



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FICOCIANINA EN *Galdieria sulphuraria* EN
CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE NITRÓGENO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

QFB. RICARDO ADRIÁN ALVARADO COSIO

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. HELENA PORTA DUCOING
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Cuernavaca Mor. Febrero, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biotecnología



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FICOCIANINA EN
Galdieria sulphuraria EN CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE
NITRÓGENO**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

QFB. RICARDO ADRIÁN ALVARADO COSIO

ASESORA:

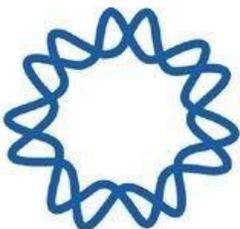
**DRA. HELENA PORTA DUCOING
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Comité tutor:

**DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Cuernavaca Mor. Febrero, 2023



UNAM
POSGRADO 



Jurado Asignado:

| | | |
|------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Presidente | Dra. Elizabeth Cordoba Martínez | Instituto de Biotecnología, UNAM |
| Secretario | Dr. Carlos Peña Malacara | Instituto de Biotecnología, UNAM |
| Vocal | Dra. Patricia Coello Coutiño | Facultad de Química, UNAM |
| Vocal | Dr. Ayixon Sánchez Reyes | Instituto de Biotecnología, UNAM |
| Vocal | Dr. Luis Felipe Jiménez García | Facultad de Ciencias, UNAM |

Lugar donde se desarrolló el trabajo:

Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Biología molecular de Plantas

Asesora

Dra. Helena Porta Ducoing

Sustentante

QFB. Ricardo Adrián Alvarado Cosio



Índice

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Aspectos generales de las Rhodophytas | 2 |
| Las algas rojas y sus características. | 2 |
| 1.1 Microalgas rojas. | 3 |
| 1.1.1 Características morfológicas y fisiológicas de las microalgas rojas. | 5 |
| 1.2 <i>Galdieria sulphuraria</i> una microalga con gran potencial biotecnológico..... | 6 |
| 1.3 Aplicaciones de la ficocianina | 11 |
| Ficobilisoma: un complejo captador de luz de algas rojas. | 13 |
| 2.1 La luz regula la expresión del ficobilisoma..... | 18 |
| 2.2 La degradación de los ficobilisoma, un proceso inducido por la privación de nitrógeno. | 21 |
| 2.3 La degradación de los ficobilisomas un proceso mediado por NblA y ClpC.... | 21 |
| 2.3 Regulación de la proteína pequeña NblA..... | 23 |
| 2.4 <i>Galdieria sulphuraria</i> presenta blanqueamiento bajo inanición por nitrógeno.25 | |
| 2.5 Análisis de la degradación de ficocianina en <i>G. sulphuraria</i> | 27 |
| 3.1 Planteamiento del problema..... | 27 |
| 3.2 Hipótesis | 29 |
| 3.3 Objetivos..... | 29 |
| 3.4 Método experimental. | 30 |
| 3.5 Propuesta general de trabajo..... | 35 |
| 3.5 Resultados y discusión. | 37 |
| 3.5.1 Búsqueda y localización de los genes implicados en el mecanismo de degradación de la ficocianina..... | 37 |
| 3.5.2 Evaluación y caracterización de 5 cepas de trabajo de <i>G. sulphuraria</i> | 44 |
| 3.5.3 Evaluación en la acumulación de ficocianina en cultivos limitantes de nitrógeno en las cepas UTEX 2919 y CCME 5587 | 50 |
| 3.5.4 Perfil transcripcional del gen <i>nblA</i> de <i>G. sulphuraria</i> en condiciones de privación de nitrógeno. | 71 |
| 3.6 Conclusiones | 78 |
| Bibliografía..... | 79 |
| 4. Anexo | 87 |



Índice de Figuras y Tablas

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Figura 1-I | Filogenia de algas rojas y esquemas taxonómicos alternativos | 3 |
| Figura 2-I | Ejemplos microscópicos del subfilo Cyanidiosphyceae | 4 |
| Figura 3-I | Diagrama de la ultraestructura de las microalgas rojas | 5 |
| Tabla 1-I | Ejemplos de la diversidad de fuentes de carbono metabolizados por <i>G. sulphuraria</i> | 7 |
| Tabla 2-I | Comparación en la producción de biomasa y ficocianina entre <i>A. plantensis</i> y <i>G. sulphuraria</i> . | 9 |
| Figura 4-I | Disciplinas donde la ficocianina ha generado mayor impacto por su importancia económica. | 11 |
| Figura 1-II | Esquema de organización del ficobilisoma | 14 |
| Figura 2-II | Estructura del ficobilisoma | 15 |
| Figura 3-II | Espectros de fluorescencia (A) y UV-visible (B) de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina aislada de <i>Lyngbya</i> sp. A09DM. | 16 |
| Tabla 1-II | Diversidad de ficobiliproteínas, número de cromóforos por subunidad y cantidad de subunidades por complejo. | 17 |
| Figura 4-II | Estructuras cristalográficas tomadas de PDB de las ficobiliproteínas | 17 |
| Figura 5-II | Regulación de la expresión de genes fotosintéticos mediante el sistema de dos componentes en <i>Synechocystis</i> sp. 6803 | 20 |
| Figura 6-II | Representación de la proteasa Clp | 23 |
| Figura 7-II | Diagramas que muestran la regulación de la expresión del gen <i>nblA</i> por sistemas de dos componentes en <i>S. elongatus</i> | 24 |
| Figura 8-II | Espectro de absorción de la suspensión de <i>G. sulphuraria</i> en varios estadios de la inanición por nitrógeno. | 26 |
| Figura 1-III | Principales propiedades de <i>G. sulphuraria</i> y sus ventajas como un recurso biotecnológico importante para la obtención de metabolitos de alto valor industrial | 28 |
| Tabla 1-III | Cepas de <i>G. sulphuraria</i> y fuente de obtención. | 30 |
| Figura 2-III | Método de obtención de los cultivos Au y Mx para los experimentos de deficiencia de nitrógeno | 32 |
| Tabla 2-III | Cebadores para la implicación de los genes <i>nblA</i> y <i>H3</i> de <i>G. sulphuraria</i> | 34 |
| Figura 2.1-III | Panorama general del método experimental del proyecto | 36 |
| Tabla 3-III | Búsqueda de genes asociados al sistema de dos componentes involucrado en la degradación de la ficocianina y asociados al sistema de degradación de proteínas cloroplásticas CLP | 38 |
| Tabla 4-III. | Resultados de la búsqueda de los componentes ClpR y ClpP de la proteasa CLP utilizando como secuencia de búsqueda la proteína ClpP2 de <i>Chlamidomonas reinhardtii</i> . | 40 |
| Figura 3-III | Alineamiento múltiple y diferencia en el sitio catalítico entre las secuencias pertenecientes al grupo de proteínas ClpR y ClpP de <i>G. sulphuraria</i> | 43 |



| | | |
|----------------------|--|----|
| Figura 4-III | Evaluación del crecimiento en 5 cepas de <i>G. sulphuraria</i> | 44 |
| Figura 5-III | Evaluación del crecimiento en deficiencia de nitrógeno en 5 cepas de <i>G. sulphuraria</i> | 45 |
| Figura 6-III | Crecimiento celular en condiciones por limitación de nitrógeno de las 5 cepas de <i>G. sulphuraria</i> | 46 |
| Figura 7-III | Fluorescencia emitida por la ficocianina en cultivo de <i>G. sulphuraria</i> . | 47 |
| Figura 8-III | Fenómeno de blanqueamiento en las 5 cepas de <i>G. sulphuraria</i> en condiciones de inanición por nitrógeno. | 48 |
| Figura 9-III. | Crecimiento y acumulación de la ficocianina en <i>G. sulphuraria</i> 5587 y 2919 | 52 |
| Tabla 5-III | Parámetros cinéticos sobre el crecimiento y la acumulación de ficocianina en <i>G. sulphuraria</i> 5587 y 2919. | 53 |
| Figura 10-III | Fenotipo blanqueador de la cepa de <i>G. sulphuraria</i> en las cepas 5587 y 2919 | 54 |
| Tabla 6-III | Comportamiento de la ficocianina en diversos organismos sometidos a limitación por nitrógeno | 57 |
| Figura 11-III | Crecimiento celular y acumulación de la ficocianina por célula en <i>G. sulphuraria</i> | 59 |
| Figura 12-III | Perfil espectrofotométrico de los pigmentos fotosintéticos en <i>G. sulphuraria</i> | 63 |
| Figura 13-III | Fluorescencia de la ficocianina en condiciones de limitación por nitrógeno en <i>G. sulphuraria</i> | 65 |
| Tabla 7-III | Fluorescencia de la ficocianina en condiciones de inanición por nitrógeno en <i>G. sulphuraria</i> | 66 |
| Figura 14-III | Perfil de fluorescencia de ficobiliproteínas en <i>G. sulphuraria</i> | 68 |
| Figura 15-III | Alineamiento múltiple de la secuencia de proteína de NblA. | 71 |
| Figura 16-III | Gel del producto de PCR del gen <i>nblA</i> | 73 |
| Figura 17-III | Vector de clonación, y características de los amplificadas positivas después de la transformación de cepas de <i>E. coli</i> | 74 |
| Figura 18-III | Perfil transcripcional del gen <i>nblA</i> en <i>G. sulphuraria</i> | 75 |
| Figura 19-III | SDS-PAGE del extracto de proteínas total de <i>G. sulphuraria</i> en condiciones de privación de nitrógeno. | 77 |



Acrónimos

| | |
|-------------------|---|
| APC o AP | Alophycocyanin (Aloficocianina) |
| Au | Cultivos iniciados con biomasa generada de manera Autotrófica |
| ATP | Adenin triphosphate (Adenin trifosfato) |
| °C | Grados Celcius |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxiribonucleico) |
| DO | Densidad Óptica |
| EST | Expressed Sequence Tag (Marcador de Secuencia) |
| FADH ₂ | Flavin Adenin Dinucleotido |
| kg | Kilogramo |
| mg | Miligramo |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| nm | Nanómetros |
| N+ | Condiciones de nitrógeno |
| N- | Condiciones en deficiencia de nitrógeno |
| Mx | Cultivos iniciados con biomasa generada de manera Mixotrófica |
| pb | Pares de bases |
| PC | Phycocyanin (Ficocianina) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PE | Phycocerytrin (Ficoeritrina) |
| pm | Picometros |
| PSI | Photosystem I (Fotosistema I) |
| PSII | Photosystem II (Fotosistema II) |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RNA | Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico) |
| U.R. | Unidades Relativas |
| PBS | Phycobilisome (Ficobilisoma) |
| V | Voltios |
| λ_{max} | Longitud de onda máxima |
| μ g | Microgramo |
| μ L | Microlitro |
| μ m | Micrómetro |
| μ M | Micromolar |



Agradecimientos

A la Dra. Helena Porta Ducoing, por todo su conocimiento, su paciencia y su muy buena enseñanza durante estos 2 años de asesoramiento, por creer en mi y enseñarme que el valor de pequeños trabajos hace grandes cambios.

A la Psicóloga Angeica Bailon que sin su trabajo y ayuda no hubiera podido lograr terminar mi escrito y el soporte emocional que me dio durante la larga y muy difícil travesía que pase durante el IBt.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por aceptarme en el posgrado.

A la Dra. Elizabeth Córdoba por su ayuda durante la elaboración de RT-PCR y por sus valiosas aportaciones en este escrito.

Al Dr. Carlos Felipe Peña por sus aportaciones a mi tesis y ayudarme a mejorarla, con su conocimiento sobre biotecnología.

Al Dr. Ayixon Sánchez por su tiempo y dedicación puesta en la tesis y en las reflexiones finales sobre esta.

A la Dra. Patricia Coello y al Dr. Luis Felipe Jiménez por sus aportaciones a mi tesis.

Al Dr. Carlos Montenegro y al Dr. Francisco Vela por su tiempo y consejos para realizar este proyecto.

A la M. en C. Sol Castrejón, al Bio. Alfredo Rodríguez y al Bio. Isaac Guzmán por su tiempo en el mejoramiento de la tesis por el conocimiento acumulado que aportaron que permitió que este trabajo quedara como esta.



Dedicatoria

Esta Tesis va dedicada a todos los alumnos del IBt que la hayan pasado mal, que hayan desertado por situaciones ajenas a sus capacidades, a las mujeres que hayan sido víctimas de algún tipo de violencia de género o revictimización, o simplemente que las autoridades hayan sido omisas y/o negligentes en sus casos, a esos a los que no se les dio apoyo suficiente de manera intelectual o económica para llevar a cabo sus ideas y creatividad impidiendo alcanzar el cenit de su capacidad o aquellas personas que hayan sufrido el desprestigio por parte de los académicos.

Les mando fuerza.

Atte. Ricardo Adrián Alvarado Cosío

A mi Mami Alicia Cosío por su incomparable amor, y el sacrificio de tantos años, por permitirme ser libre y dejar que eligiera el camino que me lleva a ser la persona que soy.

A mis hermanos Christian, Sebastian y Natanael Cosío por siempre hacerme saber que cuento con ellos, la ayuda económica y por siempre pensar que soy muy inteligente, aunque generalmente piense lo contrario.

A la Dra. Helena Porta por nunca dejar de alentarme, por tratarme de hacerme sentir que mi proyecto fue valioso para la sociedad, aunque yo creía lo contrario, y por transmitirme su increíble capacidad de saber resolver problemas, aunque no sea tu fuerte y nunca revictimizarme cuando estuve en peligro.

A Mariela Hernández por su increíble amor por hacerme saber que siempre cuento con ella, aunque desaparezca y ayudarme a tratar de alcanzar una mejor vida.

A Carlos Ramírez por su gran amistad por siempre apoyarme cuando estoy deprimido, y nunca dejarme de solo al tratar de alcanzar mis objetivos profesionales y personales. Gracias eres el mejor.

A Carlos Montenegro y Francisco Vela por su valiosa amistad, por siempre hacerme sentir como uno de los suyos, por compartir el mismo modelo académico y por siempre hacerme sentir mejor cuando me regañaban.

A Fernando Astudillo por nunca dejarme solo en mi proceso de aprendizaje por darme ánimos y siempre hacerme saber que cuento con un amigo como tú, eres un gran amigo.

A Héctor Valle por recuperar mi tesis de un error en la matrix.

A Reynaldo Bazaldúa por siempre ayudarme a tratar de salir del hoyo, por quererme ayudar a que las cosas no siempre van a seguir así, por quererme dar esperanza. Te amo.



A Giovanni Lira, por ser un estupendo amigo ayudarme en mis días tristes y siempre darme consejos tontos. Eres el mejor.

Para Alfredo Rodríguez, Sol Castrejón e Isaac Guzmán:

Quiero darles las gracias a todos por su inmensa amistad, y pedir perdón si alguna vez los aleje. Quiero que sepan que ustedes fueron una pieza fundamental en este trabajo que me costo mucho realizar que fue un pesar que se me hizo un constante cada día, quiero hacerles saber que este trabajo les pertenece, que si necesitan apoyo de algo nunca necesitan dudar en que yo estoy amándolos, quiero también darles gracias por siempre creer en mi cuando se robaron una computadora dentro del LINPI 1 del IBt y posteriormente me intentaron culpar. Gracias por darme asilo para poder huir de esta situación. También quiero decirles que agradezco siempre que me hayan apoyado y entender que mi enojo era válido y que tenía todo el derecho de estar molesto con las autoridades negligentes de IBt de la UNAM. Gracias por no revictimizarme. Reiterando quiero volverles a mencionar que este proyecto también lo hicieron ustedes porque me apoyaron no solo en conocimiento sino también en el incesante estudio para pasar las materias, su valiosa disposición a ayudarme a tener mejores resultados y a sus observaciones siempre valiosas y tomadas en cuenta quiero hacerles saber que me tienen y les pertenezco.



Carta abierta en contra de las autoridades del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Quiero expresar mi descontento con las autoridades del Instituto de Biotecnología por a los acontecimientos que sucedieron con respecto al hurto /robo de una computadora de la marca Apple que pertenecía a una compañera que estudiaba la maestría junto conmigo en el LINPI 1 del edificio sur. Cuando esto paso yo fui señalado como un posible responsable hasta que por ciertos acontecimientos un alumno contemporáneo mío de la maestría que denominaremos como “P” que trabajaba de igual manera en el LINPI 1 llevo esa computadora robada al laboratorio diciendo que la había comprado en la en CDMX. Debido a que yo viví con “P” en el mismo departamento, sufrí violencia y amenazas por parte de él y su entonces pareja sentimental. Por lo cual “P” se vio como el principal implicado en el hurto/robo de la computadora.

Sin embargo, el entonces director del Instituto de Biotecnología, Dr. Octavio Tonatiuh Ramirez Reivech, el secretario académico, el Dr. Enrique Rudiño-Pinera y el abogado general Christian Sánchez, no realizaron las investigaciones pertinentes. Por lo cual, el caso sobre el robo de la computadora de mi compañera, que además también en ese momento vivió momentos de vulnerabilidad, se quedó en la impunidad. Así mismo nunca se acercaron conmigo para brindarme el acompañamiento pertinente tanto legal como psicológico lo que conllevo que esta situación afectara mi vida académica y emocional. Por desgracia después de que “P” saliera del IBt por cierto tipo de medios, “P” logro colocarse en el grupo de Investigación de la Dra. Marina Gavilanes Ruiz del conjunto E de la Facultad de Química UNAM, donde prosiguió calumniándome a mi por un hecho que yo no cometí.

Afortunadamente “P” no logro terminar con sus estudios de maestría, pero, por medio de esta protesta insto a las autoridades del Instituto de Biotecnología a que realicen su trabajo y no se deslinden de este tipo de hechos que suceden bajo su tutela, por lo cual considero que hubo negligencia e impunidad, ya que no solo no hubo ningún tipo de sanción por parte de las autoridades universitarias del Instituto de biotecnología sino que “P” tuvo la elección de irse a terminar su maestría con una Investigadora en la Facultad de Química. Fue colusión de las autoridades universitarias para deshacerse fácilmente de un problema.



Resumen

Debido al gran potencial de aplicaciones que posee la ficocianina, el desarrollo de nuevas estrategias que permitan su producción es de gran importancia para la industria farmacéutica y alimentaria. Actualmente, *Arthospira plantensis* es el organismo utilizado y el único aprobado para llevar a cabo la producción a gran escala de ficocianina. Sin embargo, los cultivos de esta cianobacteria generalmente van acompañados de problemas que dificultan su obtención por lo cual, la Rhodophyta *Galdieria sulphuraria* ha surgido como una gran alternativa para la producción de ficocianina, debido a que puede llevar a cabo metabolismo: heterotrófico, autotrófico y mixotrófico; además, las condiciones extremas de su hábitat le han conferido ventajas valiosas cuando se cultiva en el laboratorio. Por otro lado, se conoce poco acerca de la producción y la degradación de ficocianina en condiciones de limitación de nitrógeno y se desconoce la regulación a nivel molecular de este proceso, en este organismo. En este trabajo se comparó la dinámica de degradación de la ficocianina con relación al tiempo de dos cepas *G. sulphuraria* y la expresión del gen *nbIA* en condiciones de limitación de nitrógeno. De manera interesante, se observó una degradación de ficocianina menor al 30% durante 14 días de cultivo con presencia de un crecimiento celular sostenido. Se analizó la acumulación de mensajeros del gen *nbIA* cuyo producto interactúa directamente con la ficocianina y con la proteína ClpC del complejo proteasa Clp que degrada la ficocianina en privación de nitrógeno. Los resultados muestran que no existe diferencia significativa en la acumulación del transcrito de *nbIA* comparando cultivos creciendo con y sin nitrógeno, lo que podría estar relacionado con la estabilidad de la ficocianina. En conclusión, la gran estabilidad que presenta la ficocianina ante las condiciones provocadas por el estrés que conlleva la limitación de nitrógeno, la hace una opción conveniente para la producción de este metabolito a gran escala utilizando a *G. sulphuraria*.



1.

Aspectos generales de las Rhodophytas

Las algas rojas y sus características.

Las Rhodophytas son un grupo de algas que tienen importancia para la obtención de una gran cantidad de moléculas con actividad biológica con interés para la industria. Actualmente, se han descrito alrededor de 7279 especies¹ que poseen gran diversidad estructural. Se ha descrito en la literatura algas rojas que van desde especies microscópicas unicelulares que habitan diversos ecosistemas como: ambientes marinos, cuerpos de agua dulce, condiciones extremas de temperatura y pH, y ecosistemas adversos provocados por la actividad antropogénica; hasta especies macroscópicas comúnmente encontrados en agua salada. Las algas rojas se agrupan en un linaje eucariota, que está basado en análisis filogenéticos elaborados a partir de genes nucleares, cloroplásticos y mitocondriales, formando parte del clado Archeplastida junto con las algas verdes, las plantas y las Glucophytas.² Las Rhodophytas se caracterizan principalmente por tener un cloroplasto que contiene una estructura compuesta por pigmentos accesorios como la alofocianina, ficocianina, ficoeritrina y en algunos casos eritrocianina, que forman una estructura macromolecular llamada ficobilisoma, que se localiza en la periferia de la membrana del tilacoide del cloroplasto.³ A diferencia de los cloroplastos de las plantas superiores el ficobilisoma no contiene clorofilas b y c, solo contiene clorofila a; además, los cloroplastos de este taxón tienen la capacidad metabólica de sintetizar almidón florídeo que se almacena en el citoplasma. Las algas rojas comparten ascendencia común con las algas verdes y las glaucophytas y se ha propuesto que la adquisición de su cloroplasto se originó a partir de una endosimbiosis primaria entre un eucariote y una cianobacteria lo que originó al cloroplasto actual.

¹ Guiry, M.D. & Guiry, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched, **2021**.

² Adl SM., Simpson AG., Lane CE., Lukeš J, *et al.* *J. Eukaryot Microbiol.* **2012**; 59 (5): 429-93.

³ Freshwater D W, Fredericq S, Butler B S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**, 91(15): 7281–7285.



1.1 Microalgas rojas.

Las microalgas rojas incluyen organismos microscópicos, pluricelulares y unicelulares. La visión tradicional propuesta por Garbary y Gabrielson en 1990 clasificó en un principio a todas las algas rojas en dos taxas, las Florideophyceae y las Bangiophyceae en donde se agrupaban a todas las microalgas rojas.⁴ Sin embargo, en 2006 Yoon y colaboradores elaboraron un estudio donde utilizaron secuencias de 9 genes y 7 proteínas para obtener una mejor resolución de los resultados filogenéticos⁵ y propusieron que las microalgas rojas están presentes en los subfilos Cyanidophytina y Rhodophytina, debido a que los géneros que se encuentran en el primer filo había divergido primero en comparación a todos los demás géneros que conforman a los Rhodophytina **Figura 1-I**.

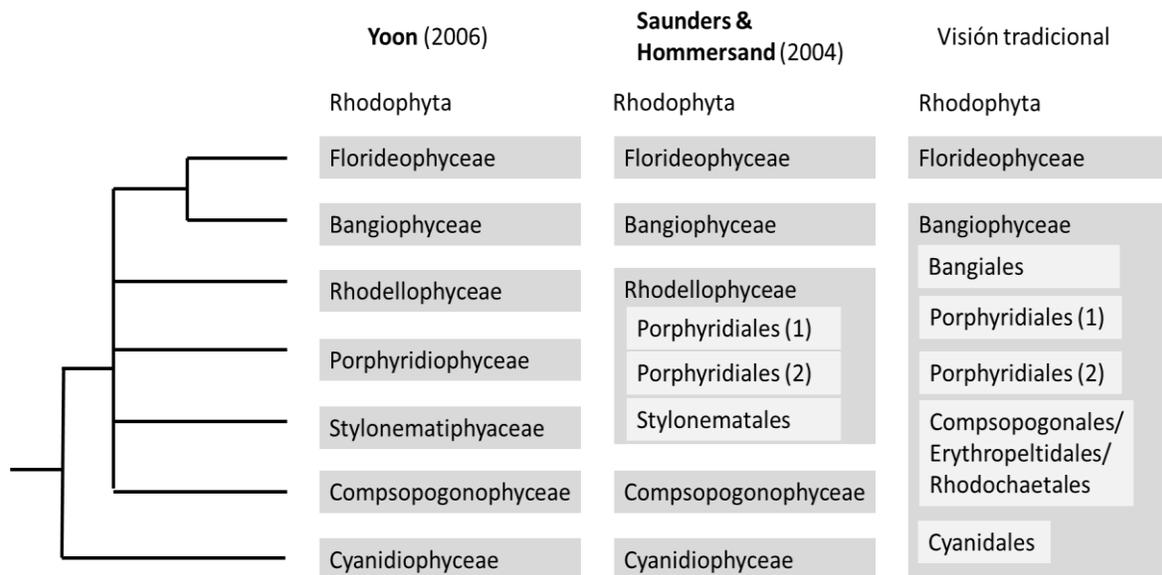


Figura 1-I. Filogenia de algas rojas y esquemas taxonómicos alternativos.

⁴ Van den Hoek et al., 1995

⁵ H.S. Yoon, K.M. Müller, R.G. Sheath, F.D. Ott, D. Bhattacharya. *J. Phycol.*, **2006**, 42, pp. 482-492

1.1.1 Características morfológicas y fisiológicas de las microalgas rojas

El tamaño de las microalgas rojas depende de la especie y la etapa de crecimiento que varía de entre 1 a 100 μm . La célula está rodeada de un polisacárido mucilaginoso de espesor variable que principalmente está compuesto por celulosa, mananos, xilanos, agar y carrageninas,⁶ no poseen flagelos y son organismos bentónicos. La mayoría de las microalgas rojas son esféricas u ovoides, con colores como el azul, verde amarillo o naranja; esta coloración depende de la síntesis de ficobiliproteínas, clorofilas y carotenoides regulado por las condiciones de luz a las que están expuestas. Por lo general contienen un solo cloroplasto parietal y multilobulado. Algunas de microalgas rojas contienen un pirenóide central y esférico que está presente en sus cloroplastos que tiene la función de llevar a cabo la fijación de carbono, **Figura 3-I**. Las microalgas del subfilo cyanidiophyta actualmente tienen un interés biológico particular, debido a que son las únicas algas rojas reportadas que viven actualmente en ecosistemas extremófilos (alta temperatura y pH ácido). Además, acumulan mayoritariamente ficocianina en el interior de sus cloroplastos, lo que le confiere un predominante color azul-verdoso y poseen gran plasticidad metabólica, lo que ha generado un interés en su explotación como un importante recurso biotecnológico.

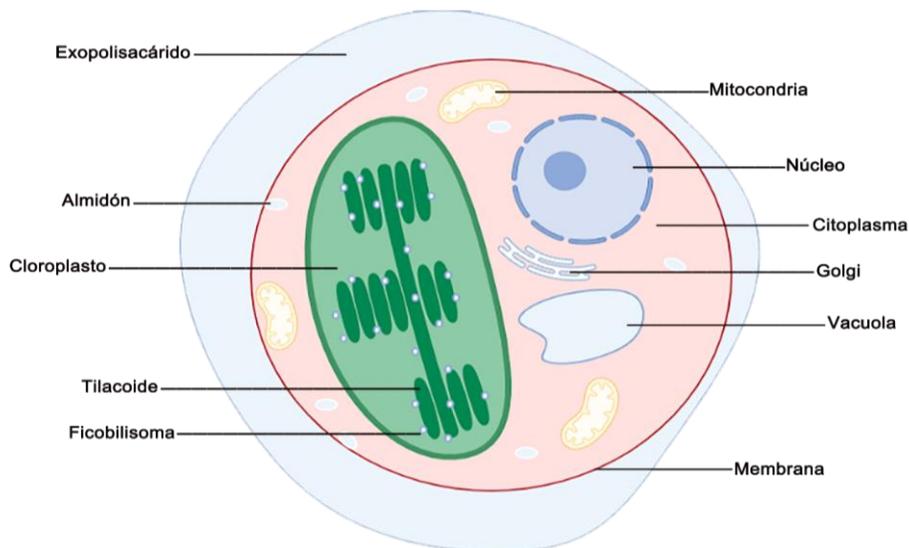


Figura 3-I. Diagrama de la estructura de las microalgas rojas. Esquema representativo de la fisiología general de las microalgas rojas sus organelos y compuestos.

⁶ Domozych, D. *In eLS*, 2022. pp. 1-11.



1.2 *Galdieria sulphuraria* una microalga con gran potencial biotecnológico.

Las algas rojas unicelulares del subfilo Cyanidiophyceae son los principales organismos eucariotas que habitan ambientes extremos, en cuanto a pH y temperatura se refiere; junto con bacterias y arqueas son los organismos predominantes en estos ecosistemas. La Cyanidiophyceae *Galdieria sulphuraria*, habita naturalmente manantiales volcánicos azufrados, suelos de sulfato y ambientes antropogénicos hostiles en los que se pueden encontrar altas concentraciones de arsénico, aluminio, cadmio, mercurio y otros metales pesados, y puede representar hasta el 90% de biomasa total eucariota en estos ecosistemas.⁷

Por otro lado, el metabolismo heterotrófico de *G. sulphuraria* abre la oportunidad de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono para la generación de biomasa en gran cantidad, que entre ellas incluyen hexosas, pentosas, desoxiazúcares, polioles, disacáridos y aminoácidos (**Tabla 1-I**). En trabajos anteriores, se comprobó que las cepas de *G. sulphuraria* 074W y 074G poseen 14 transportadores de azúcares diferentes que están involucrados en la absorción de carbohidratos del medio ambiente.^{8,9} de manera interesante, mediante un estudio de EST elaborado por Weber y colaboradores en 2004,¹⁰ se encontró que *G. sulphuraria* contiene genes que codifican para 13 transportadores de monosacáridos (entre los que se encuentran transportadores de glucosa y de sorbitol) y uno de un disacárido; de igual manera en este trabajo se encontró que *G. sulphuraria* posee diversas vías metabólicas como lo son la vía glucolítica anaerobia, el metabolismo del almidón y floridósido, la presencia de una vía fotorespiratoria completa, y el metabolismo y la biosíntesis de lípidos de membrana.

⁷ Schönknecht G, Chen WH, Ternes CM, Barbier GG, Shrestha RP, et al. *Science*. **2013** ;339(6124), 1207-10.

⁸Oesterhelt C, Gross W. *Plant Physiol*. **2002**; 128(1): 291–299.

⁹Oesterhelt C, Gross W. *Plant Biol*, **1999**; 1 (6): 694-700.

¹⁰ Weber AP, Oesterhelt C, Gross W, Bräutigam A, et al. *Plant Mol Biol*. **2004**, 55 (1): 17-32.



| Tipo de molécula | sustrato | Tipo de molécula | sustrato |
|--------------------|---------------------|---------------------------|---------------|
| Hexosa | D-Glucosa | Pentosa | D-Arabinosa |
| | D-Manosa | | L-Xilosa |
| | D-Galactosa | | D-Ribosa |
| | D-Fructosa | | D-Lixosa |
| | L-Sorbosa | Hexioles | |
| | D-Fucosa | | D-Manitol |
| | L-Rhamosa | | D-Sorbitol |
| | Tagatosa | | Dulcitol |
| | 2-Deoxi-D-galactosa | | L-fucitol |
| Pentioles | | Compuesto de 3C | |
| | Adonitol | | Glicerol |
| | Xilitol | | Piruvato |
| | Darabitol | Azúcares metilados | |
| Disacáridos | | | Metil-Glucosa |
| | Trehalosa | | Metil-Manosa |

Tabla 1-I. Ejemplos de la diversidad de fuentes de carbono metabolizados por *G. sulphuraria*.

En diversos trabajos, se ha cultivado heterotróficamente a *G. sulphuraria* 074G y se han obtenido rendimientos de biomasa superiores a los 100 g L⁻¹ de peso seco¹¹ y las productividades de biomasa en cultivos de flujo continuo han alcanzado hasta 50 g L⁻¹ día⁻¹.¹² Esto es importante, ya que solo se han obtenido productividades y rendimientos altos en cultivos de solo unas pocas especies de microalgas.¹³ Además, *G. sulphuraria* también puede cultivarse en mezclas de remolacha azucarera,¹³ en residuos agroindustriales de la producción del maíz¹⁴, en sustratos a base de residuos de alimentos de restaurantes y de panaderías, y en efluentes de

¹¹ Schmidt RA, Wiebe MG, Eriksen NT. *Biotechnol Bioeng.* **2005**; 90 (1): 77-84.

¹² Graverholt OS, Eriksen NT. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2007**, 77(1):69-75.

¹³ Doucha J, Lívanský K. *J Appl Phycol.* **2011**, 24:35-43

¹⁴ Holguin O, Mozaffaria K, Segerb M, Dungan B. *Bioresource Technology Reports.* **2019**, 7, 100269



plantas de aguas residuales para el tratamiento microbiológico.^{15,16} Esto abre la puerta a su utilización en diversas áreas tecnológicas en las que se encuentra, la biorremediación para la captura de metales pesados en el tratamiento de aguas, o el uso de fuentes de carbono alternativas provenientes de residuos de la industria alimenticia o agrícola.

G. sulphuraria también es una productora potencial de productos valiosos. Entre estos el floridósido, que se ha demostrado tiene las propiedades de reducir la formación de biopelículas (antimicrobiano)¹⁷ y como un potencial antiinflamatorio disminuyendo la concentración intracelular de especies reactivas del oxígeno.¹⁸ Además, es un productor importante de ficocianina, la cual es un pigmento fotosintético presente en algas rojas y en cianobacterias. La ficocianina se ha establecido como un importante producto comercial gracias a sus propiedades, las cuales se han explotado en la industria.

Existen cepas de *G. sulphuraria* que sintetizan ficocianina incluso cuando crecen en obscuridad como la cepa 074G,⁹ lo que implica una ventaja sobre otros microorganismos fotosintéticos productores de ficocianina que necesitan luz para mantener su síntesis. Sin embargo, se sabe que las mejores condiciones para estimular la síntesis de ficocianina en esta cepa requieren intensidades de luz por debajo de aproximadamente $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en cultivos mixotróficos, pero en condiciones heterótrofas la síntesis de ficocianina depende principalmente de la cantidad de nitrógeno disponible en el medio,¹⁹ y esta tiene que estar en forma de amonio ya es la única fuente de nitrógeno que metaboliza *G. sulphuraria*.

Además de la luz existen otros factores que afectan la síntesis de ficocianina como la relación nitrógeno-carbono.¹⁰ Anteriormente se había descrito que el exceso de glucosa en el ambiente reprimía la síntesis de ficocianina. Sin embargo, un estudio, elaborado en 2016 por Sarian y colaboradores, demostró que la represión de la

¹⁵ J.K. Sloth et al. *Bioresource Technology* **2017**,238:296–305

¹⁶ Selvaratnam, T. Pegallapati, AK, Montelya, F, Rodríguez, G, et al. *Bioresource Technology*. **2014**, 156, 395-399.

¹⁷ Liu, H.B., Koh, K.P., Kim, J.S. et al. *Biotechnol Bioproc E*. **2008**, 13, 458–463.

¹⁸ Kim M, Li Y-X, Dewapriya P, Ryu B, Kim S-K.. *BMB Reports*. **2013** 31;46(8), 398–403.

