

**EVALUACION DE LA PRODUCCION DEL PIGMENTO AZUL
FICOCIANINA DE LA MICROALGA *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832**



KAREN SUSANNA MOSQUERA TORRADO

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
para optar el título de**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

Bogotá, D.C - Colombia

2017

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO AZUL
FICOCIANINA DE LA MICROALGA *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832**

KAREN SUSANNA MOSQUERA TORRADO

Sandra Baena Garzón Ph.D

Director

Gina López Ph.D

Co – Director

María Ximena Rodríguez

Evaluador

Bogotá, D.C - Colombia

2017

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO AZUL
FICOCIANINA DE LA MICROALGA *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832**

KAREN SUSANNA MOSQUERA TORRADO

**Concepcion Judith Puerta Ph. D
Decana de la facultad de ciencias**

**Marcela Franco Ph. D
Directora Programa**

Bogotá, D.C - Colombia

2017

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes de todo, quiero agradecer a Dios por guiarme e iluminarme en lo que debía hacer para alcanzar los logros y metas propuestas en este trabajo.

A toda mi familia, en especial a mis padres, por su constante apoyo en todo este proceso.

A la Dra. Sandra Baena, por permitirme trabajar en compañía de ella y todo su grupo de investigación para llevar a cabo dicho trabajo, y por todos los consejos y recomendaciones recibidos por parte suya.

A Gina López, por ser una guía en este proceso, su constante apoyo y sus consejos recibidos.

A Carolina Díaz, Yaris Eulegelo, Mati Muñoz, Felipe Martínez y Erika Corrales por ser mi familia en el laboratorio de anaerobios, y por su apoyo y ayuda en los momentos que más lo necesitaba.

A Caro Benavides, Meli Calvo, Dani Barreto, Cami Forero, Vale Rojas, Gustavo, Silvi, Dani, Camila, Cinthya, Hernán, por ser mi segunda familia en USBA y su apoyo.

Al Dr. Ricardo Vera y Marcela Rey por su colaboración y consejos.

A mis amigas de universidad Maryi Orjuela, Laura Patiño, Jenny Quintana por su compañía y apoyo constante.

RESUMEN

La ficocianina (FC), es una proteína y pigmento accesorio azul que pertenece a las ficobiliproteínas, su función principal es ampliar el espectro de absorción de la luz de los pigmentos primarios y servirle a los microorganismos que los producen como sistemas de protección frente al exceso de luz (fotoprotección). Este tipo de pigmento se utiliza ampliamente en las industrias, ya sea en la industria de alimentos como aditivo nutricional, o como un anti-radical libre en la industria cosmética, pero principalmente se usa en la medicina para tratar enfermedades de causadas por el estrés oxidativo y como un posible agente anticancerígeno. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la producción del pigmento azul ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832, microalga acidófila aislada de un manantial termal ácido ubicado en el Parque Nacional Natural de los Nevados (PNN de los Nevados). Con el fin de analizar cuál es el efecto de la concentración de diferentes variables de cultivo en la producción de biomasa y ficocianina, se realizó un diseño factorial general.

A partir de esta metodología, se estableció que el extracto de levadura a 1.5 g/L, la glucosa a 5 g/L, y el sulfato de amonio a 1.3 g/L, son las concentraciones de dichas variables en el medio de cultivo de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 que tienen una mayor significancia ($p < 0,05$) en la producción de biomasa y ficocianina, con un valor de 205,46 mg/ml y 3,85 mg/L respectivamente. Una vez identificadas las variables los valores máximos de concentración de biomasa y ficocianina, se procedió a realizar una fotoinducción partiendo de una siembra en heterotrofia con las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas a una siembra en autotrofia con condiciones establecidas de luz.

La fotoinducción de la cepa *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 demostró que a mayor incidencia de luz (110 Lux) la microalga producía mayor concentración del pigmento (ficocianina) con aproximadamente 4,35 mg/L.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Microalgas.....	4
3.1.1 Metabolismo – microalgas.....	4
3.1.2 Metabolitos de interés industrial – microalgas.....	5
3.2 <i>Galdieria</i> sp.	5
3.3 Pigmentos fotosintéticos.....	6
3.3.1 Ficobilisomas.....	6
3.3.2 Ficobiliproteínas.....	7
3.4 Ficocianina (FC).....	7
3.4.1 Importancia y aplicación actual de la ficocianina.....	8
3.5 Factores que afectan la producción de ficocianina.....	8
3.5.1 Factor de crecimiento – Autotrofia.....	9
3.5.2 Factor de crecimiento – Heterotrofia.....	9
3.5.3 Factor de crecimiento – Mixotrofia.....	10
3.5.4 Fuente de carbono.....	11
3.5.5 Fuente de nitrógeno.....	11
3.5.6 Agitación.....	12
3.5.7 Temperatura.....	12
3.5.8 Luz.....	12
3.5.9 pH.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. METODOLOGÍA.....	15
5.1 Microorganismo.....	15
5.2 Condiciones de cultivo.....	15
5.2.1 Medio de cultivo.....	15

5.3 Evaluación de la producción de biomasa y ficocianina de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 bajo un diseño factorial.....	15
5.3.1 Evaluación del efecto de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de biomasa y ficocianina en <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832.....	15
5.4 Cultivo de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 en un sistema de cultivo secuencial de heterotrofia / fotoinducción.....	16
5.5 Extracción de Ficocianina.....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1 Análisis del efecto de la concentración de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio en los medios de cultivo de la microalga <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 para la producción de biomasa y ficocianina.....	18
6.1.1 Evaluación de la producción de biomasa y de ficocianina bajo un diseño de factorial.....	18
6.1.1.1 Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de biomasa.....	18
6.1.1.2 Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de ficocianina.....	25
6.2 Evaluación de la concentración de ficocianina en el cultivo secuencial heterotrofia/fotoinducción de la microalga <i>Galdieria</i> sp. USBA-GBX-832.....	30
6.2.1 Evaluación ficocianina del cultivo foto-autotrófico.....	30
7. CONCLUSIONES.....	33
8. BIBLIOGRAFÍA.....	34
9. ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos correspondientes a la velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación, rendimiento y productividad de la biomasa de cada tratamiento	21
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de biomasa de los diferentes tratamientos del cultivo de <i>Galdieria</i> sp. USBA-GBX 832	22
Tabla 3. Datos correspondientes al rendimiento y productividad de la ficocianina de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX 832 en cada tratamiento	26
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de la producción de ficocianina de los diferentes tratamientos del cultivo de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX 832	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura conformacional de los ficobilisomas	7
Figura 2. Estructura conformacional de la Ficocianina	8
Figura 3. Crecimiento de <i>Galdieria</i> sp. USBA-GBX-832 bajo diferentes concentraciones de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio	19
Figura 4. Evaluación de la concentración en peso seco (mg/ml) de la biomasa frente a las tres variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio)	23
Figura 5. Seguimiento de glucosa residual de cada uno de los tratamientos	24
Figura 6. Concentración de ficocianina de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes condiciones de cultivo	25
Figura 7. Evaluación de la concentración de Ficocianina (mg/L) frente a las tres variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio)	28
Figura 8. Grafica del crecimiento, producción de ficocianina y consumo de glucosa por parte de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX 832 en función del tiempo (días)	29
Figura 9. Crecimiento de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes intensidades de luz, en función del tiempo (días)	31
Figura 10. Concentración de ficocianina de <i>Galdieria</i> sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes intensidades de luz, en función del tiempo (días)	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio 991 o <i>Caldisphaera lagunensis</i> modificado	42
Anexo 2. Diseño de factorial general con tres factores a evaluar	42
Anexo 3. Curva patrón de glucosa (mg/ml)	43
Anexo 4. Diseño experimental Heterotrofía/foto-inducción	44
Anexo 5. Ecuación para la cuantificación de ficocianina	44
Anexo 6. Curva patrón de peso seco ($\mu\text{g/ml}$)	44

1. INTRODUCCIÓN

En la unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana se llevó a cabo un proyecto de investigación en compañía de GeBix, con el fin de aprovechar el potencial de los ambientes extremos en Colombia en cuanto a diversidad microbológica, y cuyo estudio se titula: “Conformación de una plataforma en metagenómica y bioinformática para la caracterización y el aprovechamiento de recursos genéticos de ambientes extremos – GeBix”.

En el año 2009 se aislaron diferentes microorganismos acidófilos de un manantial ubicado en el Parque Nacional Natural los Nevados (PNN los Nevados), dentro de estos se encuentra la microalga acidófila *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832. Estudios previos demostraron que *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 tiene la capacidad de producir un pigmento azul denominado Ficocianina (FC) tanto en condiciones de autotrofia como en condiciones de mixotrofia y heterotrofia, en esta última utilizando diferentes fuentes de carbono.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los pigmentos naturales propios de microalgas y cianobacterias como la ficocianina (FC), que tiene propiedades fluorescentes y antioxidantes, se aplican hoy en día como productos de importancia biotecnológica en un gran número de industrias, entre las que se encuentran, no sólo la alimenticia, sino también la farmacéutica, textil, agrícola y cosmética, entre otras; estas industrias buscan reemplazar compuestos sintéticos con aquellos de origen natural, con el fin de obtener productos con un mayor beneficio para el ser humano. Específicamente, la FC se podría usar como aditivo nutricional, como reactivo fluorescente en pruebas de diagnóstico o como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, entre otras (Díaz-Domínguez *et al.*, 2016).

Actualmente, la ficocianina es extraída de microorganismos como las cianobacterias *Spirulina* sp. y *Arthrospira* sp., que producen el pigmento a escala industrial bajo condiciones fotoautotróficas en cultivos al aire libre (estanques abiertos), para permitir mayor incidencia de la luz solar (Lee 1997; Pulz 2001; Spolaore *et al.*, 2006). Sin embargo, este tipo de cultivos presenta algunos inconvenientes como: contaminación por agentes biológicos y físicos al estar expuestos al aire libre; baja productividad en la producción de ficocianina, debido a que la luz solar penetra sólo los centímetros superiores del cultivo (Eriksen, 2008); inhibición de los centros fotosintéticos que llevan a cabo la producción de la FC debido a que las células cercanas a la superficie del cultivo experimentan una intensidad de luz en exceso (Grobbelaar 2007). Frente a esto se plantea como alternativa el cultivo heterotrófico de microalgas tipo *Galdieria* sp.

La microalga *Galdieria* sp. que crece en ambientes altamente ácidos, en un rango entre 0.5 - 3.0, y temperaturas cercanas a 50°C puede sintetizar la ficocianina bajo condiciones fotoautotróficas, mixotróficas y heterotróficas (Barbier *et al.*, 2005; Reeb y Bhattacharya 2010). Siendo la última condición, la heterotrofia, la que mejor le favorece a esta microalga para la producción de la FC, ya que la producción de biomasa puede ser 100 veces mayor a lo reportado para las cianobacterias *Spirulina* sp. y *Arthrospira* sp (Eriksen, 2008). Las condiciones de cultivo de *Galdieria* (pH 3.0; 50°C) permite mantener cultivos axénicos incluso a escala industrial, permitiendo obtener una ficocianina de mayor calidad y más segura en los alimentos, nutracéuticos y productos farmacéuticos (Eriksen, 2008). Adicionalmente, la ficocianina de *Galdieria* puede ser

estable hasta 73°C, siendo esta una gran ventaja frente a la producida por *Spirulina* cuyo pigmento se inactiva a 46°C (Wan et al., 2016).

En el año 2012, en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), se aisló del parque Nacional Natural de los Nevados (Colombia) la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832, la cual crece bajo condiciones mixotrofia, fotoautotrofia y heterotrofia, siendo esta última la más favorable. De trabajos anteriores, se logró evidenciar por técnicas cromatográficas la presencia de pigmentos como la FC en esta cepa. Por lo tanto, con este trabajo se quiere evaluar la producción de la ficocianina en la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes condiciones de cultivo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos que metabólicamente son fotosintéticos, tienen un rápido crecimiento (3,5 h), lo que conduce a cortos tiempos de duplicación de la biomasa durante el crecimiento exponencial; poseen un alto contenido lipídico, el cual dependiendo de la especie y las condiciones en las que han sido cultivadas, puede encontrarse entre el 20% y el 50% del peso seco; por último, su característica más importante, es que son los microorganismos con mayor capacidad para fijar el CO₂ (Sánchez Mirón *et al.*, 2003; Chisti, 2007).

