



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA MICROALGA EXTREMÓFILA
Galdieria sulphuraria Y ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE α -POLIGLUCANOS
BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA

Tutor Principal:

Dr. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

Comité Tutor:

Dra. HELENA PORTA DUCOING

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. ELISEO CRISTIANI URBINA

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – Instituto Politécnico Nacional

Cuernavaca, Morelos. Noviembre de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



CGEP/PMDCB/1654/2022

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA
Asunto: Jurado de examen
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 24 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias**, con la réplica de la tesis **“Caracterización bioquímica de la microalga extremófila *Galdieria sulphuraria* y estudio de la acumulación de a-poliglucanos bajo diferentes condiciones de cultivo”**, dirigida por el Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE: Dr. Agustín López Munguía Canales
Vocal : Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández
Vocal : Dr. Carlos Felipe Peña Malacara
Vocal : Dra. Dulce María Arias Lizárraga
Secretario : Dra. Luz de María Bretón Deval

MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana. Tome en cuenta que usted tiene 30 días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias..

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuernavaca, Morelos, a 24 de agosto de 2022
COORDINADOR DEL SUBCOMITÉ CAMPUS MORELOS

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Contacto: mdcba@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006



El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los Estudios de doctorado se realizaron gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 699699). Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) – Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Beca PAPIIT-DGAPA-UNAM IT201119.

DEDICATORIA

Con mucho amor dedico este logro a:

Dios, por darme la vida, por la familia en que nací, por cada uno de los logros alcanzados y por todas las bendiciones que me ha otorgado.

Mis papás Alonso y Marina, por su apoyo incondicional, por cada una de sus palabras de amor, cariño, aliento y sabiduría, por cada uno de sus consejos y regaños, y por permitirme volar y hacer mis sueños realidad.

Mis hermanos Jhon y Liliana, por estar siempre a mi lado.

Mis abuelitos Jovita y Sinaí, por su amor, ternura, comprensión y buenos consejos.

Al amor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Alfredo Martínez Jiménez

A los miembros de mi comité tutor integrado por: Dra. Helena Porta, Dra. Rosario Vera Estrella y Dr. Eliseo Cristiani Urbina.

A los miembros del jurado: Dr. Agustín López Munguía Canales, Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández, Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, Dra. Dulce María Arias Lizárraga y Dra. Luz de María Bretón Deval.

A los investigadores del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas: Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Adelfo Escalante Lozada y Dr. Luis Caspeta Guadarrama.

Al personal académico del laboratorio, por su apoyo técnico: M. en C. Georgina Hernández Chávez, Q. I. Luz María Martínez Mejía y Dra. Noemí Flores Mejía.

Al personal de apoyo: Sra. Aurelia González Guzmán y Biól. Manuel Saucedo

Al personal de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología: Dr. Leobardo Serrano Carreón, Biol. Mario Caro Bermúdez, M. en C. José Raunel Tinoco e I.Q. Verónica Albíter.

A la M. en C. María Elena Rodríguez Alegría.

Al personal de la Unidad de Docencia: M. en C. Lidia Judith Martínez Carrera, Lic. Antonio Guillén, Lic. Gloria Villa Herrera e Ing. Jalil Saab.

A mis amigas y familia Estefanía Sierra, Viviana López y Mariana Manzoni.

A mis amigas en Colombia Alejandra Torres, Laura Córdoba, Diana Bravo y Carmen Pinzón.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de IVM y LINPI I.

Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1. Carbohidratos de reserva..... | 6 |
| 1.1.1. Estructura..... | 6 |
| 1.1.2. Biosíntesis..... | 9 |
| 1.2. <i>Galdieria sulphuraria</i> | 12 |
| 2.3. Antecedentes..... | 13 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 15 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 17 |
| 4. OBJETIVO GENERAL..... | 18 |
| 4.1. Objetivos específicos..... | 18 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 19 |
| 5.1. Métodos experimentales..... | 20 |
| 5.1.1. Cepas..... | 20 |
| 5.1.2. Medio de Cultivo..... | 20 |
| 5.1.3. Mantenimiento de las cepas..... | 20 |
| 5.1.4. Preinóculo..... | 21 |
| 5.1.5. Inóculo..... | 22 |
| 5.1.6. Cultivos experimentales..... | 23 |
| 5.2. Métodos analíticos..... | 23 |
| 5.2.1. Determinación de la concentración celular..... | 23 |
| 5.2.2. Cuantificación de amonio..... | 24 |
| 5.2.3. Determinación del contenido de proteínas..... | 25 |
| 5.2.4. Determinación gravimétrica de lípidos..... | 26 |
| 5.2.5. Determinación del contenido de carbohidratos..... | 27 |
| 5.2.6. Extracción de α -poliglucanos..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.2.7. Análisis de α -poliglucanos por cromatografía de permeación en gel (CPG). | 28 |
| 5.2.8. Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas. | 29 |
| 5.2.9. Extracción y cuantificación de Clorofila. | 29 |
| 5.2.10. Extracción y determinación de aminoácidos. | 30 |
| 5.2.11. Determinación de clorofila a (Chl a). | 30 |
| 5.2.11. Determinación de ROS y viabilidad. | 31 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 32 |
| 6.1. ETAPA 1..... | 32 |
| 6.1.2. Crecimiento y producción de biomasa. | 32 |
| 6.1.2. Composición bioquímica: carbohidratos, lípidos y proteínas..... | 35 |
| 6.1.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos: ficobiliproteínas y clorofila..... | 39 |
| 6.1.4. Perfil de aminoácidos. | 41 |
| 6.2. ETAPA 2..... | 45 |
| 6.2.1. Crecimiento y acumulación del poliglucano | 45 |
| 6.2.2. Caracterización del polímero de reserva. | 49 |
| 6.2.3. Lípidos, proteínas y ficocianina. | 52 |
| 6.2.4. Conclusiones parciales | 54 |
| 6.3. ETAPA 3..... | 55 |
| 6.3.1. Diseño de experimentos..... | 55 |
| 6.3.2. Crecimiento celular..... | 56 |
| 6.3.3. Acumulación de poliglucanos..... | 58 |
| 6.3.4. Fotosistemas, potencial de membrana mitocondrial y viabilidad celular. | 59 |
| 6.3.5. Conclusiones parciales. | 62 |
| 7. CONSIDERACIONES GENERALES..... | 63 |
| 8. CONCLUSIONES GENERALES. | 67 |
| 9. PROSPECTIVAS..... | 68 |
| 10. REFERENCIAS. | 69 |
| 11. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA | 80 |
| 12. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA Y ACADÉMICA..... | 85 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática de los enlaces α -glucosídico y β -glucosídico presentes en los glucanos de reserva (adaptado de Blanco & Blanco, 2017)..... | 6 |
| Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de los principales alfa-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal de la amilosa. B. Estructura lineal y ramificada de la amilopectina, almidón florídeo y glucógeno (adaptado de Al Abdallah et al., 2016)..... | 8 |
| Figura 3. Representación esquemática de los gránulos de glucógeno y almidón (Ball et al., 2011)..... | 8 |
| Figura 4. Esquema del metabolismo central del carbono en una microalga unicelular (adaptado de Baroukh et al., 2014) | 10 |
| Figura 5. Vía de síntesis de los principales alfa-glucanos de reserva (glucógeno y almidón) acumulados en microalgas (adaptado de Ran et al., 2019) | 12 |
| Figura 6. Diagrama experimental descrito por etapas..... | 19 |
| Figura 7. Esquema del sistema fotobiológico usado en el presente estudio..... | 22 |
| Figura 8. Representación esquemática de los cuadrantes utilizados en la cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular..... | 24 |
| Figura 9. Mecanismo de reacción del método colorimétrico de fenol-hipoclorito para la determinación de amonio (adaptado de Kimble et al., 2006)..... | 29 |
| Figura 10. Crecimiento celular de diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> bajo condiciones autótrofas de crecimiento. A. Concentración de Biomasa. B. Densidad celular..... | 33 |
| Figura 11. Productividad volumétrica de biomasa y densidad celular de diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> bajo condiciones de crecimiento autótrofas..... | 34 |
| Figura 12. Contenido de carbohidratos (glucosa) de diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> | 38 |
| Figura 13. Contenido de ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) de diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> en el día 20 de cultivo bajo condiciones autotróficas..... | 40 |

Figura 14. Acumulación de clorofila en diferentes cepas de *Galdieria sulphuraria* en condiciones de crecimiento autótrofo. A. Comparación del contenido del pigmento fotosintético en las cepas evaluadas. B. Espectro de absorción de los pigmentos extraídos con acetona al 90%.....41

Figura 15. Consumo de glucosa y amonio de *G. sulphuraria* SAG107.79 bajo condiciones heterotróficas (A) y mixotróficas (B) de cultivo.....47

Figura 16. Acumulación del polímero de reserva (g/100gBiomasa) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones diferentes de cultivo.....48

Figura 17. Productividad de biomasa (A) y poliglucano (B) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en diferentes condiciones de crecimiento.....49

Figura 18. Distribución de los pesos moleculares del polímero de reserva determinados por cromatografía de permeación en gel (CPG) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en diferentes condiciones de cultivo.....50

Figura 19. Verificación de la composición química monomérica por cromatografía en capa fina (TLC) del polímero de carbohidratos extraído de *G. sulphuraria* SAG 107.79.....52

Figura 20. Caracterización Bioquímica de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas, mixótrofas y heterótrofas de cultivo. Acumulación de la macromolécula (g/100gBiomasa) en *G. sulphuraria* SAG 107.79 en el tiempo t de máxima concentración de biomasa (Autotrofia: día 20; Mixotrofia y Heterotrofia: día 5).....53

Figura 21. Crecimiento celular de diferentes de *G. sulphuraria* en condiciones autótrofas de cultivo a diferentes temperaturas e intensidades de luz. **A.** Concentración de Biomasa. **B.** Densidad celular.....57

Figura 22. Señal de fluorescencia normalizada de la clorofila a (685nm/750nm) de células de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas de cultivo. Los valores por día corresponden a la señal de emisión de un mismo número de células.....60

Figura 23. Determinación cualitativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas a temperaturas e intensidades de luz diferentes en el

día 14 de cultivo. Células teñidas con MitoTracker Red CMXRos y analizadas mediante citometría de imagen.....61

Figura 24. Viabilidad celular de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas a temperaturas e intensidades de luz diferentes. Células Sytox Blue y analizadas mediante citometría de imagen.....62

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. α -poliglucanos de reserva sintetizados por los principales grupos taxonómicos de microalgas (adaptado de Al Abdallah et al., 2016)..... | 7 |
| Tabla 2. Composición del medio de cultivo..... | 21 |
| Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos del comportamiento de las diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> en el día 20 bajo condiciones autótrofas de cultivo..... | 36 |
| Tabla 4. Contenido de pigmentos fotosintéticos de diferentes cepas de <i>G. sulphuraria</i> en el día 20, bajo condiciones autótrofas de cultivo..... | 39 |
| Tabla 5. Perfil de aminoácidos de diferentes cepas de <i>Galdieria sulphuraria</i> cultivadas bajo condiciones autotróficas de crecimiento..... | 43 |
| Tabla 6. Resultados de crecimiento de <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 bajo diferentes condiciones de cultivo..... | 46 |
| Tabla 7. Caracterización del polímero de almacenamiento de <i>Galdieria sulphuraria</i> SAG 107.79: Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la distribución del peso molecular... | 50 |
| Tabla 8. Diseño experimental..... | 55 |
| Tabla 9. Crecimiento celular de <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 en condiciones autotróficas a diferentes temperaturas e intensidades de luz..... | 58 |
| Tabla 10. Acumulación y productividad del poliglucano de <i>G. sulphuraria</i> SAG107.78 bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz..... | 59 |

RESUMEN

Galdieria sulphuraria es una microalga roja unicelular extremófila, que puede sobrevivir en ambientes ácidos con valores de pH entre 0 a 4 (acidófilo) y a temperaturas superiores a 40°C, y sintetizar un α -poliglucano de reserva altamente ramificado (almidón florídeo). En este proyecto se propuso realizar la caracterización bioquímica de la microalga extremófila *G. sulphuraria* y el estudio de la acumulación de α -poliglucanos bajo diferentes condiciones de cultivo. Inicialmente, se realizó un estudio cinético comparativo del crecimiento celular y la caracterización bioquímica de cinco cepas diferentes de *G. sulphuraria* bajo condiciones controladas de crecimiento (fotobiorreactor de 1 L, 900 mL de medio mineral, pH 2, 42 °C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO_2 atmosférico, 150 rpm y 0.5 vvm), observándose que la cepa CCMEE.5587.1 presentó las mejores características de crecimiento, representadas en una concentración de biomasa superior (2.33 g L⁻¹), una densidad celular alta (8.97 x10⁷ células mL⁻¹), un tiempo de duplicación menor (4.27 días) y una productividad de ~ 110 mg L⁻¹ día⁻¹. Teniendo en cuenta que la cepa SAG 107.79 presentó el contenido de carbohidratos (cuantificados como glucosa polimerizada) más alto (8.9 % P/P) se seleccionó esta cepa para llevar a cabo los experimentos de la segunda y tercera etapa del proyecto.

Posteriormente, se llevaron a cabo cultivos mixotróficos y heterotróficos (complementarios a los cultivos autotróficos previamente descritos) en los sistemas fotobiológicos mencionados anteriormente, suplementando el medio de cultivo con glucosa 10 g L⁻¹. La condición de heterotrofia se realizó en oscuridad. La acumulación del poliglucano más alta se logró bajo condiciones mixotróficas (20.1%), en comparación con las condiciones heterotróficas (13.6 %) y autotróficas (5.1%). Así mismo, bajo las condiciones autotróficas, el polímero presentó una distribución bimodal, un tamaño de 8.32 x 10⁴ - 1.43 x 10⁶ Da, a diferencia del polímero sintetizado en condiciones heterotróficas y mixotróficas, el cual presentó un tamaño de 1.53 x 10⁵ Da y 8.30 x 10⁴ Da, respectivamente. Para las tres condiciones de crecimiento, el índice de polidispersión osciló entre 1.65-9.18 (IP>1; polímero polidisperso), indicando heterogeneidad del peso molecular de las cadenas poliméricas. Finalmente, mediante cromatografía de capa fina se corroboró la composición química del polímero extraído e hidrolizado, encontrándose glucosa como monómero estructural.

Finalmente, en comparación con las condiciones de cultivo estándar C2 (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 42°C) y referente al crecimiento autotrófico y la acumulación del poliglucano de reserva de *G. sulphuraria*, a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 32 °C se observó un efecto positivo en el crecimiento, alcanzando una concentración de biomasa de 2.29 g L⁻¹, una densidad celular de 8.17x10⁷ células mL⁻¹ y un tiempo de duplicación de 2.37 días. El mayor contenido de poliglucanos de reserva (5,96%; gPolímero 100gBiomasa⁻¹) se logró en la condición de referencia C2, en la que se obtuvo la mayor señal de estrés celular. Asimismo, se evidenció una señal constante de fluorescencia de clorofila *a* y valores de viabilidad celular >95%, lo que indica que las condiciones evaluadas no tuvieron un efecto negativo en los fotosistemas ni generaron muerte celular.

Palabras Clave: *Galdieria sulphuraria*, proteína unicelular, poliglucano, autotrofia, mixotrofia, heterotrofia, peso molecular, ficocianina.

ABSTRACT

Galdieria sulphuraria is a unicellular red extremophile microalga, which can survive in acidic environments with pH ranges from 0-4 (acidophilic), and at temperatures above 40°C, and synthesize a highly branched reserve α -polyglucan (florid starch). In this study the macromolecular biochemical characterization, and the study of α -polyglucans accumulation under different culture conditions was performed. First, a kinetic study of cell growth and macromolecule content of five different *G. sulphuraria* strains was performed in batch mode under controlled conditions (42 °C, pH 2, constant illumination at 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 150 rpm, 0.5 vvm, and atmospheric CO_2). The *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 reached 2.33 g L^{-1} of dry cell weight (DCW) ($\sim 9 \times 10^7$ cells mL^{-1}) in 20 days, i.e., a productivity of ~ 110 $\text{mg}_{\text{DCW}} \text{L}^{-1} \text{day}^{-1}$ was achieved. Considering that *G. Sulphuraria* strain SAG 107.79 had the highest carbohydrate content (8.9% w/w; quantified as polymerized glucose), this strain was selected to carry out the second and third stage of the study.

Regarding the second stage, mixotrophic and heterotrophic cultures (complementary to the autotrophic cultures previously described) were carried out with glucose 10 g L^{-1} . Heterotrophic mode was performed in darkness. The highest polyglucan accumulation was achieved under mixotrophic conditions (20.1%), compared to heterotrophic (13.6%) and autotrophic (5.1%) modes. Likewise, under autotrophic culture conditions, the polymer showed a bimodal distribution, a size of 8.32×10^4 - 1.43×10^6 Da, unlike the polymer synthesized under heterotrophic and mixotrophic modes, which presented a size of 1.53×10^5 Da and 8.30×10^4 Da, respectively. The polydispersity index for all conditions ranged between 1.65-9.18 ($\text{IP} > 1$; polydisperse polymer), indicating a molecular weight heterogeneity of the polymer chains that make up the polymer. Finally, TLC confirmed the chemical composition of the extracted and hydrolyzed polymer, finding glucose as the structural monomer.

Compared to standard culture conditions (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and 42°C) on the autotrophic growth and the accumulation of the reserve polyglucan of *G. sulphuraria*, at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 32 °C condition a positive effect on growth was observed, reaching a biomass concentration of 2.29 g L^{-1} , a cell density of 8.17×10^7 cells mL^{-1} and a doubling time of 2.37 days. The highest content of reserve polyglucans (5.96%; $\text{g}_{\text{Polymer}} 100\text{g}_{\text{Biomass}}^{-1}$) was achieved in the reference condition C2, in which the highest cell stress signal was obtained. Likewise, a constant signal

of chlorophyll *a* fluorescence and cell viability values >95% were evidenced, which indicates that the conditions evaluated did not have a negative effect on the photosystems nor did they generate cell death.

Keywords: *Galdieria sulphuraria*, Single-cell protein, polyglucan, autotrophy, mixotrophy, heterotrophy, molecular weight, phycocyanin.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas tienen el potencial de producir biomasa y otros compuestos como lípidos, proteínas y carbohidratos de reserva, con productividades más altas que las obtenidas con plantas terrestres, llevando a cabo cultivos en condiciones controladas de crecimiento ([Bajpai & Zappi, 2014](#)). Así mismo, debido a la posibilidad de llevar a cabo el cultivo de estos microorganismos fotosintéticos sin hacer uso de suelo agrícola, se hace evidente el potencial que presentan para la producción de diferentes metabolitos y productos químicos de interés sin competir con la producción de alimentos.

Dentro de las problemáticas mundiales más importantes se encuentran la sostenibilidad ambiental y la crisis energética. Aproximadamente el 87% del consumo mundial de energía se satisface a partir de combustibles fósiles, lo cual ha generado diversas preocupaciones respecto a las reservas limitadas de petróleo, la seguridad energética y el impacto ambiental producto del aumento de los gases de efecto invernadero ([Singh and Das, 2014](#)). Por lo anterior, en los últimos años muchas de las investigaciones han sido encaminadas al estudio, diseño y desarrollo de biorrefinerías. El concepto de biorrefinería hace referencia a la tecnología de base biológica que transforma la biomasa en un amplio espectro de productos energéticos o bioproductos. En las biorrefinerías, la materia prima son recursos biológicos como los cultivos tradicionales, residuos orgánicos de origen agroindustrial o incluso microalgas, lo cual ha llevado a muchos investigadores a explorar el cultivo de estos microorganismos, tanto en condiciones autotróficas como en heterotróficas ([Bajpai & Zappi, 2014](#)).

Las microalgas son una de las materias primas más prometedoras para la producción de biocombustibles y productos químicos valiosos. La investigación en microalgas no solo se centra en mejorar la generación de biomasa (lípidos, proteínas y carbohidratos), sino también en la obtención de nuevos compuestos de interés, en donde la materia prima para biorrefinar estos compuestos es precisamente la biomasa microalgal ([Perez-Garcia & Bashan, 2015](#)).

Las biorrefinerías de microalgas tienen el potencial de producir compuestos químicos de interés para su uso en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica, química, cosmética y bioenergética. La producción de biodiesel a partir de lípidos de microalgas es una de las alternativas más estudiadas en lo que respecta a la producción de bioenergía. Otra

opción es la utilización de los carbohidratos de reserva de las microalgas como materia prima para la fermentación microbiana, mediante la cual se abre la posibilidad de producir una gama amplia de productos químicos (por ejemplo, aminoácidos, alcoholes o ácidos orgánicos) que actualmente son producidos por vía fermentativa haciendo uso de levaduras o bacterias (Mayers *et al.*, 2018).

1.1. Carbohidratos de reserva

1.1.1. Estructura

En las células de microalgas los carbohidratos se pueden encontrar en la pared celular externa (p. ej. pectina, agar y alginato), la pared celular interna (por ejemplo, celulosa y hemicelulosa) y dentro de la célula, como productos de almacenamiento (por ejemplo, almidón y glucógeno) (Martín-Juárez *et al.*, 2017). En cuanto a los glucanos de almacenamiento, éstos son homopolímeros de glucosa que dependiendo del tipo de enlace glicosídico (enlace entre dos grupos funcionales hidroxilo) que presenten las subunidades monoméricas del polímero, se clasifican en alfa-glucanos o beta-glucanos (Al Abdallah *et al.*, 2016): alfa (α) si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte inferior del carbono anomérico; o beta (β), si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte superior del carbono anomérico (**Figura 1**).

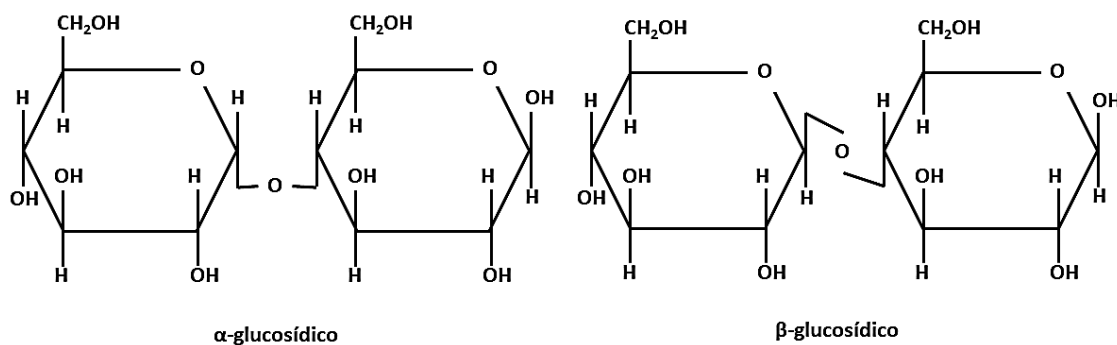


Figura 1. Representación esquemática de los enlaces α -glucosídico y β -glucosídico presentes en los glucanos de reserva (adaptado de Blanco & Blanco, 2017).

La síntesis de α -poliglucanos es propia del subgrupo Archaeplastida (**Tabla 1**), en el cual se encuentran las algas verdes y las plantas superiores (Chloroplastida) que acumulan almidón, las algas rojas (Rhodophyceae) que sintetizan almidón florídeo (similar al glucógeno y a la amilopectina), y los Glaucophytes, los cuales acumulan glucógeno. Adicionalmente, una diferencia entre los tres grupos descritos anteriormente es que en las plantas terrestres y algas

verdes la síntesis de almidón se lleva a cabo al interior de los plástidos, mientras que en las algas rojas y en los Glaucophytes la síntesis de poliglucano de almacenamiento se realiza en el citosol (Ball *et al.*, 2011; Busi *et al.*, 2014).

Tabla 1. α -poliglucanos de reserva sintetizados por los principales grupos taxonómicos de microalgas (adaptado de Al Abdallah *et al.*, 2016)

| Polímero | Monómero | Enlaces glucosídicos | Ubicación celular | Grupo taxonómico |
|-------------------------------|----------|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| ^a Almidón | | | | |
| Amilosa (30%) | Glucosa | α -(1-4) | Cloroplasto | Chlorophyta |
| Amilopectina (70%) | | α -(1-4) y α -(1-6) | | |
| ^b Almidón Florídeo | Glucosa | α -(1-4) y α -(1-6) | Citosol | Rhodophyta |
| ^b Glucógeno | Glucosa | α -(1-4) y α -(1-6) | Citosol | Cyanophyta |

^a El almidón presenta un 5-6% de ramificaciones (enlaces α -(1-6)) distribuidas de forma no aleatoria.

^b El glucógeno y el almidón florídeo contienen cadenas lineales más cortas en comparación con la amilopectina y un mayor número de puntos de ramificación. El grado de ramificación del glucógeno depende de su fuente y varía del 7 al 13%.

Las células vivas almacenan carbohidratos en forma de una variedad de moléculas (polímeros y oligómeros principalmente), siendo el almidón y el glucógeno dos de las moléculas de reserva de energía más comunes. El almidón, el almidón florídeo y el glucógeno corresponden a polímeros de glucosa con una cadena principal lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1-4) y ramificaciones unidas en ciertos puntos a través de enlaces α -(1-6) (Ball *et al.*, 2011) (Figura 2).

El glucógeno y la amilopectina difieren en el porcentaje y la distribución de las ramificaciones, lo cual afecta la estructura y las propiedades de la molécula. El almidón está compuesto por dos tipos de polímeros: amilosa (30%), prácticamente sin ramificaciones, y amilopectina (70%), el cual presenta un 5-6% de ramificaciones (enlaces α -(1-6)) distribuidas de forma no aleatoria. Las regiones ramificadas están dispuestas en grupos separados por regiones lineales, lo que lleva a la aparición de secciones cristalinas y la formación de gránulos de almidón (Figura 3). El glucógeno y el almidón florídeo contienen cadenas lineales más cortas en comparación con

la amilopectina y un mayor número de puntos de ramificación. El grado de ramificación del glucógeno depende de su fuente y varía del 7 al 13% (Martinez-Garcia *et al.*, 2016).

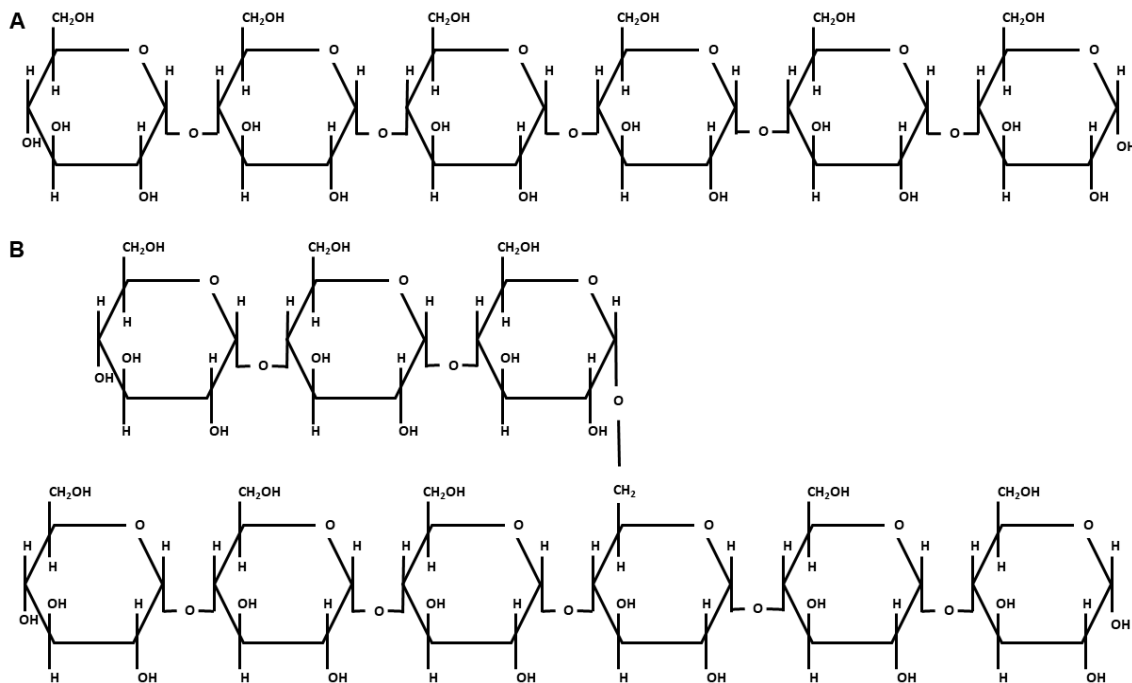


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de los principales alfa-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal de la amilosa. B. Estructura lineal y ramificada de la amilopectina, almidón florídeo y glucógeno (adaptado de Al Abdallah *et al.*, 2016)

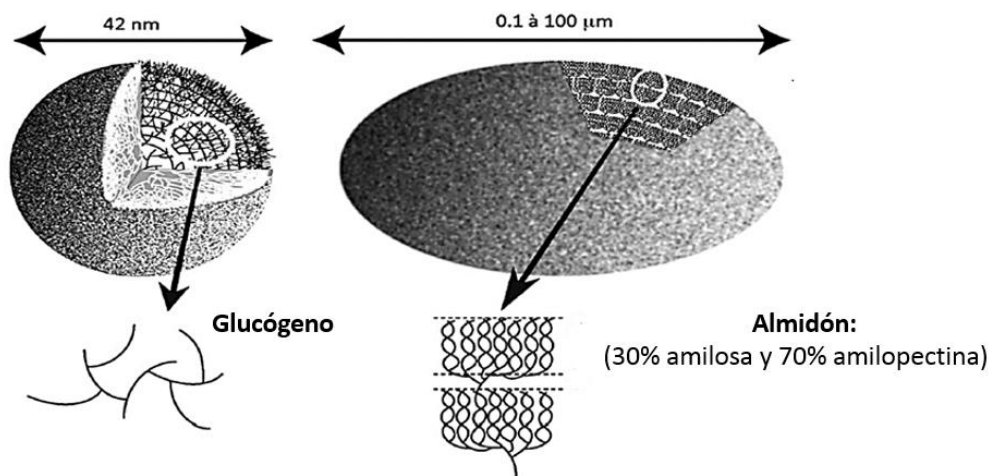


Figura 3. Representación esquemática de los gránulos de glucógeno y almidón (Ball *et al.*, 2011).

1.1.2. Biosíntesis

Teniendo en cuenta que las microalgas son microorganismos fotosintéticos, el primer paso para la formación de biomasa es el uso de energía de la luz para lograr la fijación de CO₂ (carbono inorgánico) y su conversión en esqueletos carbonados (carbono orgánico). Durante la fotosíntesis, las microalgas producen monosacáridos, los cuales se usan como fuente de carbono y energía para la producción de otras macromoléculas ([Masojídek et al., 2007](#)), tales como proteínas, lípidos y otros carbohidratos, las cuales son destinadas para la generación de biomasa y otras moléculas (**Figura 4**). La fotosíntesis se divide en dos fases: la fase luminosa, en la cual se genera energía ATP, NADPH y oxígeno a partir de luz y agua, y la fase de oscuridad, en la cual se emplea la energía generada en la fase anterior para fijar CO₂ a través del ciclo de Calvin mediante la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) en el cloroplasto ([Maia et al., 2020](#)). El producto final de la fotosíntesis es un metabolito de 3 carbonos (gliceraldehído-3-fosfato; GAP), que posteriormente es exportado al citosol. El GAP se sitúa en el centro del metabolismo de azúcares, el cual se divide en gluconeogénesis y glucólisis. La gluconeogénesis genera glucosa 6-fosfato (G6P), que luego se invierte en la síntesis de carbohidratos o en la ruta de las pentosas fosfato para la generación de poder reductor (NADPH). La glucólisis genera fosfoenolpiruvato (PEP), que luego se utiliza en la síntesis de lípidos o en el ciclo del ácido cítrico, en el cual se producen metabolitos intermedios necesarios para la síntesis de biomasa. Los cofactores (FADH, NADH) generados por el ciclo del ácido cítrico se transforman en energía (ATP) gracias a la fosforilación oxidativa ([Baroukh et al., 2014](#)).

Cuando la intensidad de luz es demasiado alta o cuando el suministro de nutrientes inorgánicos es limitado (por ejemplo, estrés de nitrógeno), la tasa de producción de glucosa durante la fotosíntesis puede exceder la tasa de consumo de glucosa por la célula. Este exceso no se puede almacenar como glucosa debido a la alteración del equilibrio osmótico de la célula. Por lo tanto, el excedente de glucosa es convertida en polisacáridos o en lípidos, que actuarán como almacenamiento de carbono y energía para su futuro uso. Debido a que la conversión de glucosa en polisacáridos es mucho más rápida que en los lípidos, y a que requiere menor

aporte de energía y cofactores reducidos, las microalgas a menudo primero acumulan carbohidratos y luego lípidos (Martín-Juárez *et al.*, 2017).

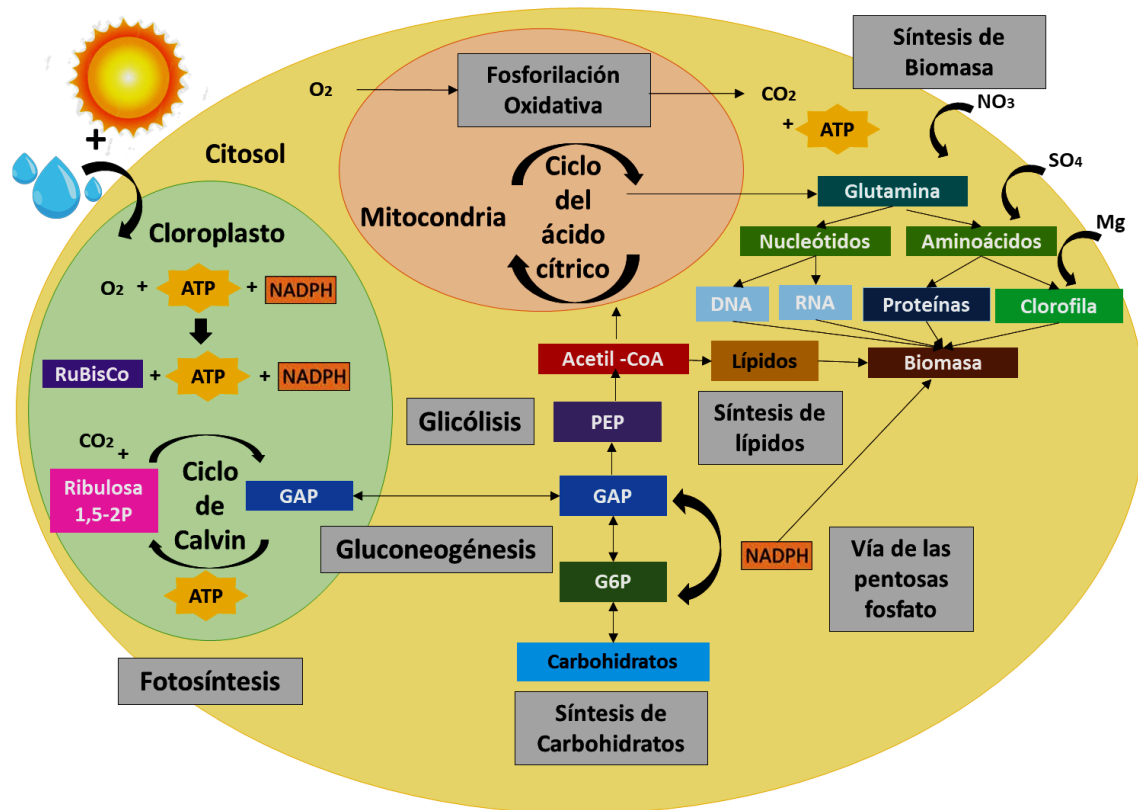


Figura 4. Esquema del metabolismo central del carbono en una microalga unicelular (adaptado de Baroukh *et al.*, 2014).

La síntesis de poliglucanos de reserva en algas rojas procede a través de una UDP-glucosa-selectiva α -glucano sintasa, en analogía con la ruta citosólica de la síntesis de glucógeno en otros eucariotas (Ball *et al.*, 2011; Viola *et al.*, 2001), mientras que la biosíntesis de almidón en el caso de las algas verdes procede a través de una ADP-glucosa selectiva α -glucano sintasa, al igual que las plantas terrestres (Busi *et al.*, 2014).

De forma general la síntesis de carbohidratos de reserva (glucógeno y almidón) está mediada por tres pasos: activación del sustrato, elongación de la cadena principal y ramificación de la cadena (Busi *et al.*, 2014). La activación del sustrato se lleva a cabo mediante la enzima UDP/ADP-glucosa-pirofosforilasa, la cual se encarga de catalizar la conversión de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa o ADP-glucosa. Posteriormente, la elongación de la cadena principal

y formación del maltooligosacárido (MOS) (Ran *et al.*, 2019) se encuentra mediada por una enzima glucosiltransferasa o α -glucano sintasa selectiva (glucógeno-sintasa o almidón-sintasa), que transfiere una unidad de azúcar activada a un grupo hidroxilo de azúcar no reductor, generándose un enlace glucosídico α -(1-4) entre el carbono 1 del grupo glucosilo que entra y el carbono 4 del residuo de glucosa del extremo no reductor de la cadena polimérica existente o del cebador (**Figura 5**). En este punto, la síntesis de alfa-glucanos se divide en dos caminos, en dónde, por un lado, continua la elongación y obtención de cadenas lineales, para la formación de amilosa, mediante la enzima almidón-sintasa ligada al gránulo, y por el otro, se lleva a cabo la formación de glucanos ramificados (amilopectina, almidón florídeo y glucógeno). La ramificación de la cadena procede a través de la enzima ramificante o amilo-(1,4-1,6)-transglucosilasa, la cual transfiere un fragmento terminal de unidades de glucosa unidas por un enlace α -(1-4) a un grupo hidroxilo situado en la posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero, generándose dos extremos no reductores, para que continúe la elongación de la cadena (Mathews *et al.*, 2005; Ball *et al.*, 2011; Busi *et al.*, 2014). La actividad catalítica conjunta de las enzimas almidón/glucógeno sintasa y ramificante conllevan a la aparición de polisacáridos solubles en agua (WSP), los cuales aumentan de tamaño conforme se siguen agregando monosacáridos de glucosa a los extremos reductores y se siguen ramificando hasta obtener finalmente un α -poliglucano como el glucógeno o el almidón florídeo (Ran *et al.*, 2019). En plantas superiores y algas verdes, una enzima desramificante (isoamilasa) interviene en la formación del polímero ramificado (amilopectina), la cual se encarga de controlar el espaciado entre las ramificaciones y por ende favorecer la estructura cristalina característica de los gránulos de almidón (Busi *et al.*, 2014; Powell *et al.*, 2015). La posición de las ramificaciones corresponde a una de las principales diferencias entre el glucógeno y la amilopectina, ya que en el caso del glucógeno las ramificaciones se dan cada 12 o 18 unidades de glucosa y en la amilopectina se dan cada 20 o 30 unidades de glucosa (Mathews *et al.*, 2005).

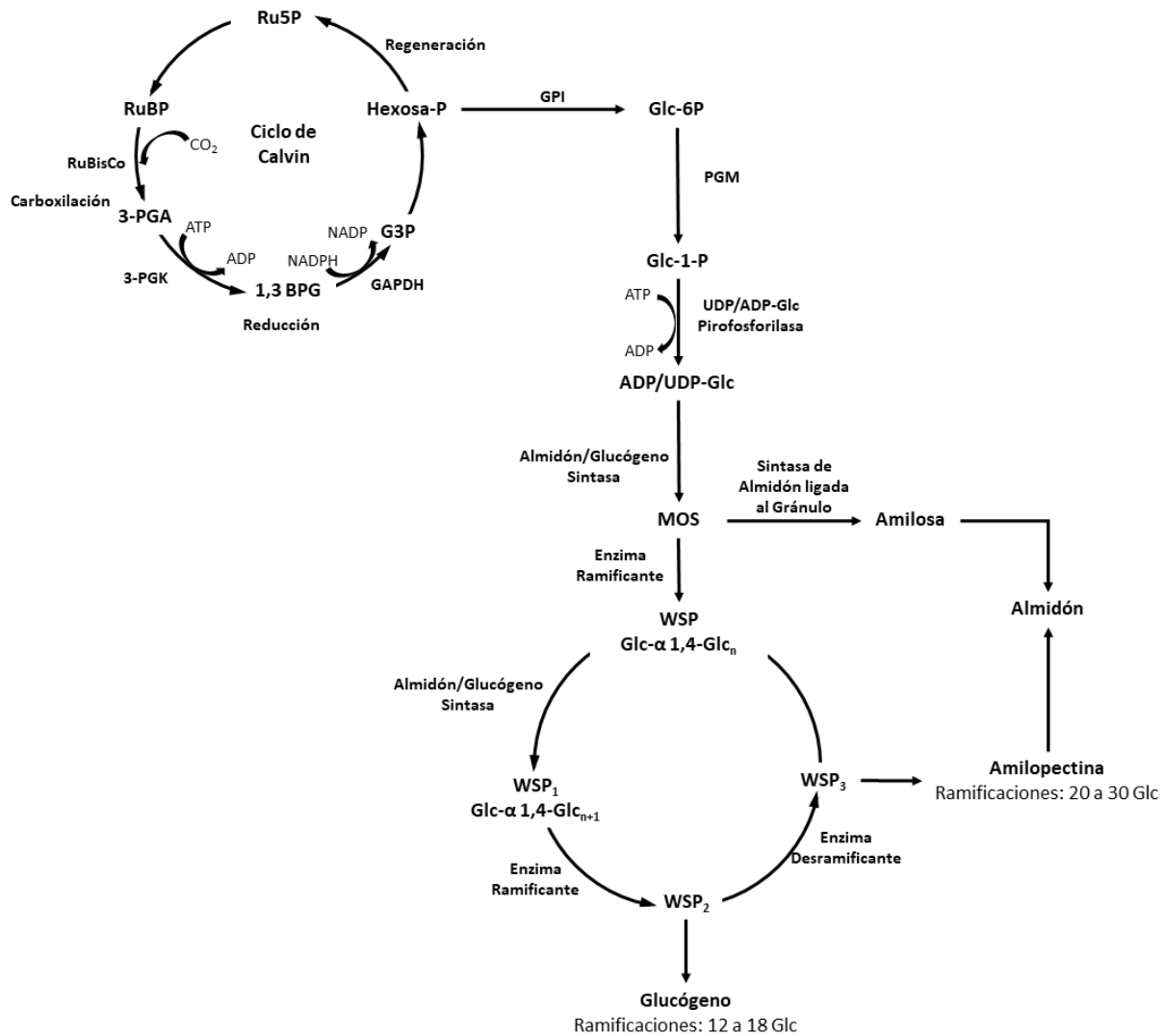


Figura 5. Vía de síntesis de los principales alfa-glucanos de reserva (glucógeno y almidón) acumulados en microalgas (adaptado de Ran et al.,2019). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bifosfato, RuBisCO: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-fosfoglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bisfosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehído-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglucosa isomerasa, Glc6P: glucosa-6-fosfato, PGM: fosfoglucomutasa, Glc1P: glucosa-1-fosfato, UDP: uridina difosfato, ADP: adenosín difosfato, MOS: maltooligosacárido, WSP: polisacáridos solubles en agua.

1.2. *Galdieria sulphuraria*

Las algas rojas (Rhodophyta) constituyen un phylum muy diverso de organismos que contiene especies multicelulares y unicelulares, que pueden colonizar una gama amplia de hábitats (por ejemplo aguas dulces y marinas, manantiales calientes de azufre, ambientes volcánicos)

(Martinez-Garcia, 2017), y que comparten diversas características como: células eucariotas, ausencia de flagelos, producción de almidón florídeo como carbohidrato de reserva, pigmentos de ficobiliproteína (rojo y azul) y tilacoides no apilados (Sheath & Vis, 2015). Los gránulos de almidón de algas rojas (almidón florídeo) muestran similitudes estructurales con gránulos de almidón de plantas superiores, pero carecen de amilosa.

El subphylum Cyanidiophytina contiene solo una clase, Cyanidiphyceae, y esta clase contiene solo un orden llamado Cyanidiales, el cual consiste en tres géneros: *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* (Martinez-Garcia, 2017). Dentro del orden Cyanidiales, las especies pertenecientes al género *Galdieria* muestran diversas características metabólicas y fisiológicas, que desde un punto de vista práctico son deseables para la producción de diversos compuestos de interés, aunque han sido poco estudiadas. La especie en este género más estudiada es *Galdieria sulphuraria*. Una de las características fisiológicas más relevantes de *G. sulphuraria* es la capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos (acidófila) con valores de pH de 0 a 4 y en temperaturas superiores a 40 °C (Oesterhelt *et al.*, 2007). Lo anterior sumado a la flexibilidad metabólica que presenta para crecer en condiciones autotróficas, realizando fotosíntesis, y heterotróficas, en completa oscuridad, utilizando diversos compuestos como fuente de carbono (monosacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos), ha permitido resaltar el potencial biotecnológico de este microorganismo.

2.3. Antecedentes

Sakurai *et al.*, (2016) investigaron la producción de biomasa, glucógeno y lípidos por *G. sulphuraria* con la cepa denominada 074 W en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas (Iluminación constante 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, glucosa 25 mM, pH 2.5 y CO_2 atmosférico). La producción máxima de biomasa se obtuvo en el cultivo mixotrófico con un valor de 3.8 g L⁻¹. Así mismo, obtuvo un alto contenido de glucógeno en los cultivos mixotróficos (11.84%), mientras que las cantidades de lípidos neutros fueron similares entre cultivos mixotróficos y heterotróficos. Bajo condiciones autotróficas se alcanzó un contenido de glucógeno de 4.54%.

Martinez-Garcia (2017) evaluó bajo condiciones heterotróficas el efecto del suministro de nitrógeno, el tipo de fuente de carbono, las condiciones de crecimiento y los métodos de extracción sobre el rendimiento de glucógeno y floridoside (un soluto compatible sintetizado por algas rojas con propiedades antiincrustantes y terapéuticas) producidos por *G. sulphuraria*

SAG 108.81 con el fin de optimizar la producción. Los resultados muestran que *G. sulphuraria* acumuló altas cantidades de glucógeno (tanto como 50% de su peso seco) independientemente del nivel de suministro de nitrógeno. Adicionalmente, *G. sulphuraria* fue capaz de crecer en glicerol crudo como fuente de carbono, obteniéndose valores de biomasa, glucógeno y floridoside de 19.4 g L^{-1} , 9.4 g L^{-1} y 0.12 g L^{-1} , respectivamente.

Finalmente, [Mozaffari et al., 2019](#) llevaron a cabo el estudio de las alteraciones en la fotosíntesis y las reservas de energía en *G. sulphuraria* CCMEE.5587.1, usando azúcares y algunos nutrientes obtenidos de hidrolizado de rastrojo de maíz. Los autores inicialmente realizaron un estudio preliminar comparando el crecimiento celular y la acumulación de α -glucanos bajo condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas de cultivo, en matraces de 1 L, a un pH de 2.5, una intensidad de luz de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperiodo de 12 luz/12 oscuridad, temperatura en un rango de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (periodo de oscuridad) a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (periodo de luz) y una concentración de CO_2 del 2% en la corriente de gas suministrada a los cultivos. Bajo las condiciones heterotróficas y mixotróficas de cultivo, las células aumentaron rápidamente de 0.5 a 1.23 ± 0.06 y $1.29 \pm 0.05 \text{ DO}_{750}$ (día 4), respectivamente, mientras que en condiciones fotoautotróficas se alcanzó un crecimiento de $0.81 \pm 0.07 \text{ DO}_{750}$ (día 7). En cuanto al almidón de reserva, se evidenció el efecto positivo de la adición de una fuente de carbono orgánica (melazas 25 mM) sobre la acumulación del glucano, encontrándose una acumulación máxima del polímero en mixotrofia (38%), seguido de heterotrofia (30%) y fotoautotrofia (15%).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el potencial biotecnológico que presentan las microalgas para la producción de moléculas de alto valor como pigmentos y lípidos está siendo ampliamente explorado, convirtiéndose en una de las fuentes principales para la producción de diferentes compuestos como β -carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Sakurai *et al.*, 2016). Sin embargo, desde un enfoque de biorrefinería, todos los carbohidratos presentes en las microalgas, estructurales y de reserva, son aprovechables y presentan el potencial de ser usados para diferentes aplicaciones. Respecto a los glucanos de reserva como la amilopectina, el almidón florídeo y el glucógeno, debido su estructura altamente ramificada, tienen aplicación en la industria farmacéutica y médica, en la producción de soluciones para diálisis peritoneal y en la formulación de bebidas deportivas (Martinez-Garcia *et al.*, 2017).

Las fuentes de azúcares de biomasa terrestre son abundantes y económicas. Los cultivos de caña de azúcar, maíz, entre otros, se han utilizado para la producción de biocombustibles denominados de primera generación. Sin embargo, los problemas relacionados con la competencia por tierras destinadas al cultivo de alimentos han llevado a la búsqueda de vías alternas. Las materias primas lignocelulósicas (residuos agrícolas y forestales) son reconocidas cada vez más como una materia prima más sostenible para la generación de biocombustibles de segunda generación. No obstante, muchas de estas biomásas son recalcitrantes y requieren un pretratamiento complejo para liberar los azúcares polimerizados (Mayers *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta lo anterior, la biomasa de microalgas representa una materia prima (denominada de tercera generación) prometedora para la obtención de carbohidratos que podrían utilizarse, además de las aplicaciones citadas en el párrafo anterior, en la producción fermentativa de diferentes compuestos químicos de interés de alto valor agregado.

Se han utilizado diversas estrategias con la finalidad de aumentar la acumulación de los carbohidratos de reserva en las células microalgales, en donde la suplementación con fuentes de carbono orgánicas y la modificación de las condiciones de cultivo, han sido unas de las más implementadas. Teniendo en cuenta la naturaleza fotosintética de las microalgas, dos de las variables más importantes dentro de las condiciones de cultivo corresponden a la temperatura y a la intensidad de luz (irradiancia) (González-Fernández & Ballesteros, 2012). Respecto a la

temperatura, teniendo en cuenta que la principal fuente de carbono es el CO₂, el cambio de la temperatura afecta la solubilidad de este gas (Markou *et al.*, 2014). De igual forma, en cuanto a la irradiancia, este parámetro se relaciona directamente con la fotosíntesis de la microalga y por ende con la obtención de energía, evidenciándose que un aumento de la intensidad de luz (sin alcanzar condiciones de fotoinhibición) conlleva a un aumento de la actividad fotosintética (Masojídek *et al.*, 2007).

El principal problema que trae consigo el uso de microalgas, especialmente cuando se llevan a cabo cultivos abiertos, es la posible contaminación con otros microorganismos, lo cual constituye una de las limitantes más importantes que resulta en la inhibición del crecimiento de las algas y la disminución de la productividad de los compuestos de interés. Por tal motivo, una de las estrategias más efectivas para contrarrestar dicha problemática es realizar cultivos de microalgas bajo condiciones extremas (Malavasi *et al.*, 2020; Varshney *et al.*, 2015). *G. sulphuraria* es un alga unicelular perteneciente al grupo de las algas rojas (Rhodophyceae), que se clasifica como extremófilo, ya que puede sobrevivir en ambientes ácidos con valores de pH entre 0 a 4 (acidófilo). Así mismo, *G. sulphuraria* es capaz de crecer autotróficamente, realizando fotosíntesis en presencia de luz y CO₂, heterotróficamente, usando diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono en oscuridad, y mixotróficamente (Martinez-Garcia & van der Maarel, 2016)

Por lo anterior, teniendo en cuenta las características fisiológicas de *G. sulphuraria*, el potencial que presenta la biomasa microalgal para la producción de carbohidratos y la posibilidad de utilizar estos polímeros como materia prima en la obtención de diferentes compuestos de interés, en el presente proyecto se propuso llevar a cabo la caracterización bioquímica y el estudio de la acumulación de α -poliglucanos (carbohidratos de reserva), usando la microalga extremófila *G. sulphuraria* bajo diferentes condiciones de cultivo.

3. HIPÓTESIS

El aumento de la intensidad de luz y la disminución de la temperatura en el cultivo de la microalga extremófila *Galdieria sulphuraria*, conducirán a una mayor biosíntesis y acumulación de carbohidratos de reserva (α -poliglucanos). Asimismo, la suplementación del medio de cultivo con una fuente de carbono orgánica favorecerá la acumulación del poliglucano de reserva.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente la biomasa de la microalga extremófila *G. sulphuraria* y estudiar la acumulación de α -poliglucanos bajo diferentes condiciones de cultivo.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar el crecimiento celular y la composición bioquímica de cinco cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones autotróficas de cultivo.
- Evaluar la acumulación del poliglucano de reserva de una cepa seleccionada de *G. sulphuraria* bajo condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas de cultivo y caracterizar el polímero acumulado.
- Evaluar el crecimiento celular y la acumulación de α -poliglucanos en la cepa seleccionada de *G. sulphuraria* bajo diferentes temperaturas e intensidades de luz.

5. METODOLOGÍA

En la **figura 6** se expone el diagrama general propuesto para el desarrollo del proyecto de investigación, el cual se divide en tres etapas principales.

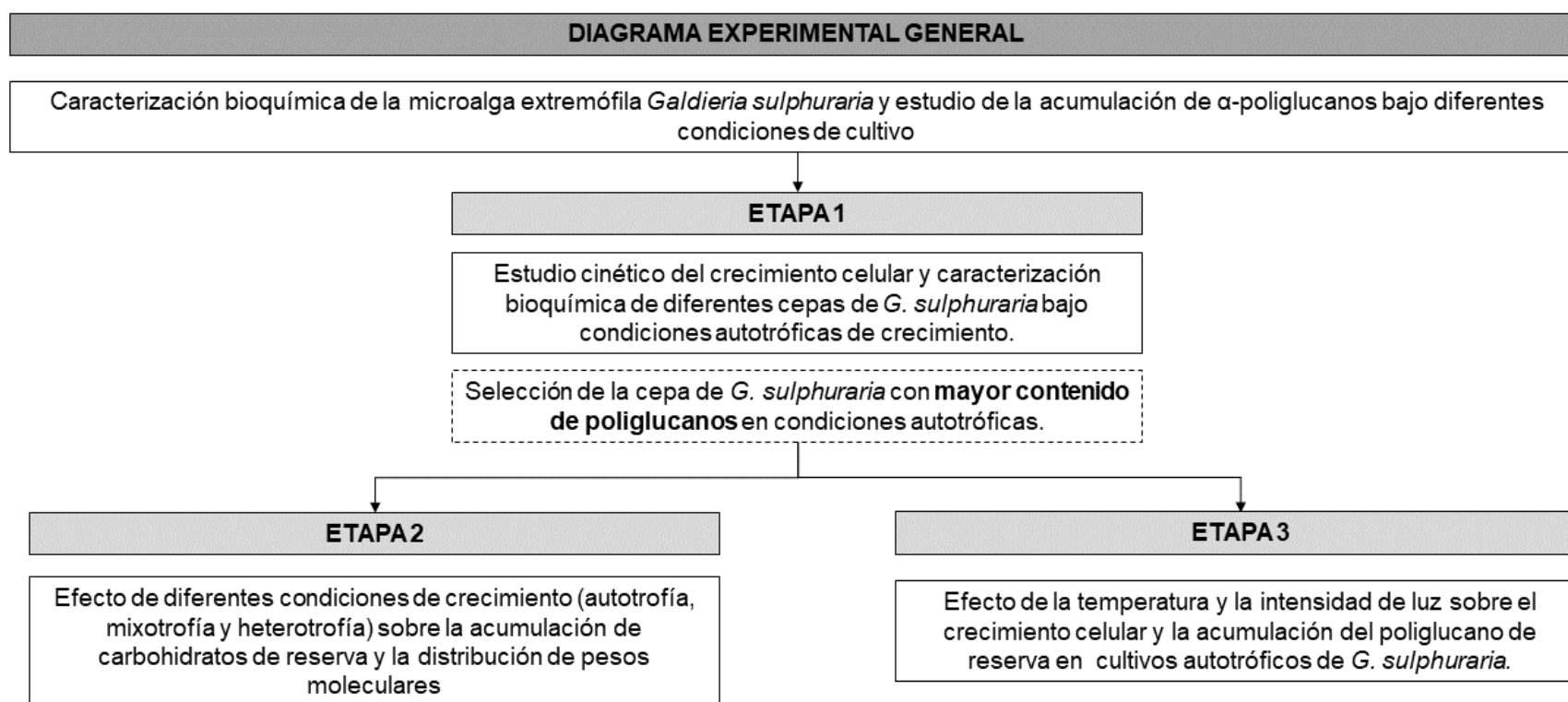


Figura 6. Diagrama experimental descrito por etapas.

5.1. Métodos experimentales

5.1.1. Cepas

Las diferentes cepas de *G. sulphuraria* se obtuvieron de la colección de algas perteneciente al departamento experimental de ficología de la Universidad de Gotinga, Alemania (SAG 107.79, SAG 108.79 y SAG 21.92), de la colección microbiana de la Universidad de Texas (UTEX 2919) y de la colección de microorganismos de ambientes extremos de la Universidad de Oregón, Estados Unidos (CCMEE.5587.1).

5.1.2. Medio de Cultivo

El medio utilizado para el cultivo de *G. sulphuraria* fue el descrito por Ford (1979) y Gross & Schnarrenberger (1995) (Tabla 2). La preparación de este medio de cultivo requiere de cinco macronutrientes (1 a 5) y de dos soluciones de elementos traza (6 y 7). Una vez preparado el medio de cultivo, éste se ajustó a un pH de 2.0 mediante la adición de ácido sulfúrico (96%) y fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 Lb/in² de presión por 20 minutos. El pH de las soluciones de Fe-EDTA y elementos traza se ajustó antes de mezclar con los otros macronutrientes y se reservó como soluciones stock. Para la preparación del medio sólido, se utilizaron las mismas concentraciones de macronutrientes y elementos traza descritos anteriormente, con una concentración de agar y glucosa de 3% y 1%, respectivamente. Debido a la temperatura de incubación utilizada, la concentración de agar fue de 3%. Teniendo en cuenta la condición ácida del medio, el agar se esterilizó por separado a pH 6.0 con el fin de evitar la hidrólisis de éste, mientras que el resto de los componentes se esterilizaron a pH 1.0 y finalmente se mezclaron las dos partes.

5.1.3. Mantenimiento de las cepas.

Las diferentes cepas de *G. sulphuraria* se mantuvieron en cultivos líquidos utilizando matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL de medio de cultivo, cubiertos con tapones de silicón que permiten la difusión estéril del aire, incluyendo el CO₂ presente en este gas (~0.04%), e inoculados al 10% (v/v) a partir de cultivos de aproximadamente un mes en matraces en las mismas condiciones. Los cultivos fueron incubados a una temperatura constante de 42 °C, agitación de 150 rpm, iluminación con luz blanca a una intensidad de 80 μmol m⁻² s⁻¹ y fueron preservados durante periodos de cuatro a cinco semanas para

posteriormente ser renovados. Así mismo, las cepas se mantuvieron en medio sólido, sembrando por agotamiento periódicamente en cajas de Petri con medio de cultivo a partir de colonias aisladas.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo.

| N° | Componente | Cantidad para 1 L de medio de cultivo |
|----|--|---------------------------------------|
| 1 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.5 g |
| 2 | K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O | 300 mg |
| 3 | MgSO ₄ •7H ₂ O | 300 mg |
| 4 | CaCl ₂ •2H ₂ O | 20 mg |
| 5 | NaCl | 20 mg |
| 6 | Fe-EDTA | 1.5 mL |
| 7 | Metales traza | 2.0 mL |

| N° | Componente | Cantidad para 100 mL de solución patrón de Fe-EDTA |
|----|-------------------|--|
| 1 | FeSO ₄ | 690 mg |
| 2 | EDTA | 930 mg |

| N° | Componente | Cantidad para 1 L de solución patrón de elementos traza |
|----|--|---|
| 1 | H ₃ BO ₃ | 2.86 g |
| 2 | MnCl ₂ •4H ₂ O | 1.82 g |
| 3 | ZnSO ₄ •7H ₂ O | 220 mg |
| 4 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O | 30 mg |
| 5 | CuSO ₄ •5H ₂ O | 80 mg |
| 6 | NaVO ₃ •4H ₂ O | 40 mg |
| 7 | CoCl ₂ •6H ₂ O | 40 mg |

5.1.4. Preinóculo.

Los preinóculos se realizaron en las mismas unidades experimentales utilizadas para el mantenimiento de las cepas (matraces Erlenmeyer de 500 mL y 300 mL de medio) y bajo las mismas condiciones de cultivo (42 °C, pH 2.0, 150 rpm y 80 μmol m⁻² s⁻¹). Con el fin de disminuir

el tiempo de cultivo del preinóculo, previamente se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de las cepas en condiciones autotróficas y mixotróficas (adición de glucosa 10 g L^{-1}), por un periodo de 20 días. Las variables analizadas fueron: densidad óptica y peso seco (**Información suplementaria IS.1**).

5.1.5. Inóculo.

Los inóculos consistieron en cultivos líquidos de 900 mL de volumen del medio de cultivo descrito anteriormente, inoculados al 10% (v/v) a partir de los preinóculos e incubados durante un periodo de siete días una temperatura de $42 \text{ }^\circ\text{C}$, iluminación continua con luz blanca a una intensidad de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0.4 vvm de aireación, CO_2 atmosférico (0.040%) y agitación mecánica de 150 rpm con un magneto plano de teflón de 7 cm. Los inóculos se prepararon en sistemas fotobiológicos cerrados (fotobiorreactores), los cuales consisten en frascos de vidrio de 1 L de volumen con tapones herméticos que cuentan con línea de aireación, venteo y toma de muestra (**Figura 7**). Teniendo en cuenta la temperatura utilizada, fue necesario saturar de agua previamente el aire que ingresaba al sistema mediante el acoplamiento de un humidificador.

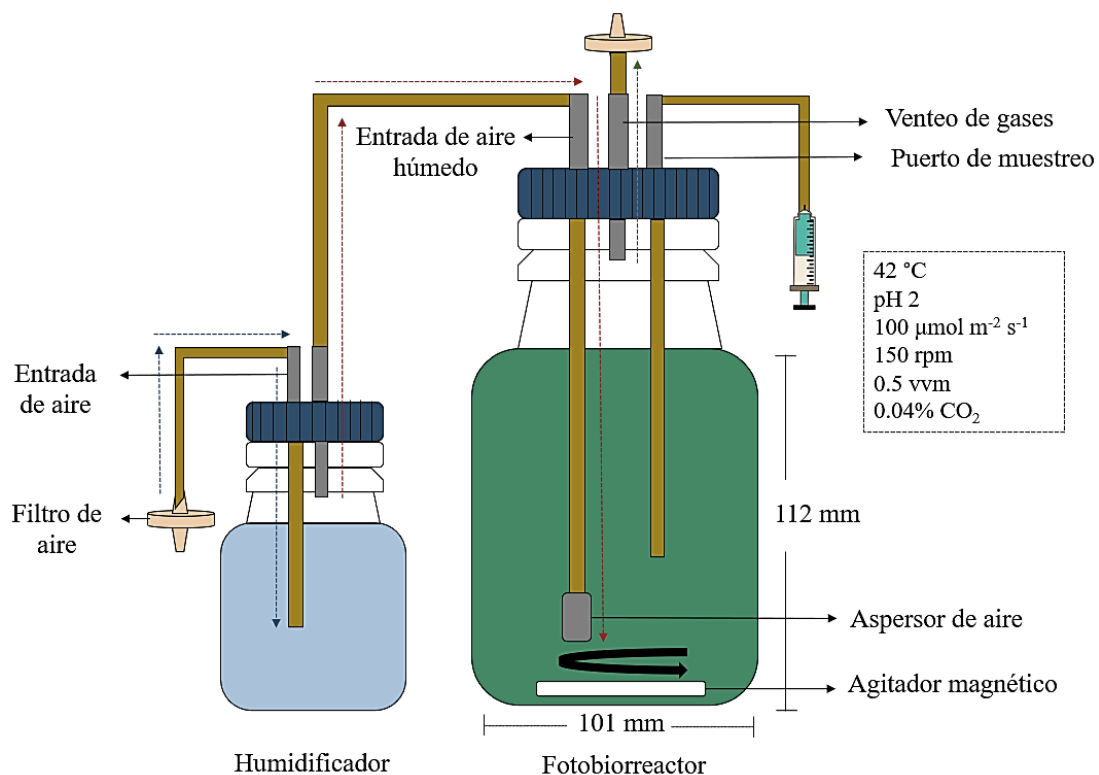


Figura 7. Esquema del sistema fotobiológico usado en el presente estudio.

5.1.6. Cultivos experimentales.

Se realizó un estudio cinético comparativo del crecimiento celular y contenido de proteína, carbohidratos y lípidos a nivel fotobiorreactor, usando diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones controladas de crecimiento (fotobiorreactor de 1 L, pH 2.0, 42 °C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO_2 atmosférico (0.040%), 150 rpm y 0.4 vvm), utilizando un volumen de trabajo de 900 mL de medio de cultivo. Todos los cultivos experimentales fueron monitoreados cada 2 días, durante un periodo total de 20 días. Las variables analizadas fueron: concentración celular y contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

5.2. Métodos analíticos.

5.2.1. Determinación de la concentración celular.

La concentración celular fue estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, para lo cual a partir de los diferentes tiempos de muestreo establecidos se tomó un cierto volumen de cultivo y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro (GENESYSTEM 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) a una longitud de onda de 800 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado y se interpolaron en una curva tipo de peso seco, usando agua destilada como blanco: $y = 1.0052x - 0.0053$; $R^2 = 0.9926$.

Para determinar el peso seco de la masa celular, las muestras se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro. La masa celular retenida en las membranas se lavó dos veces con agua destilada para eliminar los constituyentes minerales solubles que pudieran estar presentes. Posteriormente, las membranas se colocaron en una estufa a 75 °C, hasta peso constante. La cuantificación de la biomasa se estimó por diferencia de pesos. La productividad volumétrica de la biomasa se determinó mediante la **ecuación 1**,

$$Q_x = \frac{X_n - X_0}{t_n - t_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde X_n y X_0 es la concentración de biomasa (g L^{-1}) en los días t_n y t_0 , respectivamente.