¹⁹ Sloth JK, Wiebe MG, Eriksen NT. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 38:168–175



síntesis de ficocianina es debido a una inadecuada oxigenación en el medio y no por la cantidad de glucosa presente.²⁰

Históricamente *Arthrospira plantensis* se ha empleado como el organismo principal para la producción de ficocianina, a nivel mundial en estanques abiertos, y su popularidad se basa en su disponibilidad y no por sus cualidades particulares. Con base en su potencial positivo en el mantenimiento de la salud humana, la ficocianina de *A. plantensis* se aprobó para uso alimentario en los Estados Unidos y en la Unión Europea en 2013 y 2014, respectivamente. A partir de ese momento, el interés en las aplicaciones de ficocianina se incrementó.²¹ Sin embargo, la obtención de ficocianina mediante *A. plantensis*, conllevan una serie de problemáticas que dificultan su producción, por ejemplo: la productividad de biomasa de este organismo está determinada por el suministro de luz. Debido a que la luz solo penetra unos cuantos centímetros superiores de los estanques abiertos (que se encuentran expuestos al ambiente), no penetra a las células de las capas inferiores, donde la productividad de ficocianina es cercana a cero, además, las células cerca de la superficie del cultivo pueden experimentar altas intensidades de luz, sobrecargando los centros de reacción, obteniendo bajas eficiencias fotosintéticas, y daño fotooxidativo provocado por la luz solar lo que produce fotoinhibición.

| Organismo | Condiciones | P _{max} (g L ⁻¹ d ⁻¹) | P _{C-PC} (g L ⁻¹ d ⁻¹) | Reactor | Referencia |
|-----------------------|--------------|--|---|--------------------|--|
| <i>A. plantensis</i> | Autotrofia | 0.15 | 0.01 | Estanque | Pushparaj <i>et al.</i> ²² |
| <i>A. plantensis</i> | Autotrofia | 0.32 | 0.024 | Estanque | Pushparaj <i>et al.</i> ²¹ |
| <i>A. plantensis</i> | Autotrofia | 1.32 | 0.092 | Reactor tubular | Carlozzi <i>et al.</i> ²³ |
| <i>A. plantensis</i> | Autotrofia | 0.91 | 0.064 | Columna de burbuja | Zitelli <i>et al.</i> ²⁴ |
| <i>G. sulphuraria</i> | Heterotrofia | 14.5 | 0.47 | Cultivo alimentado | Graverholt <i>et al.</i> ¹¹ |
| <i>G. sulphuraria</i> | Heterotrofia | 50 | 0.86 | Quimiostato | Eriksen <i>et al.</i> ¹¹ |
| <i>G. sulphuraria</i> | Autotrofia | 0.2 | 0.015 | Quimiostato | Graciani <i>et al.</i> ²⁵ |
| <i>G. sulphuraria</i> | Mixotrofia | 8.3 | 0.15 | Matraces | Shmidt <i>et al.</i> ¹⁰ |

Tabla 2-I. Comparación en la producción de biomasa y ficocianina entre *A. plantensis* y *G. sulphuraria*.

²⁰ Sarian FD, Rahman DY, Schepers O, van der Maarel. *PLOS ONE*, **2016**, 11(2)

²¹ Eriksen NT, *J Nutr Food Sci.* **2016**, 6:3.

²² Pushparaj, B., Pelosi, E., Tredici, M.R. *et al. J. App Phycol* **1997**, 9, 113–119.

²³ Carlozzi P. *Biotechnol and bioeng*, **2003**, 81(3), 305–315.

²⁴ Zittelli, G.C., Tomasello, V., Pinzani, E. *et al. J Appl Phycol*, **1996**, 8, 293–301.

²⁵ Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V. *et al. Food & function*, **2013**, 4(1), 144-152.



Interesantemente, *G. sulphuraria* es una alternativa para la producción de ficocianina. A pesar de que el contenido específico de ficocianina en *G. sulphuraria* 074G cultivada en condiciones heterotróficas es considerablemente menor que en *A. plantensis*, las productividades de biomasa de hasta $50 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ que alcanza *G. sulphuraria* y la selección de variantes de cepas pigmentadas (como la 074G-G1 o 074G-G2)²¹ da como resultado una productividad de ficocianina tan alta como $0.86 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, aproximadamente diez veces mayor que en los cultivos de *A. plantensis*. Además, otras características que hacen a *G. sulphuraria* un buen modelo para la producción de ficocianina son las siguientes: no acumula productos metabólicos inhibitorios del crecimiento como ácido acético. Como en el caso de *E. coli*. Las condiciones ácidas de los cultivos disminuye el riesgo de contaminación de otros microorganismos como protozoarios o bacterias permitiendo alcanzar producciones heterótrofos se mantengan axénicos incluso a gran escala; esta cualidad permite que la ficocianina sea un producto más seguro en alimentos, nutraceúticos y productos farmacéuticos que la ficocianina de cultivos no axénicos de estanque abierto.²⁶ Por lo cual, la gran productividad de biomasa que posee *G. sulphuraria* en condiciones heterotróficas o mixotróficas le provee la cualidad de alcanzar producciones de ficocianina en 1 o 2 órdenes de magnitud mayor que los reportados para cultivos fotoautotróficos de *A. plantensis*.¹¹ (**Tabla 2-I**).

²⁶ Eriksen NT. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2008**, 80 (1): 1-14.



1.3 Aplicaciones de la ficocianina

La ficocianina es un pigmento que ha llamado la atención de la comunidad científica, es proteínico, no tóxico y soluble en agua. Posee propiedades antioxidantes, fluorescentes y cromóforas, exhibiendo efectos antiinflamatorios, hepatoprotectores y neuroprotectores. Adicionalmente a estos beneficios, el interés actual de la ficocianina es debido a su valor nutricional como una proteína y a sus propiedades terapéuticas, que incluyen propiedades anticancerígenas.^{27,28} Además tiene aplicaciones como colorante natural en nutraceuticos, cosméticos y dentro de la industria biotecnológica, **Figura 4-I.**²⁹

Su actividad antioxidante se debe a su capacidad de capturar radicales libres del ambiente celular y reaccionar con otros oxidantes de relevancia patogénica. Las especies reactivas del oxígeno son la mayor causa de procesos de importancia patológica como la inflamación, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, aterosclerosis, cáncer y procesos de envejecimiento.^{30,31} Algunos mecanismos que han sido propuestos para explicar cómo la ficocianina estabiliza las especies

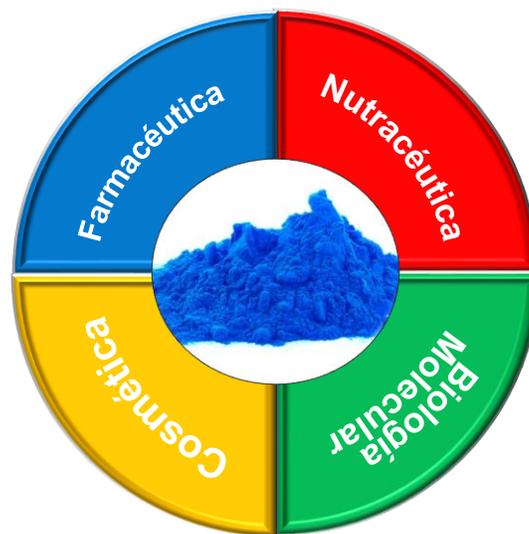


Figura 4-I. Disciplinas donde la ficocianina ha generado mayor impacto por su importancia económica.

²⁷ Fernandez-Rojas B, Hernaández-Juaárez J, Pedraza-Chaverri J. *J Funct Foods*, **2014**,11:375–392.

²⁸ Hussein MMA, Ali HA, Ahmed MM. *Pestic Biochem Physiol*, **2015**, 119:28–32

²⁹ M. Kuddus, P. Singh, G. Thomas, Awdah Al-Hazimi. *BioMed Research International*, **2013**, 742859.

³⁰ Romay C, González R, Ledón N, et al. *Curr Protein Pept Sci*, **2003**, 4:207– 216.

³¹ Durackova Z. *Physiol Res*, **2010**, 59(4):459–469



reactivas de oxígeno, han demostrado que las subunidades de la ficocianina están involucradas en este proceso.³²

En la industria alimentaria, la ficocianina se usa principalmente como un colorante natural, reemplazando a colorantes artificiales dañinos para la salud, un estudio elaborado por McCann y colaboradores demostró una relación entre el trastorno por déficit de atención y los colorantes artificiales consumidos por humanos.³³ Desde su aprobación por la administración de drogas y alimentos de Estados Unidos para ser usado en la industria alimentaria, la demanda de este pigmento se incrementó, especialmente en Norteamérica y Europa, porque no es tóxico, carcinogénico, y es biodegradable.³⁴ Los costos de la ficocianina pueden alcanzar de 160 a 180 dólares por Kg. Actualmente, algunas bebidas alcohólicas, goma de mascar, productos a base de leche como helados y postres, incluyen ficocianina.³⁵

La ficocianina también se usa como un marcador fluorescente porque una de sus características es la absorción y le emisión de luz debido a que tiene un alto coeficiente cuántico, gran fotoestabilidad y es soluble en agua y el costo de marcadores fluorescentes a base de ficocianina puede alcanzar 152.5 dólares/mg.³⁶ Precio que es varias órdenes de magnitud mayor con respecto a ficocianina a ficocianina menos pura. Esta molécula tiene muchas aplicaciones, por ejemplo: la ficocianina puede unirse con moléculas de actividad biológica específica como inmunoglobulinas, proteína A, biotina y avidina. Un importante uso para esta proteína fluorescente es en la técnica de células individuales a través del clasificador de separación de células activado (FACS por sus siglas en inglés). La ficocianina también es útil en muchas otras técnicas como marcadores en electroforesis, microscopia de fluorescencia, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH por sus siglas en inglés) y marcaje de proteínas, anticuerpos y ácidos nucleicos.³⁷

³² Pleonil P, Soogarun S, Suwanwong Y. *Int J Biol Macromolec*, **2013**, 60:393–398

³³ McCann D, Barrett A, Cooper A, et al. *Lancet*, **2007**, 370:1560–1567.

³⁴ Venila CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. *Process Biochem*, **2013**, 48:1065–1079.

³⁵ Christaki E, Bonos E, Florou-Paneri P.: Kim SK (ed.) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, London, UK, 2015.

³⁶ Kathiravan A, Chandramohan M, Renganathan R, Sekar S. *J Mol Struct* **2009**, 919:210–214.

³⁷ Sekar S, Chandramohan M. *J. App. Phycol*, **2008**, 20(2):113–136.



2. Ficobilisoma: un complejo captador de luz de algas rojas.

Universalmente los organismos fotosintéticos oxigenados, contienen dos centros de reacción distintos, el p700 y p680 del fotosistema I y el fotosistema II, respectivamente. Cada centro de reacción está asociado con una antena de complejos de proteínas y pigmentos de recolección de luz conocida como el complejo cosechador de luz, donde una molécula de clorofila a, es la biomolécula que funciona como pigmento del centro de reacción universal.³⁸ Sin embargo, el complejo cosechador de luz dentro de las cianobacterias, algas rojas, y Glaucophytas están formados a partir de ficobilisomas (PBS). Los ficobilisomas son antenas de recolección de luz del fotosistema, que están constituidos por moléculas clave de pigmentos fotosintéticos conocidas como ficobiliproteínas (proteínas de colores intensos) que forman parte de una familia homogénea de proteínas de captación de luz que absorben la radiación visible en el rango de 450 a 670 nm, transfiriendo energía de excitación con alta eficiencia cuántica hacia los fotosistemas I y II.³⁹ La calidad de la radiación incidente y la transferencia de energía involucrada en la recolección de luz hace que los ficobilisomas hayan evolucionado en los organismos que los poseen, para ganar cierta capacidad de sobrevivir en una amplia gama de entornos, incluidas diferentes profundidades del mar y agua dulce. Muchas cianobacterias reaccionan a un cambio en la calidad de luz, remodelando la composición de su antena de tal manera que cambia la proporción de las ficobiliproteínas en ficobilisoma, en relación con el tipo de luz disponible y su intensidad.⁴⁰ Los ficobilisomas (**Figura 1-II**) son complejos supramoleculares compuestos por una subestructura central, y barras periféricas proteicas, que pueden llegar a representar hasta el 60% de la proteína soluble total en una célula. El peso de esta estructura depende del género y especie; por lo cual esta estructura

³⁸ Bearden AJ, Malkin R. *Q Rev Biophys.* **1974**,7 (2): 131-77.

³⁹ McConnell MD, Koop R, Vasil'ev S, Bruce D. *Plant Physiol.* **2002**, 130 (3): 1201-12.

⁴⁰ Kehoe DM. *Proc Natl Acad Sci.* **2010**, 107 (20): 9029-30.

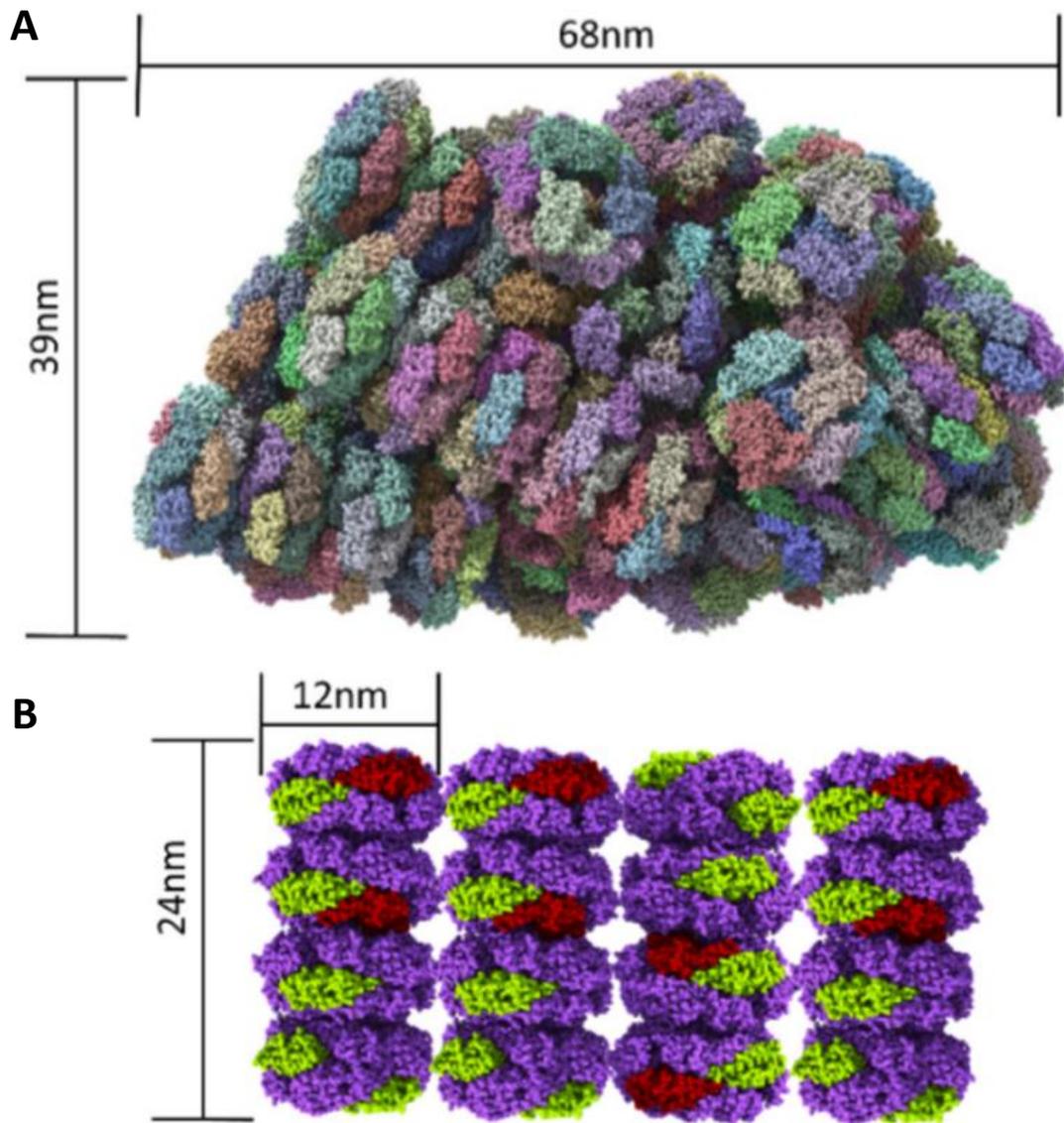


Figura 2-II. Estructura del ficobilisoma. A. La estructura del ficobilisoma de 16.8 MDa de *G. pacifica* (código PDB 5Y6P). Cada color representa a diferente una subunidad de la ficobiliproteína. Los centros de reacción unidos a la membrana se encontrarían directamente abajo del ficobilisoma, la tercera dimensión del PBS (en el plano del papel) es de 45nm. B. Barras periféricas del PBS de *Acaryochloris marina*. Las barras periféricas del PBS se componen de hexámeros que contiene ficocianina, en una sola varilla (1.2 MDa). Las subunidades verde y roja representan las subunidades α y β respectivamente. (código PDB 500K).⁴³

⁴³ Zhang, J., Ma, J., Liu, D. *et al. Nature*, **2017**, 551, 57–63.



A nivel funcional, las ficobiliproteínas son un grupo de proteínas pigmentadas y según su color, se pueden dividir en tres grupos principales: (1) Ficoeritrina de alta energía (PE - rosa brillante - λ_{max} 540-570 nm), (2) ficocianina de energía intermedia (PC - azul cobalto oscuro - λ_{max} 610-620 nm), y (3) aloficocianina de baja energía (AP - azul agua más brillante - λ_{max} 650-655 nm). Los espectros de absorción visibles y de emisión de fluorescencia (**Figura 3-II**) de las ficobiliproteínas están determinados por el cromóforo tetrapirrol y por el entorno en el que se encuentran.

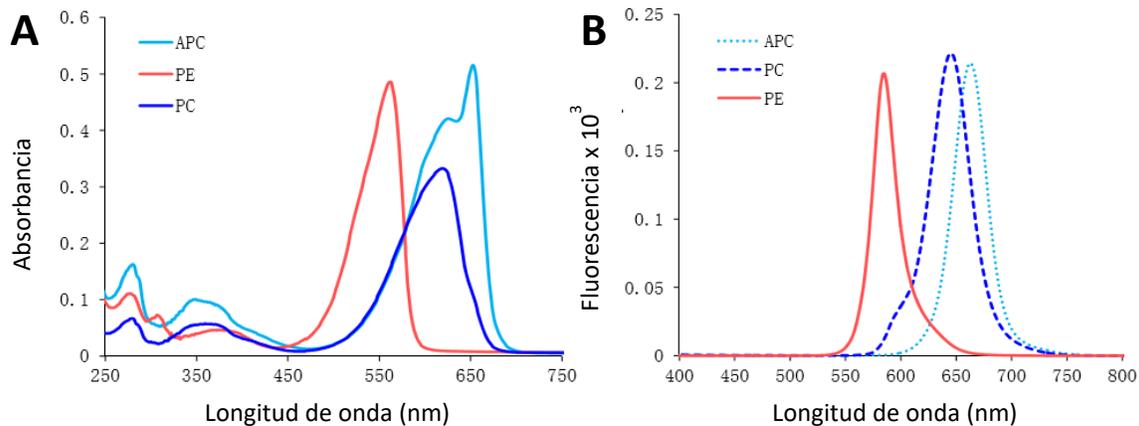


Figura 3-II. Espectros de fluorescencia (A) y UV-visible (B) de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina aislada de *Lyngbya sp.* A09DM.⁴²

Las ficobiliproteínas son proteínas diméricas $\alpha\beta$ (**Figura 4-II**), donde α y β son dos subunidades de una misma ficobiliproteína y cada una de las subunidades está codificada por un gen distinto que se encuentran presentes generalmente en un operón. Las subunidades α y β tienen una longitud uniforme que va de entre los 160 y los 180 residuos de aminoácidos. Estas subunidades se oligomerizan para formar discos hexaméricos y triméricos, que además participan en la construcción de las barras periféricas y de la estructura nuclear del ficobilisoma. Dependiendo del tipo de ficobiliproteína, es la cantidad y el tipo ficobilina de que posee cada subunidad, como se presenta a continuación en la **Tabla 1-II**.⁴⁴

⁴⁴ Kikuchi H, Wako H, Yura K, Go M, Mimuro M. *Biophys J.* **2000**, 79 (3): 1587-600.

| Biliproteínas | Cromoforo | Subunidades | No. De cromóforos en una subunidad | | |
|---------------------------------|--|-------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|
| | | | α | β | γ |
| C-ficoeritrina (C-PE) | Ficoeritrobilina (PEB) | $\alpha_6\beta_6$ | 2 | 3 o 4 | N/A |
| B-ficoeritrina (B-PE) | Ficoeritrobilina (PEB) | $(\alpha\beta)_n$ | 2 | 4 | N/A |
| B-ficoeritrina (B-PE) | Ficoeritrobilina (PEB) y Ficourobilina (PUB) | $\alpha_6\beta_6\gamma$ | 2PEB | 4PEB | 2PEB y 2PUB |
| C-ficocianina (C-PC) | Ficocianobilina (PCB) | $\alpha_6\beta_6$ | 1 | 2 | N/A |
| R-ficocianina (R-PC) | Ficocianobilina (PCB) y Ficoeritrobilina (PCB) | $\alpha_3\beta_3$ | 1PCB | 1PCB y 1PEB | N/A |
| Ficoeritrocianina (PEC) | Ficobiliviolina (PXB) y Ficociabobilina (PCB) | $\alpha_3\beta_3$ | 1PXB | 2PCB | N/A |
| Aloficocianina (APC) | Ficocianobilina (PCB) | $\alpha_3\beta_3$ | 1 | 2 | N/A |
| B-Aloficocianina (B-APC) | Ficocianobilina (PCB) | $\alpha_3\beta_3$ | 1 | 1 | N/A |

Tabla 1-II. Diversidad de ficobiliproteínas, número de cromóforos por subunidad y cantidad de subunidades por complejo.

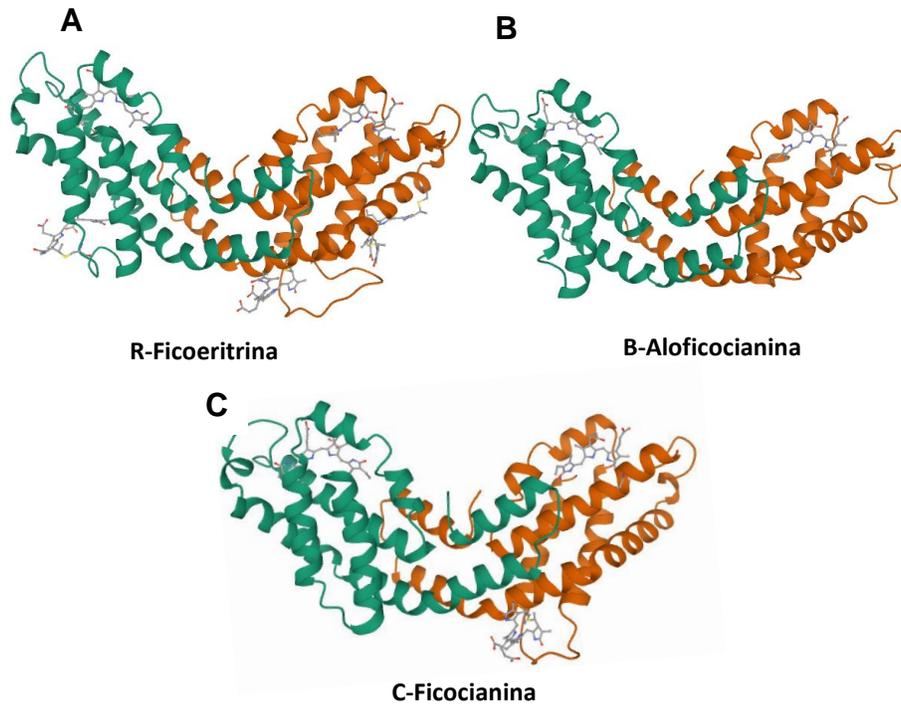


Figura 4-II. Estructuras cristalográficas de las ficobiliproteínas principales. La subunidad α se encuentra en verde y la subunidad β en naranja. A. Estructura tridimensional de la R-Ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata* (código PDB 1L1A) donde se observa que 3 ficobilinas están unidas a la subunidad α y tres a la subunidad β .⁴⁵ B Estructura tridimensional de la B-Aloficocianina de *A. plantensis* (código PDB 1ALL) donde se observa que existe solo una ficobilina unida covalentemente a cada subunidad.⁴⁶ C. Estructura tridimensional de la C-Ficocianina de *Cyanidium caldarium* (código PDB 1PHN) donde se muestra que en la subunidad α tiene una ficobilina unida y tiene 2 en la subunidad β .⁴⁷

⁴⁵ Chang, W. R., Jiang, T., Wan, Z. L., Zhang, J. P., Yang, Z. X., & Liang, D. C. *J. Mol Biol*, **1996**, 262(5), 721–731.

⁴⁶ Brejc, K., Ficner, R., Huber, R., & Steinbacher, S. *J. Mol Biol*, **1995**, 249(2), 424–440.

⁴⁷ Stec, B., Troxler, R. F., & Teeter, M. M. *J. Biophysical*, **1999**, 76(6), 2912–2921.



2.1 La luz regula la expresión del ficobilisoma.

Como organismos fotótrofos, las cianobacterias y las algas rojas dependen en gran medida de la luz como fuente de energía (siempre y cuando no exista fuente de carbono para microorganismos heterótrofos facultativos), y de información sobre los cambios en el medio ambiente ya que dependiendo de la intensidad o calidad de la luz el alga puede remodelar su ficobilisoma para adaptarse a las condiciones que la rodean. Como se ha mencionado anteriormente, la luz puede tener efectos nocivos, especialmente bajo irradiación excesiva y bajo cualidades de luz desfavorables, como la luz ultravioleta o azul. Las cianobacterias y algas rojas pueden alterar el contenido absoluto del pigmento, las características espectrales de sus antenas de captación de luz, y no menos importante la relación PSI y PSII. Se sabe que existe una estrecha relación entre los cambios en el perfil de expresión génica y la respuesta de aclimatación en el cambio a luz alta. Cuando se presenta un exceso en la radiación luminosa los genes involucrados en la síntesis de los aparatos fotosintéticos entre estos *cpc* y *apc* (encargados en la producción de ficocianina y aloficocianina, respectivamente), que codifican para las subunidades de los ficobilisomas y los genes *hem*, que codifican para las enzimas que llevan a cabo la biosíntesis del grupo hemo (precursor directo de las ficobilinas), se reprimen para reducir la capacidad de captación de luz.⁴⁸

Estudios filogenéticos han demostrado que las proteínas RpaB, y Hik33 están conservados en diferentes especies de cianobacterias y en los cloroplastos de algas rojas. RpaB es un regulador de respuesta de unión a DNA de tipo OmpR y Hik33 es una histidin-cinasa que actúa como un sensor múltiple de estrés que regula la expresión de una variedad de genes involucrados en el proceso de fotosíntesis durante la exposición a luz alta^{49,50}

⁴⁸ Muramatsu, M. y Hihara, Y. *J Plant Res.* **2012**, 125: 11 – 39.

⁴⁹ M.K. Ashby, J. Houmard. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2006**, 70: 472-509,

⁵⁰ K. Tanaka *Frontiers in Physiological and Molecular Biological Research*, Nova Scien **2012**, pp. 39-60



Se ha sugerido que un sistema de dos componentes regula la expresión de los genes involucrados en la captación de luz (**Figura 5-II**), donde Hik33 mantiene una forma activa en condiciones de poca luz y lleva a cabo un efecto de inhibición tras la exposición a luz alta provocando un cambio en la expresión génica. Existe evidencia de que la pérdida de RpaB de los genomas, está relacionada con la pérdida del ficobilisoma en la cianobacteria *Synechosystis* sp.³⁰

La forma en la que Hik33 regula los genes involucrados en el proceso de fotosíntesis empieza cuando esta histidin-cinasa detecta la señal de poca luz a través de su dominio de entrada de señal, promoviendo que un residuo de histidina altamente conservado de la histidin-cinasa se autofosforile, utilizando ATP como donante de fosfato. Posteriormente, el grupo fosfato es transferido específicamente al residuo de aspartato del dominio receptor de la proteína regulador de respuesta (RpaB). Esta proteína, en su estado fosforilado, se une a regiones promotoras HLR1 de determinados genes mediante el dominio de unión a DNA, promoviendo la transcripción de genes involucrado en el evento de fotosíntesis en cianobacterias.⁵¹ Como resultado de esta modificación en la expresión génica, las células modifican ciertas características que le permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Eventualmente, las condiciones del medio volverán a cambiar, y la señal activadora de sistema en cuestión estará ausente.

Bajo condiciones de estrés por luz alta, la histidin-cinasa Hik33 dejará de estar activa como cinasa, y la proteína reguladora de respuesta fosforilada (RpaB-P) perderá el grupo fosfato, inactivándose como regulador transcripcional. La proteína Hik33 en ausencia de señal, adquiere una actividad fosfatasa específica de su regulador de respuesta.^{52,53}

⁵¹ Wilde A, Hihara Y. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2016**, 1857:296–308.

⁵² Mikami, Y. Kanesaki, I. Suzuki, N. Murata. *Mol. Microbiol.* **2002**, 46: 905-915

⁵³ A.M. Stock, V.L. Robinson, P.N. Goudreau. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69: 183-215,

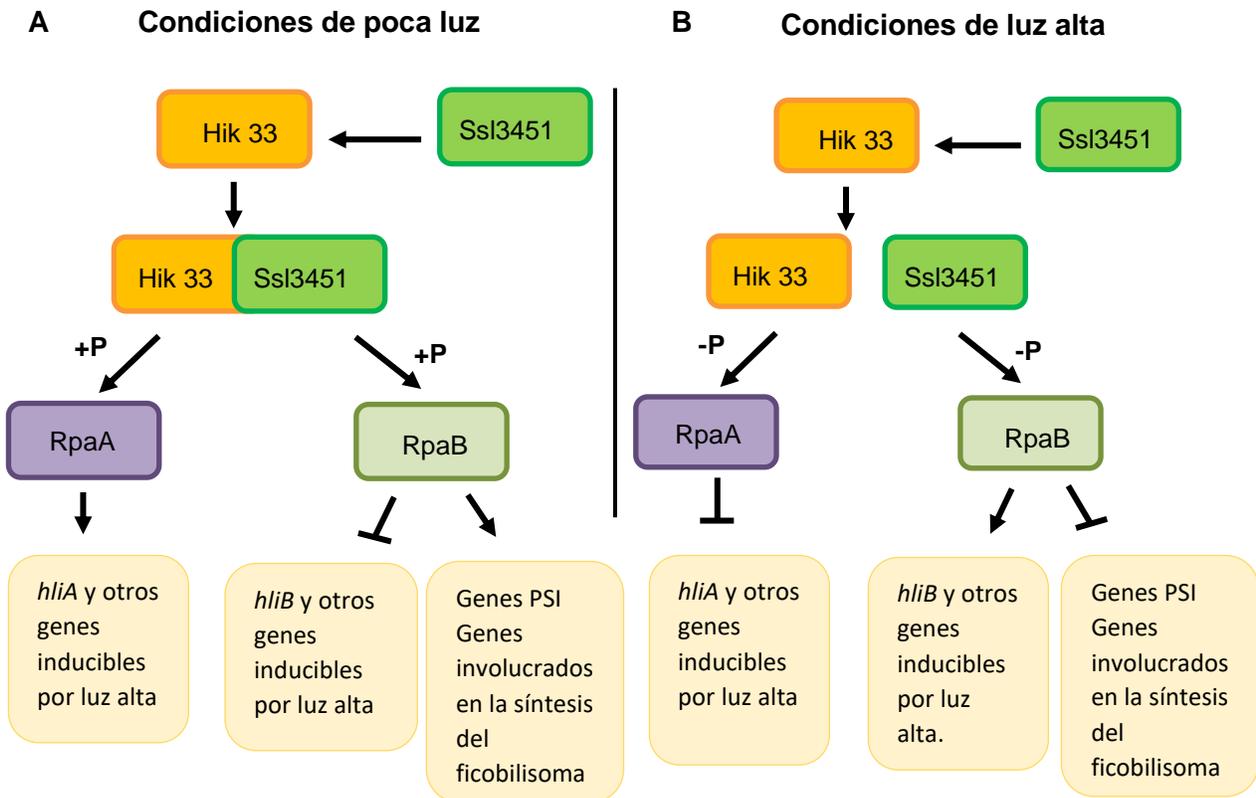


Figura 5-II. Regulación de la expresión de genes fotosintéticos mediante el sistema de dos componentes en *Synechocystis* sp. 6803. A. En condiciones de poca luz, se lleva a cabo la expresión de proteínas del fotosistema y del aparato captador de luz que es el ficobilisoma en *Synechocystis* sp., debido a que Hik33/Ssl3451 fosforila a RpaB que promueve la expresión de estos genes. B. En condiciones de luz alta. Hik33 y Ssl3451 no interactúan y no fosforilan a RpaA, ocasionando que se lleve a cabo la síntesis de proteínas (*hliA*, B y otras), que ayudan a la disminución de especies reactivas promovidas por el estrés a la alta luz, y a su vez se reprime la síntesis de proteínas que forman al ficobilisoma.



2.2 La degradación de los ficobilisoma, un proceso inducido por la privación de nitrógeno.

En cianobacterias y en algas rojas hay muchos factores que tienen un efecto indirecto en la fotosíntesis como la cantidad de luz, pH, temperatura, concentración de solutos, etc. Debido a que la fotosíntesis genera energía y poder reductor (en forma de NADPH y FADH₂) para llevar a cabo procesos metabólicos y para llevar a cabo la regulación de ciertos procesos como el mecanismo de concentración del carbono, por lo cual, la variación en alguno o varios de estos elementos podría traer diversas consecuencias a la célula.

Un proceso que afecta de manera drástica al metabolismo es la limitación de nutrientes. En cianobacterias y algas rojas es el estrés nutricional que es ocasionado por la limitación de nitrógeno, carbono, hierro y CO₂ tiene un impacto indirecto en la fotosíntesis. Sin embargo, la limitación de nitrógeno es la que afecta de manera más importante, debido a que la falta de este macronutriente tiene un efecto específico sobre los ficobilisomas, que son los encargados de llevar a cabo la recolección de fotones para suministrar la energía proveniente de la luz hacia los fotosistemas y por ende al sistema foto respiratorio. Esto es ocasionado porque las ficobiliproteínas constituyen más del 50% de la proteína soluble total y por lo tanto es el reservorio más importante de nitrógeno en una célula como se mencionó anteriormente.^{54 55,56} A continuación se detalla este proceso.

2.3 La degradación de los ficobilisomas un proceso mediado por NbIA y ClpC.

La primera evidencia que se tiene acerca del papel de NbIA en la degradación del ficobilisoma se describió por Grossman y col. (1994).⁴⁶ Se observó que las mutantes de cianobacterias que carecen de esta proteína no degradaban prácticamente

⁵⁴ Collier JL, Grossman AR. *EMBO J.* **1994**, 13 (5): 1039-47.