3.1.1 Metabolismo – microalgas

Las microalgas bajo condiciones fotoautotróficas, crecen en presencia de sales minerales, utilizando la luz solar como fuente de energía, y el CO₂ como fuente de carbono, acumulando la glucosa como producto de la fotosíntesis cuando éstas, fijan carbono inorgánico de la atmosfera (Cortés-Castillo *et al.*, 2012). además de este tipo de condición metabólica, existen microalgas que crecen en condiciones mixotróficas, donde el CO₂ y el carbono orgánico se asimilan simultáneamente (Kaplan *et al.*, 1986; Lee, 2004) o pueden obtener energía de la oxidación de H₂S y acoplar dicha generación a la asimilación de la fuente de carbono orgánico (Stanier *et al.*, 1992); y por ultimo pero no menos importante, existen algunas otras microalgas que pueden crecer en condiciones heterotróficas, usando un sustrato orgánico como fuente de carbono, cuando estos no pueden sintetizar los hidratos de carbono a partir de compuestos inorgánicos (Xu *et al.*, 2006).

Esta plasticidad metabólica de las microalgas les permite adaptarse fácilmente a diferentes ecosistemas y diferentes procesos biotecnológicos, generando mayor concentración de biomasa y así mismo una mayor concentración de pigmentos, los cuales ayudan a absorber la energía luminosa y a su vez desarrollan una función de fotoprotección, previniendo la fotooxidación al atenuar especies reactivas de oxígeno (Siefermann-Harms, 1987; Yong y Lee, 1991; Bidigare *et al.*, 1993).

Los pigmentos de las microalgas pueden ser usados en la producción de alimentos, concentrados, aditivos nutricionales, compuestos bioactivos, biocombustibles, en la biorremediación, cosméticos y como fuentes de investigación médica (Chisti, 2007).

3.1.2 Metabolitos de interés industrial – microalgas

Algunas especies de microorganismos se han utilizado como fuente de producción de pigmentos con el fin de ser usados por el ser humano, como es el caso de las cianobacterias (*Spirulina* spp., *Anabaena* spp., y *Arthrospira* spp.), pero son las microalgas los microorganismos productores de metabolitos con interés industrial, entre las cuales se encuentran: las algas verdes: *Chlorella* spp., Y recientemente las algas rojas del genero *Galdieria* sp. (*Galdieria sulphuraria* y *G. partita*). Los organismos anteriormente mencionados son los que recientemente han llamado la atención como fuentes comercialmente valiosas de un amplio espectro de compuestos, incluyendo vitaminas (B12, C y E), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, glicolípidos, sulfolípidos y otros compuestos fenólicos, pero, estos microorganismos se destacan principalmente porque producen pigmentos como clorofila, carotenoides y ficocianina (FC), este último por ser un complejo pigmento-proteína, se extrae de dichos organismos con el fin de ser usado principalmente como fuente de antioxidantes, anti-radicales libres y antitumorales (Herrero *et al.*, 2006; Abd El Baky *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2011; Abd El Baky *et al.*, 2013).

3.2 *Galdieria*

La microalga *Galdieria* pertenece a la división Rhodophyta. Esta microalga se desarrolla a altas temperaturas (50-55°C), ya que su hábitat natural es caliente (manantiales ácidos) (Gross y Schnarrenberger 1995) y a un bajo pH (0.5-1.5), además, tolera altas concentraciones de sal y metales tóxicos. *Galdieria* sp. se destaca por su capacidad de crecer y sobrevivir heterotróficamente durante largos períodos de tiempo en la oscuridad, esta microalga es de las pocas que puede crecer en presencia de más de 50 fuentes de carbono (Barbier *et al.*, 2005; Reeb y Bhattacharya 2010).

Galdieria sp. es un candidato para la producción heterotrófica de FC, ya que sintetiza concentraciones altas de FC y cantidades menores de A-FC, y las propiedades de la ficocianina a partir de *Galdieria* sp. heterotrófica se asemejan a las propiedades de FC a

partir de fuentes de cianobacterias (Eriksen, 2008); además, con *Galdieria* sp. la producción de ficocianina es de 20-287 veces mayor que la de los cultivos fotoautótrofos de la cianobacteria *Spirulina platensis* (Graverholt y Eriksen, 2007), y dicho pigmento fotosintético puede tolerar temperaturas de hasta 73 ° C en esta microalga, mientras que la ficocianina de la mayoría de cianobacterias como *Spirulina* spp. se desactiva a temperaturas superiores a 46 ° C (Moon *et al.*, 2014).

3.3 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos son sustancias captadoras de energía lumínica, la cual es transformada en energía química mediante la fotosíntesis, dichos pigmentos se diferencian en su composición y estructura molecular, existiendo por ejemplo Los pigmentos primarios, los cuales tienen como finalidad principal la captación de la energía lumínica y estos están acompañados de otros pigmentos accesorios, cuyas funciones son: ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y servir a los microorganismos que los producen como sistemas de protección frente a la luz excesiva (Manrique Reol, 2003).

3.3.1 Ficobilisomas

Las ficobilisomas son compuestos complejos supra-moleculares de ficobiliproteínas (proteínas / pigmentos fotosintéticos) ensamblados en la superficie de la membrana tilacoidal de rodófitas y cianobacterias, y en la membrana interna plasmática de los procariotas, cumple con la función de transferir la energía lumínica que es absorbida por las biliproteínas (ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina) que forman parte de su estructura, hacia el centro de reacción en la membrana fotosintética (Minini-Rivas L, 2012).

Dos dominios estructurales son los que componen a los ficobilisomas, el primero, organizado en forma de triángulo equilátero, la aloficocianina (AF) y la aloficobilina (APB), denominado CORE, y el segundo dominio morfológico en forma de varilla que surge desde el CORE, la cual está constituida por dos tipos de biliproteína, la ficoeritrina (PE), en la región más externa de la varilla y la ficocianina (FC) en la región más interna (Minini-Rivas L, 2012) (Fig. 1).

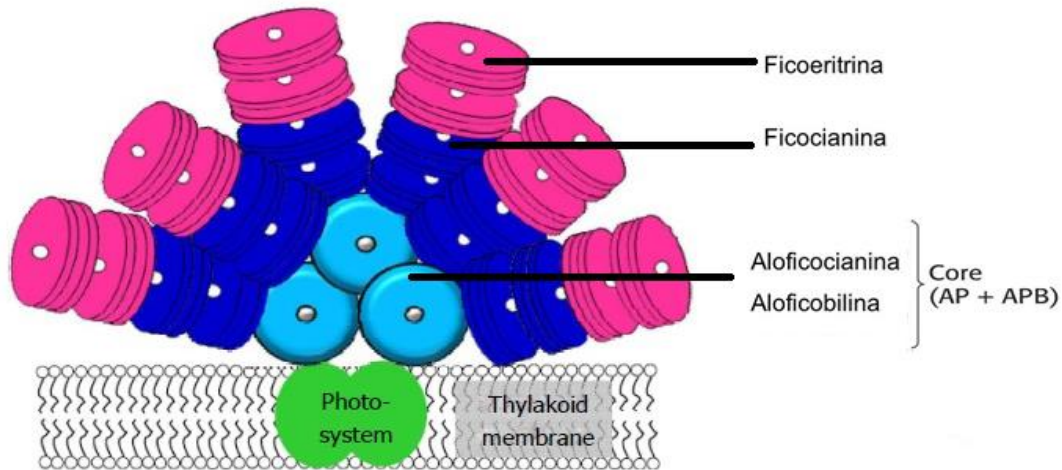


Figura 1. Estructura conformacional de los ficobilisomas. Adaptado de Sonani *et al.* (2016).

3.3.2 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son proteínas solubles en agua, que funcionan como pigmentos fotosintéticos en diferentes organismos como las cianobacterias, las algas rojas y las Cryptomonada (Díaz-Domínguez *et al.*, 2016), dichas proteínas están compuestas por múltiples cromóforos, que les permite a su vez, tener altos coeficientes de absorción de luz y cubrir un intervalo amplio de espectro, además, presenta una elevada eficiencia cuántica, son fotoestables y su fluorescencia es constante ya que los cambios de pH o las biomoléculas no afectan en absoluto esta propiedad (Cañizares-Villanueva *et al.*, 1998). Las ficobiliproteínas se dividen en dos, las ficoeritrobilinas y las ficocianobilinas, encontrándose en este último grupo la aloficocianina y la ficocianina.

3.4 Ficocianina (FC)

El pigmento fotosintético azul ficocianina, es una proteína que pertenece a las ficobiliproteínas y está compuesta principalmente de dos clases de subunidades, la primera: α (20,5 kDa) y la segunda: β (23,5 kDa), para formar $\alpha_3\beta_3$, además, también tiene en su estructura nueve moléculas de ficocianobilina, las cuales funciona como cromóforo y se encarga de absorber luz a aproximadamente 620 nm y emitirla a aproximadamente 640 nm (Boussiba *et al.*, 1979; Fukui *et al.*, 2004) (Fig. 2).

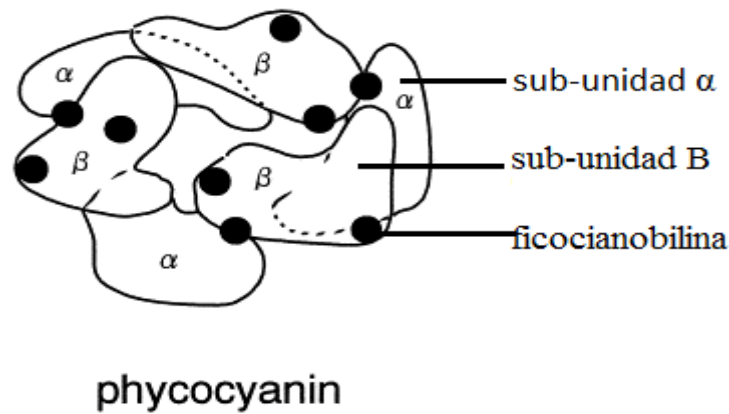


Figura 2. Estructura conformacional de la Ficocianina. Adaptado de Fukui *et al.* (2004).

3.4.1 Importancia y aplicación actual de la ficocianina

La ficocianina puede ser utilizada en la industria alimenticia como un aditivo nutricional o como pigmento natural, ya sean en dulces, helados y en bebidas; en la industria de cosméticos es usada como colorante y también como un agente anti-radicales libres. Por último, en medicina es empleada como un reactivo fluorescente altamente sensible en pruebas de diagnóstico, en análisis de células activadas- fluorescentes, o como posible agente terapéutico por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antiinflamatorias para el tratamiento de enfermedades que están asociadas al estrés oxidativo (Díaz-Domínguez *et al.*, 2016), y en inmunofluorescencia, como marcadores fluorescentes conjugados a anticuerpos, en donde el pigmento se acopla a un anticuerpo específico que generalmente es monoclonal (Cañizares-Villanueva *et al.*, 1998).

Para mejorar la productividad en la producción de pigmentos, en este caso de la ficocianina, con el fin de ser usada por las diferentes industrias, es necesario optimizar el crecimiento de las microalgas en función de la concentración y naturaleza de las fuentes de carbono, nitrógeno, temperatura, agitación, pH etc., en condiciones de laboratorio (Hoffmann 1988; Loreto *et al.*, 2003).

3.5 Factores que afectan la producción de ficocianina

Existen factores como la temperatura, fuente de carbono y nitrógeno, luz, pH, entre muchas otras, que pueden estimular o inhibir la biosíntesis y la acumulación de

bioactivos específicos (ficocianina) en las microalgas, cuando estas crecen bajo dichas condiciones ambientales controladas.

3.5.1 Factor de crecimiento - Autotrofia

La autotrofia es el procedimiento más común para el cultivo de microalgas hoy en día, debido a los bajos costos de su cultivo por el uso de estanques abiertos y una fuente de luz natural, mas sin embargo estos cultivos presentan dificultad en cuanto a las condiciones axénicas (Des Habbayes *et al.*, 1989). Debido a que las microalgas son conversores eficientes de energía solar, estas se cultivan en un ambiente natural o artificialmente iluminado, para que las células recojan la energía luminosa y puedan usar el CO₂ como fuente de carbono (Perez-Garcia *et al.*, 2011). El principal objetivo del cultivo autotrófico, es la introducción de suficiente luz natural o artificial para permitir un crecimiento masivo y tener así poblaciones densas de microalgas; un factor limitante del cultivo es: cuanta más luz hasta un límite para el organismo, mejor, debido a que no todas las microalgas tienen igual capacidad de aprovechamiento de intensidades luminosas mayores, y el rendimiento en la célula se puede ver afectado al aumentar dicho factor (Mandalam and Palsson, 1998; Yang *et al.*, 2000, Suh and Lee, 2003).