La densidad celular (células mL^{-1}) de los cultivos fue determinada mediante conteo directo en cámara de Neubauer con microscopio de luz utilizando el objetivo 40X. En los casos en los

cuales fue necesario diluir la muestra, las diluciones se llevaron a cabo utilizando agua destilada. Los recuentos se realizaron por triplicado y los resultados se representan como valores medios. La densidad celular se determinó utilizando la **ecuación 2**,

$$Células mL^{-1} = \left\{ \frac{(N)(Fd)}{(0.1*1*1)\left(\frac{n}{25}\right)} \right\} (1000) \quad \text{Ecuación 2}$$

en donde N fue el recuento total de células, Fd fue el factor de dilución y n los cuadrantes totales contados de la cámara (**Figura 8**).

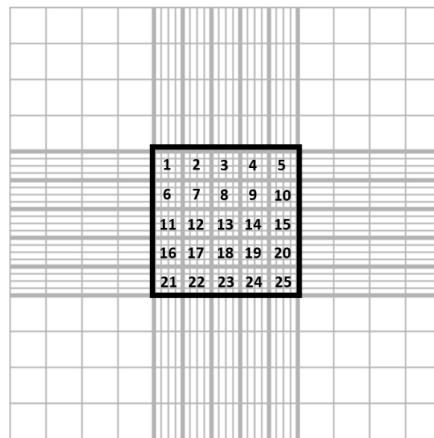


Figura 8. Representación esquemática de los cuadrantes utilizados en la cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular.

5.2.2. Cuantificación de amonio.

La concentración de amonio fue determinada mediante el método colorimétrico propuesto por [Hernández-López & Vargas-Albores, 2003](#) con algunas modificaciones. 750 μ L de la muestra convenientemente diluida ($Fd:1/500$) sin células se mezclaron con 60 μ L de fenol 10% (en etanol al 95%), 60 μ L de nitroprusiato de sodio al 0.5% (p/v) y 90 μ L de solución oxidante (citrato de sodio 20% p/v, hidróxido de sodio 1% p/v, hipoclorito de sodio 4% v/v). Los reactivos se adicionaron a la muestra en el orden mencionado, mezclando por inversión entre cada paso de la reacción. La mezcla fue incubada durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro (GENESYSTM 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) a una longitud de onda de 655 nm. Los ensayos se hicieron por triplicado y las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva tipo ($y = 0.1053x + 0.0119$)

realizada con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en concentraciones de 1.5 – 9.0 ppm y un $R^2 = 0.9948$. Los resultados se representan como valores medios.

El método colorimétrico se fundamenta en la formación de un complejo coloreado (azul de Indofenol) que se desarrolla por la reacción entre amonio, hipoclorito de sodio y fenol en presencia de nitroprusiato de sodio. En el mecanismo de reacción (**Figura 9**) el amoníaco reacciona con el hipoclorito para formar monocloroamina en un ambiente alcalino (I), la cual posteriormente reacciona con un fenol para formar cloroimina de benzoquinona (II), que a su vez reacciona con un segundo fenol para formar un indofenol (III). El nitroprusiato de sodio es un reactivo de acoplamiento que aumenta la cinética de la última etapa de la reacción (Catalizador) (IV).

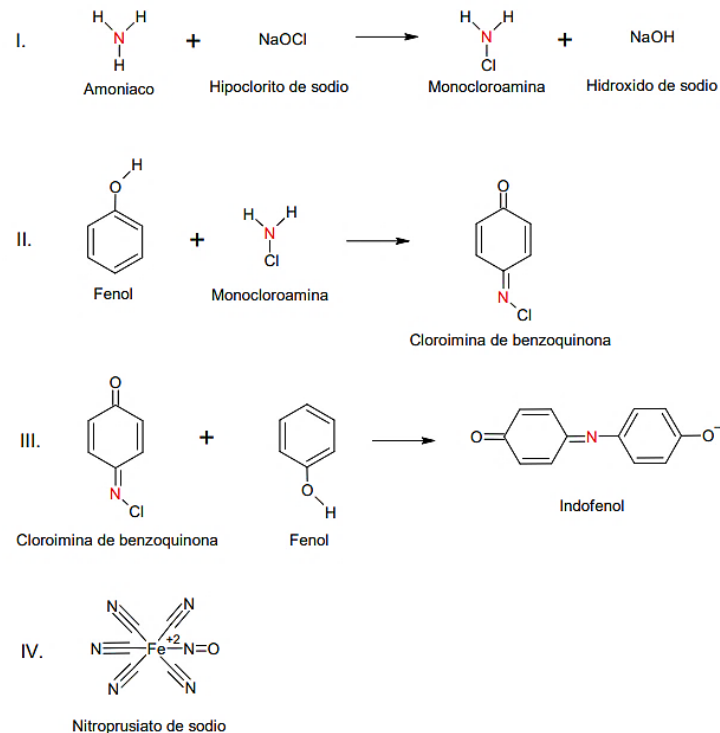


Figura 9. Mecanismo de reacción del método colorimétrico de fenol-hipoclorito para la determinación de amonio (adaptado de [Kimble et al.,2006](#)).

5.2.3. Determinación del contenido de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de [Lowry et al., \(1951\)](#), modificado por [Price \(1965\)](#). Se preparó una solución de reactivo D de Lowry en una proporción de 48: 1: 1 de reactivos A (Na_2CO_3 al 2% (p / v) (anhidro) en NaOH 0.1 N); B (tartrato de NaK

tetrahidratado al 1% (p / v)) y C ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en H_2O al 0.5% (p / v)), respectivamente. El ensayo de Lowry también emplea el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu en una proporción 1:1 de Folin-Ciocalteu fenol 2 N: agua ultrapura.

Para la extracción de proteínas se llevó a cabo la metodología propuesta por [Slocombe et al., \(2013\)](#) con algunas modificaciones. 5 mg de la biomasa seca se resuspendieron mediante agitación con Vórtex en 0.2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 24% (p /v). Los homogeneizados se incubaron a 95 °C durante 15 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se diluyeron hasta una concentración de TCA 6% (p /v) con la adición de 0.6 mL de agua ultrapura. Los homogeneizados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min a 4 °C (microcentrífuga Eppendorf™ modelo 5415R, Hamburgo, Alemania) y se descartaron sus sobrenadantes. Los sedimentos se resuspendieron en 0.5 mL de reactivo D de Lowry y se incubaron durante 3 h a 55 °C. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se retuvo el sobrenadante.

A 50 µL del extracto de proteína anterior se adicionaron 0.95 mL de reactivo D de Lowry, se mezcló por inversión y se llevó a incubación durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 0.1 mL del reactivo fenol de Folin-Ciocalteu diluido a cada tubo y se agitó de inmediato. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de cada muestra a 600 nm. En los casos en los cuales fue necesario diluir la muestra, las diluciones se llevaron a cabo utilizando reactivo D de Lowry.

Las lecturas se realizaron en un tiempo inferior a una hora y los ensayos se hicieron por triplicado. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva tipo ($y = 0.00378x + 0.1215$) realizada con albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 2.5 – 500 µg/mL y un $R^2 = 0.9837$. Los resultados se representan como valores medios.

5.2.4. Determinación gravimétrica de lípidos.

La extracción lipídica se realizó por el método desarrollado por [Bligh & Dyer \(1959\)](#) , el cual consta de un sistema cloroformo / metanol / agua para la extracción de lípidos a partir de material biológico. El método se basa en una mezcla de cloroformo y metanol (sistema de disolvente monofásico) que permite extraer y disolver lípidos. Por la adición de agua o solución

salina se produce un sistema bifásico que conduce a la migración de los compuestos polares, junto con el metanol en una fase acuosa superior, dejando los lípidos en la fase inferior de cloroformo (Meullemiestre *et al.*, 2015).

Para la extracción de lípidos, 30 mg de la biomasa microalgal liofilizada se resuspendió mediante agitación con Vórtex en 6 mL de una mezcla de metanol y cloroformo (2:1 v/v) y se llevó a sonicación (Branson B200, Danbury, Connecticut, USA) por 60 min. Posteriormente, se adicionaron 4 mL de una mezcla de cloroformo y solución de NaCl al 1% (1:1 v/v) con el fin de obtener una proporción final de metanol, cloroformo y NaCl 1% de 2:2:1 v/v. Finalmente, se recuperó la fase del cloroformo, la cual se secó a temperatura ambiente y la porción restante se consideró como lípidos. Todas las extracciones se realizaron por triplicado. Los resultados se representan como valores medios.

5.2.5. Determinación del contenido de carbohidratos.

La determinación del contenido de carbohidratos se llevó a cabo mediante el analizador bioquímico (YSI® 2700, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), el cual emplea una o más reacciones catalizadas por enzimas para finalmente producir peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se oxida electroquímicamente en el ánodo de platino de una sonda electroquímica, lo cual genera una señal de corriente de la sonda. Teniendo en cuenta que estructuralmente los α -poliglucanos (glucógeno y almidón) están constituidos por subunidades de glucosa, se empleó una membrana con la enzima Glucosa oxidasa inmovilizada.

Para la extracción de los carbohidratos presentes en la muestra se realizó un tratamiento termoquímico (Garibay-Hernández *et al.*, 2013). Un volumen determinado del cultivo microalgal se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min (microcentrífuga Eppendorf™ modelo 5415R, Hamburgo, Alemania), recuperando la pastilla celular y descartando el sobrenadante. Posteriormente, la muestra se resuspendió en 0.5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 2 N, se homogenizó mediante agitación con Vórtex, se incubó a 99 °C durante 1 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se neutralizó con NaOH 4 N, se centrifugó a 14,000 rpm, se retuvo el sobrenadante y se realizó la medición en el YSI ®. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se representan como valores medios.

5.2.6. Extracción de α -poliglucanos.

La extracción de α -poliglucanos se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por [Martinez-Garcia et al., 2016](#) con algunas modificaciones. 50 mg de biomasa seca de *G. sulphuraria* se resuspendieron en 1 mL de agua ultrapura y se llevaron a sonicación (Procesador Ultrasónico Cole-Parmer®, modelo GEX130, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos) por 4 ciclos de 10 s de rompimiento celular y 30 s de reposo, para un tiempo total de 40 s por ciclo. El lisado celular se centrifugó (microcentrífuga Eppendorf™ modelo 5415R, Hamburgo, Alemania) a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante, libre de restos celulares y células intactas, se llevó a incubación en una plataforma de calentamiento (ThermoMixer® F1.5, Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) a 100 °C durante 15 min para desnaturalizar y precipitar proteínas y luego se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 0.1 volúmenes de ácido tricloroacético al 50% (TCA) para precipitar las proteínas residuales. La muestra se incubó en hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se mezcló con 1.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el α -poliglucano a 4 °C. El α -poliglucano precipitado se recuperó mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos y se analizó posteriormente.

5.2.7. Análisis de α -poliglucanos por cromatografía de permeación en gel (CPG).

El análisis de los polímeros extraídos se realizó mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando el Cromatógrafo Ultimate 3000 Dionex equipado con un detector de índice de refracción (RefractoMax 520) y una columna Ultrahydrogel™ Linear (7.8 x 300 mm). La columna se mantuvo a 35 °C con un flujo de 0.8 mL min⁻¹ de Nitrato de Sodio 0.1 M (fase móvil). Previo al análisis de las muestras, la columna se estabilizó con la fase móvil hasta que el valor del índice de refracción no cambiara. Las corridas tuvieron una duración de 20 minutos ([Vallejo-García et al., 2019](#)). Para el análisis de las muestras, el α -poliglucano extraído se disolvió en 50 μ L de agua ultrapura y se analizó directamente. Se utilizó glucógeno tipo VII de *Mytilus edulis* (G-1508 Sigma Aldrich) como control a una concentración de 10 mg mL⁻¹. La determinación del peso molecular de los α -poliglucanos se llevó a cabo a partir de una curva tipo de polímeros estándar (**IS.2**).

5.2.8. Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas.

Para la ruptura celular y extracción de las ficobiliproteínas, 10 mg de biomasa liofilizada de *G. sulphuraria* se resuspendieron en 1 mL de solución de extracción, la mezcla se congeló y descongeló, se adicionaron 500 mg de perlas de vidrio de 450-500 μm (Sigma Aldrich), se mezclaron por agitación (Mezclador de vórtice Daigger® Scientific, Vortex-Genie 2) por 2 min y se llevaron a incubación por 3 horas, 37°C y 300 rpm (ThermoMixer® F1.5, Eppendorf®, Hamburgo, Alemania). La cuantificación de las ficobiliproteínas se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico propuesto por [Kursar & Alberte, 1983](#). La absorbancia de los sobrenadantes que contienen ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) se midió a 618, 650, 498 nm (GENESYS™ 30, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) para calcular la concentración de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, utilizando las ecuaciones 3, 4 y 5 respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se representan como valores medios.

$$\text{Ficocianina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 166A_{618} - 108A_{650} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Aloficocianina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 200A_{650} - 52.3A_{618} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Ficoeritrina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 169A_{498} - 8.64A_{618} - 1.76A_{650} \quad \text{Ecuación 5}$$

5.2.9. Extracción y cuantificación de Clorofila.

Para la ruptura celular y extracción de clorofila, 5 mg de biomasa liofilizada de *G. sulphuraria* se resuspendieron en 1 mL de solución de extracción (Acetona 90%), se adicionaron 500 mg de perlas de vidrio de 450-500 μm (Sigma Aldrich), se mezclaron por agitación (Mezclador de vórtice Daigger® Scientific, Vortex-Genie 2) por 2 min y se llevaron a incubación por 3 horas, 37°C y 300 rpm (ThermoMixer® F1.5, Eppendorf®, Hamburgo, Alemania). La cuantificación de la clorofila se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico propuesto por [Ritchie, 2006](#). La absorbancia de los sobrenadantes que contienen clorofila se midió en un rango de 400-700 nm (GENESYS™ 30, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) y se utilizó la ecuación 6 para determinar la concentración del pigmento. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se representan como valores medios.

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11.8668A_{664} - 1.7858A_{647} \quad \text{Ecuación 6}$$

5.2.10. Extracción y determinación de aminoácidos.

La hidrólisis de la biomasa microalgal se llevó a cabo mediante un tratamiento termoquímico. 10 mg de biomasa seca de *G. sulphuraria* se resuspendieron en 1 mL de HCl 3N, se homogenizó mediante agitación con Vórtex (Mezclador de vórtice Daigger® Scientific, Vortex-Genie 2) y se incubó durante 24 h, a 99 °C y 200 rpm (ThermoMixer® F1.5, Eppendorf®, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, la muestra se neutralizó con NaOH 10 N, se centrifugó por 30 min a 13,000 rpm (microcentrífuga Eppendorf™ modelo 5415R, Hamburgo, Alemania), se retuvo el sobrenadante y se filtró (filtros de nylon de 0.45 µm y 13 mm de diámetro, MICROLAB SCIENTIFIC). La determinación del perfil de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Previo a la inyección, los aminoácidos presentes en las muestras se derivatizaron en línea usando orto-ftalaldehído (OPA) (para aminoácidos primarios) según el método de [Henderson et al., 2000](#). Se inyectaron los siguientes volúmenes: 2.5 µL de solución tampón de borato mezclado con 0.5 µL de muestra, 0.5 µL de OPA y 37 µL de agua. El sistema de HPLC (serie 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) está compuesto por una bomba binaria equipada con un microdesgasificador de vacío, un inyector automático controlado por termostato, un compartimento de columna y un detector de arreglo de diodos. Los análisis se realizaron utilizando una columna Synergi™ 4 µm Max-RP 80 Å, LC 75 x 2 mm (Phenomenex®, California, USA) y la temperatura de la columna se fijó en 40 °C. La fase móvil corresponde a una solución 40 mM de NaH₂PO₄ (fase A) y una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (10:45:45; fase B). La elución de las muestras se realizó a un flujo de 2.0 mL/min mediante elución en gradiente, y el tiempo total de ejecución fue de 14 min.

5.2.11. Determinación de clorofila a (Chl a).

La clorofila a se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia de células completas se determinaron en un fluorómetro (L-55, PerkinElmer®, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Las células se ajustaron a una concentración 4.5x10⁶ Células mL⁻¹ para todas las mediciones. La Chl a se excitó a 455 nm y la lectura de emisión de fluorescencia se realizó a 685 nm. Los valores de fluorescencia se normalizaron mediante F/F750. Se midieron tres réplicas biológicas independientes (n = 3).

5.2.11. Determinación de ROS y viabilidad.

La determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la viabilidad celular se llevó a cabo mediante citometría de imagen, empleando MitoTracker™ Red CMXRos y SYTOX™ Blue, respectivamente. El MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) es un colorante fluorescente (rojo) que tiñe las mitocondrias de las células vivas y cuya intensidad de fluorescencia está asociada a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). De igual forma, las mitocondrias activas exhiben una fluorescencia más brillante en comparación con las mitocondrias de células en fase de muerte celular. El agente de tinción presenta una longitud de onda de emisión de 579-599 nm cuando se emplea el láser amarillo (561 nm). Por otra parte, el SYTOX™ Blue (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) es un agente de tinción fluorescente específico para los ácidos nucleicos de las células muertas, con membranas plasmáticas comprometidas, observándose una fluorescencia de color azul brillante cuando se excita con láser violeta de 405 nm.

Las células microalgales se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 1000 μ L de agua ultrapura. Posteriormente, 2 μ L de la solución del agente de tinción (MitoTracker™ Red CMXRos 1 mM y SYTOX™ Blue 1 mM) se añadieron. Las muestras de viabilidad se incubaron a temperatura ambiente y las de determinación de ROS se llevaron a 37°C por 20 min en oscuridad. Con el fin de determinar la autofluorescencia de las muestras, se realizó un control sin tinción para las dos determinaciones.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. ETAPA 1.

Estudio cinético del crecimiento celular y contenido de macromoléculas de diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones autotróficas de crecimiento.

6.1.2. Crecimiento y producción de biomasa.

En la **Tabla 3** se presentan de forma comparativa los resultados obtenidos de la evaluación de las cinco cepas de *G. sulphuraria*, cultivadas durante 20 días en condiciones autotróficas de crecimiento: fotobiorreactor de 1 L (Figura 7) , 900 mL del medio mineral descrito por [Ford \(1979\)](#) y [Gross & Schnarrenberger \(1995\)](#), pH 2.0, 42 °C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO_2 atmosférico (0.040%), 150 rpm y 0.5 vvm. Durante el tiempo evaluado los cultivos celulares no alcanzan la fase estacionaria (**Figura 10**), observándose que la cepa SAG 2192 no presentó un crecimiento significativo en comparación con las demás cepas evaluadas. Así mismo, se evidencia una reducción de la velocidad de crecimiento de la mayoría de las cepas después de 14 días de cultivo, siendo *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 la cepa que alcanzó la concentración de biomasa final más alta (2.33 g L⁻¹). Excluyendo la cepa SAG 21.92, este valor fue de 2.2 a 3.2 veces superior al obtenido con las otras cepas (Figura 2.A, Tabla 1).

Al comparar los resultados obtenidos con la cepa *G. sulphuraria* CCMEE.5587.1 con los reportados por [Sakurai et al., \(2016\)](#), quienes obtuvieron una concentración máxima de biomasa de 1.1 g L⁻¹ en 12 días utilizando la cepa 074 W de *G. sulphuraria* en condiciones autotróficas, se observa que en el presente estudio se obtiene una concentración superior con la cepa *G. sulphuraria* CCMEE.5587.1 con un valor de 1.37 g L⁻¹ en el día 12, lo cual corresponde a una concentración de biomasa 20% mayor a lo reportado en la literatura. No obstante, es importante mencionar que las condiciones de cultivo reportadas con la cepa 074 W (cultivo en matraces de 500 mL, 300 mL de medio Allen modificado 2x, pH 2.5, 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 42 °C) fueron diferentes a las utilizadas en el presente estudio.

Por otra parte, respecto a los valores máximos de densidad celular alcanzados para cada una de las cepas evaluadas (**tabla 3**), se puede apreciar que con la cepa *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 (8.97 x10⁷ células mL⁻¹) se obtiene un valor aproximadamente 5 veces superior al alcanzado con las otras cepas de *G. sulphuraria* (excluyendo la cepa SAG 2192; **Figura 10.B**).

Lo anterior se correlaciona con los resultados encontrados referentes al tiempo de duplicación (t_d), teniendo en cuenta que para la cepa *G. sulphuraria* CCME5587 se obtuvo un t_d de 4.43 días, el cual fue en promedio 2.12 veces menor comparado con las demás cepas. Los valores reportados presentan diferencia significativa (t_d SAG. 2192 = t_d UTEX 2919 \neq t_d SAG 107.79 \neq t_d SAG 108.79 \neq t_d CCMEE 5587.1), representado en el estadístico $p < 0.05$ ($p = 0.0133$). Cabe mencionar, aunque no se estudió a detalle, que las células de *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 son significativamente de menor tamaño que las células de las otras cepas. Observaciones directas al microscopio, a la hora de contar las células, permitieron observar esa diferencia, lo cual explica en parte la discrepancia en los valores relativos de masa y densidad celular obtenidos a los 20 días de los cultivos, 2.2 a 3.2 veces vs 5 veces mayor, respectivamente. Dicho resultado indica que, aunque son cepas de la misma especie, el lugar de donde fueron aisladas, las modificaciones genéticas que seguramente tuvieron a lo largo del tiempo para adaptarse a los lugares donde se encontraban, y otros factores, afectaron su fenotipo (y seguramente su genotipo) y por tanto es relevante hacer estudios comparativos entre las diferentes cepas.

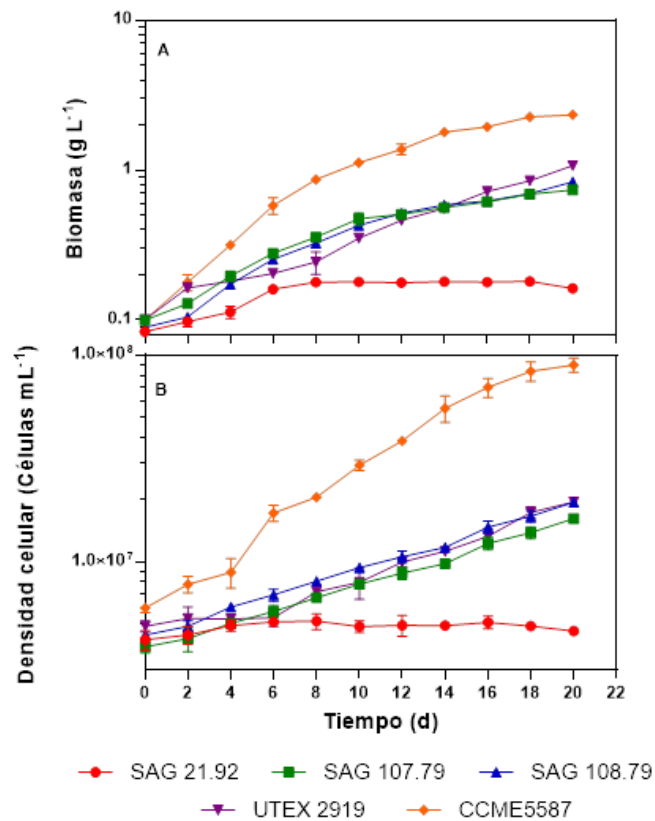


Figura 10. Crecimiento celular de diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones autótrofas de crecimiento. **A.** Concentración de Biomasa. **B.** Densidad celular.

La **Figura 11** muestra los resultados de productividad volumétrica de biomasa (**A**) y células (**B**) de todas las cepas de *G. sulphuraria* estudiadas. Respecto a la productividad volumétrica determinada a partir de la biomasa, se observa que la cepa *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 presenta una productividad de $111.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en el día 20, la cual es 3.5, 3.0 y 2.31 veces superior a las encontradas para las cepas *G. sulphuraria* SAG 107.79 ($31.77 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), SAG 108.79 ($37.13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y UTEX 2919 ($48.40 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), respectivamente. Así mismo, respecto a la productividad celular, la cepa *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 presenta una productividad de $4.18 \times 10^6 \text{ Células mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ al final del tiempo de cultivo, la cual es 6.8, 6.4 y 6.6 veces superior a las encontradas para las cepas *G. sulphuraria* SAG 107.79 ($6.17 \times 10^5 \text{ Células mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$), SAG 108.79 ($7.52 \times 10^5 \text{ Células mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y UTEX 2919 ($7.31 \times 10^5 \text{ Células mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$), respectivamente.

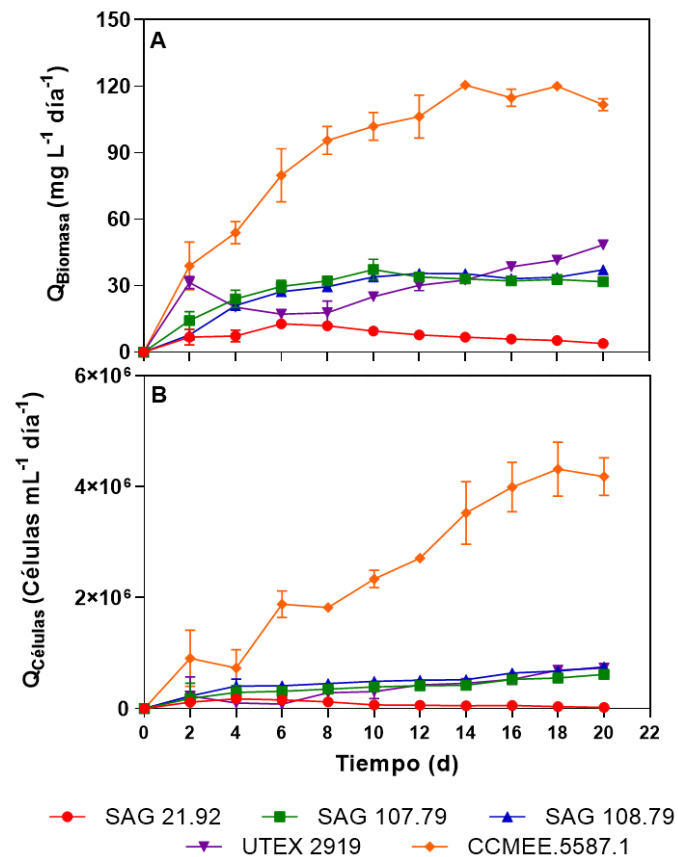


Figura 11. Productividad volumétrica de biomasa y densidad celular de diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones de crecimiento autótrofas.

El contenido de macromoléculas (proteínas, carbohidratos y lípidos) es uno de los criterios indispensables en la evaluación del potencial de los microorganismos para la producción de

estos compuestos. Sin embargo, dicho parámetro por sí solo es una medida inadecuada para hacer una elección acertada de una cepa útil con aplicaciones industriales, por lo cual se debe tener en cuenta diversos parámetros, como la productividad de biomasa (Maroneze et al., 2016). Al correlacionar el comportamiento del crecimiento celular (producción de biomasa y densidad celular) y la productividad de biomasa de la cepa *G. sulphuraria* CCMEE.5587.1, se hace evidente la presencia de una fase de desaceleración, caracterizada por presentar crecimiento celular a una velocidad menor y la obtención de la productividad máxima (día 14). El análisis de la productividad es un criterio importante que permite seleccionar por ejemplo a que tiempo es conveniente cosechar el cultivo, teniendo en cuenta que en un tiempo menor se alcanza una velocidad de producción constante.

6.1.2. Composición bioquímica: carbohidratos, lípidos y proteínas.

En cuanto a la caracterización bioquímica de la biomasa microalgal generada, al analizar el contenido de proteína final de las diferentes cepas de *G. sulphuraria* (Tabla 3), se observa un contenido de proteínas alto, superior al 40% (p/p) para la mayoría de las cepas, siendo *G. sulphuraria* UTEX 2919 la cepa que alcanzó el valor más alto (~47 %). Los resultados anteriores se comparan con los encontrados por Graziani et al., (2013), quienes cuantificaron (método de Kjeldahl y utilizando un factor de conversión de nitrógeno de 6.25) la proteína total presente en la biomasa seca de la cepa *G. sulphuraria* 064/309, encontrando un contenido proteico del 32.5% en cultivos autotróficos. En el mismo sentido, el contenido de proteína encontrado en actual proyecto es superior al de otras microalgas rojas como *Porphyridium marinum*, la cual presenta un contenido del 15.38% respecto al peso seco (Ben Hlima et al., 2019), *Porphyridium cruentum*, cuyo contenido proteico es del 28% al 39% (Becker, 2007), o *Porphyridium purpureum*, que tiene un contenido del 15.08% bajo condiciones autotróficas y no limitantes (Assunção et al., 2017).

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos del comportamiento de las diferentes cepas de *G. sulphuraria* en el día 20 bajo condiciones autótrofas de cultivo.

| Cepa | Biomasa (g _{DCW} L ⁻¹) | Densidad celular (Células mL ⁻¹) | Proteína (%; g g _{Biomasa} ⁻¹) | Carbohidratos (%; g g _{Biomasa} ⁻¹) | Lípidos (%; g g _{Biomasa} ⁻¹) | <i>td</i> * (Días) |
|---------------------------------------|--|---|--|---|---|---------------------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 21.92 | 0.18 ± 0.01 | 5.17x10 ⁶ ± 2.25x10 ⁵ | 42.58 ± 2.72 | 8.01 ± 0.58 | 8.89 ± 1.58 | 16.84 ± 2.27 ^a |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 0.74 ± 0.02 | 1.62x10 ⁷ ± 4.51x10 ⁵ | 39.31 ± 3.21 | 8.89 ± 0.08 | 6.78 ± 0.77 | 9.61 ± 0.59 ^b |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 0.83 ± 0.01 | 1.75x10 ⁷ ± 4.58x10 ⁵ | 43.44 ± 1.73 | 8.15 ± 0.05 | 9.56 ± 1.35 | 9.36 ± 0.48 ^b |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 1.07 ± 0.04 | 1.95x10 ⁷ ± 5.39x10 ⁵ | 46.86 ± 1.35 | 3.94 ± 0.31 | 7.31 ± 0.97 | 8.21 ± 0.51 ^c |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | 2.33 ± 0.06 | 8.97x10 ⁷ ± 7.01x10 ⁶ | 43.95 ± 3.15 | 5.91 ± 0.35 | 14.11 ± 0.84 | 4.27 ± 0.11 ^d |

* Tiempo de duplicación.

Los datos corresponden a las medias ± las desviaciones estándar de los experimentos por triplicado.

^a, ^b, ^c y ^d parámetros obtenidos por una prueba de Tukey. Letras iguales: diferencia entre medias = 0, letras diferentes: diferencia entre medias ≠ 0. Los valores de *td* se obtuvieron durante la fase de crecimiento exponencial.

Los valores de proteína alcanzados con este microorganismo se comparan favorablemente con el contenido reportado de algunos vegetales utilizados como fuente de proteína en la industria de alimentos y piensos como la harina de soya (*Glycine max*), cuyo rendimiento porcentual es ~36% (p/p) y es considerada fuente de proteína (Koyande et al., 2019b). Además del alto contenido de proteínas que observamos en la biomasa de *G. sulphuraria*, hay otros tipos de macromoléculas presentes, como lípidos y carbohidratos, que en conjunto brindan buenas características nutricionales a la biomasa generada.

Con relación al contenido de lípidos, éste en las cinco cepas evaluadas varió de 7 a 14 % (p/p), en donde *G. sulphuraria* CCMEE.5587.1 presentó un contenido de lípidos 2 veces mayor que las otras cepas (**Tabla 3**). Se ha reportado que *G. sulphuraria* es capaz de acumular lípidos con valores que van desde 1.1 (Graziani et al. 2013) a 5.4% (Sakurai et al. 2016), los cuales son contenidos inferiores a los encontrados en todas las cepas en el estudio actual. De igual forma, nuestros resultados se comparan con los reportados para otros microorganismos Rhodophytas como *P. cruentum*, capaz de acumular lípidos en un intervalo del 14 al 19% (Becker, 2007; Oh et al., 2009) y *P. purpureum* con un contenido lipídico del 1.73 % respecto a la biomasa seca (Assunção et al., 2017).

Respecto al contenido de carbohidratos (**Figura 12**), se puede apreciar que no hay cambios en el contenido de esta macromolécula en los diferentes tiempos de cultivo, sugiriendo que los cultivos no se encontraron bajo condiciones de limitación de nutrientes o estrés que permitieran la sobreacumulación del glucano de reserva. El principal polímero de reserva acumulado por *G. sulphuraria* es el almidón florídeo, un homopolímero de glucosa altamente ramificado (~18% de enlaces α -1,6) y un tamaño molecular de 2.5×10^5 Da (Martinez-Garcia et al., 2016). Por lo anterior, el contenido de carbohidratos se determinó a partir de la glucosa liberada después de la hidrólisis termoquímica de la biomasa liofilizada. Las cepas de *G. sulphuraria* acumularon cantidades bajas de carbohidratos, las cuales oscilaron entre 4 y 9% (p/p) y obteniéndose el mayor contenido con la cepa SAG 107.79 (Tabla 1). La cepa CCMEE 5587.1 tuvo un ligero aumento en el contenido de carbohidratos como se ve al final del cultivo (día 20), lo que es característico de la fase de desaceleración del crecimiento observada para esta cepa (**Figura 2**), en la que el contenido de carbohidratos puede aumentar como un material de reserva.

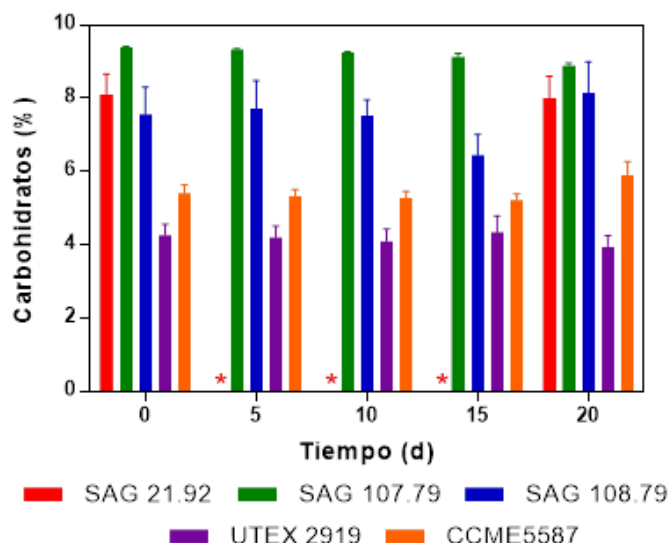


Figura 12. Contenido de carbohidratos (glucosa) de diferentes cepas de *G. sulphuraria*.

El contenido de macromolécula se expresa como: $(\text{gX gB}^{-1}) \times 100$, donde gX es la concentración carbohidratos y gB la concentración de Biomasa.

Existen reportes para microalgas rojas como *G. sulphuraria* y *P. cruentum* en los cuales se han encontrado contenidos de carbohidratos totales del 69% (Graziani *et al.*, 2013) y 57% (Becker, 2007) respectivamente, los cuales son superiores a los obtenidos en el presente estudio. Como se mencionó anteriormente, teniendo en cuenta la finalidad del proyecto, el contenido de carbohidratos reportado corresponde únicamente a la cuantificación de glucosa; por lo cual, no se tiene en cuenta el contenido de otros monosacáridos como la xilosa y arabinosa, los cuales se han encontrado en la biomasa de la cepa *G. sulphuraria* UTEX 2919 (comunicación personal Francisco Vera López-Porrillo), o como galactosa, unidad estructural de la carragenina, un compuesto químico presente en la pared celular de las algas rojas (Al Abdallah *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se seleccionó la cepa *G. sulphuraria* SAG 107.79 para llevar a cabo los experimentos de la segunda etapa del proyecto correspondientes a dos estrategias de cultivo para incrementar la síntesis de poliglucano de reserva: (1) Efecto de diferentes condiciones de crecimiento (autotrofia, mixotrofia y heterotrofia) sobre la acumulación del polímero de carbohidratos de reserva y la distribución de pesos moleculares; y (2) Evaluación de diferentes condiciones de cultivo, intensidad luminosa y temperatura de cultivo (100 y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 32 y 42°C) sobre la acumulación del poliglucano de reserva,

mediante un diseño experimental factorial 2FI (22) (variables evaluadas: Temperatura e Intensidad de luz).

6.1.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos: ficobiliproteínas y clorofila.

En la **Tabla 4** se presentan los resultados correspondientes a la cuantificación de las ficobiliproteínas presentes en la biomasa de las diferentes cepas evaluadas de *G. sulphuraria*. En general, se observa que la cepa CCMEE.5587.1 presenta un mayor contenido de este pigmento fotosintético, el cual es 1.40 a 3.04 veces mayor que los valores obtenidos con las otras cepas. Así mismo, los resultados obtenidos muestran que la ficocianina es la ficobiliproteína que se acumula en mayor proporción en el complejo proteico del ficobilisoma (**Figura 13**), en contraste con lo reportado por [Graziani et al., \(2013\)](#), quienes encontraron un mayor contenido de aloficocianina en comparación con los otros pigmentos. Las ficobiliproteínas (por ejemplo, ficoeritrina, aloficocianina, ficocianina), son complejos proteicos pigmentados involucrados en la captación y transporte (complejo antena) de la energía solar durante la fase luminosa de la fotosíntesis ([Masojidek et al., 2013](#)). En *G. sulphuraria* se ha encontrado que el contenido de las ficobiliproteínas puede llegar a ser hasta del 10% del peso seco total de la biomasa ([Graziani et al., 2013](#); [Wan et al., 2016](#)) en cultivos fotoautótrofos. Teniendo en cuenta que la cepa SAG 21.92 no creció bajo las condiciones probadas en el presente estudio, los pigmentos fotosintéticos (ficobiliproteínas y clorofila) y el perfil de aminoácidos no se reportan para esta cepa.

Tabla 4. Contenido de pigmentos fotosintéticos de diferentes cepas de *G. sulphuraria* en el día 20, bajo condiciones autótrofas de cultivo.

| Cepa | Ficocianina (mg g ⁻¹) | Aloficocianina (mg g ⁻¹) | Ficoeritrina (mg g ⁻¹) | Clorofila (mg g ⁻¹) |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|------------------------------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 17.31 ± 0.19 | 2.9 ± 0.29 | 4.14 ± 0.44 | 1.08 ± 0.04 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 33.81 ± 3.06 | 5.34 ± 0.48 | 6.2 ± 0.47 | 1.89 ± 0.05 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 15.50 ± 0.80 | 2.58 ± 0.64 | 4.72 ± 0.65 | 1.57 ± 0.39 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE.5587.1 | 47.13 ± 5.16 | 11.7 ± 1.34 | 9.92 ± 0.88 | 2.48 ± 0.15 |

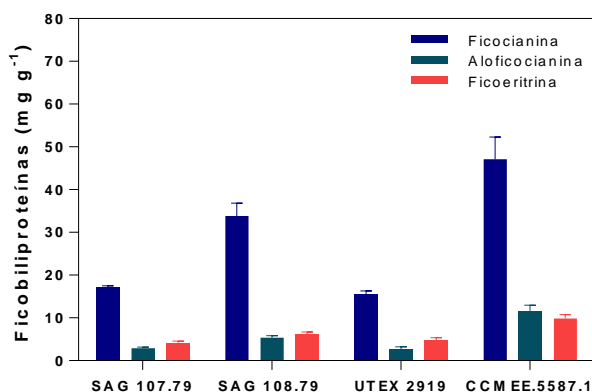


Figura 13. Contenido de ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) de diferentes cepas de *G. sulphuraria* en el día 20 de cultivo bajo condiciones autotróficas.

El contenido de cada pigmento se expresa como: $(\text{mgX gB}^{-1}) \times 100$, donde mgX es la concentración del pigmento y gB la concentración de Biomasa.

La ficocianina es actualmente una molécula comercialmente valiosa obtenida de cultivos autótrofos con cianobacterias como *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Para este microorganismo se han reportado contenidos de 56.6 mg g^{-1} (Manirafasha et al., 2018), 148.1 mg g^{-1} (Ajayan et al., 2012) y 160 mg g^{-1} (Xie et al., 2015), los cuales son 1.2 a 3.4 veces más altos que los informados en el presente estudio con la cepa CCMEE.5587.1 (47 mg g^{-1}) (Tabla 4), lo que indica que se necesita más investigación para maximizar la producción de ficocianina con *G. sulphuraria*. Cabe mencionar que una de las principales ventajas de la ficocianina sintetizada por *G. sulphuraria* es su termoestabilidad a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, a diferencia de lo reportado para la ficocianina de *Spirulina* sp., con estabilidad a temperaturas inferiores a $47 \text{ }^\circ\text{C}$ (Moon et al., 2014).

Respecto a los resultados referentes a la cuantificación de clorofila extraída de la biomasa de *G. sulphuraria*, se observa que en general las diferentes cepas presentan una acumulación de clorofila en un rango de 1.08 a 2.48 mg g^{-1} , siendo el valor más alto el encontrado para la cepa CCMEE.5587.1 (Figura 14.A). Como era de esperar, el espectro de absorción muestra la presencia de dos picos de señal a 410 nm y 670 nm , que son característicos de la clorofila a (Figura 14.B). *Galdieria sulphuraria* es una microalga unicelular clasificada dentro del grupo de las algas rojas que, a pesar de tener un alto contenido en ficobiliproteínas como parte del complejo recolector de fotones, también presenta clorofila a, la cual es un pigmento fotosintético que actúa como centro de reacción en los fotosistemas involucrados en la fase luminosa de fotosíntesis (Masojídek et al., 2007).

La presencia de ficobiliproteínas y clorofila en la biomasa de *G. sulphuraria* aporta un valor nutracéutico añadido a la biomasa de microalgas obtenida en este trabajo. La ficocianina tiene actividades nutracéuticas relacionadas con la disminución de la presión arterial (actividad antihipertensiva), de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (actividad antioxidante), de procesos inflamatorios (actividad antiinflamatoria) y de la proliferación de procesos celulares descontrolados (actividad anticancerígena) (Abd El-Hack *et al.*, 2019; Chandra *et al.*, 2020; Lafarga *et al.*, 2020). Adicionalmente, la clorofila proporciona propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antígenotóxicas, con propiedades nutracéuticas para enfermedades hepáticas (Bishop & Zubeck, 2012; García *et al.*, 2017; Koyande *et al.*, 2019).

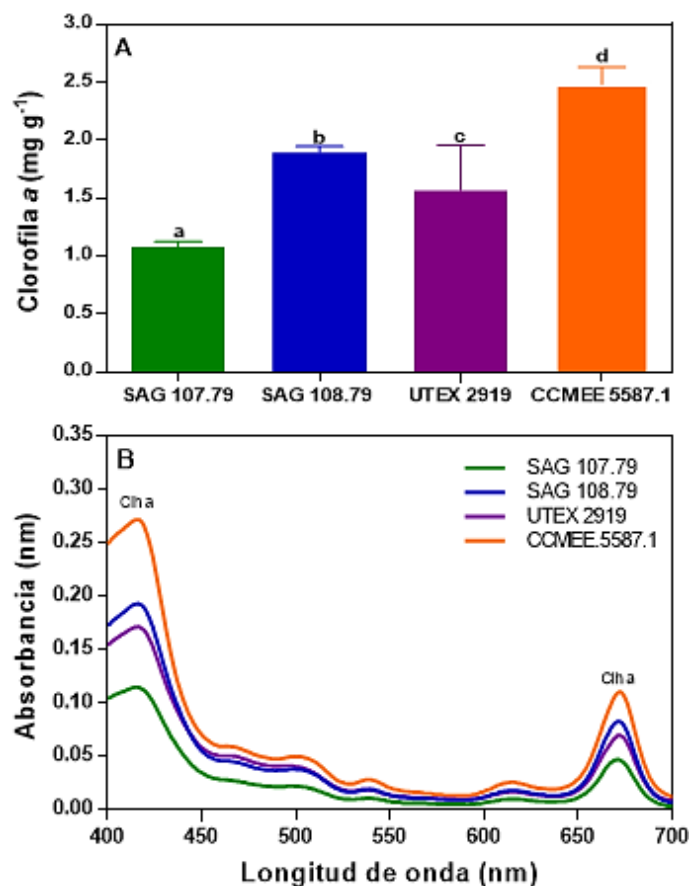


Figura 14. Acumulación de clorofila en diferentes cepas de *Galdieria sulphuraria* en condiciones de crecimiento autótrofo. A. Comparación del contenido del pigmento fotosintético en las cepas evaluadas. B. Espectro de absorción de los pigmentos extraídos con acetona al 90%.

6.1.4. Perfil de aminoácidos.

Debido a la metodología de extracción (hidrólisis termoquímica) y análisis (HPLC) utilizada en esta investigación, algunos aminoácidos como triptófano, asparagina y glutamina no fueron

detectables, lo que sugiere que podría estar relacionado con el límite de detección de la técnica o con el tratamiento termoquímico realizado para la hidrólisis de la biomasa analizada. La Tabla 3 muestra el perfil de aminoácidos (esenciales y no esenciales) de cuatro cepas de *G. sulphuraria*, en el cual se puede observar que todas las cepas presentan un perfil de aminoácidos similar, con ocho de los nueve aminoácidos definidos como esenciales y siete de nueve aminoácidos no esenciales (**Tabla 5**). La determinación del perfil de aminoácidos es uno de los parámetros fundamentales para la evaluación de la calidad de la proteína, especialmente la destinada al consumo humano, la cual de preferencia debe contener en su totalidad o la mayoría de los aminoácidos esenciales, es decir, aquellos aminoácidos que no son sintetizados de forma natural por los seres humanos y por ende deben ser suministrados mediante la ingesta de alimentos (Koyande *et al.*, 2019).

El triptófano es un aminoácido primario, aromático y esencial, cuya biosíntesis en microorganismos fotosintéticos (por ejemplo, las diatomeas) se encuentra estrechamente relacionada con la biosíntesis de otros aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina, al compartir el corismato como molécula precursora común (Bromke, 2013). En la literatura se ha reportado que este aminoácido puede estar en pequeñas concentraciones en la biomasa de varios géneros de microalgas y corresponde a uno de los aminoácidos que se encuentra en menor porcentaje, por lo cual en algunos estudios no es detectable (Chronakis & Madsen, 2011; Koyande *et al.*, 2019a; Tibbetts *et al.*, 2015). Así mismo, se ha reportado que algunas condiciones de extracción de proteínas de la biomasa microalgal utilizando ácido clorhídrico y elevadas temperaturas (condiciones termoquímicas), puede conllevar a la destrucción del triptófano y a no ser determinado posteriormente por los métodos cromatográficos tradicionales (Barbarino & Lourenço, 2005).

Por otra parte, en cuanto a la determinación de glutamina y asparagina (aminoácidos no esenciales), estos tampoco pudieron ser cuantificados mediante la metodología empleada. Sin embargo, Salbitani & Carfagna, 2020 lograron llevar a cabo la determinación de tres aminoácidos (glutamina, glutamato y asparagina) a partir de la biomasa húmeda de *G. sulphuraria* 011, utilizando etanol al 80% para su extracción. Por lo anterior, la proteína presente en las diferentes cepas evaluadas en el presente estudio podría contener los aminoácidos no detectables mencionados anteriormente.

Tabla 5. Perfil de aminoácidos de diferentes cepas de *Galdieria sulphuraria* cultivadas bajo condiciones autotróficas de crecimiento.

| N° | Aminoácido | <i>G. sulphuraria</i> | <i>G. sulphuraria</i> | <i>G. sulphuraria</i> | <i>G. sulphuraria</i> |
|--------------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | SAG 107.79 | SAG 108.79 | UTEX 2919 | CCMEE.5587.1 |
| Esenciales (%) | | | | | |
| 1 | Treonina | 2.54 | 2.52 | 2.41 | 2.81 |
| 2 | Histidina | 2.92 | 2.74 | 2.67 | 2.37 |
| 3 | Valina | 1.43 | 1.32 | 1.36 | 1.54 |
| 4 | Metionina | 0.71 | 0.76 | 0.64 | 0.70 |
| 5 | Triptófano | - | - | - | - |
| 6 | Fenilalanina | 1.58 | 1.55 | 1.46 | 1.57 |
| 7 | Isoleucina | 0.68 | 0.90 | 0.81 | 0.88 |
| 8 | Leucina | 2.64 | 2.65 | 2.67 | 2.71 |
| 9 | Lisina | 1.77 | 1.67 | 1.25 | 1.49 |
| No Esenciales (%) | | | | | |
| 10 | Aspartato | 3.09 | 3.33 | 2.41 | 4.09 |
| 11 | Glutamato | 5.73 | 5.48 | 4.58 | 4.14 |
| 12 | Asparagina | - | - | - | - |
| 13 | Serina | 3.61 | 3.50 | 3.36 | 2.11 |
| 14 | Glutamina | - | - | - | - |
| 15 | Glicina | 3.14 | 3.04 | 2.75 | 2.57 |
| 16 | Arginina | 2.15 | 2.29 | 1.84 | 2.79 |
| 17 | Alanina | 3.03 | 2.76 | 2.03 | 2.45 |
| 18 | Tirosina | 0.61 | 0.70 | 0.78 | 0.68 |

Los valores reportados corresponden al contenido porcentual (g de Aminoácido/ 100 g de Biomasa)

Los resultados anteriores hacen parte de la caracterización bioquímica de las cepas evaluadas, la cual se reporta en el primer producto de investigación “Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization”, manuscrito sometido a la revista “*Journal of Applied Phycology*” el día 31 de octubre de 2021 y aceptado para publicación el día 21 de marzo de 2022.

6.1.5. Conclusiones parciales.

- Bajo las condiciones de cultivo evaluadas fue posible generar biomasa microalgal de *G. sulphuraria* con un potencial alto para producir proteína unicelular, y dada la caracterización bioquímica de esta microalga, la composición de la biomasa es adecuada para alimentos o piensos.
- La cepa CCMEE.5587.1 presenta las mejores características de crecimiento que conllevan a una productividad de biomasa superior. Teniendo en cuenta lo anterior y la condición ácida de los cultivos, esta cepa tiene el potencial de ser utilizada para producción de biomasa a gran escala en estanques abiertos, en dónde se desean cultivos autotróficos con alta densidad celular, que faciliten otras operaciones unitarias como la cosecha de la biomasa y el secado.
- La ficocianina es el pigmento fotosintético que se encuentra en mayor proporción en las diferentes cepas de *G. sulphuraria* cultivadas bajo condiciones autotróficas, lo cual hace de la biomasa de este microorganismo una fuente atractiva para la producción y obtención de este pigmento de interés industrial.
- La cepa SAG107.79 se seleccionó para continuar con las siguientes etapas del proyecto debido a que presentó el mayor contenido de carbohidratos.

6.2. ETAPA 2.

Efecto de diferentes condiciones de crecimiento, autotrofía, mixotrofía y heterotrofía, sobre la acumulación de carbohidratos de reserva y la distribución de pesos moleculares en *G. sulphuraria*

6.2.1. Crecimiento y acumulación del poliglucano

La primera estrategia de cultivo para estudiar la acumulación de α -poliglucanos en *G. sulphuraria* se centró en el efecto de diferentes condiciones de crecimiento (autotrofía, mixotrofía y heterotrofía) sobre la acumulación del polímero de carbohidratos de reserva y la distribución de pesos moleculares. Se llevaron a cabo cultivos mixotróficos y heterotróficos (complementarios a los cultivos autotróficos previamente descritos) en los sistemas fotobiológicos mencionados anteriormente, suplementando el medio de cultivo con glucosa 10 g L⁻¹ (Relación C/N ~10), a pH 2.0, 42 °C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO₂ atmosférico (0.040%), 150 rpm y 0.5 vvm. En la condición de heterotrofía los cultivos se realizaron en oscuridad. Para los cultivos mixotróficos y heterotróficos, las células se recolectaron en la fase exponencial tardía (día 5), en la cual se espera la síntesis máxima del polímero y en donde se evidencia un agotamiento simultáneo de las fuentes de carbono y nitrógeno, indicando una relación C/N inicial balanceada (C/N=12/1) (**Figura 15**). La acumulación del polímero de carbohidratos de reserva en microalgas se realiza al final de la fase exponencial, debido a que la síntesis de estos polímeros (fuente primaria de almacenamiento de energía) implica un menor gasto energético en comparación con la síntesis de otras moléculas de energía de almacenamiento secundario como los lípidos (ej., triacilgliceroles), los cuales se acumulan dentro de los cuerpos lipídicos en el citosol durante la fase estacionaria y hay un exceso de la fuente de carbono ([Martín-Juárez et al., 2017](#); [Mozaffari et al., 2019](#)).

En cuanto al crecimiento celular, la suplementación de los cultivos con glucosa en las condiciones mixotróficas y heterotróficas, conllevan a un aumento de la concentración celular respecto a las condiciones autotróficas, alcanzándose valores ~8 veces más altos (**Tabla 6**). El comportamiento anterior, se relaciona con los resultados referentes al tiempo de duplicación (*T_d*), en donde se evidencia que las células de *G. sulphuraria* SAG 107.79 presentan un *T_d* 14-15 veces más alto en los cultivos suplementados con carbono orgánico, respecto a los

cultivos celulares en condiciones autotróficas, en dónde la obtención de energía deriva del metabolismo de los esqueletos carbonados generados durante la fotosíntesis.

Tabla 6. Crecimiento de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo diferentes condiciones de cultivo durante el tiempo *t*.

| Cepa | <i>t</i> (días) | Biomasa (g L ⁻¹) | <i>Td</i> * (Días) |
|--------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Heterotrofia | 5 | 5.81 ± 0.08 ^a | 0.64 ± 0.02 ^a |
| Mixotrofia | 5 | 6.15 ± 0.31 ^a | 0.68 ± 0.01 ^a |
| Autotrofia | 20 | 0.74 ± 0.02 ^b | 9.61 ± 0.59 ^b |

Para otros microorganismos fotosintéticos como *Chlorella vulgaris*, se ha evidenciado que la adición de carbono orgánico al medio de cultivo conlleva la activación del ciclo del glioxilato y por ende al aumento de los niveles relativos de los transcritos de genes que codifican para enzimas como la malato sintasa e isocitrato liasa, en comparación con las condiciones autótrofas de cultivo. El ciclo del glioxilato tiene dos enzimas clave, isocitrato liasa y malato sintasa, las cuales están involucradas en la conversión de isocitrato y acetil-CoA en succinato y malato, lo que permite a las células microalgales generar succinato a partir de dos unidades de acetil-CoA, evitando la descarboxilación que se presenta en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). En este sentido, el aumento de la concentración de biomasa de las condiciones mixotróficas y heterotróficas, puede estar relacionado con una utilización más eficiente de acetil-CoA para la generación de biomasa (Cecchin et al., 2018; Vidotti et al., 2020). Así mismo, una fuente de carbono orgánica, como un azúcar, en este caso la glucosa, contiene almacenado un contenido energético, que deriva en la formación de ATP (y otras moléculas que contienen energía) a través de la glucólisis, TCA y cadena respiratoria, y concomitantemente una gran cantidad de glucosa se destina a la formación de material celular (proteínas, carbohidratos, lípidos, DNA, RNA, etc.). Por tanto, la suplementación con una fuente de carbono orgánica conduce a una mayor cantidad de biomasa en un menor tiempo.

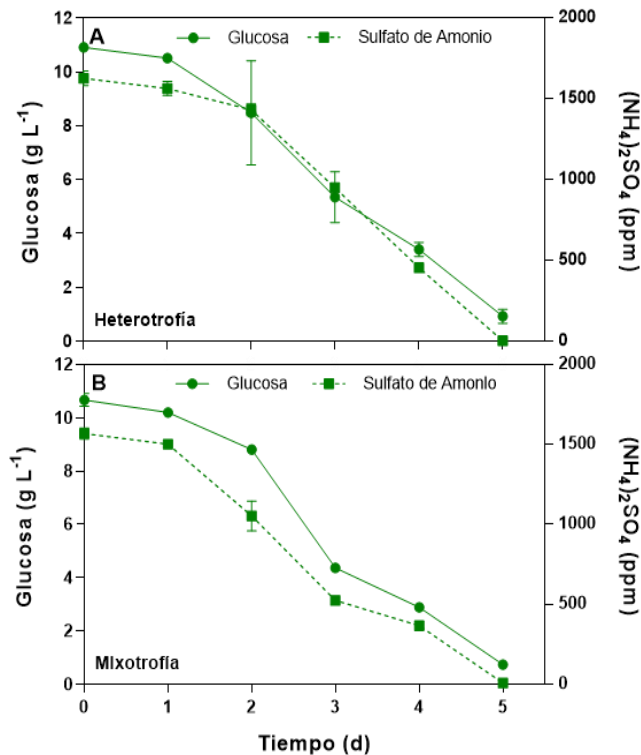


Figura 15. Glucosa y sulfato de amonio residual en cultivos de *G. sulphuraria* SAG107.79 bajo condiciones heterotróficas (A) y mixotróficas (B).

Por otra parte, la mayor acumulación del polímero utilizando la cepa SAG. 107.79 se logró en condiciones mixotróficas (20.1% p/p), siendo 1.5 y 3.9 veces mayor que la obtenida en condiciones heterotróficas (13.6% p/p) y autótrofas (5.1% p/p), respectivamente. Este comportamiento muestra el efecto sinérgico positivo de la suplementación del medio del cultivo con carbono orgánico y la fotosíntesis (carbono inorgánico y luz) sobre la acumulación de este polímero de reserva (**Figura 16**). Nuestros resultados concuerdan con los reportados por [Sakurai et al., 2016](#) y [Mozaffari et al., 2019](#) quienes observaron un comportamiento similar en la acumulación de almidón florídeo en *G. sulphuraria*, en donde el contenido mayor se logra en mixotrofia seguido de heterotrofia y autotrofia. Respecto al metabolismo de organismos fotosintéticos bajo las condiciones evaluadas en el presente proyecto, se ha evidenciado que la suplementación del medio de cultivo con una fuente de carbono orgánica conlleva a un aumento de la abundancia relativa del transcrito que codifica para la enzima glucosa-1-fosfato adeniltransferasa (ADP/UDP-glucosa pirofosforilasa), la cual se encuentra involucrada la activación del sustrato dentro de la ruta biosintética de los poliglucanos de reserva ([Vidotti et al., 2020](#)).

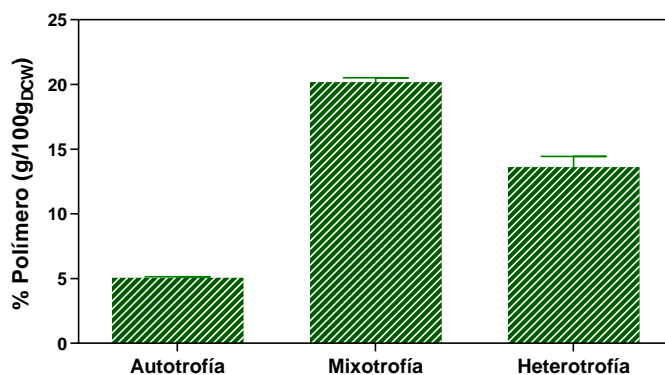


Figura 16. Acumulación del polímero de reserva (g/100g de Biomasa) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo diferentes condiciones de cultivo

Se han utilizado diversas estrategias de cultivo para aumentar los carbohidratos de reserva en las células de microalgas, incluidas la limitación de nutrientes (falta de nitrógeno o fósforo), condiciones de estrés (alta irradiancia y osmolaridad) y la suplementación con carbono exógeno (orgánico e inorgánico) (González-Fernández & Ballesteros, 2012; Markou et al., 2014; Ran et al., 2019; Shahid et al., 2020). Sin embargo, algunas de éstas conllevan a un estrés celular, en donde el crecimiento celular se ve disminuido. En el presente estudio, suplementar el medio de cultivo con glucosa conllevó a un aumento de la productividad de la biomasa y por ende a un aumento en la productividad en el polímero de reserva (**Figura 17**). En la condición de crecimiento mixotrófica, se alcanzó una productividad de biomasa alta ($1030.52 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), similar a la obtenida en condiciones heterotróficas ($970.45 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), y 33 veces más alta comparada con la obtenida en los cultivos autotróficos ($31.28 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). En este sentido, teniendo en cuenta que la acumulación más alta del polímero se obtuvo en los cultivos mixotróficos, la productividad de éste en esta condición ($208.09 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) fue al menos 1.58 y 132 veces más alta que la obtenida en los cultivos heterotróficos ($132.14 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y autotróficos ($1.58 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), respectivamente. En la actualidad, la principal aplicación del almidón florídeo corresponde a su uso en la formulación de bebidas deportivas (Martinez-García et al., 2017), en donde debido a su alto porcentaje de ramificaciones, su metabolismo está aunado a un proceso de degradación prolongado sin que se eleven los niveles de glicemia.

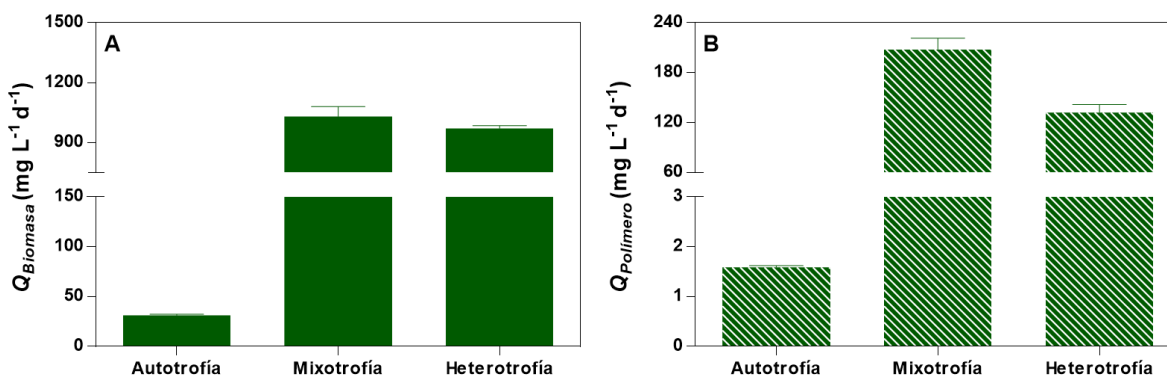


Figura 17. Productividad de biomasa (A) y poliglucano (B) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en diferentes condiciones de crecimiento.

6.2.2. Caracterización del polímero de reserva.

La **Tabla 7** muestra el resumen de resultados de la caracterización del peso molecular (M) del polímero de carbohidratos de reserva de *G. sulphuraria* SAG 107.79 obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo. El peso molecular (M) es un parámetro directamente proporcional al tamaño y es fundamental en la caracterización de un polímero. En condiciones de crecimiento autotróficas, el α -poliglucano de reserva presentó una distribución bimodal con dos tamaños predominantes (P1 y P2), los cuales presentaron una diferencia de tamaño entre ellos de un orden de magnitud ($P1 > P2$) (**Figura 18**). El peso molecular del polímero extraído fue de 1.43×10^6 Da ($g\ mol^{-1}$) para P1 y 8.32×10^4 Da para P2. Debido a la deficiencia de amilosa del polímero de carbohidratos que sintetiza *G. sulphuraria* y la similitud de los precursores de la síntesis (UDP-glucosa) con otros organismos acumuladores de glucógeno, el almidón florídeo se considera un polímero de tipo glucógeno ([Ball et al., 2011](#)). El glucógeno es un polímero altamente ramificado que funciona como reserva de almacenamiento de glucosa en bacterias, levaduras, algas, células animales y algunas plantas superiores (fitoglucógeno). Asimismo, los gránulos de glucógeno pueden estar formados por partículas α (diámetro ≥ 300 nm) que se forman a partir de partículas β más pequeñas (~ 20 nm de diámetro), por lo que la distribución del peso molecular de este polímero puede presentar un comportamiento bimodal. Los mecanismos moleculares de formación de partículas α de glucógeno a partir de partículas β aún no se han descrito bien, sin embargo, bajo ciertos cambios ambientales, un posible mecanismo de aglomeración y unión de proteínas, principalmente glucogeninas, entre

partículas β puede conducir a la conformación de partículas α (Liu et al., 2021; Powell et al., 2015; Wang et al., 2019).

Tabla 7. Caracterización del polímero de almacenamiento de *G. sulphuraria* SAG 107.79: Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la distribución del peso molecular M .

| Muestra | TR | M | M_n | M_w | IP |
|-----------------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|------|
| Autotrofia | 9.17 | 1.43×10^6 | 1.80×10^6 | 3.07×10^6 | 1.70 |
| | 10.27 | 8.32×10^4 | 9.80×10^4 | 1.60×10^5 | 1.63 |
| Heterotrofia | 10.02 | 1.53×10^5 | 3.88×10^5 | 1.54×10^6 | 3.97 |
| Mixotrofia | 10.27 | 8.30×10^4 | 6.06×10^5 | 5.56×10^6 | 9.17 |
| <i>Mytilus edulis</i> | 9.00 | 2.20×10^6 | 3.28×10^6 | 7.67×10^6 | 2.34 |

-Parámetros determinados por Cromatografía de Permeación en Gel (CPG): TR (tiempo de retención), M (peso molecular), M_n (peso molecular promedio en número), M_w (peso molecular promedio en masa) e IP (índice de polidispersión).

- Los datos corresponden a los valores medios de los análisis por duplicado.

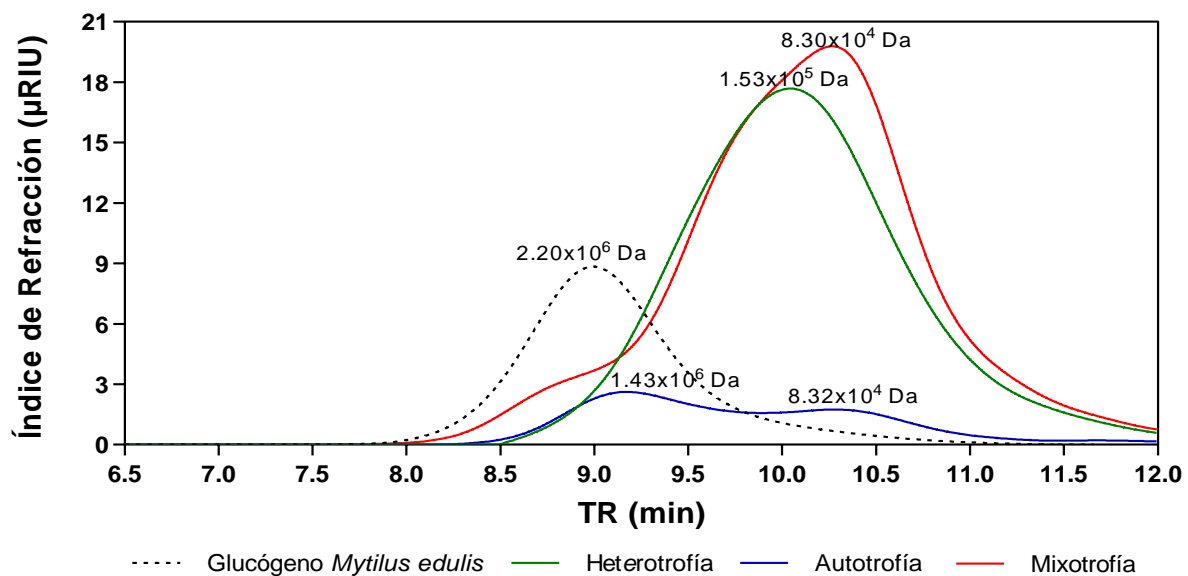


Figura 18. Distribución de los pesos moleculares del polímero de reserva determinados por cromatografía de permeación en gel (CPG) de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en diferentes condiciones de cultivo.