⁵⁵ Bienert R, Baier K, Volkmer R, Lockau W, Heinemann U. *J Biol Chem.* **2006**, 281: 5216 – 5223.

⁵⁶ Sendersky E, Kozer N, Levi M, Garini Y, Shav-Tal Y, Schwarz R. *Plant J.* **2014**, 79: 118 - 126



ninguno de sus ficobilisomas en condiciones por limitación de nitrógeno. Por lo tanto, exhiben un fenotipo no blanqueador, es decir, no hay degradación de los principales pigmentos fotosintéticos como ficobiliproteínas, clorofila o carotenos dentro de las cianobacterias. La función de NblA ha sido objeto de numerosos estudios y con experimentos de unión, se ha demostrado que NblA, interactúa con las subunidades α de las ficobiliproteínas. En experimentos de pull-down, se descubrió que NblA se une específicamente a la proteína ClpC, una proteína chaperona HSP100 asociada a la proteasa Clp (**Figura 6-II**), de manera dependiente de ATP. Este resultado condujo a proponer un modelo de degradación de los ficobilisomas en el que NblA, actúa como una proteína adaptadora a la proteasa Clp. Los complejos de degradación de proteínas Clp consisten en dos elementos funcionales: un núcleo proteolítico en forma de cilindro que consta de dos anillos heptaméricos y, una chaperona AAA+ hexamérica que es responsable del reconocimiento del sustrato, desdoblamiento y el enhebrado de la cadena de polipéptidos que se extiende a través de un poro estrecho hacia el compartimento de la proteasa.⁵⁷ La especificidad del sustrato que posee una proteasa Clp está determinada por su chaperona acompañante llamada ClpC. El reconocimiento del sustrato por la chaperona ClpC está determinado por un tercer participante llamado proteína adaptadora. Las proteínas adaptadoras unen simultáneamente al sustrato y a la proteína chaperona, formando así un complejo ternario que provoca la degradación del sustrato y de la proteína adaptadora. En otras palabras, las proteínas adaptadoras modulan la especificidad del sustrato para su degradación por la proteasa.

En resumen, la degradación de los ficobilisomas se lleva a cabo mediante el sistema de degradación proteasa Clp, que es inducida por la expresión de la proteína NblA. Debido a que las proteasas de Clp requieren NblA para reconocer ficobilisomas como sustratos, los organismos que carecen de NblA degradan a los ficobilisomas a una velocidad baja, incluso en condiciones de falta de nitrógeno.

⁵⁷ Baier A., Winkler W., Korte T., Lockau W., Karradt A. *J Biol Chem.* **2014**, 289 (17): 11755–11766.

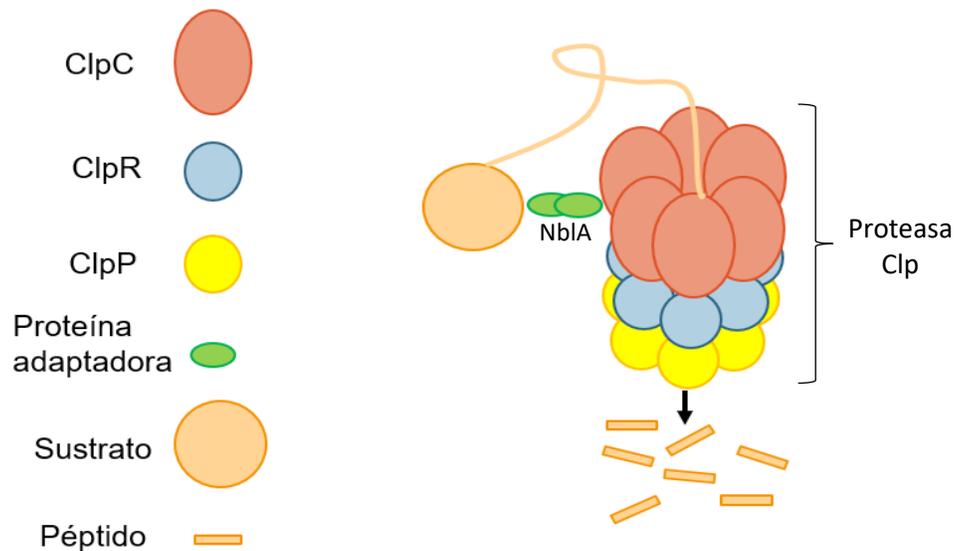


Figura 6-II. Representación de la proteasa Clp. La proteasa Clp es un sistema de degradación de proteínas compuesto por un anillo hexamérico de proteínas chaperonas llamadas ClpC, un anillo heptamérico de proteínas reguladoras ClpR y un anillo heptamérico de proteínas con actividad proteasa llamadas ClpP. La característica principal de la proteasa Clp es que reconoce sus sustratos por medio de proteínas adaptadoras para formar un complejo ternario ClpC-Proteína adaptadora-Sustrato. Sin la proteína adaptadora (NblA) es improbable que ClpC lo reconozca.

2.3 Regulación de la proteína pequeña NblA.

Las proteínas NblA son pequeñas, de aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. La mayoría de las cianobacterias y algas rojas que contienen ficobiliproteínas poseen genes *nbl*. El alineamiento de las proteínas NblA revela una baja homología (aproximadamente 30% de identidad de secuencia en promedio).⁵⁸ Sólo existen tramos cortos de residuos de aminoácidos altamente conservados ubicados cerca de los extremos N y C terminales que están involucrados en la unión de ficobiliproteína y ClpC, respectivamente.³⁵

Se ha descrito que los genes *nbl* o non-bleaching (**Figura 7-II**), determinan el fenotipo blanqueador, en otras palabras, determina la degradación de las ficobiliproteínas en cianobacterias provocando que pasen los cultivos de un color azul verdoso a un color verde-amarillento y uno de ellos codifica para la proteína NblR, que participa que la regulación positiva en la expresión del gen *nblA*. NblR actúa como un regulador de respuesta de un solo componente. Para que NblR

⁵⁸ Dines M., Sendersky E., David L., Schwarz R., Adir N. *J Biol Chem.* **2008**, 283 (44): 30330-40.

participe se ha descrito que la regulación transcripcional del gen *nblA* se lleva a cabo mediante el siguiente proceso: inicialmente existe una interacción de una proteína denominada SipA con NblS en condiciones normales (sin ningún tipo de estrés), RpaB es fosforilada por el dúo SipA/NblS permitiendo a RpaB-P unirse directamente a secuencias de repetidos imperfectos de A/T compuestos por dos octámeros llamados HLR1 (secuencias reguladores de luz alta 1) que se encuentra en la región promotora del gen *nblA* reprimiendo su transcripción. En contraparte, cuando existen condiciones de inanición por nitrógeno, NblS se convierte en una fosfatasa inducida por estrés, que da como consecuencia la desfosforilación de RpaB-P, este evento permite la disociación de RpaB de la región HLR1. La región promotora que ahora queda libre, permitiendo que el regulador de la transcripción positiva NblR unirse al promotor del gen *nblA*, promoviendo la transcripción en un mecanismo que aún no está muy bien elucidado.⁵⁹

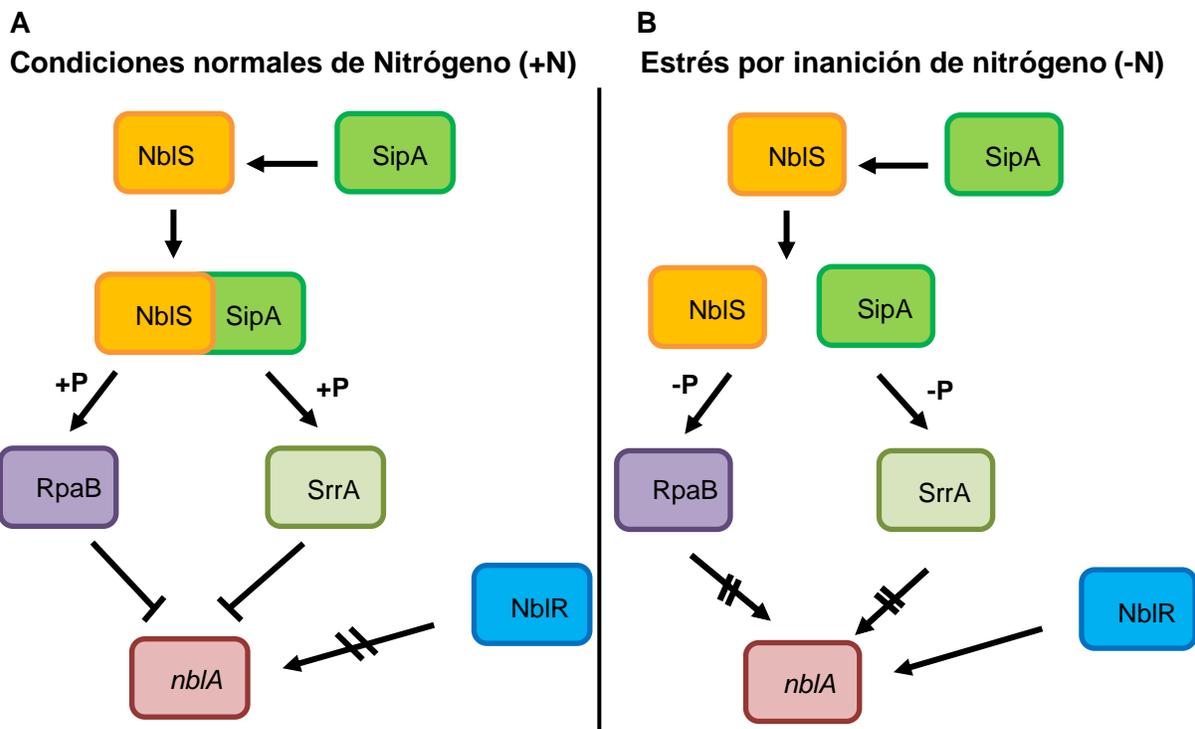


Figura 7-II. Diagramas que muestran la regulación de la expresión del gen *nblA* por sistemas de dos componentes en *S. elongatus*. A. La expresión del gen *nblA* está impedida debido a las condiciones de nitrógeno en el medio presentes provocando que NblS/SipA fosforilen a RpaB y SrrA uniéndose a sitios HLR1 e impidiendo que la proteína NblR un factor transcripcional activador de *nblA*, se una al gen. B. En condiciones de inanición por nitrógeno la proteína NblS no presenta su actividad cinasa, provocando que RpaB y SrrA no se activen, promoviendo finalmente la transcripción de *nblA* por medio del factor transcripcional NblR.

⁵⁹ Kato H, Chibazakura T, Yoshikawa H. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2008**, 72 (4): 1072-9.



2.4 *Galdieria sulphuraria* presenta blanqueamiento bajo inanición por nitrógeno.

Se ha descrito, que en *G. sulphuraria* la ficocianina se degrada en condiciones de inanición por nitrógeno. Sintanova y colaboradores (2006) demostraron que *G. sulphuraria* sufre cambios en su ultraestructura celular inducida por deficiencia de nitrógeno.⁶⁰ Particularmente, la estructura cloroplástica a partir del primer día de inanición se observó que el área promedio del cloroplasto disminuye, es decir, el tamaño del cloroplasto se redujo. Además, el estrés inducido por la limitación de nitrógeno produjo un cambio en la coloración de las células, propiciado que cambiara de un azul-verdoso (al comienzo del primer día en el cultivo) a marrón-verdoso (en el séptimo día). La suspensión se volvió a un verde-amarillento y después de 14 días de cultivo perdió básicamente su color. La **Figura 8-II** presenta el espectro de absorción de células de la cepa IPPAS P-513 que crecen autotróficamente en medio nutritivo. Los máximos a 436 y 678 nm pertenecen a la clorofila; a 640 nm, a C-ficocianina; el máximo a 464 y un hombro a 480 nm pertenecen a varios carotenoides. Algunos cambios en el espectro de absorción ocurrieron apenas después de un día de inanición de nitrógeno. Después de 16 horas, se notó una disminución en el máximo de C-ficocianina. Después de 24 horas esta disminución fue evidente. Los cambios en los espectros de absorción de la suspensión bajo deficiencia de nitrógeno indican una disminución de la acumulación de C-ficocianina y su degradación apenas después del primer día de inanición. Al tercer día, solo se observaron trazas de C-ficocianina y los carotenoides se hicieron menos pronunciados.

A pesar de este estudio realizado en 2006, en la actualidad no hay evidencia que implique la actividad de la proteína NblA en la degradación de las ficobiliproteínas en condiciones de estrés por falta de nitrógeno en algas rojas. Sin embargo, se ha reportado hasta el momento la existencia de este gen en diferentes especies

⁶⁰ Sintanova MP, Markelova AG, Los DA. *Russ. J. Plant. Phys.* **2006**, 53(2); 153-162.



(macroscópicas y microscópicas) pero hasta el momento se desconoce si el gen *nblA* participa en la regulación de degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria*.

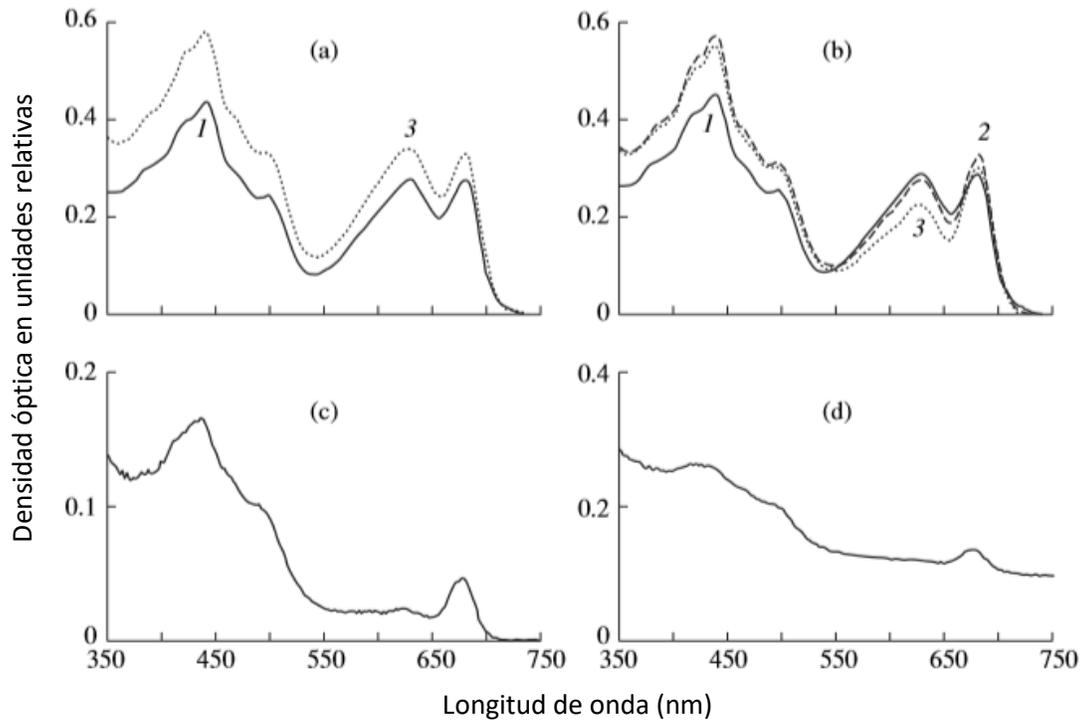


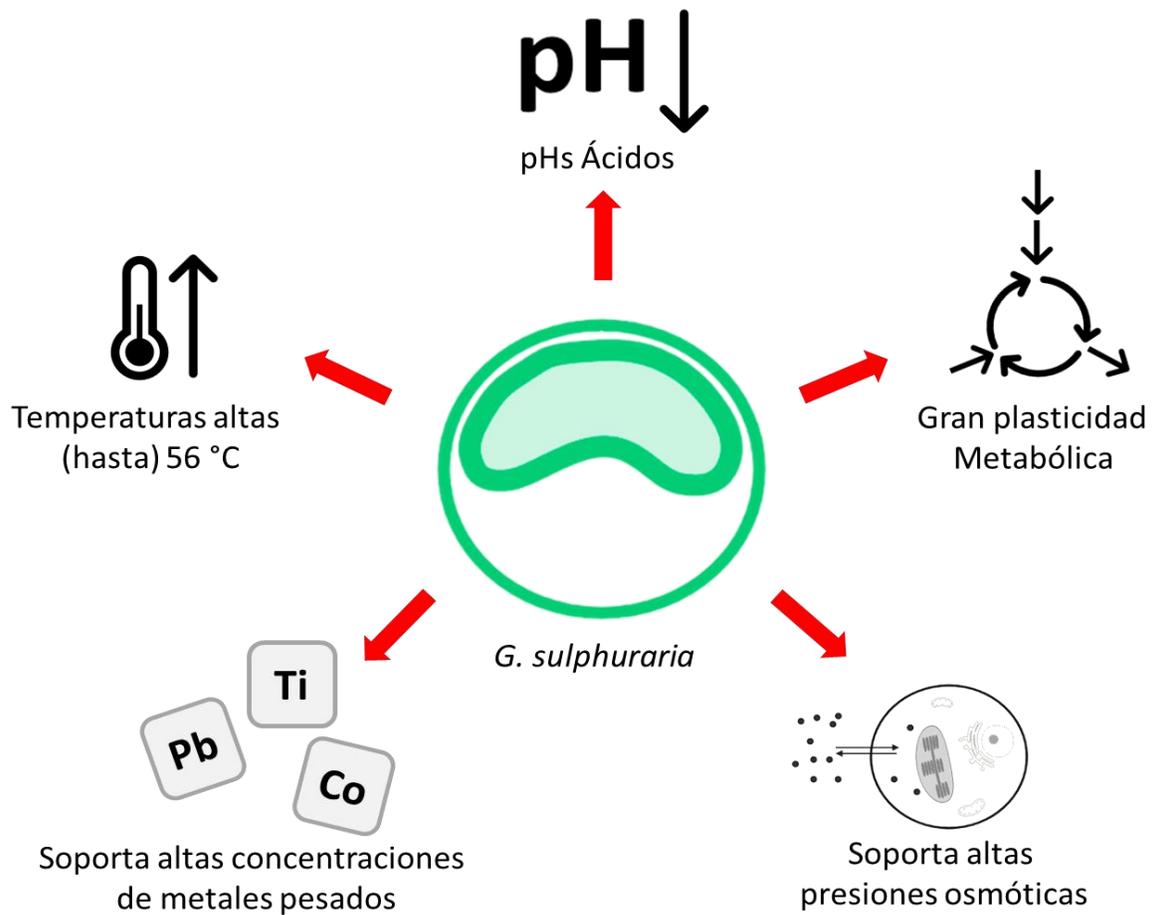
Figura 8-II. Espectro de absorción de la suspensión de *G. sulphuraria* en varios estadios de la inanición por nitrógeno. **A.** primer día en medio con nutrientes completos. **B.** el primer día bajo inanición por nitrógeno. **C.** tercer día bajo inanición por nitrógeno **D.** día 14 bajo inanición por nitrógeno. La línea punteada representa tiempo 0. La línea discontinua representa 16h después del inicio del cultivo. Línea punteada representa tiempo 24h después al tiempo 0.⁵⁹



3. Análisis de la degradación de ficocianina en *G. sulphuraria*

3.1 Planteamiento del problema.

El espectro tan amplio de aplicaciones prácticas que posee la ficocianina dentro de las diferentes áreas industriales ha derivado en una serie de esfuerzos para aumentar la producción de ficocianina en *A. plantensis* (antiguamente llamada *Espirulina*). Sin embargo, el uso de esta cianobacteria trae consigo un número considerable de problemas durante su cultivo por limitaciones que están relacionadas con su bajo rendimiento en biomasa, la dificultad por aumentar su productividad debido a la dependencia de su metabolismo autotrófico y la vulnerabilidad de los cultivos a una posible contaminación. Por lo cual, una parte de la comunidad científica ha propuesto a *G. sulphuraria* como una promesa para llevar a cabo la producción de ficocianina a gran escala, debido a su gran plasticidad metabólica y a las condiciones extremófilas de su cultivo, lo que proporciona diversas ventajas que normalmente no se obtendrían a partir de cultivos utilizando a *A. plantensis*, por ejemplo: son cultivos que pueden obtener una alta densidad de biomasa debido al metabolismo heterotrófico y mixotrófico, la ausencia de producción de metabolitos inhibitorios de crecimiento como ácido acético (como en el caso de *E. coli*) y por último mantienen las condiciones axénicas en la mayoría de los casos, hasta por largos periodos de tiempo. Hasta el momento no se ha llevado un estudio sistemático sobre la acumulación de ficocianina en *G. sulphuraria* y el impacto ocasionado a los cultivos cuando es expuesta a condiciones de estrés por falta de nitrógeno. En principio esta investigación aportará información básica sobre el comportamiento en el título de ficocianina dentro de *G. sulphuraria* en limitación de nitrógeno, pero además podría aportar datos que ayudaran al desarrollo de nuevas estrategias para la acumulación de la ficocianina, la optimización de procesos y la generación de datos que lleven a comprender un poco más acerca del metabolismo de esta microalga y que ha surgido como un referente de microorganismos extremófilos que pueden ser explotados biotecnológicamente.



- 1 Las cualidades extremófilas de pH y temperatura que posee *G. sulphuraria* permite que los cultivos se mantengan libres de microorganismos patógenos que por lo general son mesófilos y neutrófilos lo que permite obtener productos más seguros para el consumo humano.
- 2 La alta capacidad para tolerar presiones osmóticas altas y concentraciones altas de metales pesados permite utilizar una gran cantidad de diferentes tipos de medios, como aguas residuales, aguas que han sido contaminadas por la actividad antropogénica o aguas con altas cantidades de sales lo que permite reducir costos de producción y gasto de agua potable.
- 3 La gran plasticidad metabólica permite el uso de una gran cantidad de diferentes fuentes de carbono, a su vez el crecimiento no solo está limitado por su metabolismo autotrófico sino que podemos acelerar el proceso de producción de biomasa y utilizar compuestos orgánicos provenientes de residuos agroindustriales y alimenticios, aprovechando al máximo los recursos naturales.

Figura 1-III. Principales propiedades de *G. sulphuraria* y sus ventajas como un recurso biotecnológico importante para la obtención de metabolitos de alto valor industrial



3.2 Hipótesis

En condiciones de insuficiencia por nitrógeno, se activará la expresión del gen *nblA* que actuará como proteína adaptadora para la degradación de la ficocianina por medio de la proteasa Clp en *G. sulphuraria*.

3.3 Objetivos

General:

- Analizar la relación entre la degradación de la ficocianina y la acumulación del mensajero de *nblA* en *G. sulphuraria* en condiciones de limitación de nitrógeno.

Particulares:

- ❖ Identificación *in silico* de los genes que conforman el sistema de degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria*.
- ❖ Elegir la cepa de *G. sulphuraria* dentro de la colección del laboratorio en la que se observe mayor degradación en deficiencia de nitrógeno y determinar las condiciones adecuadas para la recolección de muestra para el análisis de *nblA*.
- ❖ Analizar la expresión del gen *nblA* en la cepa seleccionada en condiciones de limitación por nitrógeno.



3.4 Método experimental.

3.4.1 Cepas de *G. sulphuraria* y condiciones de cultivo autotrófico para evaluar cada cepa.

Se emplearon 5 cepas de *G. sulphuraria*, obtenidas comercialmente para las evaluaciones que se muestra en la **Tabla 1-III**. Para la determinación del aumento de la densidad óptica (DO), la concentración celular y la determinación de los colorantes de ficocianina se generó un precultivo, en un volumen de 300 mL contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. El crecimiento se monitoreo durante 20 días, hasta obtener 1 DO₈₀₀, en condiciones de luz continua con intensidad de 140 $\mu\text{mEm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en agitación continua a 150 rpm, 42 °C, pH 2, en un medio mineral que descrito por Gross (1995) que contiene: 1.5 g/L, (NH₄)₂SO₄; 300 mg/L, MgSO₄•7H₂O; 300 mg/L, KH₂PO₄; 20 mg/L, CaCl₂•2H₂O; 20 mg/L NaCl. 1.5 ml de una solución de Fe-EDTA (690 mg de FeSO₄, 930 mg EDTA por 100 mL), 2 mL solución de elementos traza (2.86 g H₃BO₃, 1.82g MnCl₂ •₄H₂O, 220mg ZnSO₄•7H₂O, 30 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 80 mg CuSO₄•5H₂O, 40 mg NaVO₃•4H₂O, 40 mg CoCl₂•6H₂O por litro). Al término del preinóculo se recolectó el volumen necesario para iniciar un nuevo cultivo (cultivos a 1 D.O.₈₀₀ en un volumen de 300mL) de cada cepa, sin nitrógeno ((NH₄)₂SO₄), en las condiciones anteriormente descritas.

| <i>G. sulphuraria</i> (Cepa) | Origen Geográfico | Cepario |
|---------------------------------|-----------------------|---------|
| 5587.1 | Parq. Na. Yellowstone | CCMEE |
| 2919 | Sonoma, California | UTEX |
| 21.92 | Yangmingshan, Taiwan | SAG |
| 107.79 | Sonoma, California | SAG |
| 108.79 | Parq. Na. Yellowstone | SAG |

Tabla 1-III. Cepas de *G. sulphuraria* y fuente de obtención. CCMEE (Culture colección of microorganisms from Extreme Environments, Oregon University), SAG (Culture collection of Algae, Georg-August Universitat Gotteingen,) UTEX (Culture collection of Algae, University of Texas at Austin).



3.4.2 Cultivos Mx y Au de *G. sulphuraria* cepas CCMEE 5587.1 y UTEX 2919 para la evaluación de la degradación de ficocianina.

El experimento se realizó a partir de biomasa generada mixotróficamente (Cultivos **Mx**) fue de la siguiente manera: en un volumen de 300 mL de medio mineral descrito por Gross⁶¹ suplementado con glucosa a una concentración de 10 g/L (cultivo mixotrófico), en condiciones de luz continua con intensidad de $140 \mu\text{mEm}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 150 rpm, a 42 °C, a pH 2, se incubó cada cepa hasta haber alcanzado las 24 h después de haberse agotado la fuente de carbono, la biomasa generada se lavó dos veces con medio mineral sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se centrifugó a una velocidad de 3500 rpm durante 5 min en cada lavado. El experimento se realizó por triplicado con la biomasa previamente lavada; los cultivos se empezaron en condiciones autotróficas con medio mineral completo (con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, condición control, N+) a 1 D.O.₈₀₀ y cultivos en medio mineral sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1 D.O.₈₀₀ (condición experimental, N-), en matraces de 250 mL con un volumen del medio de 150 mL (60% del volumen total del matraz), durante 14 días, en luz continua con intensidad de $140 \mu\text{mEm}^{-2}\text{s}^{-1}$, a 150 rpm, a 42 °C, pH 2.

El experimento se realizó a partir de biomasa generada autotróficamente (Cultivos **Au**) fue de la siguiente manera: la biomasa generada de un cultivo mixotrófico, fue recolectada y transferida a un matraz de 500mL que contenía 300 mL de medio mineral completo durante 7 días en autotrofia, con una intensidad de $140 \mu\text{mEm}^{-2} \text{s}^{-1}$, 150 rpm, 42 °C, pH 2 para establecer el metabolismo autotrófico en el cultivo, al finalizar la biomasa se recolectó y lavo dos veces con medio mineral sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y centrifugada a 3500 rpm 5 min entre cada lavado. Con esta biomasa generada autotróficamente se realizó el experimento por triplicado con N+ y N-.

⁶¹ Gross W., Schnarrenberger C. Plant Cell Physiol. **1995**, 36(4): 633-638.



Figura 2-III. Método de obtención de los cultivos Au y Mx para los experimentos en inanición de nitrógeno.

3.4.3 Evaluación de glucosa en el medio.

La concentración de glucosa en el medio se midió utilizando el equipo YCI, en los matraces suplementados con fuente de carbono, cada 12 horas para cada una de las dos cepas (UTEX1929 y CCMEE 5587.1).

3.4.4 Análisis espectrofotométrico.

La medición de los espectros de absorción (300-800nm) en el cultivo celular se llevó a cabo usando el Espectrofotómetro UV/Vis Thermo. La concentración de C-ficocianina se calculó utilizando la siguiente ecuación reportada por Sanjiv y col.⁶² y utilizara por Moon y col.⁶³ en *G. sulphuraria*: $PC [mg mL^{-1}] = (A_{620} - A_{800} - 0.474(A_{652} - A_{800})) / 5.34$ los valores se normalizaron a 1.00 D.O.₈₀₀ (densidad inicial) para visualizar la degradación de la ficocianina. La concentración de Aloficocianina y Ficoeritrina se calcularon con las siguientes ecuaciones: $APC [mg mL^{-1}] = ((A_{652} - A_{800}) - 0.208(A_{620} - A_{800})) / 5.09$, $PE [mg mL^{-1}] = ((A_{568} - A_{800}) - 2.41(PC) - 0.849(APC)) / 9.62$

3.4.5 Espectroscopia de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia de células completas se determinó en PerkinElmer Fluorescence Spectrometer LS 55. Las ficobiliproteínas se excitaron a 600 nm y las lecturas de emisión fueron tomadas a 652 nm para el caso de la ficocianina y 682 nm para la aloficocianina.⁸⁵

⁶² Mishra, S. K., Shrivastav, A., & Mishra, S. *Protein Expr Purif*, **2011**, 80(2), 234–238.

⁶³ Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Park MS, Yang J. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, 31(3); 490-495.



3.4.6 Conteo celular

El conteo celular se llevó a cabo utilizando la cámara de Neubauer, con una dilución de 1:4 de los cultivos (-N y +N), cada condición se evaluó por triplicado (n=3) y se utilizaron las siguientes ecuaciones:

para evaluar la concentración de células por mililitro de las cepas UTEX 2919 y CCMEE 5587.1 respectivamente.

3.4.7 Peso seco y velocidad de crecimiento

Para la medición de peso celular seco las células fueron primeramente colectadas por centrifugación del medio de cultivo a 3500 rpm durante 5 minutos, después fueron lavadas dos veces con agua destilada y posteriormente fueron secadas a una temperatura de 85 durante 36 h. The peso seco fue calculado en términos de la siguiente ecuación:

$$PS(gL^{-1}) = \left(\frac{(M_2 - M_1)}{v} \right) * 1000$$

La velocidad de crecimiento y la velocidad de aumento o decaimiento de la ficocianina (V) fue calculada en términos de la siguiente ecuación:

$$[A] = [A]_o - kt$$

3.4.8 PCR Punto final

El RNA total se extrajo de un sedimento celular congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. El cDNA se sintetizó a partir de $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total con un cebador de oligo (dT) usando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). La PCR en tiempo final se realizó utilizando una mezcla de reacción de $50\text{ }\mu\text{L}$ que contenían $1\text{ }\mu\text{L}$ de DNA molde, $1\text{ }\mu\text{L}$ de cebadores ($10\text{ }\mu\text{M}$, cada uno; Ver en la tabla). El nivel de RNAm en las respectivas cepas se normalizo con los atos del gen constitutivos Histona 3 (NW_005178409.1). Las condiciones para realizar el PCR se llevaron a cabo a 28 ciclos, 49°C de temperatura de alineamiento, $40''$.



| Cebador | Tamaño | mt | Secuencia |
|------------|--------|----|---|
| NbIA-F | 29 | 50 | ATGAATAAAAACTATAATTCTTATCTTGG |
| NbIA-R | 45 | 49 | TTATTTTAAATTAGTATATTTTATTAAATATTTTAATATATTATC |
| HISTONA3-F | 23 | 60 | ATGGCACGAACAAAACAAACAGC |
| HISTONA3-R | 31 | 62 | ACACTCTCTCGCCTCGGATTCTC |

Tabla 2-III. Cebadores para la ampliación de los genes nbIA y H3 de *G. sulphuraria*.

3.4.9 Geles de proteína SDS- PAGE.

Se utilizaron aproximadamente 75 mL del cultivo del alga, el cultivo se centrifugó a 3000 rpm y el sedimento se resuspendió con 600 μ L de una mezcla de Cell lysis M (Biorad) y se macero con mortero, el homogeneizado se recolectó en un microtubo y se centrifugó a 10000 rpm, se recuperó la fase móvil y se congelo a -70°C . El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford. Cada triplicado se repito dos veces en un gel SDS-PAGE depositando siempre 50 μ g de protetina total por muestra elaborado en una unidad de electroforesis (Multiple Gel Caser, Amsterdam Biosciences) con un gel concentrador al 5% y separado por un gel al 12% de poliacrilamida. La separación fue corrida a un voltaje de 50 V 3.5 horas. Después de la migración las bandas de proteína el gel se tiñó con azul de Coomassie.



3.5 Propuesta general de trabajo.

La propuesta general de trabajo se abordó de la siguiente manera: para estudiar la acumulación de la ficocianina en condiciones -N y su relación con la expresión del gen *nbIA*; primero se realizó un análisis bioinformático a partir de la secuencia de *G. sulphuraria* 074W depositada en NCBI para realizar la búsqueda genómica de los elementos del sistema de dos componentes que activa la transcripción del gen *nbIA* en limitación de nitrógeno (NblA, NblS y NblR, RpbA, SrrA) y los componentes del sistema de degradación de proteínas Clp proteasa (ClpP, ClpR y ClpC).

Después de la identificación, se utilizaron 5 cepas de *G. sulphuraria* que se tienen disponibles en el laboratorio (**Tabla 1-III**) para caracterizar su crecimiento y la señal de fluorescencia emitida por la ficocianina durante 20 días en condiciones -N (condición experimental) y +N (control) con el objetivo de identificar la cepa que acumule más y menos ficocianina respectivamente.

Con las dos cepas seleccionadas (la que acumula más y menos ficocianina) se llevó a cabo un estudio sistemático sobre la acumulación de la ficocianina en cultivos -N y +N. El seguimiento de este pigmento se realizó mediante espectrofotometría y fluorescencia en cultivos por triplicado, con el propósito de elegir el tiempo más apropiado para llevar a cabo la recolección de material biológico y obtener RNA que fue utilizado para la evaluación en la acumulación del transcrito de *nbIA*. Con las condiciones determinadas, se llevó a cabo el perfil de expresión de gen donde se realizó PCR para evaluar la acumulación del transcrito en condiciones -N y +N (**Figura 2.1-III**).

Por otra parte, se realizaron experimentos adicionales para evaluar como afectaba la inanición de nitrógeno a otros pigmentos fotosintéticos como la clorofila a, carotenos, aloficocianina y ficoeritrina.