3.5.2 Factor de crecimiento - Heterotrofia

La heterotrofia es definida como el uso de compuestos orgánicos tales como el metanol, la glicerina y la glucosa entre muchos otros, con el fin de influir en el crecimiento celular (Droop, 1974), en el cual, los organismos heterótrofos han suplido sus necesidades energéticas al utilizar dichos compuestos orgánicos, los cuales pueden haber sido sintetizados previamente por otros organismos o no son sintetizados del todo (Kaplan et al., 1986).

Los procesos microbianos heterotróficos que no están limitados por las intensidades de luz, tienen un potencial mayor de producción (biliproteinas) que aquellos procesos dependientes de la luz, además, son más fáciles de escalar en relación con el tamaño de los bioreactores, la mezcla, la transferencia de gas, la productividad y la axenicidad del medio de cultivo (Eriksen, 2008); para este último (medio de cultivo), la composición básica para cultivos heterotróficos es similar al cultivo autotrófico con la única

excepción de la adición de una fuente de carbono orgánica, que puede ser desde glucosa hasta acetato, dependiendo de la microalga y como ésta lo asimila (Tsavalos and Day, 1994).

Durante el cultivo heterotrófico, las células acumulan un porcentaje de ficocianina inferior al 3% del peso de las células secas (Sloth *et al.*, 2006), y esta baja relación de conversión del material a la ficocianina en el cultivo heterotrófico da como resultado un contenido bajo de ficocianinas en las células, lo que trae una serie de problemas, tales como alto costo de extracción a escala industrial, muchos subproductos de bajo valor y desperdicios, pero un cambio del crecimiento autotrófico a la nutrición heterotrófica en *Galdieria* sp. conduce a la excreción de coproporfirina (ogen) III en el medio de crecimiento, el cual es un precursor universal en la biosíntesis de ficocianobilina para la producción de pigmentos (Stadnichuk *et al.* 1998).

3.5.3 Factor de crecimiento – Mixotrofia

La mixotrofia se define como el proceso para obtener energía tanto de la luz por medio de la fotosíntesis, como de compuestos orgánicos e inorgánicos (Perez-Garcia *et al.*, 2011); y solo aquellos microorganismos verdaderamente mixotróficos tienen que invertir en la síntesis y el mantenimiento tanto de los sistemas fotosintéticos como de la captación y degradación de sustratos orgánicos (Oesterhelt *et al.*, 2007).

El crecimiento mixotrófico ofrece una posibilidad de aumentar en gran medida la concentración celular de microalgas y, por tanto, la productividad en sistemas discontinuos, aun, cuando dicho proceso este limitado tanto por una fuente de carbono o sustrato de carbono orgánico, como por la intensidad de la luz que reside en el medio de cultivo (Richmond, 1988); el contenido de FC de cultivos mixtos de cianobacterias y microalgas cultivados en interiores es mayor que en cultivos fotoautotróficos al aire libre, sin embargo, pero este resultado presenta un problema en cuanto a la intensidades de luz incidente, la cual es más bajas en los cultivos de interior (Eriksen, 2008).

3.5.4 Fuente de carbono

La fuente de carbono y su metabolismo por parte de las microalgas depende directamente de las rutas metabólicas, las cuales pueden ser realizadas por mecanismos múltiples, y de los factores de crecimiento tales como la heterotrofia, en el cual los organismo heterótrofos primero necesitan descomponer los compuestos complejos o aquellos llamados materiales complejos como la glucosa, para luego utilizar los productos resultantes con fines como el crecimiento celular (Des Habbayes *et al.*, 1989).

De las diversas rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos para la descomposición de la glucosa, solo dos han sido las vías metabólicas usadas por las microalgas para la glicolisis aeróbica: la vía de Embden-Meyerhof (EM) y la vía de las pentosas fosfato (Neilson y Lewin, 1974). Las microalgas no pueden metabolizar la glucosa en condiciones de oscuridad y anaerobiosis debido a que la energía insuficiente es liberada durante la desasimilación de la glucosa y también es retardada por los bajos niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) (Neilson y Lewin, 1974).

Para *Galdieria sulphuraria*, así como para otras especies de *Galdieria* sp. (*G. partita*), se ha descrito que la glucosa como fuente de carbono, disminuye la cantidad de membranas de tilacoides y pigmentos fotosintéticos, así como la composición enzimática del plástido (Stadnichuk *et al.* 1998, Tischendorf *et al.*, 2007), es decir, que en dicha pérdida de membranas tilacoides se acompaña de una reducción del contenido del pigmento primario: clorofila a. y a su vez de los pigmentos accesorios: C-ficocianina y aloficocianina en las células heterotróficas, porque no existe una transformación de su precursor universal coproporfirinógeno III en protoporfirinógeno IX en la biosíntesis de ficobilisomas (Stadnichuk *et al.* 1998).

3.5.5 Fuente de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno que comúnmente se utilizan en los cultivos son urea suplementada y nitrato de sodio, debido a que el nitrógeno después del carbono, es el nutriente más importante para las microalgas formando parte de los nucleótidos y proteínas de la biomasa celular (Hernández-Pérez *et al.*, 2014); además las adiciones repetidas de sustrato orgánico pueden sostener el crecimiento mixotrófico y heterotrófico en cultivos de densidad muy alta (Cerón García *et al.*, 2005).

El nitrógeno y la limitación de hierro inducen la degradación selectiva de la ficobiliproteína: ficocianina, cuando la biomasa se expone a la limitación de estos (Xing *et al.*, 2007).

3.5.6 Agitación

La agitación es un factor que en el medio de cultivo favorece el intercambio de gases, evita la sedimentación de las células y la concentración de nutrientes, pero su función principal es permitir que todas las células puedan acceder a las zonas iluminadas o que tengan contacto con la energía luminosa incidente, así, se evita que las células que están expuestas sobre la superficie del medio de cultivo se foto-inhiban (Ogbonna y Tanaka, 2000; Ugwu *et al.*, 2002).

El aumento en la fotosíntesis por parte del microorganismo y la productividad de los cultivos, se debe en parte al aumento en la frecuencia de los ciclos Luz/Oscuridad, permitiendo obtener una mayor densidad celular y a su vez productos fotosintéticos (Contreras *et al.*, 2003), sin embargo, en estos procesos celulares se utilizan los niveles óptimos de mezclado, los cuales dependen de la especie cultivada, en virtud de la fragilidad celular (Gudin y Chaumont, 1991).

3.5.7 Temperatura

En algunas microalgas como *Galdieria* sp. y cianobacterias como *Spirulina platensis*, cuanto mayor es la temperatura de trabajo, el valor de pH es más bajo y por lo tanto el extracto acuoso de ficocianina es más estable, lo que a su vez demuestra que la temperatura de degradación y pH son inversamente proporcionales con respecto a la degradación de la ficobiliproteína (PC) (Antelo *et al.*, 2008), además, la vida media de la ficocianina disminuye rápidamente a medida que aumenta la temperatura de 47 a 64 ° C (Chaiklahana *et al.*, 2012).

3.5.8 Luz

La luz es un factor limitante que depende directamente de la densidad celular de la microalga y la cantidad de energía luminosa incidente en los medios de cultivos (Contreras *et al.*, 2003), es decir, bajo ciertas condiciones, los cultivos con mayor

densidad celular utilizan la luz incidente con mayor eficiencia en los procesos de fotosíntesis celular en comparación con aquellos cultivos que están diluidos (Hu *et al.*, 1996), pero, puede haber una foto-inhibición si la densidad celular no se ajusta a la intensidad de la fuente de luz (Ogbonna y Tanaka, 2000).

Contrario al efecto ocasionado por la fuente de carbono (glucosa) en *Galdieria* sp., se ha descrito que la luz aumenta la cantidad de membranas de tilacoides y pigmentos fotosintéticos como la ficocianina, así como también, un aumento en la composición enzimática del plástido (Stadnichuk *et al.* 1998, Tischendorf *et al.*, 2007).

3.5.9 pH

La producción e inhibición de las ficobiliproteínas, y en este caso en particular la ficocianina, no sólo depende de los componentes del medio de cultivo sino también de factores como el pH; dicho parámetro está establecido por el tipo especie microbiana y su pH óptimo de crecimiento.

El pH óptimo para el crecimiento y la capacidad fotosintética de algas acidófilas como *Galdieria* sp. con el fin de producir las ficobiliproteínas, especialmente ficocianina, es de pH 3 (Fukuda, 1958), debido a que la ficocianina se encuentra como una mezcla compleja de monómeros, trímeros, hexámeros y otros oligómeros, moléculas cuya estabilidad y degradación dependen del estado de agregación de la proteína, influenciada por parámetros como el pH (Chaiklahana *et al.*, 2012).

En cianobacterias alcalófilas productoras de ficobiliproteínas como *Synechocystis* sp. el contenido máximo de producción de ficocianina es a pH 10 (Deshmukh *et al.*, 2012), y en otro microorganismo como *Gloeotrichia natans* que bajo pH 9,0 el cultivo se vuelve de color negro pardo, el contenido de pigmentos se vuelve tan alto como el porcentaje (%) de la proteína total, lo que indica que a pH neutros (7,0 – 8,0) se afecta el contenido total de ficocianina en estos organismos, así como el porcentaje de proteína total pero sin influir en la tasa de crecimiento de estos (Boussiba, 1991), es decir que *Galdieria* sp. al ser una microalga acidófila creciendo a pH de 0.5-1.5, el contenido de la ficocianina puede ser limitada a pH alcalinos (8,5 – 10,0) (Barbier *et al.*, 2005; Reeb y Bhattacharya 2010).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción del pigmento azul ficocianina (FC) en la microalga *Galdieria* sp. USBA-GBX-832.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de la concentración de glucosa y las fuentes de nitrógeno: extracto de levadura y sulfato de amonio en el crecimiento celular y la producción de ficocianina en *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832.
- Evaluar la producción de ficocianina en *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 en un sistema de cultivo secuencial de heterotrofia / fotoinducción.

5. METODOLOGÍA

5.1 Microorganismo

La cepa termoacidófila *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832, se obtuvo de la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana y se mantuvo conservada a -80 ° C con glicerol al 20% (v/v) (banco madre) y a -20°C (banco de trabajo).

5.2 Condiciones de cultivo

5.2.1 Medio de cultivo

El trabajo experimental llevado a cabo se realizó utilizando el medio de cultivo 991 (Itoh *et al.* 2003) (Anexo 1) a pH 2.5, y los cultivos heterotróficos se hicieron crecer en Erlenmeyers de 500 ml en donde se evaluó 250 ml del medio de cultivo (Relación 1/2). Los inóculos de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 se realizaron bajo condiciones de autotrofia.

5.3 Evaluación de la producción de biomasa y ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo un diseño factorial

Se realizó un diseño factorial general al experimento por medio del programa (Desing expert 8.0.3) para evaluar tres factores: concentración de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio. El primer factor, la fuente carbono (glucosa) con tres niveles: concentración 5 g/L, 15 g/L y 30 g/L. Se evaluó un segundo factor, la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) con tres niveles: concentración 0 g/L, 0,5 g/L y 1,5 g/L. Se evaluó un tercer factor, la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) con dos niveles: concentración 1,3 g/L y 2,6 g/L. La combinación de cada uno de los niveles de los 3 factores dio como resultado 18 tratamientos a evaluar por triplicado (Anexo 2).

5.3.1 Evaluación del efecto de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de biomasa y ficocianina en *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832.

Las concentraciones de glucosa evaluadas fueron: 5, 15, 30 g.L⁻¹. Para su evaluación y su efecto sobre la generación de biomasa, se realizaron curvas de crecimiento de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 a través de espectrofotometría en una longitud de onda de 750nm, donde los pigmentos no son cuantificables. Para ello, *Galdieria* sp.

cepa USBA-GBX-832 se cultivó en 125 mL de medio 991 a 45°C, un pH de 2.5 y 180 r.p.m; los cultivos se incubaron por un periodo de 10 días. Se retiraron del cultivo 1.0 ml para cada lectura, las cuales se realizaron entre las 7 - 12 horas. Los datos se transformaron a través de una curva patrón de peso seco (mg/ml) (Anexo 6), el cual se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos en la USBA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El consumo de glucosa se evaluó a través de la técnica de antrona por la metodología de Wan *et al.*, (2016) y los datos se transformaron a través de una curva patrón de glucosa (mg/ml) (Anexo 3), el cual se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos por Wan *et al.*, (2016).