En cuanto a la caracterización del polímero en cultivos heterotróficos, éste presentó una distribución unimodal (**Figura 18**) con un peso molecular de 1.53×10^5 Da. Estos resultados concuerdan con los reportados por Martínez-García et al., 2016 quienes caracterizaron un polímero con comportamiento unimodal de 2.5×10^5 Da en cultivos heterotróficos de *G. sulphuraria* SAG 108.79 suplementados con glicerol al 1% (p/v), pH 2.0 y 40 °C . Así mismo, en condiciones de crecimiento mixotróficas, se obtuvo un polímero con un peso molecular (8.3×10^4 Da), similar al polímero P1 obtenido en condiciones autotróficas (**Figura 18**). Sin embargo, se observa una ligera distribución bimodal, con un polímero de mayor peso molecular que se encuentra en menor proporción. El peso molecular es un parámetro esencial en la caracterización de polímeros, ya que determina algunas propiedades físicas como la viscosidad, la resistencia a la tracción, la tenacidad, el comportamiento térmico, y la resistencia química, entre otras (Rudin, 1999; Shrivastava, 2018). Éste es el primer estudio en el que se aborda el análisis de las alteraciones en la distribución del peso molecular del polímero de reserva de carbohidratos de *G. sulphuraria* en diferentes condiciones de cultivo, y el primer informe de la modulación de partículas alfa y beta en microalgas acumuladoras de polímeros tipo glucógeno.

De igual forma, en cuanto a la curva de distribución de pesos moleculares de la familia de polímeros que conforman el poliglucano caracterizado, fue posible determinar los parámetros M_n y M_w , los cuales hacen referencia al peso molecular promedio en número y al peso molecular promedio en masa, respectivamente. Estos valores difieren entre sí, debido a que en el M_w una molécula más grande contiene más de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas, a diferencia del M_n , que corresponde al promedio aritmético y por ende todas las cadenas poliméricas tienen la misma importancia al determinar este parámetro. Teniendo en cuenta lo anterior, se espera que el valor obtenido del peso molecular M a partir de las cadenas poliméricas con mayor frecuencia absoluta (moda aritmética), sea más cercano al M_n que al M_w . La determinación de los parámetros descritos anteriormente se hace relevante para establecer el índice de polidispersidad (IP), el cual refleja la amplitud de la curva de dispersión de pesos moleculares y se define como el cociente entre el peso molecular promedio en masa y el peso molecular promedio en número (M_w/M_n). En nuestros resultados, se obtuvieron valores de IP superiores a 1.0 para todas las muestras en las condiciones de cultivo evaluadas, lo que sugiere que el polímero es polidisperso, indicando la

heterogeneidad de pesos moleculares de sus cadenas poliméricas. Así mismo, los resultados obtenidos muestran que las condiciones mixotróficas permiten una síntesis de polímero con un índice de polidispersidad más alto (9.18) y que es al menos 2.7 y 2.4 veces mayor que el polímero sintetizado en condiciones autótrofas y heterótrofas, respectivamente.

Debido al comportamiento bimodal observado en la distribución del peso molecular, se determinó la comprobación de la composición química monomérica del polímero de almacenamiento mediante Cromatografía de Capa Fina (TLC) a partir de muestras de polímero hidrolizado. Los resultados confirman que la glucosa (**Figura 19**) es el único monómero de carbohidratos que compone el polímero sintetizado por *G. sulphuraria* SAG 107.79 en los diferentes modos de crecimiento. De igual forma, los resultados encontrados permiten corroborar que con el método de extracción utilizado únicamente se obtiene el glucano de reserva.

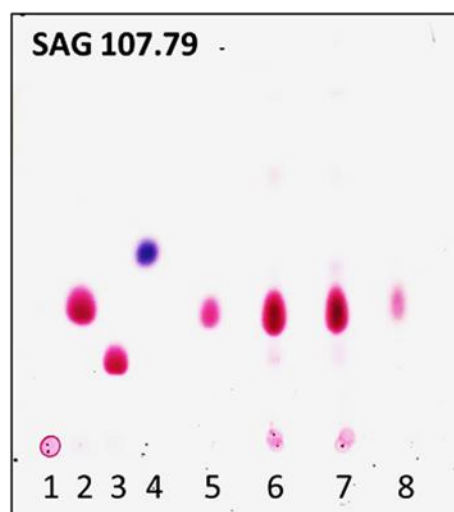


Figura 19. Verificación de la composición química monomérica, por cromatografía en capa fina (TLC), del polímero de carbohidratos extraído de *G. sulphuraria* SAG 107.79. Placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Fase estacionaria) y eluidas con Cloroformo: Metanol: Agua (30:20:4) (Fase móvil). Carriles: Glucógeno (1), glucógeno hidrolizado (2), galactosa (3), xilosa (4), glucosa (5), polímero hidrolizado-mixotrofia (6), polímero hidrolizado-heterotrofia (7) y polímero hidrolizado-autotrofia (8).

6.2.3. Lípidos, proteínas y ficocianina.

Teniendo en cuenta que la suplementación del medio de cultivo con una fuente de carbono orgánica en los cultivos mixotróficos y heterotróficos conllevó a un aumento de la acumulación

del poliglucano de reserva, respecto a condiciones autotróficas, también se determinó el contenido de otras moléculas de interés como lípidos y proteínas (**Figura 20**).

Respecto al contenido de lípidos, se observa que durante la fase exponencial bajo las condiciones autotróficas se alcanza la acumulación más alta (6.77%), seguido de las condiciones heterotróficas (5.08%) y mixotróficas (3.51%). Teniendo en cuenta la finalidad del proyecto, el análisis de lípidos se hizo al final de la fase exponencial, en donde los poliglucanos corresponden a la principal molécula de reserva de energía. Sin embargo, para *G. sulphuraria* se ha reportado que durante la fase estacionaria hay un aumento en el contenido lipídico aunado a una disminución de los glucanos de almacenamiento, con lo cual se sugiere que la síntesis de lípidos en dicha fase de crecimiento podría estar originada a partir del reciclaje de carbono proveniente de los polímeros de glucosa. (Mozaffari et al., 2019).

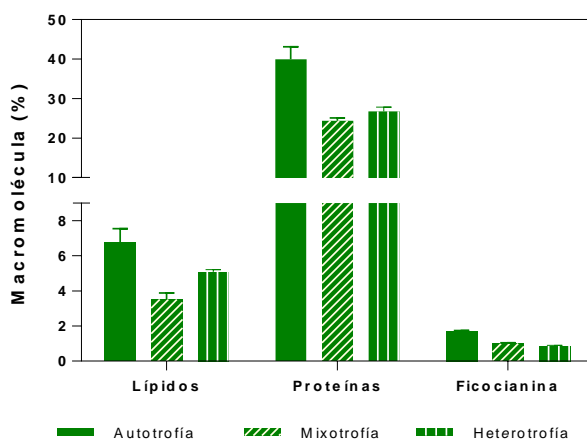


Figura 20. Caracterización Bioquímica de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas, mixótrofas y heterótrofas de cultivo. Acumulación de la macromolécula ($\text{g } 100\text{g}_{\text{Biomasa}}^{-1}$) en *G. sulphuraria* SAG 107.79 en el tiempo t de máxima concentración de biomasa (Autotrofia: día 20; Mixotrofia y Heterotrofia: día 5).

Por otra parte, en cuanto al contenido de proteínas, en los cultivos mixotróficos y heterotróficos hubo una disminución de esta macromolécula (24.37% y 26.79%, respectivamente), en comparación con los cultivos autotróficos (39.91%). La suplementación de los cultivos microalgales con una fuente de carbono orgánica ha demostrado ser una excelente estrategia para incrementar la concentración celular, la cual en cultivos fotoautótrofos generalmente es $<3 \text{ g L}^{-1}$ (Gifuni et al., 2019). Sin embargo, se ha reportado que el contenido de pigmentos,

especialmente en heterotrofia, y proteína puede disminuir, en comparación con el contenido de estos bioproductos en la biomasa proveniente de cultivos autotróficos (Fernández et al., 2021). En este sentido, en lo que respecta al contenido de ficocianina, se evidencia que dicho pigmento se acumula en mayor porcentaje bajo condiciones fotoautotróficas (1.73%), alcanzando valores 1.80 y 2.01 veces más altos que lo obtenido bajo condiciones mixotróficas (0.96%) y heterotróficas (0.86%), respectivamente. Lo anterior se debe a que la ficocianina es considerada un bioproducto foto-dependiente, y dado que en condiciones autotróficas las células microalgales crecen y obtienen energía únicamente mediante la fotosíntesis, se requiere un mayor contenido de los principales pigmentos fotosintéticos (Wan et al., 2016).

Finalmente, parte de los resultados obtenidos y analizados en esta etapa del trabajo conforman los resultados presentados en el artículo propuesto "*Molecular weight distribution alterations of Galdieria sulphuraria storage polyglucan: Effect of different culture modes*", del cual se tiene el manuscrito para ser sometido.

6.2.4. Conclusiones parciales

- En este estudio fue posible incrementar la producción de biomasa y acumulación del almidón florídeo en *G. sulphuraria* SAG 107.79 al suplementar el medio de cultivo con glucosa, demostrando que los cultivos bajo condiciones mixotróficas y heterotróficas, son una estrategia adecuada para incrementar la síntesis del poliglucano de reserva sin utilizar condiciones de estrés.
- En comparación con la generación de poliglucano de menor peso molecular y comportamiento unimodal en condiciones heterotróficas, la exposición a la luz en los cultivos de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en condiciones autotróficas permitió la generación de partículas alfa (α) de glucógeno a partir de partículas beta (β), lo cual se reflejó en la obtención de polímero con mayor peso molecular y con comportamiento bimodal.
- El polímero de reserva acumulado en la biomasa de *G. sulphuraria* SAG 107.79 presentó glucosa como monómero estructural. Mediante TLC se corroboró la naturaleza monomérica de éste poliglucano.

6.3. ETAPA 3.

Efecto de la temperatura y la intensidad de luz sobre el crecimiento celular y la acumulación del poliglucano de reserva en *G. sulphuraria*.

6.3.1. Diseño de experimentos.

En la **Tabla 8** se presenta el diseño de experimentos para estudiar la acumulación del poliglucano de reserva en *G. sulphuraria* SAG 107.79, diseño factorial 2FI (2^2), variables a evaluar: Temperatura 32 y 42°C; Intensidad de luz 100 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en fotobiorreactores de 1 L (Figura 7), durante 14 días. Teniendo en cuenta la naturaleza fotosintética del microorganismo de interés, se decidió modificar las variables de temperatura e intensidad de luz. Respecto a la temperatura, se ha reportado que para *G. sulphuraria* la disminución de 10 °C conlleva a una concentración de biomasa menor (Náhlík *et al.*, 2021), lo cual puede conducir a una mayor acumulación de compuestos de reserva. Asimismo, en cuanto a la intensidad de luz, se ha descrito para *G. sulphuraria* que la máxima actividad fotosintética se alcanza en una irradiancia de 200-225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Oosterhelt *et al.*, 2007).

Tabla 8. Diseño experimental

| N° | Condición | Factor 1 | Factor 2 |
|----|-----------|--|------------------------|
| | | A: Irradiancia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | B: Temperatura (°C) |
| 1 | C1 | 100 | 32 |
| 2 | | 100 | 32 |
| 3 | | 100 | 32 |
| 4 | C2 | 100 | 42 |
| 5 | | 100 | 42 |
| 6 | | 100 | 42 |
| 7 | C3 | 200 | 32 |
| 8 | | 200 | 32 |
| 9 | | 200 | 32 |
| 10 | C4 | 200 | 42 |
| 11 | | 200 | 42 |
| 12 | | 200 | 42 |

6.3.2. Crecimiento celular.

En la **Tabla 9** se exponen los principales resultados obtenidos correspondientes al crecimiento celular de los cultivos de la cepa *G. sulphuraria* SAG 107.79 en las condiciones descritas anteriormente. De forma general, se puede observar que la disminución de la temperatura y el aumento de la intensidad de luz conlleva a la obtención de cultivos autotróficos con una concentración de biomasa y una densidad celular mayor a la de referencia a los 14 días de cultivo (**Figura 21**), es decir a una mayor productividad. En la condición 3 la cepa seleccionada presentó las mejores características de crecimiento, con una concentración de biomasa de 2.29 g L⁻¹, una densidad celular de 8.17x10⁷células mL⁻¹ y un tiempo de duplicación de 2.37 días.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es evidente el efecto positivo del aumento de la intensidad de luz sobre el crecimiento celular, el cual podría deberse a un aumento de la actividad carboxilasa de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), encargada de llevar a cabo la fijación del CO₂ durante la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) ([Masojídek et al, 2007](#)). En otros microorganismos fotosintéticos, se ha reportado que el aumento de la intensidad de luz (sin alcanzar irradiancias de fotoinhibición) conlleva al aumento de la afinidad de la RuBisCO por el CO₂ y por ende a una mayor fijación en carbono orgánico ([González-Fernández & Ballesteros, 2012](#); [Shahid et al., 2020](#)). De igual forma, la disminución de la temperatura permite un incremento del 33% en la solubilidad del CO₂ (32°C: 1200 ppm; 42°C: 900 ppm) ([Markou et al., 2014](#)), lo cual aumenta el carbono inorgánico disponible en el medio de cultivo susceptible a ser fijado por la microalga durante la fotosíntesis.

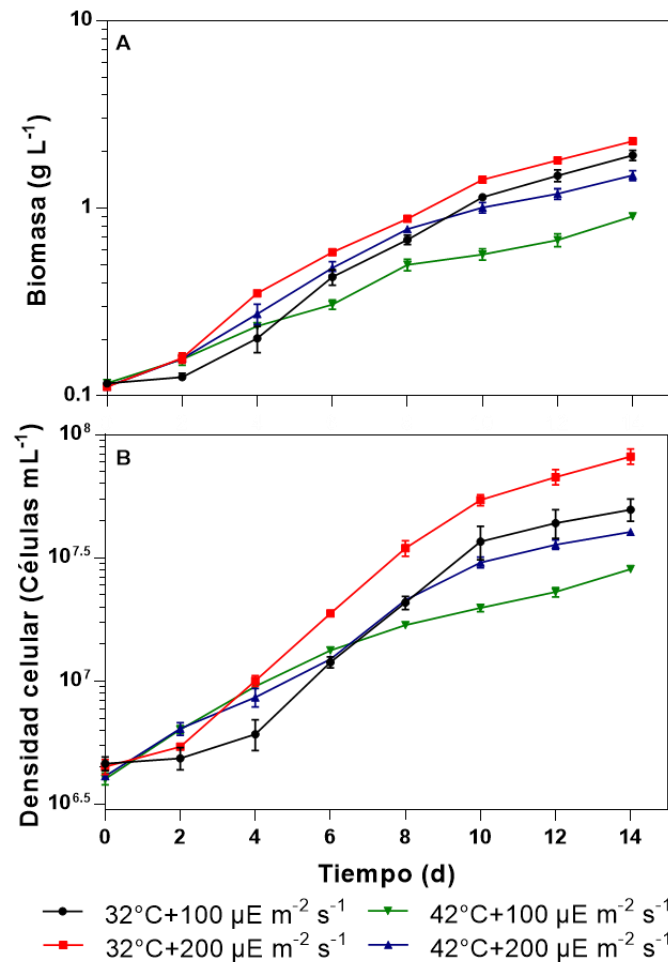


Figura 21. Crecimiento celular de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en condiciones autótrofas a diferentes temperaturas e intensidades de luz. **A.** Concentración de Biomasa. **B.** Densidad celular.

Se ha reportado que *G. sulphuraria* tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas superiores a 40°C, creciendo en intervalos de 24-50 °C (Henkanatte-Gedera *et al.*, 2017). La cepa SAG 107.79 se cultivó a 50 °C y 100 μmol m⁻² s⁻¹ durante 8 días, sin embargo, después del día 2 se presentó una disminución de la DO₈₀₀ y de la densidad celular del 58% y 59%, respectivamente (**Información Suplementaria IS.3**). El fenómeno anterior podría estar relacionado con la disminución de 17% de la solubilidad del CO₂ (42°C: 900 ppm; 50°C: 700 ppm;) (Markou *et al.*, 2014), afectándose la fase de oscuridad de la fotosíntesis en donde se fija el carbono inorgánico en carbono orgánico, el cual más adelante es utilizado para la síntesis de diferentes macromoléculas (p. ej., carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) implicadas en la generación de biomasa (Baroukh *et al.*, 2014). Así mismo, bajo esta temperatura evaluada

hubo una disminución gradual del contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficocianina), fenómeno conocido como blanqueamiento celular. Lo anterior podría estar relacionado con una posible degradación o inactivación de estos pigmentos, y al tratarse de una condición exclusivamente autotrófica, la microalga no puede llevar a cabo la fotosíntesis y por ende la obtención de energía necesaria para la generación de biomasa.

Tabla 9. Crecimiento de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en condiciones autotróficas a diferentes temperaturas e intensidades de luz

| Condición | Biomasa (g L ⁻¹) | Densidad celular (Células mL ⁻¹) | <i>t</i> _d [*] (días) |
|--|---------------------------------|--|--|
| C1 (32°C+100 μE m ⁻² s ⁻¹) | 1.93 ± 0.01 ^a | 4.97x10 ⁷ ± 5.13x10 ⁶ ^a | 2.74 ± 0.04 ^a |
| C2 (42°C+100 μE m ⁻² s ⁻¹) | 0.91 ± 1.01 ^b | 2.85x10 ⁷ ± 5.01x10 ⁶ ^b | 4.88 ± 0.16 ^b |
| C3 (32°C+200 μE m ⁻² s ⁻¹) | 2.29 ± 0.04 ^c | 8.17x10 ⁷ ± 5.13x10 ⁶ ^c | 2.37 ± 0.05 ^c |
| C4 (42°C+200 μE m ⁻² s ⁻¹) | 1.49 ± 0.09 ^d | 4.43x10 ⁷ ± 7.64x10 ⁶ ^a | 3.45 ± 0.14 ^d |

* Tiempo de duplicación

C2: Condición control

Los datos corresponden a los valores medios ± la desviación estándar de los experimentos por triplicado en el día 14.

6.3.3. Acumulación de poliglucanos.

Respecto al contenido del poliglucano de reserva (**Tabla 10**), se observa que hay una mayor acumulación en las condiciones C2 y C4 (5.93% y 5.68%, respectivamente), las cuales corresponden a la temperatura más alta (42 °C). El resultado anterior coincide con los resultados encontrados relacionados con el crecimiento celular, dado que en estas condiciones se obtiene la menor concentración de biomasa y la menor densidad celular, comparado con los valores obtenidos a 32 °C. Sin embargo, teniendo en cuenta que en la condición C3 se obtiene la mayor concentración de biomasa, al analizar la productividad es evidente que en esta condición se alcanza el valor más alto (7.10 mg_{Poliglucano} L⁻¹ d⁻¹), el cual es 8%, 85% y 17% más alto que los obtenidos en las condiciones C1, C2 y C4, respectivamente.

Por otra parte, para cada una de las temperaturas evaluadas se observa que hay una disminución en el contenido del poliglucano de reserva al aumentar la intensidad de luz, acompañado de un aumento de la concentración celular (biomasa y densidad celular). El

fenómeno anterior puede estar relacionado a un posible incremento de la actividad catalítica de la enzima RuBisCO como producto del aumento de la irradiancia (González-Fernández & Ballesteros, 2012). En la fotosíntesis, la principal molécula orgánica producto de la fijación del CO₂ (etapa de reducción en el ciclo de Calvin) corresponde a la glucosa, la cual es el monómero estructural de los glucanos de reserva (Masojídek et al., 2007; Ran et al., 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, el aumento de la intensidad de luz sin llegar a condiciones de estrés por fotoinhibición puede conllevar a una mayor fijación de CO₂ en esqueletos carbonados intermediarios que pueden ser utilizados en la generación de biomasa y no en la síntesis de polímeros de reserva. Para *G. sulphuraria* en condiciones autótrofas, se ha reportado la máxima actividad fotosintética a una intensidad de luz de 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Oesterhelt et al., 2007), razón por la cual en el presente trabajo se decidió utilizar una irradiancia de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 10. Acumulación y productividad del poliglucano de *G. sulphuraria* SAG107.78 bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz.

| Condición | Poliglucano (%: $\text{g } 100\text{g}_{\text{Biomasa}}^{-1}$) | Q Poliglucano ($\text{mg}_{\text{Poliglucano}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$) |
|--|--|---|
| C1 (32°C+100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 4.78 \pm 0.32 | 6.54 \pm 0.41 |
| C2 (42°C+100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 5.93 \pm 0.24 | 3.83 \pm 0.04 |
| C3 (32°C+200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 4.41 \pm 0.03 | 7.10 \pm 0.12 |
| C4 (42°C+200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 5.68 \pm 0.06 | 6.07 \pm 0.37 |

Los datos corresponden a los valores medios \pm la desviación estándar de los experimentos por triplicado en el día 14. C2: Condición control. Los resultados corresponden a la cuantificación del polímero de reserva, a diferencia de la etapa 1, en donde se cuantificó la glucosa total de la biomasa generada.

6.3.4. Fotosistemas, potencial de membrana mitocondrial y viabilidad celular.

G. sulphuraria es un microorganismo acidófilo, el cual ha sido cultivado a 42°C en la mayoría de los reportes científicos, con lo cual una disminución en esta variable o un aumento en la intensidad de luz podría conllevar a estrés celular. En los organismos fotosintéticos, los cambios en las condiciones de cultivo pueden alterar en primera instancia a los fotosistemas y por ende afectar el crecimiento celular. Teniendo en cuenta que *G. sulphuraria* es una microalga roja y que únicamente contiene clorofila *a* en el centro de reacción de los

fotosistemas I y II (Masojídek et al., 2007), se analizó el comportamiento de este pigmento fotosintético como parámetro indicador de la afectación a los fotosistemas por las condiciones evaluadas. Durante el tiempo de cultivo, en todas las condiciones se puede observar que la señal de fluorescencia (excitación/emisión = 455nm/685nm) de la clorofila *a* se mantiene estable a lo largo de los 14 días (**Figura 22**), a diferencia del comportamiento de los pigmentos fotosintéticos en los experimentos a 50 °C, en donde los cultivos sufrieron un blanqueamiento celular, caracterizado por una disminución progresiva en el contenido de clorofila *a* y ficocianina (**Información Suplementaria IS.4**), los cuales son pigmentos involucrados en la captación de fotones y obtención de energía durante la fase luminosa de la fotosíntesis.

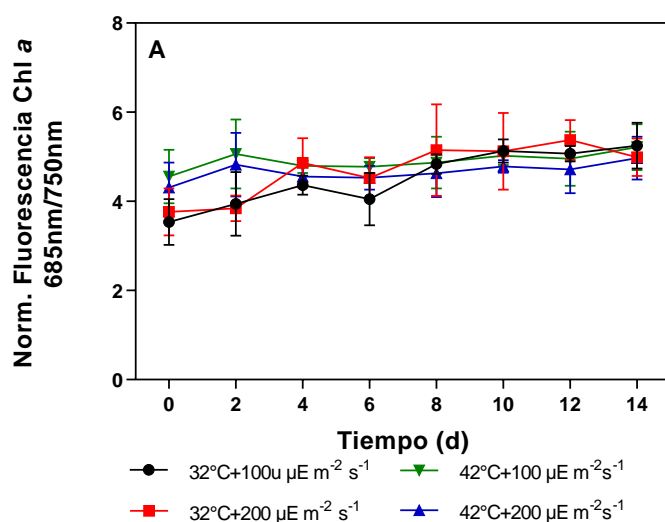


Figura 22. Señal de fluorescencia normalizada de la clorofila *a* (685nm/750nm) de células de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas de cultivo. Los valores por día corresponden a la señal de emisión de un mismo número de células.

Finalmente, teniendo en cuenta que las condiciones utilizadas podrían conducir a un estrés celular y por ende un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y generar muerte celular, se determinó cualitativamente el potencial de membrana mitocondrial y la viabilidad en los días 2, 8 y 14. En general, se puede observar que en el día 14 en la condición de 42°C+100 μmol m⁻² s⁻¹ se alcanza la mayor señal de ROS (**Figura 23**), medida como intensidad media de fluorescencia de ROS. El resultado anterior se relaciona con los resultados obtenidos de crecimiento celular y síntesis del poliglucano de reserva, debido a que en la condición C2 se alcanza la menor concentración de biomasa y el contenido de poliglucano

más alto. De la misma manera, respecto a la viabilidad celular (**Figura 24**), este parámetro se mantiene constante (viabilidad >95%) a lo largo del tiempo de cultivo para las condiciones evaluadas, indicando que el aumento en la intensidad de luz conlleva a un aumento de ROS sin generar muerte celular. Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que la condición de referencia utilizada para el cultivo de *G. sulphuraria* (42°C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no es la óptima para el crecimiento de la cepa SAG 107.79; sin embargo, se requieren de estudios adicionales que puedan definir el nicho térmico de este microorganismo, teniendo en cuenta que en la condición de 50°C+100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ evaluada preliminarmente, la microalga no creció y sufrió un proceso de blanqueamiento celular.

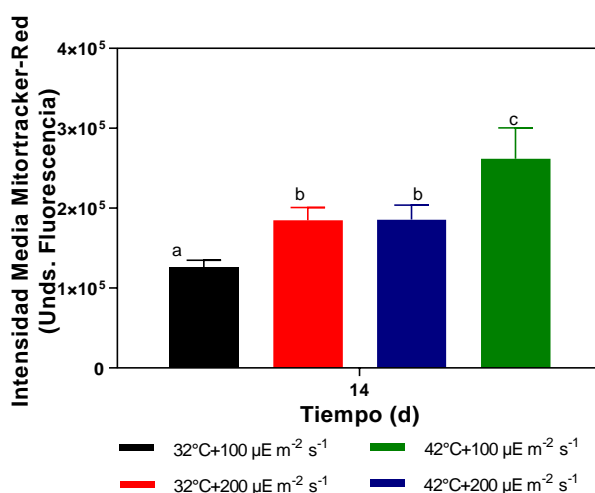


Figura 23. Determinación cualitativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) en *G. sulphuraria* SAG 107.79 en el día 14 de cultivo. Células teñidas con MitoTracker Red CMXRos y analizadas mediante citometría de imagen.

a, b, c, parámetros obtenidos mediante una prueba de Tukey. Letras iguales: diferencia entre las medias = 0, letras distintas: diferencia entre las medias $\neq 0$. $p < 0.05$ ($p = 0.00074$).

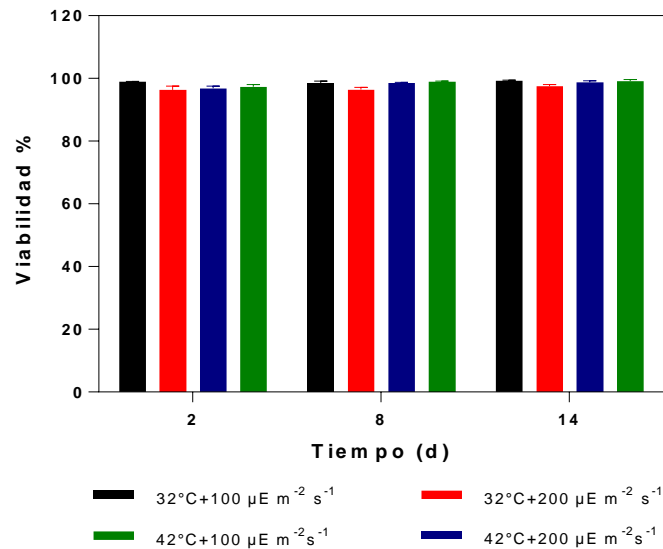


Figura 24. Viabilidad celular de *G. sulphuraria* SAG 107.79 en el día 14 de cultivo. Células teñidas con Sytox Blue y analizadas mediante citometría de imagen.

6.3.5. Conclusiones parciales.

- A diferencia del carácter termofílico, se demostró la naturaleza mesófila de la cepa *G. sulphuraria* SAG 107.7, teniendo en cuenta que presentó mejores características de crecimiento al disminuir la temperatura de cultivo (32°C) respecto a la condición de referencia reportada (42 °C), y a la disminución progresiva de los pigmentos fotosintéticos al aumentar la temperatura (50°C).
- El aumento de la intensidad de luz a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin llegar a la fotoinhibición ni afectar los fotosistemas, favorece el crecimiento celular de *G. sulphuraria* SAG 107.7.
- La disminución de la temperatura (32 °C) y el aumento de la intensidad de luz (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), respecto a las condiciones de referencia (42°C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no generaron condiciones de estrés para *G. sulphuraria* SAG 107.7 y en consecuencia no conllevaran al incremento del contenido del poliglucano de reserva.

7. CONSIDERACIONES GENERALES.

Las microalgas son consideradas un grupo de microorganismos sin valor taxonómico, que contiene especies procariontes y eucariontes, y que se caracterizan por obtener energía a partir del metabolismo fotosintético (Queiroz et al., 2020). En los últimos años, las microalgas han cobrado gran importancia debido a la capacidad de utilizar la energía solar para fijar el dióxido de carbono atmosférico, mediante la fotosíntesis, y producir biomasa y otros biocompuestos de valor agregado como lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos (Hu & Bassi, 2020). Por lo anterior, los cultivos microalgales representan una tecnología de base biológica, con el potencial de generar procesos sostenibles bajo el concepto de biorrefinería (Perez-Garcia & Bashan, 2015). A nivel industrial, el panorama de los procesos basados en microalgas es prometedor, debido principalmente al costo económico de las moléculas que se pueden obtener, a la posibilidad de usar el CO₂ contenido en el aire como fuente de carbono y al uso de tierras no cultivables, con lo cual no se compite con la agricultura tradicional. Sin embargo, el número de especies utilizadas se limita a unas pocas. Por lo anterior, el estudio de diferentes especies microalgales con diferentes características metabólicas se hace relevante.

Galdieria sulphuraria es una microalga roja extremófila que en los últimos años ha sido foco de investigación debido a la capacidad de crecer en ambientes ácidos (acidófila) y en temperaturas superiores a 40 °C (Portillo et al., 2022). Así mismo, teniendo en cuenta que sintetiza ficobiliproteínas como sistema antena de captación de luz, es evidente el potencial biotecnológico de este microorganismo como fuente de pigmentos (Moon et al., 2014; Sloth et al., 2006). Las condiciones ácidas (pH 2) de los cultivos de *G. sulphuraria*, han hecho de esta microalga un microorganismo atractivo para su cultivo potencial en sistemas abiertos (raceways o estanques abiertos circulares), evitándose el crecimiento de microorganismos contaminantes (Henkanatte-Gedera et al., 2017; Munasinghe-Arachchige et al., 2019).

En la caracterización bioquímica de la biomasa de diferentes cepas *G. sulphuraria* realizada en la primera etapa de este proyecto, es evidente que las proteínas son una de las macromoléculas que se acumulan en mayor porcentaje, con valores promedio superiores a 40% (%: $\text{g}_{\text{Proteínas}} 100\text{g}_{\text{Biomasa}}^{-1}$). De igual forma, se observa que la biomasa presenta la mayoría de los aminoácidos esenciales (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina,

treonina, triptófano y valina), aunado a resultados de digestibilidad proteica superiores al 90% (resultado no publicado), lo cual la convierte en una fuente potencial de proteína unicelular de alta calidad, susceptible de ser utilizada como fuente alimento destinado al consumo humano (Montenegro-Herrera et al., 2022). En cuanto a este grupo de alimentos, la búsqueda de fuentes proteicas alternas se hace relevante debido a la desnutrición proteico-calórica reportada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), que afecta principalmente a la población infantil. Así mismo, los resultados obtenidos mostraron que la ficocianina es el pigmento fotosintético que se acumula en mayor proporción en todas las cepas evaluadas, lo cual convierte a *G. sulphuraria* en una fuente alterna para la obtención de este pigmento, confiriéndole a la biomasa completa características de alimento funcional (Graziani et al., 2013; Montenegro-Herrera et al., 2022).

Respecto al contenido de carbohidratos, las cepas de *G. sulphuraria* cultivadas autotróficamente acumularon cantidades de glucosa que variaron entre 4 y 9 % (p/p), siendo la cepa SAG 107.79 la que presentó el mayor contenido de esta molécula, con valores de 8.89% (%: $\text{gGlucosa } 100\text{gBiomasa}^{-1}$) y $4.03 \text{ ng célula}^{-1}$ (resultado no publicado). *G. sulphuraria* puede acumular almidón florídeo, un polímero de glucosa similar al glucógeno, que se caracteriza por contener un alto porcentaje de ramificaciones (18%), lo cual lo hace atractivo como ingrediente en la formulación de bebidas deportivas, debido a su degradación prolongada (Martinez-Garcia et al., 2016, 2017).

A nivel de metabolismo, todas las microalgas pueden obtener energía mediante la fotosíntesis (metabolismo autotrófico), sin embargo, algunas especies, en ausencia de luz, son capaces de metabolizar fuentes de carbono orgánicas mediante el metabolismo heterotrófico. *G. sulphuraria* presenta la flexibilidad metabólica de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas, es decir, utilizar y metabolizar fuentes de carbono inorgánicas y orgánicas en presencia de luz (Portillo et al., 2022; Mozaffari et al., 2019; Sakurai et al., 2016; Sloth et al., 2006). Los cultivos mixotróficos y heterotróficos realizados en la segunda etapa de este proyecto, permitieron evidenciar el efecto positivo de la suplementación del medio de cultivo con una fuente de carbono orgánica (glucosa 10 g L^{-1}) sobre el crecimiento de *G. sulphuraria* SAG 107.79, alcanzándose concentraciones de biomasa al menos 8 veces superiores, respecto a los cultivos en condiciones autotróficas. Una de las principales limitantes

de los procesos microalgales se relacionan con la generación de cultivos con una baja densidad celular en condiciones fotoautotróficas, con concentraciones de biomasa inferiores a 3 g L^{-1} (Gifuni et al., 2019). En este sentido, el uso de cepas que puedan crecer en condiciones heterotróficas y mixotróficas se hace relevante, considerando se puede alcanzar una concentración de biomasa superior en un tiempo de cultivo menor, incrementándose la productividad y facilitando operaciones unitarias de cosecha y secado.

En cuanto al poliglucano de interés, el empleo de una fuente de carbono orgánica en los cultivos heterotróficos y mixotróficos condujo a un aumento del contenido del polímero, evidenciándose que bajo las condiciones mixotróficas se obtiene la mayor productividad de almidón florídeo. Diversas estrategias se han implementado a nivel de cultivo de microalgas con la finalidad de incrementar los compuestos de reserva, las cuales generalmente conducen a la generación de estrés celular a partir de condiciones de limitación de nutrientes, a una disminución en el crecimiento celular y aun aumento del compuesto de almacenamiento (Ran et al., 2019; Yao et al., 2012). Sin embargo, en *G. sulphuraria* la suplementación con glucosa demostró ser una buena estrategia para incrementar el contenido de almidón florídeo sin afectar el crecimiento celular.

Así mismo, las diferentes condiciones de cultivo (autotrofia, heterotrofia y mixotrofia) afectaron el peso molecular del α -poliglucano de interés, el cual es un parámetro que se relaciona directamente con el tamaño y que determina características mecánicas del polímero (Rudin, 1999; Shrivastava, 2018). Para *G. sulphuraria*, en la literatura se ha descrito la presencia de un α -poliglucano (partículas de glucógeno β) de comportamiento unimodal en condiciones de crecimiento heterotróficas (Martínez-García et al., 2016), lo cual concuerda con los resultados encontrados en el presente estudio. Sin embargo, el efecto más relevante del modo de cultivo sobre la distribución de pesos moleculares del almidón florídeo se observa en condiciones autotróficas, en donde es posible evidenciar un comportamiento bimodal, atribuido a la presencia de partículas de glucógeno α y β . Con fines de aplicación industrial y teniendo en cuenta que las partículas α de glucógeno presentan mayor peso molecular, un polímero con estas características es deseable para su uso como ingrediente en alimentos para personas con afecciones en el metabolismo de azúcares, evitándose el incremento abrupto de los niveles de glicemia en sangre que conlleve a un aumento de la señal de insulina.

Por otra parte, teniendo en cuenta las características de *G. sulphuraria* como organismo fotosintético y capaz de crecer en temperaturas superiores a 40 °C, la intensidad de luz y la temperatura son factores abióticos fundamentales que pueden afectar algunas de las enzimas principales involucradas en la fotosíntesis y en la vía de síntesis de los α -poliglucano (González-Fernández & Ballesteros, 2012). En cuanto a la temperatura, debido a que el CO₂ es la única fuente de carbono en las condiciones autotróficas, la solubilidad de este gas se puede ver afectada por un cambio de temperatura y por ende aumentar o disminuir la disponibilidad en el medio de cultivo (Markou et al., 2014) . De igual forma, respecto a la intensidad de luz, este parámetro se relaciona directamente con la fotosíntesis y por ende con la obtención de energía para la fijación de carbono inorgánico, observándose que un aumento de la intensidad de luz sin alcanzar condiciones de fotoinhibición resulta en un aumento de la actividad fotosintética (Masojídek et al., 2007; Oesterhelt et al., 2007). En la tercera etapa de este estudio, se observó un efecto sinérgico de la disminución de la temperatura (30 °C) y el aumento de la intensidad de luz ($200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sobre el crecimiento de *G. sulphuraria* SAG 107.79, alcanzándose valores de concentración de biomasa 2.5 veces más altos respecto con la condición de referencia (42°C+100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Teniendo en cuenta lo anterior y aunado a la pérdida progresiva de los pigmentos fotosintéticos (blanqueamiento celular) de las células cultivadas a 50°C, se demostró la naturaleza mesófila de la cepa *G. sulphuraria* SAG 107.79.

8. CONCLUSIONES GENERALES.

- La biomasa de *Galdieria sulphuraria* presenta en su composición bioquímica ficobiliproteínas y un contenido alto de proteínas, evidenciándose el potencial que presenta esta microalga para ser utilizada como fuente de proteína unicelular de alta calidad o alimento destinado para el consumo humano o animal. Así mismo, debido a las condiciones ácidas empleadas, los cultivos son potencialmente escalables en estanques abiertos, evitándose el crecimiento de microorganismos contaminantes.
- La distribución de pesos moleculares del poliglucano de reserva en *G. sulphuraria* SAG 107.79 se ve afectada por las condiciones de cultivo: el metabolismo fotosintético modula la distribución unimodal a bimodal. Así mismo, los cultivos mixotróficos para esta microalga, son una buena estrategia de cultivo que permite incrementar el contenido y la productividad del poliglucano de reserva, sin afectar el crecimiento celular.
- Se evidenció que la cepa *G. sulphuraria* SAG 107.79 tiene un comportamiento termotolerante, debido a la capacidad de crecer a 32 °C y al efecto de blanqueamiento e inhibición del crecimiento celular que presentó a 50 °C. Por lo tanto, la característica de extremófila no está dada por su capacidad de crecer en condiciones termófilas, arriba de 50 °C, sino principalmente por el crecimiento de esta microalga en condiciones ácidas (acidófila).

9. PROSPECTIVAS.

- Llevar a cabo análisis nutricionales adicionales de la biomasa como digestibilidad y biodisponibilidad, que sustenten el uso potencial de *G. sulphuraria* como proteína unicelular y suplemento en las formulaciones de alimentos y piensos.
- Diseñar y evaluar estudios encaminados a incrementar el contenido de ficocianina en *G. sulphuraria* con la finalidad de hacerla una fuente de producción competitiva de este pigmento desde el punto de vista económico.
- Realizar un estudio de temperatura acoplado a respirometría que conlleve a establecer el nicho térmico de *G. sulphuraria*.
- Llevar a cabo estudios de proteómica y transcriptómica para determinar los niveles relativos y regulación de las principales enzimas involucradas en la ruta anabólica de poliglucanos de reserva en *G. sulphuraria*.
- Evaluar el efecto del cambio en las intensidades de luz sobre la modulación de partículas de glucógeno β a α .
- Completar la caracterización del polímero de reserva mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) que permita determinar el porcentaje de ramificaciones del poliglucano obtenido en las condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas.

10. REFERENCIAS.

- Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M. A., Khafaga, A. F., Mahgoub, S. A., Elnesr, S. S., & Gebriel, M. G. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 42–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.069>
- Ajayan, K. V., Selvaraju, M., & Thirugnanamoorthy, K. (2012). Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. *Biomass and Bioenergy*, *47*, 436–441. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2012.09.012>
- Al Abdallah, Q., Nixon, B. T., & Fortwendel, J. R. (2016). The Enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol. *Frontiers in Energy Research*, *4*, 36. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2016.00036>
- Assunção, M. F. G., Varejão, J. M. T. B., & Santos, L. M. A. (2017). Nutritional characterization of the microalga *Ruttnera lamellosa* compared to *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, *26*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.06.028>
- Bajpai Rakeshand Zappi, M. and D. S. and S. R. and P. A. (2014). Status of Algae as Vehicles for Commercial Production of Fuels and Chemicals. In A. and Z. M. Bajpai Rakeshand Prokop (Ed.), *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products* (pp. 3–24). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_1
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., & Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1775–1801. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq411>
- Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *17*(5), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2014). DRUM: A New Framework for Metabolic Modeling under Non-Balanced Growth. Application to the Carbon

- Metabolism of Unicellular Microalgae. *PLOS ONE*, 9(8), e104499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104499>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2006.11.002>
- Ben Hlima, H., Dammak, M., Karkouch, N., Hentati, F., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2019). Optimal cultivation towards enhanced biomass and floridean starch production by *Porphyridium marinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 152–161. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.01.207>
- Bishop, W., & Zubeck, H. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 02. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Carbohydrates. *Medical Biochemistry*, 73–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00004-5>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bromke, M. A. (2013). Amino Acid biosynthesis pathways in diatoms. *Metabolites*, 3(2), 294–311. <https://doi.org/10.3390/metabo3020294>
- Busi, M. V., Barchiesi, J., Martín, M., & Gomez-Casati, D. F. (2014). Starch metabolism in green algae. *Starch - Stärke*, 66(1–2), 28–40. <https://doi.org/10.1002/star.201200211>
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M., & Ballottari, M. (2018). Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*, 8(1), 6465. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24979-8>
- Chandra, P., Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>
- Chronakis, I. S., & Madsen, M. (2011). 14 - Algal proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams

(Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 353–394). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857093639.353>

Fernández, F. G. A., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V., & Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, 61, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/J.NBT.2020.11.011>

Ford, T. W. (1979). Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from the thermophilic, acidophilic alga, *Cyanidium caldarium* (Geitler): Purification, characterisation and thermostability of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 569(2), 239–248.
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(79\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(79)90059-7)

García, J. L., de Vicente, M., & Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1017–1024.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.12800>

Garibay-Hernández, A., Vazquez-Duhalt, R., Serrano-Carreón, L., & Martinez, A. (2013). Nitrogen Limitation in *Neochloris oleoabundans*: A Reassessment of Its Effect on Cell Growth and Biochemical Composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7), 1775–1791. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0454-1>

Gifuni, I., Pollio, A., Safi, C., Marzocchella, A., & Olivieri, G. (2019). Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. *Trends in Biotechnology*, 37(3), 242–252.
<https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2018.09.006>

González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 6, pp. 1655–1661). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>

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 thermoacidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & Function*, 4(1), 144–152.
<https://doi.org/10.1039/C2FO30198A>

- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acidophilic Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>
- Henkanatte-Gedera, S. M., Selvaratnam, T., Karbakhshravari, M., Myint, M., Nirmalakhandan, N., Van Voorhies, W., & Lammers, P. J. (2017). Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by *Galdieria sulphuraria*: Laboratory to field scale demonstration. *Algal Research*, 24, 450–456. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.08.001>
- Hernández-López, J., & Vargas-Albores, F. (2003). A microplate technique to quantify nutrients (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ and PO₄³⁻) in seawater. *Aquaculture Research*, 34(13), 1201–1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00928.x>
- Hu, Y., & Bassi, A. (2020). Chapter 11 - Extraction of biomolecules from microalgae. In E. Jacob-Lopes, M. M. Maroneze, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (Eds.), *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 283–308). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00011-7>
- Kimble, K., Walker, J., Finegold, D., & Asher, S. (2006). Progress Toward the Development of a Point-of-Care Photonic Crystal Ammonia Sensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 678–685. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0453-y>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., & Show, P.-L. (2019a). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019b). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2019.03.001>
- Kursar, T. A., & Alberte, R. S. (1983). Photosynthetic Unit Organization in a Red Alga: Relationships between Light-Harvesting Pigments and Reaction Centers. *Plant Physiology*, 72(2), 409–414. <https://doi.org/10.1104/pp.72.2.409>

- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Ación-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137, 109356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>
- Liu, Q.-H., Tang, J.-W., Wen, P.-B., Wang, M.-M., Zhang, X., & Wang, L. (2021). From Prokaryotes to Eukaryotes: Insights Into the Molecular Structure of Glycogen Particles. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 299. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.673315>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin Phenol Reagent. In *J. biol. Chemistry* (Vol. 193).
- Maia, J. L. da, Cardoso, J. S., Mastrantonio, D. J. da S., Bierhals, C. K., Moreira, J. B., Costa, J. A. V., & Morais, M. G. de. (2020). Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2739–2749. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.159>
- Malavasi, V., Soru, S., & Cao, G. (2020). Extremophile Microalgae: the potential for biotechnological application. *Journal of Phycology*, 56(3), 559–573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpy.12965>
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., & Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293–301. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.12.068>
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Maroneze, M. M., Siqueira, S. F., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2016). The role of photoperiods on photobioreactors – A potential strategy to reduce costs. *Bioresource Technology*, 219, 493–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.003>

- Martín-Juárez, J., Markou, G., Muylaert, K., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado, S. (2017). Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 183–207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X>
- Martinez-Garcia, M., Kormpa, A., & van der Maarel, M. J. E. C. (2017). The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydrate Polymers*, 169, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.04.004>
- Martinez-Garcia, M., Stuart, M. C. A., & van der Maarel, M. J. E. . (2016). Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 12–18. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.04.051>
- Martinez-Garcia, M., & van der Maarel, M. J. E. C. (2016). Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express*, 6(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0244-6>
- Masojidek, J., Koblizek, M., & Torzillo, G. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Masojídek, J., Koblížek, M., & Torzillo, G. (2007). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 20–39). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch2>
- Mayers, J. J., Vaiciulyte, S., Malmhäll-Bah, E., Alcaide-Sancho, J., Ewald, S., Godhe, A., Ekendahl, S., & Albers, E. (2018). Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research*, 31, 430–442. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.034>
- Meullemiestre, A., Breil, C., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2015). Microorganisms: Source of High Value Added Compounds. In A. Meullemiestre, C. Breil, M. Abert-Vian, & F. Chemat (Eds.), *Modern Techniques and Solvents for the Extraction of Microbial Oils* (pp. 1–9).

Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22717-7_1

- Montenegro-Herrera, C. A., Vera-López Portillo, F., Hernández-Chávez, G. T., & Martínez, A. (2022). Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization. *Journal of Applied Phycology*, *34*(3), 1341–1352. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02733-y>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0239-9>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100269>
- Munasinghe-Arachchige, S. P., Delanka-Pedige, H. M. K., Henkanatte-Gedera, S. M., Tchinda, D., Zhang, Y., & Nirmalakhandan, N. (2019). Factors contributing to bacteria inactivation in the *Galdieria sulphuraria*-based wastewater treatment system. *Algal Research*, *38*, 101392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101392>
- Náhlík, V., Zachleder, V., Čížková, M., Bišová, K., Singh, A., Mezricky, D., Řezanka, T., & Vítová, M. (2021). Growth under Different Trophic Regimes and Synchronization of the Red Microalga *Galdieria sulphuraria*. *Biomolecules*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/biom11070939>
- Oesterhelt, C., Schmäzlin, E., Schmitt, J. M., & Lokstein, H. (2007). Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*†. *The Plant Journal*, *51*(3), 500–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>
- Oh, S. H., Han, J. G., Kim, Y., Ha, J. H., Kim, S. S., Jeong, M. H., Jeong, H. S., Kim, N. Y., Cho, J. S., Yoon, W. B., Lee, S. Y., Kang, D. H., & Lee, H. Y. (2009). Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*(5), 429–434. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2009.05.020>

- Perez-Garcia Octavio and Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In R. K. and Z. M. E. Prokop Aleš and Bajpai (Ed.), *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design* (pp. 61–131). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3
- Portillo, F. V.-L., Sierra-Ibarra, E., Vera-Estrella, R., Revah, S., Ramírez, O. T., Caspeta, L., & Martínez, A. (2022). Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy. *Algal Research*, 65, 102752. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102752>
- Powell, P. O., Sullivan, M. A., Sheehy, J. J., Schulz, B. L., Warren, F. J., & Gilbert, R. G. (2015). Acid hydrolysis and molecular density of phytoglycogen and liver glycogen helps understand the bonding in glycogen α (composite) particles. *PloS One*, 10(3), e0121337–e0121337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121337>
- Price, C. A. (1965). A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. *Analytical Biochemistry*, 12(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90084-9)
- Queiroz, M. I., Vieira, J. G., & Maroneze, M. M. (2020). Chapter 2 - Morphophysiological, structural, and metabolic aspects of microalgae. In E. Jacob-Lopes, M. M. Maroneze, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (Eds.), *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 25–48). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00002-6>
- Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., Zhang, Y., & Lan, X. (2019). Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*, 291, 121894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121894>
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>

- Rudin, A. (1999). Mechanical Properties of Polymer Solids and Liquids. *Elements of Polymer Science and Engineering*, 377–443. <https://doi.org/10.1016/B978-012601685-7/50011-2>
- Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Umemura, T., Tsuzuki, M., & Minoda, A. (2016). Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology*, 200, 861–866. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.11.014>
- Salbitani, G., & Carfagna, S. (2020). Different behaviour between autotrophic and heterotrophic *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) cells to nitrogen starvation and restoration. Impact on pigment and free amino acid contents. *International Journal of Plant Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8567>
- Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M., & Mehmood, M. A. (2020). Microalgal Carbohydrates and Proteins: Synthesis, Extraction, Applications, and Challenges. In M. A. Alam, J.-L. Xu, & Z. Wang (Eds.), *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 433–468). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_14
- Sheath, R. G., & Vis, M. L. (2015). Chapter 5 - Red Algae. In J. D. Wehr, R. G. Sheath, & J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America (Second Edition)* (pp. 237–264). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00005-0>
- Shrivastava, A. (2018). Polymerization. *Introduction to Plastics Engineering*, 17–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2>
- Singh Manjinderand Das, K. C. (2014). Low Cost Nutrients for Algae Cultivation. In A. and Z. M. Bajpai Rakeshand Prokop (Ed.), *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products* (pp. 69–82). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_3
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.163>

- 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), 168–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1109–1119. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0428-x>
- Vallejo-García, L. C., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2019). Enzymatic Process Yielding a Diversity of Inulin-Type Microbial Fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(37), 10392–10400. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03782>
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., & Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology*, 184, 363–372. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.11.040>
- Vidotti, A. D. S., Riaño-Pachón, D. M., Mattiello, L., Giraldi, L. A., Winck, F. V., & Franco, T. T. (2020). Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches. *Algal Research*, 51, 102060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102060>
- Viola, R., Nyvall, P., & Pedersén, M. (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings. Biological Sciences*, 268(1474), 1417–1422. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1644>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.06.045>
- Wang, L., Liu, Q., Tan, X., Wang, Z., Wang, M., Wise, M. J., Li, C., Ma, C., Li, E., Deng, B., Du, Y., Tang, D., & Gilbert, R. G. (2019). Molecular Structure of Glycogen in *Escherichia coli*.

Biomacromolecules, 20(7), 2821–2829. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00586>

Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y., & Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 180, 281–287. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.12.073>

Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S., & Zhang, W. (2012). Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*, 118, 438–444. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.030>

11. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

IS. 1. Caracterización del preinóculo.

En la **tabla IS.1** se reportan de forma comparativa los resultados obtenidos de la caracterización del preinóculo de las diferentes cepas de *G. sulphuraria*, cultivadas bajo condiciones autotróficas (**Figura IS.1.A**) y mixotróficas (**Figura IS.2.B**) de crecimiento. De forma general se evidencia que las cepas evaluadas presentan un mejor crecimiento en mixotrofia, obteniéndose concentraciones de biomasa máximas aproximadamente 5 veces superiores a las obtenidas en autotrofia, además de obtenerse en un tiempo de cultivo menor.

Tabla IS.1. Resultados obtenidos del comportamiento de las cepas de *G. sulphuraria* evaluadas en el tiempo t de concentración máxima de biomasa bajo condiciones autótrofas y mixótrofas de cultivo.

| Cepa | Autotrofia | | Mixotrofia | | R_t^* |
|-------------------------------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|---------|
| | Biomasa (g L ⁻¹) | Tiempo (Días) | Biomasa (g L ⁻¹) | Tiempo (Días) | |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 21.92 | 0.99 ± 0.01 | 20 | 5.45 ± 0.05 | 10 | 1 : 5.5 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 1.20 ± 0.03 | 20 | 6.38 ± 0.11 | 8 | 1 : 5.3 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 1.18 ± 0.02 | 20 | 6.56 ± 0.13 | 6 | 1 : 5.6 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 1.18 ± 0.01 | 20 | 5.97 ± 0.12 | 8 | 1 : 5.1 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCME5587 | 1.03 ± 0.01 | 20 | 6.07 ± 0.13 | 6 | 1 : 5.9 |

* R_t . Relación de la biomasa máxima producida en condiciones de cultivo autotróficas respecto a condiciones mixotróficas.

Los datos corresponden a las medias ± las desviaciones estándar de los experimentos por triplicado.

Los resultados anteriores se asemejan a los reportados por [Sakurai et al., \(2016\)](#), quienes evaluaron el crecimiento de *G. sulphuraria* O74 W bajo condiciones autótrofas y mixótrofas de cultivo, encontrando una mayor producción de biomasa (3.8 g L⁻¹ día 4) al utilizar glucosa 4.5 g L⁻¹ como fuente de carbono, respecto al cultivo fotoautótrofo (1.1 g L⁻¹ día 12) en un tiempo de cultivo menor.

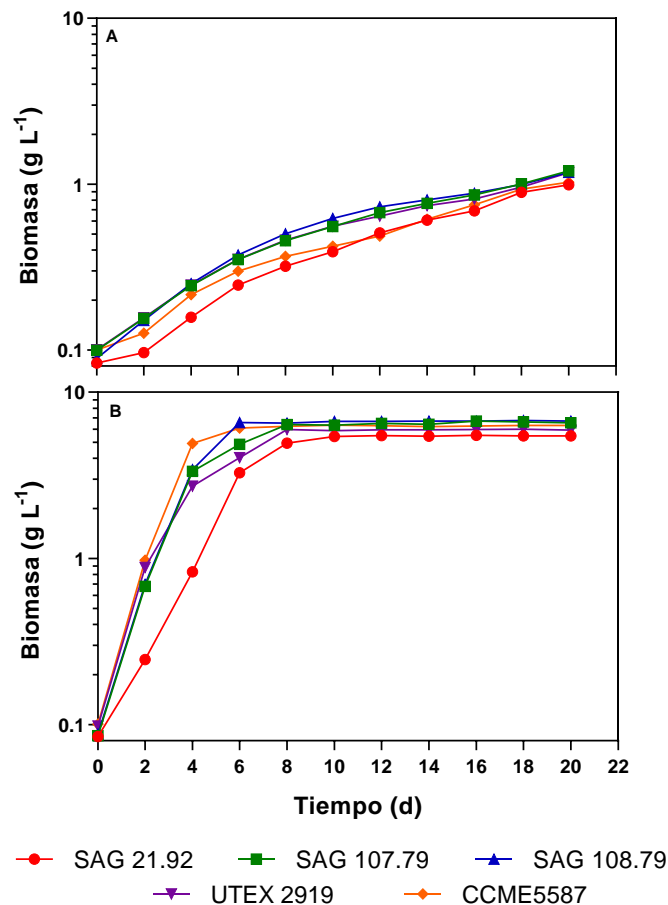


Figura IS.1.1. Producción de biomasa con diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones autotróficas (A) y mixótrofas (B) de cultivo.

De forma global se observa que llevando a cabo el cultivo de las microalgas en condiciones autotróficas durante el tiempo evaluado no se logra alcanzar la fase estacionaria, indicando que hasta el día 20 ninguno de los nutrientes del medio utilizado empieza a ser limitante para el cultivo de las cepas empleadas. Sin embargo, un fenómeno distinto ocurre en el crecimiento de las microalgas evaluadas al adicionar glucosa 10 g L⁻¹ al medio de cultivo, observándose que las cepas alcanzan la fase estacionaria cuando se logran ≥ 5.4 g L⁻¹ de biomasa, lo cual se atribuye al agotamiento de la fuente orgánica de carbono utilizada.

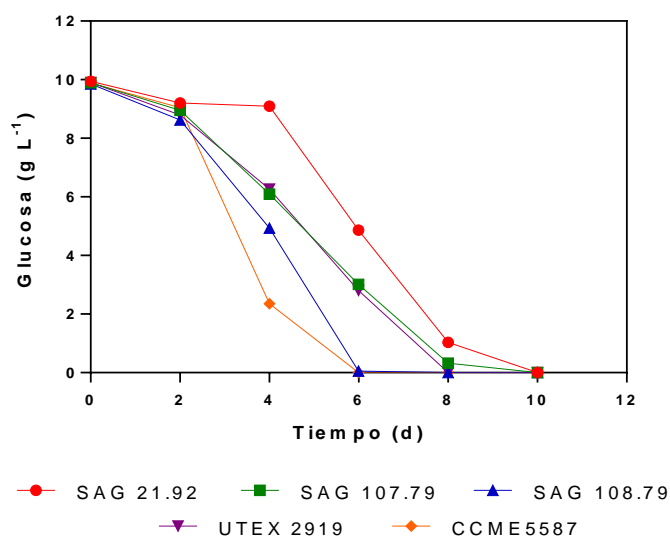
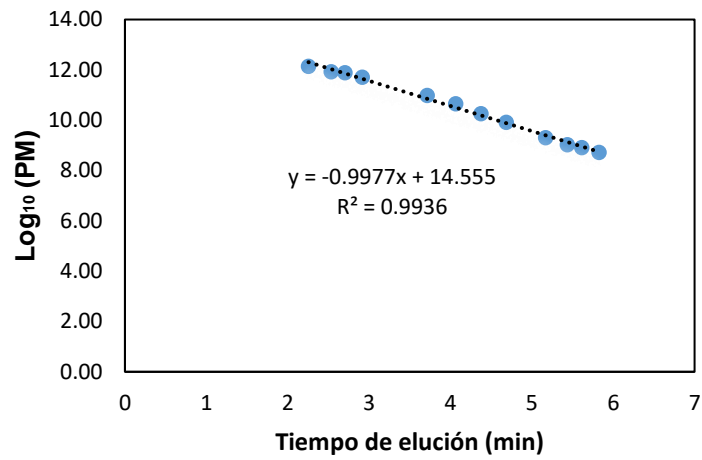


Figura IS.1.2. Consumo de glucosa de diferentes cepas de *G. sulphuraria* bajo condiciones mixotróficas de crecimiento.

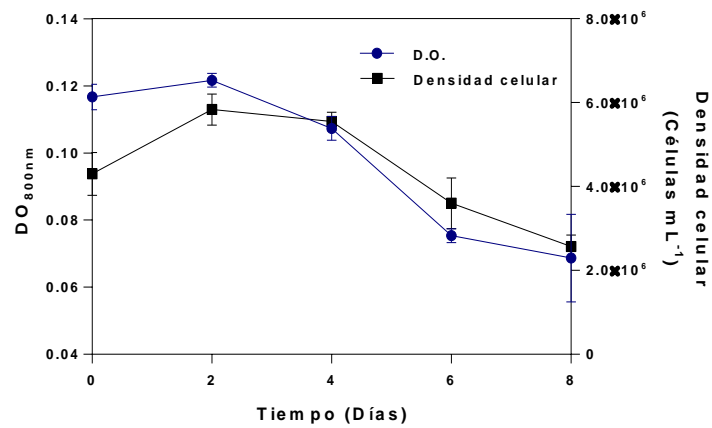
Teniendo en cuenta los resultados anteriores referentes al comportamiento de las cepas bajo las dos condiciones de crecimiento evaluadas, se decidió llevar a cabo la obtención de los preinóculos en condiciones mixotróficas, con el fin de disminuir el tiempo de cultivo de estos y asegurar una población microalgal constante para realizar los inóculos.

IS. 2. Curva tipo determinación peso molecular α -poliglucanos

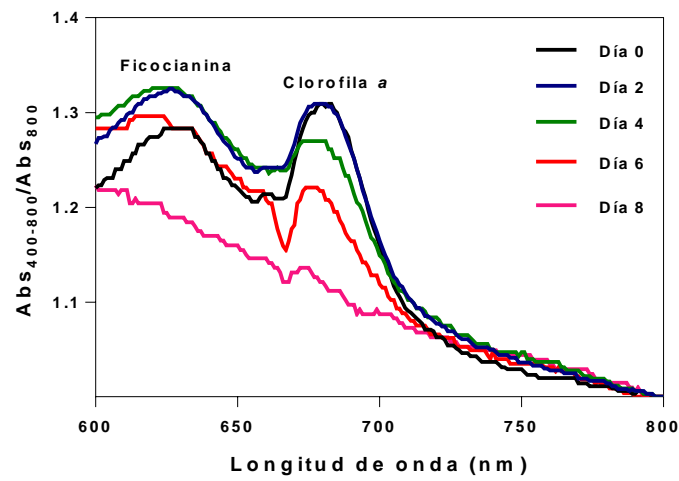
| Estándar | PM (Da) | Log (PM) | Tiempo de elución (min) |
|------------------|---------|-------------|-------------------------|
| Fructosa (Sigma) | 180 | 2.255272505 | 12.14 |
| Sacarosa (Sigma) | 342 | 2.534026106 | 11.93 |
| 1-Kestosa | 504 | 2.702430536 | 11.89 |
| F-1Nistosa | 828 | 2.918030337 | 11.71 |
| Dextrana 5.2 | 5200 | 3.716003344 | 10.99 |
| Dextrana 11.6 | 11600 | 4.064457989 | 10.66 |
| Dextrana 23.8 | 23800 | 4.376576957 | 10.26 |
| Dextrana 48.6 | 48600 | 4.686636269 | 9.92 |
| Dextrana 148 | 148000 | 5.170261715 | 9.30 |
| Dextrana 273 | 273000 | 5.436162647 | 9.03 |
| Dextrana 410 | 410000 | 5.612783857 | 8.92 |
| Dextrana 668 | 668000 | 5.824776462 | 8.73 |



IS. 3. Efecto de la temperatura (50°C) sobre el crecimiento de la microalga *Galdieria sulphuraria* SAG 107.79



IS. 4. Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficocianina) en células completas de *G. sulphuraria* SAG 107.79 bajo condiciones autótrofas a 50°C y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



12. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA Y ACADÉMICA

A continuación, se relacionan los diferentes productos de investigación y actividades académicas desarrolladas durante el doctorado:

1. Artículo de Investigación: Montenegro-Herrera, C.A., Vera-López Portillo, F., Hernández-Chávez, G.T. et al. Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization. *J Appl Phycol* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02733-y>

2. Artículo de revisión: Montenegro-Herrera, C.A., Manzoni Maroneze, M., Vera-López-Portillo, F., Martínez, A. (2021). Poliglucanos de reserva en microalgas: química, biosíntesis y manipulación de condiciones de cultivo. *BioTecnología. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 25 (5 no. especial), 52-64.

3. Artículo de revisión: Manzoni Maroneze, M., Montenegro-Herrera, C.A., Martínez, A. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica. *BioTecnología. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 25 (5 no. especial), 11-34.

4. Artículo de revisión: Vera-López-Portillo, F., Montenegro-Herrera, C.A., Alvarado-Cosío, R.A., Martínez, A., Porta-Ducoing, H. (2021). Ficocianina y su acumulación en la microalga roja *Galdieria sulphuraria*. *BioTecnología. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 25 (5), 81-94.

4. Actividad complementaria: Coordinador del curso “Principios y Aplicaciones de Biotecnología Microalgal”, impartido dentro del posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas durante el semestre 2021-1 en el Instituto de Biotecnología-IBT.

5. Estancia de Investigación: Instituto De Ciencias Aplicadas Y Tecnología-ICAT. Laboratorio de Ingeniería de Proceso. Responsable: Dra. María Soledad Córdova Aguilar. Actividades: Desarrollo de una bebida de alta calidad proteica y fibra, incorporando biomasa microalgal. 2022-06-10 – 2022-07-10.

6. Congreso Internacional: 10th International conference of Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2021), United Kingdom, “Potential single-cell protein production with the

thermoacidophile microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization”, Autor, 2021.

7. **Congreso Nacional:** XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, León, Guanajuato, México, “Producción potencial de proteína con la microalga roja extremófila *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919”, Autor, 2019.

8. **Capacitación en laboratorio Nacional:** Tópico selecto y capacitación “fundamentos en citometría de flujo y capacitación en el equipo CITO FLEX”, Laboratorio Nacional de citometría de Flujo-LabNalCit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, 2019.

9. **Congreso Internacional:** 14 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Brazil, “INCREASED PHYCOCYANIN PRODUCTIVITY FROM THE MICROALGAE *Galdieria sulphuraria* THROUGH MODULATION OF CN RATIO”, Autor, 2021.

10. **Participación Curso:** 3ra Escuela de Verano en Investigación. Conferencia “Principios y aplicaciones de biotecnología microalgal”, llevada a cabo en el Instituto de Biotecnología-UNAM del 12 al 25 de junio del 2022.