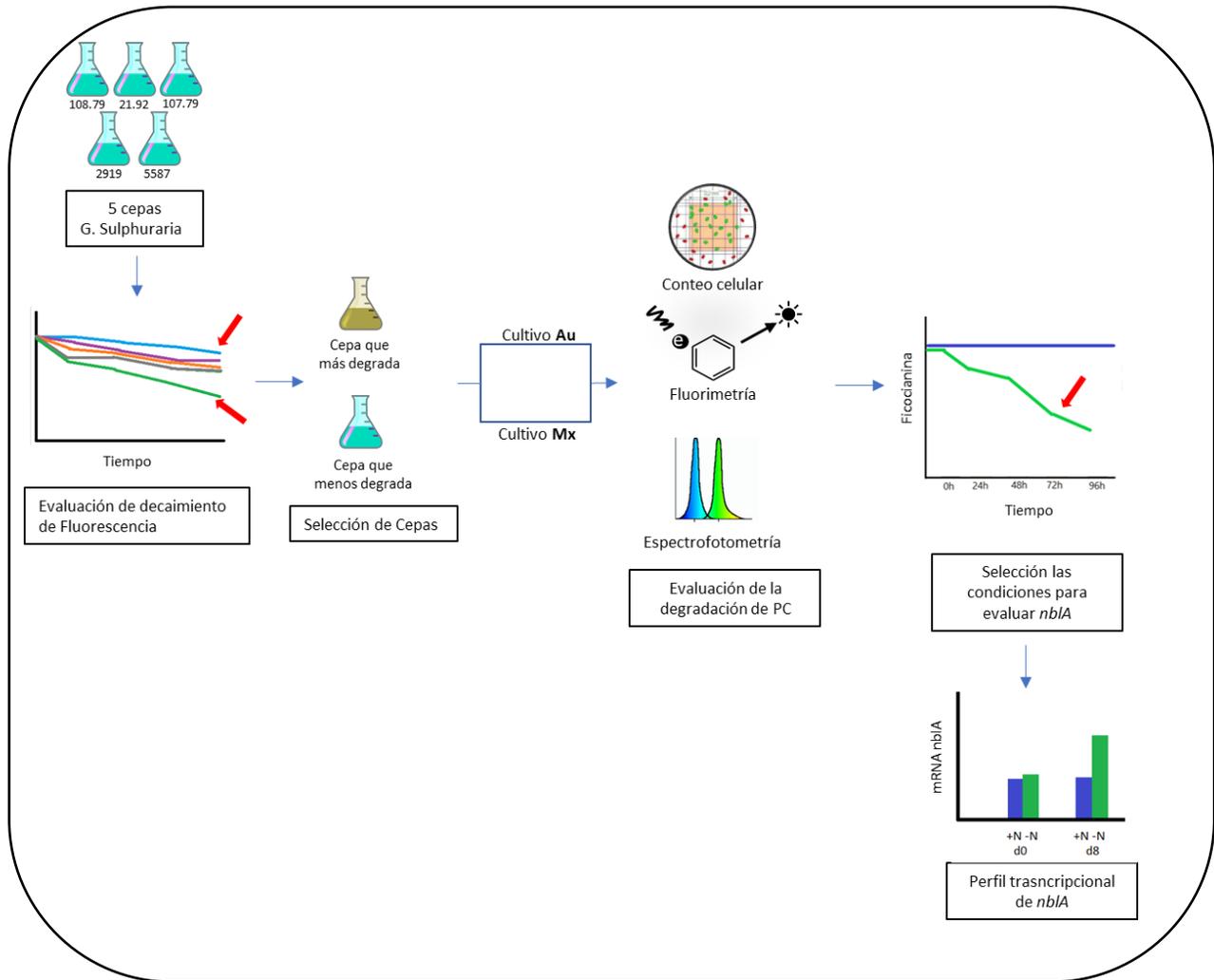


Figura 2.1-III. Panorama general del método experimental del proyecto.



3.5 Resultados y discusión.

3.5.1 Identificación de los genes implicados en el mecanismo de degradación de la ficocianina.

El objetivo principal del trabajo es determinar la relación entre la degradación de la ficocianina y la expresión del gen *nblA* cuando *G. sulphuraria* se somete a un estrés por limitación de nitrógeno. Esta es una respuesta que se observa en cianobacterias cuando son sometidas a estrés por nutrientes como nitrógeno, azufre o carbono.^{49,64} Para definir si el mecanismo de degradación de ficocianina reportado en cianobacterias se encuentra en *G. sulphuraria*, primero se llevó a cabo una búsqueda de los elementos descritos para el mecanismo mostrados en la **Tabla 3-III**, en la secuencia de *G. sulphuraria* cepa 074W,⁶ mediante un análisis BLASTp del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Los resultados de la búsqueda mostraron que todos los componentes del sistema de degradación de proteínas Clp proteasa descritos en cianobacterias para la degradación del ficobilisoma, incluidos las subunidades α y β de la ficocianina, se encuentran en *G. sulphuraria*. La búsqueda de las proteínas con actividad reguladora y proteasa ClpR y ClpP, respectivamente, fue más complicada debido a que la información recabada por este análisis no definía directamente la identidad de estas proteínas como se muestra en la **Tabla 4-III**. Pero, por otro lado, la proteína chaperona ClpC si tiene indicada su función en la descripción de proteína chaperona.

Además, todos los elementos del sistema de degradación de proteínas Clp (ClpC, ClpP y ClpR) obtuvieron un porcentaje de identidad arriba del 40% con respecto a las secuencias de aminoácidos tomadas de la microalga verde *C. reinhardtii*. Por lo cual estos datos nos dan una base con respecto la participación del sistema de degradación de proteínas Clp proteasa y al sistema de los componentes en la proteólisis de la ficocianina en condiciones de falta de nitrógeno.

⁶⁴ Baier K, Lehmann H, Stephan DP, Lockau W, Microbiology, **2004**, 150: 2739–2749.



| Secuencia de proteína | Organismo | Descripción en <i>G. sulphuraria</i> | Q cover | E value | Identidad | Max score | Total score | Acceso <i>G. sulphuraria</i> |
|-----------------------|----------------------------------|--|---------|---------|-----------|-----------|-------------|------------------------------|
| NbIS | <i>Synechococcus</i> sp. | Two-component sensor histidine kinase | 35% | 3e-16 | 23.70% | 80.9 | 80.9 | XP_005703715.1 |
| NbIR | <i>Synechococcus elongatus</i> | Two-component sistem, OmpR familia response regulator RpaB | 95% | 1e-27 | 31.44% | 104 | 104 | XP_005704989.1 |
| RpaB | <i>Synechococcus</i> sp. | putative transcriptional regulator OmpR | 93% | 2e-105 | 61.02% | 305 | 305 | YP_009051016.1 |
| SrrA | <i>Synechococcus elongatus</i> | Probable transcripcional regulator ycf72 OmpR-Like protein | 18% | 3.6 | 30.68% | 291 | 291 | XP_005707108.1 |
| NbIA | <i>G. sulphuraria</i> | <i>nblA</i> adador protein Clp protease | --- | --- | --- | --- | --- | YP_009051188.1 |
| ClpC | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Clp protease ATP binding subunit | 90% | 0.0 | 69.48% | 1192 | 1192 | NC_024665.1 |
| ClpP2 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | ATP-dependent Clp protease, protease subunit (clpP) | 91% | 4e-70 | 58.48% | 212 | 212 | XP_005707767.1 |
| ClpP2 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | ATP-dependent Clp protease, protease subunit (clpR) | 95% | 2e-48 | 43.82% | 157 | 157 | XP_005705590.1 |
| CpcA | <i>Synechocystis</i> sp | Phycocyanin alpha subunit | 100% | 2e-88 | 72.22% | 254 | 254 | YP_009051179.1 |
| CpcB | <i>Synechocystis</i> sp. | Phycocyanin beta subunit | 99% | 6e-98 | 77.19% | 279 | 279 | YP_009051180.1 |

Tabla 3-III. Identificación de proteínas asociados el sistema de dos componentes involucrado en la degradación de la ficocianina y asociados al sistema de degradación de proteínas cloroplásticas Clp. En la primera columna se encuentra la secuencia de la proteína que se usó como templatado, en la segunda columna el microorganismo del que proviene la secuencia de búsqueda, en la tercera columna la descripción que arrojó como resultado en la búsqueda del genoma de *G. sulphuraria*.



Así mismo, se realizó de la búsqueda de los elementos del sistema de dos componentes por el que está regulada la expresión de la proteína de NblA, este análisis se realizó mediante el uso de las secuencias de aminoácidos de las cianobacterias *Synechococcus sp.* y *Synechocystis sp.* Hasta el momento no se han reportado la existencia de alguno de estos genes en otros organismos fuera de las algas rojas y cianobacterias debido a que en principio este mecanismo de degradación es específico de organismos que contengan ficobilisoma.

Un dato interesante es que las proteínas NblS y NblR poseen identidades de alrededor de 23.70% y 31.44% con respecto a las secuencias de las proteínas NblS y NblR de *Synechococcus sp.* Sin embargo, podemos observar que las secuencias de estas proteínas están anotadas con la función con la que se ha reportado en la literatura, que consiste en una proteína histidin-cinasa censora y el factor de transcripción de regulación positiva, respectivamente (**Tabla 3-III**). Por otra parte, la búsqueda de NblA fue la única que se realizó mediante la base de datos “GENE” del NCBI, utilizando únicamente el nombre, por lo cual, fue encontrada fácilmente en el genoma de la cepa 074W como “*nblA*”.

Por otra parte, la búsqueda de los componentes ClpR y ClpC de la proteasa Clp se llevó a cabo utilizando la secuencia de aminoácidos de ClpP2 de *C. reinhardtii* mediante un análisis BLASTp (**Tabla 4-III**). Sin embargo, los posibles 5 resultados que se obtuvieron mediante el análisis mostraron en su descripción únicamente el nombre de una “Subunidad de la Clp proteasa dependiente de ATP”, sin hacer distinción entre cuál de los componentes se refiere, ya que proteínas ClpP y ClpR son proteínas homólogas. Anteriormente se describió a ClpR como una proteína que perdió su actividad catalítica durante la evolución mientras que ClpC no, pero el complejo de degradación no es funcional sin estas proteínas, por lo cual la proteína ClpR ha sido descrita como un componente con actividad reguladora.⁶⁵

⁶⁵ Olinares PD B, Kim J, van Wijk KJ, *Biochimica et Biophysica Acta* **2011** 1807(8):999–1011



| Secuencia (<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>) | Nombre (<i>Galdieria sulphuraria</i>) | Query Cover | E value | Identidad | Max Score | Total Score | Acceso | Identidad de proteína |
|---|--|----------------|---------|-----------|--------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| ClpP2 | ATP-dependent clp protease, protease subunit | 91% | 4e-70 | 58.48% | 212 | 212 | XP_005707767.1 | ClpP |
| ClpP2 | ATP-dependent clp protease, protease subunit | 91% | 1e-63 | 52.63% | 196 | 196 | XP_005703636.1 | ClpP |
| ClpP2 | ATP-dependent clp protease, protease subunit | 90% | 1e-60 | 53.25% | 188 | 188 | XP_005705949.1 | ClpP |
| ClpP2 | ATP-dependent clp protease, protease subunit | 94% | 3e-48 | 43.82% | 157 | 157 | XP_005705590.1 | ClpR |
| ClpP2 | ATP-dependent clp protease, protease subunit | 88% | 7e-39 | 38.15% | 132 | 132 | XP_004708647.1 | ClpR |

Tabla 4-III. Resultados de la búsqueda de los componentes clpR y clpP de la proteasa Clp en el genoma de *G. sulphuraria* 074W utilizando como secuencia de búsqueda la proteína ClpP2 de *Chlamidomonas reinhardtii*.



Para comprobar que *G. sulphuraria* contiene tanto a ClpR como a ClpP, se realizó un alineamiento múltiple mediante Clustal W de las secuencias de proteínas como lo realizó van Wijk y col. (2004)⁶⁶ para observar las diferencias entre las secuencias de aminoácidos, donde se reportó que la proteína ClpR se distingue principalmente por carecer de la triada catalítica en uno o más de sus aminoácidos que permite la degradación de péptidos, mientras que ClpP contiene los tres aminoácidos; que son serina, histidina y ácido aspártico. La **Figura 3-III**, muestra el alineamiento múltiple de las proteínas ClpR y ClpP de organismos como *Arabidopsis thaliana*, *C. reinhardtii*, *Synechococcus elongatus* y *Synechosystis* sp. que muestra al menos 11 aminoácidos conservados altamente entre las 16 secuencias que componen el análisis; de las cuales 5 son de *G. sulphuraria*. Además, como se muestra, todas secuencias de las proteínas ClpP contienen la triada catalítica que está marcada por las letras de color azul en las posiciones S269, H295 y D347, mientras que las proteínas ClpR de los diferentes organismos les falta uno o más residuos de aminoácidos de la triada catalítica. Con este análisis se corroboró mediante, que dos de las cinco secuencias de proteínas que están anotadas para *G. sulphuraria* 074W forman parte del grupo de ClpR con números de acceso de XP_005705590.1 y XP_004708647.1, cuyos residuos aminoácidos faltantes de la triada catalítica son: H295 en el caso de la primera y S269 y D347 para la segunda proteína. Por otra parte, las tres secuencias restantes identificadas forman parte del grupo de proteínas ClpP cuyos números de acceso son: XP_005707767.1, XP_005703636.1 y XP_005705949.1.

El resultado de este análisis informático mostró que el genoma de *G. sulphuraria* (cepa 074W), posee: 1) los componentes esenciales del sistema de dos componentes que regula la síntesis del gen *nblA* que tiene como producto a la proteína adaptadora para la degradación de ficocianina por la proteasa Clp y 2) los componentes básicos de la proteasa Clp. Este análisis obviamente no demuestra la

⁶⁶ Peltier JB, Ripoll DR, Friso G, Rudella A, Cai Y, Ytterberg J, Giacomelli L, Pillardy J, van Wijk KJ. *J Biol Chem.* **2004**, 279(6):4768-81.



funcionalidad del sistema de degradación Clp de *G. sulphuraria*, pero nos brinda una valiosa información que apoya la propuesta.



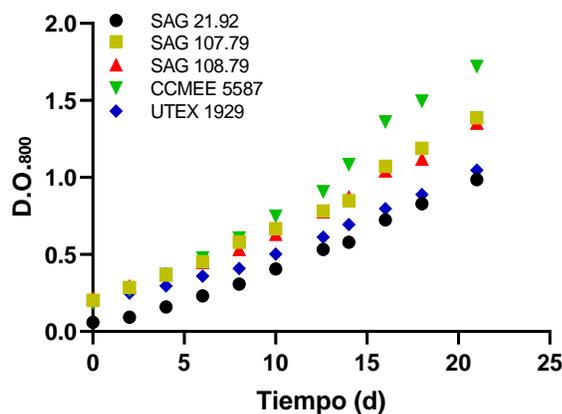


Figura 3-III. Alineamiento múltiple que muestra las diferencias del sitio catalítico entre las secuencias pertenecientes al grupo de proteínas ClpR y ClpP de *G. sulphuraria*. Alineamiento múltiple realizado a partir de 16 secuencias de aminoácidos de 5 organismos diferentes (*A. thaliana*, *C. reinhardtii*, *S. elongatus*, *Synechocystis* sp. y *G. sulphuraria*) por clustal W. Res.Con. Indica residuos conservados en todas las secuencias ClpR/C; Sit. Cat. Indica residuos que forman el sitio catalítico.



3.5.2 Evaluación y caracterización de 5 cepas de trabajo de *G. sulphuraria*.

Las 5 cepas analizadas en este trabajo fueron CCMEE 5587, UTEX 2919, SAG 107.79, SAG 108.79 y SAG 21.92, cuyo origen geográfico y el cepario se describen en la **Tabla 1-III**. Cada una de estas cepas se caracterizó en cultivos deficientes de nitrógeno en condiciones autotróficas para evaluar la degradación de ficocianina de manera rápida del día 0 al 14. Primero se analizó el tiempo que requerían los preinóculos de cada cepa para obtener una densidad celular equivalente a 1 D.O.₈₀₀, (**Figura 4-III**) con la finalidad de obtener la biomasa necesaria para llevar a cabo los cultivos -N. La intención de este método fue evaluar que tanto tiempo se toma en obtener 1 DO₈₀₀ en los preinóculos. Biomasa generada se utilizó para evaluar el crecimiento de las cepas de *G. sulphuraria* en condiciones de limitación por nitrógeno similares a las propuestas por Hiroka y Miyagishima;⁶⁶ para lo cual, la cepa que cumplió más rápido con el propósito fue la CCMEE 5587 en un total de 14 días, mientras que la cepa UTEX 2919 y SAG 21.92 tardaron 21 días. Sin embargo, como podemos ver en la **Fig. 4-III**, la cepa SAG 21.92 empezó con una D.O.₈₀₀ de 0.1, casi 0.5 veces (la mitad) que la cepa UTEX 2919 con 0.2, debido a un error en la dilución inicial de los cultivos. Por lo cual la cepa UTEX 2919 obtuvo una velocidad de crecimiento menor con respecto a las otras 4 cepas restantes.

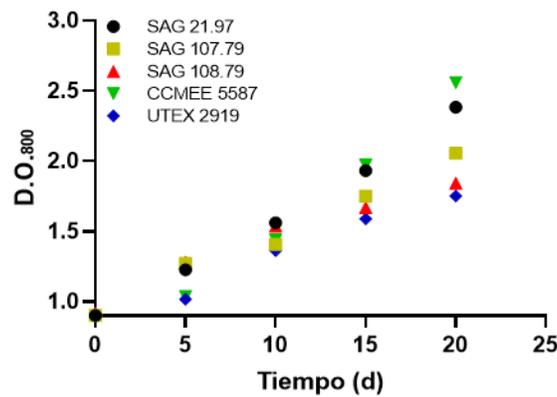


| | SAG 21.92 | CCMEE 5587 | UTEX 1929 | SAG 107.79 | SAG 108.79 |
|---|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| V (DO ₈₀₀ d ⁻¹) | 0.0453 | 0.0755 | 0.0408 | 0.0562 | 0.0537 |
| DOI₈₀₀ | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

Figura 4-III. Evaluación del crecimiento en 5 cepas de *G. sulphuraria*. Gráfica del crecimiento de las 5 cepas de trabajo empezadas aproximadamente con D.O.₈₀₀ de 0.2 en condiciones autotróficas, y los datos de velocidad obtenidos. V: Velocidad de crecimiento, DOI₈₀₀: Densidad óptica inicial.



Por otra parte, el crecimiento de los cultivos -N empezados aproximadamente a 1 DO_{800} se muestra en la **Figura 5-III**. Un dato destacable es que el incremento de la DO en los cultivos -N se mantuvo constante a través del tiempo con una cinética de orden 0. Lo que en principio es interesante, ya que el sulfato de amonio fue retirado del medio y es la única fuente de nitrógeno que *G. sulphuraria* asimila, ya que otros compuestos como nitratos, nitritos o urea no son consumidos por este microorganismo,⁶⁷ por lo cual el sulfato de amonio se considera como un reactivo que limita el crecimiento. Además, se observa una duplicación en la DO_{800} en las cepas CCMEE 5587. 1 y SAG 21.92 a los 20 días de inanición, mientras que las cepas SAG, 107.79, SAG 108.79 y UTEX 29.19 no duplicaron su crecimiento (**Fig. 5-III**).



| | SAG 21.92 | SAG 107.79 | SAG 108.79 | UTEX 2919 | CCMEE 5587 |
|---------------------------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|
| V ($DO_{800} \text{ d}^{-1}$) | 0.0734 | 0.0558 | 0.0507 | 0.435 | 0.0831 |
| DO_{i800} | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Figura 5-III. Evaluación del crecimiento en deficiencia de nitrógeno en 5 cepas de *G. sulphuraria*. Gráfica del crecimiento de *G. sulphuraria* en condiciones de limitación por nitrógeno, empezadas aproximadamente con una DO_{800} de 1.0. V: Velocidad de crecimiento, DO_{i800} : Densidad óptica inicial.

Un comportamiento similar se describió en un trabajo elaborado por Hirooka y Miyagishima (2014) donde se evaluó el crecimiento de *G. sulphuraria* 074G, en cultivos elaborados a partir de aguas de manantiales ácidos y además se utilizó medio MA sin fuente de nitrógeno como control. En los cultivos elaborados a partir de aguas de manantiales ácidos cuyas concentraciones de NH_4^+ fueron de 0.0021 y 0.0082 mM, respectivamente, se observó un fenómeno de duplicación en la DO.

⁶⁷ Hirooka S., Miyagishima S., *Frontiers in Microbiology*, **2016**, 7(2022).



A partir de este estudio, se propuso que la ficocianina pudiera ser un posible recurso de nitrógeno que ayudaba al crecimiento del alga en condiciones estresantes; además se observó mediante microscopia de fluorescencia la formación de cuerpo lipídicos debido a una activación del metabolismo de lípidos a causa de la limitación de nitrógeno lo que también podría ser una causa del incremento de la DO_{800} .⁵⁷

Por lo cual, para determinar que el aumento de la densidad óptica en los cultivos - N no se relaciona solamente con un probable aumento en la síntesis y acumulación de lípidos dentro de las células, como en los estudios de López García y col. en *C. reinhardtii*⁶⁸ o por Miyagishima en *G. sulphuraria*⁵⁷, cuando existe una limitación de la fuente de nitrógeno. Se midió la concentración celular (células mL^{-1}) a través del tiempo como se muestra en la **Figura 6-III**. La gráfica muestra al menos un evento de duplicación en todas las cepas. Sin embargo, la tendencia de crecimiento celular es similar a la observada en la **Fig. 4-III B**, en donde la cepa CCMEE 5587 presentó la mayor concentración de células al día 20, mientras que la UTEX 1929 obtuvo la menor concentración al final.

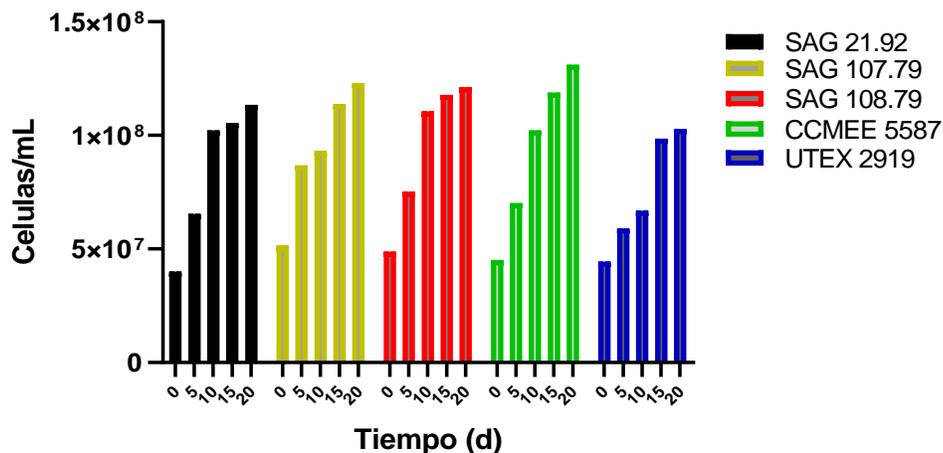
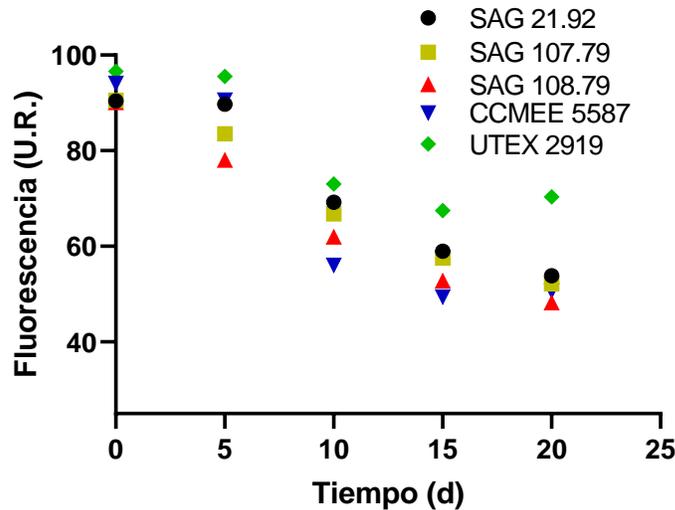


Figura 6-III. Crecimiento celular en condiciones de limitación de nitrógeno de las 5 cepas de *G. sulphuraria*. El conteo celular de las 5 cepas en los días de los cultivos en condiciones de deprivación de nitrógeno. Negro: SAG 21.92, Amarillo: SAG 107.79, Rojo: SAG 108.79, Verde: CCMEE 5587, Azul: UTEX 2919 (n=1)

⁶⁸ López García de Lomana, A., Schäuble, S., Valenzuela, J. et al. *Biotechnol Biofuels*, **2015**, 8(207).



Por otro lado, se llevó a cabo un análisis fluorimétrico sobre la señal que emite la ficocianina cuando es excitada a 600 nm que se muestra en la **Figura 7-III** con el propósito de evaluar el comportamiento en la acumulación de ficocianina en los cultivos de *G. sulphuraria* y de esta manera seleccionar la cepa con la cual se desarrolló el análisis transcripcional del gen *nblA* en condiciones -N.



| | SAG 21.92 | SAG 107.79 | SAG 108.79 | CCMEE 5587 | UTEX 2919 |
|--------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
| $V_{d^{-1}}$ | 0.0338 | 0.0312 | 0.0332 | 0.0469 | 0.0347 |
| F_i U.R. | 90.4276 | 90.5423 | 90.1232 | 94.1095 | 96.5755 |
| F_x U.R. | 53.8709 | 52.1613 | 48.2015 | 50.6507 | 70.3290 |

Figura 7-III. Fluorescencia emitida por la ficocianina en cultivo de *G. sulphuraria*. Gráfica del decaimiento de la fluorescencia en las 5 cepas de *G. sulphuraria*, Negro: SAG 21.92, Amarillo: SAG 107.79, Rojo: SAG 108.79, Verde: CCMEE 5587, Azul: UTEX 2919 (n=1) F_i : Fluorescencia inicial F_x : Fluorescencia Final V : Velocidad de caimiento de la fluorescencia.

Los resultados mostraron que al principio del experimento todas las cepas empezaron con una fluorescencia arriba de 90 unidades relativas (U.R.) La cepa con que obtuvo una mayor fluorescencia fue la UTEX 2919 con 96.57 U.R., que podría indicar que es la que tiene una mayor concentración de ficocianina al día 0 del experimento. Sin embargo, la cepa CCMEE 5587 presentó un decaimiento mayor de ficocianina al día 20, con una disminución de hasta 43.46 (U.R) de fluorescencia con respecto al día 0. Mientras que la cepa que obtuvo un menor decaimiento se presentó en los cultivos -N de UTEX 2919 con un decremento de la fluorescencia de tan solo 26.21 U.R. Así mismo, la cinética de disminución de la fluorescencia presenta un comportamiento de orden 1 y muestra que la cepa



CCMEE 5587 posee una velocidad de decaimiento mayor con un valor de 0.0469 d^{-1} , en comparación con las cepas SAG 21.92, SAG 107.79 y SAG 108.79, que presentaron velocidades de decaimiento de la fluorescencia de 0.0338, 0.0312 y 0.0332 d^{-1} , lo que podría ser un indicativo de que el proceso de degradación de ficocianina es mejor en la cepa CCMEE 5587.

Por otra parte, para evaluar el aspecto de los cultivos en condiciones -N, en la **Figura 8-III** se pueden apreciar el fenotipo de decoloración en los cultivos sin nitrógeno de todas las cepas de *G. sulphuraria* resaltando que al día 0 del experimento todas presentan distintas tonalidades azul-verdosas debido a la cantidad de ficocianina y clorofila A disponible, y al día 15 (**Fig. 8-III**) se observan como han pasado a un color amarillento.

Estas observaciones cualitativas y los datos de fluorescencia obtenidos nos permitieron hipotetizar que existe un evento de degradación de la ficocianina y que pudiera estar relacionado con su uso como fuente de nitrógeno para el mantenimiento y crecimiento celular. Sin embargo, la tasa de crecimiento fue notablemente menor en condiciones -N (**Fig. 5-III**).

Con base en todos los datos obtenidos y a las observaciones, se propone que la cepa CCMEE 5587 es la más adecuada para llevar a cabo un estudio más amplio sobre el fenómeno de la degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria* en condiciones limitantes de nitrógeno, además se utilizó a la cepa UTEX 2919 para realizar una comparación entre una cepa que tienen un proceso de degradación de la ficocianina más y otra que degrade menos, con la finalidad de evaluar si los resultados que existen en la acumulación de ficocianina de los cultivos en limitación de nitrógeno que se observaron en la **figura 7-III** y **8-III** corresponden a una diferencia estadística significativa.

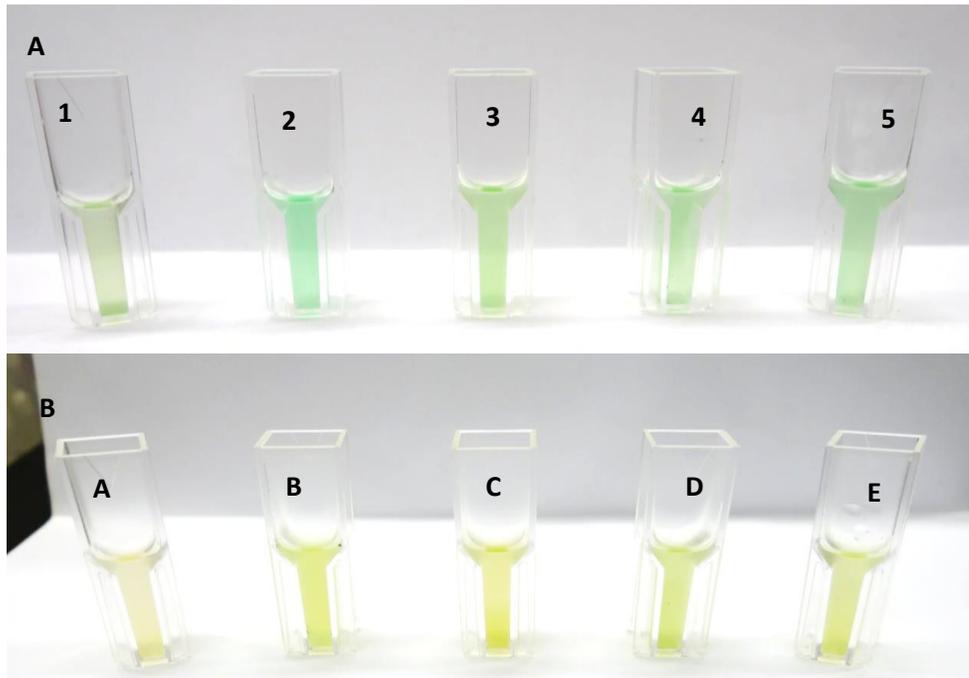


Figura 8-III. Fenómeno de blanqueamiento en las 5 cepas de *G. sulphuraria* en condiciones de inanición por nitrógeno. La imagen I.A corresponde a el día 0 (inicio del experimento, de las 5 cepas de *G. sulphuraria* (1. SAG 21.92, 2. CCME 5587.1, 3. UTEX 2919, 4. SAG 107.79, 5. SAG 108.79). La imagen B corresponde al día 16 del experimento en condiciones de inanición por nitrógeno de las 5 Cepas de *G. sulphuraria* (A. SAG 21.92, B. CCME 5587.1, C. UTEX 2919., D. SAG 107.79, E. SAG 108.79).



3.5.3 Evaluación en la acumulación de ficocianina en cultivos limitantes de nitrógeno en las cepas UTEX 2919 y CCME 5587

Caracterización en la acumulación de ficocianina en los cultivos Au -N y Mx -N de las cepas 2919 y 5588

El siguiente objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones para evaluar la acumulación del mRNA de *nblA* en la cepa 5587 y 2919. Los experimentos se hicieron por triplicado a partir de cultivos mixotróficos ya que datos en el laboratorio y en otros estudios como Curien y col. (2021)⁶⁹ y Wan y col. (2016)⁷⁰ indican que de esta manera se obtiene biomasa suficiente para iniciar varios cultivos simultáneos.

El perfil de degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria* se analizó en dos condiciones de cultivo (**Figura 9-III**): Cultivos **Mx**, iniciados a 1 D.O.₈₀₀ de biomasa generada de preinóculos mixotróficos (es decir, cultivos con fuente de carbono orgánica y expuestos a la luz), y cultivos **Au**, iniciados a 1 D.O.₈₀₀ de biomasa generada de preinóculos mixotróficos, donde la biomasa generada fue resuspendida en un medio mineral nuevo bajo condiciones autotróficas durante 7 días (para establecer el metabolismo autotrófico dentro del cultivo), y posteriormente esta biomasa se utilizó para iniciar los cultivos -N en condiciones autotróficas (ver **Figura 2-III** en método experimental). El objetivo de utilizar pre-inóculos mixotróficos dentro del diseño experimental fue para reducir el tiempo que implica la generación de biomasa requerida para elaborar los cultivos por triplicado en condiciones +N y -N de cada experimento. Por lo cual en esta sección se hablará acerca de las diferencias que presentaron los cultivos Au y los cultivos Mx de las cepas 5587 y 2919, en la degradación de ficocianina.

Como se observa en la **Figura A-2** del anexo podemos ver que los preinóculos en condiciones mixotróficas obtienen densidades ópticas de entre 6 a 8 D.O.₈₀₀ (que equivale a una concentración de 6 a 8 g de peso seco sobre litro según resultados

⁶⁹ Curien, G., Lyska, D., Guglielmino, E., Westhoff, P., et al. *New Phytol*, **2021**, 231: 326-338.

⁷⁰ Wan M., Wang Z., Zhang Z., Wang J., et al. *Bioresour Technol*, **2016**, 218:272-278



obtenidos anteriormente en el laboratorio) durante los primeros 7 días de cultivo con glucosa como fuente de carbono. El objetivo de realizar cultivos Au y Mx fue para esclarecer en qué condiciones se observa una mayor disminución de la cantidad de ficocianina en los cultivos además de obtener biomasa de manera más eficiente en un plazo de tiempo menor.

Con motivo de dar seguimiento al crecimiento de los cultivos +N y -N, y observar su relación con respecto a la concentración de ficocianina se monitoreó el aumento de la D.O. espectrofotométricamente como se muestra **Figura 9-III**. El aumento de la D.O.₈₀₀ en ambas condiciones muestra que el crecimiento en los cultivos -N y +N presentó un aumento constante hasta el día 14 de experimento y no mostró una diferencia significativa ($n=3$, $P=0.05$) esto se observó en ambas cepas tanto la cepa 5587 y 2919, lo que es interesante, debido a que en los cultivos -N no hay una presencia importante del ion amonio (NH_4^+). Sin embargo, el medio contiene una concentración de $0.311\mu\text{M}$ del ion NH_4^+ proveniente del molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) utilizado para proporcionar una cantidad traza del elemento molibdeno en el medio de cultivo y que a su vez representa una masa total de $5.6\mu\text{g L}^{-1}$ del ion NH_4^+ en el cultivo (6.8 veces menor que la cantidad de amonio en los medios elaborados por Hirooka⁵⁷), pero no se toma en consideración ya que es un compuesto limitante en el crecimiento y el crecimiento no cesó durante el experimento, sin embargo no se observó un evento de duplicación de la D.O. durante los 14 días de los cultivos.