A los medios de cultivo heterotróficos anteriormente descritos, se les realizaron tres ensayos para el extracto de levadura (YE: Yeast Extract) de acuerdo al diseño factorial descrito en el ítem 5.3., los cuales consistían en: 1) la cepa cultivada en ausencia de extracto de levadura 2) la cepa cultivada con 0,5 g.L⁻¹ extracto de levadura; 3) la cepa cultivada con 1.5 g.L⁻¹ de extracto de levadura; y se realizaron dos ensayos para el sulfato de amonio de acuerdo al diseño factorial descrito en el ítem 4.3., los cuales consistían en: 1) la cepa cultivada con 1.3 g.L⁻¹ de sulfato de amonio; 2)) la cepa cultivada con 2.6 g.L⁻¹ de sulfato de amonio.

El efecto se evaluó a través de lecturas de DO_{750nm} y con la cuantificación de la ficocianina como lo describe Kursar & Alberte (1983) (Anexo 5).

5.4 Cultivo de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 en un sistema de cultivo secuencial de heterotrofia / fotoinducción.

La microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 se cultivó bajo las condiciones óptimas de cultivo, mencionadas anteriormente. El cultivo secuencial inicio bajo condiciones de heterotrofia por un periodo de 7 días en el medio 991 suplementado con la glucosa y fuente de nitrógeno establecidos según los resultados de los procedimientos anteriores: numeral 5.3.1. Se realizaron determinaciones de DO_{750nm} diario y se verifico por microscopia la pureza del cultivo. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células se concentraron a 3500g por 5 min a 8°C. El proceso de fotoinducción (Anexo 4) se hizo en 7 días y se realizaron de la siguiente forma: de las células concentradas, se hicieron

dos cultivos (Tto 1 y Tto 2) con dos intensidades diferentes de luz a 110 Lux y 30 Lux respectivamente, y un tercer cultivo que correspondía al control para los otros dos tratamientos mencionados, por lo tanto este se colocó en condiciones de oscuridad. El medio para la fotoinducción, fue el mismo medio de cultivo 991 en ausencia de la fuente de carbono. Las variables que se midieron fueron biomasa y ficocianina.

5.5 Extracción de Ficocianina

Las células del cultivo celular se centrifugaron a 5.000 xg por 10 min, y se llevaron a congelación a -80°C, luego estas se llevaron a liofilizar a 0.01°C y 4.5 mmHg con el fin de obtener el peso seco de la biomasa en mg/ml; un vez liofilizadas las muestras, se pesaron en una balanza analítica, se resuspendieron en un tampón fosfato a una concentración de 50 mM, pH 7,2 y luego se le adicionaron perlas de vidrio (diámetro: 0.1 mm) en proporción de 1: 1,1 (g de biomasa: g de perlas de vidrio). Las muestras se agitaron en vortex y se llevaron a un baño ultrasónico (50 kHz) durante 40 minutos; transcurrido el tiempo en el baño ultrasónico, las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 2500 xg. El sobrenadante se denomina extracto de células crudas (Medeiros *et al.*, 2008).

Para la cuantificación de la ficocianina se realizaron mediciones espectrofotométricas del extracto a 618nm y a 650nm. La concentración se determinó como lo describe Kursar & Alberte (1983) (Anexo 5).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis del efecto de la concentración de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio en los medios de cultivo de la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 para la producción de biomasa y ficocianina.

6.1.1 Evaluación de la producción de biomasa y de ficocianina bajo un diseño de factorial.

Con el fin de conocer los efectos de diferentes variables de cultivo sobre la producción de biomasa y de ficocianina en *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832, se realizó un diseño factorial general para identificar cual (es) de los factores de cultivo entre la fuente de carbono: glucosa, la fuente de nitrógeno orgánico: extracto de levadura, la fuente de nitrógeno inorgánico: sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ tienen un efecto significativo en sobre el cultivo de la microalga. Para lo cual se hizo el seguimiento del aumento del crecimiento celular de la microalga y del aumento del pigmento en los diferentes tratamientos (1-18).

El diseño se realizó bajo un cultivo discontinuo heterotrófico, debido a que la ficocianina en heterotrofia no funciona como un sistema de fotoprotección a la microalga (Manrique Reol, 2003), lo que ocasiona que este pigmento se acumule y genere una gran concentración de proteínas y aminoácidos; además en heterotrofia se promueve la obtención de mayores concentraciones de la biomasa (Ip y Chen, 2005; Benavente-Valdés *et al.*, 2012).

6.1.1.1 Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de biomasa.

En el cultivo discontinuo heterotrófico de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832, los tratamientos evaluados, permitieron evidenciar su efecto sobre el crecimiento de la microalga en función del tiempo (días) (Figura 3). Adicionalmente, se logró determinar los parámetros cinéticos de crecimiento como velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), el tiempo de duplicación (T_d), el rendimiento de la biomasa sobre el sustrato ($Y_{\text{Bx/S}}$) y la productividad de la biomasa sobre el tiempo ($P_{\text{Bx/t}}$) (Tabla 1).

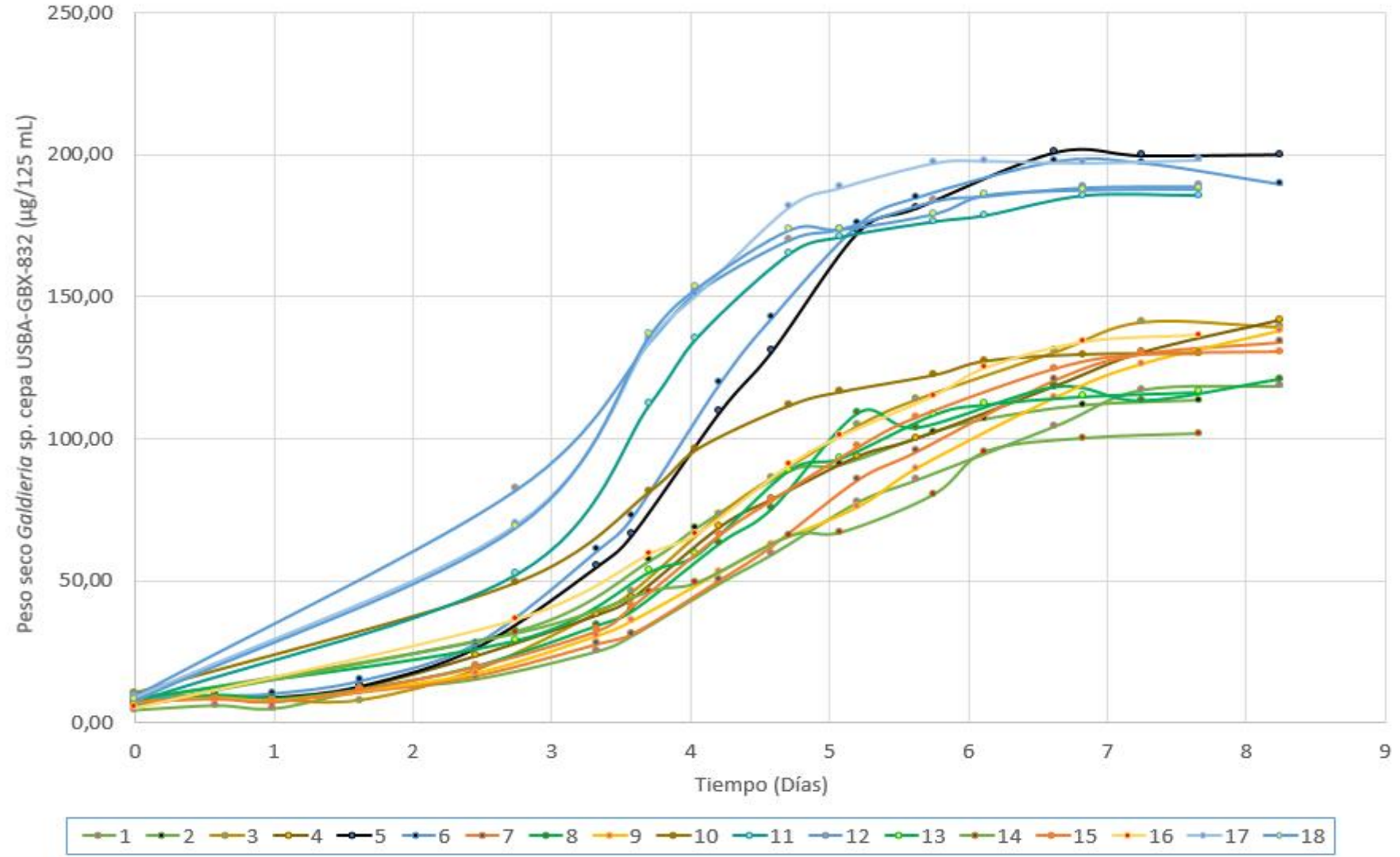


Figura 3. Crecimiento de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes concentraciones de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio.

En un estudio realizado por Wan y colaboradores (2016), alcanzaron la mayor biomasa (17,8 g/L) de *Galdieria* sp. cuando se cultivó con una concentración inicial de glucosa de 35 g/L mientras que a una concentración de glucosa de 15g/L fue la más baja producción de biomasa (7 g/L), donde además concluyeron que a concentraciones de glucosa mayores a 35 g/L se ve reducido el crecimiento celular.

Parece ser que a concentraciones mayores de glucosa hay una represión catabólica por metabolito, y es debido a que *G. sulphuraria* crece principalmente en esteras celulares y utiliza el metabolismo heterotrófico solo para sobrevivir a condiciones de luz limitada (Gross y Oesterhelt, 1999), utilizando como fuente de carbono la glucosa (derivado de células en descomposición dentro de la estera celular), la cual genera una represión del transportador de Fucosa (FUC) y el transportador de la Ramnosa (Rha) para la adsorción de desoxiazúcares (Oesterhelt C and Gross W, 2002), además, las altas concentraciones de glucosa no permiten que el coproporfirinógeno III se transforme en protoporfirinógeno IX, generando una acumulación de este precursor, que posiblemente podría incurrir en el crecimiento celular (Stadnichuk *et al.* 1998).

De acuerdo, con los resultados arrojados en la curva de crecimiento de *Galdieria* sp (USBA-GBX 832), la mayor producción de biomasa los presentan los tratamientos 5, 6, 11, 12, 17 y 18 (curvas de crecimiento de color azul), que corresponden a los tratamientos con la mayor concentración de extracto de levadura (1,5 g/L) pero a diferentes concentraciones de glucosa, y los de menor crecimiento celular son los tratamientos 1, 2, 7, 8, 13 y 14 (curvas de crecimiento de color azul), que corresponden a los tratamientos sin extracto de levadura. El tratamiento 5 y 6 producen la mayor cantidad de biomasa: 205,46 mg/ml y 208,38 mg/ml con desviación estándar de: 3,96 y 11,90, el doble de producción comparado con el tratamiento 14 de 101,66 mg/ml de biomasa, con una desviación estándar de: 11,91.

Tabla 1. Datos correspondientes a la velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación, rendimiento y productividad de la biomasa de cada tratamiento.

Ttos	Bx inicial (µg/ml)	Bx* (µg/ml)	Desviación estándar	µ max (h-1)	Td (h-1)	Y Bx/S (µg/g)	P Bx/t (µg/ml*día)
1	9,60	127,43	15,75	0,82	0,85	25,18	17,33
2	7,55	120,07	10,58	0,63	1,10	25,09	16,55
3	4,63	152,37	3,72	0,62	1,11	31,70	21,73
4	7,89	155,87	6,21	0,62	1,12	34,00	21,76
5	6,82	205,46	3,96	0,75	0,93	44,19	29,21
6	9,16	208,38	11,90	0,72	0,96	44,64	29,30
7	6,14	126,60	19,70	0,58	1,19	9,58	17,72
8	6,97	114,13	9,14	0,61	1,13	8,94	15,76
9	7,16	136,63	1,30	0,57	1,21	12,15	19,04
10	10,38	129,91	5,96	0,52	1,32	7,55	15,73
11	7,31	185,54	0,95	0,69	1,00	12,21	23,45
12	9,55	189,00	1,26	0,64	1,08	10,41	23,61
13	5,41	136,39	4,02	0,61	1,14	4,66	13,89
14	6,23	101,66	11,91	0,51	1,37	3,83	12,56
15	7,99	113,59	8,53	0,52	1,33	4,31	17,23
16	8,52	116,47	12,29	0,50	1,40	3,45	14,20
17	8,82	198,25	13,41	0,68	1,03	6,29	24,93
18	7,94	188,12	0,80	0,75	0,93	7,87	23,71

* Mayor producción de biomasa (µg/ml).