11. **Capítulo de Libro:** Maroneze, M.M., Sierra-Ibarra, E., Montenegro-Herrera, C.A., Martinez, A. (2022). Waste Biorefineries Facilities: The Feedstock Choice. In: Jacob-Lopes, E., Queiroz Zepka, L., Costa Deprá, M. (eds) Handbook of Waste Biorefinery. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06562-0_3



Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization

Carlos A. Montenegro-Herrera¹ · Francisco Vera-López Portillo¹ · Georgina T. Hernández-Chávez¹ · Alfredo Martínez¹

Received: 31 October 2021 / Revised and accepted: 21 March 2022 / Published online: 22 April 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

New food sources are urgently needed due to population growth. The production of microalgae biomass with high protein content is particularly of interest. *Galdieria sulphuraria* is an extremophilic red microalgae that can grow in acidic environments (pH 0 to 4) and above 40 °C. The aim of this work was to study the photoautotrophic growth and the biochemical composition of five *G. sulphuraria* strains to potentially produce single-cell protein. A kinetic study of cell growth and macromolecule content was performed in batch mode under controlled conditions: 42 °C, pH 2, constant illumination at 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 150 rpm, 0.5 vvm, and atmospheric CO_2 (0.04%). The *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 reached 2.33 g L^{-1} of dry cell weight (DCW) ($\sim 9 \times 10^7$ cells mL^{-1}) in 20 days, i.e., a productivity of $\sim 110 \text{ mg}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ was achieved. The biomass from this strain shows a high protein content ($\sim 44\% \text{ w/w}_{\text{DCW}}$), 42.7% of essential amino acids, 4.7% (w/w_{DCW}) of phycocyanin, 5.9% (w/w_{DCW}) total carbohydrates, and 14.1% (w/w_{DCW}) total lipids. A productivity of 21 $\text{t ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ could be attained assuming a straightforward scale-up in open ponds and reaching half the protein productivities obtained in the laboratory. This biomass composition is suitable for food purposes.

Keywords *Galdieria sulphuraria* · Rhodophyta · Photoautotrophic · Single-cell protein · Essential amino acids · Photosynthetic pigments

Introduction

The food industry has recently focused on new food and feed sources (e.g., carbohydrates, lipids, proteins, PUFAs, vitamins, and nutraceuticals among others) that satisfy dietary and nutritional needs (Nalage et al. 2016). Proteins are one of the most studied food groups due to their importance as a source of essential amino acids. The unicellular protein

or single-cell protein (SCP) refers to protein obtained from the cultivation of various microorganisms using organic or inorganic carbon sources such as bacteria, yeasts, fungi, and algae (Najafpour 2007) that contain more than 40% of crude protein on a dry weight basis (García-Garibay et al. 2014).

SCP production with microorganisms (bacteria and yeasts) under heterotrophic culture conditions has been performed using a wide variety of organic carbon sources such as monosaccharides (glucose), fermentation products (ethanol), and industrial residues (whey) (García-Garibay et al. 2014). However, the use of such carbon sources raises the total economic cost of production due to the high cost of commercial carbon sources or pretreatments made of industrial wastes. Therefore, the use of microalgae biomass as a protein source becomes relevant due to the ability of microalgae to grow in autotrophic culture conditions.

Microalgae are a diverse group of photoautotrophic organisms present in many ecosystems (Gaignard et al. 2019). Microalgae have recently gained great biotechnological and industrial importance due to their ability to fix atmospheric carbon dioxide using solar energy through

✉ Alfredo Martínez
alfredo.martinez@ibt.unam.mx

Carlos A. Montenegro-Herrera
carlos.montenegro@ibt.unam.mx

Francisco Vera-López Portillo
francisco.vera@ibt.unam.mx

Georgina T. Hernández-Chávez
georgina.hernandez@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Col. Chamilpa, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

photosynthesis and produce biomass and other compounds such as storage carbohydrates (e.g., starch or glycogen) (Brányiková et al. 2011; Martinez-Garcia et al. 2017), lipids (e.g., PUFAs) (Koller et al. 2014), and proteins with higher productivities than those obtained with terrestrial plants (Bajpai et al. 2014).

Red algae (Rhodophyta) are a phylum of photosynthetic organisms that contains multicellular and unicellular species that can colonize a wide range of habitats including marine and fresh waters, hot sulfur springs, and volcanic environments. These microorganisms share diverse characteristics such as eukaryotic cells, absence of flagella, production of floridean starch as storage carbohydrate, synthesis of phycobiliprotein pigments (phycocyanin and phycoerythrin), and non-stacked thylakoids (Sheath and Vis 2015). Cyanidiophyceae (subphylum Cyanidiophytina) belongs to the Rhodophyta, which are unicellular algae that live in extremophile conditions in acidic environments and at high temperatures (Gagnard et al. 2019). This class includes two families in the order Cyanidiales (Cyanidiaceae and Galdieriaceae) and the genera *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon*, and *Galdieria*.

Galdieria sulphuraria is an extremophile red microalga that thrives in acidic environments with pH values from 0 to 4 and temperatures up to 56 °C (Martinez-Garcia and van der Maarel 2016). It can grow under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture conditions using many organic carbon sources (e.g., sugars, polyols, disaccharides, amino acids, and organic acids) (Oesterhelt et al. 2007). In addition, *G. sulphuraria* has great potential for the biotechnological production of pigmented proteins like phycocyanin (Wan et al. 2016) and functional carbohydrates such as glycogen (Martinez-Garcia et al. 2017) and floridoside (Pade et al. 2015).

The biotechnological potential of microalgae for obtaining high-value products has been explored. However, one of the main limitations is the potential culture contamination with other microorganisms; this issue is relevant when mesophilic temperatures and pH values around neutrality are used (e.g., 5 to 9) (Malavasi et al. 2020). Therefore, the use of acidophilic microalgae becomes relevant because the low pH prevents the growth of other autotrophic microorganisms or other microorganisms that could colonize the culture medium (Varshney et al. 2015).

There are proteins synthesized by *G. sulphuraria* of biotechnological interest including phycobiliproteins (phycoerythrin, allophycocyanin, and phycocyanin). The latter are pigmented protein complexes involved in the collection and transport (antenna complex) of solar energy during the light phase of photosynthesis (Masojídek et al. 2007). The phycobiliprotein content in *G. sulphuraria* can reach up to 10% of the total dry weight of the biomass in photoautotrophic cultures (Graziani et al. 2013). Moreover, the potential of *G. sulphuraria* as a source of protein has been reported with a

protein content of 33% (*G. sulphuraria* 064/309) based on dry weight (Graziani et al. 2013). However, to date, there are few reports regarding the cultivation of *G. sulphuraria* under autotrophic growth conditions. The aim of this work was to study the photoautotrophic growth and the biochemical macromolecular composition of five different *G. sulphuraria* strains to potentially produce SCP.

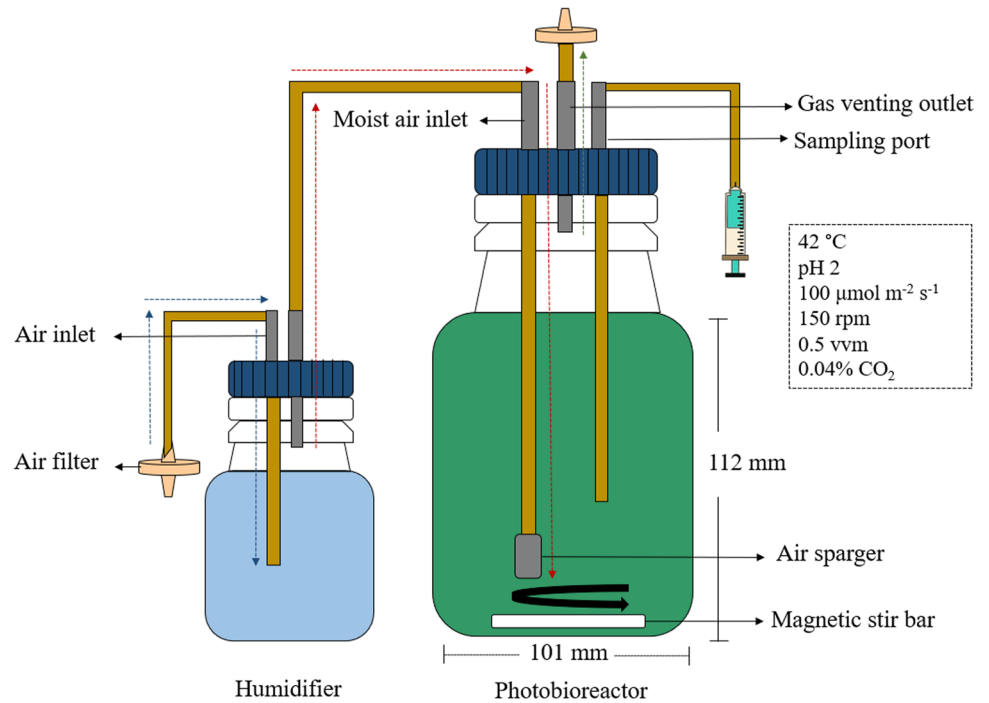
Materials and methods

Algae strains and culture conditions

Different strains of *Galdieria sulphuraria* were obtained from the algae collection of the Department of Experimental Phycology and Culture Collection of Algae from the University of Göttingen, Germany (SAG 107.79, SAG 108.79, and SAG 21.92), from the Algae Culture Collection of the University of Texas, USA (UTEX 2919), and from the microbial collection of extreme environments of the University of Oregon, USA (CCMEE 5587.1). Stock cultures were maintained by sub-cultivation in 500-mL shake flasks containing 300 mL of medium described by Ford (1979) as well as Gross and Schnarrenberger (1995). One liter of culture medium contained 1.5 g (NH₄)₂SO₄, 300 mg MgSO₄·7H₂O, 300 mg K₂HPO₄·3H₂O, 20 mg CaCl₂·2H₂O, 20 mg NaCl, 1.5 mL of Fe-EDTA-solution (690 mg FeSO₄, 930 mg EDTA per 100 mL), and 2 mL trace-element solution (2.86 g H₃BO₃, 1.82 g MnCl₂·4H₂O, 220 mg ZnSO₄·7H₂O, 30 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 80 mg CuSO₄·5H₂O, 40 mg NaVO₃·4H₂O, and 40 mg CoCl₂·6H₂O per liter). The pH was adjusted to 2.0 with H₂SO₄.

The experimental cultures were evaluated in photobiological systems containing 900 mL of mineral media. A comparative study of cell growth and protein, carbohydrate, and lipid content was performed under controlled growth conditions: 42 °C, pH 2, constant illumination of 100 μmol photons m² s⁻¹ (white lamps), 150 rpm, and an air flow rate of 0.5 vvm with atmospheric CO₂ (0.04%) and filtered through a 0.2 μm sterile membrane. Axenic batch autotrophic cultures were performed in 1-L glass photobioreactors (Schott-Duran 1-L glass bottles with a diameter of 101 mm) (Fig. 1). The bioreactor included a sample port, an air inlet with a sintered stainless steel sparger (2 μm pore size), a gas venting outlet, and an illuminated incubator with temperature control. Agitation was provided with a magnetic stir bar at the bottom of the photobioreactors (50 × 7 mm) and bubbled air through the sparger placed above the stir bar. It was necessary to moisten the air that entered the system using a humidifier due to the temperature used in cultures. All experimental cultures were started with an optical density of 0.1 at 800 nm and a

Fig. 1 Scheme of the photobiological system used in this study



cell density of $\sim 5 \times 10^6$ cells mL^{-1} . This was performed in triplicate and monitored every 2 days for 20 days.

Analytical methods

Biomass concentration, cell density, and biomass productivity

The biomass concentration was determined by spectrophotometry at 800 nm using distilled water as a blank. The measurements were made in triplicate and interpolated in a dry weight curve.

The cell density (cells mL^{-1}) of the cultures was determined by direct count in a Neubauer chamber and a light microscope equipped with a 40x objective. The counts were in triplicate, and the results are represented as mean values. The cell density was determined using Eq. 1:

$$\text{Cell Density} = \left\{ \frac{(N)(Df)}{(0.1 * 1 * 1) \left(\frac{n}{25} \right)} \right\} (1000)$$

where N is the total cell count, Df is the dilution factor, and n is the total counted quadrants. (1)

The doubling time (Dt) (day) was calculated using Eq. 2 and assuming exponential growth during 20 days of cultivation or when the cells grew exponentially.

$$Dt = \frac{\text{Ln}2}{\mu} \tag{2}$$

where the specific growth rate was determined by

$$\mu = (\text{Ln}(DCW_f - DCW_i)) / (t_f - t_i) \tag{3}$$

where DCW is the dry cell weight (in $\text{g}_{DCW} \text{L}^{-1}$) and f and i correspond to the final and initial values for DCW and time (in days), respectively.

Biomass productivity (Q_{DCW}) was calculated using Equation 4:

$$Q_{DCW} = \left\{ \frac{(DCW_f) - (DCW_i)}{t_f} \right\} (1000) \tag{4}$$

Carbohydrate content

The glucose-carbohydrate hydrolysis was done by a thermochemical treatment: 10 mg of dry algal biomass was resuspended in 0.5 mL of 2 N hydrochloric acid (HCl),

homogenized by vortexing, incubated at 99 °C for 1 h and cooled at room temperature (Garibay-Hernández et al. 2013). For glucose determination, the samples were neutralized with 4 N NaOH and centrifuged at $16,800 \times g$. The supernatant was retained and the glucose measurements were made with a biochemical analyzer (model YSI 2700, YSI Inc., USA). All determinations were done in triplicate.

Gravimetric lipid determination

The lipid extraction was done by the methodology described by Bligh and Dyer (1959) with some modifications. Thirty mg of dry biomass was resuspended by vortexing in 6 mL of a methanol and chloroform (2:1 v/v) solution and sonicated for 60 min (Branson Model B200 Ultrasonic, USA). Next, 4 mL of a chloroform and 1% NaCl solution (1:1 v/v) were added to obtain a final ratio of methanol, chloroform, and 1% NaCl of 2:2:1 v/v. Finally, the organic phase (chloroform and lipids) was recovered and dried at room temperature, and the remaining portion was considered as lipids. All extractions were performed in triplicate.

Protein content

Protein extraction followed the methodology developed by Slocombe et al. (2013) based on Price (1965) with some modifications. Five mg of dry algae biomass was resuspended by vortexing in 200 μL of 24% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). The homogenates were incubated at 95 °C for 15 min and cooled at room temperature. Next, the samples were diluted to 6% TCA (w/v) in ultra-pure water, centrifuged at $15,600 \times g$ for 20 min at 4 °C, and their supernatants discarded. The pellets were resuspended in 500 μL of Lowry D reagent (48:1:1 ratio solution of Lowry reagents A (2% (w/v) Na_2CO_3 (anhydrous) in 0.1 N NaOH), B (1% (w/v) NaK tartrate tetrahydrate), and C (0.5% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in H_2O); samples were then incubated for 3 h at 55 °C. The samples were cooled at room temperature and centrifuged at $16,800 \times g$ for 20 min, and the supernatant was retained for quantification via the colorimetric Lowry method (Lowry et al. 1951). Next, 950 μL of Lowry D reagent was added to 50 μL of the above protein extract, mixed by inversion, and incubated for 10 min at RT. Next, 0.1 mL of the diluted Folin–Ciocalteu phenol reagent (1:1 ratio of 2 N Folin–Ciocalteu phenol reagent: ultra-pure) was added to each sample and vortexed immediately. After 30 min at RT, the absorbance of each sample was read at 600 nm. The measurements were made in less than 1 h, and the tests were done in triplicate. The results were interpolated using a bovine serum albumin (BSA) standard curve.

Phycobiliprotein extraction and quantification

For cell disruption and extraction of phycobiliproteins, 10 mg of lyophilized *G. sulphuraria* biomass was resuspended in 1 mL of extraction buffer (CellLytic M solution with cOmplete Protease Inhibitor Cocktail); 300 mg of 450–500 μm glass beads (Sigma Aldrich) was added, mixed by shaking (Daigger Scientific vortex mixer, Vortex-Genie 2,) for 2 min, incubated for 3 h at 37 °C with shaking at 300 rpm (ThermoMixer F1.5, Eppendorf, Germany), and finally centrifuged $16,800 \times g$ (room temperature). The quantification of phycobiliproteins was carried out using the spectrophotometric method of Kursar and Alberte (1983). The absorbance of the supernatants containing phycobiliproteins was measured at 618, 650, and 498 nm to calculate the concentration of phycocyanin, allophycocyanin, and phycoerythrin using Eqs. 5, 6, and 7, respectively. Measurements were made in triplicate (1/10 dilution factor), and the results are represented as mean values:

$$\text{Phycocyanin} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 166A_{618} - 108A_{650} \quad (5)$$

$$\text{Allophycocyanin} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 200A_{650} - 52.3A_{618} \quad (6)$$

$$\text{Phycoerythrin} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 169A_{498} - 8.64A_{618} - 1.76A_{650} \quad (7)$$

Chlorophyll extraction and quantification

For cell disruption and chlorophyll extraction, 5 mg of lyophilized *G. sulphuraria* biomass was resuspended in 1 mL of extraction solution (acetone 90%); 500 mg of 450–500 μm glass beads (Sigma Aldrich) was then added and mixed with shaking (Daigger Scientific vortex mixer, Vortex-Genie 2) for 2 min and incubated for 3 h at 37 °C and 300 rpm (ThermoMixer F1.5, Eppendorf, Germany). Samples were centrifuged at $16,800 \times g$ at room temperature. Chlorophyll quantification used the spectrophotometric method proposed by Ritchie (2006). The absorbance of the chlorophyll-containing supernatants was measured from 400 to 700 nm, and Eq. 8 was used to determine the concentration of the pigment. A dilution factor of 1/10 was used for the adequate measurement of absorbance. All determinations were carried out in triplicate, and the results are represented as mean values:

$$\text{Chlorophyll } a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11.8668A_{664} - 1.7858A_{647} \quad (8)$$

Amino acid profile determination

The hydrolysis of the microalgal biomass was carried out by a thermochemical treatment. Ten milligram of dry *G. sulphuraria* biomass was resuspended in 1 mL of 3 N HCl, homogenized by vortexing and incubated for 24 h at 99 °C and 200 rpm. The sample was then neutralized with 10 N NaOH and centrifuged for 30 min at room temperature and 16,800 × *g*, and the supernatant was retained and filtered. The determination of the amino acid profile was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Henderson et al. (2000) with some modifications. Prior to injection, the amino acids present in the samples were derivatized using ortho-phthalaldehyde (OPA) (for primary amino acids). The following volumes were automatically injected and mixed by the autosampler in the following order: 2.5 µL of borate buffer (0.4 N, pH 10.2), 0.5 µL of sample, 0.5 µL of OPA, and 37 µL of water. The HPLC system (1100 series, Agilent Technologies, Germany) consisted of a binary pump, a thermostat-controlled autosampler, a column compartment, and a diode array detector at 338 nm. Analyses were performed using a Synergi 4 µm Max-RP 80 Å, LC 75 × 2 mm column (Phenomenex, USA), and the column temperature was set at 40 °C. The mobile phase was a 40 mM solution of NaH₂PO₄ (phase A) and a mixture of water, methanol, and acetonitrile (10:45:45; phase B). The elution of the samples was performed at a flow rate of 2.0 mL min⁻¹ by gradient elution and a total run time of 14 min.

Statistical analysis

The experimental error was determined for all triplicate determinations and expressed as standard deviation (SD). The significant difference of the duplication time comparison was determined by a variance analysis one-way ANOVA test followed by a Tukey test using the statistical packages GraphPad Prism version 6.01 and PAST version 3.14, respectively; *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Growth and biomass production

Table 1 shows a summary of results of the five different *G. sulphuraria* strains cultivated under autotrophic growth conditions. The microalgae were incubated for 3 weeks. The cells did not reach the stationary phase during such period other than SAG 21.92, which grew poorly under the tested conditions, and CCME 5587.1 strain, which surpassed all strains in cell density and biomass accumulation (Fig. 2). However, the *G. sulphuraria* strain CCME 5587.1 grew slower after 14 days of culture and reached a final biomass concentration of 2.33 g L⁻¹ of dry cell weight (DCW) at 20 days. Excluding strain SAG 21.92, this value was 2.2 to 3.2-fold higher than that obtained with the other strains (Fig. 2A, Table 1). Most of the SAG 21.92 cells settled even with the agitation provided by the magnetic stirrer and air sparger. Observations with the microscope revealed the formation of flocs: this strain probably excretes a polymer, but other studies are required to determine the factors that promote this behavior.

Table 1 Results obtained from the characterization of *G. sulphuraria* strains at time of maximum biomass concentration (t = 20 days)

| Strain | DCW (g _{DCW} L ⁻¹) | Cell density (cells mL ⁻¹) | Proteins (%; g g _{DCW} ⁻¹) | Carbohydrates (%; g g _{DCW} ⁻¹) | Lipids (%; g g _{DCW} ⁻¹) | Dt* (days) |
|-----------------------------------|---|--|---|--|---|---------------------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 21.92 | 0.18 ± 0.01 | 5.17E+06 ± 2.25E+05 | 42.58 ± 2.72 | 8.01 ± 0.58 | 8.89 ± 1.58 | 16.84 ± 2.27 ^a |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 0.74 ± 0.02 | 1.62E+07 ± 4.51E+05 | 39.31 ± 3.21 | 8.89 ± 0.08 | 6.78 ± 0.77 | 9.61 ± 0.59 ^b |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 0.83 ± 0.01 | 1.75E+07 ± 4.58E+05 | 43.44 ± 1.73 | 8.15 ± 0.85 | 9.56 ± 1.35 | 9.36 ± 0.48 ^b |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 1.07 ± 0.04 | 1.95E+07 ± 5.39E+05 | 46.86 ± 1.35 | 3.94 ± 0.31 | 7.31 ± 0.97 | 8.21 ± 0.51 ^c |
| <i>G. sulphuraria</i> CCME 5587.1 | 2.33 ± 0.06 | 8.97E+07 ± 7.01E+06 | 43.95 ± 3.15 | 5.91 ± 0.35 | 14.11 ± 0.84 | 4.27 ± 0.11 ^d |

*Doubling time

The data correspond to means ± the standard deviations of the triplicate experiments

^a, ^b, ^c, and ^d parameters obtained by a Tukey test. Equal letters, difference between means = 0; different letters, difference between means ≠ 0. The Dt values were obtained during the exponential growth phase

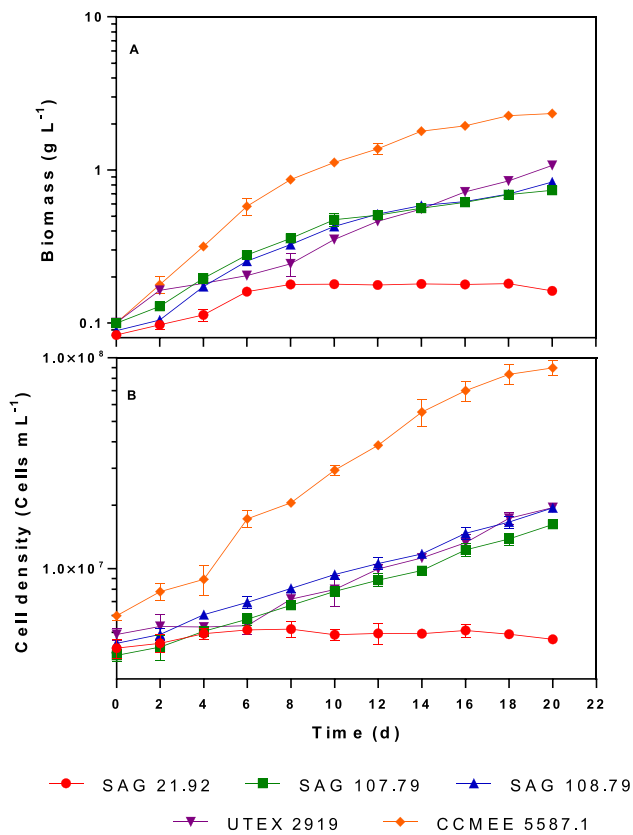


Fig. 2 Cell growth of different *G. sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions. **A** Biomass concentration. **B** Cellular density

In relation to the maximum cell density obtained for each strain (Table 1), *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 ($8.97 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ cells) reached a value that was 4.6- to 5.5-fold higher than that obtained by the other strains (excluding strain SAG 21.92) (Fig. 2B). Furthermore, the values found for doubling times (Dt) were, on average, 2.12-fold lower for most strains compared to CCMEE 5587.1 (Table 1). These values have a significant difference ($\text{Dt SAG. 21.92} \neq \text{Dt SAG 107.79} = \text{Dt SAG 108.79} \neq \text{Dt UTEX 2919} \neq \text{Dt CCMEE 5587.1}$) as represented by the statistic $p < 0.05$ ($p = 0.0001$).

Figure 3A shows the cumulative biomass productivity among the four strains: *G. sulphuraria* CCME 5587.1 reached a maximum biomass productivity between 14 and 20 days of cultivation ($111.7 \pm 2.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$). This value was 3.5-, 3.0-, and 2.31-fold higher compared to SAG 107.79, SAG 108.79, and UTEX 2919 at 20 days, respectively.

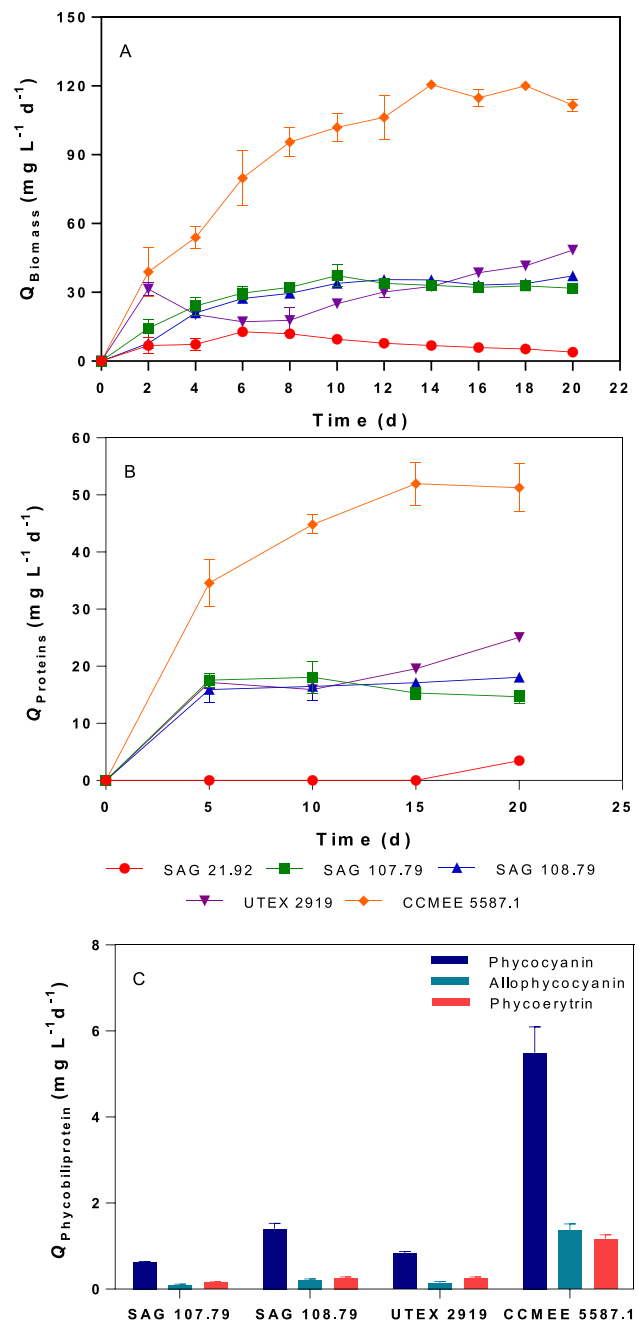


Fig. 3 Cumulative productivities of biomass (A), proteins (B), and phycobiliproteins (C) of different *G. sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions

Biochemical composition: carbohydrates, lipids, and proteins

The main reserve carbohydrate accumulated by *G. sulphuraria* is floridean starch (Martinez-Garcia et al. 2017). Floridean starch is a highly branched glucose homopolymer with a branched percentage of $\sim 18\%$ (α -1,6 linkages) and a molecular size of 2.5×10^5 Da (Martinez-Garcia

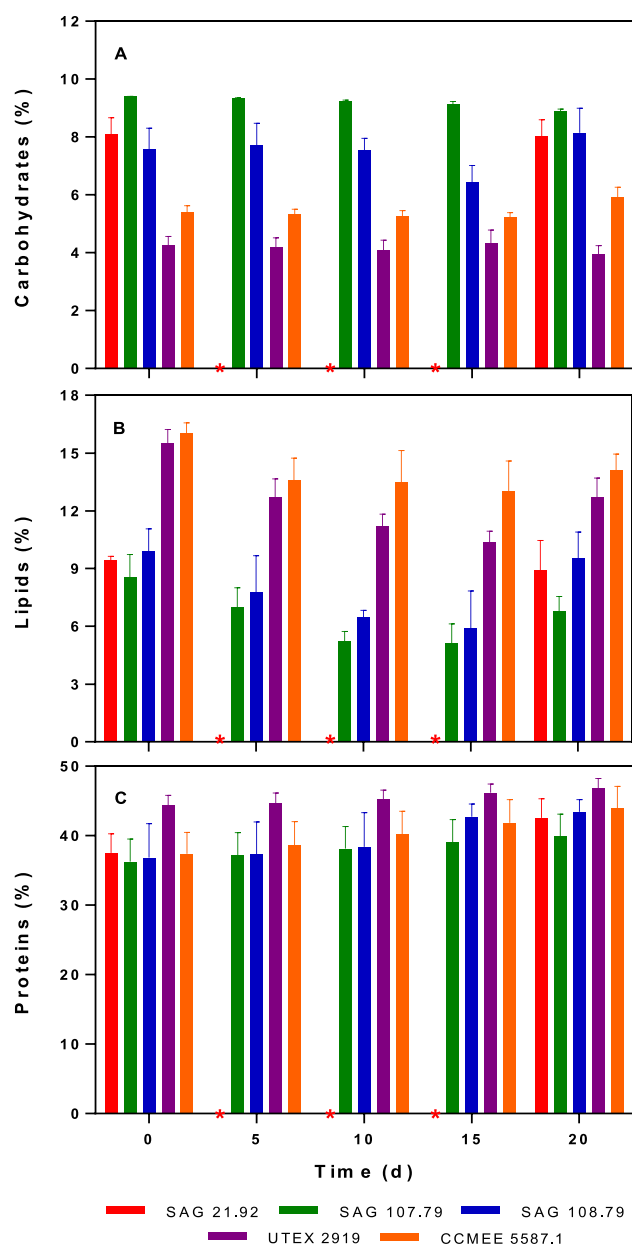


Fig. 4 Biochemical composition, carbohydrates (glucose) (A), lipids (B), and proteins (C), of different *G. sulphuraria* strains, was determined at 0, 5, 10, 15, and 20 days of cultivation time. The macromolecule content is expressed as $(\text{gX g}_{\text{PCW}}^{-1}) \times 100$, where X are proteins, carbohydrates, or lipids. * The macromolecule content in *G. sulphuraria* SAG.2192 was not determined

et al. 2016). Hence, the carbohydrate content was determined from the glucose released after thermochemical hydrolysis (see the Materials and Methods section). The *G. sulphuraria* strains accumulated lower amounts of carbohydrates that ranged from 4 to 9% (w/w); the highest content was obtained with strain SAG 107.79 (Table 1). Throughout the characterization, there were no changes in the content of this macromolecule at different culture

times (Fig. 4A), suggesting that the cultures were not found under nutrient limitation or stress condition, which could lead to over-accumulation of reserve glucans. However, *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 had a slight increase in carbohydrate content as seen at the end of the culture (day 20), which is a characteristic of the deceleration phase observed for this strain (Fig. 2) in which the carbohydrate content can increase as a reserve material.

The lipid content in the five evaluated strains ranged from 7 to 14% (w/w), and *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 presented a lipid content 2 times higher than the other strains (Fig. 4B). It has been reported that *G. sulphuraria* is capable of accumulating lipids with values ranging from 1.1 (Graziani et al. 2013) to 5.4% (Sakurai et al. 2016), which are lower than those contents found in all strains in the present study.

All strains showed a high protein content, above 40% (w/w) for most strains, being *G. sulphuraria* UTEX 2919 the strain that reached the highest value (~47%) (Fig. 4C). These values are higher than those reported previously for *G. sulphuraria* strain 064/309 (Graziani et al. 2013), which has a protein content of 32.5% in autotrophic cultures. However, the cumulative protein productivity is evident wherein strain *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 has a productivity 2 times higher than that of strain *G. sulphuraria* UTEX 2919, 51.3, and 25.1 $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$, respectively (Fig. 3B).

Photosynthetic pigments: phycobiliproteins and chlorophyll

There was a slight increase in protein content throughout the exponential phase of the different strains of *G. sulphuraria* (Fig. 4C). The microalgae actively synthesize various protein components involved in the increase of biomass such as enzymes, structural proteins, transporters, etc. Table 2 shows that the phycocyanin is the phycobiliprotein that accumulates at the highest proportion in the phycobilisome protein complex. These results contrast with that reported by Graziani et al. (2013) who found a higher content of allophycocyanin compared to the other phycobiliproteins. Remarkably, strain CCMEE 5587.1 accumulates the highest amount of phycocyanin: 1.4- to 3.04-fold higher than the values obtained with the other strains (Fig. 5). In the same way as the CCMEE 5587.1 strain reached the highest biomass and proteins productivities, this strain is expected to achieve the highest phycocyanin productivity: 3.9 to 8.6 times higher than the values obtained with the other strains (Fig. 3C). The SAG 21.92 strain did not grow under the tested conditions; the photosynthetic pigments (phycobiliproteins and chlorophyll) and amino acid profiling were not performed for this strain.

As expected, the absorption spectrum obtained shows the presence of two signal peaks at 410 nm and 670 nm, which

Table 2 Summary of photosynthetic pigments found in the biomass of *Galdieria sulphuraria* at time of maximum biomass concentration (t = 20 days)

| Strain | Phycocyanin | | Allophycocyanin | | Phycocerythrin | | Chlorophyll <i>a</i> | |
|------------------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | (mg g ⁻¹) | | (mg g ⁻¹) | | (mg g ⁻¹) | | (mg g ⁻¹) | |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 17.31 | ± 0.19 | 2.9 | ± 0.29 | 4.14 | ± 0.44 | 1.08 | ± 0.04 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 33.81 | ± 3.06 | 5.34 | ± 0.48 | 6.2 | ± 0.47 | 1.89 | ± 0.05 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 15.5 | ± 0.8 | 2.58 | ± 0.64 | 4.72 | ± 0.65 | 1.57 | ± 0.39 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | 47.13 | ± 5.16 | 11.7 | ± 1.34 | 9.92 | ± 0.88 | 2.48 | ± 0.15 |

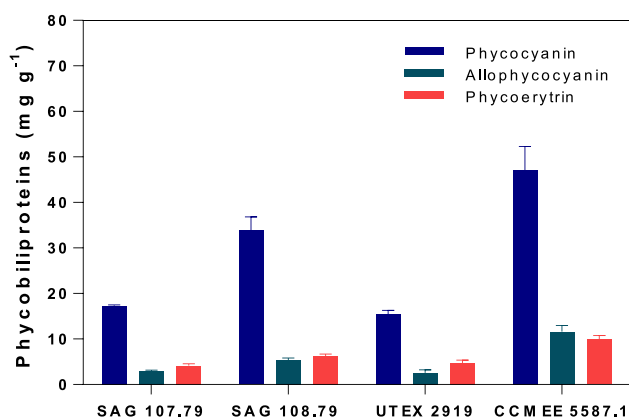


Fig. 5 Phycobiliprotein content of different *Galdieria sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions at time of maximum biomass concentration (t = 20 days)

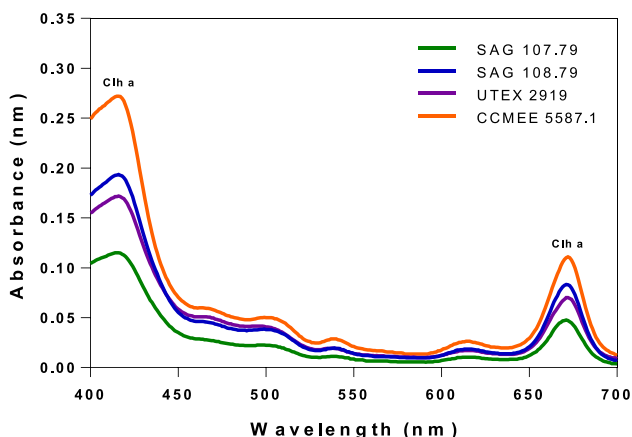


Fig. 6 Chlorophyll accumulation in different *Galdieria sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions at time of maximum biomass concentration (t = 20 days). Absorption spectrum of the pigments extracted with 90% acetone

are characteristic of chlorophyll *a* (Fig. 6). Despite having a high content of phycobiliproteins as part of the photon harvester complex, it also contains chlorophyll *a*, which acts as a reaction center in the photosystems involved in the light

phase of photosynthesis (Masojídek et al. 2007). Table 2 also shows the chlorophyll pigments extracted from the *G. sulphuraria* biomass, in which chlorophyll *a* was accumulated from 1.08 to 2.48 mg g⁻¹ with the highest value found in strain CCMEE 5587.1

Amino acid profile

Due to the extraction methodology (thermochemical hydrolysis) and analysis (HPLC) used in this research, some amino acids such as tryptophan, asparagine, and glutamine were not detectable, which suggests that it could be related to the detection limit of the technique or with the thermochemical treatment carried out for the hydrolysis of the analyzed biomass. Table 3 shows the amino acid profile (essential and non-essential) of four *G. sulphuraria* strains. It was clear that all strains had a similar amino acid profile with eight of the nine amino acids defined as essential and seven of nine non-essential amino acids.

Tryptophan is a primary, aromatic, and essential amino acid, whose biosynthesis in photosynthetic microorganisms (for example, diatoms) is closely related to the biosynthesis of other aromatic amino acids such as phenylalanine and tyrosine; chorismate is shared as a common precursor molecule (Bromke 2013). Various studies have shown that this amino acid may be found in small concentrations in the biomass of various genera of microalgae and corresponds to one of the amino acids in a lower percentage; thus, some studies have shown that it is not detectable (Chronakis and Madsen 2011; Tibbetts et al. 2015; Koyande et al. 2019). Likewise, some conditions for extracting proteins from microalgal biomass using acids and high temperatures (thermochemical conditions) can destroy tryptophan, and thus, tryptophan cannot be subsequently determined by traditional chromatographic methods (Barbarino and Lourenço 2005).

Glutamine and asparagine (non-essential amino acids) could not be quantified with our methodology. However, Salbitani and Carfagna (2020) measured three free amino acids (glutamine, glutamate, and asparagine) from wet biomass of *G. sulphuraria* strain 011 using 80% ethanol for

Table 3 Amino acid profile of different *Galdieria sulphuraria* strains cultivated under autotrophic growth conditions at time of maximum biomass concentration (t = 20 days)

| | Amino acid | <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 |
|----------------|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Essentials | | | | | |
| 1 | Threonine | 2.54 | 2.52 | 2.41 | 2.81 |
| 2 | Histidine | 2.92 | 2.74 | 2.67 | 2.37 |
| 3 | Valine | 1.43 | 1.32 | 1.36 | 1.54 |
| 4 | Methionine | 0.71 | 0.76 | 0.64 | 0.70 |
| 5 | Tryptophan | - | - | - | - |
| 6 | Phenylalanine | 1.58 | 1.55 | 1.46 | 1.57 |
| 7 | Isoleucine | 0.68 | 0.90 | 0.81 | 0.88 |
| 8 | Leucine | 2.64 | 2.65 | 2.67 | 2.71 |
| 9 | Lysine | 1.77 | 1.67 | 1.25 | 1.49 |
| Non-essentials | | | | | |
| 10 | Aspartate | 3.09 | 3.33 | 2.41 | 4.09 |
| 11 | Glutamate | 5.73 | 5.48 | 4.58 | 4.14 |
| 12 | Asparagine | - | - | - | - |
| 13 | Serine | 3.61 | 3.50 | 3.36 | 2.11 |
| 14 | Glutamine | - | - | - | - |
| 15 | Glycine | 3.14 | 3.04 | 2.75 | 2.57 |
| 16 | Arginine | 2.15 | 2.29 | 1.84 | 2.79 |
| 17 | Alanine | 3.03 | 2.76 | 2.03 | 2.45 |
| 18 | Tyrosine | 0.61 | 0.70 | 0.78 | 0.68 |

The reported values correspond to the percentage content (g of amino acid (100 g)⁻¹ biomass)

- No determinate

its extraction. Therefore, the protein present in the different strains evaluated here could contain these non-determinate amino acids.

Theoretical productivity projected for *Galdieria sulphuraria* cultures under autotrophic conditions

A theoretical calculation of annual productivity was performed to estimate the potential of *G. sulphuraria* to produce microalgal biomass with a high protein content. The projection was based on the productivities reached over

20 days using the CO₂ contained in air, pH 2, and temperature of 42 °C. The calculations were performed using two hypothetical open ponds with the following dimensions: 100 m × 50 m × 0.25 m (length, width, and liquid depth). The projections were made under two scenarios: (A) the productivity values are not affected by the scaling process and (B) 50% reduction in biomass productivity. The results showed that biomass and protein productivity values are 15.49–48.78 t_{DCW} ha⁻¹ year⁻¹ and 6.18–21.44 t_{proteins} ha⁻¹ year⁻¹, respectively, assuming a half reduction of the projected parameters (Table 4).

Table 4 Theoretical annual productivity projected for *Galdieria sulphuraria* cultures under autotrophic conditions (atmospheric CO₂) in two scenarios: (A) productivity values are not affected by scaling-up and (B) productivity values are reduced by 50%

| Strain | Projected parameter | Scenario A | Scenario B |
|---------------------------------------|---|------------|------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | Q_{DCW} (t _{DCW} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 30.99 | 15.49 |
| | $Q_{proteins}$ (t _{proteins} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 12.37 | 6.18 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | Q_{DCW} (t _{DCW} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 34.76 | 17.38 |
| | $Q_{proteins}$ (t _{proteins} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 15.10 | 7.55 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | Q_{DCW} (t _{DCW} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 44.81 | 22.40 |
| | $Q_{proteins}$ (t _{proteins} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 21.00 | 10.50 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | Q_{DCW} (t _{DCW} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 97.57 | 48.78 |
| | $Q_{proteins}$ (t _{proteins} ha ⁻¹ year ⁻¹) | 42.88 | 21.44 |

Projected productivity values of evaluated *G. sulphuraria* strains (Q_i) are shown for the following compounds (i): dry cell weight (DCW) and proteins. For these calculations, an annual cultivation of 335 days was assumed carried out in two ponds (100 m × 50 m × 0.25 m per pond)

Discussion

Galdieria sulphuraria CCMEE 5587.1 had better growth characteristics than SAG 21.92, SAG 107.79, SAG 108.79, and UTEX 2919. It offered the highest biomass concentration, the highest cell density, and the shortest doubling time. Comparing our results with those reported for *G. sulphuraria* 074 W strain (maximum biomass concentration of 1.1 g L^{-1} in 12 days under autotrophic conditions) (Sakurai et al. 2016), we observed that strain *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 had a 25% higher DCW with a value of 1.37 g L^{-1} in the same elapsed culture time.

The maximum biomass concentration and the macromolecular content (proteins, carbohydrates, and lipids) are essential criteria to evaluate the potential of microorganisms to produce high-value metabolites. However, this parameter alone is an inadequate measure to make a correct choice of a useful strain for large-scale industrial applications where several parameters must be considered, e.g., productivity (Maroneze et al. 2016). The biomass productivity determination throughout the culture also allows us to show the time in which the maximum productivity is reached and therefore decrease the cultivation time. Here, the maximum biomass productivity of *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 was reached on day 14. Doubling time and protein productivity values obtained for this strain, together with the advantages to growth at acidic pH, can be used to design repeated batch, fed-batch, and semicontinuous or continuous cultures at pilot plant aiming to test the technical feasibility to scale-up the culture process for protein production using *G. sulphuraria*.

All strains exhibit a high protein content (above 40% for most strains), which shows the potential of this microalgal biomass to produce SCP as a potential food or feed. The protein values achieved with this microorganism compare favorably with the reported content of some vegetables used as protein source in the food and feed industry such as soybean flour (*Glycine max*) whose percentage yield is ~36% and is considered a source of protein (Koyande et al. 2019). Likewise, the protein content in this current study is higher than that of other red microalga such as *Porphyridium marinum* with a content of 15.4% (Ben Hlima et al. 2019), *Porphyridium cruentum* at 28.0–39.0% (Becker 2007), and *Porphyridium purpureum* with 15.1% (Assunção et al. 2017). These were also measured under autotrophic conditions. Since microalgal biomass destined for food or feed is normally supplied as a supplement in diets, it is important to consider the entire biomass. In addition to the high protein content that we observed in the *G. sulphuraria* biomass, there are other types of macromolecules present such as lipids and carbohydrates that collectively provide good nutritional characteristics to the generated biomass (Koyande et al. 2019).

The presence of phycobiliproteins and chlorophyll in the biomass of *G. sulphuraria* provides a nutraceutical value added to the microalgal biomass obtained in this work using only the CO_2 content in the air. Phycocyanin has nutraceutical activities related to a decrease in blood pressure (anti-hypertensive activity), free radicals and reactive oxygen species (antioxidant activity), inflammatory processes (anti-inflammatory activity), and proliferation of uncontrolled cellular processes (anticancer activity) (Abd El-Hack et al. 2019; Chandra et al. 2020; Lafarga et al. 2020). In addition, chlorophyll provides anticarcinogenic, antioxidant, and antigenotoxic properties. It is an effective nutraceutical for liver illnesses (Bishop and Zubeck 2012; García et al. 2017; Koyande et al. 2019).

Phycocyanin is currently a commercially valuable molecule obtained from photoautotrophic cultures with cyanobacteria such as *Arthrospira (Spirulina) platensis*. For this microorganism, contents of 56.6 mg g^{-1} (Manirafasha et al. 2018), 148.1 mg g^{-1} (Ajayan et al. 2012), and 160 mg g^{-1} (Xie et al. 2015) have been reached, which are 1.2 to 3.4 times higher than those reported in our study with the strain CCMEE 5587.1 (47 mg g^{-1}) (Table 2), indicating that further research is needed to maximize phycocyanin production with several *G. sulphuraria* strains. It is worth mentioning that one of the main advantages of the phycocyanin synthesized by *G. sulphuraria* is its thermostability at $60 \text{ }^\circ\text{C}$, unlike that reported for phycocyanin from *Spirulina* sp., with stability at temperatures below $47 \text{ }^\circ\text{C}$ (Moon et al. 2014).

Regarding the quality of the protein obtained, the amino acid profile showed that the generated biomass has most essential amino acids. The amino acid profile or amino acid score is a fundamental parameter for the evaluation of protein quality especially protein destined for human and animal consumption (Vanthoor-Koopmans et al. 2013). This protein should preferably contain all or most of the essential amino acids (Koyande et al. 2019). The presence of some amino acids such as methionine and lysine increases the growth rate in broiler chickens (Lima et al. 2008; Vanthoor-Koopmans et al. 2013).

Assuming a straightforward scale-up using strain CCMEE 5587.1 in open ponds and that half of the protein productivities obtained in the laboratory can be reached, a productivity of $21 \text{ t}_{\text{proteins}} \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ could be attained. This value compares favorably with the productivities reported for soybean in Brazil and the USA (main soybean producing countries in the world): 2019–2020 were 1.36 and $1.27 \text{ t}_{\text{proteins}} \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$, respectively (estimated values based on protein content of 40%) (Embrapa 2021). This hypothetical productivity with *G. sulphuraria* is 15.4 to 16.5 times higher than that obtained with this legume. Additionally, one of the main advantages that the cultivation of microalgae presents compared to the cultivation of terrestrial plants is that the cultivation of microalgae does not require the use of

agricultural land and therefore does not compete with food or feed production (Benedetti et al. 2018).

The main problem associated with the use of microalgae, especially in open ponds, is the high probability of contamination with other microorganisms. This is one of the most important factors affecting microalgae growth and decreases the productivity of metabolites of interest. Therefore, one of the most effective strategies to counteract this problem is to use extremophilic microalgae species in extreme cultivation conditions and growing in simple mineral media. *Galdieria sulphuraria* is classified as extremophilic because it could survive in acidic environments with pH values 0–4 (acidophilic) and at temperatures above 40 °C (thermotolerant) (Martinez-Garcia and van der Maarel 2016). Cultivation conditions used for *G. sulphuraria* also promotes a synergism between the low pH of the culture medium, irradiance, high temperature, and dissolved oxygen (DO), which leads to the appearance of reactive oxygen species (ROS) and a potential negative effect on the growth of contaminating microorganisms (Munasinghe-Arachchige et al. 2019). Finally, temperature control in the microalgae cultivation in open ponds continues to be one of the main technological challenges to implement. In this sense, *G. sulphuraria* can grow adequately in reactors exposed to sunlight and natural temperature variations from 24 to 50 °C (Henkanatte-Gedera et al. 2017).

Conclusions

We produce *G. sulphuraria* microalgal biomass with high protein content under phototrophic conditions and using the CO₂ content in air. Due to the thermoacidophile conditions, the biomass is free of microbial contamination and suitable for scale-up. Finally, the resulting biomass has a high potential to produce single-cell protein as the result of the biochemical analysis of this red microalga. This biomass composition is suitable for food or feed purposes, but nutritional tests must still be done. Among the five different tested strains, *G. sulphuraria* CCME 5587.1 is proposed as the most appropriate strain for scale-up because it has the highest biomass productivity and the highest percentage content of phycocyanin and chlorophyll as well as a protein and lipid content higher than 40% and 14%, respectively.

Acknowledgements The authors thank Mario A. Caro-Bermudez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Roberto Pablo Rodríguez Bahena, and Leonardo Peña-Carranza for technical support. Algae strains were obtained from the University of Göttingen, Germany (SAG 107.79, SAG 108.79, and SAG 21.92); Algae Culture Collection of the University of Texas, USA (UTEX 2919); and the Microbial Collection of Extreme Environments of the University of Oregon, USA (CCME 5587.1). CAMH held a scholarship from CONACyT – Mexico (699699).

Author contribution CAM-H and AM, conception and design of the study and manuscript drafting and editing. CAM-H, cultivation of microalgae, biochemical composition analyses, and data analysis. AM, project administration and funding acquisition. All the authors (CAM-H, FV-LP, GTH-C, and AM) participated in data analyses, discussion of results, and writing and revising the manuscript.

Funding This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) – Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Grant PAPIIT-DGAPA-UNAM IT201119.

Data availability All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Abd El-Hack ME, Abdelnour S, Alagawany M, Abdo M, Sakr MA, Khafaga AF, Mahgoub SA, Elnesr SS, Gebriel MG (2019) Microalgae in modern cancer therapy: current knowledge. *Biomed Pharmacother* 111:42–50
- Ajayan KV, Selvaraju M, Thirugnanamoorthy K (2012) Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: an in-vitro study. *Biomass Bioenerg* 47:436–441
- Assunção MFG, Varejão JMTB, Santos LMA (2017) Nutritional characterization of the microalga *Ruttenella lamellosa* compared to *Porphyridium purpureum*. *Algal Res* 26:8–14
- Bajpai R, Zappi M, Dufreche S, Subramaniam R, Prokop A (2014) Status of algae as vehicles for commercial production of fuels and chemicals. In: Bajpai R, Prokop A, Zappi M (eds) *Algal Biorefineries, vol 1. Cultivation of Cells and Products*. Springer, Dordrecht, pp 3–24
- Barbarino E, Lourenço SO (2005) An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *J Appl Phycol* 17:447–460
- Becker EW (2007) Microalgae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25:207–210
- Ben Hlima H, Dammak M, Karkouch N et al (2019) Optimal cultivation towards enhanced biomass and floridean starch production by *Porphyridium marinum*. *Int J Biol Macromol* 129:152–161
- Benedetti M, Vecchi V, Barera S, Dall’Osto L (2018) Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb Cell Fact* 17:173
- Bishop W, Zubeck H (2012) Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *J Nutr Food Sci* 02:
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
- Brányiková I, Maršálková B, Doucha J, Brányik T, Bišova K, Zachleder V, Vítova M (2011) Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnol Bioeng* 108:766–776
- Bromke MA (2013) Amino acid biosynthesis pathways in diatoms. *Metabolites* 3:294–311
- Chandra P, Sharma RK, Arora DS (2020) Antioxidant compounds from microbial sources: a review. *Food Res Int* 129:108849
- Chronakis IS, Madsen M (2011) Algal proteins. In: Phillips GO, Williams PA (eds) *Handbook of Food Proteins*. Woodhead Publishing, London, pp 353–394

- Embrapa (2021) Soja em números (safra 2019/20). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Accessed 2 June 2021
- Ford TW (1979) Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from the thermophilic, acidophilic alga, *Cyanidium caldarium* (Geitler): purification, characterisation and thermostability of the enzyme. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* 569:239–248
- Gaignard C, Gargouch N, Dubessay P, Delattre C, Pierre G, Laroche C, Fendri I, Abdelkaf S, Michaud P (2019) New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol Adv* 37:193–222
- García JL, de Vicente M, Galán B (2017) Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb Biotechnol* 10:1017–1024
- García-Garibay M, Gómez-Ruiz L, Cruz-Guerrero AE, Bárzana E (2014) Single cell protein Yeasts and Bacteria. *Encycl Food Microbiol* 431–438
- Garibay-Hernández A, Vazquez-Duhalt R, Serrano-Carreón L, Martínez A (2013) Nitrogen limitation in *Neochloris oleoabundans*: a reassessment of its effect on cell growth and biochemical composition. *Appl Biochem Biotechnol* 171:1775–1791
- Graziani G, Schiavo S, Nicolai MA, 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 Funct* 4:144–152
- Gross W, Schnarrenberger C (1995) Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol* 36:633–638
- Henderson JW, Ricker RD, Bidlingmeyer BA, Woodward C (2000) Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Agilent Technologies. Application note No. 5980–1193E
- Henkanatte-Gedera SM, Selvaratnam T, Karbakhsharavari M, Myint M, Nirmalakhandan N, Van Voorhies W, Lammers PJ (2017) Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by *Galdieria sulphuraria*: laboratory to field scale demonstration. *Algal Res* 24:450–456
- Koller M, Muhr A, Brauneegg G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res* 6:52–63
- Koyande AK, Chew KW, Rambabu K, Tao Y, Chu DT, Show PL (2019) Microalgae: a potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci Hum Wellness* 8:16–24
- Kursar TA, Alberte RS (1983) Photosynthetic unit organization in a red alga : relationships between light-harvesting pigments and reaction centers. *Plant Physiol* 72:409–414
- Lafarga T, Fernández-Sevilla JM, González-López C, Ación-Fernández FG (2020) Spirulina for the food and functional food industries. *Food Res Int* 137:109356
- Lima LMB, Lara LJC, Baiao NC, Cancado SD, Michell BC, Ferreira FC (2008) Effect of energy, lysine and methionine and cystine levels on performance and carcass yield of broiler chickens. *Braz J Anim Sci* 37:1424–1432
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Malavasi V, Soru S, Cao G (2020) Extremophile microalgae: the potential for biotechnological application. *J Phycol* 56:559–573
- Manirafasha E, Murwanashyaka T, Ndikubwimana T, Ahmed NR, Liu J, Lu Y, Zeng X, Ling X, Jing K (2018) Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresour Technol* 255:293–301
- Maroneze MM, Siqueira SF, Vendruscolo RG, Wagner R, Ragagnin-de-Menezes C, Queiroz-Zepka L, Jacob-Lopes E (2016) The role of photoperiods on photobioreactors – a potential strategy to reduce costs. *Bioresour Technol* 219:493–499
- Martinez-Garcia M, van der Maarel MJEC (2016) Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express* 6:71
- Martinez-Garcia M, Stuart MCA, van der Maarel MJE (2016) Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens. *Int J Biol Macromol* 89:12–18
- Martinez-Garcia M, Kormpa A, van der Maarel MJEC (2017) The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydr Polym* 169:75–82
- Masojidek J, Torzillo G, Koblížek M (2007) Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley Blackwell, Oxford, pp 20–39
- Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Park MS, Yang JW (2014) Isolation and characterization of the thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean J Chem Eng* 31:490–495
- Munasinghe-Arachchige SP, Delanka-Pedige HMK, Henkanatte-Gedera SM, Tchinda D, Zhang Y, Nirmalakhandan NM (2019) Factors contributing to bacteria inactivation in the *Galdieria sulphuraria*-based wastewater treatment system. *Algal Res* 38:101392
- Najafpour GD (2007) Single-cell protein. In: Najafpour GD (ed) *Biochem Eng Biotechnol*. Elsevier Science, New York, pp 332–341
- Nalage DN, Khedkar GD, Kalyankar AD, Sarkate AP (2016) Single cell proteins. *Encycl Food Heal* 790–794
- Oesterhelt C, Schmälzlin E, Schmitt JM, Lokstein H (2007) Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant J* 51:500–511
- Pade N, Linka N, Ruth W, Weber APM, Hagemann M (2015) Floridoside and isofloridoside are synthesized by trehalose 6-phosphate synthase-like enzymes in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *New Phytol* 205:1227–1238
- Price CA (1965) A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. *Anal Biochem* 12:213–218
- Ritchie RJ (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 89:27–41
- Sakurai T, Aoki M, Ju X, Ueda T, Nakamura Y, Fujiwara S, Umemura T, Tsuzuki M, Minoda A (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour Technol* 200:861–866
- Salbitani G, Carfagna S (2020) Different behaviour between autotrophic and heterotrophic *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) cells to nitrogen starvation and restoration. Impact on pigment and free amino acid contents. *Int J Plant Biol* 11:7–11
- Sheath RG, Vis ML (2015) Red Algae. In: Wehr JD, Sheath RG, Kociolek JP (eds) *Freshwater algae of North America*, 2nd edn. Academic Press, Boston, pp 237–264
- Slocombe SP, Ross M, Thomas N, McNeill S, Stanley MS (2013) A rapid and general method for measurement of protein in microalgal biomass. *Bioresour Technol* 129:51–57
- Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP (2015) Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *J Appl Phycol* 27:1109–1119
- Vanthoor-Koopmans M, Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM (2013) Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour Technol* 135:142–149
- Varshney P, Mikulic P, Vonshak A, Beardall J, Wangikara PP (2015) Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresour Technol* 184:363–372
- 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*. *Bioresour Technol* 218:272–278
- Xie Y, Jin Y, Zeng X, Chen J, Lu Y, Jing K (2015) Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresour Technol* 180:281–287

Poliglucanos de reserva en microalgas: química, biosíntesis y manipulación de condiciones de cultivo

Carlos Montenegro-Herrera*, Mariana Manzoni Maroneze, Francisco Vera-López Portillo, Alfredo Martínez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62200, México

carlos.montenegro@ibt.unam.mx

Resumen

En la actualidad, las microalgas se usan como fuentes en la producción de diferentes compuestos comerciales de valor agregado, por ejemplo: pigmentos (β -carotenoides, clorofila, ficobiliproteínas) y lípidos (ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs), y en algunos casos la propia biomasa microalgal. Sin embargo, se ha centrado poca atención en el estudio de los azúcares de reserva (poliglucanos) que pueden llegar a acumular las microalgas bajo condiciones específicas de cultivo. Desde el punto de vista de una biorrefinería, la biomasa microalgal presenta el potencial para el aprovechamiento de las diferentes macromoléculas que la conforman, tales como pigmentos, proteínas, lípidos y carbohidratos, siendo éstos últimos una materia prima susceptible a ser utilizada como fuente de carbono (biomasa de tercera generación), para la obtención, por vía fermentativa, de productos de interés industrial como ácidos orgánicos y biocombustibles. En este sentido, el objetivo de este trabajo es revisar los principales carbohidratos de reserva presentes en las microalgas, abordando sus características estructurales, la biosíntesis y las principales estrategias utilizadas en los cultivos para incrementar el contenido de dichos compuestos.

Palabras clave: Microalga, compuesto de reserva, poliglucano.

Abstract

Currently, microalgae are used to produce different high-value commercial compounds, i.e., pigments (β -carotenoids, chlorophyll, phycobiliproteins), and lipids (polyunsaturated fatty acids-PUFAs), and the biomass itself. However, little attention has been focused on the study of reserve carbohydrates (polyglucans), which microalgae can accumulate under specific cultivation conditions. From a biorefinery perspective, microalgal biomass has the potential to be used as a source of several macromolecules, such as pigments, proteins, lipids, and carbohydrates. Among them, polyglucans can be used as a raw material to generate monosaccharides, that can be fermented to several products, including organic acids and biofuels, in the so called third generation biomass and biorefinery concepts. In this sense, the objective of this report is to review the main reserve carbohydrates stored in microalgae, addressing the structural characteristics, biosynthesis, and the main strategies used in the cultivation conditions to increase these storage compounds.

Key words: Microalgae, storage compound, polyglucan.

Carbohidratos presentes en microalgas

En los últimos años, la investigación con microalgas para aplicaciones biotecnológicas se ha incrementado sustancialmente y ha cobrado gran importancia debido a la capacidad de utilizar la energía solar para fijar el dióxido de carbono (CO_2) atmosférico, mediante la fotosíntesis (Masojídek et al., 2007), y en consecuencia ayudar a mitigar algunas causas que han originado el cambio climático mediante la captura de CO_2 . Además, potencialmente la productividad de biomasa microalgal y otros compuestos como pigmentos, lípidos, proteínas y carbohidratos de reserva, son más altas que las obtenidas con plantas terrestres (Bajpai et al., 2014). Así mismo, debido a la posibilidad de llevar a cabo el cultivo de estos microorganismos sin hacer uso de suelo agrícola, se hace evidente el potencial que presentan para la producción de diferentes metabolitos y productos químicos de interés, incluyendo carbohidratos de reserva, sin competir con la producción de alimentos en suelo agrícola. Las microalgas son materias primas prometedoras en la producción sostenible de biocombustibles y productos químicos valiosos. La investigación en microalgas no solo se centra en mejorar la generación de productos, sino también en la obtención de nuevos compuestos de interés, en donde la materia prima para biorrefinar estos compuestos es la biomasa microalgal, llevando a cabo cultivos en condiciones controladas de crecimiento (Perez-García & Bashan, 2015).

Las biorrefinerías de microalgas tienen el potencial de producir compuestos químicos de interés para su uso en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica, química,

cosmética y bioenergética. En los tres últimos lustros, la producción de biodiesel a partir de lípidos obtenidos de microalgas es una de las alternativas más estudiadas en lo que respecta a la producción de bioenergía (Cesário et al., 2018). Otra opción es la utilización de los carbohidratos de reserva de las microalgas como materia prima para la fermentación microbiana, mediante la cual se abre la posibilidad de producir una gama amplia de productos químicos (p. ej., aminoácidos o ácidos orgánicos) y biocombustibles (p. ej. bioetanol y biobutanol) que actualmente son producidos por vía fermentativa haciendo uso de levaduras o bacterias (Mayers et al., 2018).

Estructura de los glucanos de reserva

En las células de microalgas los carbohidratos se pueden encontrar en la pared celular externa (pectina, agar y alginato), la pared celular interna (celulosa y hemicelulosa) y dentro de la célula como productos de almacenamiento (por ejemplo, almidón y glucógeno) (Martín-Juárez et al., 2017). Respecto a los glucanos de almacenamiento o de reserva, éstos corresponden a polímeros de glucosa y se pueden clasificar en alfa-glucanos o beta-glucanos teniendo en cuenta el tipo de enlace glicosídico (enlace entre dos grupos funcionales hidroxilo) que presenten las subunidades monoméricas del polímero (Al Abdallah et al., 2016): alfa (α) si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte inferior del carbono anomérico; o beta (β), si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte superior del carbono anomérico (figura 1).

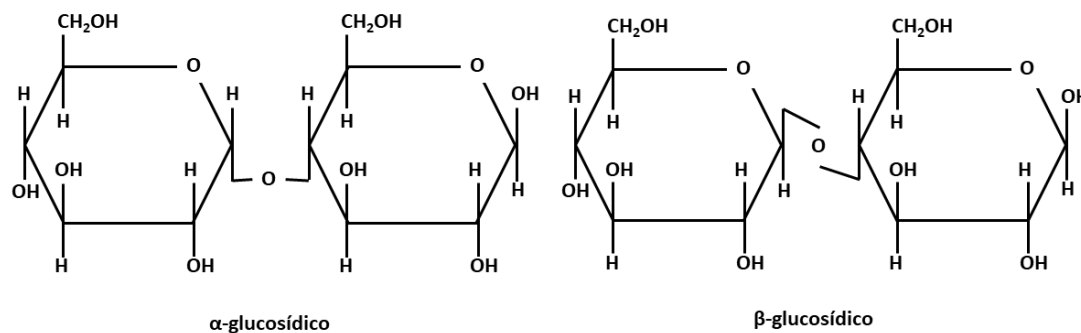


Figura 1. Representación esquemática de los enlaces α -glucosídico y β -glucosídico presentes en los glucanos de reserva (adaptado de Blanco y Blanco 2017).

Alfa-glucanos

La síntesis de alfa-glucanos es única para el subgrupo Archaeplastida, el cual incluye: 1) algas verdes y plantas terrestres (Chloroplastida), las cuales sintetizan almidón, 2) las algas rojas (Rhodophyceae) que sintetizan un tipo de almidón carente de amilosa, también llamado almidón florideo (similar al glucógeno y a la amilopectina), y un grupo menor llamado 3) Glaucophytes, los cuales acumulan polímeros de glucosa en forma de glucógeno. La característica más notable es que en las plantas terrestres y algas verdes la síntesis de almidón se lleva a cabo al interior de los plástidos, mientras que en las algas rojas y en los Glaucophytes la síntesis del polímero de reserva se produce en el citosol (Ball et al., 2011; Busi et al., 2014) (tabla 1).

El almidón, el almidón florideo y el glucógeno corresponden a polímeros de glucosa con una cadena principal lineal de

unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1-4) y ramificaciones unidas en ciertos puntos a través de enlaces α -(1-6) (Ball et al., 2011) (figura 2). El glucógeno y la amilopectina difieren en el porcentaje y la distribución de las ramificaciones, lo cual afecta la estructura y las propiedades de la molécula. El almidón está compuesto por dos tipos de polímeros: amilosa (30%), prácticamente sin ramificaciones, y amilopectina (70%), el cual presenta un 5-6% de ramificaciones (enlaces α -(1-6)) distribuidas de forma no aleatoria. Las regiones ramificadas están dispuestas en grupos separados por regiones lineales, lo que lleva a la aparición de secciones cristalinas y la formación de gránulos de almidón. El glucógeno y el almidón florideo contienen cadenas lineales más cortas en comparación con la amilopectina y un mayor número de puntos de ramificación. El grado de ramificación del glucógeno depende de su fuente y varía del 7 al 13% (Martinez-Garcia et al. 2016).