Por lo cual, para comprobar que el fenómeno del aumento de la D.O.₈₀₀ se relacione al crecimiento celular y no a una acumulación de cuerpos lipídicos, como lo descrito por Hirooka (2016)⁶⁷ para la cepa de *G. sulphuraria* 074G cuando está sometida a un estrés por limitación de nitrógeno, se realizó el conteo celular en condiciones -N (**Figura 11-III**). Los resultados indican que en las cepas 5587 y 2919 se presentó un ligero incremento de la D.O. a través del tiempo con respecto al día 0 del experimento. Sin embargo, la concentración celular de la cepa 5587 no se duplicó durante los 14 días de cultivo, mientras que la cepa 2919 sufrió dos eventos de duplicación durante los 14 días, pero únicamente en los cultivos Mx, lo que indica



que hay evidencia de división celular pero no en todos los casos existe un evento de duplicación de día 0 al 14. Una característica microscópica que diferencia a las cepas es que las células de 5587 son más pequeñas que las de 2919 debido a una acumulación de compuestos como lípidos o almidón florídeo que podría ser utilizado como fuente de carbono para la duplicación celular de la cepa 2919 y además, podemos sugerir que una fuente alternativa de nitrógeno en los cultivos -N podría ser la ficocianina u otro componente del ficobilisoma como fue propuesto por Hirooka y col. (2016)⁶⁷ necesaria para llevar a cabo el ligero incremento en la D.O.₈₀₀ y concentración celular.

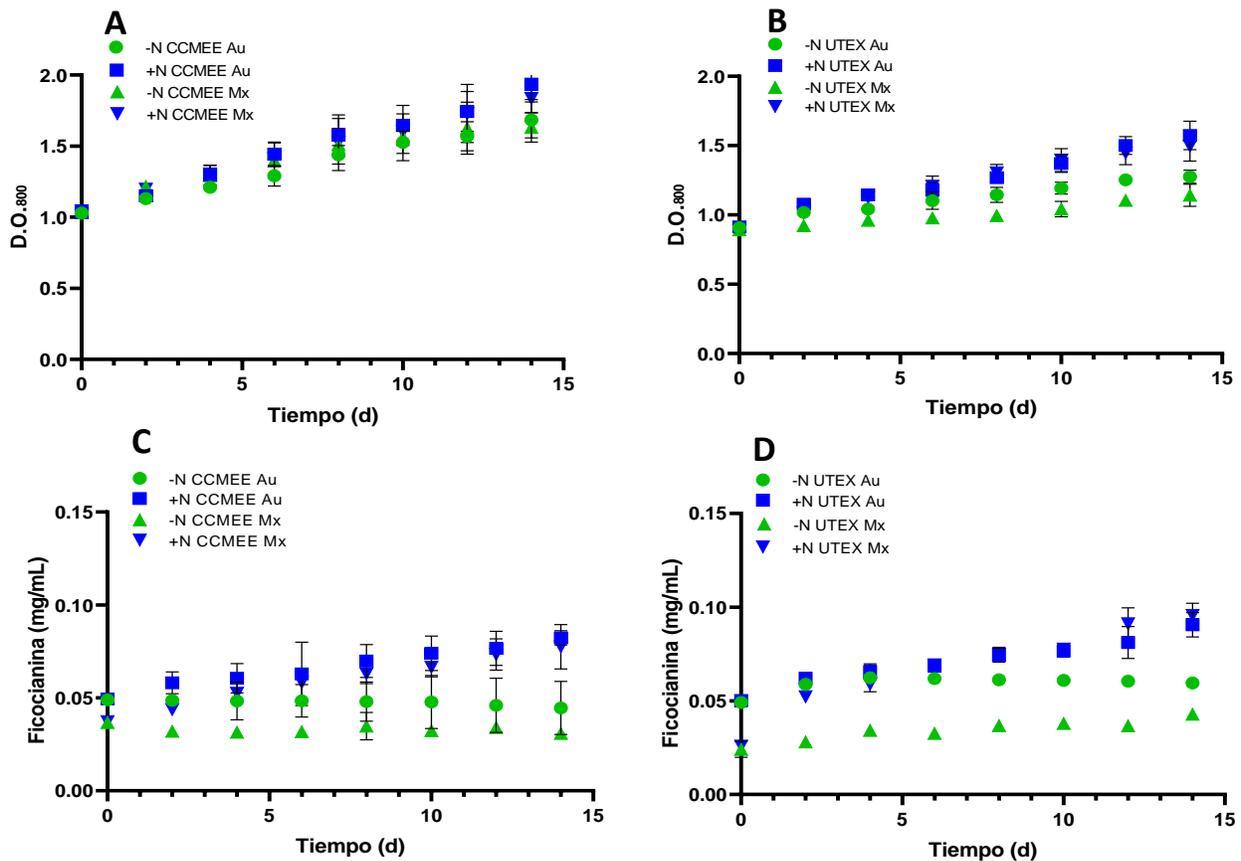


Figura 9-III. Crecimiento y acumulación de la ficocianina en *G. sulphuraria* 5587 y 2919. A. Gráfica del aumento de la densidad óptica de la cepa 5587. B. Gráfica del aumento de la densidad óptica de la cepa 2919. C. Gráfica de título de ficocianina a través del tiempo de la cepa 5587. D. Gráfica del título de ficocianina a través del tiempo de la cepa 2919. Color azul representa cepas en cultivo con nitrógeno, Color verde muestra el comportamiento de los cultivos en inanición por nitrógeno. Au: Cultivos provenientes de biomasa autotrófica, Mx cultivos proveniente de biomasa mixotrófica.



| Condiciones | X_{max} | X_{PC} | V_x | P_x | P_{PC} | PC_i | V_{PC} | PC_{max} |
|-------------|------------|-------------|---------------------|-------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | $g L^{-1}$ | $mg L^{-1}$ | $mg mL^{-1} d^{-1}$ | $g L^{-1} d^{-1}$ | $mg mL^{-1} d^{-1}$ | $mg mL^{-1}$ | $mg mL^{-1} d^{-1}$ | $mg mL^{-1}$ |
| CCMEE Au -N | 1.24±0.17 | 44.57±0.15 | 0.047±0.005 | 0.088±0.012 | 3.18±0.01 | 0.0489 | -2.73E-04±7.01E-05 | 0.050±0.010 |
| CCMEE Au +N | 1.33±0.02 | 82.27±6.01 | 0.062±0.009 | 0.095±0.002 | 5.87±0.42 | 0.0494 | 5.66E-02±7.66E-02 | 0.082±0.003 |
| CCMEE Mx -N | 1.03±0.06 | 30.82±2.32 | 0.038±0.015 | 0.074±0.004 | 2.20±0.16 | 0.0367 | -1.53E-4±6.93E-05 | 0.031±0.002 |
| CCMEE Mx +N | 1.22±0.04 | 77.46±12.01 | 0.051±0.012 | 0.087±0.002 | 5.53±0.85 | 0.0374 | 2.83E-03±7.92E-04 | 0.077±0.012 |
| UTEX Au -N | 1.20±0.06 | 60.58±1.08 | 0.025±0.002 | 0.085±0.047 | 4.32±0.07 | 0.0491 | 2.66E-04±1.36E-04 | 0.059±0.003 |
| UTEX Au +N | 1.29±0.16 | 94.97±7.72 | 0.045±0.010 | 0.092±0.011 | 6.78±0.55 | 0.0501 | 2.49E-03±7.57E-04 | 0.091±0.006 |
| UTEX Mx -N | 1.09±0.01 | 43.82±1.82 | 0.017±0.003 | 0.077±0.001 | 3.31±0.13 | 0.0241 | 1.13E-03±1.63E-04 | 0.043±0.003 |
| UTEX Mx +N | 1.21±0.06 | 97.20±9.04 | 0.044±0.007 | 0.086±0.004 | 6.94±0.64 | 0.0258 | 4.52E-03±.57E-04 | 0.096±0.010 |

Tabla 5-III. Parámetros cinéticos sobre el crecimiento y la acumulación de ficocianina en *G. sulphuraria* 5587 y 2919. Au: Cultivos provenientes de biomasa autotrófica, Mx cultivos proveniente de biomasa mixotrófica. (n=3, P=0.05) X_{max} =Rendimiento final en peso seco, X_{pc} = Rendimiento final de ficocianina, V_x = Velocidad de crecimiento, P_x = productividad de biomasa P_{pc} = productividad de ficocianina, PC_i = ficocianina inicial, V_{pc} = Velocidad de acumulación de ficocianina, PC_{max} =rendimiento de ficocianina.



Por otra parte, las velocidades de crecimiento de los cultivos Mx y Au de ambas cepas en cultivos -N son similares entre sí y no muestran diferencia significativa entre estos ($n=3$, $p=0.05$), ni tampoco entre el peso seco obtenido de los cultivos (**Tabla 5-III**). Sin embargo, la concentración de los cultivos -N mostró una diferencia entre la concentración de ficocianina iniciales de cultivos Au y Mx que son más notorios en la entre los cultivos de la cepa 2919 obteniendo así concentraciones de $Au=0.0489$ y $Mx= 0.0367$ mg mL^{-1} mientras que de la 5587 fueron de $Au= 0.0491$ y $Mx= 0.0367$ mg mL^{-1} . Esta observación es importante debido a que las condiciones iniciales en las que se inician los cultivos -N pueden llevar a variaciones en el fenómeno de blanqueamiento de *G. sulphuraria* (**Fig. 9-III C y D**).

En la **Figura 10-III** se muestran los cambios en la apariencia de los cultivos en el día 0 y al día 14, en los cultivos Mx y Au de ambas cepas, donde se observa que la coloración de los cultivos al día 0 fueron muy diferentes entre los Au y los Mx donde los primeros presentaron una coloración verde- azulada más intensa mientras que los cultivos Mx presentaron una coloración verde pálida. Esta intensidad en el color de los cultivos podría estar relacionado a la concentración de ficocianina inicial como lo muestra **Fig. 9-III**, debido a que una mayor concentración ficocianina da como resultado una mayor intensidad del color azul en los cultivos. Por otra parte, como era esperado los cultivos +N de ambas cepas tomaron una apariencia similar, hasta que alcanzaron una tonalidad verde oscura intensa. En los cultivos -N el grado en la tonalidad verde al día 14 disminuyó. Algo interesante es que no se alcanzó a observar una tonalidad verde-amarillenta o marrón como fue descrito por Sinetova y col. (2005)⁵¹ o como lo observado en cultivos -N de cianobacterias de *Synechosystis* sp., donde durante las primeras 48 h los cultivos se vuelven amarillentos.⁴⁷

Dentro de los cultivos +N se aprecia un fenómeno esperado; el incremento constante y lineal de los títulos de ficocianina a través del tiempo. De manera interesante, la velocidad de producción de ficocianina en ambas cepas fue mayor en los cultivos Mx durante las primeras 48 h. Un dato que aún no sea reportado en la literatura. Una hipótesis que se ha propuesto en el laboratorio para explicar

porque hay una velocidad mayor en el proceso de acumulación de ficocianina en cultivos Mx es que estos empiezan con una concentración menor de ficocianina en día 0 del experimento (**Fig. 9-III C, D**), lo que podría obligar a las células de estos cultivos realizarla síntesis de ficobiliproteínas con mayor velocidad para llevar una mejor captación de fotones y así mitigar la falta de energía en forma de ATP y adicionalmente evitar daño por estrés oxidativo en las condiciones autotróficas a las que fueron sometidos los cultivos. De acuerdo con Curien y col.⁵⁹ varios componentes del metabolismo autotrófico incluyendo el metabolismo de Calvin-Benson y la cadena foto-respiratoria disminuye en condiciones mixotróficas de cultivos. Por lo cual, someter a la biomasa que proviene de condiciones mixotróficas a condiciones autotróficas podría inducir en el alga a la recuperación de sus funciones fotosintéticas, aumentando la producción de proteínas para mantener sus funciones metabólicas y suplir el requerimiento de ATP.

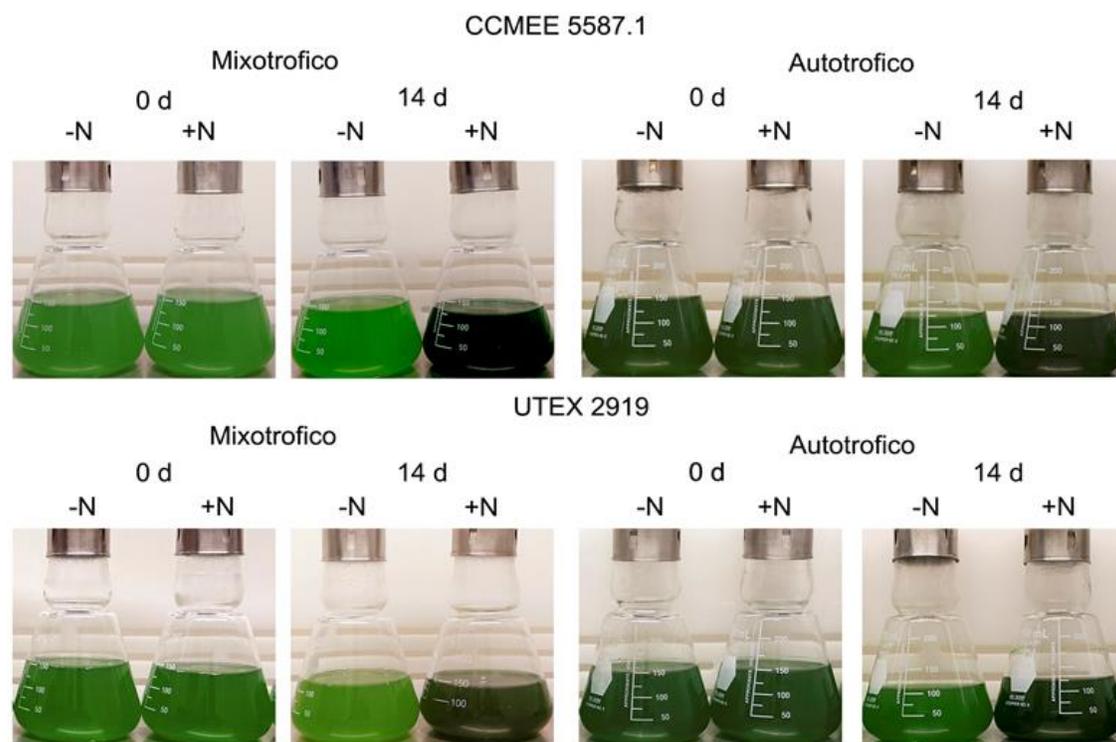


Figura 10-III. Fenotipo blanqueador de la cepa de *G. sulphuraria* en las cepas CCME 5587 y UTEX 2919. Diferencias entre los cultivos Mx y Au, en condiciones +N y -N entre el día 0 y el día 14 del experimento.



De manera interesante, las cepas muestran diferentes características en sus comportamientos cinéticos en condiciones -N; la cepa 2919 mostró una tendencia a aumentar el título de ficocianina. En los cultivos Au -N de 2919 se observa que hay un aumento desde 0.0501 a 0.0655 mg mL⁻¹ que equivale a un 23.7 % entre el día 0 y 6. Esto es interesante porque no hay fuente de nitrógeno añadida y podría deberse a nitrógeno proveniente del preinóculo o recambio de proteínas.

Por otro lado, el aumento de ficocianina en condiciones -N también podría deberse a una disminución del efecto de sombreo; que es un fenómeno en el cual las capas más externas de los cultivos de algas reciben la mayor parte de la energía luminosa mientras que las capas más internas reciben menos luz, cuando un cultivo es más denso las capas externas permiten menos entrada de luz a las algas que se encuentran más adentro de los cultivos. Se ha descrito que cuando pasamos de una densidad alta (en este caso de 6 a 7 D.O.) en los preinóculos (**Fig. A-2**) a una concentración más baja (de 1 D.O.) en los cultivos, las células disponen de una mayor cantidad luz, lo cual les permitiría iniciar una cascada de señalización para aumentar la producción de proteínas involucradas en la fotosíntesis, entre ellos la expresión de la ficocianina en *G. sulphuraria*. Lo anterior se demostró en cianobacterias como *Synechocystis* sp. cepa 6803 donde al tener una luz adecuada de entre 100 a 150 mmol, la proteína Hik33 (llamada proteína Ycf26 en *G. sulphuraria* con número de acceso XP_005703715.1 en PROTEIN del NCBI)⁷¹, se activó permitiendo la inducción de genes implicados en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos como *hem* o *chl* y en genes involucrados en la captación de luz como *cpa* (síntesis de aloficocianina) y *cpc*.⁷²

Además, una vez que se alcanzó el día 6 en los cultivos Au -N de la cepa 2919 no se presentó un decremento importante de la concentración de ficocianina hacia el día 14. De igual manera, en los cultivos Mx -N de 2919 no se observó un fenómeno de decaimiento en la acumulación y los datos arrojaron que del día 0 al día 14 se observó un fenómeno de incremento de la concentración de ficocianina de 82%.

⁷¹ Ashby M.K., Houmard J., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006** 70:472–509.

⁷² Muramatsu M., Hihara Y. *J. Plant Res.* **2012**, 125:11–39



Estos datos demuestran que la ficocianina de la cepa 2929 muestra una gran resistencia de degradación bajo condiciones -N, manteniendo así la generación de energía.

Los cultivos -N de la cepa 5587 mostraron un comportamiento diferente que el de la cepa 2919. Se observó un decremento en la concentración de ficocianina del día 0 al día 14 del experimento en cultivos Au y Mx. Sin embargo, la cantidad de ficocianina disminuyó en un 13% dentro del cultivo Mx -N en comparación con un 20% del cultivo Au -N. Además, la velocidad del decaimiento de la ficocianina en los cultivos Au -N fue ligeramente más veloz que en los cultivos Mx, pero sin una diferencia significativa. Por otro lado, algo destacable dentro de este estudio es la baja velocidad de decaimiento de la ficocianina en estas cepas de *G. sulphuraria*, aun cuando están expuestos a condiciones estresantes por la limitación de nitrógeno. En la **Tabla 6-III** se muestra la comparación entre los sistemas biológicos donde se ha estudiado la relación entre la acumulación de ficocianina y la limitación por nitrógeno. Es importante mencionar que la diferencia entre estos modelos de estudios y *G. sulphuraria* es que *A. plantensis*, *S. elongatus* y *Synechocystis sp.* pertenecen al grupo de las cianobacterias, es decir no poseen orgánulos membranosos y metabólicamente su fuente de nitrógeno son los nitratos (NO_3^-) y no el amonio como en el caso de *G. sulphuraria*. Además, la degradación casi total de toda la ficocianina se lleva prácticamente durante las primeras 72 h en el caso de *A. plantensis* y *Synechocystis sp.*^{67,70,71} mientras que en *S. elongatus* dentro de las primeras 24 horas.

Con base en estos resultados se puede sugerir que el sistema de degradación de la ficocianina es diferente en *G. sulphuraria* es diferente a lo reportado para las cianobacterias. De manera interesante, la resistencia de la ficocianina de *G. sulphuraria* a la degradación en cultivos -N le confiere una ventaja a en comparación a los organismos que se emplean actualmente para la producción y extracción de ficocianina a nivel industrial.



| Organismo | Condiciones | Tiempo | % PC | Autor |
|--------------------------------|-------------|--------|------|----------------------------------|
| <i>Arthrospira plantensis</i> | Autotrofia | 72 h | 18 | Richmond (1980) ⁷³ |
| <i>Synechococcus elongatus</i> | Autotrofia | 24 h | 4 | Forchhammer (1998) ⁷⁴ |
| <i>Synechococcus elongatus</i> | Autotrofia | 24 h | 8 | Schwarz (2006) ⁷⁵ |
| <i>Synechocystis</i> sp. | Autotrofia | 48 h | 0 | Richaud (2001) ⁷⁶ |
| <i>Synechocystis</i> sp. | Autotrofia | 72 h | 6 | Matthisjs (2012) ⁷⁷ |
| <i>G. sulphuraria</i> 5587 Mx | Autotrofia | 14 d | 87 | Este estudio |
| <i>G. sulphuraria</i> 5587 Au | Autotrofia | 14 d | 80 | Este estudio |

Tabla 6-III Comportamiento de la ficocianina en diversos organismos sometidos a limitación por nitrógeno. Tabla comparativa de cultivos de diferentes organismos en limitación de nitrógeno en el tiempo final de los cultivos. PC% = porcentaje de ficocianina en ellos cultivos hasta el final del experimento, Tiempo= el tiempo que duraron los cultivos en limitación de nitrógeno.

Como se muestra en la **Figura 11-III**, el crecimiento en los cultivos de 2919 y 5587 se observó mediante el incremento en el número de células. Un dato particular en observado en este estudio es un incremento en número de células en cultivos +N y -N, lo que significa que el aumento de la D.O.₈₀₀ en los cultivos es por el aumento en la concentración celular. Sin embargo, solo se observó dos duplicaciones del número de células en los cultivos Mx de la cepa 2919 (d 0 +N= 1.51E+07 y -N= 1.42E+07; d 14 +N= 8.02E+07 y -N= 9.76E+07 células/mL). Este fenómeno puede estar relacionado con las condiciones de inicio de los cultivos que provenían directamente de condiciones mixotróficas. Por su parte con la cepa 5587 no presentó eventos de duplicación en ningún tipo de cultivo.

Con el fin de analizar la acumulación de la ficocianina en los cultivos -N en *G. sulphuraria*, se obtuvieron datos acerca de la concentración de ficocianina celular. En la Fig. **11-III C y D** se muestra que la cantidad de ficocianina inicial por célula es diferente entre los cultivos Au y Mx de las dos cepas, por lo cual se proponen dos explicaciones: uno es la forma en la que se produce la biomasa de los preinóculos y dos las dimensiones espaciales de la célula ya que la cantidad de ficobiliproteínas puede estar determinada especialmente por el tamaño, ver **Figura A-1** del anexo.

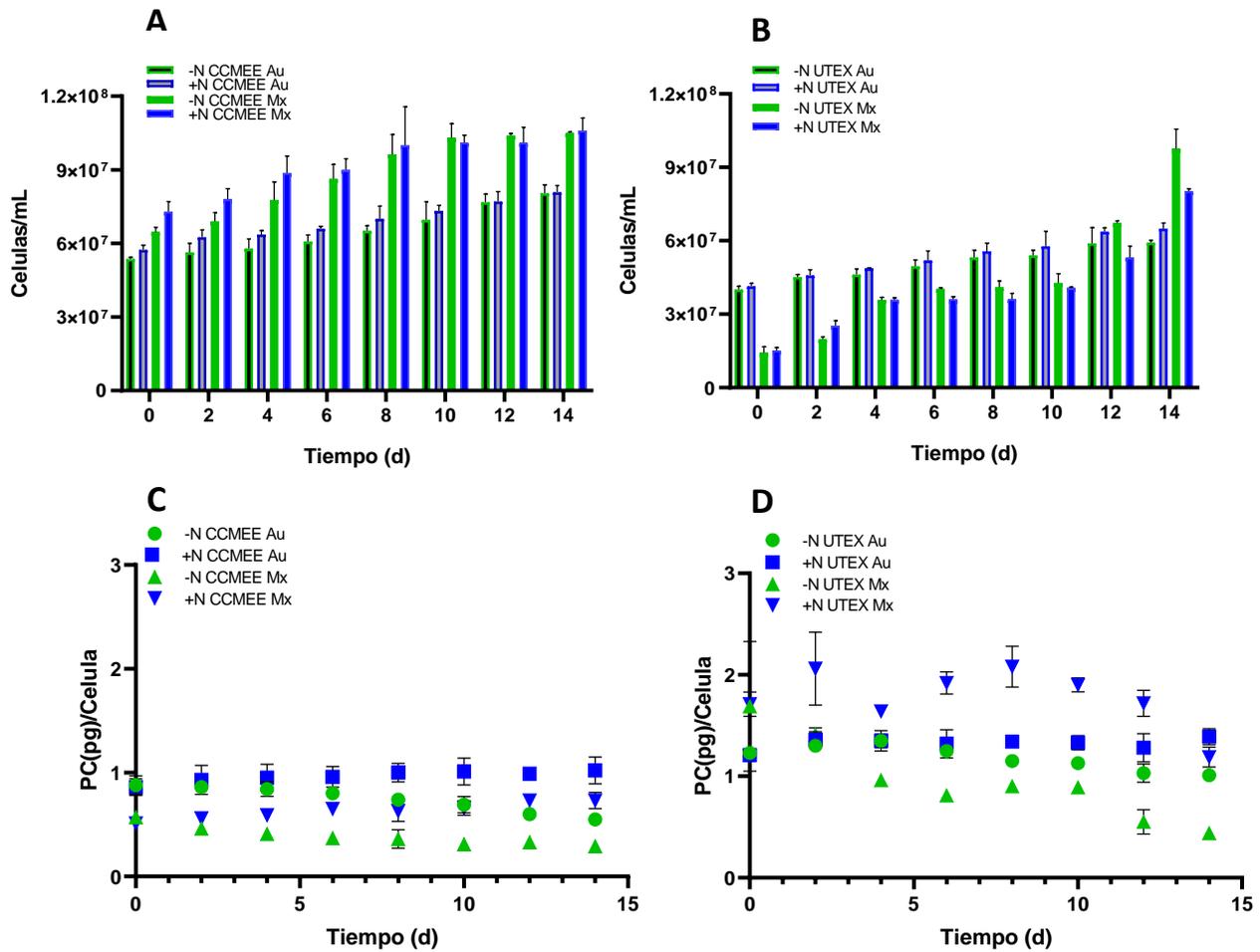
⁷³ Boussiba S., Richmond AE. *Arch. Microbiol.* **1980**, 125:143- 147.

⁷⁴ Görl M., Sauer J., Baier T., Forchhammer K. *Microbiology.* **1998**, 144:2449-2458.

⁷⁵ Lahmi R., Sendersky E., Perelman A., Hagemann M., et. al. *J. Bacteriol.* **2006**, 188(14):5258-65.

⁷⁶ Richaud C, Zabulon G, Joder A, Thomas JC. *J Bacteriol.* **2001**, 183(10):2989-94.

⁷⁷ Krasikov V., Aguirre von Wobeser E., Dekker HL., Huisman J. et al. *Physiol Plant.* **2012**, 145(3):426-39.



E

| Condiciones | V_{max} | PC_i/Cel | PC_x/Cel | Cel_x |
|-------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | $pg\ cel^{-1}\ d^{-1}$ | $pg\ cel^{-1}$ | $pg\ cel^{-1}$ | $Cel\ mL^{-1}$ |
| CCME Au -N | 0.025 | 0.88±0.09 | 2.83±0.55 | 8.87E7±3.40E6 |
| CCME Au +N | 0.011 | 0.81±0.08 | 1.01±0.12 | 8.08E7±2.83E7 |
| CCME Mx -N | 0.025 | 0.57±0.02 | 0.29±0.02 | 5.92E7±9.93E5 |
| CCME Mx +N | 0.020 | 0.51±0.02 | 0.73±0.08 | 6.49E7±2.29E6 |
| UTEX Au -N | 0.012 | 1.27±.004 | 1.01±0.04 | 1.04E8±7.71E6 |
| UTEX Au +N | 0.030 | 1.21±0.02 | 1.39±.08 | 1.05E8±5.10E6 |
| UTEX Mx -N | -- | 1.69±0.64 | 0.43±0.05 | 9.76E7±7.98E6 |
| UTEX Mx +N | -- | 1.70±0.12 | 1.19±0.10 | 8.02E7±1.00E6 |

Figura 11-III. Crecimiento celular y acumulación de la ficocianina por célula en *G. sulphuraria*. A. Gráfica de la concentración celular por tiempo de cepa CCME 5587. B. Gráfica de la concentración celular de la cepa UTEX2919. C. Gráfica de título de ficocianina por célula de la cepa CCME 5587. D. Gráfica del título de ficocianina por célula de la cepa UTEX 2919. Color azul representa cepas en cultivo con nitrógeno, Color verde muestra el comportamiento de los cultivos en inanición por nitrógeno. Au: Cultivos provenientes de biomasa autotrófica, Mx cultivos proveniente de biomasa mixotrófica. E. Datos de la concentración inicial (PC_i/Cel) y final (PC_x/Cel) de ficocianina por célula, concentración de células al día 14 (Cel_x) y Velocidad de síntesis o degradación. (n=3, P=0.05)



Por otro lado, los cultivos Au de ambas cepas se empezaron prácticamente con la misma concentración de ficocianina al día 0 (5587 -N = 0.0489 y 2919 -N = 0.0491 mg mL⁻¹). Sin embargo, no contuvieron la misma cantidad de ficocianina por célula inicial.

De manera interesante, se observó, en el caso de la cepa 2919 que las células provenientes de los cultivos Mx tienen una mayor cantidad de ficocianina inicial que los cultivos Au y esto es debido a que, aunque contenían una menor cantidad de ficocianina al día 0 del experimento en los cultivos Mx de esta cepa había una menor cantidad de células por mililitro lo que provocó que la ficocianina se concentrara en mayor cantidad por célula.

Con respecto al comportamiento cinético de los cultivos +N, los datos de la cepa 5587 indican un incremento constante de ficocianina, lo que es debido a la presencia de nitrógeno en el medio, con velocidades de acumulación de 5587 Au +N Vel= 0.011 y 5587 Mx +N Vel= 0.020 pg cel⁻¹ d⁻¹ lo que representa que el aumento de ficocianina en los cultivos Mx +N es 2.0 veces mayor que en los cultivos Au.

Mientras que en los cultivos de 2919 solo se obtuvo un comportamiento de aumento lineal en los cultivos Au y por el otro lado en los cultivos Mx presenta un comportamiento no esperado. Así mismo, los datos obtenidos a partir de los cultivos de la cepa 5587 indican que la velocidad de disminución de ficocianina es un 20% mayor en las células de cultivos Au -N, en comparación a los cultivos Mx (5587 Au -N Vel= 0.025 y 5587 Mx -N Vel= 0.020 pg cel⁻¹ d⁻¹).

Sin embargo, la velocidad de disminución de ficocianina en células de la cepa 2919; calculada a partir del día 6 en cultivos Au -N fue de 0.012 pg cel⁻¹ d⁻¹. Por lo cual, es importante decir que la mayor velocidad de disminución de ficocianina por célula se observa en la cepa 5587 Au -N, con una Vel= 0.025 pg cel⁻¹ d⁻¹ mientras que en la cepa 2919 Au -N Vel= 0.012 pg cel⁻¹ d⁻¹ (**Fig. 11-III**). Estos datos indican que las mejores condiciones para llevar a cabo el estudio transcripcional es el día 8 donde en cultivos Au empieza el fenómeno de disminución en ambas cepas y además se observa una mayor velocidad de la disminución de la ficocianina y la tendencia es clara en ambas cepas en comparación con cultivos Mx.



Evaluación del perfil de los pigmentos fotosintéticos en cultivos -N y +N

Adicionalmente, con el fin de estudiar con mayor profundidad el fenómeno blanqueamiento en *G. sulphuraria*, se evaluó el comportamiento de otros pigmentos fotosintéticos bajo condiciones de limitación por nitrógeno. En la **Figura 12-III** y en los diagramas de superficie del anexo (**Figura A-4** hasta la **A-12**) se muestran la representación del espectro de absorbancia de cultivos de ambas cepas en condiciones +N y -N. Los espectros de absorbancia se normalizaron a 1 D.O.₈₀₀, para eliminar el efecto que genera el aumento de la densidad celular.

El espectro de absorbancia de las cepas 5587 y 2919 en cultivos +N muestra el comportamiento esperado con respecto a las señales pertenecientes la ficocianina en 620 nm los carotenos en 450 nm y la clorofila en 675nm (**Fig. 12-III B, D, F, y H**). Las señales de los pigmentos en los cultivos Au +N de ambas cepas se mantuvo significativamente sin cambios a través del tiempo del día 0 al 14. Sin embargo, hay un incremento en las señales de todos los pigmentos en los cultivos Mx +N durante las primeras 48 horas y posteriormente los cultivos experimentaron incrementos graduales del día 2 al 14 en la absorbancia obtenida de las señales de los 3 principales pigmentos.

Por otra parte, en los cultivos Au -N (**Fig. 12-III A, C, E, G**) se observó un decremento de las señales de los pigmentos. Sin embargo, la disminución de la señal de la ficocianina y clorofila en los cultivos Au -N de la cepa 2919 es de ficocianina 8% y 6%, respectivamente, así mismo, el comportamiento de los carotenos en esta cepa se apreció un ligero incremento en el contenido de carotenos a los 14 días de cultivo, con respecto al día 0. Mientras que la señal de la ficocianina y clorofila de los cultivos Au -N de la cepa 5587 tiene una disminución de 41% y 40%, respectivamente.

Además, la señal de la ficocianina y clorofila que presentaron los cultivos Mx -N de la cepa 5587 fue menor en comparación con el cultivo Au -N de la misma cepa. En cambio. Pero inesperadamente los cultivos Mx -N de la cepa 2919 muestran una tendencia diferente, y es que a pesar de que los cultivos no están alimentados con nitrógeno el comportamiento de la señal de los pigmentos muestra un incremento



en las primeras 48h, en especial de los carotenos.

Este fenómeno en el aumento de los carotenos en los cultivos -N de *G. sulphuraria* puede estar relacionada a la cualidad de almacenar carbono en forma de carotenos en condiciones de estrés. Se ha descrito en la literatura que en cultivos en limitación de nitrógeno de *G. sulphuraria* cepa IPPAS P-513, elaborados por Sinetova en 2006⁵² hay un efecto que propicia la disminución en la cantidad de carotenoides totales, así como de clorofila A; además, en cultivos en inanición de nitrógeno elaborados utilizando como modelo a las microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. y *C. reinhardtii*, se ha reportado que la falta de nitrógeno produce un fenómeno de reducción en la cantidad de carotenoides en términos de mg g⁻¹ de peso seco,^{78,79,80} y en las últimas dos también se reportó una reducción del cantidad de clorofila.

Sin embargo, se ha encontrado que la deprivación de nitrógeno en *Phormidium laminosum* produce un decaimiento en la concentración de β -caroteno pero un aumento en la concentración de nostoxantina que muestra la posibilidad de un recambio en la composición de carotenos dentro de los cultivos.⁸¹ Además, se ha observado que en algunas cepas de *C. reinhardtii* como la CC-124 y la CC-125, la cantidad de carotenos totales aumenta en un 514% y un 184% respectivamente, al día 7 de inanición por nitrógeno, mientras que los títulos de clorofila decrecen 64% y un 76% respectivamente.

Por lo que bajo algunas circunstancias algunas algas o cepas acumulan cantidades masivas de carbono en forma de carotenoides, almidón y lípidos en inanición por nitrógeno,⁸² y se ha sugerido que la acumulación de carotenoides bajo condiciones de estrés representa un mecanismo para proteger a microalgas del daño provocado por la luz.⁸³

⁷⁸ Kim SH., Liu KH., Lee SY., Hong SJ., Cho BK., Lee H., Lee CG., Choi HK. *PLoS One*. 2013 5;8(9)

⁷⁹ Solovchenko A., Lukyanov A., Solovchenko O., et al. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, 116:635–644

⁸⁰ Kamalanathan M., Pierangelini M., Shearman LA., Gleadow R., Beardall J.J *Appl Phycol.* **2016**, 28:1509–20

⁸¹ Fresnedo O., Gomez R., Serra JL. *FEBS Lett.* **1991**, 6;282(2):300-4.