Los mayores rendimientos de la biomasa sobre el sustrato con respecto a cada uno de los tratamientos (Ttos), corresponde a los tratamientos 5 y 6, con valores de 44,19 µg/g y 44,64 µg/g, dichos tratamientos coinciden con el menor valor en cantidad de glucosa (5 g/L) y el mayor valor en cantidad de extracto de levadura (1,5 g/L), además, son los que mayor productividad de biomasa tuvieron con respecto a los otros tratamientos, con valores de 29,21 µg/ml*día y 29,30 µg/ml*día respectivamente. Los tratamientos 13, 14, 15, y 16 tuvieron el más bajo rendimiento con valores de: 4,66; 3,83; 4,31 y 3,45 mg/g respectivamente, pero es la productividad de los Ttos 13 y 14 la de menor valor (13,89 y 12,56 µg/ml*día), dichos tratamientos tienen la mayor concentración de glucosa (30 g/L) y la menor concentración de extracto de levadura: 0 g/L. Según un realizado por Graverholt y Eriksen (2007) donde evaluaron la concentración celular de

G. sulphuraria en un cultivo heterotrófico, reportaron que la productividad máxima de biomasa en un volumen de reactor de 2.5 L era de: 50,0 g/L*día.

Lo expuesto anteriormente se corroboró con los resultados arrojados del análisis de varianza (ANOVA), para establecer cuál de las tres variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio) era significativa o no era significativa, los datos se ajustaron a un modelo de regresión lineal en donde se identificaron al extracto de levadura y a las combinaciones glucosa-extracto de levadura y glucosa-sulfato de amonio como estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la producción de biomasa del cultivo de *Galdieria* sp. USBA-GBX 832, mientras que la glucosa, el sulfato de amonio y la combinación extracto de levadura-sulfato de amonio no presentaron un efecto significativo (Tabla 2); además, el porcentaje del coeficiente de variación dio menor al 20% (7,2073%) al tratarse de una prueba biológica.

La mayor concentración de biomasa no depende directamente de la glucosa, debido a que esta última (fuente de carbono) no tiene un efecto significativo sobre el modelo realizado, sin embargo, se observa que esta variable está fuertemente relacionada con las variables de fuente de nitrógeno. Se logró identificar un efecto significativo con la variable extracto de levadura, siendo los tratamientos con el mayor extracto de levadura (1,5 g/L) los que obtuvieron la mayor producción de biomasa (Figura 3 y 4).

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de biomasa de los diferentes tratamientos del cultivo de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832.

Variable	SC	Gl	MC	Valor F	Valor P
Modelo	65626,146	13	5048,165	48,973	< 0.0001*
A-Glucosa	171,464	2	85,732	0,832	0.4427
B-Extracto de levadura	61771,716	2	30885,858	299,629	< 0.0001*
C-(NH₄)₂SO₄	25,690	1	25,690	0,249	0.6204
AB	2484,244	4	621,061	6,025	0.0007*
AC	701,706	2	350,853	3,404	0.0431*
BC	471,326	2	235,663	2,286	0.1148
Residual	4123,216	40	103,080		

R²: 0,9408, R² Adjust: 0,9216, R² Predict: 0,8922, Adeq Precision: 19,4316, CV %: 7,2073, Std Dev: 10,1528

SC: Suma de cuadrados, gl: Grados de libertad, MC: Media cuadrática.

* Significancia a $p < 0,05$.

Con el fin de observar las combinaciones entre las variables extracto de levadura y glucosa, y corroborar los resultados de la tabla 1, se graficaron los datos de peso seco por medio del programa estadístico Desing expert 8.0.3 (Figura 4), en donde se observa que la combinación ideal para el aumento de la biomasa es la de mayor concentración de extracto de levadura (1,5 g/L) y la de menor concentración de glucosa (5 g/L), mientras que a una concentración de 15 g/L de la fuente de carbono sin presencia de la fuente de nitrógeno orgánica, se obtiene la más baja producción de biomasa.

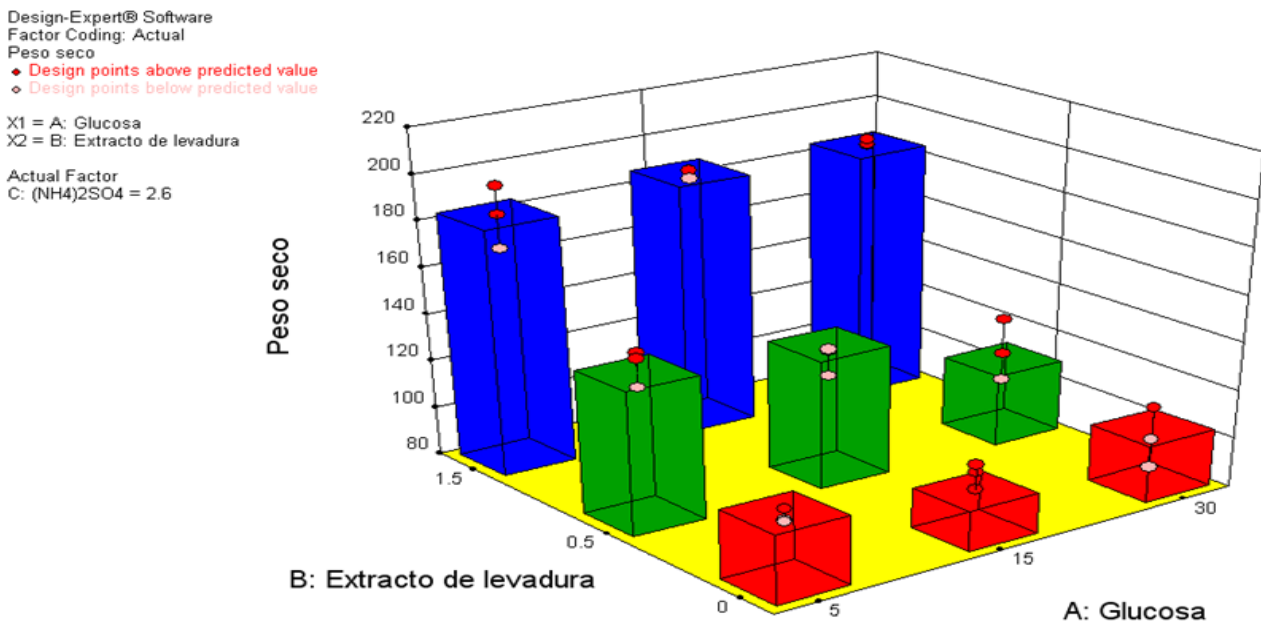


Figura 4: Evaluación de la concentración en peso seco ($\mu\text{g/ml}$) de la biomasa frente a las tres variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio).

El resultado anteriormente mencionado con respecto al aumento de biomasa por la presencia de una concentración mayor de extracto de levadura puede deberse al hecho de que esta fuente de nitrógeno orgánica tiene un elevado contenido de proteínas y aminoácidos libremente disponibles, además de una fuente rica de minerales y vitaminas del complejo B y en los medios de cultivo, complementa las peptonas para proveer de nutrición suficiente a los microorganismos exigentes [1], dicho de esta manera, esta fuente al por proveer de nutrientes a la microalga genera un efecto positivo en la producción de biomasa.

Para establecer si *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 consumió toda la glucosa presente en los diferentes medios de cada tratamiento, se calculó la concentración de glucosa presente en los tiempos establecidos del cultivo (0, 2, 5, 7, 8, 10 días) a partir de la ecuación de la recta $Y = 0,0108x + 0,0878$ con un $R^2 = 0,9931$ de la curva patrón de Glucosa (Anexo 3), y cuyos resultados obtenidos se observan en la Figura 5, donde se observa que en los tratamientos donde hubo menor concentración de la fuente de carbono (5 g/L) esta fue consumida totalmente por parte de la microalga, pero para los tratamientos donde la concentración de carbono era alta (15-30 g/L) hubo glucosa residual de aproximadamente de 2-4 g/L.

Correlacionado los resultados de la curva de crecimiento en peso seco de la microalga (Tabla 1) con el consumo de glucosa, las concentraciones de 30 g/L y 15 g/L son consumidas hasta la mitad de su concentración cuando *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 alcanza el punto máximo de la fase de crecimiento exponencial en el día séptimo y comienza la fase estacionaria (Figura 5).

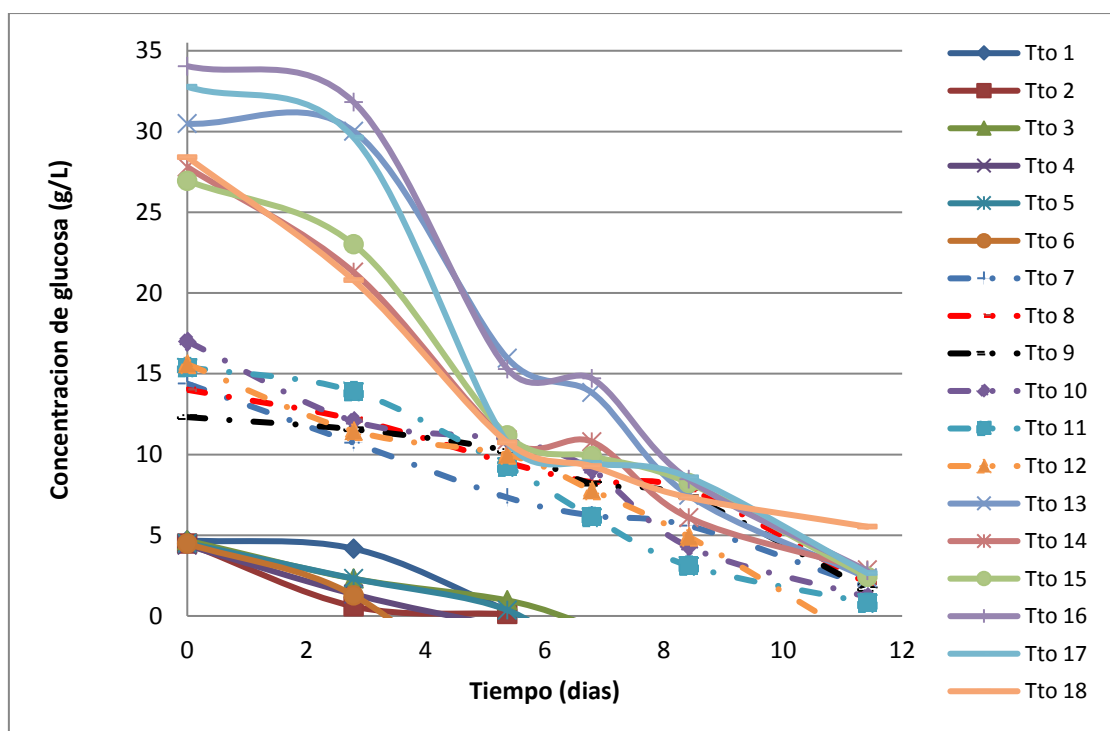


Figura 5. Seguimiento de glucosa residual de cada uno de los tratamientos.

6.1.1.2 Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de ficocianina.

Las variables en los diferentes tratamientos evaluados permitieron evidenciar su efecto sobre la producción de ficocianina en la microalga en función del tiempo (días) (Figura 6). Adicionalmente, se logró determinar los parámetros cinéticos del rendimiento de la ficocianina sobre el sustrato ($Y_{FC/S}$) y la productividad de la ficocianina sobre el tiempo ($P_{FC/t}$) (Tabla 3).