Tabla 1. Poliglucanos de reserva sintetizados por los principales grupos taxonómicos de microalgas (adaptado de Al Abdallah et al., 2016)

| Polímero | Monómero | Enlaces glucosídicos | Ubicación celular | Grupo taxonómico |
|-------------------------------------|----------|--|-------------------|---|
| Almidón | | | | |
| Amilosa (30%) Amilopectina (70%) | Glucosa | α -(1-4) α -(1-4) y α -(1-6) | Cloroplasto | Chlorophyta |
| Almidón Florideo | Glucosa | α -(1-4) y α -(1-6) | Citosol | Rhodophyta |
| Glucógeno | Glucosa | α -(1-4) y α -(1-6) | Citosol | Cyanophyta |
| Laminarina | Glucosa | β -(1-3) y β -(1-6) | Citosol | Phaeophyceae |
| Crisolaminarina | Glucosa | β -(1-3) y β -(1-6) | Citosol | Bacillariophyceae Xanthophyceae Chrysophyceae Haptophyta Chlorarachniophyta |
| Paramilon | Glucosa | β -(1-3) | Citosol | Euglenophyta |

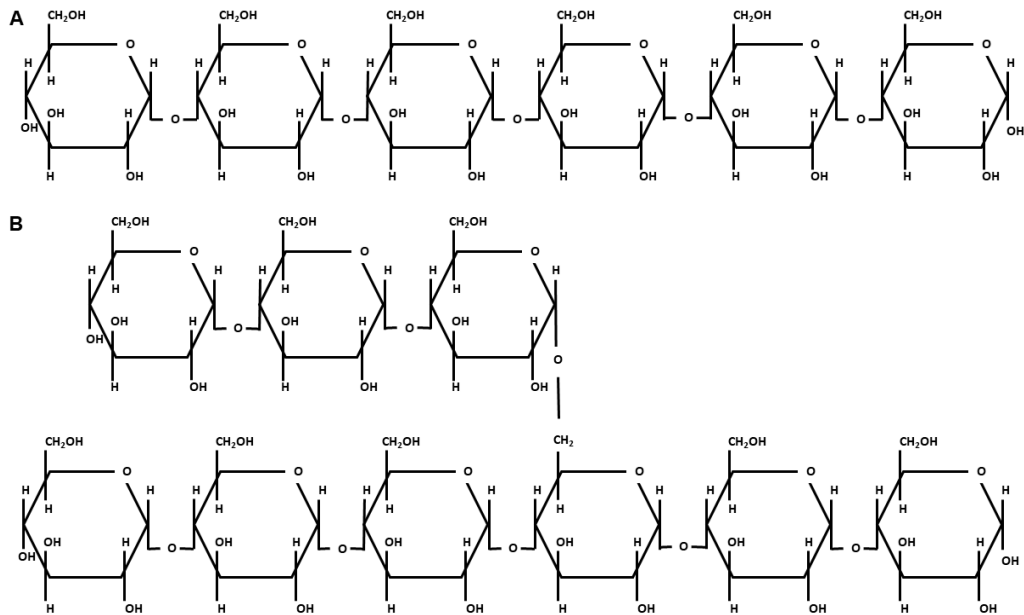


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de los principales alfa-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal de la amilosa. B. Estructura lineal y ramificada de la amilopectina, almidón florideo y glucógeno (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

Beta-glucanos

Respecto a la síntesis de beta-glucanos de reserva en microorganismos fotosintéticos, ésta es llevada a cabo por algas pertenecientes a los grupos Phaeophyceae (algas pardas), Bacillariophyceae (diatomeas) y Euglenophyta, los cuales acumulan en el citosol laminarina, crisolaminarina (similar a la laminarina) y paramilon (Al Abdallah et al., 2016). Los anteriores β -glucanos, corresponden a polímeros lineales de glucosa unidos por enlaces β -(1-3) y con ramificaciones β -(1-6) cada 20-25 unidades de glucosa (figura 3), con diferentes terminaciones reductoras que pueden tener residuos de manitol o glucosa (Stone, 2009; Mišurcová et al., 2012; Délérís et al., 2016). Las principales diferencias estructurales entre la laminarina y la crisolaminarina se deben a la relación de enlaces β -(1-3) : β -(1-6), la cual es de 15:1 y 11:1, respectivamente (Al Abdallah et al. 2016), y a la presencia de glucosa y manitol en el extremo reductor en los polímeros de laminarina, a diferencia de la crisolaminarina que únicamente presenta glucosa en el extremo reductor. En cuanto al paramilon, difiere estructuralmente de los otros dos β -glucanos al carecer de

ramificaciones y presentar únicamente una cadena lineal de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces β -(1-3) (Al Abdallah et al. 2016).

Biosíntesis de los glucanos de reserva en microalgas

Fijación del CO₂

Al ser microorganismos fotosintéticos, el primer paso es la fijación de CO₂ (carbono inorgánico) y su conversión en esqueletos carbonados (carbono orgánico). Durante la fotosíntesis, las microalgas producen monosacáridos, los cuales se usan como fuente de carbono y energía para la producción de otras macromoléculas (Masojídek et al. 2007). La fotosíntesis se divide en dos fases: la fase luminosa, en la cual se genera energía ATP, NADPH y oxígeno a partir de luz y agua, y la fase de oscuridad, en la cual se emplea la energía generada en la fase anterior para fijar CO₂ a través del ciclo de Calvin-Benson mediante la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) en el cloroplasto (Maia et al., 2020). El producto

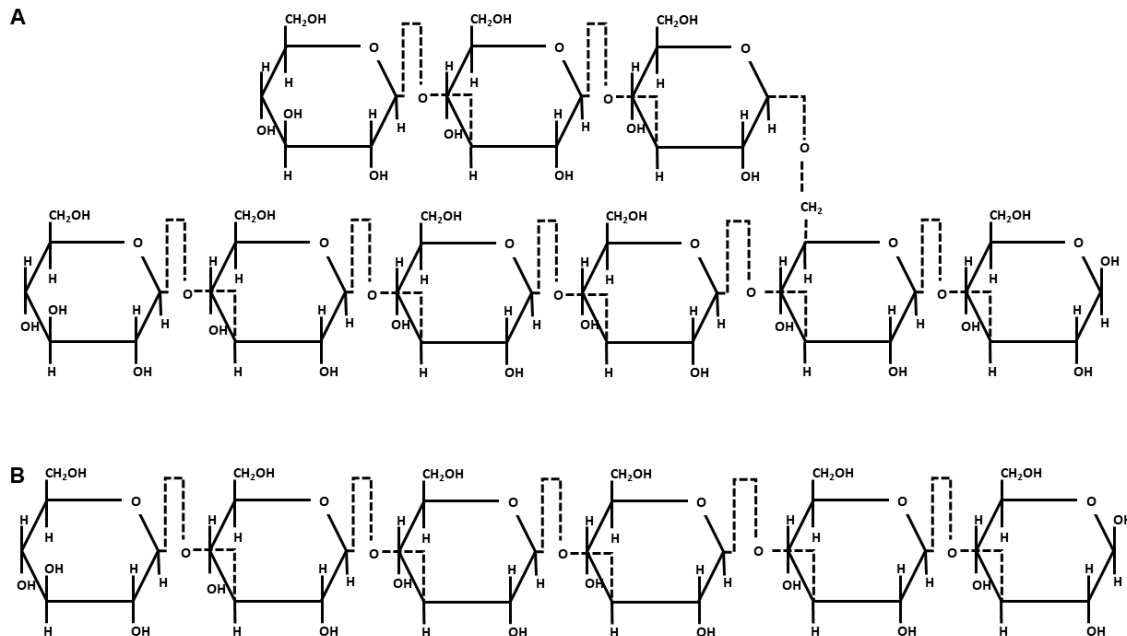


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química de los principales beta-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal y ramificada de la laminarina y crisolaminarina. B. Estructura lineal del paramillon (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

final de la fotosíntesis es un metabolito de 3 carbonos (gliceraldehído-3-fosfato; GAP), que posteriormente es exportado al citosol. El GAP se sitúa en el centro del metabolismo de azúcares, el cual se divide en gluconeogénesis y glucólisis. La gluconeogénesis genera glucosa 6-fosfato (G6P), que luego se invierte en la síntesis de carbohidratos o en la ruta de las pentosas fosfato para la generación de poder reductor (NADPH). La glucólisis genera fosfoenolpiruvato (PEP), que luego se utiliza en la síntesis de lípidos o en el ciclo del ácido cítrico, en el cual se producen metabolitos intermedios necesarios para la síntesis de biomasa. Los cofactores (FADH, NADH) generados por el ciclo del ácido cítrico se transforman en energía (ATP) gracias a la fosforilación oxidativa (Baroukh et al. 2014).

Cuando la intensidad de luz es demasiado alta o cuando el suministro de nutrientes inorgánicos es limitado (por ejemplo, estrés de nitrógeno), la tasa de producción de glucosa durante la fotosíntesis puede exceder la tasa de consumo de glucosa por la célula. Este exceso no se puede almacenar como glucosa debido a la alteración del equilibrio osmótico de la célula.

Por lo tanto, la glucosa sobreproducida se convierte en polisacáridos o en lípidos, que actuarán como reservorio de carbono y energía para su futuro uso. Debido a que la conversión de glucosa en polisacáridos es mucho más rápida que en lípidos, las microalgas a menudo primero acumulan carbohidratos y posteriormente lípidos (Martín-Juárez et al., 2017).

Síntesis de alfa-glucanos en microalgas

La síntesis de poliglucanos de reserva en algas rojas procede a través de una UDP-glucosa-selectiva α -glucano sintasa, en analogía con la ruta citosólica de la síntesis de glucógeno en otros eucariotas (Viola et al., 2001; Ball et al., 2011), mientras que la biosíntesis de almidón en el caso de las algas verdes procede a través de una ADP-glucosa selectiva α -glucano sintasa, al igual que las plantas terrestres (Busi et al., 2014).

De forma general la síntesis de carbohidratos de reserva (glucógeno y almidón) está mediada por tres pasos: activación del sustrato, elongación de la cadena principal y ramificación de la cadena (Busi et al., 2014). La activación del sustrato se lleva a cabo mediante la enzima UDP/ADP-

glucosa-pirofosforilasa, la cual se encarga de catalizar la conversión de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa o ADP-glucosa. Posteriormente, la elongación de la cadena principal y formación del maltooligosacárido (MOS) (Ran et al., 2019) se encuentra mediada por una enzima glucosiltransferasa o α -glucano sintasa selectiva (glucógeno-sintasa o almidón-sintasa), que transfiere una unidad de azúcar activada a un grupo hidroxilo de azúcar no reductor, generándose un enlace glucosídico α -(1-4) entre el carbono 1 del grupo glucosilo que entra y el carbono 4 del residuo de glucosa del extremo no reductor de la cadena polimérica existente o del cebador. En este punto, la síntesis de alfa-glucanos se divide en dos caminos, en donde, por un lado, continua la elongación y obtención de cadenas lineales, para la formación de

amilosa, mediante la enzima almidón-sintasa ligada al gránulo, y por el otro, se lleva a cabo la formación de glucanos ramificados (amilopectina, almidón florideo y glucógeno). La ramificación de la cadena procede a través de la enzima ramificante o amilo-(1,4-1,6)-transglucosilasa, la cual transfiere un fragmento terminal de unidades de glucosa unidas por un enlace α -(1-4) a un grupo hidroxilo situado en la posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero, generándose dos extremos no reductores para que continúe la elongación de la cadena (Mathews et al., 2005; Ball et al., 2011; Busi et al., 2014). La actividad catalítica conjunta de las enzimas almidón/glucógeno sintasa y ramificante conllevan a la aparición de polisacáridos solubles en agua (WSP), los cuales aumentan de tamaño conforme se

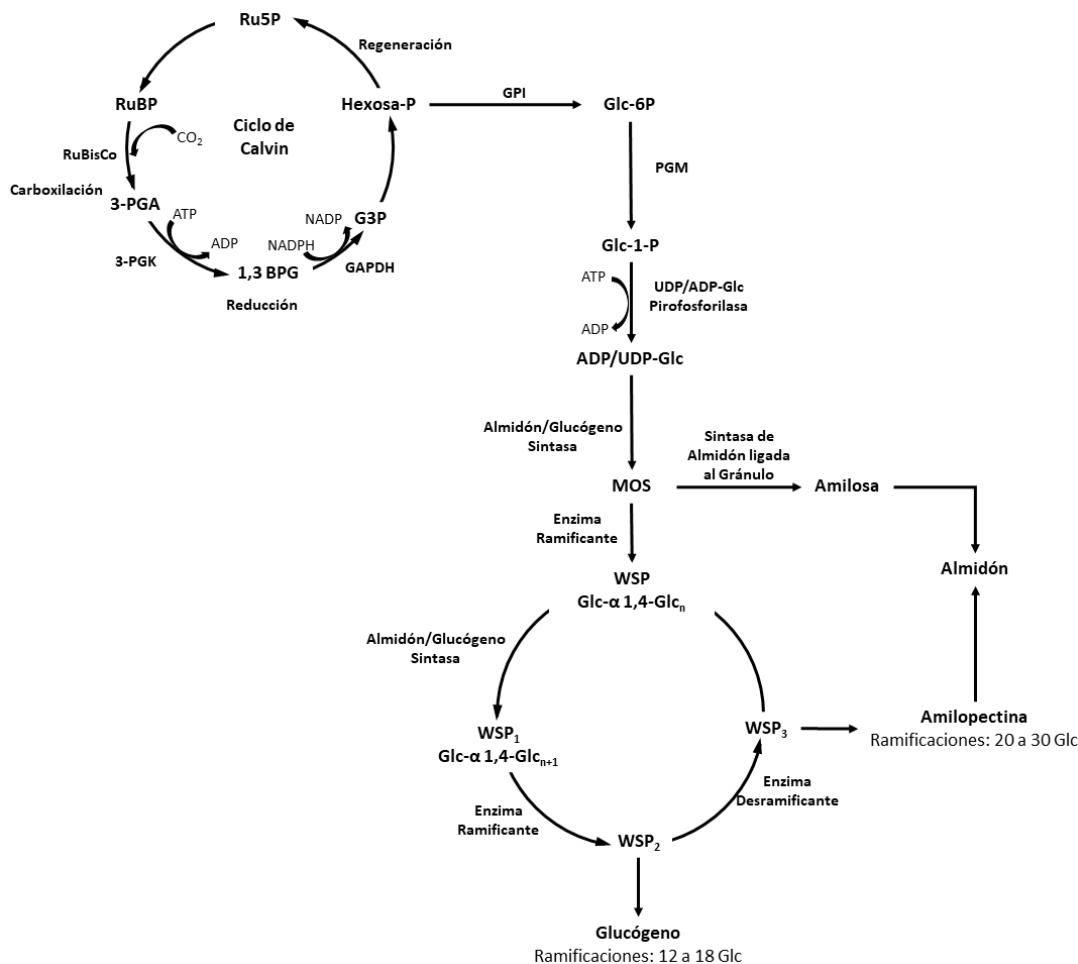


Figura 4. Vía de síntesis de los principales alfa-glucanos de reserva (glucógeno y almidón) acumulados en microalgas (adaptado de Ran et al., 2019). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bifosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-fosfoglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bifosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehido-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglucoasa isomerasa, Glc6P: glucosa-6-fosfato, PGM: fosfoglucomutasa, Glc1P: glucosa-1-fosfato, UDP: uridina difosfato, ADP: adenosín difosfato, MOS: maltooligosacárido, WSP: polisacáridos solubles en agua.

siguen agregando monosacáridos de glucosa a los extremos reductores y se siguen ramificando hasta obtener finalmente un α -poliglucano como el glucógeno o el almidón florideo (Ran et al., 2019). En plantas superiores y algas verdes, una enzima desramificante (isoamilasa) interviene en la formación del polímero ramificado (amilopectina), la cual se encarga de controlar el espaciado entre las ramificaciones y por ende favorecer la estructura cristalina característica de los gránulos de almidón (Busi et al. 2014; Powell et al. 2015). La posición de las ramificaciones corresponde a una de las principales diferencias entre el glucógeno y la amilopectina, ya que en el caso del glucógeno las ramificaciones se dan cada 12 ó 18 unidades de glucosa y en la amilopectina se dan cada 20 ó 30 unidades de glucosa (Mathews et al., 2005).

Síntesis de beta-glucanos en microalgas

Respecto a la síntesis y acumulación de beta-poliglucanos en microalgas, la ruta anabólica implicada en dicho proceso aún no se encuentra bien descrita. Sin embargo, para especies como *Euglena gracilis* se conoce que la ruta citosólica de la síntesis de paramilon, análoga a la ruta biosintética de glucógeno, inicia con la activación del sustrato Glc-1-P, el cual es convertido en UDP-Glc por la enzima UDP-Glc pirofosforilasa. Una vez obtenido el sustrato activador (UDP-Glc), la enzima glucosiltransferasa, conocida como paramilon sintasa, se encarga de llevar a cabo la elongación de las cadenas poliméricas mediante la formación de enlaces β -(1-3) glucosídicos entre las subunidades monoméricas, obteniendo de forma inicial un polímero β -(1-3)-glucano insoluble, que da lugar a formación del gránulo citoplasmático (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021).

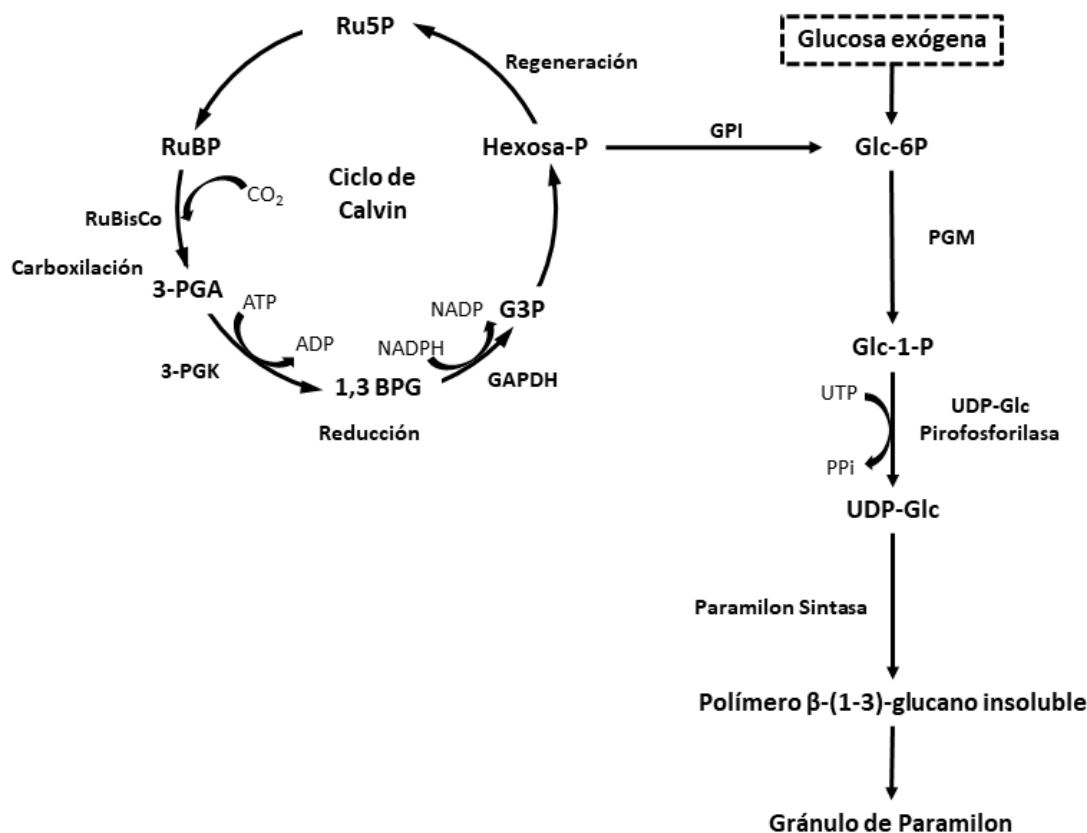


Figura 5. Vía de síntesis de beta-glucanos de reserva (Paramilon) acumulados en microalgas. (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-foglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bisfosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehido-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglucosa isomerasa, Glc6P: glucosa-6-fosfato, PGM: fosfoglucomutasa, Glc1P: glucosa-1-fosfato, UDP: uridina difosfato, ADP: adenosín difosfato.

Manipulación de nutrientes y condiciones de cultivo para favorecer la acumulación de carbohidratos de reserva

Con el fin de aumentar el contenido de carbohidratos de reserva en la biomasa microalgal, la manipulación tanto de los nutrientes (macro y micronutrientes) como de las condiciones de cultivo ha resultado una de las principales estrategias a implementar, con el fin de favorecer la actividad enzimática de algunas proteínas clave involucradas en la biosíntesis de carbohidratos de reserva (González-Fernández & Ballesteros, 2012).

Respecto a los macro y micronutrientes, así como moléculas esenciales para el crecimiento celular, la limitación de algunos de ellos como nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg), ha demostrado ser efectiva en la alteración del contenido de macromoléculas de la biomasa (carbohidratos, lípidos y proteínas), generando un aumento de los glucanos de reserva (Shahid et al., 2020). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, elemento esencial en la síntesis de pigmentos, proteínas y ácidos nucleicos, las células metabolizan el nitrógeno contenido en las proteínas, se detiene la división celular y se redirige el flujo de carbono fijado a través de la fotosíntesis hacia la síntesis de polímeros de reserva, aumentando la actividad enzimática de algunas enzimas clave como la anhidrasa carbónica (CA), la RuBisCo y la glucosiltransferasa (glucógeno/almidón sintasa) (González-Fernández & Ballesteros, 2012; Zachleder & Brányiková, 2014; Ran et al., 2019). En cuanto al fósforo, es un componente importante de los ácidos nucleicos, de algunas moléculas proveedoras de energía celular (ATP / ADP / AMP) y de las membranas celulares (fosfolípidos) (Ran et al., 2019). Se ha observado que la limitación de fósforo también puede ejercer estrés sobre las microalgas, lo que lleva a la acumulación de compuestos de reserva de energía, aumentando la actividad de la enzima anhidrasa carbónica y por ende generando un incremento la disponibilidad de carbono inorgánico en forma de CO₂ susceptible de ser fijado más adelante en el ciclo de Calvin por la enzima RuBisCo (Kozłowska-Szerenos et al., 2004; González-Fernández & Ballesteros, 2012). Así mismo, en condiciones de cultivo

óptimas y sin limitación de nutrientes, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) generado en la fotosíntesis, se transporta fuera del cloroplasto a cambio de ortofosfato citoplasmático (Pi) que fluye hacia el interior del cloroplasto. Cuando el Pi es limitado el transporte de G3P puede reducirse, con lo cual se aumenta la concentración del precursor para la síntesis de almidón en algas verdes (Geigenberger, 2011; Ran et al., 2019).

Por otra parte, en cuanto a la manipulación de nutrientes, teniendo en cuenta que la limitación de nitrógeno y fósforo trae consigo efectos negativos sobre la generación de moléculas y compuestos involucrados en el crecimiento celular y por ende en la generación de biomasa, el cultivo de microalgas suplementando el aire con CO₂ (2-5%) ha demostrado ser una buena estrategia para incrementar el contenido de compuestos de reserva, sin afectar el crecimiento celular (Markou et al., 2014; Ran et al., 2019). De igual forma, se ha reportado que el incremento de la concentración de carbono inorgánico en los cultivos microalgales, puede conllevar incrementos del contenido de amilosa en los gránulos de almidón, teniendo en cuenta que la actividad catalítica de la enzima almidón sintasa aumenta (Izumo et al., 2007; González-Fernández & Ballesteros, 2012).

Finalmente, en lo que respecta a la manipulación de condiciones de cultivo, la intensidad de luz (irradiancia) y la temperatura juegan un papel importante en el incremento de los compuestos de reserva. Al ser microorganismos fotosintéticos, la luz es fundamental para que se lleve a cabo la fotosíntesis y por ende la obtención de energía. El incremento de la irradiancia, sin llegar a la fotoinhibición, conlleva a un aumento de la actividad carboxilasa de la enzima RuBisCo, con lo cual se incrementa la actividad fotosintética y la concentración de carbono orgánico (precursores de la síntesis de poliglucanos) (González-Fernández & Ballesteros, 2012; Shahid et al., 2020). Por otra parte, en cuanto a la temperatura, el aumento o la disminución de este parámetro puede afectar la estructura del polímero, puesto que la actividad catalítica de la enzima almidón sintasa disminuye cuando decrece la temperatura, con lo cual se favorece la síntesis de amilopectina (glucano ramificado), sobre la de amilosa (glucano lineal) (González-Fernández & Ballesteros, 2012).

Estudios enfocados a la producción de poliglucanos de reserva

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones enfocadas a la producción de α -poliglucanos, en forma de almidón o de glucógeno, utilizando cianobacterias o microalgas bajo condiciones limitantes de nutrientes o de estrés (tabla 2). Behrens et al. (1989) evaluaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B en cultivo discontinuo bajo condiciones limitantes de nitrógeno. El contenido de almidón de las células se cuantificó como la cantidad de glucosa liberada por hidrólisis enzimática de almidón parcialmente purificado. Los autores encontraron que las algas cultivadas sin limitaciones de nitrógeno lograban acumular aproximadamente 20% de su peso seco como almidón, mientras que en las células limitadas de nitrógeno el contenido de almidón llegó hasta 55% del peso seco celular. La producción de almidón fue dependiente del pH, encontrando una producción óptima de almidón de 1.3 g l⁻¹ en el rango de pH de 7.5 a 8.0.

Por otra parte, Yao et al. (2012) investigaron los efectos de las concentraciones de KNO₃ y MgSO₄ y de intensidad de la luz sobre la producción de biomasa y almidón en la microalga marina *Tetraselmis subcordiformis*. Bajo una intensidad de luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y condiciones limitantes de azufre, los autores obtuvieron una productividad de almidón de 0.33 g l⁻¹ d⁻¹, una producción máxima de 2.7 g l⁻¹ y un contenido de almidón de 62.1% (p/p).

Aikawa et al. (2012) evaluaron la producción de glucógeno de la cianobacteria halófila *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39 identificando las condiciones de cultivo más apropiadas para optimizar la producción del compuesto de interés. La producción de glucógeno se maximizó mediante la reducción de la fuente de nitrato y una alta intensidad de luz (700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obteniéndose una producción de 1.03 g l⁻¹ y una productividad de 0.29 g l⁻¹ d⁻¹.

De igual forma, Aikawa et al. (2014) llevaron a cabo el estudio de los efectos de la intensidad de la luz, la concentración de CO₂ y la salinidad sobre el crecimiento celular y el

Tabla 2. Estudios de producción de α -poliglucano por cianobacterias y microalgas bajo diferentes condiciones de cultivo.

| Microorganismo | Poliglucano (g l ⁻¹) | Observaciones | Referencia |
|---|----------------------------------|--|-----------------------|
| <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 | 3.5 | Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medio agua salobre, 4% CO ₂ . | Aikawa et al., 2014 |
| <i>Galdieria sulphuraria</i> SAG 108.81 | 9.4 | Cultivo en condiciones heterótrofas, oscuridad, pH 2, Biorreactor de 7 l, glicerol 50 g l ⁻¹ y (NH ₄) ₂ SO ₄ 5.0 N | Martinez-Garcia, 2017 |
| <i>Tetraselmis subcordiformis</i> | 2.7 | Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, medio agua de mar, 3% CO ₂ , KNO ₃ 11 mM | Yao et al., 2012 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B | 1.3 | Cultivo en condiciones fotoautótrofas, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, medio agua dulce, 2% CO ₂ , KNO ₃ 6 mM | Behrens et al., 1989 |
| <i>Synechococcus</i> sp. NKBG 15041c | 0.39 | Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, medio agua de mar, 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, 0.04% CO ₂ | Badary et al., 2018 |
| <i>Arthrospira platensis</i> NIES-39 | 1.3 | Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, HCO ₃ . 200 mM | Aikawa et al., 2012 |
| <i>Galdieria sulphuraria</i> O74 W | 0.45 | Cultivo en condiciones mixotróficas, oscuridad, pH 2, CO ₂ atmosférico. | Sakurai et al., 2016 |

contenido de glucógeno en *Synechococcus* sp. PCC 7002 con el fin de incrementar la producción de poliglucano. La producción máxima de glucógeno de 3.5 g l^{-1} , con una productividad de glucógeno de $0.5 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, se obtuvo bajo una intensidad de luz alta ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 4% de CO_2 y una condición de nitrógeno limitante, utilizando como medio de cultivo agua salobre suplementado con otros nutrientes.

Sakurai et al. (2016) investigaron la producción de biomasa, glucógeno y lípidos en la cepa de *Galdieria sulphuraria* O74W en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas (iluminación constante $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pH 2.5 y CO_2 atmosférico y glucosa 25 mM). La producción máxima de biomasa se obtuvo en el cultivo mixotrófico con un valor de 3.8 g l^{-1} . Así mismo, obtuvieron altas cantidades de glucógeno en los cultivos mixotróficos (0.45 g l^{-1}) mientras que las cantidades de lípidos neutros fueron similares entre cultivos mixotróficos y heterotróficos.

Martinez-Garcia (2017) evaluó el efecto del suministro de nitrógeno, el tipo de fuente de carbono, las condiciones de crecimiento y los métodos de extracción sobre el rendimiento de glucógeno y floridoside generados por *G. sulphuraria* SAG 108.81 con el fin de optimizar su producción. Los resultados muestran que *G. sulphuraria* acumuló altas cantidades de glucógeno (50% p/p) independientemente del nivel de suministro de nitrógeno. Adicionalmente, la cepa fue capaz de crecer en glicerol crudo como fuente de carbono, obteniéndose valores de biomasa, glucógeno y floridoside de 19.4, 9.4 y 0.12 g l^{-1} , respectivamente.

Por otra parte, Badary et al. (2018) estudiaron la producción de glucógeno por la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. NKBG15041c bajo diferentes condiciones de cultivo. La producción máxima utilizando la cepa NKBG15041c fue de 0.399 g l^{-1} cuando el microorganismo se cultivó en medio con nitrógeno reducido (BG11 Δ N marino), en un tiempo de 168 h, bajo condiciones fotoautótrofas, $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiancia y una concentración de CO_2 de 0.04%.

Finalmente, Mozaffari et al. (2019) llevaron a cabo un estudio de alteraciones en la fotosíntesis y las reservas de energía en *G. sulphuraria* CCME.5587.1, usando

hidrolizados de rastrojo de maíz para los cultivos. Los autores inicialmente realizaron un estudio preliminar comparando el crecimiento celular y la acumulación de α -glucanos bajo condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas de cultivo, en matraces de 1 l, a un pH de 2.5, una intensidad de luz de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con un ciclo de iluminación de 12 h luz/12 h oscuridad. y una concentración de CO_2 del 2%. La temperatura se mantuvo a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el periodo de oscuridad y a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ en el periodo de iluminación. Bajo las condiciones heterotróficas y mixotróficas de cultivo, las células aumentaron rápidamente de $0.5 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$ a 1.23 ± 0.06 y $1.29 \pm 0.05 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$ en 4 días, respectivamente. Mientras que en condiciones fotoautotróficas se alcanzó un crecimiento de $0.81 \pm 0.07 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$ al día 7. En cuanto al almidón de reserva, se evidenció el efecto positivo de la adición de una fuente de carbono orgánica sobre la acumulación del glucano, encontrándose una acumulación máxima del polímero en mixotrofia (38%), seguido de heterotrofia (30%) y fotoautotrofia (15%).

Carbohidratos microalgales y algunos ejemplos de aplicaciones biotecnológicas

Desde un enfoque de biorrefinería, todos los carbohidratos presentes en las microalgas, estructurales y de reserva, son aprovechables y presentan el potencial de ser usados a nivel industrial; sin embargo, en esta revisión se describirán brevemente algunas aplicaciones biotecnológicas de los poliglucanos de almacenamiento.

Respecto a los alfa-poliglucanos de reserva, el almidón es la principal fuente de energía de carbohidratos utilizada por una amplia variedad de organismos, incluidos los seres humanos (Zhang et al., 2020), y corresponde al polímero que presenta mayor número aplicaciones alimentarias y no alimentarias (Suarez et al., 2020). Por un lado, en la industria alimentaria, este polímero ha sido ampliamente utilizado como espesante, aglutinante, estabilizador de aromas y sabores, gelificante, entre otros, siendo útil en la conservación de alimentos enlatados y congelados, así como en la formulación de jarabes (Burrell et al., 2003; Copeland et al., 2008; Gifuni et al., 2017; Martínez-García, 2017). Por otra parte, respecto a las aplicaciones no alimentarias, debido a la

facilidad para hidrolizar estos glucanos mediante tratamientos termoquímicos o enzimáticos, es posible utilizar los monómeros de glucosa como fuente de carbono y energía en el cultivo de otros microorganismos, p. ej. para la producción de otros compuestos de interés como el bioetanol (John et al., 2011; Al Abdallah et al., 2016; Maia et al., 2020) y el biogás (hidrógeno, metano) (Khan et al., 2018). De igual forma, respecto a los glucanos como la amilopectina, el almidón florideo y el glucógeno, debido su estructura altamente ramificada, tienen aplicación en la industria farmacéutica y médica, en la producción de soluciones para diálisis peritoneal y en la formulación de bebidas deportivas (Martinez-Garcia et al., 2017).

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas de los beta-glucanos, si bien la glucosa como monómero estructural hace que sea una fuente de carbono potencial para la industria de fermentaciones (Al Abdallah et al., 2016), actualmente la principal aplicación de estos polímeros se encuentra en la industria farmacéutica como estimuladores de la respuesta inmune (Yu et al., 2015), y en la alimentaria, p. ej. como prebióticos o fibra dietaria (Mitmesser & Combs, 2017; Mugdil, 2017).

Por otra parte, actualmente la producción de estos poliglucanos microalgales aún no se lleva a cabo a nivel industrial, en donde el mayor desafío se centra en la obtención de procesos económicamente viables, sostenibles y que puedan competir con los cultivos tradicionales de plantas superiores productoras de glucanos (p. ej. maíz, trigo, entre otras). Dentro de los retos principales asociados a la producción industrial de procesos basados en microalgas se encuentra la generación de cultivos con alta productividad de biomasa, la optimización de los parámetros de escalamiento (inoculación, crecimiento y cosecha) y el desarrollo de procesos con un enfoque de biorrefinería. Si bien la producción industrial de biomasa microalgal para la obtención exclusiva de poliglucanos se sitúa en un escenario poco factible, el aprovechamiento integral de todos los compuestos presentes en dicha biomasa puede darle la viabilidad económica al proceso global, partiendo de la obtención de moléculas de costo económico alto como pigmentos (p. ej. carotenoides y ficobiliproteínas) y lípidos (ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs).

Conclusiones

Los poliglucanos de reserva, son metabolitos de almacenamiento de energía en microalgas con el potencial de ser utilizados como materia prima sostenible en la producción de diferentes compuestos de interés como biocombustibles, o de ser usados directamente en la industria farmacéutica y alimentaria. De igual forma, debido a las aplicaciones biotecnológicas de estos polímeros de glucosa, diversas metodologías de cultivo se han implementado con el fin de incrementar el contenido en peso seco de estas moléculas respecto a la biomasa total, en donde la limitación por nutrientes (nitrógeno y fósforo), el enriquecimiento del aire con CO₂, la disminución de la temperatura y el incremento de la intensidad de luz, sin alcanzar la irradiancia de saturación, han demostrado ser excelentes estrategias para aumentar la actividad catalítica de algunas enzimas clave en la fijación de carbono y síntesis de carbohidratos. Finalmente, muchas de las investigaciones se han enfocado en el estudio de la acumulación de almidón en algas verdes, sin embargo, poca atención se ha centrado en los polímeros de reserva de algas rojas (almidón florideo), cianobacterias (glucógeno) y algas acumuladoras de beta-glucanos (principalmente algas pardas), las cuales también presentan gran potencial para la producción de estos biopolímeros.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. CMH y FVLP recibieron una beca de doctorado de CONACyT. Mariana Manzoni Maroneze recibió una beca de posdoctorado de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico - UNAM.

Referencias

- Aikawa S, Izumi Y, Matsuda F, et al (2012) Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology* 108: 211–215.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.01.004>

- Aikawa S, Nishida A, Ho S-H, et al (2014) Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnology for Biofuels* 7:88. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-88>
- Al Abdallah Q, Nixon BT, Fortwendel JR (2016) The Enzymatic Conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in Energy Research* 4:36. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00036>
- Badary A, Takamatsu S, Nakajima M, et al (2018) Glycogen production in marine cyanobacterial strain *Synechococcus* sp. NKBG 15041c. *Marine Biotechnology* 20(2): 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9792-2>
- Bajpai R, Zappi M, Dufreche S, Subramaniam R, Prokop A (2014) Status of Algae as Vehicles for Commercial Production of Fuels and Chemicals. In: *Algal Biorefineries*. Bajpai R, Prokop A, Zappi M (eds). Springer, Dordrecht. pp. 3-24. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_1
- Ball S, Colleoni C, Cenci U, et al (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany* 62(6): 1775–1801. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq411>
- Baroukh C, Muñoz-Tamayo R, Steyer J-P, Bernard O (2014) DRUM: A New framework for metabolic modeling under non-balanced growth. application to the carbon metabolism of unicellular microalgae. *PLoS ONE* 9:e104499-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104499>
- Behrens PW, Bingham SE, Hoeksema SD, et al (1989) Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology* 1(2): 123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00003874>
- Blanco A, Blanco G (2017) Chapter 4 – Carbohydrates. In: *Medical Biochemistry*. Blanco A, Blanco G (Eds). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 73-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00004-5>
- Burrell MM (2003) Starch: the need for improved quality or quantity- an overview. *Journal of Experimental Botany*. 54 (382): 451-456. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg049>
- Busi MV, Barchiesi J, Martín M, Gomez-Casati DF (2014) Starch metabolism in green algae. *Starch - Stärke* 66: 28–40. <https://doi.org/10.1002/star.201200211>
- Cesário MT, da Fonseca MMR, Marques MM, de Almeida MCMD (2018) Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances* 36(3): 798–817. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Copeland L, Blazek J, Salmen H, Tang MC (2008) Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 23(6): 1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Déléris P, Nazih H, Bard J-M (2016) Chapter 10 - Seaweeds in Human Health. In: *Flurence J, Levine I (eds) Seaweed in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego. pp 319–367.
- Geigenberger P (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* 155(4): 1566–1577. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170399>
- Gifuni I, Olivieri G, Russo-Krauss I, D'Errico G, Pollio A, Marzocchella A (2017) Microalgae as New Sources of Starch: Isolation and Characterization of Microalgal Starch Granules. *Chemical Engineering Transactions* 57:1423-1428. <https://doi.org/10.3303/CET1757238>
- González-Fernández C, Ballesteros M (2012) Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances* 30(6): 1655–1661. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>
- Izumo A, Fujiwara S, Oyama Y, et al (2007) Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO₂ concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Science* 172(6): 1138–1147. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.03.001>

- John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* 102(1):186-93.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 17(36): 1-21.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kozłowska-Szerenos B, Bialuk I, Maleszewski S (2004) Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5): 403–409.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.02.010>
- Maia JLD, Cardoso JS, Mastrantonio DJDS, Bierhals CK, Moreira JB, Costa JAV, Morais MG (2020) Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules* 165:2739–2749.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.159>
- Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* 65:186–202.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Martín-Juárez J, Markou G, Muylaert K, et al (2017) Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-products*. Gonzalez-Fernandez C, Muñoz R (Eds). Woodhead Publishing Series in Energy. Elsevier Inc. pp. 183–207.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X>
- Martinez-Garcia M, Stuart MCA, Van der Maarel MJE (2016) Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens. *International Journal of Biological Macromolecules* 89: 12–18.
<https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2016.04.051>
- Martínez-García M (2017) Functional carbohydrates from the red microalga *Galdieria sulphuraria*. Tesis de Doctorado. Universidad de Groninga. Holanda. pp. 1-149.
- Martinez-Garcia M, Korpma A, Van der Maarel MJE (2017) The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydrate Polymers* 169:75-82.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.004>
- Masojídek J, Koblížek M, Torzillo G (2007) Photosynthesis in Microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Richmond A, Hu Q (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. pp. 20–39.
- Mayers JJ, Vaiciulyte S, Malmhäll-Bah E, et al (2018) Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research* 31: 430–442.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.034>
- Merwe LVD (2007) UDP-glucose: β-(1-3)-glucan (paramylon) synthase from *Euglena gracilis*. Tesis Maestría en Biotecnología de Plantas. Universidad en Stellenbosch. Sudáfrica. pp. 1-70.
- Mišurcová L, Škrovánková S, Samek D, et al (2012) Chapter 3 - Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. In: *Advances In Food and Nutrition Research*. Henry J (ed). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 75–145.
- Mitmesser S, Combs M (2017) Chapter 23 - Prebiotics: Inulin and other oligosaccharides. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Floch MH, Ringel Y, Walker WA (Eds). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 201–208.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00023-9>
- Mozaffari K, Seger M, Dungan B, et al (2019) Alterations in photosynthesis and energy reserves in *Galdieria sulphuraria* during corn stover hydrolysate supplementation. *Bioresource Technology Reports* 7: 100269.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100269>

- Muchut RJ, Calloni RD, Arias DG, et al (2021) Elucidating carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse genetics-based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie* 184: 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.016>
- Mudgil D (2017) Chapter 3-The interaction between insoluble and soluble fiber. In: *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease*. Samaan RA (Ed). Pittsburgh: Academic Press. Elsevier Inc. pp. 35–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>
- O'Neill EC, Trick M, Hill L, et al (2015) The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems* 11(10): 2808–2820. <https://doi.org/10.1039/C5MB00319A>
- Perez-Garcia O, Bashan Y (2015) Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In: *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design*. Prokop A, Bajpai R, Zappi M (Eds). Springer International Publishing, Cham. pp. 61–131.
- Powell PO, Sullivan MA, Sheehy JJ, Schulz BL, Warren FJ, Gilbert RG (2015) Acid hydrolysis and molecular density of phytoglycogen and liver glycogen helps understand the bonding in glycogen α (composite) particles. *PLoS ONE* 10(3): e0121337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121337>
- Ran W, Wang H, Liu Y, et al (2019) Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology* 291: 121894. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121894>
- Suarez CA, Zarate S, Van den Broek LAM, Van den Berg C, Wijffels RH, Eppink MHM (2020) Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. *Algal Research*. 46: 101801. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101801>
- Sakurai T, Aoki M, Ju X, et al (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology* 200: 861–866. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.11.014>
- Shahid A, Khan F, Ahmad N, et al (2020) Microalgal Carbohydrates and Proteins: Synthesis, Extraction, Applications, and Challenges. In: *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Alam MA, Xu JL, Wang Z (Eds). Springer Singapore. Singapore. pp. 433–468.
- Stone BA (2009) Chapter 2.1 - Chemistry of β -Glucans. In: *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Bacic A, Fincher GB, Stone BA (Eds). Academic Press, San Diego. Elsevier Inc. pp. 5–46.
- Viola R, Nyvall P, Pedersén M (2001) The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings. Biological Sciences* 268(1474): 1417–1422. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1644>
- Yao C, Ai J, Cao X, et al (2012) Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology* 118:438–444. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.030>
- Yu X, Guo C, Fisher PB, Subjeck JR (2015) Chapter Nine – Scavenger receptors: Emerging role in cancer biology and immunology. *Advances in Cancer Research* 128: 309–364. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.004>
- Zachleder V, Brányiková I (2014) Starch Overproduction by Means of Algae. In: *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products*. Bajpai R, Prokop A, Zappi M (Eds). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 217–240.
- Zhang X, Leemhuis H, Van der Maarel MJEC (2020) Digestion kinetics of low, intermediate and highly branched maltodextrins produced from gelatinized starches with various microbial glycogen branching enzymes. *Carbohydrate Polymers* 247: 116729. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116729>

Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica

Insights into microalgae culture systems: A critical review

Mariana Manzoni Maroneze*, Carlos Alberto Montenegro Herrera,
Alfredo Martínez Jiménez

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México,
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México

mariana.manzoni@ibt.unam.mx, carlos.montenegro@ibt.unam.mx,
alfredo.martinez@ibt.unam.mx

Resumen

Debido a su amplia variedad de aplicaciones, los procesos y productos basados en microalgas son actualmente el foco de un número considerable de investigadores, tanto en institutos de investigación y universidades públicas, como en empresas privadas de todo el mundo. Sin embargo, a pesar de los avances recientes, la producción de microalgas todavía tiene varios desafíos que deben abordarse, especialmente relacionados con los sistemas de cultivo. De esta manera, expertos de todo el mundo están trabajando en enfoques de ingeniería que ayudarán a la consolidación del cultivo de microalgas a escala comercial. En este sentido, el objetivo de esta revisión es abordar críticamente los problemas relacionados con los sistemas de cultivo de microalgas. Se discuten los principales factores que afectan la eficiencia de los cultivos de microalgas, los fotobiorreactores más usados, con sus ventajas y limitaciones, así como una comparación de los sistemas de cultivo y, finalmente, se presentan algunos casos comerciales de éxito.

Palabras clave: Alga, fotobiorreactores, bioprocesos, bioproductos.

Abstract

Because the wide array of applications, microalgae-based processes and products are currently the focus of considerable number of research, both in government agencies, and private companies around the world. However, despite the recent advances, microalgae production still has several challenges that need to be addressed, especially related to the culture systems. In this way, experts all over the world are working on engineering approaches that will assist in the consolidation of commercial microalgae. In this sense, the objective of this review is to critically address the issues related to microalgae culture system. In this review, we discuss major factors affecting the efficiency of microalgae cultures, the main photobioreactors available with its advantages and limitations, a comparison of these cultivation systems and, finally some commercial cases of success will be presented.

Key words: Algae, photobioreactors, bioprocesses, bioproducts.

Introducción

La población mundial continúa aumentando y se espera que llegue a 9 mil millones de personas en 2050. Este hecho asociado a la industrialización, la urbanización y el desarrollo de la economía global, han provocado el cambio climático y un aumento en la demanda de energía, alimentos, agua, medicamentos y otros recursos esenciales en las actividades humanas (Fetanat et al., 2021). Además, la actual pandemia de COVID-19 ha exacerbado el riesgo de hambruna e inseguridad alimentaria a nivel mundial (Laborde et al., 2020). Por lo tanto, para satisfacer las crecientes demandas, será necesario el desarrollo y la implementación de innovaciones incrementales y disruptivas para avanzar hacia sistemas alimentarios y energéticos más resilientes. En este sentido, las microalgas han sido identificadas como uno de los recursos biológicos más prometedores para el suministro de la próxima generación de alimentos, piensos, nutracéuticos y biocombustibles, entre otros productos (Wibisono et al., 2019).

La biomasa de estos microorganismos presenta una amplia gama de moléculas y productos potenciales como carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos, minerales, vitaminas y enzimas (Barros et al., 2019). Además, los procesos basados en microalgas también se han propuesto como una herramienta poderosa para aplicaciones ambientales, específicamente el tratamiento de aguas residuales y la mitigación de CO₂. Aproximadamente 7000 toneladas de biomasa de algas secas se producen en todo el mundo cada año y el mercado mundial de biomasa de algas se valoró en USD 717.14 millones en 2018 y se prevé que alcance los USD 1365,8 millones en 2027, a una tasa de crecimiento anual compuesta de 7.42% (Transparency Market Research, 2018). Estos datos muestran que la industria de las microalgas está ganando popularidad a nivel mundial, ya que además de la amplia variedad de aplicaciones, tiene varias ventajas potenciales frente a otros recursos fotosintéticos (Tang 2020).

A diferencia de las plantas, el crecimiento de microalgas no se limita a tierras cultivables y agua dulce. Además, estos microorganismos presentan alta

productividad, bajo impacto ambiental y no presentan estacionalidad; es decir, su cultivo se puede repetir durante todo el año y se puede cosechar diariamente (Daneshvar et al., 2021). A pesar de estas potencialidades, uno de los principales requerimientos para apoyar el desarrollo de la industria de las microalgas es el cultivo eficiente de microalgas a gran escala de forma económica. La tecnología de cultivo está relacionada tanto con el diseño del tipo y configuración de los sistemas de cultivo abiertos o cerrados, así como con las condiciones operativas que conducen al equilibrio entre el crecimiento óptimo de las microalgas y la productividad del bioproducto objetivo (Yen et al., 2019; Maroneze et al., 2020).

Con el mercado en crecimiento y la necesidad de sistemas de cultivo que permitan la producción comercial de microalgas, la investigación en el campo de los fotobiorreactores se intensificó en las últimas décadas. Se han propuesto múltiples diseños y configuraciones de fotobiorreactores con diferencias sustanciales en los costos de construcción y operación. Aun así, la mayoría de los sistemas se clasifican en una de cuatro categorías: fotobiorreactores de tanque, tubulares, planos o híbridos, que, como regla general, se dividen en abiertos y cerrados. Incluso con todas las investigaciones realizadas a nivel mundial, todavía no existe un sistema universal para el cultivo a gran escala de microalgas. Para cualquier aplicación, el fotobiorreactor que se utilizará debe seleccionarse adecuadamente en función de la cepa, los productos objetivo, los rendimientos y las condiciones ambientales (Chang et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta revisión es abordar críticamente los conocimientos relacionados con los sistemas de cultivo de microalgas. Primero, se presenta una descripción general de los procesos basados en microalgas con énfasis en el modo de cultivo y los factores que afectan la producción de biomasa de microalgas. A continuación, se presenta una descripción crítica de los desarrollos recientes y consolidados en las tecnologías de cultivo de microalgas. Finalmente, se revisan algunos casos comerciales de éxito de los sistemas de cultivo de microalgas en todo el mundo.

Procesos basados en microalgas

Los procesos basados en microalgas comprenden operaciones secuenciales de procesamiento: *upstream* (USP) y *downstream* (DSP) (Figura 1). El USP se centra en la selección de cepas, la manipulación genética, el cultivo y los requerimientos del sistema biológico. El DSP tiene como objetivo la cosecha, secado, ruptura celular, extracción y purificación de los bioproductos de la biomasa de microalgas. Los USP, especialmente el cultivo, se consideran la línea de base en los procesos de microalgas. Esta operación unitaria es un punto crítico en el proceso, tanto en términos técnicos como económicos, ya que afecta directamente la calidad y cantidad de la biomasa microalgal producida (Deneshvar et al., 2021). El proceso de producción puede diferir de muchas maneras, donde la primera variación a considerar es la elección metabólica de fuentes de carbono y energía, que pueden ser fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas.

Cultivos autótrofos vs heterótrofos vs mixotróficos

Las microalgas se han producido a gran escala desde la década de 1960, dado su alto potencial como fábricas de células. Desde entonces, el proceso fotosintético es la condición de cultivo más utilizada para el crecimiento de microalgas a nivel comercial (Chew et al., 2018). El cultivo fotoautótrofo se refiere al proceso en el que las microalgas, a través de la fotosíntesis, capturan la energía luminosa y convierten directamente el carbono inorgánico en energía química (Yin et al. 2020). Los procesos basados en esta ruta metabólica se consideran más económicos y

eco-amigables que el de los otros dos, ya que pueden utilizar la luz solar, los gases residuales industriales y el CO₂ de la atmósfera para su mantenimiento y crecimiento. Por otro lado, el escalamiento de cultivos autótrofos es un proceso que requiere mucho tiempo y ocupa un área significativa de las fábricas de producción industrial. Aunque la fotosíntesis es la ruta preferida de la gran mayoría de microalgas, está bien establecido que algunas cepas han conservado la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono orgánicas para crecer heterótróficamente o mixotróficamente, incluso mostrando mejores rendimientos en la producción de biomasa.

La producción de microalgas en fermentadores (cultivos cerrados), bajo condiciones de crecimiento heterótrofo, ha demostrado ser una ruta de comercialización muy exitosa. En este modo de crecimiento, el carbono exógeno se descompone de la misma manera que en otros microorganismos, donde las moléculas complejas se metabolizan a través de la vía Embden-Mayerhoff-Parnas (vía EMP o glucólisis) o vía de las pentosas fosfato (PPP) (Jareonsin & Pumas, 2021). Según Pérez-García et al. (2011), cuando es posible el crecimiento heterótrofo se puede superar la mayor deficiencia de los cultivos autótrofos, es decir, la dependencia de la luz que complica significativamente el proceso. Además, el fácil escalamiento y la relativa simplicidad de las operaciones y el mantenimiento diario son los principales atractivos del crecimiento heterótrofo. Sin embargo, el cultivo heterótrofo de microalgas puede incrementar los costos de producción, debido a la necesidad de una

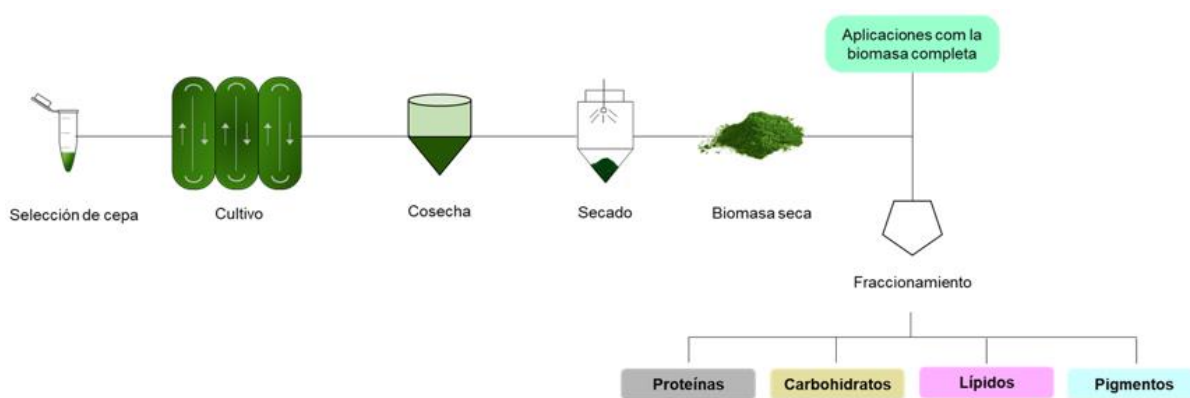


Figura 1. Proceso fundamental basado en microalgas.

fuentes de carbono orgánico exógena, y también son susceptibles a la contaminación microbiana y se limitan a producir metabolitos no inducidos por la luz. Para mejorar la viabilidad económica en la comercialización de productos a base de microalgas, se pueden emplear azúcares (p. ej. glucosa) o residuos de bajo costo, como es el caso del glicerol (Katiyar et al., 2017), desechos de alimentos (Pleissner et al., 2013) y aguas residuales agroindustriales (Maroneze et al., 2014; Queiroz et al., 2018), que son sustratos ampliamente utilizados para este propósito. Además de incrementar la viabilidad económica, el uso de residuos y desechos contribuye a la gestión de residuos (Neves et al., 2016).

Otra estrategia de cultivo para el crecimiento de microalgas es el modo mixotrófico, donde estos microorganismos pueden metabolizar simultáneamente carbono orgánico e inorgánico, mediante la respiración celular y la fotosíntesis, respectivamente (Zhan et al., 2017). Teniendo en cuenta que la mixotrofia comprende modos heterótrofos y autótrofos, las microalgas que tienen esta capacidad metabólica pueden crecer constantemente aún bajo la limitación de cualquiera de las fuentes (luz, carbono orgánico e inorgánico), incrementando de esta manera la factibilidad económica para la producción a gran escala. Otra ventaja importante de estos procesos está relacionada con la biorremediación, ya que se pueden aplicar para tratar tanto gases de combustión como aguas residuales orgánicas (Patel et al., 2020). Además de los beneficios, el cultivo mixotrófico también comparte varias

desventajas del régimen heterotrófico: riesgos de contaminación, costo de la fuente de carbono exógeno y número limitado de especies capaces de crecer en este modo; y del autótrofo: sistemas de cultivo tecnológico no completamente desarrollados.

Parámetros de la producción de microalgas

Para que los procesos basados en microalgas sean sostenibles, factibles y económicamente viables, es necesario desarrollar tecnologías de cultivo con alta productividad de biomasa y/o bioproductos objetivo al menor costo de producción. Con frecuencia, como el producto objetivo está relacionado con la formación de masa celular o el producto es la propia biomasa, la productividad de la biomasa es el parámetro clave a maximizar. El cultivo de microalgas depende de la especie y se ve afectado por factores biológicos como la intensidad de la luz, la temperatura, el pH, el CO₂, el oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. La productividad también está directamente relacionada con el diseño del fotobiorreactor, y esto depende de factores como la geometría, la dinámica de fluidos y la capacidad de transferencia de masa. Una vez definidas las condiciones biológicas y el diseño del fotobiorreactor, el siguiente paso es seleccionar la ubicación geográfica de la instalación de microalgas, con base a la radiación solar, el fotoperiodo, la temperatura y las variaciones estacionales, como se muestra en la Figura 2 (García-Mañas et al., 2019; Acien et al., 2020; Kirnev et al., 2020).

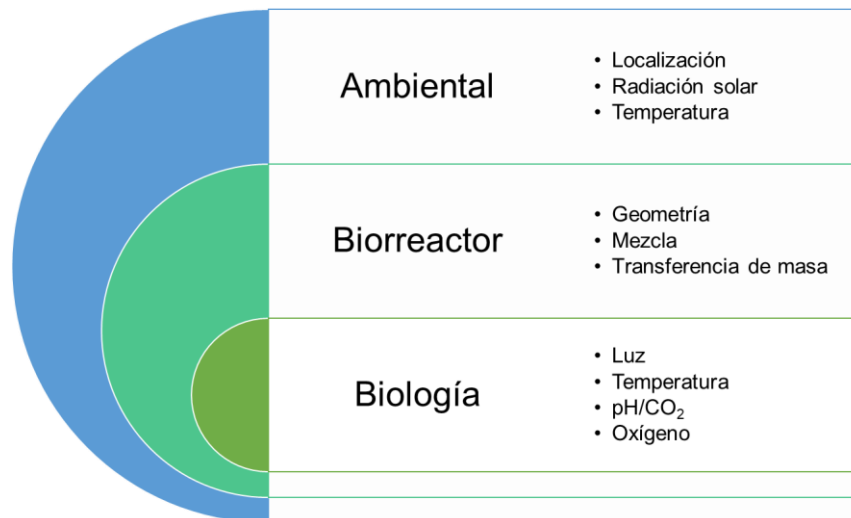


Figura 2. Principales parámetros que determinan la productividad de los sistemas relacionados con las microalgas.

Medio ambiente: factores operativos que afectan los parámetros biológicos

Como se describió anteriormente, el crecimiento de microalgas se ve afectado por la combinación de varios parámetros operativos, tales como la intensidad de la luz, el fotoperíodo, la temperatura, el pH, el CO₂, el oxígeno disuelto y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Kitaya et al., 2008). Entre ellos, la calidad y cantidad de luz es el motor de la reacción de la fotosíntesis y afecta no solo la fotosíntesis de microalgas, la composición celular y las vías metabólicas, sino también la eficiencia económica del proceso de cultivo de estos microorganismos (Blanken et al., 2013; Maroneze et al., 2016).

De todo el espectro de luz solar, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) para las microalgas solo varía entre 400 y 700 nm aproximadamente, lo que representa el 43% de la radiación solar (Kwan et al., 2020). La capacidad de las microalgas y cianobacterias para absorber una longitud de onda de luz específica depende de los pigmentos que sintetiza, los cuales funcionan como complejos antena captadores de fotones. La mayoría de los pigmentos fotosintéticos son clorofilas "a" y "b", que exhiben dos picos de absorción máxima, en azul (420 nm para Chla y 435 nm para Chlb) y rojo (660 nm para Chla y 643 nm para Chlb). Otros pigmentos implicados en la absorción de luz son los carotenoides (420-550 nm) y las ficobilinas (500-650 nm) (Martín-Girela et al., 2017).

Ya está bien definido que la luz es necesaria para la fotosíntesis de microalgas, pero para el desarrollo de fotobiorreactores y procesos de base fotosintética, es necesario comprender los fenómenos asociados con diferentes intensidades de luz, que son la limitación, saturación e inhibición por la luz (Carvalho et al., 2011). Existe un mínimo de luz requerido para realizar la fotosíntesis, conocido como irradiancia de compensación, por debajo de este valor, las microalgas están bajo fotolimitación, lo cual ocurre cuando no hay luz suficiente y se produce la respiración. Por encima de este valor de compensación, la tasa de asimilación fotosintética aumenta con la irradiancia hasta alcanzar el punto de saturación de la luz. A irradiaciones superiores al punto de saturación, se produce la fotoinhibición, lo que provoca un daño reversible al aparato fotosintético,

posteriormente con el aumento de la intensidad de luz, se induce un daño oxidativo celular (fotooxidación), el cual es irreversible. Los valores de estos parámetros característicos de la luz son diferentes para las diferentes microalgas; por tanto, son factores cruciales para considerar a la hora de elegir la especie y diseñar el fotobiorreactor (Chang et al., 2017; Martín-girela et al., 2017; Acién et al., 2020).

La energía luminosa puede ser proporcionada por la luz solar, que es la fuente de energía más rentable para la producción de microalgas. Sin embargo, también tiene ciertas desventajas, incluidos los ciclos día/noche, la influencia de las condiciones climáticas y los cambios estacionales. Por otro lado, la iluminación artificial puede dar como resultado una tasa fotosintética mejorada y, por lo tanto, una productividad mayor de la biomasa y la acumulación de productos específicos. Al mismo tiempo, el uso continuo de luz artificial da como resultado aumentos en los costos por consumo de energía eléctrica, lo que incrementa los costos del producto final (Blanken et al., 2013; Abu-Ghosh et al., 2015; Kwan et al., 2020). Alternativamente, se ha propuesto el uso de diferentes fotoperíodos para reducir la demanda de energía en cultivos de microalgas y por ende desarrollar procesos más económicos y eficientes, ya que el uso de regímenes de luz adecuados puede reducir la demanda de energía lumínica con una productividad similar o incluso superior a la obtenida con iluminación continua (Maroneze et al., 2016; Maroneze et al., 2019). Otro factor importante para considerar es la radiación ultravioleta (UV). La radiación UV puede afectar la fisiología normal, la bioquímica de las células de microalgas y afectar negativamente la fotosíntesis, el crecimiento, la motilidad y otros procesos celulares (Rastogi et al., 2019). El continuo agotamiento de la capa de ozono estratosférico indica que este factor será cada vez más relevante en la transición de cultivos del interior al exterior. Este efecto, fue evidenciado en la práctica por Schipper et al. (2021), quienes concluyeron que la radiación UV puede haber sido uno de los principales factores del fracaso en la transición de cultivos de cianobacterias de interior a exterior en Qatar, una región con altos niveles de radiación UV.

Además de la calidad y cantidad de luz, el crecimiento de las microalgas está muy influenciado por la temperatura. En general, cada especie de microalgas se caracteriza por una temperatura de crecimiento óptima. Por debajo de este valor, la tasa de crecimiento de los cultivos se reduce, aproximadamente, a la mitad cada 10 grados. Por otro lado, por encima del valor óptimo de temperatura el cultivo puede morir por sobrecalentamiento, generalmente a 10 °C por encima del valor óptimo (Queiroz et al., 2018; Ación et al., 2020). El metabolismo de las microalgas es un conjunto de procesos fotoquímicos y bioquímicos. Por lo tanto, las fluctuaciones de la temperatura ambiental tienen un impacto directo en las tasas de crecimiento a través de sus efectos en los procesos bioquímicos y fisiológicos térmicamente sensibles. Las temperaturas bajas generalmente reducen la actividad carboxilasa de la enzima RuBisCo, y esto puede conducir a una sobreproducción de energía en las membranas de los tilacoides, lo que puede generar un desequilibrio entre el suministro de energía fotosintética y el consumo de energía dentro del ciclo de Calvin-Benson-Bassham en la célula (Falk et al., 1996; Ras et al., 2013; Siqueira et al., 2020).

La mayoría de las microalgas son mesófilas, las tasas de crecimiento máximas comienzan en temperaturas entre 20 y 25 °C. Sin embargo, algunas especies pueden crecer en condiciones extremas de temperatura, como cepas termófilas y psicrófilas, p. Ej. *Galdieria sulphuraria* y *Asterionella formosa*, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de 42 °C y 17 °C, respectivamente (Ras et al., 2013). Las microalgas cultivadas en fotobiorreactores al aire libre están expuestas a variaciones estacionales y diurnas de temperatura. Por lo tanto, un equipo de control de temperatura puede ser crucial dependiendo del clima local. Por otro lado, se debe considerar que los sistemas de enfriamiento/calefacción ocasionan incrementos en el costo del bioproceso debido al uso intensivo de energía o en casos particulares el costo puede reducir por un aumento en la eficiencia del bioproceso (Uyar y Kapucu, 2015).

Por otra parte, el pH es una de las condiciones ambientales más críticas en el cultivo de microalgas, ya que determina la solubilidad y disponibilidad de CO₂ en el

cultivo e influye en el estado fisiológico de las células. Cada especie de microalgas tiene un rango de pH óptimo. En general, la mayoría de las especies de microalgas crecen en un pH neutro, excepto las marinas, que prefieren valores de pH de 8.0 a 8.4, y especies extremófilas, como *Spirulina platensis*, que puede tolerar hasta pH 9, y *Galdieria sulphuraria*, que puede tolerar pH por debajo a 2 (Khan et al., 2018). En cultivos de microalgas autótrofas, es común usar gas enriquecido con CO₂ para controlar el pH y proporcionar el carbono inorgánico requerido por las células, que comúnmente se suministra en la suspensión de microalgas en forma de burbujas a través de un difusor de gas (Fu et al., 2019; Ación et al., 2020). La concentración de CO₂ en el cultivo está determinada por la concentración de carbono inorgánico total en el medio de cultivo y el pH, según el sistema tampón bicarbonato-carbonato (CO₂ - HCO₃⁻ - CO₃²⁻). Es importante mencionar que, durante el cultivo, el pH aumenta gradualmente debido a la absorción de carbono inorgánico por las microalgas, lo que puede limitar la disponibilidad de CO₂ y luego inhibir el crecimiento celular. Por el contrario, en cultivos heterótrofos se consume oxígeno y se produce CO₂, la transferencia de masa líquido-gas también es un factor clave en estos procesos (Pérez García et al., 2011).

