozima. *J. Phycol.* **1971**, *7*, 65-71. [[CrossRef](#)]
33. Vladimirescu, AF Aislamiento de permeoplasts y esferoplasts de *Spirulina platensis*. *Rumana Biotechnol. Letón.* **2010**, *15*, 5361 a 5368.
34. Yi, P. ; Zhao, YJ; Guo, HL Inducción de esferoplasts vacuoladas y el aislamiento de vacuolas en cianobacterias. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 366-369. [[CrossRef](#)]
35. Merz, M. ; Eisele, T. ; Berends, P. ; Appel, D. ; Rabe, S. ; En blanco, I. ; Stressler, T. ; Fischer, L. Flavourzyme, una preparación enzimática con Industrial Relevance: automatizada de nueve pasos La purificación y caracterización parcial de ocho enzimas. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, Desde 5682 hasta 5693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Smith, J. *Mezclado β- Glucanasa, xilanasa de Humicola insolens*; Químicas y técnicas de evaluación (CTA); FAO: Roma, Italia, 2004; pp. 1-5.
37. Pronk, IMEJ; Leclercq, C. xylanase mixta, β- preparación de enzima glucanasa producida por una cepa de *Humicola insolens*. *OMS los hu Alimentos. Ser. JECFA* **2004**, *52*, 1-6.
38. Spackman, DH; Stein, WH; Moore, Aparato S. automático de grabación para uso en la cromatografía de Amino Acids. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1190-1206. [[CrossRef](#)]
39. Perkins, DN; Pappin, DJC; Creasy, DM; basada en la probabilidad Cottrell, JS proteína identificación mediante la búsqueda en bases de datos de secuencia utilizando los datos de espectrometría de masas. *electroforesis* **1999**, *20*, 3551-3567. [[CrossRef](#)]