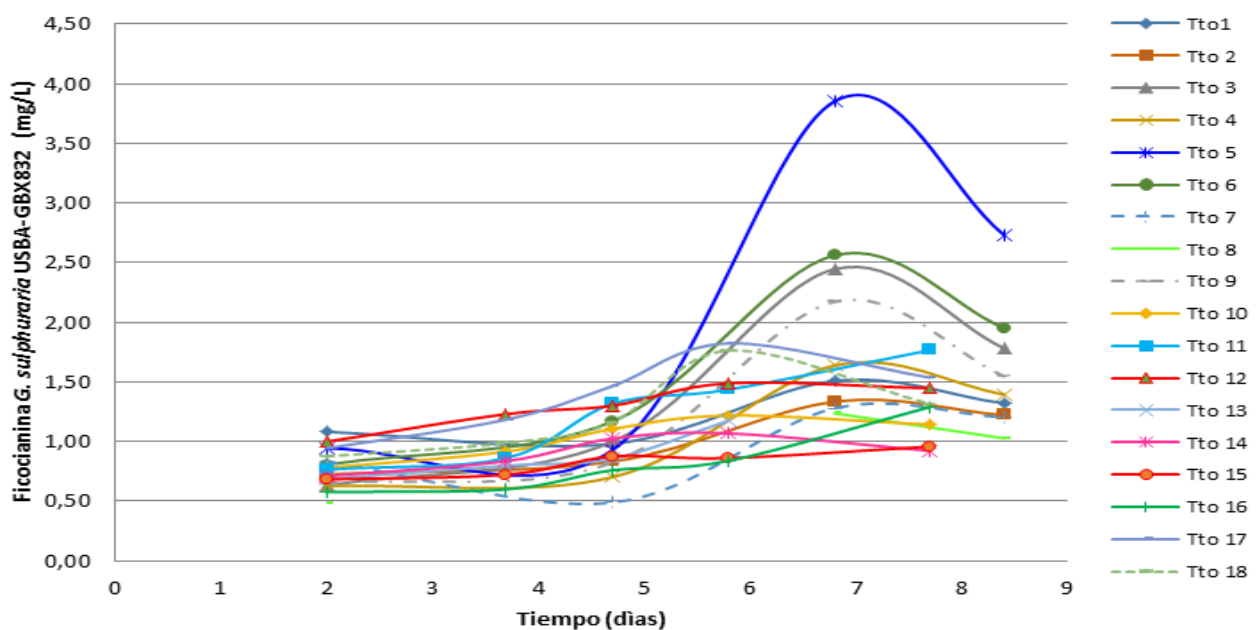


Figura 6: Concentración de ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes condiciones de cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados arrojados en la producción de ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 en función del tiempo (Figura 6), la mayor concentración del pigmento lo presenta el tratamiento 5, llegando a su punto máximo de producción en el día séptimo de incubación con un valor cercano a los 4 mg/L, contrario a lo arrojado por los tratamientos 14 y 15, que tuvieron la menor concentración de ficocianina y se observa un cambio insignificante de la producción del pigmento desde la primera muestra a las 48 horas hasta el día 8.

Tabla 3. Datos correspondientes al rendimiento y productividad de la ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 en cada tratamiento.

Ttos	FC inicial (mg/L)	FC * (mg/L)	P FC/t (mg/L*día)	Y FC/S (mg/g)
2	0,73	1,33	0,09	0,13
3	0,63	2,45	0,27	0,39
4	0,63	1,64	0,15	0,23
5	0,95	3,85	0,43	0,65
6	0,81	2,56	0,26	0,39
7	0,80	1,28	0,07	0,04
8	0,48	1,24	0,11	0,06
9	0,65	2,17	0,22	0,14
10	0,78	1,14	0,05	0,02
11	0,77	1,77	0,13	0,07
12	1,00	1,45	0,06	0,03
13	0,78	1,18	0,05	0,01
14	0,71	0,92	0,03	0,01
15	0,68	0,96	0,04	0,01
16	0,58	1,29	0,09	0,02
17	0,94	1,54	0,08	0,02
18	0,88	1,32	0,06	0,02

*Punto máximo de producción de ficocianina.

Así mismo, la mayor productividad del producto (ficocianina) con respecto al tiempo y el mayor rendimiento de la ficocianina sobre el sustrato con respecto a cada uno de los tratamientos (tabla 3), corresponden al tratamiento 5, con valores de 0,43 mg/L*día y 0,65 mg/g respectivamente, quien comparado a los otros tratamientos obtuvo los resultados más altos. Los tratamientos 2, 7, 10, 12-18, tuvieron las cifras más bajas de productividad (< 0,10 mg/L*día), pero solo los tratamientos 7, 8, 10-18, tuvieron las cifras más bajas de rendimiento (< 0,10 mg/g), precisamente tratándose de los tratamientos con las más altas concentraciones de glucosa: 15 g/L y 30 g/L.

Graverholt y Eriksen (2007) reportaron en un estudio realizado con *Galdieria sulphuraria* en cultivos heterotróficos que el rendimiento máximo de ficocianina para un volumen de reactor de 2.5 L era de 0,016 gramos de producto sobre 1 gramo de biomasa, pero tuvieron una productividad alta comparada con el anterior resultado, de 0,86 g/L*día.

Los resultados anteriormente expuestos se corroboraron con los resultados arrojados del análisis de varianza (ANOVA) de la producción de ficocianina en cada uno de los tratamientos. Para establecer cuál de las variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio) era significativa o no era significativa, los datos se ajustaron a un modelo de regresión lineal en donde se identificaron que tanto las tres variables como las combinaciones de estas: glucosa-extracto de levadura, glucosa-sulfato de amonio y extracto de levadura-sulfato de amonio son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el modelo para la producción del pigmento en el cultivo de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 (Tabla 4); además, el porcentaje del coeficiente de variación dio menor al 20% (8,6301%) al tratarse de una prueba biológica.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de la producción de ficocianina de los diferentes tratamientos del cultivo de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832.

Variable	SC	gl	MC	Valor F	Valor P
Modelo	3,198	13	0,246	22,042	< 0.0001*
A-Glucosa	1,447	2	0,723	64,814	< 0.0001*
B-Extracto de levadura	1,042	2	0,521	46,702	< 0.0001*
C-(NH₄)₂SO₄	0,112	1	0,112	10,043	0.0029*
AB	0,335	4	0,084	7,510	0.0001*
AC	0,182	2	0,091	8,158	0.0011*
BC	0,079	2	0,040	3,557	0.0379*
Residual	0,446	40	0,011		

R²: 0,8775, R² Adjust: 0,8376, R² Predict: 0,7767, Adeq Precision: 20,1759, CV %: 8,6301, Std Dev: 0,1056

SC: Suma de cuadrados, gl: Grados de libertad, MC: Media cuadrática.

* Significancia a $p < 0,05$.

Posterior a los resultados obtenidos del ANOVA, con el fin de observar los cambios significativos entre las variables glucosa, YE y sulfato de amonio, y corroborar los resultados de la tabla 4, se graficaron los datos de ficocianina por medio del programa estadístico Desing expert 8.0.3 (Figura 7), en donde se observa que las concentraciones ideales de glucosa y extracto de levadura (5 g/L, 1,5 g/L) para producir la mayor cantidad de ficocianina, siguen siendo las mismas que la de los resultados arrojados en la Figura 4; pero el aumento de sulfato de amonio de 1,3 g/L (figura 7.A) a 2,6 g/L (figura 7.B), disminuye aproximadamente una décima la concentración del pigmento.

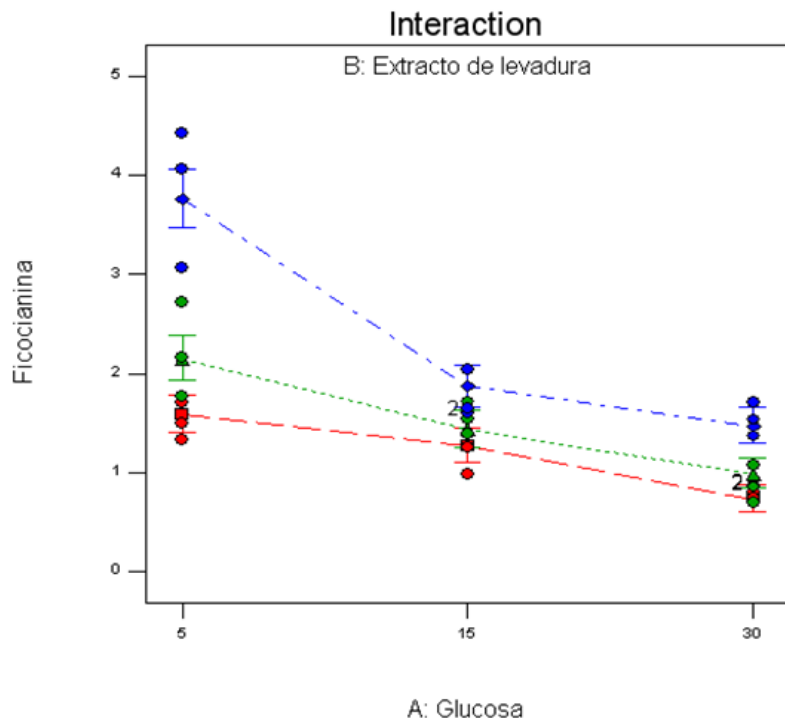
A) Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 Ficocianina

◆ Design Points

X1 = A: Glucosa
 X2 = B: Extracto de levadura

Actual Factor
 C: (NH4)2SO4 = 1.3

■ B1 0
 ▲ B2 0.5
 ◆ B3 1.5



B) Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 Ficocianina

◆ Design Points

X1 = A: Glucosa
 X2 = B: Extracto de levadura

Actual Factor
 C: (NH4)2SO4 = 2.6

■ B1 0
 ▲ B2 0.5
 ◆ B3 1.5

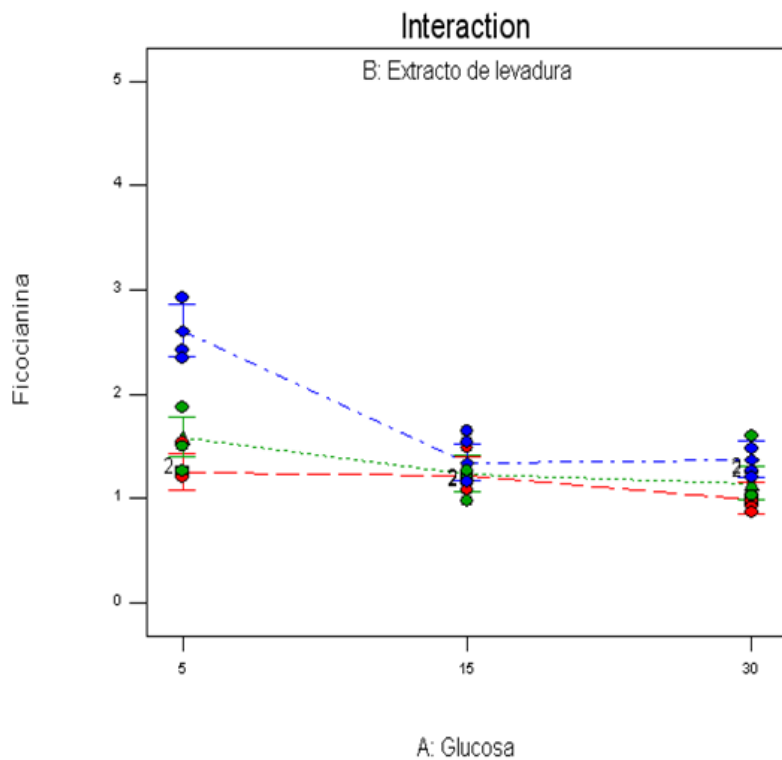


Figura 7: Evaluación de la concentración de Ficocianina (mg/L) frente a las tres variables (glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio). A) Efecto del sulfato de amonio 1,3 g/L en la concentración de ficocianina. B) Efecto del sulfato de amonio 2,6 g/L en la concentración de ficocianina.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente mencionados de crecimiento de la biomasa ($\mu\text{g/ml}$) y producción de la ficocianina (mg/L), se graficaron los resultados de peso seco, glucosa residual y producción de ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 correspondiente al tratamiento 5 (Figura 8), donde se observa que la ficocianina, que es el pigmento de *Galdieria* sp. está directamente asociado al crecimiento de la microalga, y es a partir del cuarto día de incubación del organismo que este (FC) se empieza a producir en masa alcanzando su máximo de concentración en aproximadamente el sexto o séptimo día, que es cuando *Galdieria* sp. entra a fase estacionaria. Después de estos días en dicha fase, se observa una disminución de la concentración del pigmento, además de que no hay glucosa residual, debido a esta fuente es consumida en su totalidad hasta cuando la microalga deja de crecer, es decir pasa de la fase exponencial a la fase estacionaria.