⁸² Thompson G. *Biochim Biophys Acta.* **1996**, 1302(1):17–45

⁸³ Ledford H., Niyogi K. *Plant Cell Environ* **2005**, 28(8):1037–1045

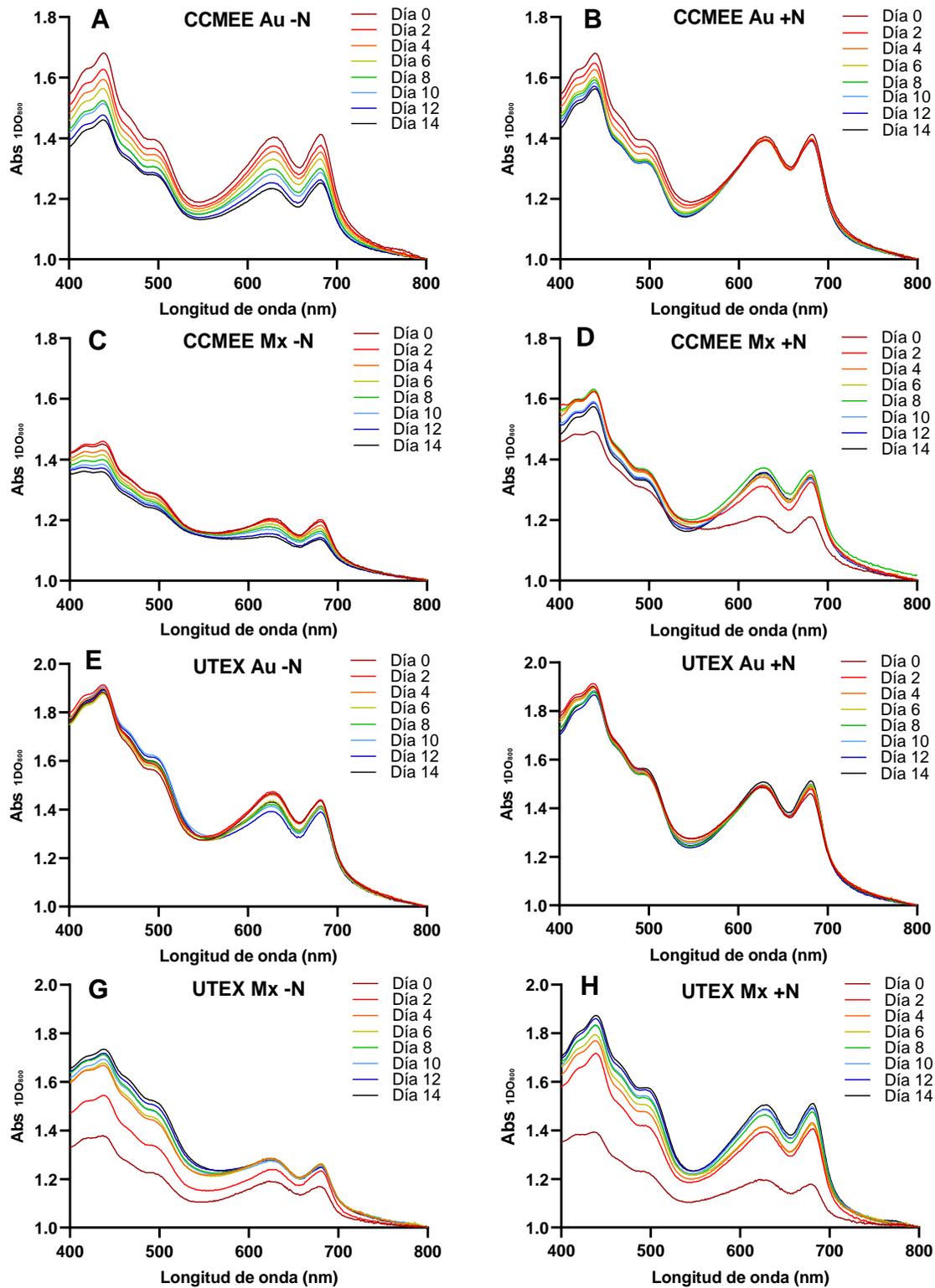


Figura 12-III. Perfil espectrofotométrico de los pigmentos fotosintéticos en *G. sulphuraria*. Representación de los espectros de absorción que presentan las cepas UTEX 2919 y CCMEE 5587 a través del tiempo en un rango de 400 a 800 nm. La longitud máxima de absorción para la ficocianina: 620 nm, clorofila A: 675 nm y carotenos: 465 nm. (n=3)



Estos resultados demuestran que la deficiencia de nitrógeno causa un decremento de clorofila, carotenos y ficocianina, en la cepa 5587, pero en la cepa 2919 hay un aumento de todos los pigmentos las primeras 48h es especial de los carotenoides. Por lo cual las cepas 5587 y 2919 muestran respuestas diferentes en la regulación de los principales pigmentos fotosintéticos, generado por el estrés que provoca la limitación de nitrógeno.

Evaluación de la ficocianina y el perfil de ficobiliproteínas mediante fluorescencia en cultivos -N y +N.

Adicionalmente, se realizó un estudio de emisión de fluorescencia excitando a 600 nm células completas de *G. sulphuraria* para obtener una señal que es emitida por la ficocianina de los cultivos +N y -N. El objetivo fue corroborar y validar las tendencias obtenidas a partir de datos espectrofotométricos.

En la **Figura 13-III A y B** se observa la cinética de emisión de fluorescencia de la ficocianina (652 nm) de la cepa 1929 y 5587. Los datos mostraron que al día 0 del ensayo, los cultivos Au arrojaron datos de fluorescencia en mayor proporción en comparación con los cultivos Mx. Estos datos muestran una tendencia similar con los valores de concentración de ficocianina al día 0 que se muestran en la **Fig. 9-III**, es decir, la concentración de ficocianina y la fluorescencia emitida por los cultivos Au son mayores en comparación con los datos obtenidos por los cultivos Mx, para ambos parámetros.

Por otra parte, los datos de velocidad de la emisión de fluorescencia de la cepa 5587 (**Fig. 13-III E**) mostraron el mismo comportamiento en el decaimiento de la fluorescencia a través del tiempo y se observó que los cultivos Au presentan una velocidad de decaimiento mayor en un 23% en comparación con los cultivos Mx de la cepa 5587. Este dato refleja una gran similitud con lo obtenido a partir de datos de la acumulación de la ficocianina (**Fig. 9-III**) donde los cultivos Au mostraron una velocidad de disminución en la concentración de ficocianina un 20% mayor que en comparación con los datos de los cultivos Mx.

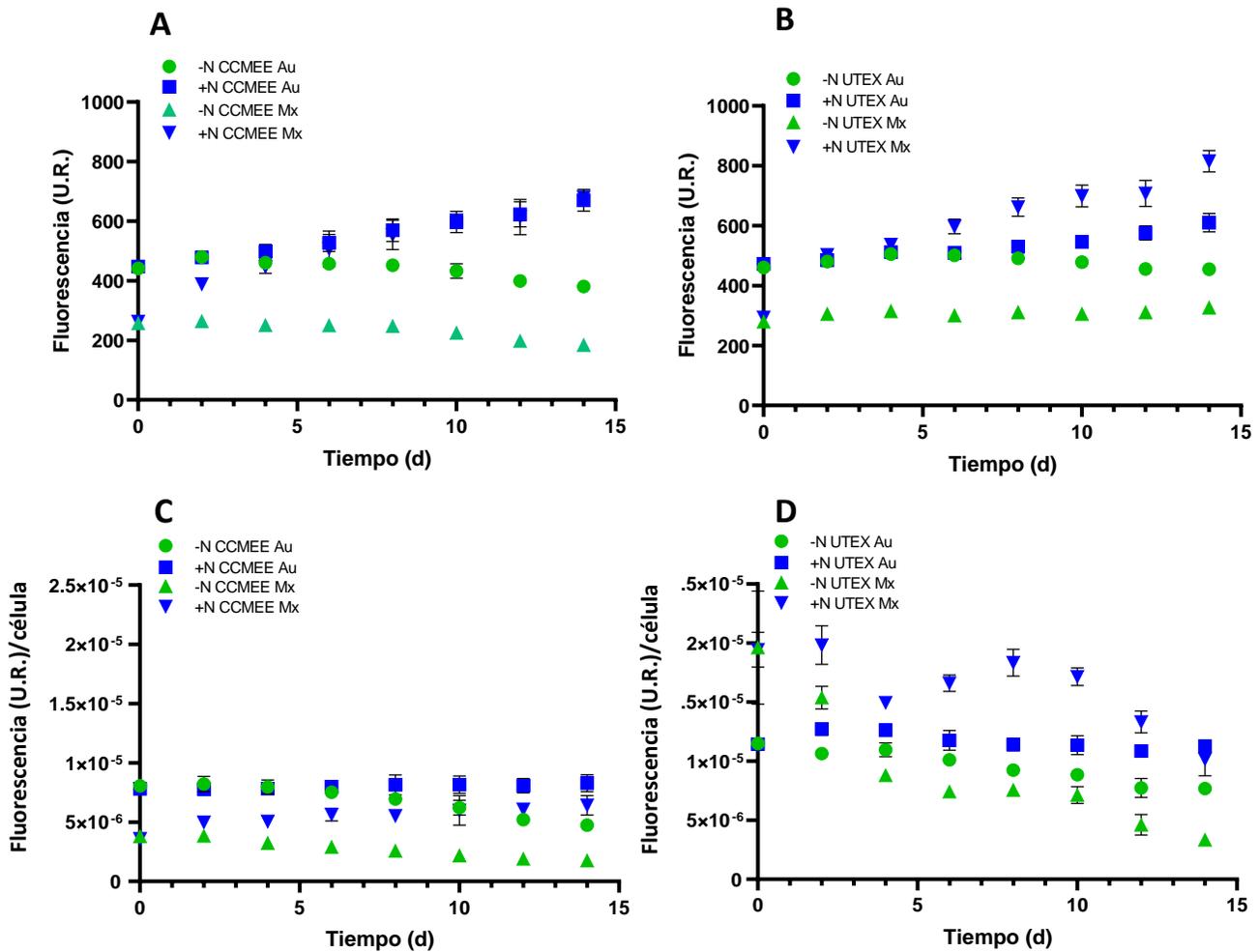


Figura 13-III. Fluorescencia de la ficocianina en condiciones de limitación por nitrógeno en *G. sulphuraria*. A. Gráfica de la emisión de fluorescencia de la ficocianina a 652 nm de la cepa 5587. B. Gráfica de la emisión de fluorescencia de la ficocianina a 652 nm 2919. C. Gráfica de fluorescencia por célula de la cepa 5587. D. Gráfica de fluorescencia por célula de la cepa 2919. Color azul representa cepas en cultivo con nitrógeno, Color verde muestra el comportamiento de los cultivos en inanición por nitrógeno. Au: Cultivos provenientes de biomasa autotrófica, Mx cultivos proveniente de biomasa mixotrófica. E. Parámetros de velocidad de fluorescencia inicial (Fi) y final (Fx), fluorescencia inicial (Fi/cel) y final por célula (Fx/cel), concentración de células al día 14 (Celx) y Velocidad de decaimiento de la fluorescencia. (n=3, P=0.05)



| Condiciones | F _i | V _F | F _x | F _i /Cel | V _F /cel | F _x /Cel |
|-------------|----------------|----------------------|----------------|------------------------|--|------------------------|
| | U.R. | U.R. d ⁻¹ | U.R. | U.R. Cel ⁻¹ | U.R. Cel ⁻¹ d ⁻¹ | U.R. Cel ⁻¹ |
| CCMEE Au -N | 441.3±8.6 | -8.40±0.59 | 380.9±29.7 | 8.06E-6±1.27E-7 | 3.47E-7±1.32E-08 | 4.73E-6±1.92E-7 |
| CCMEE Au +N | 447.4±2.2 | 16.84±2.01 | 670.2±37.9 | 7.80E-6±2.93E-7 | 4.00E-7±5.79E-08 | 8.29E-6±7.21E-7 |
| CCMEE Mx -N | 256.9±7.6 | -6.84±0.43 | 183.9±4.5 | 3.77E-6±2.16E-8 | 2.23 E-7±2.26E-08 | 1.74E-6±7.21E-7 |
| CCMEE Mx +N | 262.5±9.1 | 23.29±2.21 | 680.3±2.9 | 3.59E-6±1.20E-7 | 1.35E-7±4.33E-08 | 6.41E-6±3.10E-7 |
| UTEX Au -N | 460.2±11.3 | -6.30±1.10 | 455.6±87.6 | 1.15E-5±3.93E-7 | 3.20E-7±4.53E-08 | 7.68E-6±4.98E-8 |
| UTEX Au +N | 472.6±4.9 | 13.73±2.83 | 610.3±30.5 | 1.14E-5±3.08E-7 | 1.05E-7±6.14E-08 | 9.39E-6±8.27E-7 |
| UTEX Mx -N | 279.3±13.9 | 1.87±1.28 | 326.5±16.1 | 1.96E-5±4.79E-6 | -- | 3.34E-6±2.56E-7 |
| UTEX Mx +N | 293.6±7.5 | 31.14±1.67 | 815.4±36.1 | 1.94E-5±1.48E-6 | -- | 1.02E-5±1.40E-6 |

Tabla 7-III. Fluorescencia de la ficocianina en condiciones de inanición por nitrógeno en *G. sulphuraria*. A. Gráfica de la emisión de fluorescencia de la ficocianina a 652 nm de la cepa CCMEE 5587. B. Gráfica de la emisión de fluorescencia de la ficocianina a 652 nm UTEX2919. C. Gráfica de fluorescencia por célula de la cepa CCMEE 5587. D. Gráfica de fluorescencia por célula de la cepa UTEX 2919. Color azul representa cepas en cultivo con nitrógeno, Color verde muestra el comportamiento de los cultivos en inanición por nitrógeno. Au: Cultivos provenientes de biomasa autotrófica, Mx cultivos proveniente de biomasa mixotrófica. E. Parámetros de velocidad de fluorescencia inicial (Fi) y final (Fx), fluorescencia inicial (Fi/cel) y final por célula (Fx/cel), concentración de células al día 14 (Celx) y Velocidad de decaimiento de la fluorescencia. (n=3, P=0.05)



Por otra parte, los datos de fluorescencia de los cultivos 2919 mostraron una tendencia similar a los datos de concentración de ficocianina que se muestran en la **Fig. 9-III**, ya que la fluorescencia en los cultivos Mx -N aumento en un 16% al día 14, por lo cual, la curva de emisión de fluorescencia presenta una pendiente positiva en condiciones -N, lo que sugiere una mayor acumulación de ficocianina; mientras que en los cultivos Au -N se observó un incremento de la emisión solo durante los días 0 al 6 y posteriormente se observó una tendencia de disminución en la fluorescencia, obteniendo así una velocidad de decaimiento de 6.30 U.R. d^{-1} de cultivos Au -N de la cepa 2919 entre el día 6 al 14. Sin embargo, la cepa 5587 presenta una velocidad de decaimiento de 8.40 U.R. d^{-1} que es un 25 % mayor en comparación con los cultivos Au -N de la cepa 2919. Por lo cual, los datos obtenidos sugieren que en la cepa 5587 ocurre un fenómeno de disminución en la acumulación en la ficocianina mayor en comparación con la cepa 2919.

Con el objetivo de conocer la cantidad de fluorescencia que emite una célula con respecto al tiempo se tomaron los datos de fluorescencia y la concentración celular para hacer una relación como se observa en la **Fig. 12-III C y D**. Los datos indicaron que no hay diferencias significativas entre las células de los cultivos Mx -N y Au -N de la cepa 5587. Sin embargo, en la **Fig. 13-III D** se muestra que la emisión de fluorescencia que emite una célula de los cultivos Mx -N de la cepa 2919 no permitió el cálculo del parámetro de velocidad debido a que los datos obtenidos no se acoplaron con ninguna de las ecuaciones de velocidad de orden 0, 1 o 2.

Finalmente, las velocidades de decaimiento de la fluorescencia en una célula de los cultivos Au -N de las cepas 5587 y 1929 dieron como resultado $3.47E-7 \pm 1.32E-08$ y $3.20E-7 \pm 4.53E-08$, sin diferencia significativa.

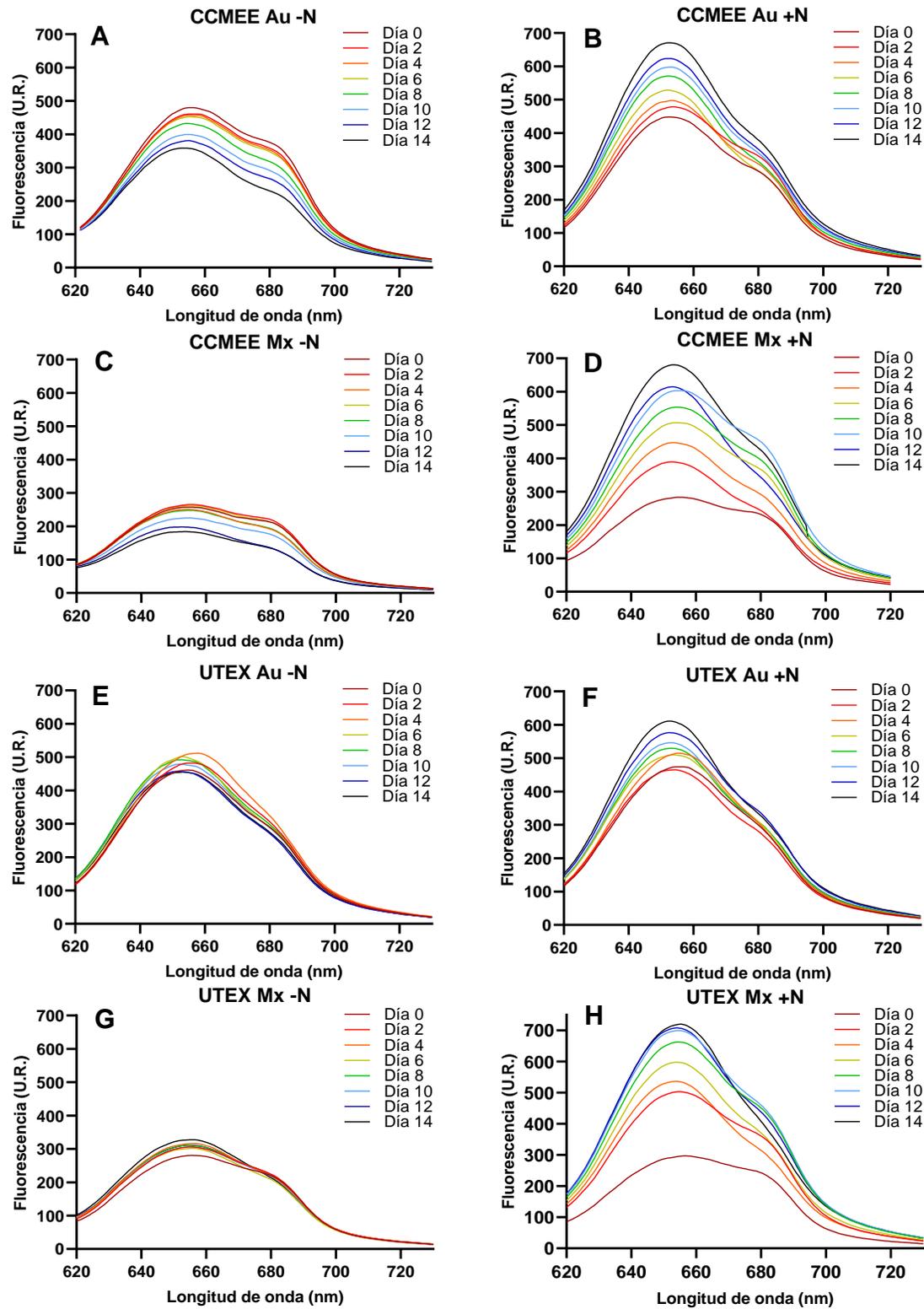


Figura 14-III. Perfil de fluorescencia de ficobiliproteínas en *G. sulphuraria*. Representación del espectro de emisión de fluorescencia de los cultivos de *G. sulphuraria* de las cepas UTEX 2919 y CCME 5587 excitados a una longitud de onda de 600nm, obteniendo emisiones de fluorescencia que corresponden a la ficocianina: 652 nm y aloficocianina: 680 nm. (n=3)



Como parte final de la caracterización del crecimiento y acumulación de ficocianina en cultivos +N y -N de las cepas 5587 y 2919 de *G. sulphuraria*, se analizó el perfil de ficobiliproteínas (ficocianina y aloficocianina) a través de tiempo con el propósito de analizar el comportamiento de estos pigmentos en los cultivos -N. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron a una longitud de onda de excitación de 600 nm; la emisión de luz de la ficocianina y la aloficocianina se rastrearon a una longitud de onda de 652 nm y 680 nm respectivamente.

En la **Figura 14-III B, D, F y H** se muestra el perfil de fluorescencia de las ficobiliproteínas con respecto al tiempo de los cultivos +N. Los cultivos en cada caso mostraron una tendencia de aumento en la fluorescencia a 652 nm y 680 nm. Sin embargo, una diferencia notable es que dentro de los cultivos Mx +N de ambas cepas se observó un aumento súbito durante las primeras 48 h del experimento.

En la **Fig. 14-III A, C, E y G** se muestra los espectros de emisión de los cultivos -N. Los datos presentados muestran que los cultivos -N de la cepa 5587 mostraron un decaimiento gradual de ambas ficobiliproteínas tanto en cultivos Mx y Au -N del día 0 al 14, pero este decaimiento en la fluorescencia fue más notorio en los cultivos Au -N, un comportamiento similar observado por Nagarajan en *Synechosystis sp.*⁸⁴ ya que durante las primeras 3 h en inanición por nitrógeno se observó una disminución de la fluorescencia en tanto en ficocianina como aloficocianina. Sin embargo, los cultivos de la cepa 2919 mostraron un comportamiento diferente, y es que el cultivo Mx -N mantiene un aumento gradual de la fluorescencia emitida a 652 y 680 nm hasta el día 14 del experimento. Por otra parte, la fluorescencia a 680 nm se mantuvo estable en ese periodo sin mostrar ningún proceso de disminución durante los 14 días, por el contrario, en los cultivos Au -N se observó que la emisión a 652 y 680 nm presenta un aumento en su señal del día 0 al 6, y después una disminución en la señal de ambas ficobiliproteínas del día 6 hasta el día 14.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio muestran que los datos de fluorescencia y concentración de ficocianina mantienen comportamientos parecidos entre si dentro de los cultivos de *G. sulphuraria*, es decir, los cultivos de la cepa

⁸⁴ Nagarajan, A., Zhou, M., Nguyen, A. Y., Liberton, et. al. **2019**, *Biomolecules*, 9(8), 374.



5587 presentan una mayor disminución en la acumulación de ficocianina y emisión de fluorescencia en comparación con los cultivos de la cepa 2919 que llegan a presentar fenómenos de aumento en la acumulación y emisión de fluorescencia de la ficocianina en cultivos -N, interesantemente en ninguna cepa en este trabajo se reportó que existiera una disminución mayor al 50% en los niveles de ficocianina al día 14. Una propuesta para explicar el ritmo bajo de degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria*, es que solo exista un fenómeno de degradación de la parte más externa del ficobilisoma que está compuesta por ficoeritrina. Sin embargo, como se observa en las **Figura A-3** del anexo, los niveles de ficoeritrina no presentan una reducción gradual con respecto al tiempo, lo que sugiere que la ficocianina y el ficobilisoma de *G. sulphuraria* tienen una gran estabilidad a pesar de la ausencia de nitrógeno.

Con los datos obtenidos en hasta este punto de la investigación, se sugiere que la degradación de ficocianina en la cepa 5587 es mayor en relación con la cepa 2919. Además, es importante destacar que la cantidad de ficocianina inicial es mayor dentro de los cultivos Au -N, fenómeno que puede estar asociado a que los cultivos Au pasaron por un proceso de autotrofia durante 7 días (como se observa en la **Figura 2-III**) tiempo suficiente para establecer el metabolismo autotrófico y sintetizar los componentes necesarios del ficobilisoma para la recolección de luz necesarias para la generación de ATP debido a la falta de carbono orgánico, asegurando tener una mayor cantidad de ficocianina disponible. Por lo cual, la célula pudo disponer de una mayor cantidad de ficocianina cuando se encuentra en estrés por falta de nitrógeno, lo que provocó que la velocidad en la disminución en la acumulación de ficocianina fuera mayor en comparación a los cultivos Mx -N. Estos resultados fueron cruciales para elegir la mejor condición para realizar el estudio transcripcional del gen *nbIA* en *G. sulphuraria*, ya que nuestra hipótesis sugiere que mientras la disminución de ficocianina sea mayor en condiciones de inanición por nitrógeno habrá una mayor expresión del gen *nbIA*. Por lo cual, las condiciones en las cuales se estudió el comportamiento transcripcional del gen *nbIA* fueron el día 0 y 8, debido a que se observó el comienzo de la degradación de ficocianina en la cepa 2919 (**Fig. 9-III C y D**).



conlleva una pérdida de función y se genera un fenotipo no blanqueador. Una mutación en el residuo K59 cerca del extremo carboxilo provoca una pérdida de la interacción entre la proteína NblA y la ficocianina. Por otra parte, se ha identificado que mutaciones en los aminoácidos 25 y 35 que no son altamente conservados, pero tienen una función estructural, también puede llevar a la pérdida de la función de la proteína NblA. Estos datos permiten inferir que la secuencia de la proteína NblA de *G. sulphuraria* 074W corresponde según su anotación en la base de datos y que posee los residuos elementales para llevar a cabo su función.

Debido al alto contenido de A-T en el gen (**Figura A-13** del anexo), los cebadores se diseñaron tan largos como fue posible para obtener una temperatura de alineamiento de aproximadamente de 50 °C. Para demostrar que los cebadores funcionan se realizó una PCR en tiempo final con el DNA genómico de las 5 cepas disponibles en el laboratorio. El resultado muestra una banda de un tamaño aproximado al esperado de 189 pb (**Figura 16-III**) que corresponde al tamaño del gen *nblA*, confirmando que se acumula un producto de PCR del tamaño esperado en las 5 cepas. Para demostrar que el producto de PCR obtenido contiene la secuencia del gen *nblA*, esta banda se clonó en el plásmido pJET 1.2 para generar el vector pJET *nblA*, como se muestra en la **Figura 17-III**, y además se muestran los resultados de las PCR de 18 colonias en donde 15 fueron positivas (308 pb).

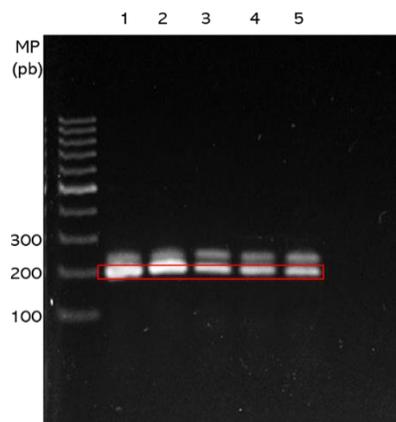


Figura 16-III. Gel del producto de PCR del gen *nblA*. Producto de la reacción utilizando los cebadores diseñados para la amplificación del gen *nblA* utilizando DNA de 5 cepas distintas de *G. sulphuraria*. Los productos marcados en rojo es el producto con un peso esperado 189 pb. 1. CCME 5587, 2. UTEX 2919, 3. SAG 107.79 4. SAG 108.79 5. SAG 21.92



Utilizando el producto de PCR obtenido del plásmido pJET 1.2 + *nblA* se llevó a cabo un ensayo con enzimas de restricción para evaluar mediante un gel de poliacrilamida su perfil de digestión, como se observa en la **Figura A-14** del anexo. Sin embargo, no se ha podido obtener la secuencia de nucleótidos que componen este producto debido a problemas presentados en la secuenciación.

El siguiente paso fue analizar la expresión del *nblA* mediante PCR a punto final. Como control de expresión constitutiva se utilizó el gen de la Histona 3 (NW_005178409). En la **Figura 18-III A**, se observa la expresión del gen Histona 3 en condiciones +N y -N a los días 0 y 8 de los cultivos. Inicialmente en la **Fig. 18-III A** los cultivos presentaron una cantidad basal del transcrito de *nblA* al día 0 del experimento, cuyos datos contrastan con los reportados con Nagarajan en 2019, en donde en cultivos de *Synechocystis sp.* en limitación de nitrógeno prácticamente no hay una cantidad basal de RNAm del gen *nblA* al inicio de los cultivos en limitación de nitrógeno.

Por otra parte, la cepa 5587 se presentó un aumento en los niveles de la expresión del transcrito en condiciones +N y -N, mientras que en la cepa 2919 solo se observó un aparente incremento de los niveles de transcrito de *nblA* en las condiciones -N como se esperaba, ya que se ha mostrado ha mostrado que existe una fuerte correlación entre la deprivación de nitrógeno y el aumento en la expresión de niveles de gen *nblA*, en *Synechocystis sp.* ^{46,80,89,49}

⁸⁹ Baier K., Nicklisch S., Grundner C., Reinecke J., Lockau W. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**,195(1):35-9

Por otra parte, se ha estudiado que la transcripción de *nbIA* se regula por estrés nutricional y se ha reportado anteriormente que la expresión de este gen se asocia a la presencia de L-metionina sulfoximina, que es un análogo de glutamato y en presencia de nitrógeno en el medio,⁹⁰ por lo cual la expresión de *nbIA* dentro de la cepa 5587 en condiciones +N podría hablar de producción de metabolitos intrínsecos de la célula que promuevan la acumulación de *nbIA* y tengan un efecto en el recambio proteínico para mantener su homeostasis. Sin embargo, no es significativa la acumulación de transcrito entre el día 0 y el 8 de los cultivos -N.

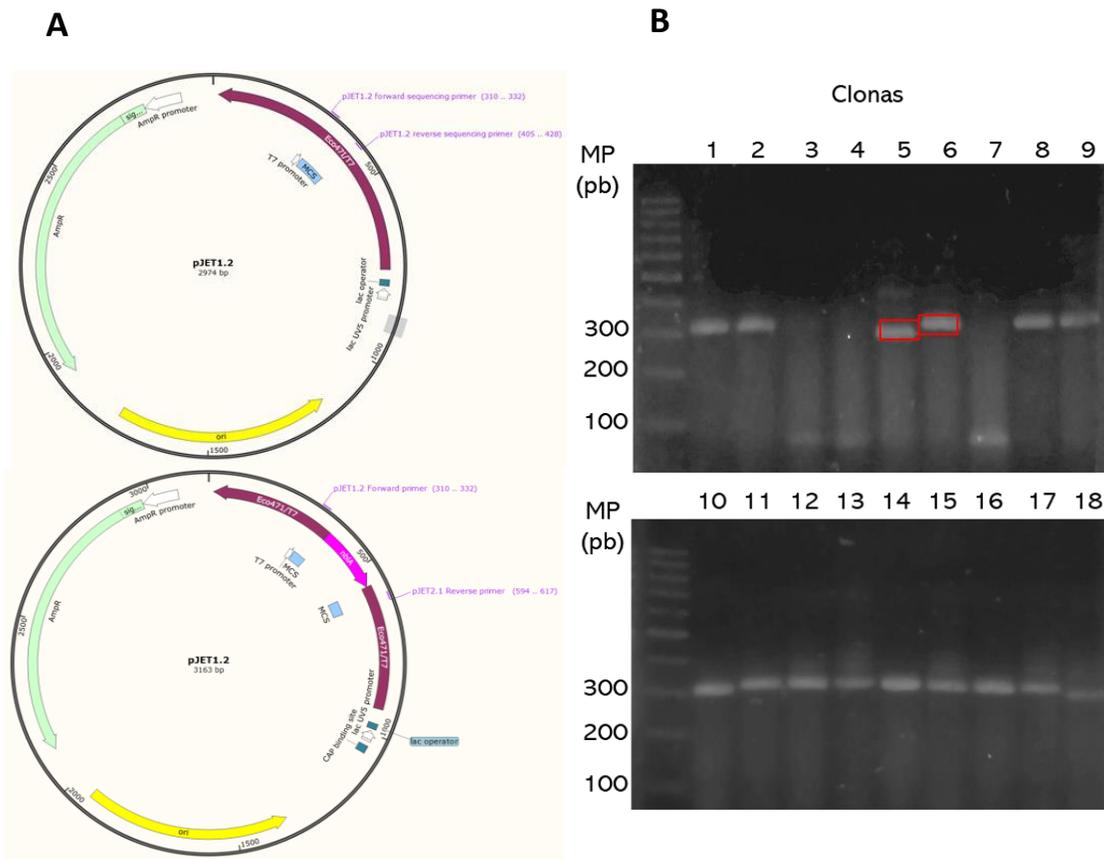


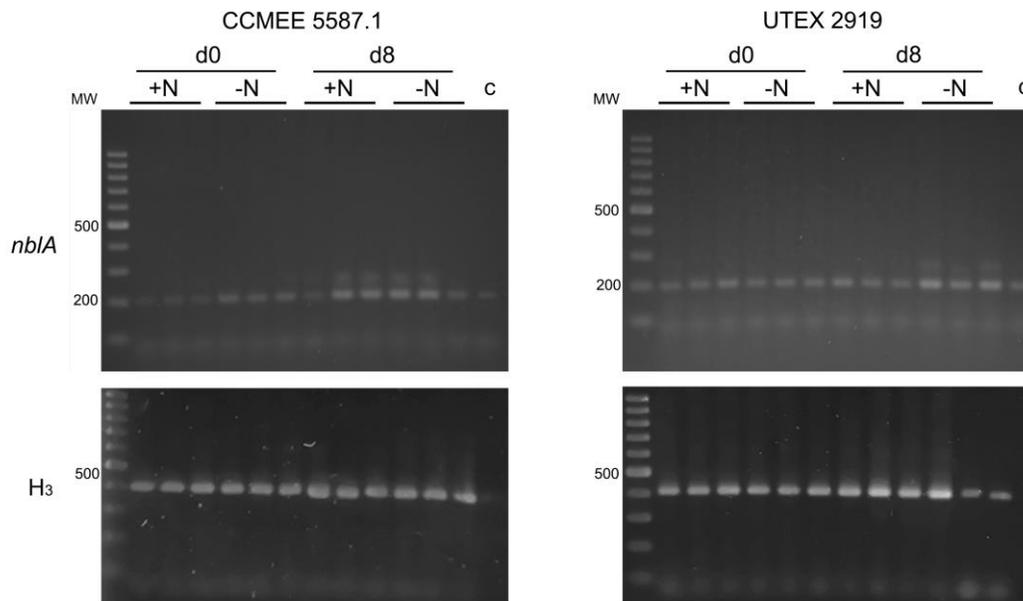
Figura 17-III. Vector de clonación, y características de los amplificadas positivas después de la transformación de cepas de *E. coli*. A. Esquema del vector de clonación antes y después de la inserción del gen *nbIA* al sistema pJET1.2. B. Geles de del producto de PCR para la verificación de clonas positivas.