La reacción de fotosíntesis produce estequiométricamente 1.9 toneladas de oxígeno cuando se genera 1 tonelada de biomasa de microalgas. Si no se dispone de los mecanismos adecuados para eliminarlo, el oxígeno puede acumularse en el medio de cultivo (Maroneze y Queiroz, 2018). Los niveles altos de oxígeno pueden inducir la fotorrespiración en las microalgas, donde el exceso de O₂ compite con el CO₂ por los sitios de unión de RuBisCO. Este fenómeno conduce a un cambio de la fotosíntesis a la fotorrespiración, reduciendo así la eficiencia fotosintética y el rendimiento de biomasa. Además, la combinación de oxígeno y exceso de luz puede crear especies reactivas de oxígeno (ROS) y luego conducir a una fotooxidación severa (Richmond, 1991; Kazbar et al., 2019). En un estudio con condiciones de luz sub-saturadas y oxígeno disuelto saturado de aire, Raso et al. (2012) demostraron una reducción en la tasa de crecimiento específico de *Nannocchloropsis* sp. de 63% cuando

aumentan la concentración de saturación de aire de 75% para 250%. De la misma forma, Sousa et al. (2013), investigaron el efecto de la presión parcial de oxígeno sobre el crecimiento de *Neochloris oleoabundans* a bajas intensidades de luz. En dicho estudio concluyeron que la pérdida en la productividad de la biomasa era resultado de la actividad fotorrespiratoria de RuBisCO, ya que la luz se encontraba en valores de subsaturación. Por lo tanto, un aspecto crítico del diseño y escalado de fotobiorreactores tubulares es establecer geometrías que no permitan la acumulación de oxígeno a niveles inhibitorios (Camacho-Rubio et al., 1999).

Parámetros del fotobiorreactor

Los sistemas de cultivo deben diseñarse para proporcionar las condiciones óptimas requeridas por las cepas seleccionadas con una demanda y un costo mínimo de energía. Por lo tanto, se deben proporcionar las condiciones de cultivo específicas ya discutidas. Para satisfacer estas demandas impuestas por el sistema biológico, los sistemas de cultivo deben diseñarse de manera que garanticen mezclado y transferencia de masa eficientes. Los biorreactores de microalgas se clasifican según su diseño en dos tipos principales: sistemas abiertos (como estanques extensos sin mezclar, estanques con canales) y sistemas cerrados (como fotobiorreactores tubulares -PBR-, PBR verticales, fermentadores heterótrofos). Normalmente, estas estructuras constan de sistemas de cuatro fases: células como fase sólida, medio de crecimiento como fase líquida, fase gaseosa y colector de radiación luminosa (en el caso de cultivos fotoautótrofos) (Chang et al., 2017).

El primer aspecto de la geometría a considerar en los fotobiorreactores es la relación superficie-volumen (relación S/V), ya que la distribución de luz en el PBR está relacionada con el área total de superficie transparente disponible. Como regla general, las productividades máximas de cultivo se logran con una relación S/V más alta, ya que esto asegura una mejor uniformidad de la energía luminosa, mejorando la eficiencia fotosintética. Por lo tanto, se prefieren los diseños de PBR de trayectoria de luz corta, incluidos los PBR tubulares, de placa plana, de biopelícula o de columna vertical. Además,

la distribución de la luz es el mayor cuello de botella en la ampliación de los PBR, ya que limita su volumen o la reducción excesiva de diámetro puede provocar un colapso estructural.

En cualquier sistema de cultivo de microalgas es imperativo generar condiciones hidrodinámicas que promuevan un buen mezclado para: (i) minimizar la existencia de gradientes y distribuir eficientemente nutrientes y gases entre las células y el medio de cultivo; (ii) evitar el estancamiento de las células en zonas no iluminadas; (iii) mantener las células en suspensión; (iv) facilitar la transferencia de calor y el intercambio de gases; y (v) evitar los fenómenos de fotolimitación, fotoinhibición y fotooxidación. En sistemas abiertos como "raceways", el mezclado se realiza mecánicamente mediante sistemas de agitación con ruedas de paletas. En fotobiorreactores cerrados, la mezcla se realiza mediante bombas y/o aspersores de CO₂/aire (p. Ej., columna de burbujas o airlift). Los fermentadores heterótrofos convencionales se agitan mediante impulsores y deflectores y/o mediante aireación con sistemas de elevación de aire o columna de burbujas (Pérez-García et al., 2015). También se puede aplicar una combinación de métodos mecánicos y no mecánicos en fotobiorreactores y fermentadores. Sin embargo, los niveles de turbulencia que superan la resistencia al cizallamiento celular pueden conducir a una condición de estrés y, en consecuencia, inhibición de la actividad metabólica, daño celular o incluso disrupción celular (Assunção et al., 2020).

Los fenómenos de transferencia de masa afectan todos los aspectos de los bioprocesos. La capacidad de transferencia de masa del sistema de cultivo biológico es su capacidad para transportar cualquier componente a las células (Acién et al., 2020). Los compuestos disueltos en la fase líquida están disponibles fácilmente para las células ya que están suspendidos en el mismo líquido. Por otro lado, los problemas de transferencia de masa entre las fases gaseosa y líquida surgen durante el suministro de oxígeno y dióxido de carbono, en cultivos heterótrofos y fotoautótrofos, respectivamente (Chisti, 2009). Como ya se ha comentado, en los cultivos de microalgas los componentes que deben intercambiarse entre las fases líquida y

gaseosa son el CO₂ y el O₂. El desafío es proporcionar y eliminar estos gases a una velocidad lo suficientemente rápida para satisfacer los requisitos de las células de microalgas con un aporte mínimo de energía. La transferencia de masa se evalúa con frecuencia mediante el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, el cual está dado en función de tres parámetros: (i) el coeficiente de transferencia de masa (k_{LA}); (ii) la fuerza impulsora, es decir la diferencia entre la concentración del componente en la fase líquida y la que está en equilibrio con la fase gaseosa; y (iii) el volumen del sistema (Reyna-Velarde 2010; Acién et al., 2020).

Parámetros ambientales/climáticos

Según Holdman et al. (2019), los procesos autótrofos de microalgas a gran escala solo pueden ser baratos si se utiliza la luz solar. Se debe considerar que los cultivos al aire libre están expuestos a cambios en el clima y cambios estacionales, que afectan la intensidad de la luz, la temperatura y el fotoperíodo, y por tanto, las productividades y los rendimientos del bioproceso dependen de las condiciones climáticas predominantes en una localidad en particular. Por lo anterior, para lograr un proceso rentable, es de vital importancia la selección de cepas de algas y ubicaciones adecuadas con alta irradiación solar anual y un intervalo de temperatura óptimo, que permita el crecimiento de las microalgas durante todo el año con niveles altos de productividad (Brusca et al., 2017).

Harmelen y Oonk (2006) establecieron que las condiciones climáticas adecuadas para las microalgas se encuentran aproximadamente en el área entre 37° N y 37° S de latitud, lo que corresponde a temperaturas medias anuales superiores a 15 °C. Siqueira et al. (2020) evaluaron el crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en simulaciones climáticas de diferentes regiones de Brasil y concluyeron que los mejores resultados se encontraron en climas tropicales y bajas latitudes. Con la misma cepa de microalgas, Dias et al. (2020) evaluaron las condiciones simuladas de catorce tipos de climas distribuidos en 33 localizaciones geográficas de las zonas ecuatoriales y tropicales del mundo. Estos investigadores encontraron que los climas tropicales y secos, caracterizados por temperaturas más altas, favorecieron la

productividad de biomasa microalgal y la acumulación de lípidos. México, debido a su baja latitud promedio, tiene una alta irradiación solar anual, lo que resulta en temperaturas medias altas. De hecho, las civilizaciones nativas del Valle de México utilizaron como alimento la Spirulina, cianobacteria que crece naturalmente en el lago Texcoco a valores de pH elevados (Soni et al., 2017). Lozano-García et al. (2019) construyeron un modelo de sistema de información geográfica para identificar áreas en México con alto potencial de producción de microalgas e identificaron que hasta el 26.8% del país cuenta con áreas aptas para la producción de microalgas, equivalentes a 526,672 km². Esta información corrobora lo planteado por Speranza et al. (2015), quien concluye que los climas ideales para el cultivo de microalgas serían tropicales y secos con baja variación de temperatura durante el año. A nivel mundial, el grupo climático dominante por área de la superficie continental es el seco (30.2%), seguido de tropical (19%) y subtropical (13.4%) (Dias et al., 2020). Además, es importante mencionar que es poco probable que las regiones muy alejadas de la línea del Ecuador (latitud 0°) puedan soportar cultivos heterótrofos de microalgas, ya que los rayos solares están más inclinados y, en consecuencia, las regiones reciben una irradiación solar menor, lo que resulta en una menor temperatura (Speranza et al., 2015). Una vez definidos los aspectos relacionados con la posición geográfica y climática, se deben considerar factores relacionados con el uso del suelo, como la topografía, el nivel y la accesibilidad de las parcelas, así como la disponibilidad de insumos (agua y nutrientes) y el acceso a la infraestructura de transporte.

Sistemas de cultivo de microalgas

Sistemas abiertos

Raceways

Actualmente, los estanques de “*raceways*” son el sistema más utilizado para la producción comercial de microalgas, se utilizan en aproximadamente el 95% de la producción mundial; debido principalmente a su simplicidad, flexibilidad, fácil ampliación, y bajos costos de construcción y operación (Mendoza et al. 2013). Un *raceway* es un canal de recirculación de circuito cerrado, generalmente hecho de paredes de concreto

y divisores revestidos con una membrana de plástico o fibra de vidrio para evitar filtraciones o simplemente se construyen en suelo compactado con un revestimiento para evitar que el suelo absorba el líquido (Singh & Sharma, 2012). En estos estanques se utiliza mezclado con ruedas de paletas con el fin de mantener un sistema homogéneo de microalgas, agua y nutrientes, los cuales circulan alrededor de un “*raceway*”. Para la producción de biomasa de microalgas, las instalaciones basadas en canales suelen tener muchos estanques, ya que un solo estanque no suele superar las 0.5 ha (Chisti, 2016).

Los reactores de canales generalmente operan en modo continuo donde los nutrientes, cuando se requiere, se agregan en la parte frontal de la rueda de paletas, y las microalgas, después de que ha circulado a través del circuito, se recolectan detrás de la rueda de paletas (Singh & Sharma, 2012). Para evitar la limitación de la luz dentro del cultivo los canales se mantienen invariablemente poco profundos y, dado que la luz solar puede penetrar el agua del estanque solo a una profundidad limitada, generalmente tienen entre 25 y 30 cm de profundidad (Chang et al. 2017), lo cual incrementa el espacio requerido en la instalación y limita la productividad volumétrica del sistema. Además, debe tenerse en cuenta que la profundidad del reactor influye directamente en la transferencia de masa y calor. La menor profundidad de los canales reduce el tiempo de contacto entre la fase gaseosa y líquida y en consecuencia se pierde hasta un 80-90% del CO₂ burbujeado a la atmósfera, lo cual puede llevar a una limitación de carbono (Kumar et al., 2015).

Por otro lado, estos sistemas presentan algunos inconvenientes importantes, que incluyen alto riesgo de contaminación del cultivo, falta de control de temperatura, bajo crecimiento celular, lo que resulta en altos costos de recolección, y, el considerado más grave, mala transferencia de masa gas/líquido (Mendoza et al., 2013). No obstante, sigue siendo el sistema económicamente más viable a nivel comercial. Slade y Bauen (2013) estimaron el costo de producción de biomasa de microalgas en *raceway* y en fotobiorreactor tubular, y concluyeron que la producción en el

sistema abierto puede ser aproximadamente un 80% menor. Según Chisti (2016), el costo estimado para producir un estanque revestido de plástico de 100 ha de tierra compacta fue de aproximadamente USD 144,830 por ha en 2014. Aunque se han reportado altas productividades de biomasa, p. ej. 37 g m⁻² d⁻¹ (Moheimani & Borowitzka, 2006), por lo general se describen productividades mucho menores, como 1.6-3.5 g m⁻² d⁻¹ (García-González et al., 2003), y 4-10 g m⁻² d⁻¹ (Delrue et al., 2017). Esta variación también se reflejará en el costo de producción de biomasa, que, según Acién et al. (2019), generalmente es mayor a 4.5 €/kg. Delrue et al. (2017) estimaron que el costo de producción de *Spirulina* en estanques de canales oscila entre 3.8 y 9.5 €/kg dependiendo de la productividad del sistema. Fernández et al. (2019) estimaron que el costo de producir microalgas en un sistema de canales es 50% más bajo que en fotobiorreactores de capa delgada en cascada.

A pesar de ser una tecnología rudimentaria, los estanques de *raceways* siguen siendo una pieza clave para la expansión de los productos y procesos basados en el mercado de las microalgas, ya que son el sistema más económico y sencillo. Aun así, para que esto sea económicamente viable es necesario invertir en mejoras en los sistemas y procesos. En este sentido, varios investigadores y empresas han buscado soluciones a estos cuellos de botella tecnológicos. Ryu et al. (2019) acoplaron un intercambiador de calor a un biorreactor de laguna utilizando el flujo de residuos industriales como fuente de calor y como estrategia para mantener una alta productividad durante todo el año. Estos autores registraron un aumento de hasta un 44% en la productividad de los cultivos y un 95% en la viabilidad económica. Inostroza et al. (2021), optimizaron el diseño y la hidrodinámica de un “*raceway*” de 500 m², utilizando Dinámica de Fluidos Computacional (CFD). Eustance et al. (2020) mejoraron la eficiencia de utilización de CO₂ en tres veces mediante la carbonatación de membranas. Sirikulrat et al. (2021) utilizaron una columna de dispersión de luz transparente para mejorar la iluminación en el nivel más profundo de un estanque de canales profundos, lo que resultó en un incremento del 48.3% para la

productividad y decrementos de 41.7% en la energía consumida y de aproximadamente 14% en la evaporación del agua.

Estanques extensos sin mezclar y estanques naturales

Las microalgas cuando encuentran condiciones ambientales favorables y con suficientes nutrientes, pueden crecer abundantemente de forma natural. Esto ocurre invariablemente con especies extremófilas, que crecen en condiciones que limitan el crecimiento de microorganismos contaminantes, como pH ácido o alcalino, temperatura extrema y alta concentración de sal. El principal ejemplo de esto son los cultivos de *Arthrospira*, también conocida comercialmente como Spirulina, que se utilizan comúnmente como alimento, suplemento dietético y suplemento alimenticio. Este microorganismo crece naturalmente en lagos alcalinos tropicales y subtropicales, con un pH de crecimiento óptimo en el rango de 8 a 10. El primer registro de producción y consumo de biomasa de Spirulina es de los aztecas que solían cosechar *Arthrospira maxima* (conocido como Tecuitlatl por pre-Hispanos) del lago de Texcoco en el Estado de México, muy cerca del actual aeropuerto internacional de la Ciudad de México (Figura 3). La Spirulina, después de ser secada, se vendía para consumo humano en un mercado de

Tenochtitlán. La primera producción comercial de Spirulina, iniciada en la década de 1970, fue en el "Caracol", una extensa laguna sin sistemas de mezclado artificial de la compañía Sosa Texoco (Belay, 2008, Hamed, 2016). Antes del cierre a mediados de la década de 1990 debido al aumento de la contaminación, resultante del desarrollo urbano e industrial de la Ciudad de México, el 'Caracol' era un evaporador solar gigante en forma de espiral de 3200 m de diámetro con una superficie de 900 ha dentro del lago de Texcoco, que producía alrededor de 300 toneladas de biomasa por año. La productividad de la biomasa informada en este sistema fue de 10 g m⁻² d⁻¹ (Borowitzka, 1999; Tredici, 2004).

Las lagunas extensas no mezcladas o lagunas poco profundas se denominan así porque generalmente tienen menos de 0.5 m de profundidad, hasta 250 ha de área y no tienen un sistema de mezclado (artificial), excepto el viento y la convección. Aunque requieren una cierta cantidad de trabajo para su construcción y mantenimiento, a menudo se les conoce como lagunas naturales (Tredici, 2004; Kumar, 2015). Los estanques sin mezclado pueden representar el método de cultivo comercial más económico y menos técnico cuando las condiciones climáticas adecuadas permiten el cultivo durante casi todo el año, como es el caso de Australia. El país alberga a los 3 mayores productores de



Figura 3. Azteca cosechando espirulina en México. Drawing in *Human Nature*, marzo de 1978, por Peter T. Furst (Hamed, 2016).

β -caroteno de *Dunaliella salina* en el mundo. Esta especie contiene hasta un 14% de β -caroteno en las células y también se considera un microorganismo extremófilo, ya que crece en medios de cultivo de alta salinidad, con un rango óptimo entre 18 y 22% de NaCl (Borowitzka et al. 1984; Maroneze et al., 2020).

El proceso de cultivo en estos estanques abiertos consiste en bombear agua de mar desde el océano adyacente al estanque y luego se agregan nutrientes a esta agua salina. Cuando el sistema ha alcanzado la densidad celular y el contenido de β -caroteno apropiados, el cultivo se dirige a una planta de recolección. Después de la cosecha, el medio residual se recicla al estanque, donde se ajusta la salinidad y el contenido de nutrientes (Borowitzka, 1990). Las principales ventajas de los estanques extensivos no mezclados están relacionadas con los aspectos económicos, ya que operan sin adición de CO₂, sin mezclado artificial, lo cual evita cierto consumo de energía eléctrica, y con un control mínimo del sistema, operando bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos luz/obscuridad que se presentan en el lugar (del Campo, 2007). Las principales desventajas están asociadas con las limitaciones de especies de microalgas que se pueden cultivar y las condiciones climáticas, además de la baja productividad, que apenas supera el valor de 1 g m² d⁻¹, lo que dificulta y encarece la recolección de biomasa (Trediti, 2004; Kotzen et al., 2019).

Estos sistemas, a pesar de sus problemas, son realmente rentables para el crecimiento de microalgas extremófilas, especialmente de *D. salina* para la producción de β -caroteno, el cual es un producto de alto valor. Sin embargo, estos sistemas están extremadamente limitados a regiones con una irradiancia anual muy alta, clima cálido, escasas precipitaciones y principalmente alta disponibilidad de agua salina.

Sistemas cerrados

Fotobiorreactores tubulares

Entre los sistemas cerrados, los fotobiorreactores tubulares se consideran el diseño más prometedor y factible para la producción comercial de microalgas, particularmente para la obtención de productos de alto valor como productos

químicos finos o farmacéuticos (Torzillo & Zittelli, 2015; Zittelli et al., 2013). El éxito de estos fotobiorreactores se debe a la gran superficie, las condiciones de cultivo estables y controlables, la reproducibilidad y la alta productividad de la biomasa. Esto permite utilizar estos reactores para generar biomasa a partir de cepas sensibles como *H. pluvialis*, que fácilmente son presa de microorganismos contaminantes y son sensibles a condiciones ambientales extremas (Berstenhorst et al., 2009). Como ocurre con cualquier reactor biológico, la productividad depende de variables diversas, como la configuración geométrica, las especies de microalgas y las condiciones de funcionamiento y cultivo.

Los fotobiorreactores tubulares se describieron por primera vez en 1953 (Tamiya et al., 1953), pero no se consolidaron hasta la década de 1990, después de ser mejorados progresivamente (Gudin & Chaumont, 1983; Pirt et al., 1983; Chaumont et al., 1988; Richmond et al., 1993). Consisten en una serie de tubos de plástico o vidrio transparentes rectos, que se pueden organizar en diferentes patrones (p. ej., rectos, en zigzag o en espiral) y ángulos (p. ej., horizontales, inclinados, verticales o helicoidales) (Maroneze & Queiroz, 2018). El intercambio de gases y la adición de nutrientes generalmente ocurren en una columna de burbujas o tanque adicional. El cultivo de microalgas se recircula mediante una bomba o por *airlift* en un flujo muy turbulento, con una velocidad del líquido en el rango de 0.4 a 1.0 m s⁻¹ (Trediti, 2004; Abomohra et al., 2016; Chang et al., 2017).

Aunque los PBR tubulares son una tecnología consolidada, todavía tienen varias desventajas que superar, incluida la fotolimitación o fotoinhibición, problemas de transferencia de masa y alto costo (Huang et al., 2017). En cultivos de exterior, los problemas con la iluminación son habituales, en donde para mitigarlos, además de la elección de la ubicación, el diámetro y disposición de los tubos son determinantes. En general, se acepta que, a menor diámetro, menor fotolimitación, por lo tanto, mayor eficiencia fotosintética, pero hay un límite mínimo para evitar el límite de saturación lumínica. Los valores de diámetro recomendados oscilan entre 0.03 y 0.12 m. Como ya se ha comentado, el exceso de O₂ en cultivos autótrofos es tóxico para las

células y debe eliminarse de forma eficaz, en este sentido el PBR tubular tiene tasas de transferencia de masa relativamente bajas. El principal factor que afecta la acumulación de oxígeno disuelto es la longitud del colector solar, por tal motivo se sugieren longitudes máximas de 100 y 400 m para configuraciones de colector y serpentín, respectivamente (Acién et al., 2020). Recientemente, con el incremento del uso de PBR tubulares en plantas piloto, se han reportado problemas de contaminación, que hasta entonces era una de las grandes ventajas aparentes de tales sistemas.

Aunque tienen varios desafíos tecnológicos, la principal limitación a escala comercial de los reactores tubulares es el costo de inversión, que puede exceder el doble del monto reportado para los sistemas a base de canales. Según Nosker et al. (2011), este valor varía alrededor de 0.51 M €/ha a escala de 100 ha. En cuanto al costo de producción de biomasa, se han reportado valores de 4.15 €/kg (Nosker et al., 2011), 25 €/kg (Delrue et al., 2017), y 74 €/kg (Molina Grima, 2009). Uno de los factores que más incide en los costos de producción es la productividad de la biomasa y, en este sentido, se han alcanzado valores elevados en estos sistemas. Se han reportado productividades de biomasa de 10-40 g m² d⁻¹ para *Spirulina* (Delrue et al., 2017), 13 g m² d⁻¹ para *Haematococcus pluvialis* (Olaizola, 2000), y de 20 a 50 g m² d⁻¹ para *Scenedesmus* (Acién et al., 2012).

De hecho, estos sistemas de cultivo marcaron un gran avance para los procesos basados en microalgas, debido a que ha sido posible cultivar cepas sensibles a gran escala. Sin embargo, hasta el día de hoy solo son económicamente viables para la producción de compuestos de alto valor agregado, como la astaxantina, debido a la alta inversión requerida y los elevados costos de operación. Aun así, las ventajas de los fotobiorreactores tubulares, especialmente con relación a los altos rendimientos, sugieren que se debe investigar más para tratar de reducir costos y superar los cuellos de botella tecnológicos que limitan su uso generalizado.

Biorreactores para cultivos heterótrofos

La mayor ventaja del crecimiento heterótrofo es la posibilidad de utilizar casi cualquier fermentador como biorreactor. A

diferencia del crecimiento autótrofo, en heterótrofos el oxígeno puede ser un sustrato limitante y su suministro es uno de los mayores desafíos para la ingeniería de reactores debido a su baja solubilidad en agua (Pérez-García et al., 2011). Según Griffiths et al. (1960), independientemente del sustrato orgánico o de las especies de microalgas, la productividad de la biomasa aumenta con mayores niveles de aireación. Además de la transferencia de oxígeno, el crecimiento de microalgas en condiciones heterótrofas también presenta requerimientos relacionados con el mezclado, suministro de nutrientes y un ambiente estéril.

Para cumplir con estos requisitos, los reactores de tanque agitado (STR) son los más utilizados gracias a su eficiencia de mezclado, buena transferencia de calor y masa y fácil operación. En estos equipos la agitación se proporciona mecánicamente con la ayuda de impulsores, a veces deflectores, y aspersores de gas (Jossen et al., 2017). Sin embargo, este tipo de biorreactor también tiene varias limitaciones, especialmente para las células sensibles al cizallamiento, que pueden dañarse al aumentar la velocidad de agitación o a altas velocidades de suministro de gases (p. ej. aire), además de un alto consumo de energía, que incrementa significativamente los costos del proceso. Otro grupo de biorreactores de gran importancia para la industria biotecnológica son los denominados biorreactores neumáticos, en los que la agitación del medio se realiza mediante el burbujeo de aire. Estos reactores son generalmente de forma cilíndrica, donde el aire se inyecta en la base del recipiente a través de un aspersor, para proporcionar de manera simultánea aireación, mezclado y circulación de fluidos. Hay dos tipos principales de biorreactores agitados neumáticamente: biorreactores de columna de burbujeos y tipo "air lift", que generalmente generan bajo esfuerzo cortante, diseño y construcción simple y bajos costos de operación. Sin embargo, no se recomiendan para fluidos viscosos no newtonianos, ya que la viscosidad elevada disminuye la retención de gas y reduce la transferencia de masa (Jesus et al., 2017). Para superar los inconvenientes de los biorreactores de tanque neumáticos y agitados, se propusieron biorreactores *airlift* con agitación mecánica (Chisti & Jauregui-Haza, 2002).

Al igual que con otros sistemas ya discutidos, los costos de producción en biorreactores para cultivos heterótrofos varían en función de la especie de microalga usada, la productividad y el tipo de reactor. Sin embargo, en estos sistemas, la fuente de carbono orgánico es un factor importante por considerar, ya que representa alrededor del 80% del costo del medio de cultivo (Francisco et al., 2015). Según Enzing et al. (2014), los costos actuales de producción de *Chlorella* en biorreactores heterótrofos se estiman alrededor de USD 2-2.6/kg. Ende & Noke (2019) estimaron que este valor se puede reducir a USD 1-1.25/kg utilizando residuos como materia prima.

En términos de producción de biomasa, cuando se comparan con otros sistemas de cultivo, los biorreactores aplicados a cultivos heterótrofos suelen presentar los valores más altos de productividad. Xiong et al. (2008), encontraron una productividad de *Chlorella prototecoides* de $7.40 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en un STR de 5 l, utilizando glucosa como fuente de carbono. Francisco et al. (2015) reportaron $6.68 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en un biorreactor de columna de burbujeo de 2 l con aguas residuales de yuca. Queiroz et al. (2018) encontraron una productividad de biomasa de $4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en un biorreactor de columna de burbujeo de 2 l y usando aguas residuales de procesamiento de lácteos como materia prima.

La principal ventaja de los biorreactores heterótrofos radica en el escalado, factor crucial en los procesos consolidados basados en microalgas a escala industrial. Sin embargo, sigue siendo un método de cultivo caro, pero con potencial de expansión, especialmente si se asocia al concepto de biorrefinería, ya que las aguas residuales pueden utilizarse como medio de cultivo, con tratamiento secundario y terciario paralelo de los efluentes. Independientemente del tipo de biorreactor o medio de cultivo, los cultivos heterótrofos de microalgas presentan baja susceptibilidad a la contaminación, y por supuesto en menor grado que los estanques abiertos y biorreactores tubulares. Para reducir los riesgos de contaminación y mantener las condiciones axénicas en biorreactores, el uso de microalgas extremófilas puede ser una alternativa viable.

Sistemas de cultivo de microalgas en desarrollo

Con el objetivo de resolver los problemas de los sistemas consolidados, se han propuesto otros tipos de fotobiorreactores, p. ej. fotobiorreactores tubulares verticales, de placa plana e híbridos. Sin embargo, hasta donde sabemos, ninguno de ellos se utiliza actualmente a escala industrial, principalmente debido a la dificultad en escalar su construcción y operación, su costo alto, problemas de ingeniería para resolver a escala de producción, los requisitos de un área amplia para instalar estos sistemas de cultivo o porque aún son tecnologías emergentes (Ación et al., 2020).

Los fotobiorreactores de columna vertical estuvieron entre los primeros sistemas de cultivo de microalgas descritos en la literatura (Cook, 1950). Consiste en tubos transparentes verticales que permiten la penetración de la luz, cuentan con un aspersor de gas en la parte inferior del reactor, que además promueve el mezclado del medio de cultivo la transferencia de CO_2 y eliminación de O_2 (Kumar et al., 2011). Según su modo de flujo de líquido, los PBR tubulares verticales se pueden clasificar en columna de burbujas y airlift (Singh & Sharma, 2012). Estos sistemas son compactos con una alta relación área superficial/volumen, bajo riesgo de contaminación y alto crecimiento celular. Sin embargo, hasta ahora los PBRs de columna vertical no se utilizan en propuestas industriales debido a limitaciones en el escalado, que se atribuye a la fragilidad del material, la transferencia de gas en las regiones superiores del PBR, el control de temperatura y una superficie limitada para iluminación (Mirón et al., 1999; Koller, 2015; Maroneze & Queiroz, 2018). Un caso real de los problemas en el escalamiento es el caso de GreenFuel Technologies Corporation, en Arizona en 2007 con fotobiorreactores cerrados inclinados verticales. La compañía tuvo mucho éxito con una planta piloto para utilizar CO_2 residual para producir biomasa de microalgas en estos reactores, pero cuando realizaron un escalamiento 100 veces mayor, el sistema colapsó debido a fallas de diseño de tipo ingenieril. Desafortunadamente, el proyecto de millones de dólares fracasó (Waltz, 2009; Maroneze & Queiroz, 2018).

Los fotobiorreactores de placa plana se describieron por primera vez en la década de 1950 como una gran promesa para los cultivos de microalgas debido a su alta relación de superficie a volumen. En este tipo de fotobiorreactor, se pasa una fina capa de cultivo (en el orden de milímetros) a través de un panel plano hecho de un material transparente, donde la mezcla generalmente se proporciona burbujeando gases desde un lado o al fondo del PBR a través de un tubo perforado (rociador) (Chang et al., 2017; Faried et al., 2017). Se ha reportado que se pueden lograr altas eficiencias fotosintéticas en PBRs de placa plana y, además, el oxígeno disuelto es relativamente menor en comparación con los fotobiorreactores tubulares horizontales (Ugwu et al., 2008). Los paneles planos son una tecnología prometedora para generar altas concentraciones de biomas microalgal, sin embargo, existen problemas sin resolver para ser usados a escala comercial y por esto hasta ahora solo se utilizan a escala piloto. El “ensuciamiento” o “crecimiento en pared” se considera el principal defecto, el cual ocurre cuando las células se adhieren a las paredes de plástico o vidrio, provocando una disminución en la penetración de la luz y un mayor riesgo de contaminación (Chang, 2017). Estos sistemas también pueden experimentar problemas con el control de temperatura, dificultades en la limpieza y baja eficiencia en términos de producción en masa por unidad de espacio. Las dimensiones de los paneles planos son diversas, pero se recomiendan alturas inferiores a 1.5 m, con una anchura inferior a 0.10 m para evitar el uso de materiales de alta resistencia mecánica, por lo que el escalado se convierte en una limitación crítica, ya que se requieren de muchos módulos para una instalación comercial y por tanto se requiere una amplia área para su instalación (área para instalar los PBR). adicionalmente, el costo de operación es elevado porque, en comparación con otros tipos de PBRs a escala de producción, los sistemas de placas requieren una cantidad considerablemente mayor de trabajo de mantenimiento (Fernandez et al., 2013).

También existen sistemas híbridos, que combinan dos o más configuraciones de varios sistemas. En estos, la desventaja de un diseño se complementa con las ventajas del otro, permitiendo mayores productividades y

relación superficie / volumen además de menor demanda y costos de energía (Estrada-Graf et al., 2020). Soman & Shastri (2015) combinaron PBR de placa plana y tubulares, que tienen una relación superficie/volumen un 7% mayor, un mejor régimen de flujo y menores costos operativos y de materiales. Deprá et al. (2019) desarrollaron un reactor de columna de burbujas acoplado a una plataforma de iluminación con una reducción de costos de capital, potencializando el escalamiento del sistema, ya que el PBR requirió un área superficial menor. Un fotobiorreactor híbrido estanque-tubular fue desarrollado por Xu et al. (2020). En este se logró mejorar el rendimiento de biomasa de microalgas en un 31.2% en comparación con los estanques tradicionales. Recapitulando, estas tecnologías tienen potencial para generar mayores productividades de biomasa microalgal que los sistemas ya usados a escala mayor, pero aún se requiere más investigación y desarrollo para estar disponibles en cultivos a gran escala.

La elección del sistema de cultivo: Criterios y comparación de características básicas

Es notorio que aún numerosas barreras intervienen en la producción de microalgas y hasta el día de hoy no existe un sistema que se adapte a todos los procesos sin que se presenten algunas limitaciones. Teniendo esto en cuenta, se deben considerar algunos parámetros al elegir el biorreactor adecuado. Los principales criterios por considerar incluyen (i) tipo y calidad del producto objetivo; (ii) tolerancia de las cepas de microalgas a variaciones ambientales; (iii) escala de los sistemas de cultivo y productividad versus costo de las instalaciones y de operación; (iv) condiciones climáticas en las zonas a instalar los cultivos; y (v) impactos ambientales (Chang, 2017). Para apoyar en los criterios de elección, la Tabla 1 compara algunas de las características de las tecnologías discutidas en este artículo.

El primer factor por considerar es el tipo de producto, por ejemplo, para producir biocombustibles, es necesario un sistema que sea económico, hasta el punto de ser competitivo con los combustibles fósiles, como los estanques de canales. Para obtener productos con alto valor agregado, se pueden

considerar sistemas más robustos para obtener procesos más controlados, como es el caso de fotobiorreactores cerrados o cultivos en fermentadores si la cepa puede metabolizar fuentes de carbono orgánico. La especie de microalga debe estudiarse en cuanto a su resistencia al estrés hidrodinámico y los potenciales contaminantes. Como puede verse en la Tabla 1, los sistemas como los fermentadores heterótrofos, PBR vertical y PBR de placa plana son más susceptibles al estrés hidrodinámico, mientras que los sistemas abiertos tienen un bajo control de contaminación. En cuanto a la escala y el costo, es bien sabido que los sistemas abiertos y los fotobiorreactores tubulares tienen ventajas sobre los demás. La posición geográfica y el clima local son factores importantes, por ejemplo, los lugares con condiciones favorables son plausibles para albergar cultivos al aire libre, mientras que las regiones con climas menos favorables deben investigar la posibilidad de utilizar sistemas cerrados.

También se debe comparar el impacto ambiental de las tecnologías de cultivo de microalgas, debido a que la selección del reactor influye fuertemente en esos aspectos. Deprá et al. (2021) evaluó métricas e indicadores de sostenibilidad para sistemas comerciales de cultivo, es decir, estanque de canales, PBR tubular, PBR de placa plana y fermentador heterotrófico. A través de un análisis del ciclo de vida, estos autores demostraron que el sistema con mayor impacto ambiental fue el fotobiorreactor tubular, mientras que el estanque de *raceway* presentó el menor impacto ambiental entre las configuraciones evaluadas. Esto está relacionado directamente con la demanda energética de cada sistema, corroborando lo que se muestra en la Tabla 1.

Casos comerciales de éxito

Se espera que el mercado de productos a base de microalgas supere valores de USD 4.2 billones para 2031. Las empresas del mercado de productos a base de microalgas están fortaleciendo sus

capacidades de producción para satisfacer la creciente demanda de estos productos. La Tabla 2 resume algunas de las empresas involucradas en la producción de productos a base de microalgas en todo el mundo con sus respectivos sistemas de producción, principales productos y especies utilizadas.

Los primeros casos de éxito comercial en el área de microalgas fueron con la producción de *Spirulina* y hasta el momento, los mayores productores de esta microalga utilizan estanques de *raceway*, como Zhejiang Binmei Biotechnology, Earthrise Farms y Parry Nutraceuticals, ubicados en China, Estados Unidos e India, respectivamente. Los dos mayores productores de β -caroteno a partir de *D. salina* en el mundo son Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd. en Australia y utilizan estanques extensos sin mezclar para el crecimiento de microalgas. Aunque son utilizados solo por una parte de las empresas basadas en microalgas, los biorreactores para cultivos heterótrofos y mixotróficos también han ganado importancia (Borowitzka, 2018). Solazyme en Brasil ha logrado una producción industrial exitosa de biomasa heterotrófica de microalgas para la producción de aceites, combustibles, productos de cuidado personal en fermentadores (Barros et al., 2019).

Un caso exitoso destacado fue el de Algatechnologies Ltd. (Ketura, Israel), que estableció un proceso de dos etapas para la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* en PBR tubulares (Ayalon, 2014). Cabe mencionar que el desarrollo de cultivos en reactores tubulares cerrados fue un mito en la producción de astaxantina, ya que *H. pluvialis*, el mayor productor de este pigmento, presenta un bajo rendimiento en sistemas abiertos, por ser una especie sensible (Olaizola, 2000). Los cultivos en dos o más etapas están ganando terreno en los procesos industriales, como es el caso de AllMicroalgae en Portugal, que utiliza un proceso de tres etapas, con fermentadores, PBR de placa plana y PBR tubulares, como se muestra en la Tabla 2.

Artículos

Tabla 1. Comparación de diferentes sistemas de cultivo.

| Sistema de cultivo | Eficiencia de mezcla | Eficiencia de iluminación | Control de temperatura | Transferencia de gas | Control de contaminación | Estrés hidrodinámico | Evaporación | Consumo de energía | Escalamiento | Status |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|-------------|--------------------|--------------|---------------|
| Raceways | Justo | Baja | Sin | Baja | Bajo | Muy bajo | Alta | Bajo | Fácil | Comercial |
| Estanques extensos sin mezclar | Muy pobre | Baja | Sin | Baja | Bajo | Bajo | Alta | Bajo | Fácil | Comercial |
| PBR tubular | Uniforme | Excelente | Buen | Baja | Alto | Alto | Baja | Alto | Fácil | Comercial |
| Fermentador heterótrofo | Uniforme | - | Buen | Alta | Alto | Alto | Baja | Alto | Fácil | Comercial |
| PBR vertical | Uniforme | Buena | Buen | Alta | Alto | Alto | Baja | Alto | Difícil | Escala piloto |
| PBR de placa plana | Uniforme | Excelente | Sin | Alta | Alto | Alto | Baja | Justo | Difícil | Escala piloto |
| Híbridos | Uniforme | Excelente | Regular | Alta | Regular | Alto | Justo | Justo | Fácil | Escala piloto |

Tabla 2. Algunos de los productores comerciales de productos a base de microalgas en todo el mundo.

| Microalgae | Product | Company | Location | Culture system |
|---|---|--------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| <i>H. pluvialis</i> , <i>A. platensis</i> | Astaxantina, Ficocianina | Cyanotech | Hawaii | Tubular, Raceways |
| <i>H. pluvialis</i> | Astaxantina | Mera Pharmaceuticals | Hawaii | Tubular, Raceways |
| <i>H. pluvialis</i> | Astaxantina | AstaReal | Suecia | Vertical |
| <i>H. pluvialis</i> | Astaxantina | Algatechnologies | Israel | Tubular |
| <i>H. pluvialis</i> | Astaxantina | Beijing Gingko Group | China | Tubular |
| <i>D. salina</i> | β -caroteno | Betatene (BASF) | Australia | Estanques extensos sin mezclar |
| <i>D. salina</i> | β -caroteno | Western Biotechnology | Australia | Estanques extensos sin mezclar |
| <i>D. salina</i> | β -caroteno | AquaCaroteno | Australia | Estanques extensos sin mezclar |
| <i>D. salina</i> | β -caroteno | Cyanotech | Hawaii | Raceways |
| <i>D. salina</i> | B-caroteno | Nature Beta Technologies | Israel | Raceways |
| <i>D. salina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>A. platensis</i> | β -caroteno, tabletas. aceite de astaxantina, ficocianina | Tianjin Lantai Biotechnologies | China | Raceways |
| <i>A. platensis</i> | Ficocianina | Zhejiang Binmei Biotechnology | China | Raceways |
| <i>A. platensis</i> | Ficocianina | Earthrise Farms | Estados Unidos | Raceways |
| <i>A. platensis</i> | Ficocianina | Parry Nutraceuticals | India | Raceways |
| - | Ingredientes, biocombustibles, compuestos bioactivos | Algenol | Estados Unidos | Tubular |
| - | Grasas, biocombustibles, cosméticos y otros | Solazyme | Brszil | Fermentador |
| - | Grasas, biocombustibles | Cellana | Estados Unidos | Raceways, Tubular |
| <i>Tetraselmis chui</i> , <i>Spirulina</i> , <i>C. vulgaris</i> . | Fertilizantes, alimentos, piensos | All microalgae | Portugal | Fermentador + Placa plana + Tubular |
| - | Biodiesel, alimentos, piensos | AlgaEnergy | España | Raceways, Placa plana, Tubular |

Conclusiones

Las microalgas han suscitado un gran interés en todo el mundo debido a su enorme aplicación biotecnológica en los diversos campos de los biocombustibles, alimentos y piensos, cosmética, farmacia y remediación medioambiental. Incluso con las importantes mejoras tecnológicas alcanzadas hasta ahora, el establecimiento de procesos basados en microalgas tiene una miríada de cuellos de botella, particularmente en las tecnologías de producción en masa. Los principales inconvenientes están asociados al costo de construcción y operación, el escalamiento, la transferencia de masa y un conocimiento limitado sobre los nuevos sistemas de cultivo. No existe un sistema de cultivo ideal universalmente, y la tecnología ideal aún depende del producto objetivo, las especies de microalgas y las condiciones ambientales.

A menudo se ha informado que los sistemas de cultivo abiertos no se recomiendan para la producción de productos de alto valor agregado. Sin embargo, podemos ver que en términos de la realidad industrial esto no se aplica, ya que los problemas de costos de inversión y mantenimiento son más significativos. Con base en lo discutido, es posible concluir que, en la actualidad, los estanques de *raceways* y los fotobiorreactores tubulares son los únicos sistemas capaces de producir biomasa a escala comercial con posibilidad de aplicación en las regiones del mundo más diversas. Además, es importante enfatizar que los avances recientes en esta área son cruciales para consolidar el mercado de productos a base de microalgas en un futuro próximo.

Referencias

- Abomohra A, Jin W, Tu R, Han S, Eid M, Eladel H (2016) Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 64: 596-606. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>
- Abu-Ghosh S, Fixler D, Dubinsky Z, Iluz, D (2016) Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource technology* 203: 357-363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>
- Acíen Fernandes FG, Molina E, Reis A, Torzillo G, Zittelli GC, Sepúlveda C, Masojídek J (2017) Photobioreactors for the production of microalgae. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Gonzalez-Fernandez C, Muñoz E (Eds). Woodhead Publishing, Sawston, UK. pp.1-44.
- Acíen Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (2019) Costs analysis of microalgae production. In: *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 2nd Edition. Lee DJ, Pandey A, Chang JS, Chisti Y, Soccol C (Eds). Elsevier, New York, NY. pp.551-566.
- Acíen Fernández FG, Fernández-Sevilla JM, Moya BL, Grima EM (2020) Microalgae production systems. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Jacob-Lopes E, Maroneze MM, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Academic Press. pp. 127-163.
- Assunção J, Malcata FX (2020) Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. *Algal Research* 52: 102107. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>
- Ayalon O (Algatechnologies Ltd.) (2014) Astaxanthin derivatives for heat stress prevention and treatment. WO2014057493 A1.
- Barros A, Pereira H, Campos J, Varela J, Silva J (2019) Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Nature Scientific Reports* 9: 13935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z>
- Belay A (2008) Spirulina (Arthrospira): production and quality assurance. In: *Spirulina in human nutrition and health*. Gershwin ME, Amha EB (Eds) CRC Press, London, UK. pp. 2-23.
- Berstenhorst SM, Hohmann H-P, Stahmann K-P (2009) Vitamins and vitamin-like compounds: microbial production. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Schaechter M (Ed). Elsevier, New York, NY. pp.549-561.

- Blanken W, Cuaresma M, Wijffels RH, Janssen M (2013) Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research* 2:333–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Borowitzka LJ, Borowitzka MA, Moulton T (1984) The mass culture of *Dunaliella* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. Eleventh International Seaweed Symposium. *Developments in Hydrobiology*, vol 22. Bird C.J., Ragan M.A. (Eds). Springer, Dordrecht. pp.115-121.
- Borowitzka M (2018) Commercial-Scale Production of Microalgae for Bioproducts. In: *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*. La Barre S, Bates SS (Eds) Wiley, Hoboken, NJ. pp. 33-65.
- Borowitzka MA (1990) The mass culture of *Dunaliella salina*. In: *Technical Resource Papers. Regional Workshop on the Culture and Utilisation of Seaweeds 2. Regional Seafarming Development and Demonstration Project*, FAO Network of Aquaculture Centres in Asia: Bangkok, Thailand. pp. 63-80.
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70:313-321.
- Brusca S, Famoso F, Lanzafame R, Messina M and Wilson J (2017) A site selection model to identify optimal locations for microalgae biofuel production facilities in Sicily (Italy). *International Journal of Applied Engineering Research* 12: 16058-16067.
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX (2011) Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology* 89(5): 1275-1288. [10.1007/s00253-010-3047-8](https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8)
- Chang JS, Show PL, Ling TC, Chen CY, Ho SH, Tan CH, Nagarajan D, Phong WN (2017) Photobioreactors. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Larroche C, Sanroman M, Du G, Pandey A (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 313-352.
- Chaumont D (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5: 593–604. <https://doi.org/10.1007/BF02184638>
- Chaumont D, Thepenier C, Gudín C (1988) Scaling up a tubular photoreactor for continuous culture of *Porphyridium cruentum* - From laboratory to pilot plant. In: *Algal Biotechnology*. Stadler T, Morillon J, Verdus MC, Karamanos W, Morvan H, Christiaen D (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 199-208.
- Chew KW, Chia SR, Show PL, Yap YJ, Ling TC, Chang JS (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 91: 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Chisti Y (2009) Mass transfer. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Flickinger MC (Ed). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp.1-38.
- Chisti Y, Jauregui-Haza UJ (2002) Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 10: 143-153. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00174-7)
- Chisti, Y (2016) Large-scale production of algal biomass: Raceway ponds. In: *Algae Biotechnology: Products and Processes*. Bux F, Chisti Y. (Eds). Springer, New York, pp. 21-40.
- Daneshvar E, Ok YS, Tavakoli S, Sarkar B, Shaheen SM, Hong H, Bhatnagar A (2021) Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology* 329: 124870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 1163-1174. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.019>

- Delrue F, Alaux E, Moudjaoui L, Gaignard C, Fleury G, Perilhou A, Sassi JF (2017) Optimization of *Arthrospira platensis* (Spirulina) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation* 3: 59. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040059>
- Deprá MC, Mérida LG, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2019) A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. *Chemical Engineering Research and Design* 144: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
- Dias RR, Lasta, P, Vendruscolo RG, Wagner R, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation. Part II: equatorial and tropical climate zone. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 96: 613-621. <https://doi.org/10.1002/jctb.6574>
- Ende SSW, Noke A (2019) Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. *Journal of Applied Phycology* 31: 1565-1571. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1697-6>
- Enzing C, Sijtsma L, Parisi C, Viganì M, Barbosa M, Ploeg M, Rodrigues Cerezo E (2014) Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. European Commission, Luxembourg.
- Estrada-Graf A, Hernández S, Morales M (2020) Biomitigation of CO₂ from flue gas by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM using a hybrid photobioreactor coupled to a biomass recovery stage by electro-coagulation-flotation. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 28561-28574. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08240-2>
- Eustance E, Lai YJS, Shesh T, Rittmann BE (2020) Improved CO₂ utilization efficiency using membrane carbonation in outdoor raceways. *Algal Research* 51: 102070. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102070>
- Falk S, Maxwell DP, Laudenbach DE, Huner NP (1996) Photosynthetic adjustment to temperature. In *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 5. Baker NR (Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 367-383.
- Fariéd M, Samer M. Abdelsalam E, Yousef RS, Attia YA, Ali AS (2017) Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent Advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 893-913. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>
- Fernandez FGA, Sevilla JMF, Grima EM (2013) Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12: 131-151. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9307-6>
- Fetanat A, Tayebi M, Mofid H (2021) Water-energy-food security nexus based selection of energy recovery from wastewater treatment technologies: An extended decision making framework under intuitionistic fuzzy environment. *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 43: 100937. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2020.100937>
- Francisco EC, Franco TT, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2015) From waste-to-energy: The process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3: 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.017>
- Fu J, Huang Y, Liao Q, Xia A, Fu Q, Zhu X (2019) Photo-bioreactor design for microalgae: a review from the aspect of CO₂ transfer and conversion. *Bioresource technology* 292: 121947. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121947>
- García-González M, Moreno J, Canavate J, Anguis V, Prieto A, Manzano C, Florencio FJ, Guerrero MG (2003) Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology* 15: 177-184.
- García-Mañas F, Guzmán JL, Berenguel M, Ación FG (2019) Biomass estimation of an industrial raceway photobioreactor using an extended Kalman filter and a dynamic model for microalgae production. *Algal Research* 37: 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.009>

- Griffiths DJ, Thresher CL, Street HE (1960) The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (brannon no. 1 strain). *Annals of Botany* 24: 1-11. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083682>
- Gudin C, Chaumont D (1983) Solar biotechnology study and development of tubular solar reactors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. In: *Proceedings of the Workshop and E.C. Contractor's Meeting in Capri*. Palz, W., Pirwitz, D. (Eds). D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, pp.184-193.
- Hamed I (2016) The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15: 1104-1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>
- Harmelen TV, Oonk H (2006) Microalgae biofixation processes: applications and potential contributions to greenhouse gas mitigation options. In: *International network on biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae operated under the international energy agency greenhouse gas R&D programme*. Apeldoorn, The Netherlands.
- Holdmann C, Schmid-Staiger U, Hirth T (2019) Outdoor microalgae cultivation at different biomass concentrations — Assessment of different daily and seasonal light scenarios by modeling. *Algal Research* 38: 101405-102413. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101405>
- Huang JJ, Lin S, Xu W, Cheung PCK (2017) Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology advances* 35: 597-618. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001>
- Inostroza C, Solimeno A, García J, Fernández-Sevilla JM, Acién FG (2021) Improvement of real-scale raceway bioreactors for microalgae production using Computational Fluid Dynamics (CFD). *Algal Research* 54: 102207. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102207>
- Jareonsin S, Pumas C (2021) Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 628597. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628597>
- Jesus SS, Neto JM, Filho RM (2017) Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: a comparative study. *Biochemical engineering journal* 118: 70-81.
- Jossen V, Eibl R, Pörtner R, Kraume M, Eibl D (2017) Stirred Bioreactors. In: *Current State and Developments, With Special Emphasis on Biopharmaceutical Production Processes*. Larroche C, Sanromán MA, Du G, Pandey A (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 179-215.
- Katiyar R, Gurjar BR, Bharti RK, Kumar A, Biswas S, Pruthi V (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. *Renewable Energy* 113: 1359-1365. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.100>
- Kazbar A, Cogne G, Urbain B, Marec H, Le-Gouic B, Tallec J, Pruvost J (2019) Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research* 39: 101432. [doi:10.1016/j.algal.2019.101432](https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432)
- Khan, MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories* 17: 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kirnev PCS, Carvalh JC, Vandenberghe LPS, Karp SG, Soccol CR (2020) Technological mapping and trends in photobioreactors for the production of microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02819-0>

- Kitaya Y, Xiao L, Masuda A, Ozawa T, Tsuda M, Omasa K (2008) Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O₂ and CO₂ concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp.. In: Nineteenth International Seaweed Symposium. Developments in Applied Phycology, vol 2. Borowitzka MA, Critchley AT, Kraan S, Peters A, Sjøtun K, Notoya M (Eds). Springer, Dordrecht, pp.287-292.
- Koller M (2015) Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. In: Algal biorefineries volume 2: Products and refinery design. Prokop A, Bajpai RK, Zappi ME (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.139-186.
- Kotzen B., Emerenciano MGC, Moheimani N, Burnell GM (2019) Aquaponics: Alternative Types and Approaches. In: Aquaponics Food Production Systems. Goddek S, Joyce A, Kotzen B, Burnell G. (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp.301–330.
- Kumar K, Dasgupta CN, Nayak BK, Lindblad P, Das D (2011) Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* 102: 4945-53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>
- Kumar K, Mishra SK, Shrivastav A, Park MS, Yang JW (2015) Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51: 875-885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>
- Kwan PP, Banerjee S, Shariff M, Yusoff F (2020) Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research* 52: 1337–1347. <https://doi.org/10.1111/are.15023>
- Leone G, De la Cruz Valbuena G, Cicco SR, et al. (2021) Incorporating a molecular antenna in diatom microalgae cells enhances photosynthesis. *Scientific Reports* 11: 5209. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84690-z>
- Maroneze MM, Barin JS, Menezes CR, Queiroz MI, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2014) Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Scientia Agricola* 71: 521-524. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0092>
- Maroneze MM, Deprá MC, Zepka LQ, Jacob-Lopes, E (2019) Artificial lighting strategies in photobioreactors for bioenergy production by *Scenedesmus obliquus* CPCC05. *SN Applied Sciences* 1: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1761-0>
- Maroneze MM, Dias RR, Severo IA, Queiroz MI (2020) Microalgae-Based Processes for Pigments Production. In *Pigments from Microalgae Handbook*. Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 241-264.
- Maroneze MM, Queiroz MI (2018) Microalgal Production Systems with Highlights of Bioenergy Production. In: *Energy from Microalgae*. Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 5-34.
- Maroneze MM, Siqueira SF, Vendruscolo RG, Wagner R, Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2016) The role of photoperiods on photobioreactors – A potential strategy to reduce costs. *Bioresource Technology* 219: 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.003>
- Martín-Girela I, Curt MD, Fernández J (2017) Flashing light effects on CO₂ absorption by microalgae grown on a biofilm photobioreactor. *Algal research* 25: 421-430. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.008>
- Mendoza JK, Granados MR, Godos I, Ación FG, Molina E, Heaven S, Banks CJ (2013) Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways *Bioresource Technology* 137: 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127>

- Mirón AS, Gómez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y (1999) Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology* 70: 249-270. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00079-6)
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2006) The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology* 18: 703-712. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9075-1>
- Molina Grima E (2009) Algae biomass in Spain: a case study. First European Algae Biomass Association conference & general assembly, Florence, Italy.
- Neves C, Maroneze MM, Santos AMD, Francisco EC, Wagner R, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2016) Cassava processing wastewater as a platform for third generation biodiesel production. *Scientia Agricola* 73: 412-416. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0302>
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Microalgal production-A close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29: 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 12: 499-506. <https://doi.org/10.1023/A:1008159127672>
- Olguín EJ, Galicia S, Mercado G, Pérez T (2003) Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology* 15: 249-257. <https://doi.org/10.1023/A:1023856702544>
- Patel AK, Choi YY, Sim SJ (2020) Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. *Bioresource technology*, 300: 122741. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122741>
- Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*.45: 11-36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pirt SJ, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HHM, Bazin MJ (1983) A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 33: 35-58.
- Pleissner D, Smetana S (2020) Estimation of the economy of heterotrophic microalgae-and insect-based food waste utilization processes. *Waste Management* 102: 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.031>
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Lin, C. S. K. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource technology*, 137, 139-146.
- Queiroz MI, Maroneze MM, Manetti AGDS, Vieira JG, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2018) Enhanced single-cell oil production by cold shock in cyanobacterial cultures. *Ciência Rural* 48: 1-8. [10.1590/0103-8478cr20180366](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180366)
- Ramírez-Mérida LGR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2017) Current Production of Microalgae at Industrial Scale. In: *Recent Advances in Renewable Energy*. Pires JCM (Ed.). Bentham Science Publishers, Sharjah, pp. 242-260.
- Ras M, Steyer JP and Bernard O (2013) Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12: 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Raso S, Genugten BV, Vermuë M, Wijffels RH (2012) Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *Journal of Applied Phycology* 24: 863-871. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9706-z>

- Rastogi RP, Madamwar D, Nakamoto H, Incharoensakdi A (2019) Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 43: 100322. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2019.100322
- Reyna-Velarde R, Cristiani-Urbina E, Hernández-Melchor DJ, Thalasso F, Cañizares-Villanueva RO (2010) Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49: 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.11.014>
- Richmond A (1990) Large scale microalgal culture and applications. In: *Progress in Phycological Research*. Round FE, Chapman DJ (Eds). Biopress Ltd, Britol, pp.269-330.
- Richmond A, Boussiba A, Vonshak A, Kopel R (1993) A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal of Applied Phycology* 5: 327-332. <https://doi.org/10.1007/BF02186235>
- Ryu KH, Lee JY, Heo S, Lee J (2019) Improved microalgae production by using a heat supplied open raceway pond. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 21: 9099-9108. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00986>
- Schipper K, Das P, Al Muraikhi M, AbdulQuadir M, Thaher MI, Al Jabri HMS, Wiffels RH Barbosa MJ (2021) Outdoor scale-up of *Leptolyngbya* sp.: Effect of light intensity and inoculum volume on photoinhibition and-oxidation. *Biotechnology and Bioengineering*. 118: 2368-2379. <https://doi.org/10.1002/bit.27750>
- Singh RN, Sharma S (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 2347-2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Siqueira SF, Maroneze MM, Dias RR, Vendruscolo RG, Wagner R, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation: geographic position and local climate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95: 2411-2420. <https://doi.org/10.1002/jctb.6423>
- Sirikulrat K, Jeeraporn P, Pumas C (2021) Illumination system for growth and net energy ratio enhancement of *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis outdoor cultivation in deep raceway pond. *Bioresource Technology Reports* 14: 100661. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100661>
- Slade R, Bauen A (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and bioenergy*, 53, 29-38. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects
- Soman A, Shastri Y (2015) Optimization of novel photobioreactor design using computational fluid dynamics. *Applied Energy* 140: 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.072>
- Soni RA, Sudhakar K, Rana RS (2017) *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review. *Trends in Food Science & Technology* 69: 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Sousa, C., Compadre, A., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, 2(2), 122-126. doi:10.1016/j.algal.2013.01.007
- Speranza LG, Ingram A and Leeke GA, Assessment of algae biodiesel viability based on the area requirement in the European Union, United States and Brazil. *Renew Energy* 78:406-417 (2015).

- Tamiya H, Hase E, Shibata K, Mituya A, Iwamura T, Nihei T, Sasa T (1953) Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature. In: *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*. Burlew JS (Ed).. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, pp. 204-232.
- Tang DYY, Khoo KS, Chew KW, Tao Y, Ho SH, Show PL (2020) Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource technology* 304: 122997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122997>
- Torzillo G, Chini Zittelli G (2015) Tubular Photobioreactors. In: *Algal biorefineries volume 2: Products and refinery design*. Prokop A, Bajpai RK, Zappi ME (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.187-212.
- Transparency Market Research. (2018). *Algae Market (Cultivation Technology: Open Ponds Cultivation Technology, Raceway Ponds Cultivation Technology, Closed Photo bioreactor Cultivation Technology, and Closed Fermenter Systems Cultivation Technology; Application: Marine Sector, Aviation Sector, Road Transport, DHA Production (Protein Sales), DHA Production (Pharmaceutical Applications), Bioplastics, and Others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2019 – 2027*.
- Trediti MR (2004) Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond A. (Ed). Wiley, Hoboken, NJ. pp.178-214.
- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99: 4021-4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Uyar B, Kapucu N (2015) Passive temperature control of an outdoor photobioreactor by phase change materials. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90: 915-920. <https://doi.org/10.1002/jctb.4398>
- Waltz E (2009) Biotech's green gold? *Nature Biotechnology* 27: 15-18. <https://doi.org/10.1038/nbt0109-15>
- Wibisono Y, Agung Nugroho W, Akbar Devianto L, Adi Sulianto A, Roil Bilad M (2019) Microalgae in food-energy-water nexus: A review on progress of forward osmosis applications. *Membranes* 9: 166. <https://doi.org/10.3390/membranes9120166>
- Xiong W, Li X, Xiang J, Wu Q (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1285-1>
- Xu J, Cheng J, Xin K, Xu J, Yang W (2020) Strengthening flash light effect with a pond-tubular hybrid photobioreactor to improve microalgal biomass yield. *Bioresource Technology* 318: 124079. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124079>
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Nagarajan, D., & Chang, J.-S. (2019). Design of photobioreactors for algal cultivation. In: Pandey, A. (Ed). *Biofuels from Algae*, pp. 225–256.
- Yin Z, Zhu L, Li S, Hu T, Chu R, Mo F, Li B (2020) A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource technology* 301: 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
- Zhan J, Rong J, Wan Q (2017) Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy* 42: 8505–8517. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.021
- Zitelli GC, Rodolfi L, Bassi N, Biondi N, Tredici MR (2013) Photobioreactors for biofuel production. In: *Algae for biofuels and energy*. Borowitzka MA, Moheimani NR (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.115-131.

Ficocianina y su acumulación en la microalga roja *Galdieria sulphuraria*

Francisco Vera-López Portillo², Carlos A. Montenegro-Herrera²,
Ricardo A. Alvarado-Cosío¹, Alfredo Martínez Jiménez², Helena Porta Ducoing*¹

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, ²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos.

helena.porta@ibt.unam.mx

Resumen

La microalga roja *Galdieria sulphuraria* ha llamado el interés de diferentes industrias como la alimentaria y la farmacéutica por ser un organismo del cual se puede obtener la proteína pigmentada denominada ficocianina (FC). Esta proteína se participa directamente en la absorción de fotones durante el proceso de fotosíntesis en condiciones de baja intensidad de luz. Actualmente la FC se extrae de cultivos autótrofos de la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Sin embargo, obtener este pigmento a partir de cultivos de la microalga *G. sulphuraria* es atractivo debido a que es un microorganismo extremófilo, capaz de crecer a pH menores de 3 y temperaturas mayores a 40 °C, lo cual ayuda a mantener los cultivos axénicos. Además, dicha microalga es capaz de crecer en condiciones heterótrofas (en ausencia de luz), mixótrofas y autótrofas. Adicionalmente, la FC extraída de *G. sulphuraria* presenta una termoestabilidad mayor a la extraída por *A. platensis*. En este trabajo se presenta un panorama general de la ficocianina, su función y estructura, así como las características generales de *G. sulphuraria*, los tipos de cultivos evaluados para su crecimiento y las estrategias para incrementar la acumulación de FC. Entre estas estrategias destacan, la fuente de carbono, intensidad y longitud de onda de la luz, técnicas de cultivo y el papel de la FC como reservorio de nitrógeno.

Palabras clave: Ficocianina, Microalga roja, *Galdieria sulphuraria*.

Abstract

The red microalgae *Galdieria sulphuraria* has attracted the interest of different industries, such as food and pharmaceuticals, since it is a source of the protein-pigment called phycocyanin (PC). This protein is directly involved in the absorption of photons during the photosynthesis process at low light conditions. Currently this protein is obtained from autotrophic cultures of the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. However, some culture characteristics makes attractive the use of *G. sulphuraria* to produce PC. This extremophilic microalga can thrive at pH values lower than 3 and temperatures above 40 °C, which helps to maintain axenic cultures. Furthermore, this microalga can grow under heterotrophic (in the absence of light), autotrophic and mixotrophic conditions. The extracted PC from this microalga has a higher thermostability than the obtained from *A. platensis*. In this work an overview of phycocyanin function and structure, as well as the general characteristics of microalgae *G. sulphuraria*, the diversity of cultures for its growth assessment, and the strategies used to increase PC accumulation is presented. These strategies include the use of different carbon sources, intensity and wavelength of light, culture techniques, and the role of PC as a nitrogen reservoir.

Key words: Phycocyanin, Red microalgae, *Galdieria sulphuraria*.

Introducción

La ficocianina (FC) es un pigmento fotosintético accesorio que se encuentra presente en cianobacterias y en las microalgas rodofitas, criptofitas y glaucofitas. Esta proteína está catalogada como una ficobiliproteína (FBP), que en conjunto con otras FBP (aloficocianina y ficoeritrina, principalmente) constituyen complejos supramoleculares altamente organizados denominados ficobilisomas (Glazer and Clark, 1986). Estos complejos son los principales recolectores de luz en las cianobacterias y algunos *phyla* de microalgas (figura 1).

Las FBP abarcan cerca del 80% del peso seco del ficobilisoma, el 20% restante lo conforman proteínas no pigmentadas, las cuales se encargan de unir y estabilizar el ficobilisoma a la membrana externa del tilacoide (Bryant et al., 1979). Una de las funciones de los tilacoides es capturar la energía lumínica para luego transferirse a los centros de reacción, donde se lleva a cabo la fotólisis del agua generando electrones, protones y oxígeno (MacColl, 1998).

Las FBP se encuentran ordenadas en los ficobilisomas con base en la emisión de fluorescencia y absorción de cada FBP (figura 1) y se sugiere que la transición de fotones se lleva a cabo en el siguiente orden: ficoeritrina → ficocianina → aloficocianina → fotosistemas I ó II (Zilinskas and Howell, 1983). Un modelo del proceso de absorción y utilización de energía presente en las plantas y microalgas se muestra en la figura 2.

Ficocianina, usos, estructura y estabilidad

La FC (figura 3A) es un pigmento fotosintético de color azul brillante. La coloración característica se debe a que su estructura contiene un tetrapirrol lineal denominado ficocianobilina que en su estructura tiene enlaces dobles y sencillos alternados (sistema conjugado; figura 3B), que le permiten deslocalizar electrones en respuesta a una excitación luminosa a una longitud de onda máxima de 620 nm; este tetrapirrol se encuentra estabilizado dentro de la proteína por la unión a un residuo cisteína mediante un enlace tioéster (Mulders et al., 2014).

Dos subunidades proteicas conforman a la ficocianina, una denominada α (~18 kDa) y la otra β (~20 kDa). Las diferencias entre éstas versan, principalmente, en que la subunidad β cuenta con dos moléculas del cromóforo ficocianobilina, mientras que la subunidad α sólo presenta una. La conformación de la proteína cuaternaria depende del pH en el que se encuentra: en un rango de pH de 5 a 6 la conformación mayoritariamente se encuentra es un hexámero $(\alpha\beta)_6$, mientras que a un pH de 7 la estructura cuaternaria se encuentra principalmente en forma de trímero $(\alpha\beta)_3$ (Bryant et al., 1979).