De todos los tratamientos evaluados, se seleccionó las variables del medio de cultivo del tratamiento 5, porque se logró tener la mayor concentración de biomasa ($205,46 \text{ mg/ml}$) e igualmente de ficocianina ($3,85 \text{ mg/L}$). Teniendo en cuenta que la concentración de ficocianina puede aumentar de acuerdo a la cantidad de biomasa producida y que a su vez esta se puede aumentar cuando se expone a la microalga a condiciones de luz, se decidió evaluar la ficocianina en un sistema de cultivo secuencial de heterotrofia / foto-inducción.

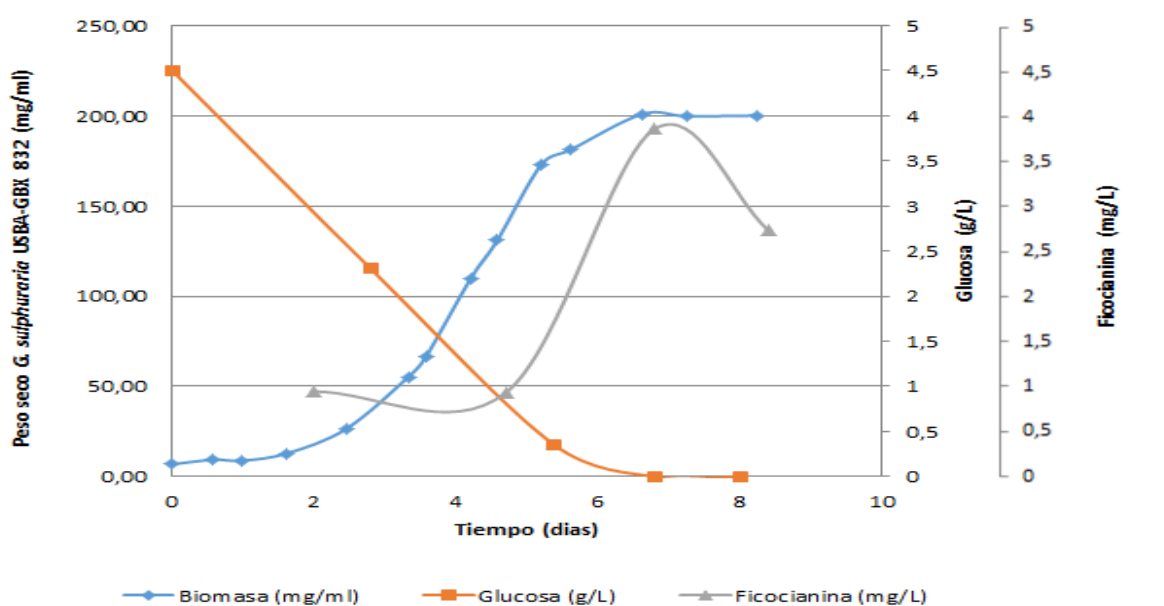


Figura 8: Grafica del crecimiento, producción de ficocianina y consumo de glucosa por parte de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832 en función del tiempo (días).

Según estudios realizados por López y compañía (2016), se sabe que la microalga (*Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832) no crece favorablemente en condiciones autotróficas, además de que al cultivarla desde un comienzo con glucosa, esta inhibe de cierta forma la producción de ficocianina, es por esto que se decidió cultivar primero en condiciones de heterotrofia para favorecer de cierta forma el crecimiento de la microalga con el fin de obtener una producción mayor de biomasa, y después si someterla a una condición que favorezca la producción de la ficocianina como lo es la incidencia de luz.

6.2 Evaluación de la concentración de ficocianina en el cultivo secuencial heterotrofia/fotoinducción de la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, los cuales corresponden al objetivo 1, se seleccionaron las concentraciones ideales pertenecientes al tratamiento 5: glucosa 5 g/L, extracto de levadura 1,5 g/L y sulfato de amonio 1,3 g/L y se adicionaron a los medios inoculados con *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832, bajo un cultivo discontinuo heterotrófico.

6.2.1 Evaluación ficocianina del cultivo foto-autotrófico.

Los tratamientos evaluados permitieron evidenciar el efecto de la luz sobre el crecimiento de la microalga en función del tiempo (días) (Figura 9). Los dos tratamientos y el control, iniciaron el crecimiento a una concentración de biomasa en peso seco de aproximadamente 15,000 mg/ml. Durante los 5 primeros días el crecimiento fue igual para las tres curvas, pero a partir de este día hasta el séptimo día que es cuando la microalga entra en fase estacionaria, según los resultados anteriormente evaluados, se observa un ligero cambio en la concentración de peso seco, siendo el tratamiento 1 con incidencia de luz de 110 lux, la mayor productora de biomasa con aproximadamente 190,000 mg/ml, seguido del tratamiento 2 con 175,000 mg/ml y por último el control.

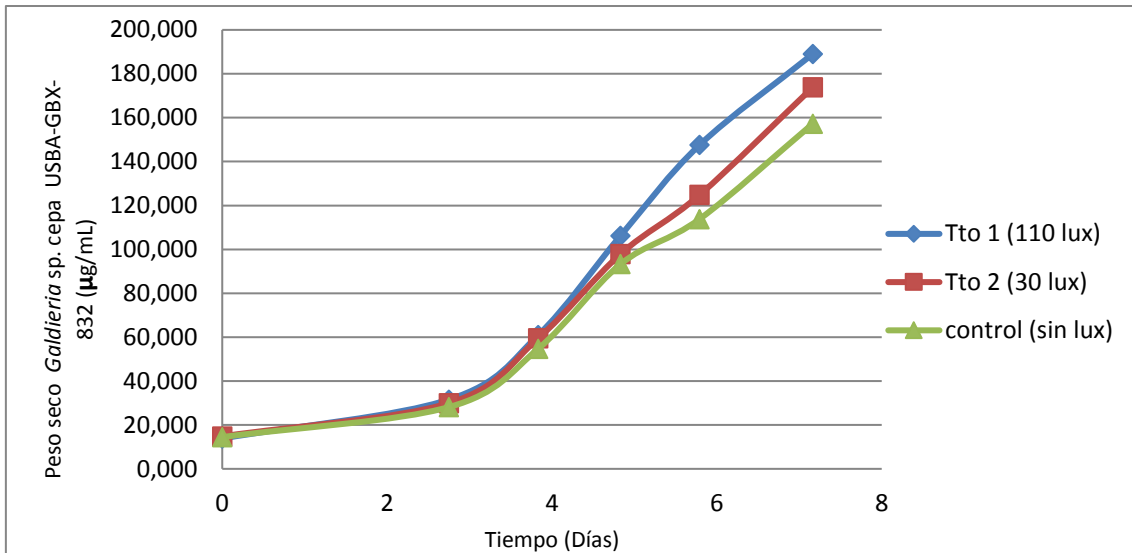


Figura 9: Crecimiento de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes intensidades de luz, en función del tiempo (días).

Se realizó un muestreo en los medios foto-autotróficos cada 12 horas a partir de las 72 horas de crecimiento de *Galdieria* sp. USBA-GBX 832 por un tiempo total de 10 días. Las variables de incidencia de luz en los dos tratamientos evaluados (1 y 2), permitieron evidenciar el efecto de estas sobre la producción de ficocianina en la microalga en función del tiempo (días) (Figura 10). El tratamiento 1 con incidencia de luz de 110 lux, tuvo la mayor producción de ficocianina con aproximadamente 4,35 mg/L, seguido del tratamiento 2 que produjo aproximadamente 2,75 mg/L y por último el control (sin fuente de luz) con una concentración del pigmento de 2,00 mg/L.

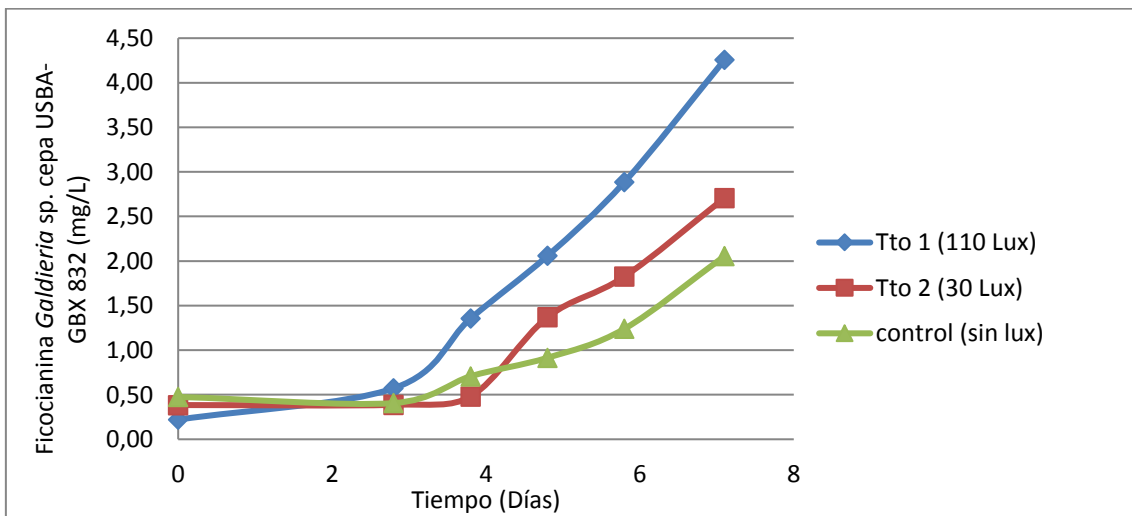


Figura 10: Concentración de ficocianina de *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832 bajo diferentes intensidades de luz, en función del tiempo (días).

Wan y colaboradores (2016) realizaron un estudio de fotoinducción con cultivos de *Galdieria sulphuraria* con el objetivo de aumentar la biomasa y producir más ficocianina; en dicho estudio obtuvieron como resultado 1,14 g/L de peso de las células secas y el contenido de ficocianina alcanzó 12,22% después de los 7 días de fotoinducción debido a que le adicionaron CO₂ al medio de cultivo, lo que aumentó su producción por el aumento de la biomasa, que según como lo argumentan los autores, el peso de las células secas puede aumentar 18 veces durante la etapa de fotoinducción con CO₂ adicional.

7. CONCLUSIONES

- Basado en los análisis de las variables fuente de carbono y fuente de nitrógeno de los medios de cultivo de la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832, se identificó que la concentración más alta de extracto de levadura es significativa para el aumento de la concentración de biomasa y la producción de ficocianina en función del tiempo.
- Las variables de cultivo sulfato de amonio y glucosa no son significativas en la producción de biomasa, pero lo son para la producción de ficocianina (significancia $p < 0,05$); la menor concentración de estas permitieron obtener la mayor producción del pigmento.
- El sistema de cultivo secuencial de heterotrofia / fotoinducción, aumentó la producción de ficocianina de la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX 832, cuando esta se expuso a una incidencia de luz mayor (110 Lux).

8. BIBLIOGRAFÍA

Abd El Baky HH, El-Baroty GS. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. *Food Funct.* 2012; 3: 381-388.

Abd El Baky HH, El-Baroty GS. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. *J Aquat Sci.* 2013; 1 (1): 11-23.

Antelo FS, Costa JAV, Kalil SJ. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis* *Biochem Eng J.* 2008; 41: 43–47.

Barbier G, Oesterhelt C, Larson MD, Halgren RG, Wilkerson C, Garavito RM, Benning C, Weber AP. Comparative genomics of two closely related unicellular thermoacidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* 2005; Vol 137(2): 460–474.

Benavente-Valdés JR, Montañez JC, Aguilar CN, Méndez-Zavala A, Valdivia B. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *UCO/R.* 2012; 4 (7).

Bidigare RR, Ondrusek ME, Kennicutt II MC, Iturriaga R, Harvey HR, Hohan RW, Macko SA. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 1993; 29: 427-434.

Boussiba S. Nitrogen fixing cyanobacteria potential uses. *Plant Soil,* 1991; 137: 177-180.

Boussiba S, Richmond AE. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch Microbiol.* 1979; 120(2): 155–159.

Cañizares-Villanueva RO, Ríos-Leal E, Olvera-Ramírez R, Ponce-Noyola T, Márquez-Rocha F. Fuentes microbianas de pigmentos. En: Giono-Cerezo S, compilador. México. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 1998; Vol 40: P. 87-107.

Cerón García MC, Sánchez Mirón A, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E, García Camacho F. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochem.* 2005. 40 (1): 297–305.

Chaiklahan R, Chirasuwana N, Bunnaga B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem.* 2012; 47 (4): 659–664.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 2007; 25: 294-306.

Contreras-Flores C, Peña-Castro JM, Flores-Cotera LB, Cañizares-Villanueva RO. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *INCI.* 2003; 28(8): 450-456.