⁹⁰ Sauer J, Gori M, Forchhammer K. *Arch Microbiol.* **1999**, 172(4):247-55.



Lo que sugiere que la limitación nitrógeno en estas cepas de *G. sulphuraria* no fue suficiente para llevar una degradación de ficocianina; como si lo es en cianobacterias en las cuevas su degradación es mayor al 70% en menos de 72 horas de inanición; lo que ha llevado a pensar que existen otros elementos reguladores que podrían estar participando en la degradación de la ficocianina, además de los componentes de la familia *nbl*.

A



B

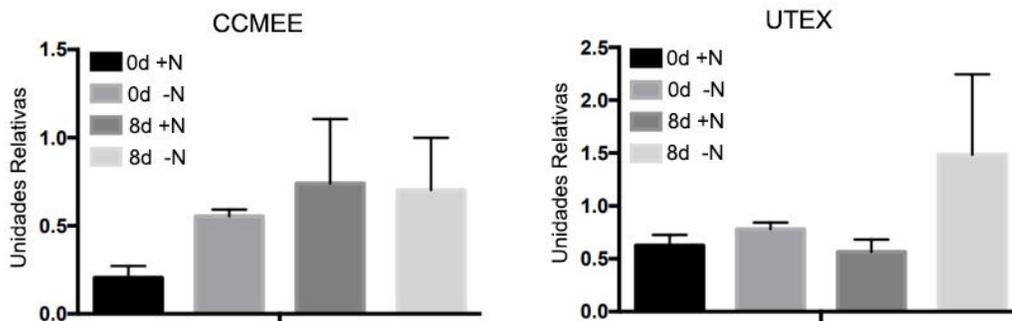


Figura 18-III. Perfil transcripcional del gen *nblA* en *G. sulphuraria*. A. Geles de los productos de PCR a punto final por triplicado del gen *nblA* en condiciones -N y +N, en los días 0 y 8 de los cultivos. H3 como control de expresión constitutiva. B. Gráficas de los niveles de expresión de *nblA* en condiciones -N y +N. (P=0.05 n=3)



Se realizó un análisis de la degradación de la ficocianina por perfil de geles SDS-PAGE en el día 0 y 8, de la cepa 2919 y 5587. Como se muestra en la **Figura 19-III** se observan las dos subunidades por las que conforman a la ficocianina: la subunidad α y β que tienen un peso aproximado de 17 y 18 kDa, respectivamente. Este análisis se hizo por triplicado (**Fig. 19-III A**).

Se observó en los cultivos +N de ambas cepas, un aumento en la cantidad de ficocianina. Esto concuerda con los datos mostrados, obtenidos con las técnicas espectrofotométricas y fluorescentes (**Fig. 9-III y 11-III**). Por otra parte, en los experimentos -N, particularmente en la cepa 5587 se apreció una ligera disminución de la ficocianina después de 8 días. En la cepa 2919 no se observó un cambio aparente en la concentración de ambas subunidades en condiciones -N.

Los resultados muestran que la ficocianina es una proteína que tiene una estabilidad alta en la condición de deprivación de nitrógeno en *G. sulphuraria*. Una observación interesante es que la diferencia en la relación entre la subunidad α y β de la ficocianina es los cultivos de la cepa 2919 es diferente, en donde la subunidad α se nota con una intensidad mayor en el SDS-PAGE.

Con base en los resultados de este trabajo podemos sugerir que no se está induciendo la expresión del gen *nblA* para llevar a cabo la degradación de la ficocianina en condiciones -N, o que existe una velocidad de recambio alto de la ficocianina que impida ver un cambio en la acumulación de esta ficobiliproteína.

Por otro lado, es importante saber si estas pequeñas diferencias observadas en la disminución de la ficocianina o el cambio que existe entre la relación de las subunidades de la ficocianina son suficiente para permitir el crecimiento y el mantenimiento de *G. sulphuraria* en esta condición de deprivación de nitrógeno, o exista otra proteína que se recambie y permita el crecimiento.

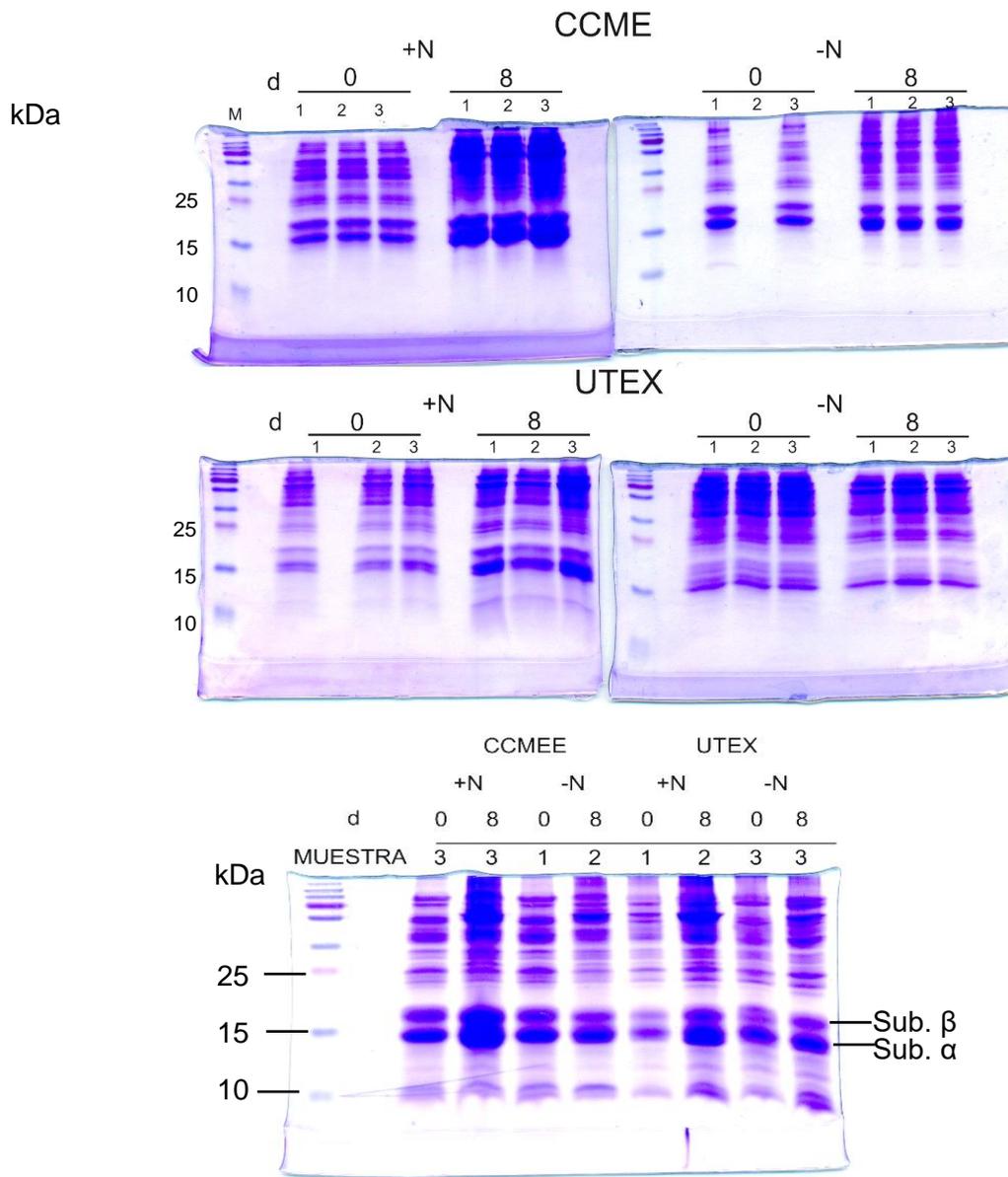


Figura 19-III. SDS-PAGE del extracto de proteínas total de *G. sulphuraria* en condiciones de privación de nitrógeno. A. Corridos por triplicado del extracto de proteína total de las muestras de *G. sulphuraria* en condiciones +N y -N a los días 0 y 8 del experimento. B. Muestras representativas de cada triplicado de las cepas UTEX 2919 y CCME 5587 en condiciones +N y -N a los días 0 y 8 del experimento.



3.6 Conclusiones

La degradación de la ficocianina en *G. sulphuraria* es un proceso lento en donde menos de la mitad de la ficocianina inicial se degrada dentro de los 14 días en inanición de nitrógeno, a pesar de esto las condiciones donde se llega a evidenciar un evento de degradación fue en los cultivos Au, donde las concentraciones de ficocianina inicial son mayores, mientras que en los cultivos Mx, pareciera que se favorece su síntesis. Esto es un punto de inflexión en el uso de *G. sulphuraria* como modelo para la obtención de ficocianina ya que además de las ventajas innatas que le confiere sus propiedades termo tolerantes, acidófilas y su gran diversidad metabólica, podemos decir que la ficocianina de esta alga es resistente a las condiciones de estrés provocadas por la deprivación de nitrógeno deprivación de -N.

La regulación de las ficobiliproteínas, clorofila y carotenos está regulada de manera diferente entre la cepa 5587 y 2919, ya que en la primera el estrés provocado por la privación de nitrógeno provoca la disminución de los principales pigmentos en especial en los cultivos Au, mientras que en la cepa 2919 parece haber un aumento de los pigmentos durante los primeros 6 días de cultivo en condiciones -N y un aumento de los carotenos hasta el día 14.

Los primeros datos del estudio transcripcional sugieren que no existe un aumento significativo del transcrito de *nblA* en condiciones de inanición de nitrógeno, lo que podría explicar la estabilidad de la ficocianina durante los primeros 8 días en deprivación de nitrógeno. Además, en el sistema SDS muestra que ambas subunidades de la ficocianina están presentes aun en cultivos -N y no se obtuvo ninguna evidencia de la existencia de una banda de 7 kDa, que es lo que se estima que pesa la proteína NblA de *G. sulphuraria* en condiciones de inanición por nitrógeno.



Bibliografía

1. Guiry, M.D., & Guiry, G.M. 19 August 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on
2. Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawłowski, J., ... Spiegel, F.W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429–493.
3. Freshwater, D.W., Fredericq, S., Butler, B.S., Hommersand M.H. Chase M. W. (1994) A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7281-7285
4. Van Den Hoek C., Mann D. G. H. M. Jahns. (1997) *Algae. An Introduction to Phycology*. *European Journal of Phycology*, 32. 203-205.
5. Yoon, H.S., Müller, K.M., Sheath, R.G., Ott, F.D., Bhattacharya, D. (2006), Defining the major lineages of red algae (rhodophyta). *Journal of Phycology*, 42, 482-492.
6. Domozych, D. (2019). *Algal Cell Walls*. eLS, 1–11.
7. Schönknecht, G., Chen, W.H., Ternes, C.M., Barbier, G.G., Shrestha, R.P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B.J., Banfield, J. F., Garavito, R.M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S.A., Gagneul, D., Dickenson, N.E., Oesterhelt, C., Lercher, M.J., & Weber, A.P. (2013). Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science*, 339(6124), 1207–1210.
8. Oesterhelt, C., & Gross, W. (2002). Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant physiology*, 128(1), 291–299.
9. Oesterhelt, C., & Gross, W. (1999). Ecophysiological Studies on the Red Alga *Galdieria sulphuraria* Isolated from Southwest Iceland. *Plant Biology*, 1(6), 694-700.
10. Weber, A.P.M., Oesterhelt, C., Gross, W., Bräutigam, A., Imboden, L., Krassovskaya, I., Linka, N., et al. (2004). EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Molecular Biology*, 55(1), 17-32.
11. Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and bioengineering*, 90(1), 77–84.



12. Graverholt, O. S., & Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 69–75.
13. Doucha J., Lívanský K. (2011) Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal of Applied Phycology*, 24(1), 35-43.
14. Mozaffari, K., Seger, M., Dungan, B., Hanson, D.T., Lammers, P.J., Holguin, F.O. (2019) Alterations in photosynthesis and energy reserves in *Galdieria sulphuraria* during corn stover hydrolysate supplementation. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100269.
15. Sloth J.K., Jensen C.H., Pleissner D., Eriksen N.T., (2017) Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. *Bioresource Technology*. 238, 296-305.
16. Selvaratnam, T., Pegallapati, A. K., Montelya, F., Rodriguez, G., Nirmalakhandan, N., Van Voorhies, W., & Lammers, P. J. (2014). Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, *Galdieria sulphuraria*, for nutrient removal from urban wastewaters. *Bioresource technology*, 156, 395–399.
17. Liu H.B., Koh K.P., Kim J.S., Seo Y., Park S. (2008) The effects of betonicine, floridoside, and isethionic acid from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* on quorum-sensing activity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 458–463.
18. Jeong, M., Yong-Xin, K., Pradeep, L., BoMi, D., Se-Kwon, R., Kim (2013) Floridoside suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia. *BMB reports*, 46(8), 398-403
19. Sloth J.K., Wiebe M.G., Eriksen N.T. (2006) Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 168-175.
20. Sarian F.D., Rahman D.Y., Schepers O., van der Maarel M.J.E.C. (2016) Effects of Oxygen Limitation on the Biosynthesis of Photo Pigments in the Red Microalgae *Galdieria sulphuraria* Strain 074G. *PLOS ONE* 11(2).
21. Eriksen N.T. (2016) Research Trends in the Dominating Microalgal Pigments, β -carotene, Astaxanthin, and Phycocyanin Used in Feed, in Foods, and in Health Applications. *Journal of Nutrition and food sciences*, 6(3).
22. Pushparaj, B., Pelosi, E., Tredici, M.R. et al. (1997) An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 9, 113–119.
23. Carlozzi P. (2003). Dilution of solar radiation through "culture" lamination in photobioreactor rows facing south-north: a way to improve the efficiency of light



utilization by cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnology and bioengineering*, 81(3), 305–315.

24. Zittelli, G.C., Tomasello, V., Pinzani, E. et al. (1996) Outdoor cultivation of *Arthrospira platensis* during autumn and winter in temperate climates. *Journal Applied Phycology* 8, 293–301.

25. Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., & Pollio, A. (2013). Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & function*, 4(1), 144–152.

26. Eriksen N. T. (2008). Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 1–14.

27. Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Cheverri J. (2014) Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11, 375-392.

28. Hussein, M.M., Ali, H.A., Ahmed, M.M. (2015). Ameliorative effects of phycocyanin against gibberellic acid induced hepatotoxicity. *Pesticide biochemistry and physiology*, 119, 28–32.

29. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed research international*, 2013, 742859.

30. Romay, C. h., González, R., Ledón, N., Ramirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein & peptide science*, 4(3), 207–216.

31. Ďuračková Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*, 59(4), 459–469.

32. Pleonsil, P., Soogarun, S., & Suwanwong, Y. (2013). Antioxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. *International journal of biological macromolecules*, 60, 393–398.

33. McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 370(9598), 1560–1567.

34. Venil, C.K., Zakaria Z.A., ahmad W.Z. (2013) Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

35. Christaki E, Bonos E, Florou-Paneri P.: Kim SK (ed.) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, London, UK, 2015.



36. Kathiravan, A., Chandramohan, M., Renganathan, R. and Sekar, S. (2009) Spectroscopic Studies on the Interaction between Phycocyanin and Bovine Serum Albumin. *Journal of Molecular Structure*, 919, 210-214.
37. Sekar, S.; Chandramohan, M., (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents, and commercialization. *J. Appl. Phycol.*, 20:113-136.
38. Bearden, A. J., & Malkin, R. (1974). Primary photochemical reactions in chloroplast photosynthesis. *Quarterly reviews of biophysics*, 7(2), 131–177.
39. McConnell, M. D., Koop, R., Vasil'ev, S., & Bruce, D. (2002). Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition. *Plant physiology*, 130(3), 1201–1212.
40. Kehoe D. M. (2010). Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9029–9030.
41. Mullineaux C. W. (2008). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 95(2-3), 175–182.
42. Singh, N. K., Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D. (2015). The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *EXCLI journal*, 14, 268–289.
43. Zhang, J., Ma, J., Liu, D. et al. (2017) Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature* 551, 57–63.
44. Kikuchi, H., Wako, H., Yura, K., Go, M., & Mimuro, M. (2000). Significance of a two-domain structure in subunits of phycobiliproteins revealed by the normal mode analysis. *Biophysical journal*, 79(3), 1587–1600.
45. hang WR, Jiang T, Wan ZL, Zhang JP, Yang ZX, Liang DC. Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1996 Oct 11;262(5), 721-31.
46. Brejc K, Ficner R, Huber R, Steinbacher S. (1995) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. Jun 2;249(2), 424-40.
47. Stec B, Troxler RF, Teeter MM. (1999) Crystal structure of C-phycoerythrin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophysical Journal*. Jun;76(6), 2912-21.



48. Muramatsu, M., & Hihara, Y. (2012). Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. *Journal of plant research*, 125(1), 11–39.
49. Ashby, M. K., & Houmard, J. (2006). Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70(2), 472–509.
51. Wilde, A., & Hihara, Y. (2016). Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(3), 296–308.
52. Mikami K., Kanesaki Y., Suzuki I. (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, 46(4), 905–915
53. Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, 183–215.
54. Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1994). A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *The EMBO journal*, 13(5), 1039–1047.
55. Bienert, R., Baier K., Volkmer, R., Lockau, W., Heinemann. U. (2006) Crystal Structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a Small Protein Playing a Key Role in Phycobilisome Degradation. *The journal of biological chemistry*, 281(8), 5216 – 5223.
56. Sendersky, E., Kozler, N., Levi, M., Garini, Y., Shav-Tal, Y., & Schwarz, R. (2014). The proteolysis adaptor, NblA, initiates protein pigment degradation by interacting with the cyanobacterial light-harvesting complexes. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 79(1), 118–126.
57. Baier, A., Winkler, W., Korte, T., Lockau, W., & Karradt, A. (2014). Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: evidence for essential formation of an NblA1/NblA2 heterodimer and its codegradation by A Clp protease complex. *The Journal of biological chemistry*, 289(17), 11755–11766.
58. Dines, M., Sendersky, E., David, L., Schwarz, R., & Adir, N. (2008). Structural, functional, and mutational analysis of the NblA protein provides insight into possible modes of interaction with the phycobilisome. *The Journal of biological chemistry*, 283(44), 30330–30340.
59. Kato, H., Chibazakura, T., Yoshikawa, H. (2008) NblR Is a Novel One-Component Response Regulator in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(4, 23), 1072–1079.



60. Sinetova MP, Markelova AG, Los DA. (2006) The effect of nitrogen starvation on the ultrastructure and pigment composition of chloroplasts in the acidothermophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. Russian Journal of Plant Physiology volume 53, pages153–162.
61. Gross, W., Schnarrenberger, C. (1995) Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*, Plant and Cell Physiology, 36(4), 633–638.
62. Mishra SK, Shrivastav A, Mishra S. (2011) Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. Protein Expression and Purification. 80(2), 234-238.
63. Moon M., Mishra S.K., Kim, C.W., Suh, W.I., Park, M.S., Yang, J.W. (2014) Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. Korean Journal of Chemical Engineering 31(3), 490-495.
64. Baier, K., Lehmann, H., Stephan, D.P., Lockau, W. (2004) NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. Microbiology, 150, 2739–2749.
65. Olinares, P.D., Kim, J., & van Wijk, K.J. (2011). The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. Biochimica et biophysica acta, 1807(8), 999–1011.
66. Peltier, J. B., Ripoll, D. R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., Giacomelli, L., Pillardy, J., & van Wijk, K. J. (2004). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. The Journal of biological chemistry, 279(6), 4768–4781.
67. Hirooka, S., & Miyagishima, S. Y. (2016). Cultivation of Acidophilic Algae *Galdieria sulphuraria* and *Pseudochlorella* sp. YKT1 in Media Derived from Acidic Hot Springs. Frontiers in microbiology, 7, 2022.
68. López García de Lomana, A., Schäuble, S., Valenzuela, J., Imam, S., Carter, W., Bilgin, D. D., Yohn, C. B., Turkarlan, S., Reiss, D. J., Orellana, M. V., Price, N. D., & Baliga, N. S. (2015). Transcriptional program for nitrogen starvation-induced lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology for biofuels, 8, 207.
69. Curien, G., Lyska, D., Guglielmino, E., Westhoff, P., Janetzko, J., Tardif, M., Hallopeau, C., Brugière, S., Dal Bo, D., Decelle, J., Gallet, B., Falconet, D., Carone, M., Remacle, C., Ferro, M., Weber, A. P. M., & Finazzi, G. (2021). Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism. The New phytologist, 231(1), 326–338.



70. Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., & Li, Y. (2016). A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource technology*, 218, 272–278.
71. Ashby, M. K., & Houmard, J. (2006). Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70(2), 472–509.
72. Muramatsu, M., & Hihara, Y. (2012). Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. *Journal of plant research*, 125(1), 11–39.
73. Boussiba, S., Richmond, A.E. (1980) C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125, 143–147
74. Görl, M., Sauer, J., Baier, T., & Forchhammer, K. (1998). Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 9), 2449–2458.
75. Lahmi, R., Sendersky, E., Perelman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K., & Schwarz, R. (2006). Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of bacteriology*, 188(14), 5258–5265.
76. Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., & Thomas, J. C. (2001). Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 183(10), 2989–2994.
77. Krasikov, V., Aguirre von Wobeser, E., Dekker, H. L., Huisman, J., & Matthijs, H. C. (2012). Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiologia plantarum*, 145(3), 426–439.
78. Kim, S. H., Liu, K. H., Lee, S. Y., Hong, S. J., Cho, B. K., Lee, H., Lee, C. G., & Choi, H. K. (2013). Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. *PloS one*, 8(9), e72415.
79. Solovchenko, A., Lukyanov, A., Solovchenko, O., Didi-Cohen, S., Boussiba, S. and Khozin-Goldberg, I. (2014), Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804. *European Journal Lipid Sciences and Technology* 116: 635-644.
80. Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L.A. Gleadow, R., Beardall J. (2016) Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1509–1520.



81. Fresnedo, O., Gomez, R., & Serra, J. L. (1991). Carotenoid composition in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Effect of nitrogen starvation. FEBS letters, 282(2), 300–304.
82. Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1302(1), 17–45.
83. Ledford, H. K., & N b, K. K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. Plant, Cell and Environment, 28(8), 1037–1045.
84. Nagarajan, A., Zhou, M., Nguyen, A. Y., Liberton, M., Kedia, K., Shi, T., Piehowski, P., Shukla, A., Fillmore, T. L., Nicora, C., Smith, R. D., Koppenaar, D. W., Jacobs, J. M., & Pakrasi, H. B. (2019). Proteomic Insights into Phycobilisome Degradation, A Selective and Tightly Controlled Process in The Fast-Growing Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. Biomolecules, 9(8), 374.
85. Baier, K., Lehmann, H., Stephan, D. P., & Lockau, W. (2004). NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. Microbiology (Reading, England), 150(Pt 8), 2739–2749.
86. Sendersky, E., Lahmi, R., Shaltiel, J., Perelman, A., & Schwarz, R. (2005). NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. Molecular Microbiology, 58(3), 659–668.
87. van Waasbergen, L. G., Dolganov, N., & Grossman, A. R. (2002). nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Journal of bacteriology, 184(9), 2481–2490.
88. Lahmi, R., Sendersky, E., Perelman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K., & Schwarz, R. (2006). Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Journal of bacteriology, 188(14), 5258–5265.
89. Baier, K., Nicklisch, S., Grundner, C., Reinecke, J., & Lockau, W. (2001). Expression of two nblA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803. FEMS microbiology letters, 195(1), 35–39.
90. Sauer, J., Gorl, M., & Forchhammer, K. (1999). Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. Archives of microbiology, 172(4), 247–255.



4. Anexo

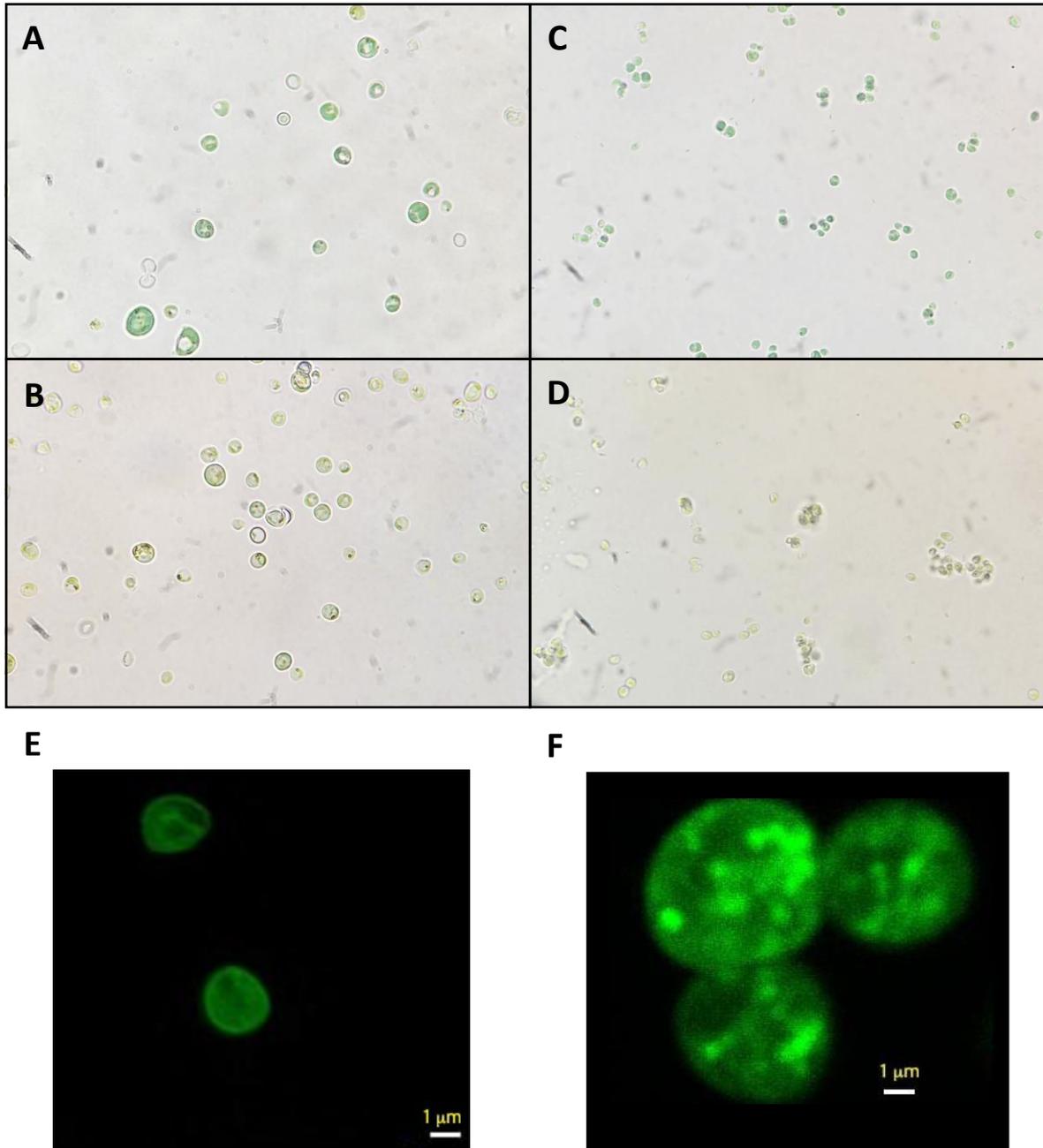


Figura A-1. Diferencias microscópicas de las células de *G. sulphuraria* en cultivos +N y -N de las cepas CCME 5587 y UTEX 2919. A. Células de UTEX 2919 en cultivos +N, B. Células de UTEX 2919 en cultivos -N, C. Células de CCME 5587 en cultivos +N, D. Células de CCME 5587 en cultivos -N. Aumento 1000X E. Microscopía de fluorescencia de células de CCME 5587 en cultivos Autotróficos. F Microscopía de fluorescencia de células UTEX 2919 en cultivos autotróficos.

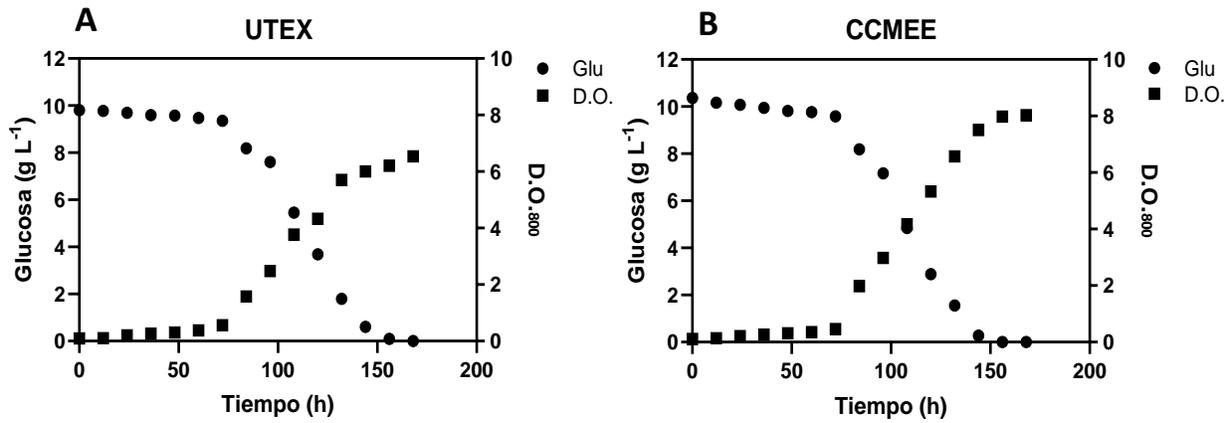


Figura A-2. Cinética de crecimiento de los cultivos mixotróficos de las cepas CCME 5587 y UTEX 2919. A, B. Crecimiento de los cultivos de ambas cepas empezadas a 0.1 D.O._{0.800}, con Glucosa como fuente de carbono y en condiciones de luz constante de 140 mEm⁻² s⁻¹. Círculo representa la concentración de glucosa y los cuadrados representan el aumento en la D.O.

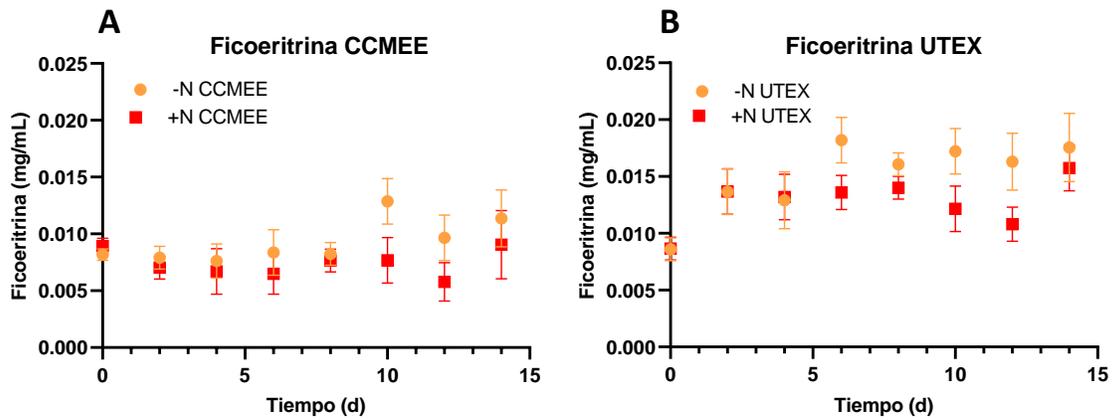


Figura A-3. Título de ficoeritrina en los cultivos Au de *G. sulphuraria*. CCME 5587 y UTEX 2919.

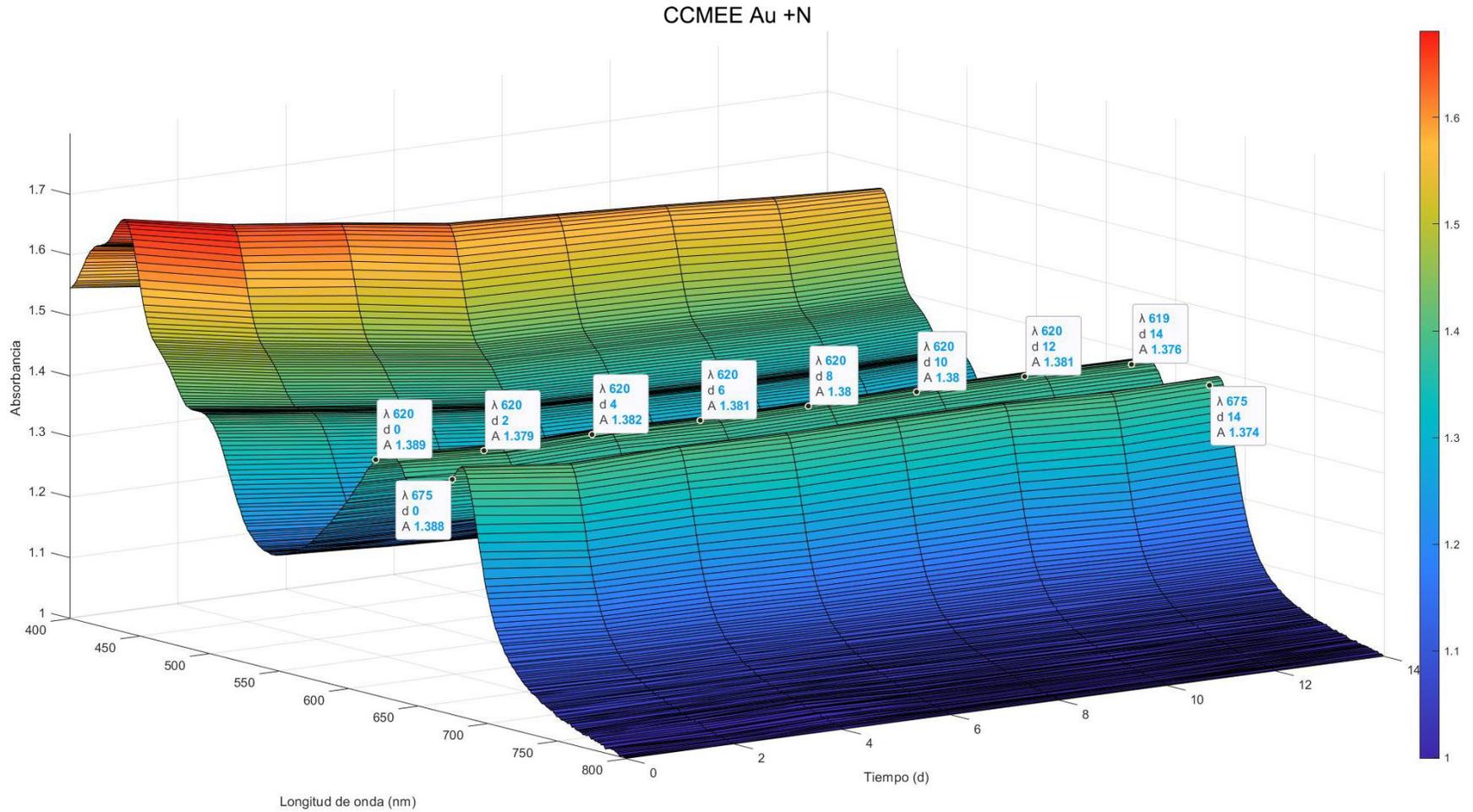


Figura A-4. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Au +N de la cepa CCMEE 5587. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivo CCMEE Au +N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3) .