La producción de FC, al igual que otros colorantes naturales del ficobilisoma, es atractiva a múltiples industrias, principalmente la alimentaria y la farmacéutica, debido a que existen reportes en donde se demuestra que los colorantes químicos se encuentran

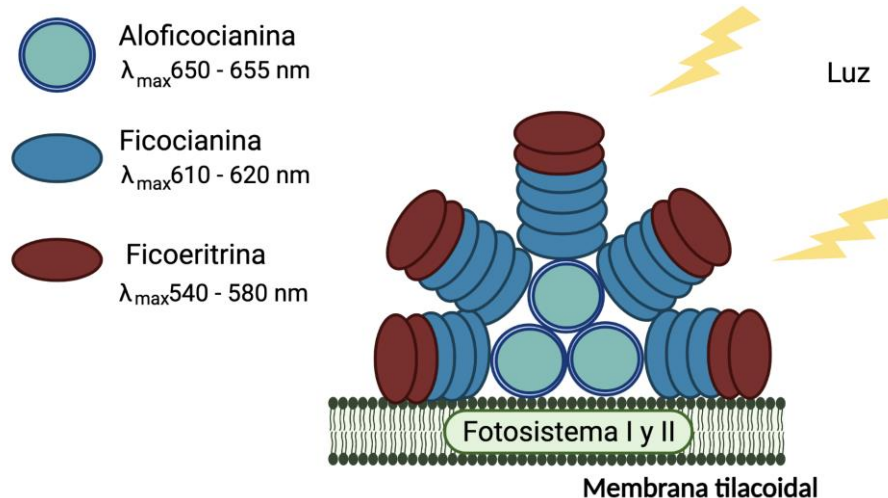


Figura 1. Diagrama del ficobilisoma situado en la membrana tilacoideal. Se presenta la distribución de ficobiliproteínas que funcionan como fotorreceptores y transfieren la energía hacia los fotosistemas I y II.

(Modificado de Gaiqnard et al. 2019).

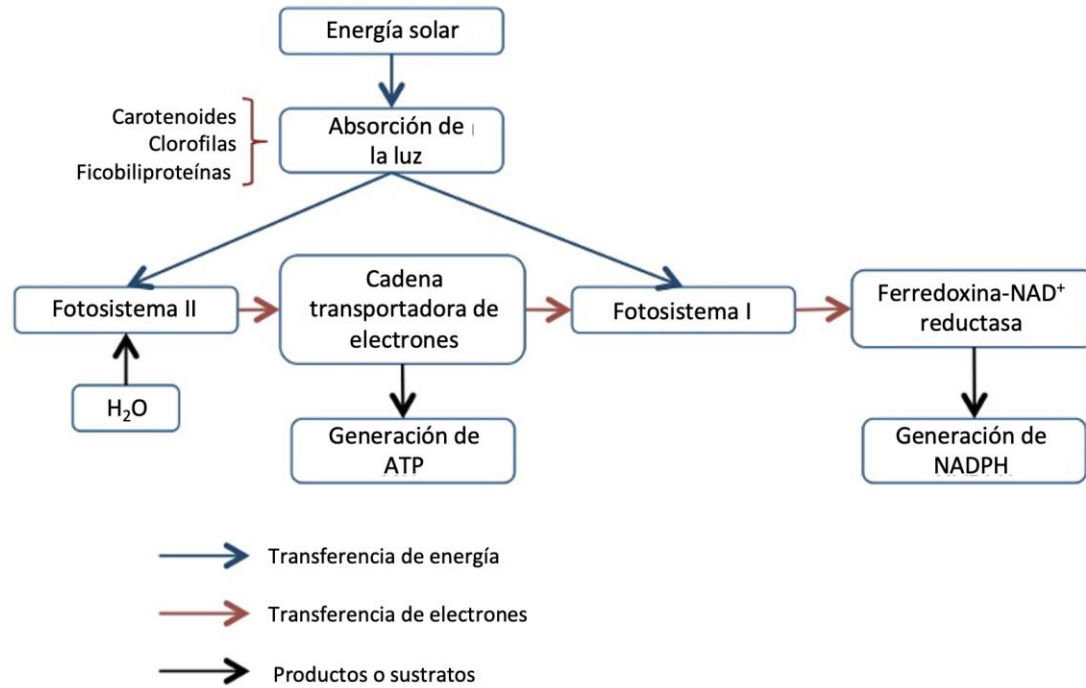


Figura 2. Diagrama simplificado de la absorción de luz y transporte de electrones en microalgas. (Modificado de Zilinskas y Howell, 1983).

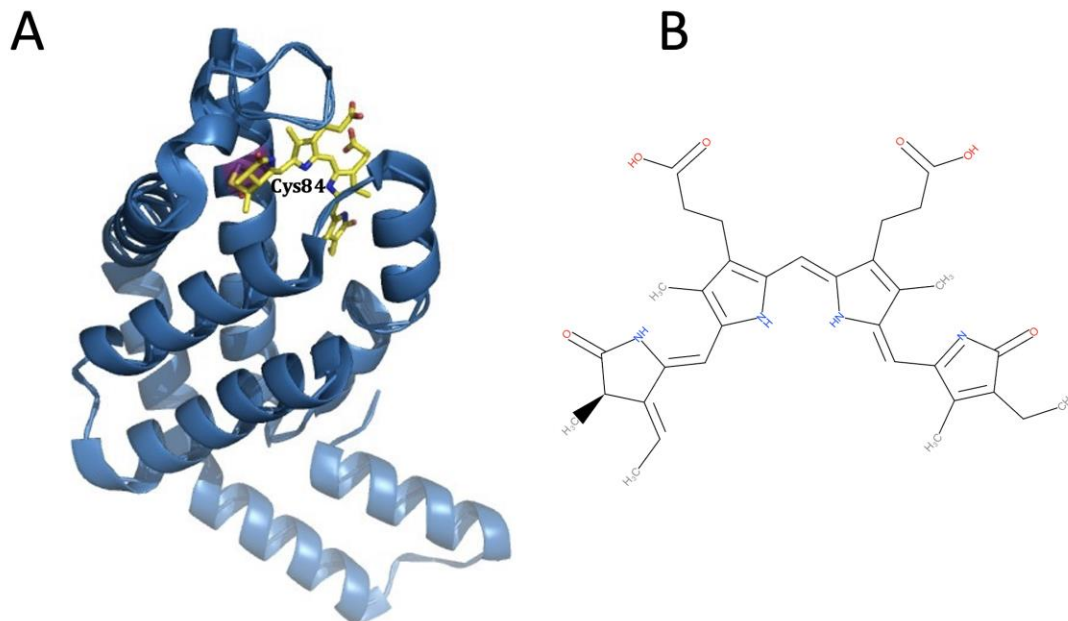


Figura 3. Estructura de las ficobiliproteínas, las cuales están compuestas por una parte proteica y un tetrapirrol unido mediante un enlace covalente a un residuo cisteína. (A) Ficocianina de la cianobacteria *Phormidium rubidum*. (B) Ficocianobilina: estructura con enlaces dobles y sencillos alternados que le permiten deslocalizar electrones en respuesta una excitación luminosa. (Figura de autoría propia).

relacionados con enfermedades infantiles, principalmente como la hiperactividad y conductas donde se altera la atención (Mulders et al., 2014). Aunado a esto, los consumidores optan por adquirir “productos ecológicos” y con menor impacto ambiental en su obtención, con lo cual se presume que tendrá un impacto en las ventas de los productos que opten por estas alternativas. Actualmente, diferentes líneas de investigación se desarrollan con fines de estudio básico y de la optimización en la producción de estos pigmentos de origen natural.

Debido a su pigmentación brillante, naturaleza no tóxica y capacidad antioxidante, las FBP se consumen como suplementos alimenticios, ya sea como cultivos celulares liofilizados o bien en extractos purificados donde predominan estas proteínas. Las FBP también se emplean en diversas aplicaciones, entre las que destacan: agentes antioxidantes, neuroprotectores, hepatoprotectores, anticancerígenos, y colorantes en cosméticos y alimentos (Morales-Sánchez et al., 2016). Dentro de sus aplicaciones, en el área de análisis inmunoquímicos se emplea a las FBP como marcadores fluorescentes en ensayos de citometría de flujo, en ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de histoquímica y para la detección de especies reactivas de oxígeno (Eriksen, 2008). Actualmente existen más de 30 patentes a nivel internacional relacionadas con la producción de FBP, y su utilización en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria y terapéutica, entre otras (Sekar & Chandramohan, 2008), por lo cual existe una necesidad específica de incrementar la producción de estas proteínas pigmentadas a nivel comercial.

Estas proteínas se encuentran en diferentes especies de microalgas y cianobacterias; se han realizado estudios para describir las diferencias o particularidades de las FCs presentes en los diferentes organismos que las producen. Se ha observado que, aunque todas las FCs contienen el mismo cromóforo (ficocianobilina), existen diferencias en la estabilidad de estas moléculas. Estas diferencias se deben a la composición aminoacídica de la parte proteica ya que presentan un mayor número de residuos

cisteína, los cuales forman enlaces disulfuro que estabilizan la proteína; no obstante, estas diferencias no afectan la estructura terciaria de las proteínas. Con base en el alineamiento de la cadena de aminoácidos de ficocianinas de diferentes organismos, se encontró que su composición de aminoácidos está muy conservada y que, además, presentan una alta proporción de cadena alfa hélices en su conformación secundaria y, por tanto, a nivel de estructura terciaria son muy similares (Eriksen, 2008).

Actualmente la FC más comercializada es la obtenida de la cianobacteria *A. platensis* (conocida comúnmente como Espirulina), y debido al incremento en el uso de colorantes naturales, la demanda de esta proteína ha aumentado, y es por esto por lo que se analizan nuevas técnicas de producción y fuentes de extracción. Aunque existen diversas microalgas que producen esta proteína, la obtención de FC de la microalga roja *Galdieria sulphuraria* es muy atractiva debido a sus características metabólicas y extremófilas, las cuales se describen a continuación.

***Galdieria sulphuraria* y ficocianina: características y propiedades**

G. sulphuraria se encuentra dentro de la clase *Cyanidiophyceae*; estas microalgas tienen la capacidad de crecer en ambientes extremos, como fuentes termales y geiseres, usualmente asociadas a localidades donde existe actividad volcánica y aguas sulfurosas. Estas condiciones derivan en un ambiente hostil para la mayoría de los organismos, como un pH menor a tres y temperaturas en el rango de 50 a 80 °C (Brock et al., 2003). Las microalgas *Cyanidiophyceae* son una clase del filo Rhodophyta (algas rojas) que, junto con las plantas verdes (*Viridiplantae*), glaucófitas (*Glaucophyta*) y cianobacterias, son organismos fotosintéticos (Reyes-Prieto et al., 2007). La clase *Cyanidiophyceae* incluye en su mayoría microalgas extremófilas, las cuales se dividen en tres géneros que son: *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* (Albertano et al., 2000). Dentro de la clase *Cyanidiophyceae* el único género que también presenta la capacidad de crecer en ausencia de una fuente luminosa es el género *Galdieria*, esto derivado de su capacidad de metabolizar diversos compuestos orgánicos como fuente de energía. Algunas características de este género de algas eucariotas unicelulares

Artículos

incluyen una morfología esférica, reproducción por medio de endosporas (4-8 endosporas), no cuentan con una pared celular sin embargo, presentan una cubierta de exopolisacáridos. De acuerdo con lo reportado por Albertano et al. (2000) y Gaignard et al. (2019), *G. sulphuraria* cuenta con un solo cloroplasto; sin embargo, presenta varias mitocondrias (>3 por célula), esto difiere de las demás microalgas rojas hasta la fecha reportadas, ya que solo presentan una mitocondria. Una representación gráfica de la estructura de *G. sulphuraria* se muestra en la figura 4.

Entre sus características metabólicas, *G. sulphuraria* tiene la capacidad de utilizar más de 30 diferentes biomoléculas como fuente de carbono, tales como hexosas, pentosas y polioles (alcoholes de azúcares), entre otros (Oesterhelt et al., 1999). Un resumen de las fuentes de carbono que se han reportado puede consumirse se presentan en la tabla 1. Aunque se ha determinado que *G. sulphuraria* es capaz de crecer en diferentes fuentes de carbono, la caracterización del crecimiento a detalle en estas fuentes no se ha evaluado, únicamente

se ha caracterizado el crecimiento de esta microalga con glucosa, glicerol, fructosa y sacarosa (Sloth et al., 2006). Como resultado de estas caracterizaciones se ha demostrado que el crecimiento celular y, por lo tanto, la productividad de biomasa obtenida en cultivos heterotróficos y mixotróficos se encuentra por encima de los reportados para otras microalgas capaces de crecer en cultivos heterotróficos suplementados con glucosa, p. ej. *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* (Guldhe et al., 2017). El modelo para explicar su eficiente crecimiento propone que su metabolismo al utilizar glucosa se encuentra relacionado con el pH ácido del medio en que se encuentra, ya que los transportadores reportados para microalgas (incluida *G. sulphuraria*) son del tipo simporte (Stadler et al., 1995), por lo cual translocan dos moléculas simultáneamente (azúcar y H^+). Al transportar el protón del medio de cultivo (pH 2) al interior de la célula (pH 7) genera la energía suficiente para translocar a la glucosa, lo que hace al proceso muy eficiente en comparación con las microalgas que habitan en pH cercanos a 7 y que probablemente requieren de ATP para transportar a la glucosa.

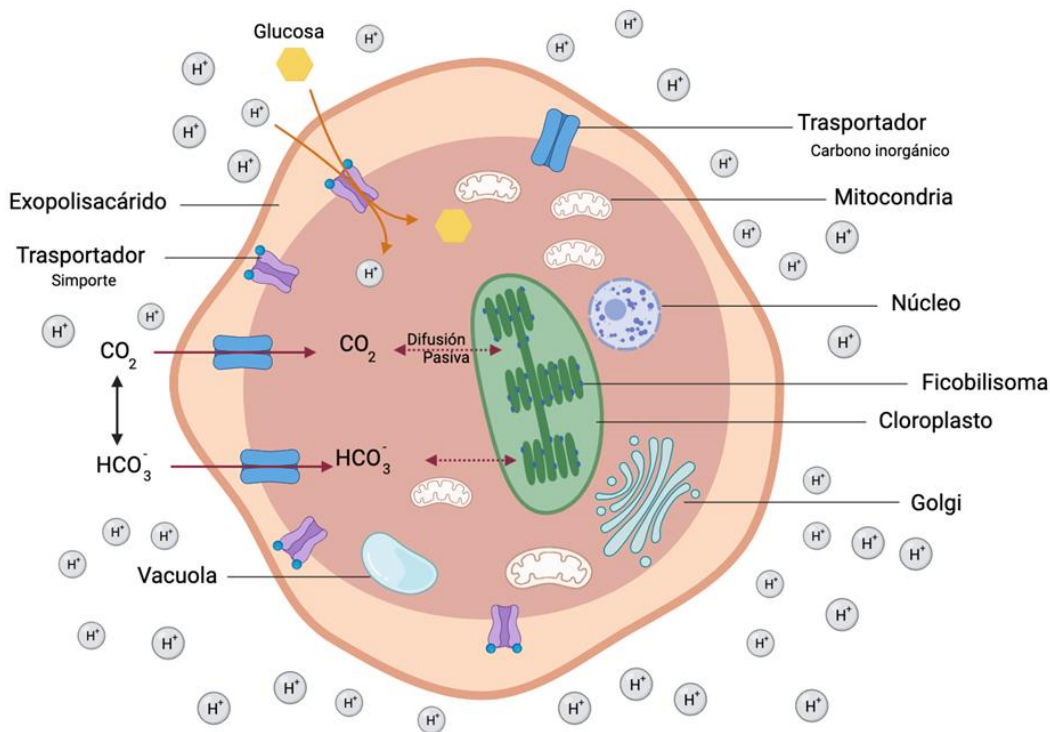


Figura 4. Esquema general de la microalga roja *G. sulphuraria*. Ésta cuenta con un cloroplasto y varias mitocondrias (>3 por célula). Se muestra la presencia de algunos transportadores de moléculas orgánicas e inorgánicas, los cuales le proporcionan la capacidad para crecer bajo condiciones heterotróficas, autotróficas y mixotróficas.

Artículos

Tabla 1. Fuentes de carbono a (hexosas, pentosas y polioles) reportadas como sustratos utilizados por *Galdieria sulphuraria* cepa MBI (Adaptado de Oesterhelt et al 1999).

| Hexosas | Pentosas | Polioles |
|-----------------|-------------|------------|
| D-Glucosa | D-Xilosa | D-Sorbitol |
| D-Manosa | D-Ribosa | D-Manitol |
| D-Galactosa | D-Arabinosa | D-Arabitol |
| D- Fructosa | | L-Arabitol |
| 6-Deoxi-glucosa | | Xilitol |
| D-Sorbosa | | Dulcitol |
| L-Fucosa | | Ribitol |
| L-Ramnosa | | |

Nota: Se utilizó una concentración de 125 mM para todas las fuentes de carbono

Con el objetivo de reforzar la clasificación taxonómica de la clase *Cyanidiophyceae*, Cozzolino et al. (2000), realizaron un estudio filogenético utilizando los genes que codifican para la subunidad larga de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo; codificada por el gen *rbcL*). Para este estudio se utilizó la secuencia del *rbcL* de diferentes microalgas recolectadas en diversas localidades del mundo. Como resultado de este estudio se determinó que existen diferencias genéticas que permiten separar los géneros *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria*. Además, se observó que las cepas de *Galdieria* usadas en diferentes investigaciones, se encuentran estrechamente relacionadas sin importar su distribución geográfica (figura 5).

Debido a las características de las *Cyanidiophyceae* (crecimiento en condiciones extremas), se ha evaluado la estabilidad de la FC producida por esta clase, encontrando que es estable a altas temperaturas. Su estabilidad se pierde a temperaturas superiores a los 60 °C, mientras que la obtenida de *A. platensis* se desestabiliza a los 47 °C (Moon et al., 2014; Rahman et al., 2017). Estudios donde se evaluó la cinética de desnaturalización de la FC, con base en la velocidad de pérdida en su coloración, mostraron que al incubar la ficocianina de *G. sulphuraria* y *A. platensis* a 60 °C durante 30 minutos a pH 7, la pérdida de la coloración es equivalente al 13.34 y 39.17%, respectivamente. Estos investigadores, también demostraron que el tiempo de vida media de la FC de *G. sulphuraria* es 3 veces

mayor que el de la FC de *A. platensis*. Probablemente, las diferencias en estabilidad de las diferentes FCs esté relacionada con el alto número de residuos cisteína encontrados en la secuencia de aminoácidos de la ficocianina de *Galdieria*. Asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante de ambas moléculas y se encontró que su poder antioxidante es similar, por estas razones la ficocianina extraída de la microalga *G. sulphuraria* es un producto competitivo en el mercado (Carfagna et al., 2018).

Cultivo de microalgas

Debido a que *G. sulphuraria* tiene la capacidad de crecer en diferentes condiciones de cultivo, en esta sección se presenta un resumen de las condiciones de cultivo para crecer esta microalga. El cultivo de microalgas a gran escala se usa para producir biomasa y metabolitos específicos como carotenoides, lípidos, FBPs y toxinas específicas, entre otros (Mulders et al., 2014). La producción de estos metabolitos, así como su biomasa, está directamente relacionada con las condiciones del cultivo las cuales se clasificaron en cuatro tipos (Chojnacka & Noworyta, 2004). (A) *Fotoautotrofia*: Donde la luz se usa como fuente de energía (fotosíntesis) y la fuente de carbono proviene de la asimilación del dióxido de carbono (CO₂). (B) *Heterotrofia*: Donde tanto la obtención de energía como la fuente de carbono proviene del catabolismo de una fuente de carbono orgánico, y el crecimiento se lleva a cabo en condiciones de obscuridad. (C) *Mixotrofia*: El crecimiento se da tanto por fotosíntesis como por heterotrofia y, por lo tanto, la fuente de carbono es de origen

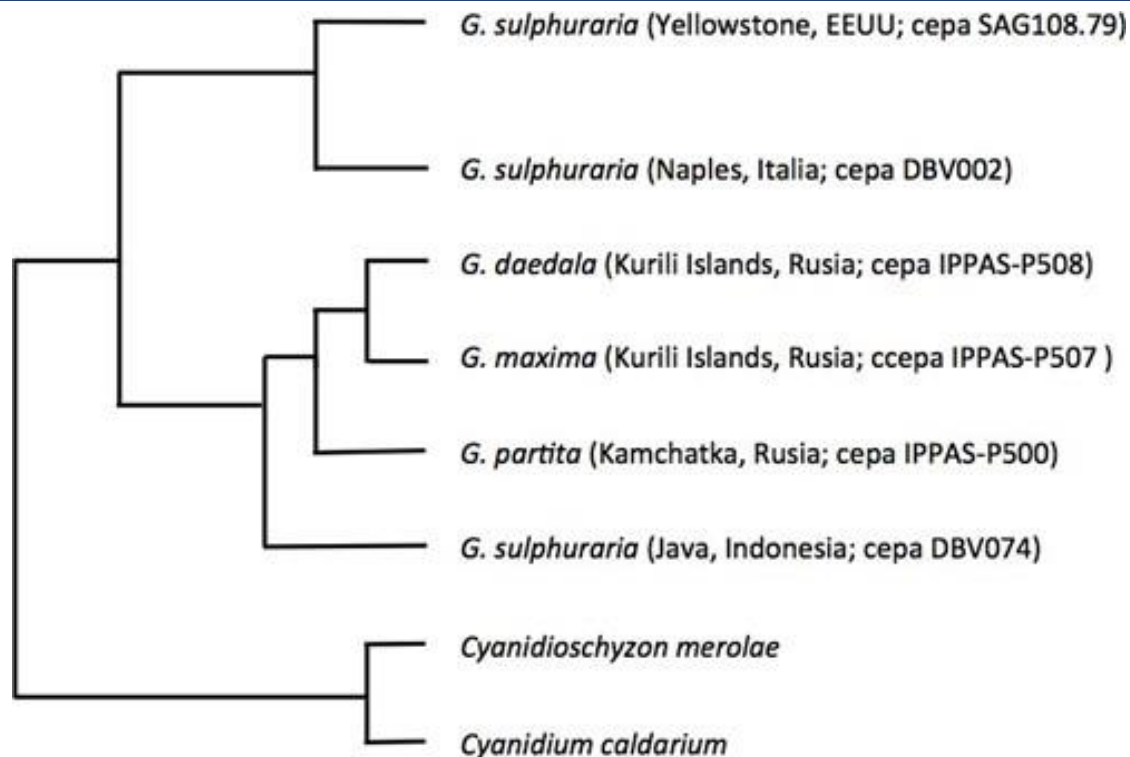


Figura 5. Fenograma donde se representa la relación dentro de la clase *Cyanidiophyceae*.
Modificado de (Cozzolino et al., 2000).

orgánico e inorgánico. (D) *Fotoheterotrofia*: Cultivo en donde la energía se obtiene tanto por fotosíntesis como por heterotrofia; no obstante, las estructuras de carbono necesarias para su anabolismo provienen únicamente de los compuestos orgánicos.

Debido a que existen pocas especies de microalgas capaces de asimilar y metabolizar fuentes de carbono orgánicas, en la mayoría de los casos el cultivo de microalgas se realiza en condiciones fotótrofas, en reactores al aire libre, debido a los bajos costos que representa su instalación y manteniendo. Sin embargo, los cultivos al aire libre tienen algunos inconvenientes, tales como una baja concentración de biomasa final (1-3 g/l) debido a la escasa difusión de luz dentro del cultivo, ya que a bajas intensidades de luz el proceso de fotosíntesis disminuye; así mismo los cultivos abiertos están propensos a contaminaciones, y no es posible controlar la temperatura del cultivo, ya que depende de la temperatura del ambiente, lo cual provoca que la productividad de biomasa se dependa de la estación del año en que se

trabaje y la localidad geográfica en la que se encuentre el cultivo (Siqueira et al., 2020). Los foto-reactores son una alternativa para evitar estos inconvenientes del cultivo bajo condiciones autótrofas. En los foto-reactores es posible controlar las condiciones de cultivo (intensidad de luz, temperatura y pH) y se puede garantizar la esterilidad del medio y cultivos axénicos. Por estas razones, los foto-reactores se emplean preferentemente para la producción de metabolitos dirigidos a las industrias farmacéutica y alimentaria (Chen & Chen, 2006). El mayor inconveniente de estos reactores es su alto costo, debido a que el material debe ser transparente y resistente a químicos abrasivos, además, del alto costo de mantenimiento del cultivo ya que los reactores se mantienen iluminados artificialmente, durante todo el proceso.

Una alternativa para el crecimiento a altas densidades celulares de microalgas es el uso de cultivos heterotróficos. Sin embargo, existe un grupo muy pequeño de microalgas que crecen en condiciones heterotróficas, p. ej. de los géneros *Chlorella* (Guldhe et al., 2017),

Neochloris (Morales-Sánchez et al., 2014) y *Galdieria* (Weber et al., 2004), debido a que cuentan con los transportadores y las vías metabólicas necesarias para translocar la fuente de carbono del medio de cultivo al interior de la célula y posteriormente realizar su catabolismo. El metabolismo heterotrófico de las fuentes de carbono en las microalgas se puede llevar a cabo en diferentes compartimientos celulares, como lo son: el cloroplasto, el citoplasma, la mitocondria y el glioxisoma (Morales-Sánchez et al., 2015). Cabe puntualizar que, aunque las microalgas cuentan con algunas vías metabólicas necesarias para utilizar biomoléculas como fuente de energía, la ausencia de transportadores específicos es el principal cuello de botella en este metabolismo ya que, para poder utilizar las fuentes de carbono, éstas deben atravesar la membrana plasmática (Fiechter & Seghezzi, 1992).

Diferentes géneros de microalgas han demostrado la capacidad de utilizar fuentes de carbono orgánico, y se han realizado estudios en los que se compara la velocidad de crecimiento en condiciones heterotróficas, autótrofas y mixotróficas. Como resultado se observa que la mayoría de microalgas presentan mayores velocidades de crecimiento en condiciones autótrofas; debido a que la internalización que tienen de los substratos orgánicos es baja (Lee, 2001). Sin embargo, existen microalgas las cuales presentan mejores velocidades de crecimiento en condiciones heterotróficas en comparación con ambientes autótrofos. Esto se debe a que la energía obtenida en forma de ATP, así como la cantidad de NADH y NADPH generados por medio de catabolismo de compuestos orgánicos, es mayor a la obtenida por medio de la fotosíntesis, lo que facilita el rápido crecimiento de las microalgas que tienen la capacidad de crecer en heterotrofia (Graverholt & Eriksen, 2007; Morales-Sánchez et al., 2014). En las microalgas que presentan buen crecimiento en condiciones heterotróficas se ha observado que existe una sinergia en el crecimiento cuando se utilizan condiciones mixotróficas. Esta sinergia se debe a la producción y asimilación de CO₂ de las microalgas que presentan un metabolismo heterótrofo y autótrofo, respectivamente.

Producción de ficocianina en la microalga roja *G. sulphuraria*

La FC actualmente comercializada proveniente de la cepa *A. platensis* (*Spirulina*); no obstante, como se menciona anteriormente, el *phylo* Rhodophyta específicamente, *G. sulphuraria* es foco de atención para la producción de esta proteína pigmentada. A continuación, se describen los principales resultados reportados a nivel de investigación para la producción de ficocianina con *G. sulphuraria* (tabla 2).

Los ficobilisomas son un complejo antena accesoria, por lo que su generación se encuentra altamente relacionada con la presencia de luz y, normalmente, las cepas que crecen en ausencia de luz no presentan pigmentos accesorios como las ficobiliproteínas y carotenoides.

La producción de ficocianina en *Galdieria* se ha centrado principalmente en cultivos heterótrofos, debido a que, en comparación con los cultivos autotróficos, se puede obtener una alta concentración de biomasa en poco tiempo. No obstante, la concentración de ficocianina en cultivos sin exposición a la luz es baja, y, en algunas cepas, inclusive se puede perder este pigmento como lo observaron Gross & Schnarrenberger (1995) quienes evaluaron las cepas de *G. sulphuraria* 074G y 074W, aisladas del mismo nicho ecológico en Indonesia. Ambas cepas presentaron el mismo comportamiento y pigmentación en cultivos autótrofos; sin embargo, encontraron que la cepa 074W al cultivarse en ausencia de luz perdió su coloración mientras que la cepa 074G, inclusive después de ser cultivada durante dos años en obscuridad, mantuvo su pigmentación debido a la presencia de estas FBP's (Gross & Schnarrenberger, 1995). También, es por esto por lo que la mayoría de los trabajos realizados con *G. sulphuraria* para la producción de FC utilizan la cepa 074G.

Actualmente no existe información suficiente sobre la síntesis de FC en cepas de *G. sulphuraria* bajo las diferentes condiciones de cultivo indicadas al inicio de esta sección. No obstante, se han estudiado diferentes ambientes de crecimiento y se ha demostrado que existen condiciones donde se favorece la

Artículos

Tabla 2. Estrategias de cultivo utilizadas en la producción de ficocianina utilizando las cepas de *G. sulphuraria* y *A. platensis*

| Microorganismo | Reactor | Fuente de Carbono | Volumen (l) | Biomasa (g/l) | Rendimiento (g _{FC} /g _{biomasa}) | Productividad (g _{FC} /l día) | Referencia |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------|---------------|--|--|-----------------------------|
| Cultivos abiertos | | | | | | | |
| <i>A. platensis</i> | "Raceway" | CO ₂ | 135000 | 0.47 | 0.061 | 0.003 | Jiménez et al. (2003) |
| <i>A. platensis</i> | "Raceway" | CO ₂ | 300 | 0.9 | 0.067 | 0.01 | Pushparaj et al. (1997) |
| <i>A. platensis</i> | "Raceway" | CO ₂ | 300 | 1.6 | 0.074 | 0.024 | Pushparaj et al. (1997) |
| <i>G. sulphuraria</i> | "Raceway" | CO ₂ | 15 | 2.23 | 0.098 | 0.016 | Wang et al. (2020) |
| Cultivos cerrados | | | | | | | |
| <i>A. platensis</i> | Tubular | CO ₂ | 11 | 5 | 0.07 | 0.092 | Carlozzi (2003) |
| <i>A. platensis</i> | Tubular | CO ₂ | 12 | 3 | 0.07 | 0.064 | Zitelli et al. (1996) |
| <i>A. platensis</i> | Panel alveolar | CO ₂ | 6 | 6.9 | 0.07 | 0.089 | Tredici et al. (1991) |
| Cultivos mixotróficos | | | | | | | |
| <i>A. platensis</i> | Alimentado | Glucosa | 2.5 | 10.2 | 0.107 | 0.087 | Chen and Zhang (1997) |
| <i>A. platensis</i> | Lote | Glucosa | 0.1 | 2.52 | 0.131 | 0.22 | Marquez et al. (1993) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Lote | Glucosa | 0.1 | 2.5 | 0.02 | 0.0125 | Sloth et al (2006) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Lote | Glicerol | 0.1 | 3.2 | 0.04 | 0.032 | Sloth et al (2006) |
| Cultivos heterotróficos | | | | | | | |
| <i>S. platensis</i> | Lote | Glucosa | 0.1 | 0.83 | 0.058 | 0.01 | Marquez et al. (1993) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Lote | Glucosa | 0.1 | 2.5 | 0.02 | 0.0125 | Sloth et al (2006) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Alimentado | Glucosa | 2.5 | 109 | 0.027 | 0.47 | Graverholt & Eriksen (2007) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Quimioestado | Glucosa | 2.5 | 83.3 | 0.16 | 0.086 | Graverholt & Eriksen (2007) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Heterotrófico | Glucosa | 0.3 | 4.6 | 0.056 | - | Graverholt & Eriksen (2007) |
| <i>G. sulphuraria</i> | Heterotrofia-Dilución-Fotoinducción | Glucosa | 300 ml+ 1l | 240 | 0.132 | 2.209 | (Wan et al., 2016) |

acumulación de esta proteína. Por esto, la mayoría de las investigaciones tratan de aumentar la productividad de FC, la cual se ve reflejada cuando se logra una elevada concentración final de biomasa en un tiempo corto y también por incrementos en la acumulación intracelular de FC. En este contexto, Graverholt y Eriksen (2007), compararon la producción de FC entre una cepa de *A. platensis* y *G. sulphuraria*. *A. platensis* se cultivó autotróficamente en cultivos abiertos y *G. sulphuraria*

heterotróficamente en cultivos alimentados, usando glucosa como fuente de carbono. Estos autores reportan que en comparación con la cianobacteria cultivada autotróficamente la cepa de *G. sulphuraria* en heterotrofia produjo FC a velocidades 1.7 a 13.6 veces mayor, ya que, aunque la concentración de ficocianina es menor a la encontrada en la cianobacteria (cultivo autótrofo), la producción de biomasa es mayor comparada con la producida por *A. platensis* (Graverholt & Eriksen, 2007).

Principales factores que afectan la productividad de ficocianina en *G. sulphuraria*

Estado de inanición

En cultivos heterótrofos y mixotróficos, que una vez agotada la fuente de carbono, la cepa entra en un estado de inanición por carbono y, como respuesta al estrés generado, se observa un incremento de FC de hasta el 300% en 24 h en comparación al pigmento cuantificado sin condiciones de estrés (Gross and Schnarrenberger, 1995). Adicionalmente se ha reportado que este efecto depende de la fuente de carbono. En cultivos en lote, donde se utilizó como fuente de carbono, fructosa, glucosa o glicerol (Sloth et al., 2006), se observó que 24 horas después de agotarse la fuente de carbono, pero con exceso de la fuente de nitrógeno, se incrementó la acumulación de FC. Sin embargo, en los cultivos donde se utilizó glicerol, la acumulación presente se duplicó en comparación con los cultivos que utilizaron glucosa y fructosa. Actualmente no se conocen las bases de este efecto.

Intensidad y longitud de onda de la luz

La ficocianina, al ser un pigmento secundario en el proceso de fotosíntesis, tiende a incrementar su concentración dentro de la célula cuando la intensidad de la luz es menor a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ya que a esta intensidad de luz la clorofila no puede absorber los fotones suficientes que permitan llevar a cabo las funciones básicas de metabolismo celular. En consecuencia, para aprovechar mejor la poca intensidad luminosa, se sintetizan más ficobilisomas (Sloth et al., 2006). Además, aunque todavía no está estudiado en *G. sulphuraria*, para *A. platensis*, además de observarse el efecto en la intensidad de luz descrito anteriormente, se sabe que dependiendo la longitud de onda utilizada es posible afectar la acumulación de ficocianina o ficoeritrina. Bajo la misma premisa discutida previamente, la clorofila absorbe fotones a longitudes de onda de 400 a 500 nm, mientras que la ficocianina absorbe a 620 nm, por lo que, si los cultivos son expuestos a la longitud de onda equivalente a la luz roja (en el intervalo de longitud de onda donde la FC absorbe fotones), la acumulación de ficocianina aumenta (Raeisossadati et al., 2019).

Concentración de oxígeno disuelto

Anteriormente se postuló que la glucosa inhibía la producción de clorofila y ficocianina en cultivos heterotróficos (Stadnichuk et al., 1998). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este efecto de disminución del contenido de FC se debe a una limitación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Debido a que la concentración celular en condiciones heterotróficas es alta y la transferencia de oxígeno insuficiente, por lo que se generan condiciones de limitación de oxígeno disuelto cercanas a cero en el medio de cultivo. En particular, se determinó que el oxígeno disuelto debe ser mayor a cero para que la enzima “coproporfirinógeno oxidasa” pueda llevar a cabo una catálisis eficiente. Cabe aclarar que esta oxidasa se necesita para la biosíntesis de intermediarios de clorofila y ficobilina (Sarian et al., 2016). Estudios realizados en quimiostato, mostraron que es posible aumentar la productividad de FC, e incrementar la concentración de biomasa final mediante el control de la velocidad de adición de la fuente de carbono. Esta operación, aunada a una recuperación simultánea de biomasa, permiten generar condiciones en las cuales el oxígeno no es limitante, es decir, que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es mayor a cero (Graverholt & Eriksen, 2007).

Concentraciones iniciales de biomasa y fuentes de carbono

Wan et al. (2016) demostraron que la concentración inicial de biomasa, en cultivos autotróficos con células provenientes de cultivos heterotróficos, tiene un impacto en el contenido de FC y en la producción de biomasa final. Evaluando diferentes concentraciones de biomasa inicial (0.1 a 1.5 g/l) en la etapa autotrófica, determinaron que las mejores concentraciones iniciales para la producción de biomasa y rendimiento de FC final son de 1.5 g/l y 0.6 g/l respectivamente (Wan et al., 2016).

Disponibilidad de nitrógeno

Como se comentó anteriormente, resultado de la inanición por carbono en cultivos heterotróficos, se observó la acumulación de FC, siempre y cuando exista un exceso de la fuente de nitrógeno (NH_4) en

el medio de cultivo. Se ha reportado que, con un exceso de nitrógeno, equivalente a una relación molar de 50:1 (mol de carbono: mol de nitrógeno), se promueve la acumulación de FC (Sloth et al., 2006). Esto se debe a que la FC también funciona como un reservorio de nitrógeno. Se han realizado estudios en cianobacterias y en *G. sulphuraria* cepa 011, donde cultivos que se encuentran limitados en nitrógeno, tienden a perder su coloración característica (verde-azul) debido a un efecto llamado blanqueamiento (Salbitani & Carfagna, 2020). En estos estudios se ha describió que las primeras estructuras pigmentadas que se pierden son las FBPs, ya que se usan como fuente de nitrógeno. Con el propósito de tener una mayor producción de FC se ha estudiado la cinética de degradación de ésta, actualmente existen estudios enfocados en tratar de evitar la degradación de FC en cultivos con limitación de nitrógeno y donde esta proteína podría proporcionar la fuente de nitrógeno. En esos trabajos se demuestra que el proceso de autofagia, que es el principalmente usado para la degradación de proteínas, no se encuentra presente en algas rojas como *G. sulphuraria* y, en cambio, para la degradación de las macro estructuras como los ficobilisomas de ficocianina, esta microalga utiliza una proteína adaptadora responsable del reconocimiento del ficobilisoma y el complejo de degradación proteasa Clp, para la hidrólisis de la FC (Salbitani & Carfagna, 2020).

G. sulphuraria surge como una microalga roja prometedora para mejorar la obtención de ficocinina en cultivos heterotóxicos a gran escala debido a su alta productividad de biomasa y las condiciones de su cultivo que facilitan controlar los cultivos axénicos. Como se ha indicado en esta sección, se tienen varios avances en la producción de biomasa y ficocianina utilizando *G. sulphuraria*; sin embargo, es deseable desarrollar nuevas estrategias para incrementar su producción. Una de estas estrategias puede ser la generación de células genéticamente modificadas, por ejemplo, empleando promotores fuertes que pudieran impactar en varios genes de su vía biosintética de la FC. También, sería deseable formar vínculos entre grupos de investigación y tecnólogos industriales para poder lograr su sobreproducción a un bajo costo.

Conclusiones

La ficocianina posee un gran potencial de aplicaciones prácticas, principalmente debido a sus propiedades fluorescentes, cromóforas y antioxidantes, las cuales, a partir de la ficocianina obtenida de *A. platensis*, ya se han explotado en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. El desarrollo de estrategias para la obtención de ficocianina, competitivas con las estrategias empleadas actualmente para producir el pigmento con *A. platensis*, es de interés biotecnológico. El uso de la microalga roja *G. sulphuraria*, es una alternativa atractiva para la obtención de dicho pigmento, principalmente por su capacidad de crecer y producir ficocianina en condiciones acidófilas y a temperaturas relativamente elevadas, así como a su capacidad de crecer en condiciones autótrofas, mixotróficas y heterotróficas, y a acumular FC. Finalmente, debido a la gran plasticidad metabólica, *G. sulphuraria* abre la oportunidad de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbonos en la generación de biomasa y obtención de ficocianina para aplicaciones en diferentes campos de la industria.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. FVLP, CAMH y RAAC recibieron becas de posgrado de CONACyT.

Referencias

- Albertano P, Ciniglia C, Pinto G, Pollio A (2000) The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: An update. *Hydrobiología* 433:137-143. <https://doi.org/10.1023/A:1004031123806>
- Allen MN (1986) The cultivation of myxophyceae. *Archiv. Mikrobiol.* 17:34-53. <https://doi.org/10.1007/BF00410816>
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) Brock biology of microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall.
- Bryant DA, Guglielmi G, de Marsac NT, Castets AM, Cohen-Bazire G (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.* 123:113-127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>

- Carfagna S, Landi V, Coraggio F, Salbitani G, Vona V, Pinto G, Pollio A, Ciniglia C (2018) Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic *Galdieria phlegrea*. *Algal Res.* 31:406-412. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.030>
- 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*). *Biotechnol. Bioeng.* 81:305-315. <https://doi.org/10.1002/bit.10478>
- Chen GQ, Chen F (2006) Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol. Lett.* 28:607-616. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0025-4>
- Chojnacka K, Noworyta A (2004) Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 34:461-465. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.002>
- Cozzolino S, Caputo P, De Castro O, Moretti A, Pinto G (2000) Molecular variation in *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) *Merola* and its bearing on taxonomy. *Hydrobiologia* 433: 145-151. <https://doi.org/10.1023/A:1004035224715>
- Eriksen NT (2008) Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1-14. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>
- Fiechter A, Seghezzi W (1992) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J. Biotechnol.* 27:27-45. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90028-8)
- Gaignard C, Gargouch N, Dubessay P, Delattre C, Pierre G, Laroche C, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P (2019) New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol. Adv.* 37:193-222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>
- Glazer AN, Clark JH (1986) Phycobilisomes: Macromolecular structure and energy flow dynamics. *Biophys. J.* 49:115-116. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83616-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83616-5)
- Graverholt OS, Eriksen NT (2007) Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:69-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
- Gross W, Schnarrenberger C (1995) Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol.* 36:633-638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>
- Guldhe A, Ansari FA, Singh P, Bux F (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecol. Eng.* 99:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>
- Jiménez C, Cossío BR, Labella D, Niell FX (2003) The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* 217:179-190. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00118-7)
- Lee KY (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* 13:307-315. <https://doi.org/10.1023/A:1017560006941>
- MacColl R (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124:311-334. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>
- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai S (1993) Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioeng* 76:408-410. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90034-6)
- Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Park MS, Yang JW (2014) Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean J. Chem. Eng.* 31:490-495. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0239-9>

- Morales-Sánchez D, Kyndt J, Ogden K, Martínez A (2016) Toward an understanding of lipid and starch accumulation in microalgae: A proteomic study of *Neochloris oleoabundans* cultivated under N-limited heterotrophic conditions. *Algal Res.* 20:22-34. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.006>
- Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez OA, Kyndt J, Martínez A (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31:1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>
- Morales-Sánchez D, Tinoco-Valencia R, Caro-Bermúdez MA, Martínez A (2014) Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Res.* 5:61-69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.05.006>
- Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* 50:229-242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
- Oesterhelt C, Schnarrenberger C, Gross W (1999) Characterization of a sugar/polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Phycol.* 34: 271-277. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736322>
- Pushparaj B, Pelosi E, Tredici MR, Pinzani E, Materassi R (1997) An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 9:113-119. <https://doi.org/10.1023/A:1007988924153>
- Raisossadati M, Moheimani NR, Parlevliet D (2019) Red and blue luminescent solar concentrators for increasing *Arthrospira platensis* biomass and phycocyanin productivity in outdoor raceway ponds. *Bioresour. Technol.* 291:121801. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121801>
- Rahman DY, Sarian FD, van Wijk A, Martínez-García M, van der Maarel MJEC (2017) Thermostable phycocyanin from the red microalga *Cyanidioschyzon merolae*, a new natural blue food colorant. *J. Appl. Phycol.* 29:1233-1239. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1007-0>
- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:147-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Rigano C, Fuggi A, Rigano VDM, Aliotta G (1976) Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Arch. Microbiol.* 107:133-138. <https://doi.org/10.1007/BF00446832>
- Salbitani G, Carfagna S (2020) Different behavior between autotrophic and heterotrophic *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) cells to nitrogen starvation and restoration. Impact on pigment and free amino acid contents. *Int. J. Plant Biol.* 11:1-14. <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8567>
- Sarian FD, Rahman DY, Schepers O, Van Der Maarel MJEC (2016) Effects of oxygen limitation on the biosynthesis of photo pigments in the red microalgae *Galdieria sulphuraria* strain 074g. *PLoS One* 11:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148358>
- Sekar S, Chandramohan M (2008) Phycobiliproteins as a commodity: Trends applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20:113-136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- Siqueira SF, Maroneze MM, Dias RR, Vendruscolo RG, Wagner R, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation: geographic position and local climate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95:2411-2420. <https://doi.org/10.1002/jctb.6423>
- Sloth JK, Wiebe MG, Eriksen NT (2006) Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38:168-175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>

Artículos

- Stadler R, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N (1995) Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant Physiol.* 107:33-41. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.33>
- Stadnichuk IN, Rakhimberdieva MG, Bolychevtseva YV, Yurina NP, Karapetyan NV, Selyakh, IO (1998) Inhibition by glucose of chlorophyll *a* and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Sci.* 136:11-23. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00088-0)
- Tredici MR, Carozzi P, Chini Zittelli G, Materassi R (1991) A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 38:153-159. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90147-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90147-C)
- 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*. *Bioresour. Technol.* 218:272-278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>
- Wang H, Zhang Z, Wan M, Wang R, Huang J, Zhang K, Guo J, Bai W, Li Y (2020) Comparative study on light attenuation models of *Galdieria sulphuraria* for efficient production of phycocyanin. *J. Appl. Phycol.* 32:165-174. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01982-8>
- Weber APM, Oesterhelt C, Gross W, Bräutigam A, Imboden LA, Krassovskaya I, Linka N, Truchina J, Schneidereit J, Voll H, Voll LM, Zimmermann M, Jamai A, Riekhof WR, Yu B, Garavito RM, Benning C (2004) EST-analysis of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Mol. Biol.* 55:17-32. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0376-y>
- Zilinskas BA, Howell DA (1983) Role of the colorless Polypeptides in phycobilisome assembly in *Nostoc* sp. *Plant Physiol.* 71:379-387. <https://doi.org/10.1104/pp.71.2.379>

Formato: dp_6_3
Evaluación de Actividad Complementaria

29/01/2021

COMITE ACADÉMICO
Programa Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente:

Por medio del presente, informo que el estudiante:

Carlos Alberto Montenegro Herrera.

Coordinó la siguiente actividad complementaria:

Tópico: Principios y aplicaciones de biotecnología microalgal.

durante el **semestre 2021/1**, habiendo obtenido una evaluación:

Positiva (X)

Negativa ()

Comentarios adicionales acerca del desempeño del (la) estudiante:

El M en C Carlos Alberto Montenegro Herrera realizó una excelente coordinación del tópico. Impartió y coordinó 5 sesiones de 4 horas cada una. Coordinó la invitación y presentación de 3 profesores foráneos invitados y participó activamente en todas las sesiones.

A t e n t a m e n t e

Cuernavaca, Mor., a 29 de enero de 2021.



Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Tutor Responsable de la Actividad Docente



Coordinación General de Estudios de Posgrado
Subdirección de Programas Institucionales
Departamento de Gestión de Apoyos

Estimado Comité,

Por este conducto informo que el Candidato a Doctor **Carlos Alberto Montenegro Herrera**, realizará una estancia académica en el Laboratorio de Ingeniería de proceso, del Instituto de Ciencias Aplicadas – UNAM. La estancia la realizar del 20 de junio al 20 de julio del 2022 bajo mi tutoría.

El M. En C. Montenegro participa en el desarrollo de una bebida de alta calidad proteica, donde se incorporan proteína de varias leguminosas y de amaranto, utilizando una matriz de bebida vegetal y enriquecer con fibra proveniente de bagazo de nopal (subproducto agroindustrial), para generar sensación de saciedad. Así mismo, se propone la incorporación de la microalga termo acidófila unicelular con la que el Candidato a Doctor Montenegro ha venido trabajando durante su trabajo de doctorado, con la finalidad de incrementar el PDCAAS de la bebida (puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de la proteína), que define la calidad de las proteínas).

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de junio de 2022.

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Neil Charles Bruce Davidson

V.º B.º Dra. María Soledad Córdova Aguilar
Académica de T.C. Titular "C"
marisol.cordova@icat.unam.mx



c.c.p. - Tutor
- Estudiante
- Archivo



Potential single-cell protein production with the thermoacidophile microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization

Carlos A. Montenegro-Herrera¹, Francisco Vera-López Portillo¹, Georgina Hernández-Chávez¹, Alfredo Martínez¹
Universidad Nacional Autónoma de México, Institute of Biotechnology, Department of Cellular Engineering and Biocatalysts. Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210 México
mohecaal@bt.unam.mx



Introduction

An important research topic is the search for new feed and food sources containing essential nutrients and nutraceuticals, that respond to the high demand caused by the accelerated population growth. Proteins are one of the most studied food groups due to its importance as a source of essential amino acids. The unicellular protein or single-cell protein (SCP) refers to the protein obtained from the cultivation of different microorganisms such as bacteria, yeasts, fungi, and algae, using organic or inorganic carbon sources. Therefore, the production of microalgae biomass with nutritional potential is pertinent, even more when some species show a high protein content with higher productivities than those obtained with terrestrial plants. *Galdieria sulphuraria* is an extremophilic red microalgae that can grow in acidic environments (pH 0 to 4), and up to 56 °C.

The aim of this work was to study the photoautotrophic growth and the biochemical macromolecular composition of five different *G. sulphuraria* strains with potential to produce SCP.

Materials and methods

Strains: SAG 107.79, SAG 108.79, SAG 21.92, UTEX 2919, CCMEE 5587.1



Culture conditions: A kinetic study of cell growth and macromolecules content was performed under controlled and non-limiting growth conditions: 42 °C, pH 2, constant illumination at 100 μmol m⁻² s⁻¹, 150 rpm, 0.5 vvm and air with atmospheric CO₂ (~0.04%), using 1-L photobiological systems, containing 900-ml of mineral media.

Materials and methods

Table 1. Results obtained from the kinetic growth of *G. sulphuraria* strains at time (t) of maximum biomass concentration.

| Strain | DCE (g L ⁻¹) | Cellular density (Cells mL ⁻¹) | Protein (%) | Carbohydrates (%) | Lipids (%) | D ₉₅ (Days) |
|------------------------------------|--------------------------|--|--------------|-------------------|--------------|------------------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 21.92 | 0.18 ± 0.01 | 3.17E+07 ± 2.22E+01 | 42.18 ± 1.72 | 8.05 ± 0.28 | 8.89 ± 1.39 | 35.54 ± 2.27 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | 0.74 ± 0.02 | 1.62E+07 ± 4.31E+01 | 35.31 ± 1.20 | 8.89 ± 0.88 | 5.78 ± 0.77 | 9.66 ± 0.29 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | 0.83 ± 0.01 | 1.75E+07 ± 4.18E+01 | 41.89 ± 1.73 | 8.15 ± 0.81 | 9.56 ± 1.31 | 9.18 ± 0.49 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | 1.07 ± 0.04 | 1.92E+07 ± 3.32E+01 | 46.56 ± 1.35 | 3.94 ± 0.31 | 7.31 ± 0.97 | 8.23 ± 0.31 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | 2.19 ± 0.08 | 3.97E+07 ± 1.01E+02 | 43.95 ± 1.13 | 1.91 ± 0.31 | 10.11 ± 0.94 | 4.27 ± 0.11 |

* Doubling time

The data correspond to mean ± the standard deviation of triplicate experiments.

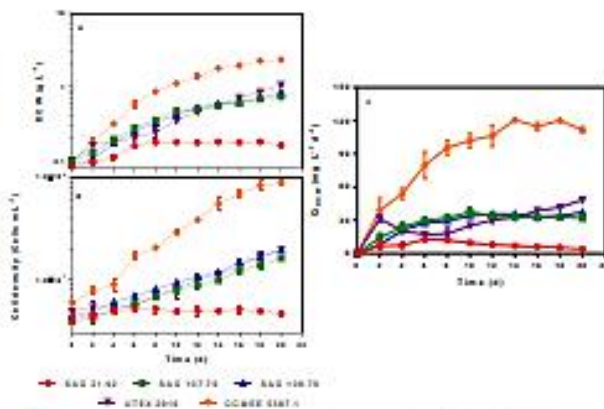


Fig. 1 Cell growth of different *G. sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions. A. Dry cell weight (DCW) concentration. B. Cellular density. C. Biomass productivity at different cultivation times.

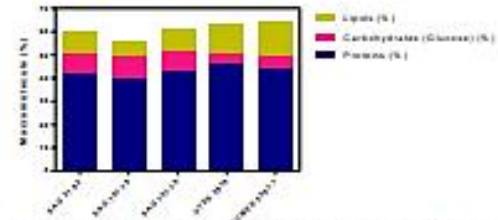


Fig. 2. Biochemical composition: Protein (A), carbohydrates (glucose) (B), and lipids content (C) of different *G. sulphuraria* strains under non-limiting culture conditions. The macromolecules content is expressed as: (g_g g_{DCW}⁻¹) × 100, where g_g are proteins, carbohydrates, or lipids concentrations.

Table 2. Essential amino acid profile of different *Galdieria sulphuraria* strains cultivated under autotrophic growth conditions.

| N° | Amino acid | <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 |
|----|---------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 1 | Threonine | 2.54 | 2.52 | 2.41 | 2.81 |
| 2 | Isoleucine | 2.92 | 2.74 | 2.67 | 2.37 |
| 3 | Valine | 1.47 | 1.32 | 1.36 | 1.54 |
| 4 | Methionine | 0.71 | 0.76 | 0.64 | 0.70 |
| 5 | Tryptophan | - | - | - | - |
| 6 | Phenylalanine | 1.58 | 1.55 | 1.45 | 1.57 |
| 7 | Isoleucine | 0.68 | 0.90 | 0.81 | 0.88 |
| 8 | Leucine | 2.64 | 2.65 | 2.67 | 2.71 |
| 9 | Lysine | 1.77 | 1.67 | 1.25 | 1.49 |

The reported values correspond to the percentage content (g of Amino Acid / 100 g of Biomass)
- No determination

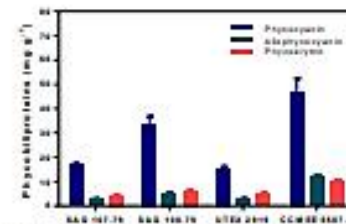


Fig. 3. Phycoerythrin content of different *Galdieria sulphuraria* strains under autotrophic growth conditions.

Table 3. Theoretical annual productivity projected for *Galdieria sulphuraria* cultures under no-limiting and autotrophic conditions (atmospheric CO₂) in two scenarios (A) productivity values are not affected by scaling-up; (B) productivity values are reduced by 95 %

| Strain | Projected scenario | Scenario A | Scenario B |
|------------------------------------|---|------------|------------|
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 21.92 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 38.99 | 11.44 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 107.79 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 12.77 | 3.88 |
| <i>G. sulphuraria</i> SAG 108.79 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 14.76 | 4.58 |
| <i>G. sulphuraria</i> UTEX 2919 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 11.09 | 3.37 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 44.90 | 13.68 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 21.77 | 6.78 |
| <i>G. sulphuraria</i> CCMEE 5587.1 | (g _g g _{DCW} ⁻¹ year ⁻¹) | 12.00 | 3.64 |

Projected productivity values of evaluated *G. sulphuraria* strains (2) are shown for the following compounds (1): Dry cell weight (DCW) and Protein. For the calculations, an annual cultivation of 333 days was assumed, carried out in two periods (166 in a 50 m² × 0.25 m per pond), for the two scenarios.

Conclusions

Under phototrophic conditions using only the CO₂ contained in the air, it was possible to produce *G. sulphuraria* biomass with high protein concentration. As result of the biochemical analysis of this red microalgae, the generated biomass has potential to produce single-cell protein. It is proposed that the biomass composition is suitable for food or feed purposes, nevertheless nutritional tests remain to be done. Finally, *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 is the most appropriate strain for the scaling-up of SCP production, because it has the highest biomass productivity, the highest percentage content of phycoerythrin, and a protein content higher than 40%.

Acknowledgements

The authors acknowledge grants CONACyT 656650 and PAPIIT-DGAPA-UNAM Grant IT201119 for financial support.

References

Diaz-Gonzalez C et al. (2019). New isolates in culture and characterization of red microalgae. *Biochemical Adv.* 27: 183-222.
 Desobry et al. (2007). Regulation of phycoerythrin in the unicellular autotrophic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant J.* 51: 820-831.
 Polun J, Lees M, & Steven Stanley, G. H. (1987). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 262: 497-502.
 Loney C et al. (1987). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 262: 248-255.
 Galdier-Hernandez R et al. (2009). *Bioleaves a Paris de Microalgues. Bio Technologie.* 13: 38-61.



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio

2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Carlos Montenegro Herrera, Alfredo Martínez Jimenez

Por su participación con la contribución en cartel:

**PRODUCCIÓN POTENCIAL DE PROTEÍNA CON LA MICROALGA ROJA EXTREMÓFILA
Galdieria sulphuraria UTEX 2919.**

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBBB

Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador

Dra. Sylvie LeBorgne
Presidenta del Comité Científico

León



leon-mexico.com



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
LABORATORIO NACIONAL DE CITOMETRÍA DE FLUJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



Otorgan la presente

Constancia

a:

Carlos Alberto Montenegro Herrera

Por haber finalizado satisfactoriamente la:
CAPACITACIÓN EN EL EQUIPO CYTOFLEX
en 3 sesiones.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 11/26/2019.

Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo
Director-Responsable Técnico
LabNalCit

Dra. Evelyn Katy Alvarez
Coordinador de servicios a la Investigación
LabNalCit



Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos

Impacto da Ciência de Alimentos na Saúde e na Doença

12 a 14 de dezembro de 2021

Evento online

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado:

"INCREASED PHYCOCYANIN PRODUCTIVITY FROM THE MICROALGAE *Galdieria sulfuraria* THROUGH MODULATION OF CN RATIO"

De autoria de

"Mariana Manzoni Maroneze, Carlos Alberto Montenegro Herrera, Alfredo Martínez Jiménez"

foi apresentado na categoria "Pôster" no **14º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA: "Impacto da Ciência de Alimentos na Saúde e na Doença"**, realizado de 12 a 14 de dezembro de 2021, no formato online.

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico

Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
Coordenadora do Comitê Científico

Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior
Coordenador do Comitê de Programação

Profa. Dra. Glauca Maria Pastore
Presidente do evento

Certification by Galoá





3^a Escuela de Verano en Investigación



4 Aniversario



EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, A TRAVÉS DE LA COORDINACIÓN GENERAL DE DOCENCIA, OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Dr. Carlos Alberto Montenegro Herrera

Por su entusiasta participación en la 3a Escuela de Verano en Investigación, que se llevó a cabo del 12 al 25 de junio del 2022

DRA. MARCELA AYALA ACEVES

Coordinadora General de Docencia



Chapter 3

Waste Biorefineries Facilities: The Feedstock Choice



Mariana Manzoni Maroneze, Estefania Sierra-Ibarra, Carlos A. Montenegro-Herrera, and Alfredo Martinez

Abstract This chapter provides an overview of waste feedstocks and their potential applications in new biorefineries. The fundamental aspects of the biorefinery are discussed, focusing on thermochemical, chemical, and biochemical processing methods. Recent literature reports are reviewed, which explore the main feedstock wastes used in biorefineries (lignocellulosic biomass, municipal solid waste, food waste, oil-based wastes, and sewage sludge). The chapter also includes characteristics of biorefineries processes, their pros and cons, conversion processes, and applications. Finally, the chapter presents the main conclusion and appropriate recommendations.

3.1 Introduction

In the face of the economic collapse—the largest since the great depression of the 1930s—driven by the coronavirus outbreak, authorities around the world are currently developing recovery programs at a remarkable scale to shape infrastructures and industries for the next few decades. The major goals are to mitigate unemployment and re-stabilize industry and commerce. However, if well designed, parts of these packages are to enhance the sustainability of the energy sector, with a potential goal to develop a cleaner, more secure, resilient, and cost-effective energy system (Markard and Rosenbloom 2020). In this scenario, waste-based biorefineries can play a vital role in the economic recovery of states.

In a world with finite resources, energy recovery from waste or residues is a key to establishing a sustainable economy. Every year, an estimated 9–11 billion tons of waste are produced globally, which is incessantly increasing day by day (Badgujar and Bhanage 2018; Chen et al. 2020). To meet the growing energy demands and the reduced depletion of fossil resources, the waste-to-energy approach holds a significant role in mitigating the challenges facing waste management. Currently, landfill

M. M. Maroneze (✉) · E. Sierra-Ibarra · C. A. Montenegro-Herrera · A. Martinez
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Mexico

to waste disposal remains the most common method of waste management, particularly in developing countries as this method is simple and relatively inexpensive. While this approach is an effective waste management system, if not managed correctly, non-sanitary landfills become a significant source of greenhouse gases emissions, soil and groundwater contamination, unpleasant odors, leachate generation, and disease spreading vectors, flies, and rodents (Kim and Owens 2010; Rehan et al. 2019).

Several definitions of biorefinery have already been reported in the literature (Cherubini 2010; de Jong and Jungmeier 2015; Solarte-Toro et al. 2021). However, they all refer to the processes that convert biomass into a range of marketable bio-based products and bioenergy (IEA 2008). The feedstock is an integral part of the biorefinery system, and its choice is critical in the definition of techno-economic viability, availability, and sustainability metrics.

Residues from lignocellulosic biomass, organic residues (mainly municipal solid waste and food waste (FW)), oil-based wastes, and sewage sludge are among a few potential feedstocks for waste biorefineries. These types of biorefinery can be employed to produce biofuels, bioenergy, platform chemicals, biofertilizers, soil conditioners, and bioplastics (de Jong et al. 2012; Venkata Mohan et al. 2016). However, the choice depends on the target products, feedstock availability, and facility structure. In this sense, this chapter aims to discuss the main waste feedstocks used in biorefineries, their pros and cons, recent literature reports, and their applications.

3.2 Waste Biorefineries

Understanding the available feedstocks, their compositions, and the target products is crucial to facilitate efficient waste valorization and choose the ideal bioconversion process. Depending on their source, the wastes can present many valuable compounds, which include carboxylic and other acids, carbohydrates, proteins, nitrogen, phosphorus, and metals. When combined with the biorefining process, they can be transformed into high-valuable products such as food additives, chemicals, biodegradable polymers, and bulk products, such as materials and energy. Numerous sources of waste are explored in the biorefinery concept. In this chapter, we focus on the major sources of waste, which are (i) lignocellulosic biomass, (ii) municipal solid waste, (iii) FW, (iv) oil-based wastes, and (v) sewage sludge (Fig. 3.1).

The conversion processes of wastes are grouped into three major categories: (i) thermochemical pathway, where high temperature is applied to feedstock using chemicals as a solvent, such as liquefaction, pyrolysis, and gasification; (ii) transesterification process based on chemical conversion, in which the wastes are treated with chemicals; and (iii) biochemical process, where the waste feedstock is converted into value-added products through enzymes or microorganisms, as in anaerobic digestion and fermentation. Figure 3.2. summarizes these pathways. To



Fig. 3.1 Major waste feedstocks for biorefineries facilities

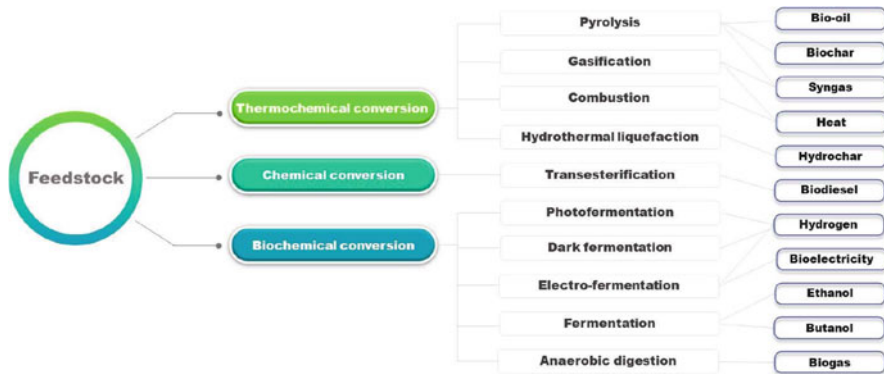


Fig. 3.2 Main waste valorization pathways for energy purposes

improve the biorefinery efficiency, a combination of two or more conversion routes is employed in process integration (Tsegaye et al. 2021).

Thermochemical conversion is considered the most versatile technology applicable to many waste feedstocks. This technology uses severe treatment under high temperatures and in some cases high pressure to generate energy and high-value products (Labaki and Jeguirim 2017). Operating conditions and the end products are the differences between the variants of this category.

Combustion is carried out under severe oxidative conditions and high temperatures (800–1000 °C), to generate heat (Materazzi and Foscolo 2019). As alternatives to combustion, gasification and pyrolysis are the refined thermochemical methods

aimed to generate solid, liquid, or gaseous biofuels. Characteristically, for pyrolysis temperatures between 300 and 800 °C are employed and are divided in slow, intermediate, and fast processes, based on their different temperatures, residence times, and heating rates (Santos et al. 2020). Regardless of the type of pyrolysis, the same energy products are generated (bio-oil, biochar, and syngas). For gasification, O₂, CO₂, steam, or supercritical water treatments are applied on the waste feedstock at high temperatures from 800 to 1000 °C. From this reaction, syngas and heat are generated (Lee et al. 2020). Thermochemical liquefaction requires a moderate temperature (250–400 °C) and high pressure to obtain biocrude oil, biochar, and gases, in which the volume of liquid oil generated is higher than that of biochar and gaseous products (Maroneze et al. 2019).

The chemical wastes conversion is the transesterification of catalyzed process, where fats and oils are converted to fatty acid methyl ester, known as biodiesel and glycerol, using catalysts to increase the rate of chemical reactions. This reaction has been widely used to produce biodiesel from waste cooking oil and waste animal fats (WAFs). In the transesterification process, alcohols like methanol and ethanol are used for chemical reactions owing to their low cost and high availability. The transesterification can be performed with many catalysts including alkalis, acids, and enzymes (Tan et al. 2019; Karpagam et al. 2021).

Bioconversion is the conversion of plant or animal waste into value-added products or usable products through the process of waste transformation, using biological agents such as whole cells or purified enzymes. The bio-based production is environmentally sustainable, clean, and eco-friendly as they are bio-processed at room temperatures (or close), using atmospheric pressure and free of harsh chemical catalyzers (Mu et al. 2010). Moreover, bio-based production generates minimal by-products and demands low energy (Bilal et al. 2021). Nevertheless, a prior thermochemical or chemical treatment of feedstocks is vital for efficient bioprocessing (Behera et al. 2014; Kiran et al. 2017). Biochemical transformation of biomass can be achieved through three pathways: anaerobic digestion, fermentation, and enzymatic catalysis. The combination of these processes or only one process can generate a broad range of products such as biofuels, biogases, bioplastics, oligo- and monosaccharides, bioactive molecules, and lignin derivatives (Cho et al. 2020).