Cortés-Castillo CE, Padilla J, Ortiz-Moreno ML, Otero-Paternina AM, Sánchez-Villarraga J. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia.* 2012; 16 (1): 11–20.

Des Habbayes H, Chadefaud M, Feldmann J, De Ferré Y, Gausson H, Grassé PP, Prévot AR. Botánica: vegetales inferiores. 2ª edición. En: Prévot AR, editor. *Fisiología general de las bacterias.* Barcelona, España. 1989. P. 25 – 37.

Deshmukh DV, Puranik PR. Statistical evaluation of nutritional components impacting phycocyanin production in *Synechocystis* sp. *Braz. J. Microbiol.* 2012; 43(1): 348-355.

Díaz-Domínguez G, Marsán-suárez V, del Valle Pérez LO. Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia [revista en Internet].* [citado 2016 Dic 1]; 2016; 32(4).

Droop MR. Heterotrophy of carbon. In: Stewart WDP, editor. *Algal Physiology and Biochemistry*. Oxford, UK, Blackwell Scientific Publications. 1974; 530–559.

Eriksen NT. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 80: 1–14.

Fukuda, I. Physiological studies on a thermophilic blue green alga, *Cyanidium caldarium* Geitler. *Bot. Mag. Tokyo*. 1958; 71: 79–86.

Fukui K, Saito T, Noguchi Y, Kodera Y, Matsushima A, Nishimura H, Inada Y. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes Pigm*. 2004; 63(1): 89–94.

Graverholt O and Eriksen N. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 77: 69–75.

Grobbelaar JU. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us?. *J Appl Phycol*. 2007; 19: 591–598.

Gross W, Schnarrenberger C. Heterotrophic growth of two strains of the acidothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol*. 1995; 36: 633–638.

Gudin C, Chaumont D. Cell fragility - the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Biores. Technol*. 1991; 38: 145-151.

Guedes AC, Catarina RB, Helena MA, Pereira CI, Francisco XM. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *Inter. J. Food Sci. Technol*. 2011; 46: 862-870.

Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev Biol Mar Oceanogr*. 2014; 49 (2): 157-173.

Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E. Supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chem.* 2006; 98: 136-148.

Hoffmann. L. Criteria for the classification of blue-green algae at the genus and at the species level. *Arch. Hydrobiol. / Algal Stud.* 1988; 50: 131-139.

Hu Q, Guterman H, Richmond A. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 51: 51-60.

Ip P and Chen F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem.* 2005; 40: 733–738.

Itoh T, Suzuki K, Sanchez PC, Nakase T. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53: 1149–1154.

Kaplan D, Richmond AE, Dubinsky Z, Aaronson S. Algal nutrition. In: Richmond A, Editor. *Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press, Boca Raton, FL., USA. 1986; 147–198.

Kursar T, Alberte RS. Photosynthetic Unit Organization in a Red Alga: RELATIONSHIPS BETWEEN LIGHT-HARVESTING PIGMENTS AND REACTION CENTERS. *Plant Physiol.* 1983; 72(2): 409-414.

Lee YK. Commercial production of microalgae in the Asia- Pacific rim. *J Appl Phycol.* 1997; 9: 403–411.

Lee YK. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond A, Editor. *Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing, Oxford, UK. 2004. P. 116.

López G, Baena S. Minería de datos genómicos de la cepa *Galdieria sp.* USBA-GBX-832, para identificación de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios asociadas a ácidos grasos poliinsaturados. USBA. 2016.

Loreto C, Rosales N, Bermúdez J, Morales E. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Bot.* 2003; 60(2): 83-89.

Mandalam R.K., Palsson BØ. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998; 59: 605–611.

Manrique Reol, E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas.* 2003; 12(1): 1697-2473.

Medeiros, F. O., Alves, F. G., Lisboa, C. R., Martins, D. S., Burkert, C. A. V. and Kalil, S. J., Ondas Ultrassônicas e Pérolas de Vidro: um Novo Método de Extração de B-Galactosidase para Uso em Laboratório. *Química Nova.* 2008; 31(2): 336-339.

Minini-Rivas L. Purificación y estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína antena ficocianina. [Tesis]. Uruguay: Universidad de la Republica. Facultad de ciencias; 2012.

Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Min SP, Yang JW. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean J. Chem. Eng.* 2014; 31: 490–495.

Neilson AH, Lewin RA. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia.* 1974; 13: 227–264.

Oesterhelt C, Schmälzlin E, Schmitt JM, Lokstein H. Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant J.* 2007; 51(3): 500-11.

Oesterhelt C and Gross W. Different Sugar Kinases Are Involved in the Sugar Sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol.* 2002; 128(1): 291–299.

Ogbonna JC, Tanaka H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 2000; 12: 207-218.

Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 2011; 45(1): 11-36.

Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 57: 287–293.

Reeb V, Bhattacharya D. The thermo-acidophilic Cyanidiophyceae (Cyanidiales) In: Seckbach J, Chapman DJ, editors. *Red algae in the genomic age*. Dordrecht (The Netherlands): Springer; 2010. P. 409–426.

Richmond A. *Spirulina*. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, editors. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press 1988. P. 85-121.

Sánchez Mirón A, Cerón García M-C, Contreras Gómez A, García Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J.* 2003; 16: 287–97.

Sieferman-Harms, D. The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 1987; 69: 561-568.

Sloth JK, Wiebe1 M G, Eriksen N T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 2006; 38: 168–175.

Sonani RR, Rastogi RP, Patel R, Madamwar D. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World J Biol Chem.* 2016; 7(1): 100-109.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 2006; 101: 87–96.

Stadnichuk I, Rakhimberdieva M, Bolychevtseva Y, Yurina N, Karapetyan N. and Selyakh I. Inhibition by glucose of chlorophyll a and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Sci.* 1998; 136: 11–23.

Stanier RY, Ingraham, JL. Wheelis, ML. Painter, PR. Capítulo 16: Eubacterias quimioautotróficas y metófilas. *Microbiología.* 2da edición. Editorial Reverté, S. A.; Barcelona: España. 1992.

Suh IS, Lee CG. Photobioreactor engineering: design and performance *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2003; 8: 313–321.

Tischendorf G, Oesterhelt C, Hoffmann S, Girnus J, Schnarrenberger C and Gross W. Ultrastructure and enzyme complement of proplastids from heterotrophically grown cells of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Phycol.* 2007; 42(3): 243-251.

Tsavalos AJ, Day JG. Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina*. *J. Appl. Phycol.* 1994; 6: 431–433.

Ugwu CU, Ogbonna JC, Tanaka H. Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 58: 600-607.

Wan M, Wang Z, Zhang Z, Wang J, Li S, Yu A, Li Y. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology.* 2016, 218: 272–278.

Xing W, Huang W, Li D, Liu Y. Effect of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Curr Microbiol.* 2007; 55: 94–98.

Xu H, Miao X, Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology.* 2006; 126: 499–507.

Yang C, Hua Q, Shimizu K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 2000; 6: 87–102.

Yong YYR, Lee YK. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)?. *Phycologia.* 1991; 30: 257-261.

[1] Yeast Extract; MSDS No. RM70 [Online]; Mast Group Ltd.: United Kingdom, Oct. 26, 2015. http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU605_SPA.pdf (consultada May. 05, 2017).

9. ANEXOS

Anexo 1.

Medio 991 o *Caldisphaera lagunensis* modificado (Itoh *et al.* 2003)

COMPONENTES	g/L
(NH ₄) ₂ S ₀ 4	1,3
KH ₂ PO ₄	0,28
Mg SO ₄ x 7 H ₂ O	0,25
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07
FeSO ₄	0,02
Extracto de levadura	0,1

Anexo 2.

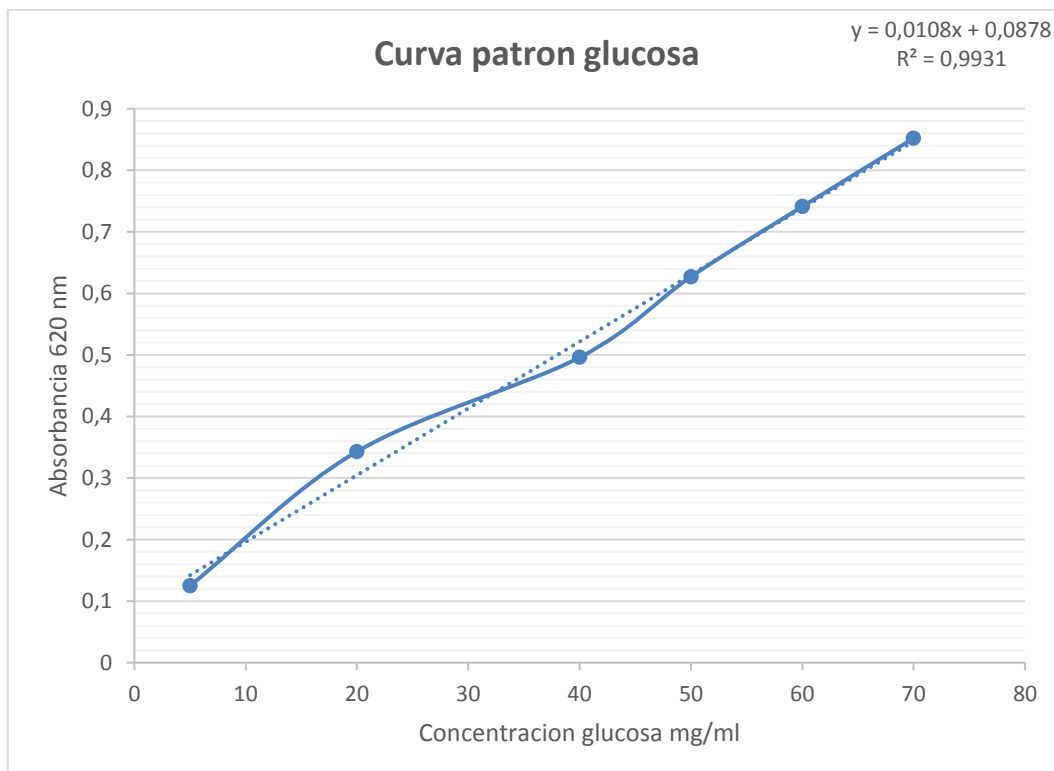
Diseño de factorial general (Desing expert 8.0.3) con tres factores a evaluar.

tratamiento	glucosa (g/L)	E. levadura (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)
1	5	0	1,3
2	5	0	2,6
3	5	0,5	1,3
4	5	0,5	2,6
5	5	1,5	1,3
6	5	1,5	2,6
7	15	0	1,3
8	15	0	2,6
9	15	1,5	1,3
10	15	0,5	2,6
11	15	1,5	1,3
12	15	1,5	2,6
13	30	0	1,3
14	30	0	2,6
15	30	0,5	1,3
16	30	0,5	2,6
17	30	1,5	1,3
18	30	1,5	2,6

Anexo 3.

Curva patrón de glucosa (mg/ml) de acuerdo a los protocolos establecidos por (Wan *et al.*, 2016).

Concentración glucosa mg/ml	Absorbancia 620 nm
5	0,125
20	0,343
40	0,496
50	0,627
60	0,741
70	0,852



Anexo 4.

Diseño experimental Heterotrofia/foto-inducción.

Tratamientos	Variables de cultivo-Heterotrofia	Intensidad de luz (Lux) Fotoinducción	Variables de cultivo-Fotoinducción
1	Glucosa 5 g/L E. de levadura 1.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.3 g/L	150	Sin glucosa 180 rpm 45 °C por 7 días
2		60	
3 (control)		Sin Lux	

Anexo 5.

Ecuación para la cuantificación de ficocianina, establecida por Kursar & Alberte (1983).

$$C-PC = 166A_{618} - 108A_{650}$$

Anexo 6.

Curva patrón de peso seco (µg/ml).

dilucion /10	abs 1	abs 2	abs 3	promedio Abs	ug/mL
0,1	0,069	0,062	0,037	0,0655	0,0298
0,5	0,164	0,147	0,187	0,1755	0,149
1	0,335	0,336	0,375	0,348666667	0,298
2	0,587	0,581	0,616	0,594666667	0,596
3	0,811	0,802	0,98	0,8065	0,894
4	0,978	1,051	0,93	0,986333333	1,192
5	1,212	1,198	1,243	1,217666667	1,49
0	1,652	1,6	1,627	1,6395	2,98