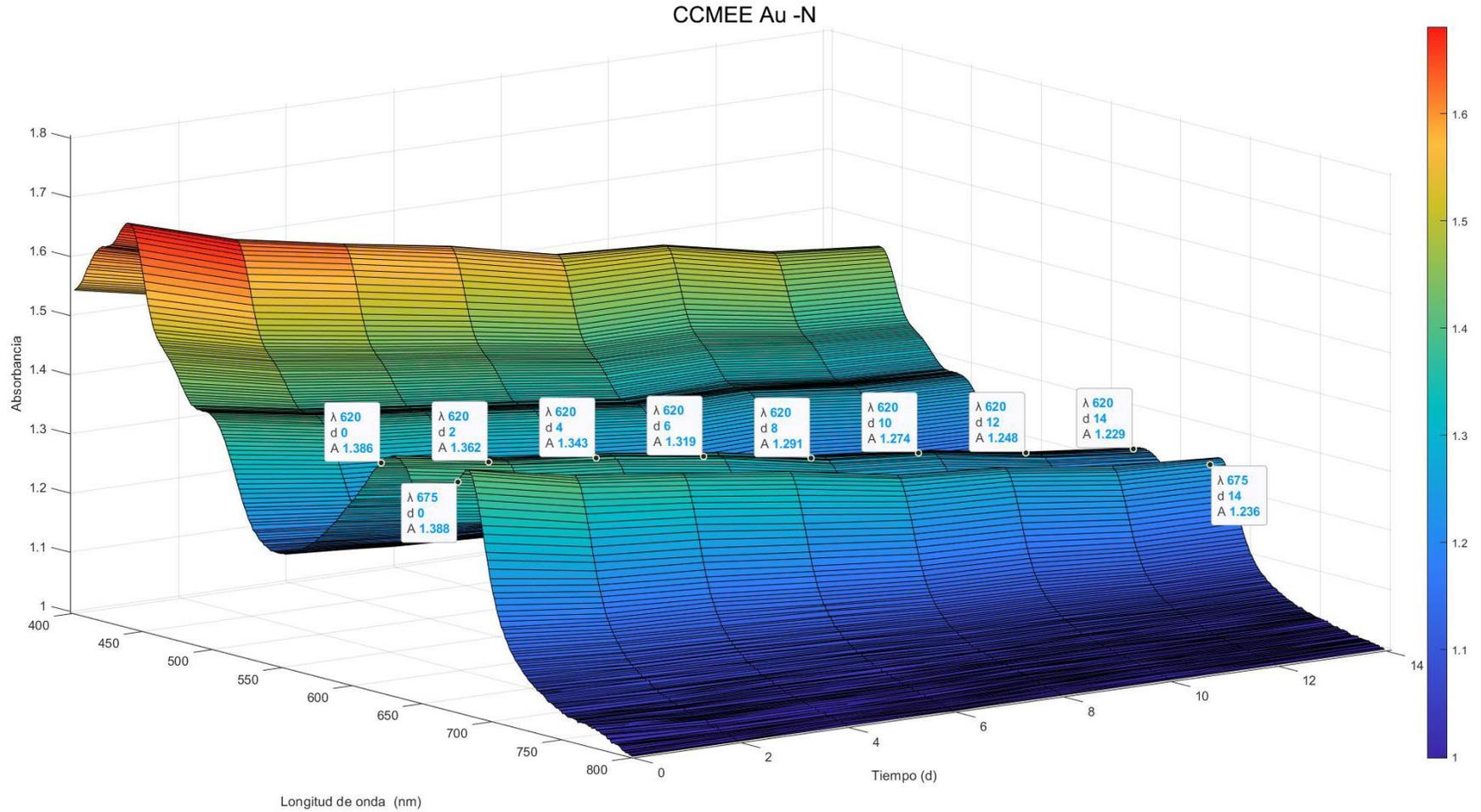


Figura A-5. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Au -N de la cepa CCMEE 5587. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos CCMEE Au -N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 675 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

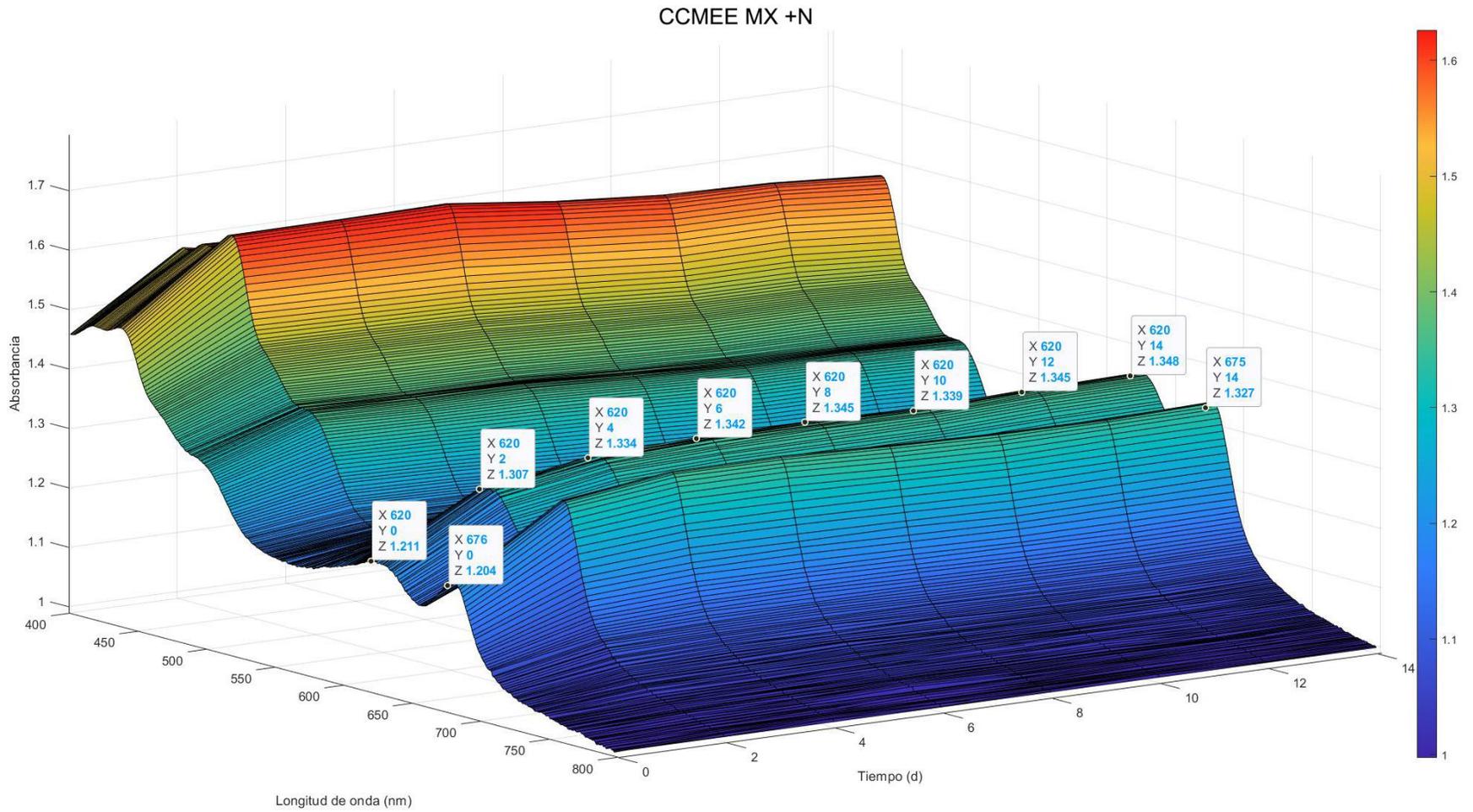


Figura A-6. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Mx +N de la cepa CCMEE 5587. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos CCMEE Mx +N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 675 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

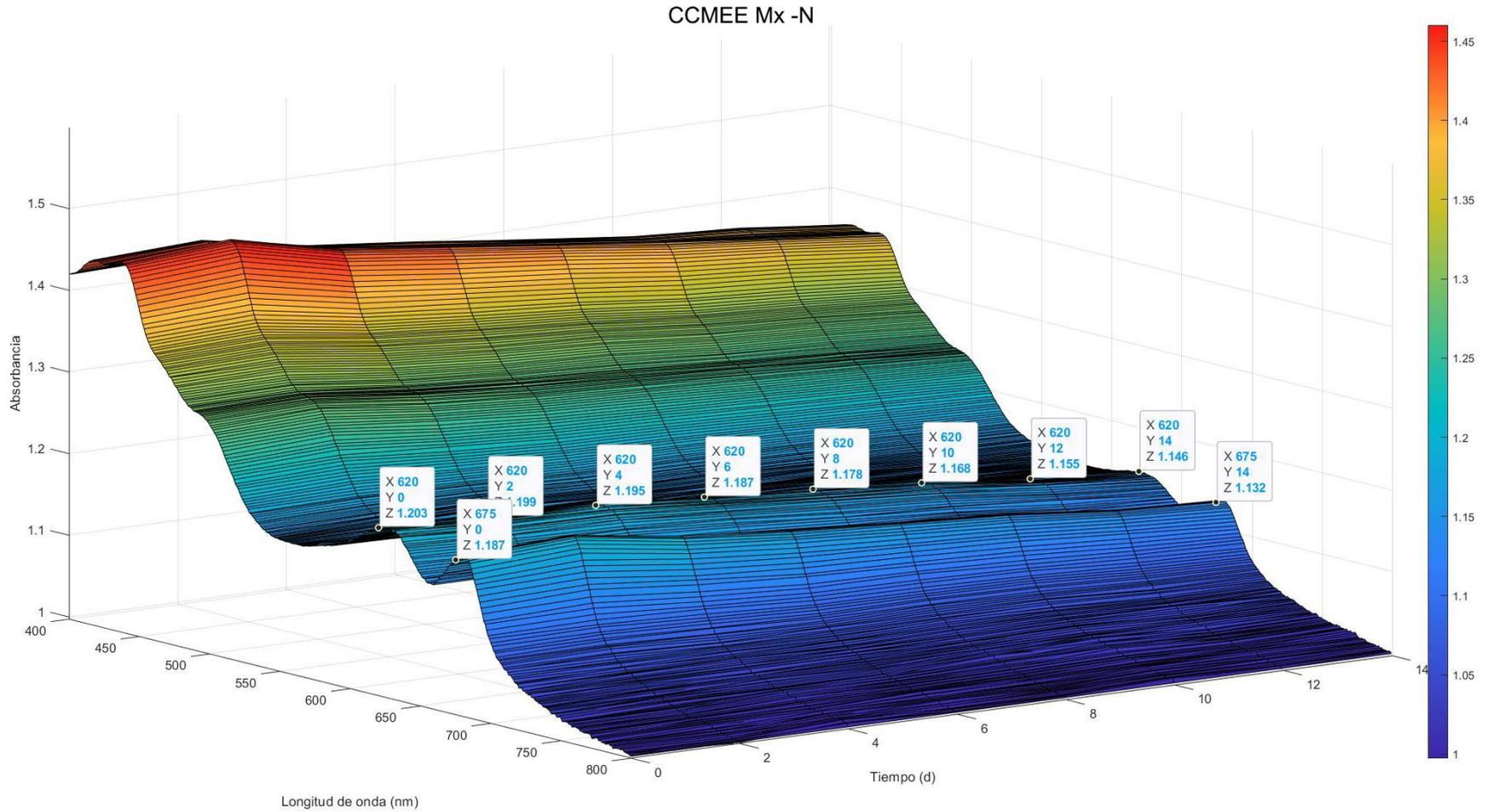


Figura A-7. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Mx -N de la cepa CCMEE 5587. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos CCMEE Mx -N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

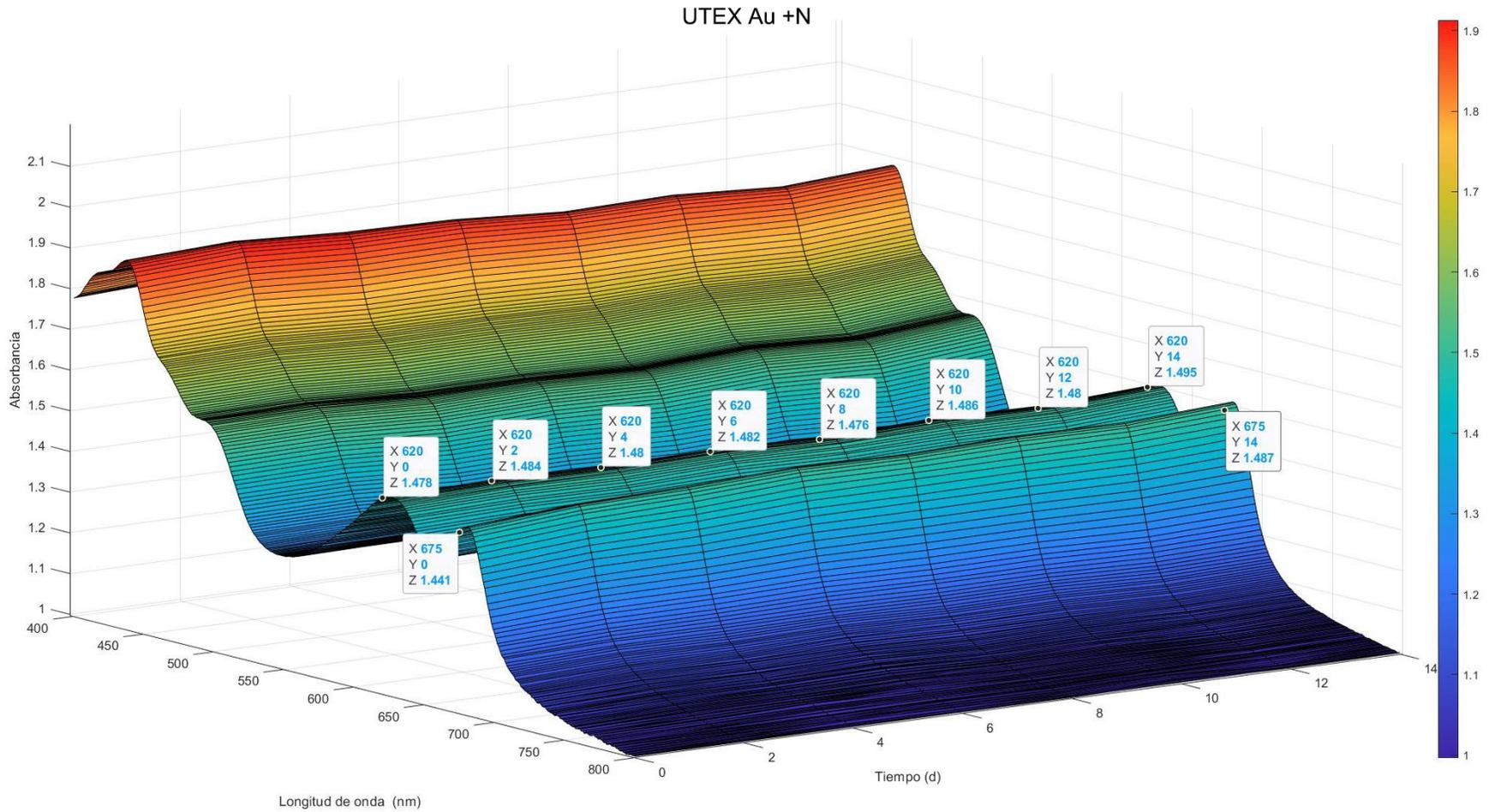


Figura A-8. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Au +N de la cepa UTEX 2919. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos UTEX Au +N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

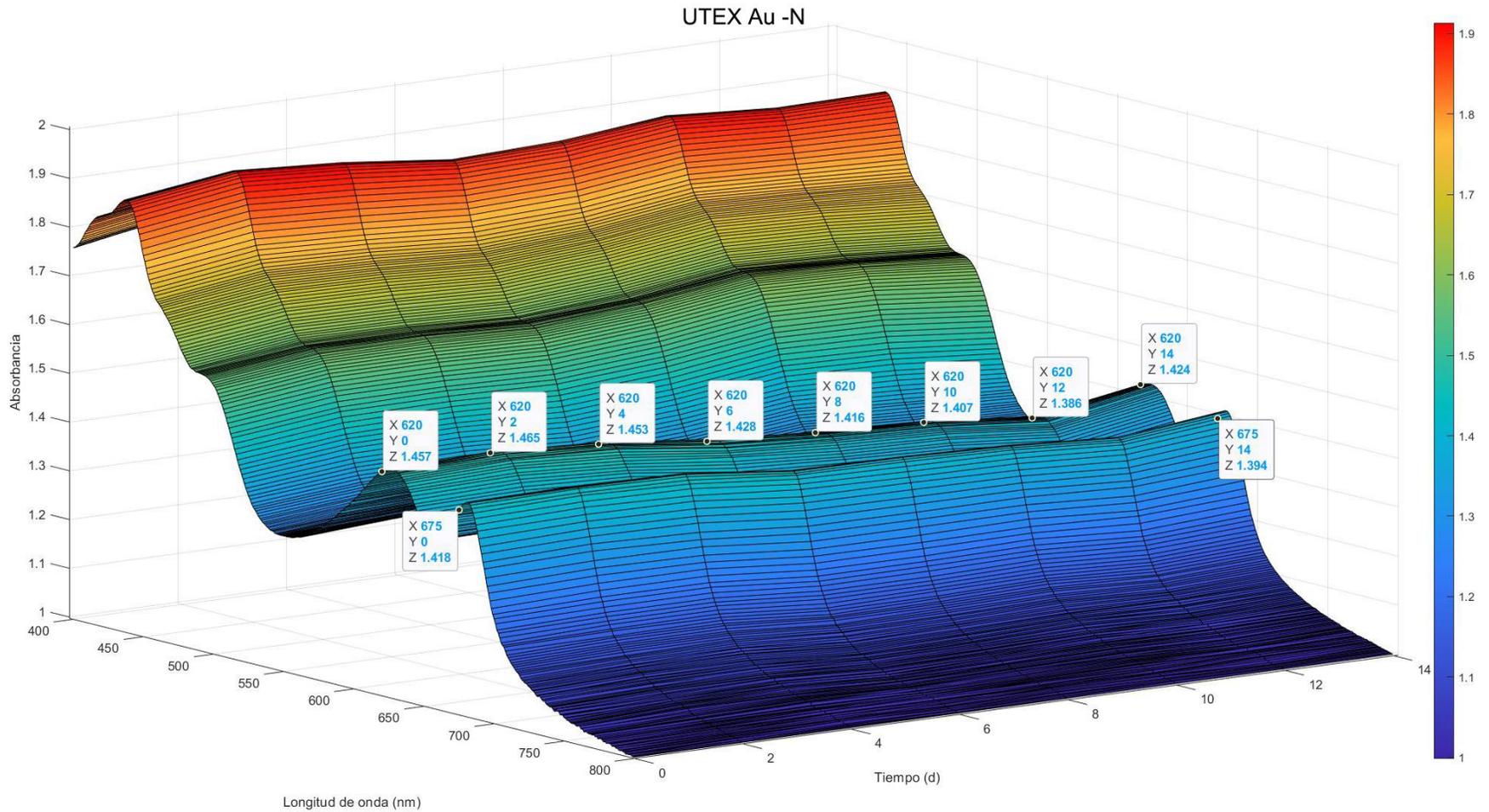


Figura A-9. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Au -N de la cepa UTEX 2919. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos UTEX Au -N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

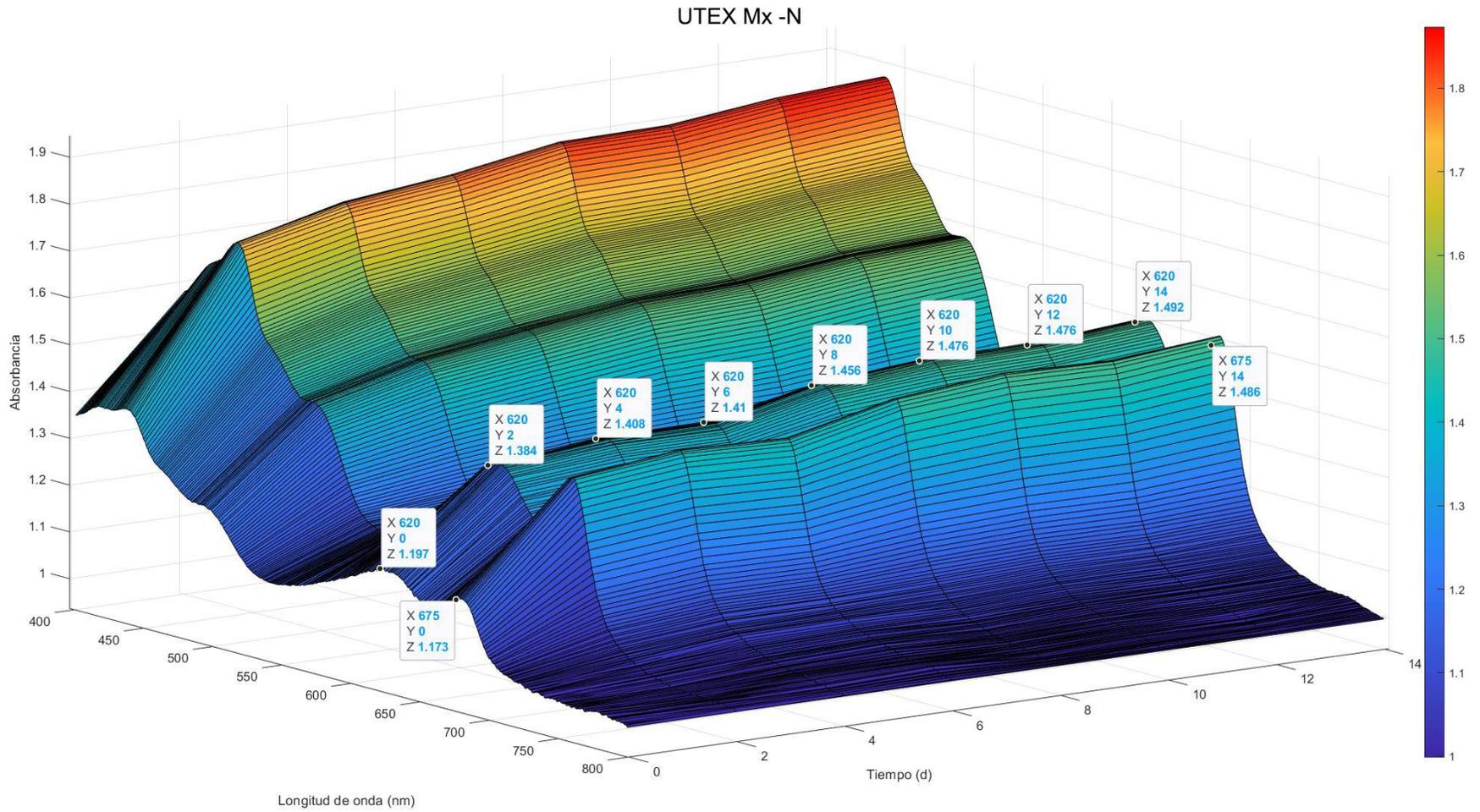


Figura A-10. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Mx +N de la cepa UTEX 2919. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos UTEX Mx +N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).

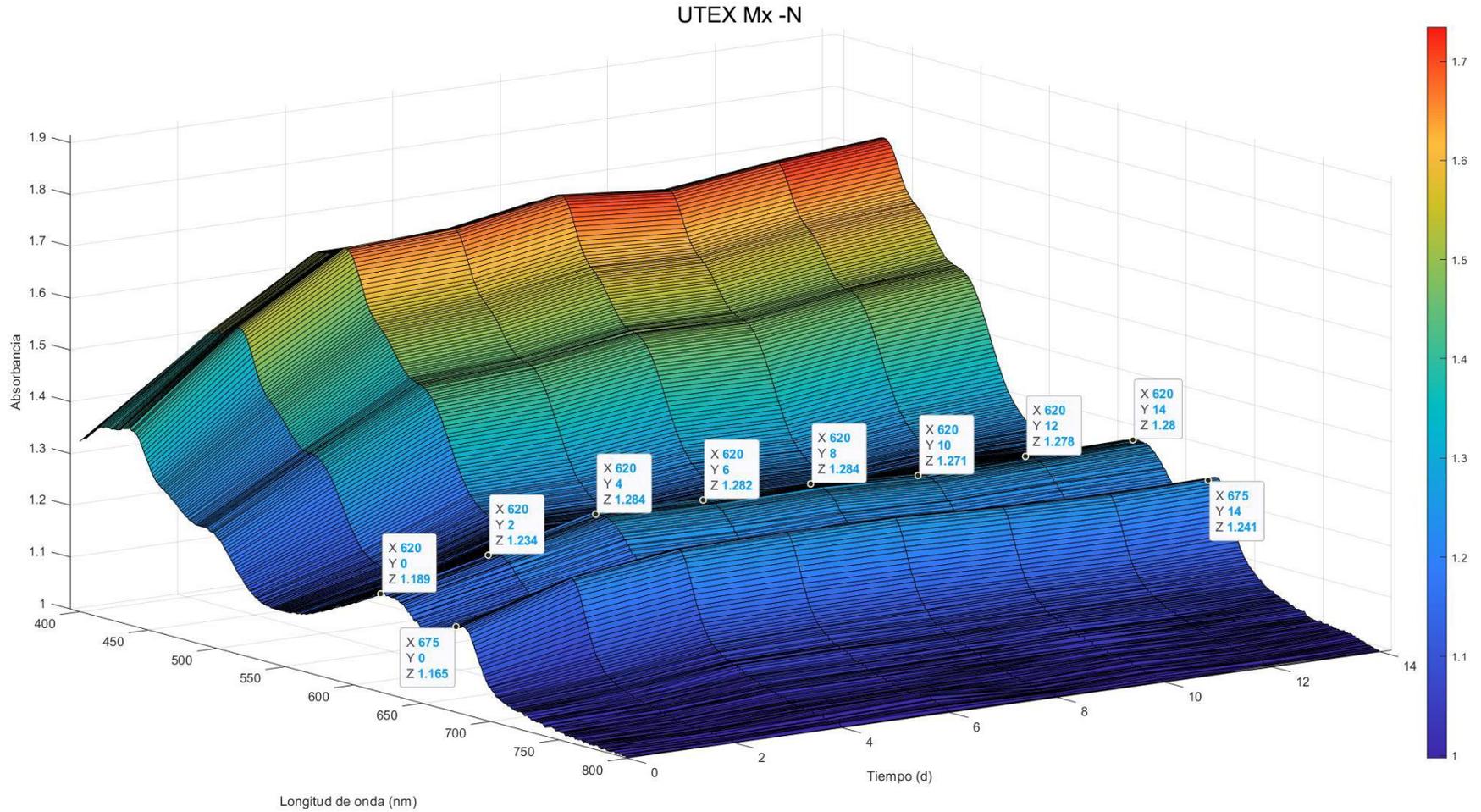
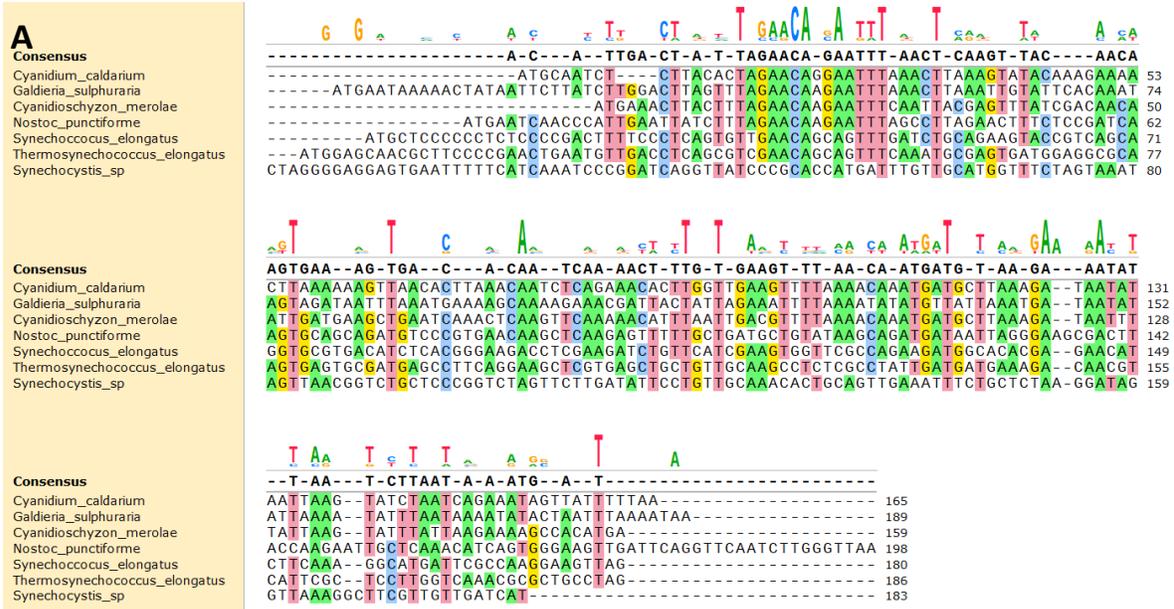


Figura A-11. Diagrama de superficie del espectro de absorción del cultivo Mx -N de la cepa UTEX 2919. Comportamiento del espectro de absorción de los cultivos UTEX Mx -N del día 0 al 14, la clorofila corresponde a una longitud de onda de 575 nm, del a ficocianina a 620 nm y de los carotenos a 555 nm (n=3).



B

| Dirección | Tamaño | Tm | Secuencia | Secuencia genómica | mensajero cDNA |
|-----------|--------|----|---|--------------------|----------------|
| NbIA-F | 29 | 50 | ATGAATAAAAACATAATTCTTATCTTGG | 189 | 189 |
| NbIA-R | 45 | 49 | TTATTTTAAATTAGTATATTTTATTAATATTTTAAATATATTATC | 189 | 189 |

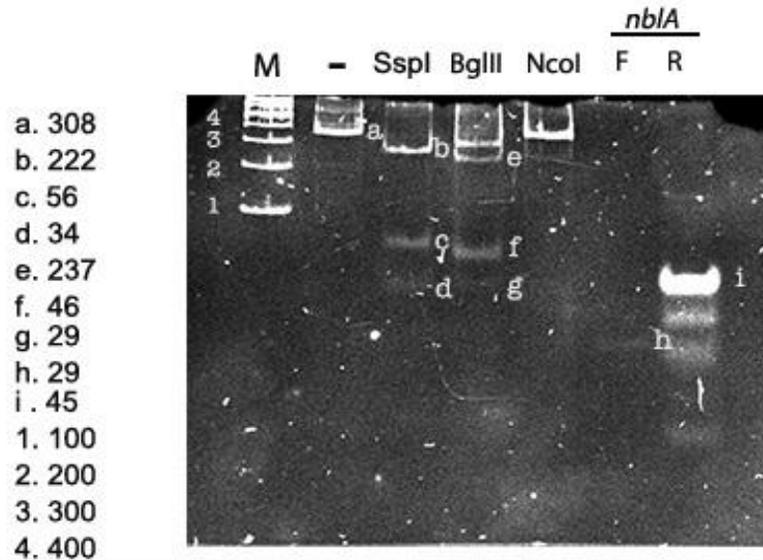
Figura A-13. Aliamiento múltiple de DNA del gen nbIA y características de los cebadores diseñados.



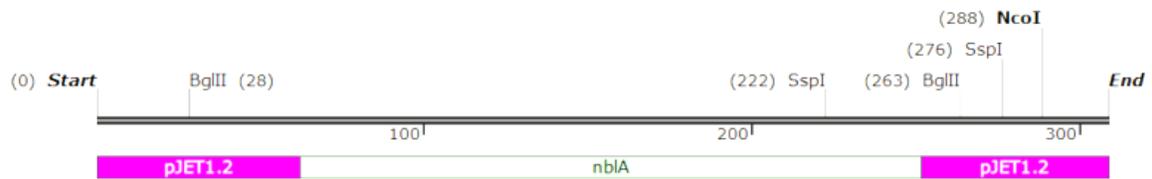
Utilizando el producto de PCR obtenido del plásmido pJET 1.2 + *nblA* se llevó a cabo un ensayo con enzimas de restricción para evaluar mediante un gel de poliacrilamida su perfil de digestión, como se observa en la **Figura A-14**. Es importante decir que en la **Fig. A-14 B** se observa que el producto amplificado de *nblA* está flanqueado por dos regiones del vector de clonación, que tienen un tamaño de 62 pb de 5' a 3' y de 57 pb de 3' a 5'. Para este ensayo se utilizaron tres enzimas de restricción: *SspI* que tiene un sitio de corte dentro del gen y uno dentro del vector (3'-5'), *BglII* que tiene dos sitios de restricción cada uno se localiza en un extremo del vector y *NcoI* que solo tiene un sitio de restricción que se localiza en la parte del vector 3' a 5'. Por otra parte, como se observa en la **Fig. A-14**, utilizando la enzima *SspI*, se obtuvo una digestión total de la banda y obteniendo los tamaños esperados. Por otra parte, utilizando la enzima *BglII* se obtuvo una digestión parcial ya que tenemos una banda que presenta un tamaño menor a 308 pb (que corresponde al tamaño del fragmento sin digerir) pero no es tan pequeña para tener un peso 237 pb que corresponde a la banda e, aunque se obtienen las otras 3 bandas esperadas de acuerdo con lo que se observa en la **Figura A-14**. Sin embargo, utilizando la enzima *NcoI* no se obtuvo el perfil de restricción esperado, que puede deberse a un mal funcionamiento de por parte de esta enzima. Sin embargo, como podemos observar por parte de los resultados arrojados del perfil de restricción utilizando *SspI* es que tentativamente si tenemos el gen *nblA*, sin embargo, no se ha podido obtener el patrón específico de nucleótidos que componen este producto debido a problemas presentados en la secuenciación.



A



B



| | SspI | BglII | NcoI |
|------------------|------|-------|------|
| Numero de cortes | 2 | 2 | 1 |
| Tamaño Banda 1 | 222 | 237 | 288 |
| Tamaño Banda 2 | 56 | 46 | 20 |
| Tamaño Banda 3 | 34 | 29 | --- |

Figura A-14. Perfil de restricción del producto de PCR del gen *nblA*. A. Perfil de restricción. M marcador de peso molecular, (-) control negativo, banda sin digerir. SspI, Perfil de digestión utilizando la enzima SspI. BglII, perfil de digestión con la enzima BglII. NcoI, perfil de digestión con la enzima NcoI. F, cebador delantero para el gen *nblA*. R, cebador reverse para el gen *nblA*. B. mapa del producto de PCR *nblA*-pJET1.2.