Anaerobic digestion is a waste-to-energy technology commonly used at different scales globally to produce energy and fertilizers. It occurs naturally at temperatures between 35 °C (mesophilic) and 55 °C (thermophilic) when high amounts of wet organic matter accumulate in the absence of oxygen (Meegoda et al. 2018). In this bioprocess, anaerobic microorganisms convert different feedstocks, mainly food wastes and animal manure, into biogases comprising 60–70% methane, 30–40% CO₂, and a solid nutrient-rich residue useful for crops applications (Xu et al. 2018).

Fermentation is the most versatile method for bioconversion processes owing to a broad range of available carbon sources, microorganisms, and products. Thus, fermentation is defined as the metabolic process that produces chemical changes, through a sequence of enzymatic actions that microorganisms perform, to generate energy through the oxidation of organic compounds (substrates) and the reduction of

an endogenous electron acceptor. Fermentation in the field of biochemistry is an anaerobic process for energy production. However, in its broad definition, it refers to any process where the action of microorganisms brings the desired change in the substrates (Godbey 2014). The products, efficiency, and yield of fermentation depend on the substrate, the catalyst (as isolated enzymes or whole cells), and the process conditions (Tomasik and Horton 2012). Therefore, fermentation is grouped into different subcategories in biorefineries application.

Dark fermentation is a process developed for biohydrogen production performed in the dark under anaerobic conditions using pure cultures or mixtures of microorganisms since it is related to the acidogenic stage of the anaerobic digestion process (Antonopoulou et al. 2011). Photo-fermentation is a process of converting organic compounds such as volatile fatty acids (VFA) into H_2 and CO_2 through the action of photosynthetic microorganisms to produce chemical energy from sunlight to power metabolic enzymatic reactions (Sağır and Hallenbeck 2019). Nevertheless, two-stage processes using sequential dark and photo-fermentation have been used to increase overall biohydrogen yield since this parameter is higher in photo-fermentation systems (Chen et al. 2008). Dark fermentation has lower production costs than photosynthetic methods as it is characterized by ambient temperatures and pressures. Moreover, it uses less expensive photo-bioreactors, such as organic wastes from agroindustry or sewage as substrate (Antonopoulou et al. 2011).

The most applicable bioconversion process in the biorefinery context is the fermentation of carbohydrates, mainly monosaccharides, and products transformation (e.g., organic acids and alcohols) to synthesize organic metabolites of commercial interest. The products spectrum from this type of fermentation is biofuels, organic acids, polysaccharides, amino acids, vitamins, antibiotics, solvents, and proteins (Anderson 2009). In search of bioprocesses with high yields and productivities, the performance of biological catalysts, i.e., microorganisms or enzymes, has been enhanced by genetic and protein engineering, genomic mining, and adaptive laboratory evolution (Utrilla et al. 2012).

3.3 Waste Feedstocks

From a biorefinery perspective, feedstock is any raw material that can be converted into value-added products. Feedstocks are grouped into three main categories: the first generation that uses edible crops; the second generation that uses non-edible crops, agro-industrial residues, and other wastes (e.g., municipal and food), and third generation that are microalgae-based processes (Moncada et al. 2014). First-generation biorefineries are considered sustainable and economically feasible platforms in the USA and Brazil where bioethanol is produced from corn and sugarcane. Nevertheless, some ethical issues still exist regarding the use of edible crops for synthesizing non-edible products (Albonetti et al. 2019). The second- and third-generation biorefineries are also sustainable and economically feasible platforms that avoid the ethical concerns mentioned above (Badgujar and Bhanage 2018).

However, probably the most studied is the concept of second-generation biorefinery, in which the processes generate waste feedstock (Albonetti et al. 2019; De Bhowmick et al. 2018). This waste feedstock includes agro-industrial (lignocellulosic) residues, municipal solid wastes, food wastes, waste cooking oil, and animal fats.

3.3.1 Agro-industrial Waste

With the rapid population growth, the agribusiness industry has experienced accelerated development, recording revenue of 75 billion dollars in 2017. However, this development has turned agro-industrial wastes into an important environmental problem, since more than five million metric tons are produced yearly (Ravindran et al. 2018; Mehmood et al. 2021). Residues from agroindustry and timber are attractive biorefinery platforms because the content of starch, xylan, glucan, and lignin contains useful compounds for bio- and chemical conversions. Lignocellulose comprises approximately half of the plant's biomass, and it is the most important renewable resource (Sánchez 2009). Lignocellulose has three main components: cellulose (35–50%), hemicellulose (20–35%), and lignin (15–25%), and it is a rigid structure organized as an intricate complex of polymers linked by covalent and non-covalent bonds (Fig. 3.3) (Vargas-Tah et al. 2015; Kohli et al. 2019). Other minor components of lignocellulose include vitamins, organic acids, volatile

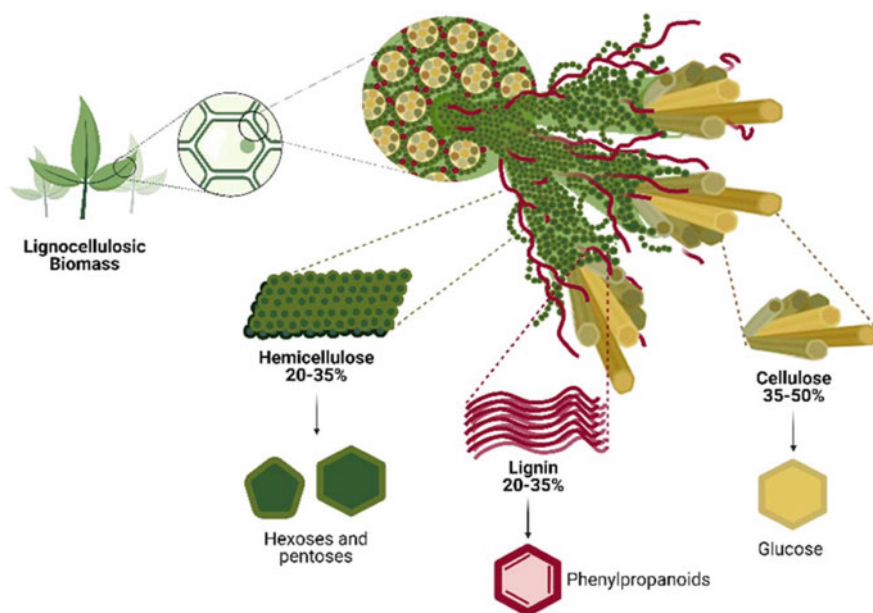


Fig. 3.3 Structure of lignocellulose

compounds, fats, proteins, and inorganic compounds (mainly minerals) (Kumar and Sharma 2017).

Cellulose is a crystalline structure of glucose homopolysaccharides, linked and stabilized by $\beta(1-4)$ glycosidic and hydrogen bonds, respectively (Kannam et al. 2017). Hemicellulose is a branched acetylated heteropolymer composed of xylose, glucose, and arabinose. Stabilized by hydrogen bonds, hemicellulose contains lower amounts of galactose, mannose, and cellobiose, in a less organized structure than cellulose (Kumar et al. 2019). Finally, lignin is an amorphous aromatic polymer synthesized from monolignols such as guaiacyl, *p*-hydroxyphenyl, syringyl, *p*-coumaryl, sinapyl, and coniferyl alcohols (Uzuner et al. 2018). Lignin is found on the exterior of the lignocellulose macro fibrils, covalently attached to hemicellulose, and acted as a crosslinker for cellulose and hemicellulose. Moreover, lignin facilitates rigidity to the cell wall and protects the cellulose structure (Kumar et al. 2019). Physicochemical and thermochemical treatments are often used to hydrolyze the structure due to the recalcitrance of lignocellulose and mechanical support. Physicochemical and thermochemical treatments also help to obtain hemicellulosic monosaccharides, organic acids mainly acetate, volatile compounds such as furans, phenolic lignin derivatives, amorphous cellulose, and low amounts of glucose monosaccharides (Kumar et al. 2009). Since glucose is the preferred substrate for bioconversion processes, additional steps are required to break the amorphous cellulose into free glucose molecules. Therefore, enzymatic saccharification is often used for this purpose (Guo et al. 2018). A wide spectrum of agro-industrial residues can be used as feedstocks in biorefineries. These include bagasses, straws, corn stover and cobs, seeds, coffee pulp and grounds, grasses, and nuts shells. Timber wastes are another important source of lignocellulosic feedstocks that generate a significant amount of residues such as branches, chunks, and sawdust from the cutting process of soft and hardwoods.

Sugarcane bagasse (SCB) is one of the most available wastes, being Brazil, India, and China the top producers of SCB in the world. Since 270 tons of this residue can produce 1000 tons of processed sugarcane, then approximately 600,000 million tons of SCB are generated yearly (Loh et al. 2013; Martinez-Hernandez et al. 2018). The average compositions of SCB are 40–45% cellulose, 30–35% hemicellulose, 20–30% lignin, and up to 2% ashes (Parameswaran 2009; Cardona et al. 2010; Alokika et al. 2021). The SCB is more advantageous for bioconversion processes owing to its low ash content and the higher yield of 80 t/ha per year, compared to 11–17% ashes and 1–20 t/ha per year of other wastes such as straws, grasses, and woods (Pandey et al. 2000). SCB offers benefits to logistic management as it has already been collected in the sugar mill and bioethanol factories, thereby reducing processing costs. Bioprocess techniques to convert SCB into value-added products are divided into a) liquid fermentation, where the whole or hydrolyzed bagasse is utilized, and b) solid-state fermentation, where the SCB is applied as the carbon source or as inert support (Pandey et al. 2000). Although SCB has mainly been used for bioenergy and biofuels production, its versatility in cultivating microorganisms enhances the development of the synthesis of alcohols, composites, polymers, fibers, proteins, etc. Table 3.1 summarizes some processes from SCB to the synthesis products.

Table 3.1 Production of value-added compounds from different lignocellulosic sources

| Agro-industrial waste | Conversion process | Product | Yield/ Titer | Region | Reference |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|---------------|-----------------------------------|
| Sugarcane bagasse | TCH/ES/fermentation | Fuel ethanol | 78% | Asia | Yu et al. (2018) |
| Sugarcane bagasse | TCH/ES/fermentation | Fuel ethanol | 77% | South America | Wanderley et al. (2013) |
| Sugarcane bagasse | TCH/ES/fermentation | Fuel ethanol | 92% | South America | de Araujo Guilherme et al. (2019) |
| Sugarcane bagasse | TCH/fermentation | D-lactate | ~100% | North America | Utrilla et al. (2016) |
| Sugarcane bagasse | TCH/ES/fermentation | 2,3-butanediol | 70% | Asia | Zhao et al. (2011) |
| Corn stover | TCH/ES/fermentation | Fuel Ethanol | 76% | North America | Vargas-Tah et al. (2015) |
| Corn stover | TCH/ES/fermentation | Fuel Ethanol | 74% | Europe | Öhgren et al. (2006) |
| Corn stover | TCH/fermentation | Carboxylic acids | 55% | North America | Thanakoses et al. (2003) |
| Rice straw | TH/ES/fermentation | Ethanol | 81% | Asia | Wi et al. (2013) |
| Rice straw | TCH/fermentation | Butanol | 13.5 g/L | Asia | Ranjan et al. (2013) |
| Oat straw | TCH/fermentation | Biohydrogen | 2.9 mol H ₂ /mol _{hexose} | North America | Arriaga et al. (2011) |
| Wheat straw | TCH/ES/fermentation | Fuel ethanol | 47% | North America | Saha et al. (2005) |
| Wheat straw | Chemo-mechanical | Nanocomposites | – | North America | Alemdar and Sain (2008) |
| Wheat straw | TCH/fermentation | Xylitol | 59% | South America | Canilha et al. (2008) |
| Barley straw | TCH/fermentation | Acetone, butanol, ethanol mixture | 27 g/L | North America | Qureshi et al. (2010) |
| Barley straw | TCH/ES/fermentation | Fuel Ethanol | 70% | Europe | Paschos et al. (2020) |
| Sorghum straw | Pulping/bleaching/acetylation | Cellulose acetate | – | South America | Andrade Alves et al. (2019) |
| Corn cobs | TCH/ES/fermentation | Ethanol | 78% | North America | Pedraza et al. (2016) |
| Avocado seed | TCH/fermentation | D-lactate | 94% | North America | Sierra-Ibarra et al. (2021) |
| Softwood | Co-pyrolysis with zeolite | Aromatic hydrocarbons | 86% | North America | Qian et al. (2021) |

(continued)

Table 3.1 (continued)

| Agro-industrial waste | Conversion process | Product | Yield/ Titer | Region | Reference |
|-----------------------|---|-----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Aspen | TCH/fermentation | Fuel ethanol | 94% | North America | Lawford and Rousseau (1991) |
| Oak | TCH/fermentation | Fuel ethanol | 72% | Asia | Nigam (2001) |
| Eucalyptus | Aqueous two-phase extraction | Antioxidant phenolics | 1.89 mg/ 100 mg _{wood} | Europe | Xavier et al. (2017) |
| Eucalyptus | TCH/fermentation | Xylitol | 26% | South America | Villarreal et al. (2006) |
| Eucalyptus kraft pulp | ES | Caffeic acid | 233 mg/L | Asia | Kawaguchi et al. (2017) |
| Cedar | Alkaline copper oxide–peroxide reaction | Vanillin | 8.5% | Asia | Qu et al. (2017) |
| Pine | Oxidation | Vanillin | 6.8% | Europe | Mathias and Rodrigues (1995) |

TCH thermochemical hydrolysis, *TH* thermal hydrolysis, *ES* enzymatic saccharification

Straw crops include corn, rice, barley, oat, sorghum, wheat, and other grains. However, the straw wastes consist of the remaining dry stalk of the cereal plants after the extraction and removal of grains (Santulli 2017). Straw wastes are abundant since they constitute approximately half of the total biomass of the harvested grains. For example, 1661 million tons, 975 million tons, and 529 million tons of corns stover/cobs, rice straw, and wheat straw, respectively, are annually produced worldwide (Smil 1999; Agwa et al. 2020; Tan et al. 2021). The lignocellulosic content of straw biomass is divided into 32–47% cellulose, 19–27% hemicellulose, 5–24% lignin, and 13–20% ashes (Zaky et al. 2008; Palvasha et al. 2021). The relatively high amount of ashes may be a major drawback for some biotechnological transformations as it decreases the efficiency of thermochemical pretreatment and enzymatic saccharification (Huang et al. 2017). However, the integration of pre-washing steps has improved the global processing efficiency (Singhal et al. 2021). Other processes where straw wastes are widely used to avoid the effect of high ash content include power generation, biogases production, composites, and usage as supporting or filtering materials (Table 3.1).

Forestry wastes are widely used in biorefineries across the North Hemisphere since they are one of the most available agricultural wastes in this region (Galbe and Zacchi 2002). Several studies have recently reported their use around the world. Widespread in most regions are wastes from woods such as oak, aspen, eucalyptus, poplar, teak, pine, cypress, spruce, and cedar, commonly used to produce different value-added products (Table 3.1). Another important fraction of woods is bark, commonly used as solid fuel but with interesting and recently reported content of

bioactive and antioxidant components (Vangeel et al. 2021). Wood from timber can be divided in two main groups: hardwoods and softwoods. Hardwoods are produced by angiosperm trees, comprising of complex structures and vessels (Wilson and White 1986). Hardwoods are used for a large range of applications that include furniture making, musical instruments, boat building, fine constructions, barrels, and manufacture of charcoal (Merkle and Nairn 2005). Softwoods are woods from gymnosperm trees commonly used in the construction industry and paper pulp (Khana and Ahring 2019). The chemical composition of soft and hardwoods depends on the species, age, and growing conditions. However, the respective average composition of softwoods and hardwoods is 43–45% and 40–55% cellulose, 20–23% and 13–40% hemicellulose, and 28% and 18–25% lignin (Galbe and Zacchi 2002; Dziekońska-Kubczak et al. 2018). Despite the high polysaccharides content that makes timber wastes attractive for fermentation, the high content of lignin-derived phenolic compounds is the main constraint for the biotransformation of these materials as they are toxic for various microorganisms and inhibit saccharification enzymes (Clark and Mackie 1984; Martinez et al. 2000; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000; Kumar et al. 2012). However, this constraint can be turned into benefits to produce other high-value aromatic chemicals such as lignosulphonates, vanillin, and antioxidants (Table 3.1).

3.3.2 *Municipal Solid Waste*

The escalating population growth has increased the consumption of energy and goods, generating more than two billion tons of municipal solid wastes globally, being India, the USA, and China the major producers (Waste Atlas 2018). Unfortunately, 33% of these residues collection or recycling are not effectively managed (Nanda and Berruti 2021). Municipal solid wastes (MSW) comprise residues from households, offices, educational institutions, and commercial enterprises, and they vary according to the region and income (Funk et al. 2013). However, a general classification organizes them into recyclables, compostable organic matter, toxic substances, and solid wastes (Millati et al. 2019). The MSW treatment includes landfilling, composting, waste-to-energy conversion, recycling, and incineration (Rao et al. 2017). Of these management strategies, only the transformation of MSW into energy is applied to the biorefinery context. The energy is produced from biohydrogen or methane through the organic fraction of MSW, composed predominantly of food wastes, minor quantities of office paper, yard wastes, and corrugated newspapers (Ghosh et al. 2020). The high variability of organic MSW and the reluctance of people to separate their wastes are the major challenges facing biogas production (Appels et al. 2011). A more detailed review of value-added products synthesis from food wastes is presented below.

3.3.3 Food Waste

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) defined food waste (FW) as food and inedible parts removed from the human food supply chain in the following sectors: food products manufacturing, food/grocery retail, food service, and households (FAO 2011). The organization estimated that one-third (approximately 1300 million tons) of food produced for human consumption is lost or wasted every year, generally dumped or incinerated with municipal solid waste (Xu et al. 2018). These wastes are characterized by high moisture content that generates dioxins from incineration, whereas dumping in open areas is associated with huge social, environmental, and economic problems.

The FW composition presents a high energetic value, consisting mainly of 30–60% carbohydrates, 5–20% proteins, 10–40% lipids (w/w), and traces of inorganic compounds (Kwan et al. 2016; Dhiman and Mukherjee 2021). However, the composition varies by source. For example, animal-based wastes are rich in lipids and proteins, whereas plant-based wastes are full of starch and carbohydrates (Ravindran and Jaiswal 2016). The characteristics associated with their homogeneity make these residues excellent candidates in waste biorefinery as they can be converted into a spectrum of biofuels, bio-commodity chemicals, and bio-based materials (Battista et al. 2020; Tsegaye et al. 2021). Table 3.2. presents the process and waste origin of some of these products.

The food manufacturing industries, commercial and households kitchens, and agricultural waste are the major sources of FW. Among the food processing industries, those with the greatest impact are the fruits processing industry as well as vegetables, cereals, meat, dairy, poultry and eggs, seafood, and aquatic products industries. However, approximately 85% of overall FW originate from plant-based products, and only 15% are from animal products chains (Li and Yang 2016).

Plant-based wastes from the food industry are particularly interesting for the renewable energy sector, as it is mainly of a lignocellulosic nature, with high cellulose and lignin content (Ravindran and Jaiswal 2016). These wastes include fruit and vegetable residues (peelings, stems, seeds, shells, and pulp), cereal residues (mainly paddy, wheat, and corn), starch, and sugar. Since this waste is easily obtained with high yield, the production of ethanol through fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* is the most common approach for FW valorization. However, many bioproducts can be recovered through different approaches, such as biohydrogen from dark fermentation (Yun et al. 2018), bioplastics and enzymes from fermentation (Tsang et al. 2019), biogas from anaerobic digestion (Xu et al. 2018), and high-value products (e.g., carotenoids, phenolic compounds, nanoparticles, and pectin) from different extraction methods (Ravindran and Jaiswal 2016). As these wastes are mostly made up of complex carbohydrates, a biological hydrolysis processing method is always required. The processing is achieved using acids or alkali. However, substances released may inhibit biological conversion. Thus, enzymatic hydrolysis is the preferred method. In addition to the biological

Table 3.2 Bioproducts from food waste using different conversion methods

| Food waste | Process type | Product | Production/ Yield | Reference |
|-------------------------|--|-----------------------|----------------------|-------------------------------|
| Tomato residue | Pyrolysis | Insecticidal bio-oil | 37.8% | Cáceres et al. (2015) |
| Mango seed | Pyrolysis | Bio-oil | 28–38% | Lazzari et al. (2016) |
| Carrot discard juices | Fermentation | Bioethanol | 11.98 g/L | Clementz et al. (2019) |
| Vegetable wastes | Fermentation | Bioethanol | 251.85 mg/g | Chatterjee and Mohan (2021) |
| Kitchen waste | Immobilized lactate oxidase/Fermentation | Bioethanol | 30 g/L | Ma et al. (2014) |
| Beer fermentation waste | Fermentation | Bioethanol | 102.5 g/L | Khattak et al. (2013) |
| Bakery/mixed waste | Fermentation | Lactic acid | 230–270 mg/g | Kwan et al. (2016) |
| Shrimp waste | Solvent extraction | Astaxanthin | 0.284 mg/g | Dave et al. (2020) |
| Dairy wastewater | Microalgae culture | Single-cell oil | 0.8 g/L | Ummalyma and Sukumaran (2014) |
| Bakery hydrolyzed waste | Microalgae culture | C-Phycocyanin | 22 mg/g | Sloth et al. (2017) |
| Catshark viscera | Fermentation | Hyaluronic acid | 2.26 g/L | Vázquez et al. (2015) |
| Shrimp waste | Alkali-acid treatment | Chitin, chitosan | 510; 410 mg/g | Khanafari et al. (2008) |
| Fish skin | Solvent extraction | Acid soluble collagen | 25–45% | Bhuimbar et al. (2019) |
| Shrimp waste | Solvent extraction | Astaxanthin | 0.0406 mg/g | Sachindra et al. (2007) |
| Fish waste | Pyrolysis | Bio-oil | 57.1% | Fadhil et al. (2017) |

conversions, FW hydrolysates are also an option for growing medium for microalgae, useful in producing a wide range of bioproducts (Kiran et al. 2017).

Animal-based food wastes are from meat, poultry, seafood, and dairy industries. The meat processing industry mainly generates wastes such as horns, hooves, bones, contents of the gastrointestinal tract, hair, and deboning waste (Jayathilakan et al. 2012). In addition, slaughterhouse wastewater contains a high organic load and polluting potential, as it is made up of protein, animal fat, blood, and detergent residues (Maroneze et al. 2014). The seafood industry generates an important source of relevant biomaterials in their wastes, which generally includes viscera, shrimp shells, crab shells, skins, prawn waste, and fish scales (Sharma et al. 2020). Dairy residues consist of complex organic milk constituents, such as fat, casein, lactose,

inorganic salts, detergent, and sanitizer residues (Dongre et al. 2020). Residues from the vegetal origin and those of animal origin also present a vast exploitation potential. Any of these sources can be converted into heat, power, or bio-fertilizer through anaerobic digestion. Lactic acid fermentation is used to process meat and poultry waste that produces lactic acid and lactic acid bacteria, which has been applied as probiotic supplements (Ashayerizadeh et al. 2017). Dairy and slaughterhouse wastewater are excellent culture media for microalgae-based processes owing to their high nutritional composition and the absence of inhibitor compounds (Maroneze et al. 2014; Queiroz et al. 2018). The seafood waste is an excellent source of different products and molecules through chemical and biological processing of protein, enzymes, glycosaminoglycans, chitin, astaxanthin, hyaluronic acid, and marine peptones (Vázquez et al. 2013; Sharma et al. 2020).

Besides the potentialities, the lack of techno-economic evaluation of FW data in biorefineries is a challenge. Moreover, the inconsistency in the composition and structural complexity of these feedstocks also make it difficult to use them. Several variables, including the location where the FW was produced, time of picking, and diversified food habits of different cultures, are some of the major factors that significantly affect the composition of the waste (Karmee 2016). Although FW is a zero-value resource, the costs related to collection and transport are a bottleneck that must be considered (Dhiman and Mukherjee 2021).

3.3.4 Oil-Based Wastes

Oil-based waste biorefineries are one of the main refineries, with some liquid fuels such as biodiesel and bio-jet fuel being the main energy added value products (Becerra-Ruiz et al. 2019). Currently, biodiesel production is carried out using feedstocks such as edible vegetable oils (edible feedstocks), non-edible vegetable oils, single-cell oils (microbial lipids), waste cooking oils (WCOs), and waste animal fats (WAFs) from non-edible feedstocks (Adewale et al. 2015). Unlike edible vegetable oils, from which approximately 95% of this biofuel is obtained, WCOs and WAFs contribute to 10% and 6% of biodiesel production, respectively (Mathew et al. 2021). However, the processing of edible and non-edible vegetable oils is restricted in some countries as some of them are considered food products intended for human consumption and for the limited availability of arable land (Pinzi et al. 2014). As the processing of WCOs and WAFs has become relevant for the biofuels production and the pollutants expelled into the environment mitigation, economic and environmental strategies are required to address the problems associated with global renewable energies (Chen et al. 2021).

The sources of WCOs are from fried foods prepared in the food segment (restaurants, households, hotels, etc.), where edible oils (e.g., soybean, canola, corn, olive, and others) and some animal fats (mainly leaf lard) are used for deep immersion cooking (Chen et al. 2021; Singh et al. 2021). As many countries do not have suitable policies for disposing of oily liquid waste, cooking waste oils produced

can massively contribute to the pollution of water resources (Gui et al. 2008; Moecke et al. 2016; Singh et al. 2021). WCOs obtained directly from cooking edible food and oil are classified as yellow grease and characterized by a free fatty acid (FFA) content of 8–15% (w/w). However, the WCOs obtained from grease traps processed in sewage facilities to separate grease and oil from wastewater are classified as brown grease and have an FFA content greater than 15% (Adewale et al. 2015; Pinzi et al. 2014; Talebian-Kiakalaieh et al. 2013). In 2019–2020, approximate consumption of edible oils reached 191.71 million tons, in which WCOs production was estimated to reach 57.51 million tons (~30% yield) (Jiang and Zhang 2016; Singh et al. 2021). In green fuel production, waste cooking oils are a possible substitute to other feedstocks owing to their low manufacturing cost compared to conventional edible vegetable oils (2.5–3.5 times lower) (Nanda et al. 2019; Rezanian et al. 2019). Different methods are used to produce biodiesel from residual cooking oil, which includes base or acid transesterification (homogeneous, heterogeneous, and enzymatic catalysis), dilution or blending, micro-emulsification, thermal cracking, or pyrolysis, among others. However, due to the high free fatty acids (FFAs) and water content, this waste cannot be used directly, a pretreatment process should be performed, which consequently affects the overall processing costs (Rezanian et al. 2019; Singh et al. 2021; Yusuf et al. 2011).

WAFs are obtained as end products from tanneries, slaughterhouses, and meat processing units, serving as a potential cheap feedstock for biodiesel production. In industrial biodiesel production, the most used WAFs are tallow (veal and beef), lard, chicken fat, and fish oil (Adewale et al. 2015; Pinzi et al. 2014; Sander et al. 2018). Animal fats comprise chemical structures similar to vegetable oils, but with a different distribution of fatty acids and an FFAs content ranging from 10 to 25%. This has been one of the main limitations of biofuel production (0.5% w/w FFAs admitted content), and it is an essential parameter in the viability of the biodiesel production process (Alajmi et al. 2018; Bianchi et al. 2010; Veljković et al. 2021). Another technical drawback of using WAFs as feedstock is the high cloud point that limits its use in areas where temperatures do not fall below 4 °C (Bagheri 2017). Despite the above limitations, WAFs have low unsaturated fatty acids, offering several advantages, such as high calorific value, high cetane number, and high oxidation stability (Adewale et al. 2015). In addition, biodiesel production using WAFs as feedstock is the most economical option (USD 0.4–0.5/L) compared to the traditional vegetable oil transesterification (USD 0.6–0.8/L) (Demirbas 2009).

3.3.5 Sewage Sludge

Sewage sludge is an inevitable by-product of the wastewater treatment released from various sources such as houses, industries, medical facilities, street runoff, and businesses (Harrison et al. 2006). Along with the growing world population, industry, and agriculture, the quantity of sewage sludge increases yearly and presents a major ongoing disposal challenge for water management authorities globally. Lack

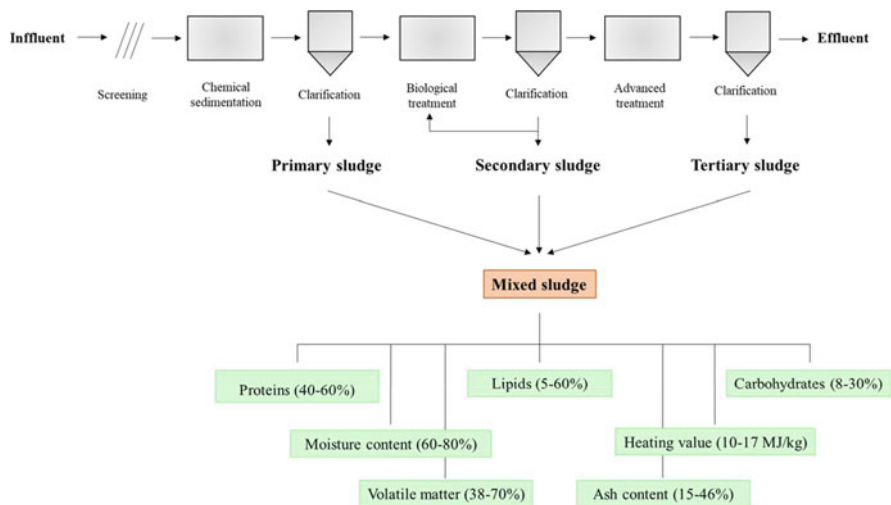


Fig. 3.4 Schematic of the wastewater treatment process and typical composition of sewage sludge (on dry basis). References: Thipkhumthod et al. (2006); Banerjee et al. (2020); Naqvi et al. (2021)

of waste generating data, treatment policies, and use policies of this waste further aggravates its sustainable management. According to Gao et al. (2020), the global sewage sludge production rate was recorded as 45 dry MT per year in 2017.

Sewage sludge contains many harmful elements, such as heavy metals, non-biodegradable organic compounds, pathogens, and dioxins (Zhang et al. 2020). They may also contain chromium, lead, copper, nickel, and other metals of approximate concentrations of between 0.1% w/w and 0.3% w/w (Agrafioti et al. 2013). Inadequate disposal facilities of these wastes cause serious environmental problems and, consequently, affect human health. The treatment and management of sewage sludge comprise approximately 50% of the wastewater treatment cost and 40% of greenhouse gas emissions (Banerjee et al. 2020). Nevertheless, sewage sludge is biomass rich in organic carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic compounds such as silicates and aluminates, in addition to having a high calorific value and a good volatile content. Thus, a promising and alternative way to manage sewage sludge is to use the waste as feedstock using a biorefinery approach (Villalobos-Delgado et al. 2021).

The origin of the wastewater defines the characteristics of the final sewage sludge. Furthermore, the processing stage in which the sludge was removed (primary, secondary, and tertiary) also influences its composition. Figure 3.4 presents a schematic basic wastewater treatment process with a typical composition of produced mixed sewage sludge.

In primary treatment, suspended solids and scum are removed in sedimentation tanks. After this process, the primary sludge will consist of debris, bulk material, and sand. The secondary treatment aims to reduce the biodegradable material, carried out through a biological process, such as activated sludge, moving bed biofilm reactor,

sequencing batch reactor, upflow anaerobic sludge blanket, and stabilization ponds. The solid residue originated from this step is mainly composed of extracellular polymers, organic pollutants, heavy metals, nutrients, and microbial assemblages (Banerjee et al. 2020). The tertiary treatment or advanced stage is applied when high-quality waste is required, involving the chemical removal of dissolved nutrients, mainly nitrogen and phosphorus. The sludge collected in this step presents a high concentration of nutrients like NO_3 , PO_4 , and SO_4 , in addition to heavy metals in many cases (Demirbas et al. 2017). Finally, the mixed sewage sludge consists of a mixture of organic, inorganic materials, and moisture (Naqvi et al. 2021).

Due to its composition, the main disposal routes for this waste include land applications such as fertilizer. However, direct use in agriculture is controversial due to the presence of heavy metals, pathogens, and micropollutants, which can aggregate the food chain (Herzel et al. 2016). Fortunately, different conversion methods have been proposed to convert sewage sludge into energy and chemicals, which include thermochemical and biochemical processes or a combination of the two platforms. According to Werle and Dudziak (2019) and Naqvi et al. (2021), the thermochemical conversion of sewage sludge (incineration, gasification, and pyrolysis) appears to be the most promising alternative for its management and energy production in the future. This is due to the significant volume (up to 90%) reduction, mass (up to 70%) reduction, and the sterility of the final by-product (Ducoli et al. 2021).

Sewage sludge incineration is the most practiced thermal technology with the ability to recover energy and residual ash. The ash is rich in CaO_2 , SiO_2 , Fe_2O_3 , and Al_2O_3 and can be disposed into landfills or can be used as a raw material substitute in cement industries (Ducoli et al. 2021). Moreover, the recovered heat can be used for drying raw sewage sludge in other biorefining processing. However, it is a source of harmful emissions of toxic compounds, in addition to being a costly alternative (Banerjee et al. 2020).

The gasification process is an alternative to using sewage sludge as a raw material for biorefineries. As this is a reducing process, it eliminates the problem of emitting gaseous contaminants to the atmosphere, unlike incineration. The main products from gasification are synthesis gas, a hydrocarbon-rich combustible gas suitable for burning and generating energy. Another by-product is the biochar, a carbon-rich solid material, that can be used for catalyst, adsorbent, or nutrients recovery. However, due to the excessive moisture and ash content of sewage sludge, the quality of gasification products is low. Thus, gas cleaning and high energy consumption are the main bottlenecks to overcome. A viable option is to combine energy production with phosphorus recovery (Werle and Dudziak 2019).

Pyrolysis of the sewage sludge produces liquid bio-oil, combustible gases, fixed carbon, ash, and water vapor. Pyrolysis is considered a favorable sludge management option, since it converts this feedstock into liquid bio-oil, combustible gases, and biochar, with low emission of pollutants, in addition to demanding cheaper equipment (Gao et al. 2020; Vali et al. 2021). The bio-oil produced in a yield is in the range of 51–80 wt%, comprising of a complex mixture of water, organic compounds, and other components that can be used as biofuel and chemicals, including

fertilizers, resins, and light aromatics (Djandja et al. 2020). This solid product (yield between 35 and 80 wt%) has a high potential to be applied as an adsorbent of pollutants such as H₂S or NO_x in gaseous streams or as a reducer in metallurgical processes or as a fuel to maintain the process (Fonts et al. 2012).

In summary, despite having high moisture, ash, and heavy metal content, sewage sludge is a promising feedstock for energy and chemical recovery, especially if we consider that the feedstock becomes a zero-waste material. However, it requires preliminary dewatering to decrease the liquidity of the feedstock to up to ~20% and increase its organic matter concentration, which significantly increases the costs of these processes. Even so, Shahbeig and Nosrati (2020) showed that sewage sludge was economically feasible to produce bioenergy from municipal sewage sludge pyrolysis. However, the lack of technical-economic information in the literature is another challenge related to sewage sludge biorefining.

3.4 Concluding Remarks

It was clearly demonstrated that there are a wide range of waste feedstocks that offer exploration potential to produce a large spectrum of by-products, especially bioenergy. This is a very interesting outlook for biorefineries, given that a portfolio of products amplifies economic viability and confers adaptability to a process. However, there are several key points of technical and economic difficulty that must be addressed and dealt with in order to consolidate such bioprocesses.

The high cost, necessity of pretreatment in most cases, and current low oil prices limit the industrial application of wastes as a biorefinery feedstock. Nevertheless, it is crucial to consider that these processes not only increase additional value to the waste but also solve environmental problems. Thus, to make the valorization of these resources commercially viable, it is important to conduct additional R & D in this domain, in addition to support from government agencies, through investments, subsidies, tax credit, etc.

This chapter demonstrated that each residue has its benefits, limitations, specificities, and possibilities. Thus, choosing the appropriate feedstock is challenging as it depends on demand, availability of resources, and geographic position, among others. Thus, for the viable development of a waste-based process, we recommend conducting a careful analysis based on the information presented and the processing requirements.

Acknowledgments This work was supported by the National Autonomous University of Mexico, through the PAPIIT-DGAPA-UNAM project: IT201119. MMM was supported with a postdoctoral fellowship from the UNAM-DGAPA.

References

- Adewale P, Dumont MJ, Ngadi M (2015) Recent trends of biodiesel production from animal fat wastes and associated production techniques. *Renew Sust Energ Rev* 45:574–588
- Agrafioti E, Bouras G, Kalderis D, Diamadopoulos E (2013) Biochar production by sewage sludge pyrolysis. *J Anal Appl Pyrolysis* 101:72–78
- Agwa IS, Omar OM, Tayeh BA, Abdelsalam BA (2020) Effects of using rice straw and cotton stalk ashes on the properties of lightweight self-compacting concrete. *Constr Build Mater* 235: 117541
- Alajmi FSMDA, Hairuddin AA, Adam NM, Abdullah LC (2018) Recent trends in biodiesel production from commonly used animal fats. *Int J Energy Res* 42:885–902
- Albonetti S, Perathoner S, Quadrelli EA (2019) Horizons in sustainable industrial chemistry and catalysis. Elsevier
- Alemdar A, Sain M (2008) Biocomposites from wheat straw nanofibers: morphology, thermal and mechanical properties. *Compos Sci Technol* 68:557–565
- Alokika A, Kumar A, Kumar V, Singh B (2021) Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: potential, challenges and future perspective. *Int J Biol Macromol* 169: 564–582
- Anderson TM (2009) Industrial fermentation processes. In: Schaechter M (ed) *Industrial fermentation processes*. Academic Press, pp 349–361
- Andrade Alves JA, Lisboa dos Santos MD, Morais CC, Ramirez Ascheri JL, Signini R, dos Santos DM, Ramirez Ascheri DP (2019) Sorghum straw: Pulping and bleaching process optimization and synthesis of cellulose acetate. *Int J Biol Macromol* 135:877–886
- Antonopoulou G, Ntaikou I, Stamatelatou K, Lyberatos G (2011) 13 – Biological and fermentative production of hydrogen. In: Luque R, Campelo J, Clark J (eds) *Handbook of biofuels production*. Woodhead Publishing, pp 305–346
- Appels L, Lauwers J, Degreève J, Helsen L, Lievens B, Willems K, Dewil R (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renew Sust Energ Rev* 15:4295–4301
- Arriaga S, Rosas I, Alatraste-Mondragón F, Razo-Flores E (2011) Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *Int J Hydrog Energy* 36:3442–3449
- Ashayerizadeh O, Dastar B, Samadi F, Khomeiri M, Yamchi A, Zerehdaran S (2017) Study on the chemical and microbial composition and probiotic characteristics of dominant lactic acid bacteria in fermented poultry slaughterhouse waste. *Waste Manag* 65:178–185
- Badgajar KC, Bhanage BM (2018) Dedicated and waste feedstocks for biorefinery: an approach to develop a sustainable society. In: Bhaskar IT, Pandey A, Mohan SV, Lee D-J, Khanal SK (eds) *Waste biorefinery*. Elsevier, pp 3–38
- Bagheri S (2017) Biodiesel and green diesel production, upgrading of fats and oils from renewable sources. In: Bagheri S (ed) *Catalysis for green energy and technology*. Springer, pp 91–112
- Banerjee A, Bhaskar T, Ghosh D (2020) A biorefinery approach for sewage sludge. In: Bhaskar T, Pandey A, Mohan SV, Lee D-J, Khanal SK (eds) *Waste biorefinery*. Elsevier, pp 393–421
- Battista F, Frison N, Pavan P, Cavinato C, Gottardo M, Fatone F, Bolzonella D (2020) Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts. *J Chem Technol Biotechnol* 95:328–338
- Becerra-Ruiz JD, Gonzalez-Huerta RG, Gracida J, Amaro-Reyes A, Macias-Bobadilla G (2019) Using green-hydrogen and bioethanol fuels in internal combustion engines to reduce emissions. *Int J Hydrog Energy* 44:12324–12332
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew Sust Energ Rev* 36:91–106
- Bhuimbar MV, Bhagwat PK, Dandge PB (2019) Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: development of collagen-chitosan blend as food packaging film. *J Environ Chem Eng* 7:102983

- Bianchi CL, Boffito DC, Pirola C, Ragaini V (2010) Low temperature de-acidification process of animal fat as a pre-step to biodiesel production. *Catal Lett* 134:179–183
- Bilal M, Vilar DS, Eguiluz KIB, Ferreira LFR, Bhatt P, Iqbal HM (2021) Biochemical conversion of lignocellulosic waste into renewable energy. *Advanced technology for the conversion of waste into fuels and chemicals*. Elsevier, pp 147–171
- Cáceres LA, McGarvey BD, Briens C, Berruti F, Yeung KKC, Scott IM (2015) Insecticidal properties of pyrolysis bio-oil from greenhouse tomato residue biomass. *J Anal Appl Pyrolysis* 112:333–340
- Canilha L, Carvalho W, Felipe MDGA, Silva JBDA (2008) Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Braz J Microbiol* 39:333–336
- Cardona CA, Quintero JA, Paz IC (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour Technol* 101:4754–4766
- Chatterjee S, Mohan SV (2021) Refining of vegetable waste to renewable sugars for ethanol production: depolymerization and fermentation optimization. *Bioresour Technol* 340:125650
- Chen C-Y, Yang M-H, Yeh K-L, Liu C-H, Chang J-S (2008) Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int J Hydrog Energy* 33:4755–4762
- Chen C, Chaudhary A, Mathys A (2020) Nutritional and environmental losses embedded in global food waste. *Resour Conserv Recycl* 160:104912
- Chen C, Chitose A, Kusadokoro M, Nie H, Xu W, Yang F, Yang S (2021) Sustainability and challenges in biodiesel production from waste cooking oil: an advanced bibliometric analysis. *Energy Rep* 7:4022–4034
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* 51:1412–1421
- Cho EJ, Trinh LTP, Song Y, Lee YG, Bae H-J (2020) Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. *Bioresour Technol* 298:122386
- Clark TA, Mackie KL (1984) Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J Chem Technol Biotechnol* 34:101–110
- Clementz AL, Manuale D, Sanchez E, Vera C, Yori JC (2019) Use of discards of bovine bone, yeast and carrots for producing second generation bio-ethanol. *Biocatal Agric Biotechnol* 22:101392
- Dave D, Liu Y, Pohling J, Trenholm S, Murphy W (2020) Astaxanthin recovery from Atlantic shrimp (*Pandalus borealis*) processing materials. *Bioresour Technol Reports* 11:100535
- de Araujo Guilherme A, Dantas PVF, Padilha CEDA, dos Santos ES, de Macedo GR (2019) Ethanol production from sugarcane bagasse: use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. *J Environ Manag* 234:44–51
- De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R (2018) Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresour Technol* 247:1144–1154
- de Jong, E., Jungmeier, G. (2015). Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In A. Pandey, R. Höfer, M. Taherzadeh, K. M. Nampoothiri, & C. Larroche. *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 3–33). Elsevier
- de Jong E, Higson A, Walsh P, Wellisch M (2012) Bio-based chemicals value added products from biorefineries. *IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery*, 34
- Demirbas A (2009) Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Appl Energy* 86:S108–S117
- Demirbas A, Edris G, Alalayah WM (2017) Sludge production from municipal wastewater treatment in sewage treatment plant. *Energy Sour Part A Recov Util Environ Eff* 39:999–1006
- Dhiman S, Mukherjee G (2021) Present scenario and future scope of food waste to biofuel production. *J Food Process Eng* 44:e13594
- Djandja OS, Wang ZC, Wang F, Xu YP, Duan PG (2020) Pyrolysis of municipal sewage sludge for biofuel production: a review. *Ind Eng Chem Res* 59:16939–16956

- Dongre A, Sogani M, Sonu K, Syed Z, Sharma G (2020) Treatment of dairy wastewaters: evaluating microbial fuel cell tools and mechanism. In: Sarvajayakesavalu S, Charoensudjai P (eds) Environmental issues and sustainable development. IntechOpen, pp 374–400
- Ducoli S, Zacco A, Bontempi E (2021) Incineration of sewage sludge and recovery of residue ash as building material: a valuable option as a consequence of the COVID-19 pandemic. *J Environ Manag* 282:111966
- Dziekońska-Kubczak UA, Berłowska J, Dziugan PT, Patelski P, Balcerek M, Pielech-Przybylska KJ, Domański JT (2018) Comparison of steam explosion, dilute acid, and alkali pretreatments on enzymatic saccharification and fermentation of hardwood sawdust. *Bioresources* 13:6970–6984
- Fadhil AB, Ahmed AI, Salih HA (2017) Production of liquid fuels and activated carbons from fish waste. *Fuel* 187:435–445
- FAO (2011) Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome
- Fonts I, Gea G, Azuara M, Ábrego J, Arauzo J (2012) Sewage sludge pyrolysis for liquid production: a review. *Renew Sust Energ Rev* 16:2781–2805
- Funk K, Milford J, Simpkins T (2013) Waste not, want not: Analyzing the economic and environmental viability of waste-to-energy (WTE) technology for site-specific optimization of renewable energy options: National Renewable Energy Lab. (NREL), Golden, CO (United States)
- Galbe M, Zacchi G (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:618–628
- Gao N, Kamran K, Quan C, Williams PT (2020) Thermochemical conversion of sewage sludge: a critical review. *Prog Energy Combust Sci* 79:100843
- Ghosh P, Shah G, Sahota S, Singh L, Vijay VK (2020) Chapter 7 – Biogas production from waste: technical overview, progress, and challenges. In: Singh L, Yousuf A, Mahapatra DM (eds) *Bioreactors*. Elsevier, pp 89–104
- Godbey WT (2014) Chapter 16 – Fermentation, beer, and biofuels. In: Godbey WT (ed) *An introduction to biotechnology*. Woodhead Publishing, pp 331–351
- Gui MM, Lee KT, Bhatia S (2008) Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy* 33:1646–1653
- Guo H, Chang Y, Lee D-J (2018) Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: research focuses. *Bioresour Technol* 252:198–215
- Harrison EZ, Oakes SR, Hysell M, Hay A (2006) Organic chemicals in sewage sludges. *Sci Total Environ* 367:481–497
- Herzel H, Krüger O, Hermann L, Adam C (2016) Sewage sludge ash—A promising secondary phosphorus source for fertilizer production. *Sci Total Environ* 542:1136–1143
- Huang C, Lai C, Wu X, Huang Y, He J, Huang C, Yong Q (2017) An integrated process to produce bio-ethanol and xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from high ash content waste wheat straw. *Bioresour Technol* 241:228–235
- IEA (2008) IEA (International Energy Agency) Bioenergy Task 42 on Biorefineries. Minutes of the third Task meeting, Copenhagen, Denmark, 25 and 26 March 2008 (www.biorefinery.nl/IEABioenergy-Task42)
- Jayathilakan K, Sultana K, Radhakrishna K, Bawa AS (2012) Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol* 49: 278–293
- Jiang Y, Zhang Y (2016) Supply chain optimization of biodiesel produced from waste cooking oil. *Transp Res Proc* 12:938–949
- Kannam SK, Oehme DP, Doblin MS, Gidley MJ, Bacic A, Downton MT (2017) Hydrogen bonds and twist in cellulose microfibrils. *Carbohydr Polym* 175:433–439
- Karmee SK (2016) Liquid biofuels from food waste: current trends, prospect and limitation. *Renew Sust Energ Rev* 53:945–953

- Karpagam R, Jawaharraj K, Gnanam R (2021) Review on integrated biofuel production from microalgal biomass through the outset of transesterification route: a cascade approach for sustainable bioenergy. *Sci Total Environ* 766:144236
- Kawaguchi H, Katsuyama Y, Danyao D, Kahar P, Nakamura-Tsuruta S, Teramura H, Kondo A (2017) Caffeic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp using recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:5279–5290
- Khana MU, Ahring BK (2019) Anaerobic degradation of Softwood lignin through wet explosion pretreatment. Paper presented at the 2019 ASABE Annual International Meeting
- Khanafari A, Marandi REZA, Sanati S (2008) Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *J Environ Health Sci Eng* 5:1–24
- Khattak WA, Khan T, Ha JH, Ul-Islam M, Kang MK, Park JK (2013) Enhanced production of bioethanol from waste of beer fermentation broth at high temperature through consecutive batch strategy by simultaneous saccharification and fermentation. *Enzym Microb Technol* 53:322–330
- Kim KR, Owens G (2010) Potential for enhanced phytoremediation of landfills using biosolids—a review. *J Environ Manag* 91:791–797
- Kiran R, Riaz A, Irfan M, Shakir HA (2017) An overview of pre-treatment methods used for bioconversion of lignocellulosic biomasses into valuable products. *Punjab Univ J Zool* 32:283–294
- Kohli K, Prajapati R, Sharma BK (2019) Bio-based chemicals from renewable biomass for integrated biorefineries. *Energies* 12:233
- Kumar A, Sharma S (2017) Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour Bioprocess* 4:7
- Kumar P, Barrett D, Delwiche M, Stroeve P (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* 48:3713–3729
- Kumar L, Arantes V, Chandra R, Saddler J (2012) The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour Technol* 103:201–208
- Kumar RP, Gnansounou E, Raman JK, Baskar G (2019) Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts: technology, advances, life cycle assessment, and economics. Academic Press
- Kwan TH, Hu Y, Lin CSK (2016) Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. *Bioresour Technol* 217:129–136
- Labaki M, Jeguirim M (2017) Thermochemical conversion of waste tires—a review. *Environ Sci Pollut Res* 24:9962–9992
- Lawford HG, Rousseau JD (1991) Fuel ethanol from hardwood hemicellulose hydrolysate by genetically engineered *Escherichia coli* B carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 13:191–196
- Lazzari E, Schena T, Primaz CT, da Silva Maciel GP, Machado ME, Cardoso CAL, Jacques RA, Caramão EB (2016) Production and chromatographic characterization of bio-oil from the pyrolysis of mango seed waste. *Ind Crop Prod* 83:529–536
- Lee SY, Park SW, Alam MT, Jeong YO, Seo YC, Choi HS (2020) Studies on the gasification performance of sludge cake pre-treated by hydrothermal carbonization. *Energies* 13:1442
- Li S, Yang X (2016) Biofuel production from food wastes. In: Luque R, Lin CSK, Wilson K, Clark J (eds) *Handbook of biofuels production*. Woodhead Publishing, pp 617–653
- Loh Y, Sujana D, Rahman ME, Das CA (2013) Sugarcane bagasse—The future composite material: A literature review. *Resour Conserv Recycl* 75:14–22
- Ma HZ, Xing Y, Yu M, Wang Q (2014) Feasibility of converting lactic acid to ethanol in food waste fermentation by immobilized lactate oxidase. *Appl Energy* 129:89–93
- Markard J, Rosenbloom D (2020) A tale of two crises: COVID-19 and climate. *Sustain Sci Pract Policy* 16:53–60
- Maroneze MM, Barin JS, Menezes CRD, Queiroz MI, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2014) Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Sci Agric* 71:521–524

- Maroneze MM, Vieira JG, aria Isabel Queiroz, M. I. (2019) Thermal depolymerization of wastes. In: Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Queiroz MI (eds) Waste-to-Energy (WtE). Nova Science Publishers, pp 271–280
- Martinez A, Rodriguez ME, York SW, Preston JF, Ingram LO (2000) Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol Bioeng* 69:526–536
- Martinez-Hernandez E, Amezcua-Allieri MA, Sadhukhan J, Anell JA (2018) Sugarcane bagasse valorization strategies for bioethanol and energy production. In: De Oliveira A (ed) Sugarcane-technology and research. IntechOpen, pp 1571–1595
- Materazzi M, Foscolo PU (2019) The role of waste and renewable gas to decarbonize the energy sector. In: Materazzi M (ed) Substitute natural gas from waste. Academic Press, pp 1–19
- Mathew GM, Raina D, Narisetty V, Kumar V, Saran S, Pugazhendi A, Binod P (2021) Recent advances in biodiesel production: challenges and solutions. *Sci Total Environ* 794:148751
- Mathias AL, Rodrigues AE (1995) Production of Vanillin by Oxidation of Pine Kraft Lignins with Oxygen 49:273–278
- Meegoda JN, Li B, Patel K, Wang LB (2018) A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. *Int J Environ Res Public Health* 15:2224
- Mehmood T, Nadeem F, Qamar SA, Bilal M, Iqbal HMN (2021) Bioconversion of agro-industrial waste into value-added compounds. In: Inamuddin, Khan A (eds) Sustainable bioconversion of waste to value added products. Springer, pp 349–368
- Merkle SA, Nairn CJ (2005) Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:602–619
- Millati R, Cahyono RB, Ariyanto T, Azzahrani IN, Putri RU, Taherzadeh MJ (2019) Agricultural, industrial, municipal, and forest wastes: an overview. *Sustain Resour Recov Zero Waste Appr*:1–22
- Moecke EHS, Feller R, dos Santos HA, Machado MDM, Cubas ALV, Dutra ARDA, Soares SR (2016) Biodiesel production from waste cooking oil for use as fuel in artisanal fishing boats: Integrating environmental, economic and social aspects. *J Clean Prod* 135:679–688
- Mohan SV, Nikhil GN, Chiranjeevi P, Reddy CN, Rohit MV, Kumar AN, Sarkar O (2016) Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. *Bioresour Technol* 215:2–12
- Moncada J, Tamayo JA, Cardona CA (2014) Integrating first, second, and third generation biorefineries: Incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery. *Chem Eng Sci* 118:126–140
- Mu D, Seager T, Rao PS, Zhao F (2010) Comparative life cycle assessment of lignocellulosic ethanol production: biochemical versus thermochemical conversion. *Environ Manag* 46:565–578
- Nanda S, Berruti F (2021) Municipal solid waste management and landfilling technologies: a review. *Environ Chem Lett* 19:1433–1456
- Nanda S, Rana R, Hunter HN, Fang Z, Dalai AK, Kozinski JA (2019) Hydrothermal catalytic processing of waste cooking oil for hydrogen-rich syngas production. *Chem Eng Sci* 195:935–945
- Naqvi SR, Tariq R, Shahbaz M, Naqvi M, Amin A, Khan Z, Al-Ansari T (2021) Recent developments on sewage sludge pyrolysis and its kinetics: Resources recovery, thermogravimetric platforms, and innovative prospects. *Comput Chem Eng* 107325
- Nigam J (2001) Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *J Appl Microbiol* 90:208–215
- Öhgren K, Rudolf A, Galbe M, Zacchi G (2006) Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass Bioenergy* 30:863–869
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol* 74:17–24

- Palvasha BA, Ahmad S, Abbasi BBK, Nazir MS, Abdullah M (2021) Bioconversion of straw biomass into bioproducts sustainable bioconversion of waste to value added products. In: Inamuddin AK (ed) Sustainable bioconversion of waste to value added products. Springer, pp 369–383
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 74:69–80
- Parameswaran B (2009) Sugarcane bagasse. In: Nigam PS, Pandey A (eds) Biotechnology for agro-industrial residues utilization. Springer, pp 239–252
- Paschos T, Louloudi A, Papayannakos N, Kekos D, Mamma D (2020) Potential of barley straw for high titer bioethanol production applying pre-hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation at high solid loading. *Biofuels*:1–7
- Pedraza L, Flores A, Toribio H, Quintero R, Le Borgne S, Moss-Acosta C, Martinez A (2016) Sequential thermochemical hydrolysis of corncobs and enzymatic saccharification of the whole slurry followed by fermentation of solubilized sugars to ethanol with the ethanologenic strain *Escherichia coli* MS04. *Bioenergy Res* 9:1046–1052
- Pinzi S, Leiva D, López-García I, Redel-Macías MD, Dorado MP (2014) Latest trends in feedstocks for biodiesel production. *Biofuels Bioprod Biorefin* 8:126–143
- Qian M, Lei H, Villota E, Zhao Y, Huo E, Wang C, Zou R (2021) Enhanced production of renewable aromatic hydrocarbons for jet-fuel from softwood biomass and plastic waste using hierarchical ZSM-5 modified with lignin-assisted re-assembly. *Energy Convers Manag* 236: 114020
- Qu C, Kaneko M, Kashimura K, Tanaka K, Ozawa S, Watanabe T (2017) Direct production of vanillin from wood particles by copper oxide–peroxide reaction promoted by electric and magnetic fields of microwaves. *ACS Sustain Chem Eng* 5:11551–11557
- Queiroz MI, Maroneze MM, Manetti AGDS, Vieira JG, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2018) Enhanced single-cell oil production by cold shock in cyanobacterial cultures. *Ciência Rural* 48. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180366>
- Qureshi N, Saha BC, Dien B, Hector RE, Cotta MA (2010) Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate. *Biomass Bioenergy* 34:559–565
- Ranjan A, Khanna S, Moholkar VS (2013) Feasibility of rice straw as alternate substrate for biobutanol production. *Appl Energy* 103:32–38
- Rao MN, Sultana R, Kota SH (2017) Chapter 2 – Municipal solid waste. In: Rao MN, Sultana R, Kota SH (eds) Solid and hazardous waste management. Butterworth-Heinemann, pp 3–120
- Ravindran R, Jaiswal AK (2016) Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends Biotechnol* 34:58–69
- Ravindran R, Hassan SS, Williams GA, Jaiswal AK (2018) A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. *Bioengineering* 5:93
- Rehan M, Nizami AS, Rashid U, Naqvi MR (2019) Waste biorefineries: future energy, green products and waste treatment. *Front Energy Res* 7:55
- Rezania S, Oryani B, Park J, Hashemi B, Yadav KK, Kwon EE, Cho J (2019) Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on economic aspects, fuel properties and by-product applications. *Energy Convers Manag* 201:112155
- Sachindra NM, Bhaskar N, Siddegowda GS, Sathisha AD, Suresh PV (2007) Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresour Technol* 98:1642–1646
- Sağır E, Hallenbeck PC (2019) Photofermentative hydrogen production. In *Biohydrogen* (pp. 141–157). Elsevier
- Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem* 40:3693–3700
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27:185–194
- Sander A, Antonije Koščak M, Kosir D, Milosavljević N, Parlov Vuković J, Magić L (2018) The influence of animal fat type and purification conditions on biodiesel quality. *Renew Energy* 118: 752–760

- Santos J, Ouadi M, Jahangiri H, Hornung A (2020) Thermochemical conversion of agricultural wastes applying different reforming temperatures. *Fuel Process Technol* 203:106402
- Santulli C (2017) The use of wheat straw as an agricultural waste in composites for semi-structural applications. In: Thakur VK, Thakur MK, Kessler MR (eds) *Handbook of composites from renewable materials*. Scrivener Publishing LLC, pp 515–531
- Shahbeig H, Nosrati M (2020) Pyrolysis of municipal sewage sludge for bioenergy production: thermo-kinetic studies, evolved gas analysis, and techno-socio-economic assessment. *Renew Sust Energ Rev* 119:109567
- Sharma P, Gaur VK, Kim SH, Pandey A (2020) Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour Technol* 299:122580
- Sierra-Ibarra E, Leal-Reyes LJ, Huerta-Beristain G, Hernández-Orihuela AL, Gosset G, Martínez-Antonio A, Martínez A (2021) Limited oxygen conditions as an approach to scale-up and improve D and L-lactic acid production in mineral media and avocado seed hydrolysates with metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:379–389
- Singh D, Sharma D, Soni SL, Inda CS, Sharma S, Sharma PK, Jhalani A (2021) A comprehensive review of biodiesel production from waste cooking oil and its use as fuel in compression ignition engines: 3rd generation cleaner feedstock. *J Clean Prod* 307:127299
- Singhal A, Kontinen J, Joronen T (2021) Effect of different washing parameters on the fuel properties and elemental composition of wheat straw in water-washing pre-treatment. Part I: Effect of washing duration and biomass size. *Fuel* 292:120206
- Sloth JK, Jensen HC, Pleissner D, Eriksen NT (2017) Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. *Bioresour Technol* 238:296–305
- Smil V (1999) Crop residues: Agriculture's largest harvest: Crop residues incorporate more than half of the world's agricultural phytomass. *Bioscience* 49:299–308
- Solarte-Toro JC, Duran CAR, Ortiz-Sanchez M, Cardona-Alzate CA (2021) A comprehensive review on the economic assessment of biorefineries: the first step towards sustainable biomass conversion. *Bioresour Technol Reports* 100776
- Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS, Mazaheri H (2013) A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Appl Energy* 104:683–710
- Tan SX, Lim S, Ong HC, Pang YL (2019) State of the art review on development of ultrasound-assisted catalytic transesterification process for biodiesel production. *Fuel* 235:886–907
- Tan J, Li Y, Tan X, Wu H, Li H, Yang S (2021) Advances in pretreatment of straw biomass for sugar production. *Front Chem* 9
- Thanakoses P, Black AS, Holtzapple MT (2003) Fermentation of corn stover to carboxylic acids. *Biotechnol Bioeng* 83:191–200
- Thipkhumthod P, Meeyoo V, Rangsunvigit P, Kitiyanan B, Siemanond K, Rirkosomboon T (2006) Pyrolytic characteristics of sewage sludge. *Chemosphere* 64:955–962
- Tomasik P, Horton D (2012) Enzymatic conversions of starch. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 68: 59–436
- Tsang YF, Kumar V, Samadar P, Yang Y, Lee J, Ok YS, Jeon YJ (2019) Production of bioplastic through food waste valorization. *Environ Int* 127:625–644
- Tsegaye B, Jaiswal S, Jaiswal AK (2021) food waste biorefinery: pathway towards circular bioeconomy. *Foods* 10:1174
- Ummalyma SB, Sukumaran RK (2014) Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresour Technol* 165:295–301
- Utrilla J, Licon-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, Martínez A (2012) Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metab Eng* 14:469–476
- Utrilla J, Vargas-Tah A, Trujillo-Martínez B, Gosset G, Martínez A (2016) Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresour Technol* 220:208–214

- Uzuner S, Sharma-Shivappa RR, Cekmecelioglu D, Kolar P (2018) A novel oxidative destruction of lignin and enzymatic digestibility of hazelnut shells. *Biocatal Agric Biotechnol* 13:110–115
- Vali N, Åmand LE, Combres A, Richards T, Pettersson A (2021) Pyrolysis of municipal sewage sludge to investigate char and phosphorous yield together with heavy-metal removal—experimental and by thermodynamic calculations. *Energies* 14:1477
- Vangeel T, Neiva DM, Quilho T, Costa RA, Sousa V, Sels BF, Pereira H (2021) Tree bark characterization envisioning an integrated use in a biorefinery. *Biomass Convers Biorefinery*:1–15
- Vargas-Tah A, Moss-Acosta CL, Trujillo-Martinez B, Tiessen A, Lozoya-Gloria E, Orencio-Trejo-M, Martínez A (2015) Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresour Technol* 198:611–618
- Vázquez JA, Rodríguez-Amado I, Montemayor MI, Fraguas J, González MDP, Murado MA (2013) Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Mar Drugs* 11:747–774
- Vázquez JA, Pastrana L, Piñeiro C, Teixeira JA, Pérez-Martín RI, Amado IR (2015) Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scylliorhinus canicula* discards. *Mar Drugs* 13:6537–6549
- Veljković VB, Banković-Ilić IB, Stamenković OS, Hung Y-T (2021) Waste Vegetable oils, fats, and cooking oils in biodiesel production. In: Wang LK, Wang M-HS, Hung Y-T (eds) Integrated natural resources research. Springer, pp 147–263
- Villalobos-Delgado FJ, di Bitonto L, Reynel-Ávila HE, Mendoza-Castillo DI, Bonilla-Petriciolet A, Pastore C (2021) Efficient and sustainable recovery of lipids from sewage sludge using ethyl esters of volatile fatty acids as sustainable extracting solvent. *Fuel* 295:120630
- Villarreal MLM, Prata AMR, Felipe MGA, Almeida E Silva JB (2006) Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzym Microb Technol* 40:17–24
- Wanderley MCDA, Martín C, Rocha GJDM, Gouveia ER (2013) Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 128:448–453
- Waste Atlas (2018) What a waste: an updated look into the future of solid waste management. <https://www.worldbank.org/en/news/immersive-story/2018/09/20/what-a-waste-an-updated-look-into-the-future-of-solid-waste-management>. Accessed 25 sept 2021
- Werle S, Dudziak M (2019) Gasification of sewage sludge. In: Prasad MNV, Favas PJC, Vithanage M, Venkata Mohan S (eds) Industrial and municipal sludge. Elsevier, pp 575–593
- Wi SG, Choi IS, Kim KH, Kim HM, Bae H-J (2013) Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. *Biotechnol Biofuels* 6:166
- Wilson K, White DJB (1986) The anatomy of wood: its diversity and variability. Stobart & Son
- Xavier L, Freire MS, Vidal-Tato I, González-Álvarez J (2017) Recovery of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* wood wastes using PEG/phosphate aqueous two-phase systems. *Waste Biomass Valorization* 8:443–452
- Xu F, Li Y, Ge X, Yang L, Li Y (2018) Anaerobic digestion of food waste: challenges and opportunities. *Bioresour Technol* 247:1047–1058
- Yu N, Tan L, Sun Z-Y, Nishimura H, Takei S, Tang Y-Q, Kida K (2018) Bioethanol from sugarcane bagasse: focused on optimum of lignin content and reduction of enzyme addition. *Waste Manag* 76:404–413
- Yun YM, Lee MK, Im SW, Marone A, Trably E, Shin SR, Kim M-D, Cho S-K, Kim DH (2018) Biohydrogen production from food waste: current status, limitations, and future perspectives. *Bioresour Technol* 248:79–87

- Yusuf NNAN, Kamarudin SK, Yaakub Z (2011) Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Convers Manag* 52:2741–2751
- Zaky RR, Hessien MM, El-Midany AA, Khedr MH, Abdel-Aal EA, El-Barawy KA (2008) Preparation of silica nanoparticles from semi-burned rice straw ash. *Powder Technol* 185:31–35
- Zhang X, Li X, Li R, Wu Y (2020) Hydrothermal carbonization and liquefaction of sludge for harmless and resource purposes: a review. *Energy Fuel* 34:13268–13290
- Zhao X, Song Y, Liu D (2011) Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of alkali/peracetic acid-pretreated sugarcane bagasse for ethanol and 2,3-butanediol production. *Enzym Microb Technol* 49:413–419