



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la producción de ficobiliproteínas
en un cultivo de *Arthrospira maxima* cuando se
realizan cambios en la longitud de onda utilizando
lámparas LED como luz artificial**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

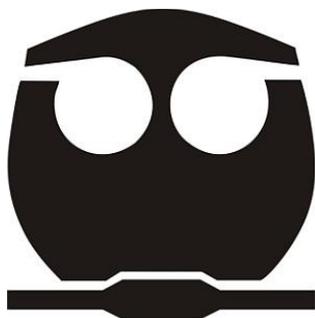
INGENIERA QUÍMICA

P R E S E N T A

INGRID VANESSA GARCÍA ACOSTA

DIRECTOR DE TESIS

DR. SERGIO ADRIÁN GARCÍA GONZÁLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

AÑO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ
VOCAL: M. en I. CARLOS ÁLVAREZ MACIEL
SECRETARIO: Dr. SERGIO ADRIÁN GARCÍA GONZÁLEZ
1er. SUPLENTE: I.Q. ELISA ELVIRA GUINEA CORRES
2° SUPLENTE: Dr. ALFONSO DURÁN MORENO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 301 de Ingeniería Ambiental
Conjunto E de la Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Sergio Adrián García González

SUSTENTANTE:

Ingrid Vanessa García Acosta

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Planteamiento del problema	2
Justificación.....	3
Objetivo general	4
Objetivos particulares.....	4
Hipótesis.....	5
ANTECEDENTES.....	5
Cianobacterias	5
<i>Arthrospira maxima</i>	6
Ficobiliproteínas	10
Clasificación de las Ficobiliproteínas.....	12
Ficocianina, Aloficocianina y Ficoeritrina.....	13
Uso de luz LED en microalgas	18
MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	21
Materiales.....	21
Reactivos.....	22
Equipos.....	22
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
Montaje de técnicas analíticas Turbidez, SST, pH y Alcalinidad	24
Inoculación y Operación de biorreactores	25
Operación de las pruebas de jarras a longitud de onda 620–630 nm (luz roja).....	27
Operación a longitud de onda 465–475 nm (luz azul) y 522–532 nm (luz verde).....	28
Pruebas de extracción con coagulante	29
Extracción de ficobiliproteínas	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
Cultivo de algas con luz visible	30
Crecimiento de algas con luz LED roja	32
Producción de pigmento con luz LED azul y verde.....	35
Función de los ficobilisomas	39
Función del coagulante.....	41
Extracción de ficobiliproteínas con coagulante	42

Cálculo de ficobiliproteínas	45
Comparación de producción de ficobiliproteínas	50
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	56

TABLAS

Tabla 1. Composición del medio mineral semejante al de Zarrouk (1996)	22
---	----

ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Morfología de <i>Arthorspira maxima</i>	10
Ilustración 2. Ficobiliproteína (López Portillo y Martínez Jiménez, 2021)	12
Ilustración 3. Modelo del ficobilisoma con el ordenamiento fundamental de las ficobiliproteínas. Adaptada de Gantt (1981).....	13
Ilustración 4. Estructura química ficocianobilina (De la Cruz José, 2018)	15
Ilustración 5. Estructura química ficoeritrobilina (De la Cruz José, 2018).....	15
Ilustración 6. Estructura Molecular Ficoeritrobilina (Omega, 2021)	16
Ilustración 7. Estructura Molecular Ficocianobilina (Omega, 2021)	16
Ilustración 8. Estructura tridimensional de las ficobiliproteínas	17
Ilustración 9. Estructuras de las cadenas α y β	18
Ilustración 10. Diagrama de flujo de producción de ficobiliproteínas	23
Ilustración 11. Reactores de 2 litros de pH 9 y 8.5 con luz visible	26
Ilustración 12. Reactor de 20 litros de pH 9 con luz visible	26
Ilustración 13. Inicio de prueba de jarras con solo 20 mg/L de SST	27
Ilustración 14. Prueba de jarras con luz LED roja.....	28
Ilustración 15. Prueba de jarras con luz LED azul y verde	29
Ilustración 16. Colorante listo para ser pasado por el espectrofotómetro	30
Ilustración 17. Estructura interna de una cianobacteria (VectorMine).....	41
Ilustración 18. Matraz con filtrado color azul y fluorescencia roja	44

GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio de SST en reactor de 20 L con luz visible	32
Gráfica 2. Promedio de SST de las jarras con luz LED roja.....	35
Gráfica 3. Cinética de reacción luz visible y luz LED roja.....	35
Gráfica 4. Promedio de SST con luz LED azul	38
Gráfica 5. Promedio de SST con luz LED verde.....	38
Gráfica 6. Cinética de reacción con luz LED azul y verde	39
Gráfica 7. Pruebas de extracción con coagulante polielectrolito líquido catiónico	44
Gráfica 8. Producción de Ficocianina con luz LED azul	47
Gráfica 9. Producción de Ficocianina con luz LED verde.....	47
Gráfica 10. Producción de Aloficocianina con luz LED azul	48
Gráfica 11. Producción de Aloficocianina con luz LED verde	48
Gráfica 12. Producción de Ficoeritrina con luz LED azul	49
Gráfica 13. Producción de Ficoeritrina con luz LED verde	49

ECUACIONES

1. Ecuación de concentración contra tiempo para orden 1	34
2. Ecuación de rapidez	34
3. Sustitución de Ec. 2 para obtener la rapidez de reacción de la luz LED Roja	34
4. Sustitución de Ec. 2 para obtener la rapidez de reacción de la luz LED azul y verde	37
5. Ecuación Ficocianinas (color azul).....	45
6. Ecuación Aloficocianinas (color verde azulado)	45
7. Ecuación Ficoeritrinas (color rojo).....	45

RESUMEN

En todo el mundo se producen ficobiliproteínas debido a que se utilizan como nutrientes para el consumo humano y animal, como colorantes naturales para alimentos o cosméticos y como productos farmacéuticos ya que tienen varias propiedades farmacológicas como antioxidantes, anticancerosas, antiinflamatorias y hepatoprotectores, entre otras.

Se estudió la producción de ficobiliproteínas a partir de *Arthrospira maxima* en presencia de luz LED roja para acelerar al máximo su crecimiento y se realizó el cambio a luz LED verde y azul para potencializar la producción de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. Se utiliza una nueva técnica de extracción empleando un coagulante polielectrolito líquido catiónico que extrae más pigmento azul que otras técnicas de la literatura. Se concluye que para alcanzar a producir la máxima cantidad de ficocianina con luz LED azul se necesitan exponer tres días, para aloficocianina dos días y para ficoeritrina un día. Con luz LED verde en dos días alcanza su máximo para las tres ficobiliproteínas; sin embargo, al usar luz LED verde se potencializa menos la producción de ficobiliproteínas que con luz LED azul. En cuanto a los Sólidos Suspendidos Totales de *Arthrospira maxima*, con luz LED verde son más altos que con luz LED azul, pero contienen menos concentración de ficobiliproteínas, por lo que si el propósito es producir ficobiliproteínas se recomienda emplear la luz LED azul.

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

El uso de ficobiliproteínas es costoso debido a ciertas limitaciones, como su bajo rendimiento, el largo tiempo de procesamiento y la dificultad de su extracción (Zahra Zahra et al., 2018). Para producir ficobiliproteínas a partir de cianobacterias, es importante que se den las condiciones necesarias en parámetros como la fuente de luz, pH, temperatura y salinidad debido a que afectan el crecimiento de *Arthrospira maxima* y la producción de ficobiliproteínas (Fernando Pagelsa et al., 2018).

Las técnicas de extracción de ficobiliproteínas reportadas en la literatura como extracción con agua, homogeneización en virtimixer usando ácido clorhídrico, congelación y descongelación (R. Sarada et al., 1999) para inducir la ruptura celular no muestran un color azul lo suficientemente visible debido a que el pigmento de ficobiliproteínas es soluble en agua, pero el uso directo del agua como medio disolvente da como resultado una mezcla que no se fracciona fácilmente debido a la presencia de sustancias polares y no polares (A. Paula R. F. Canela et al., 2002) por lo que no es tan fácil extraer el pigmento. Varios métodos de secado dan como resultado una pérdida de ficobiliproteínas, por lo que la biomasa fresca es más adecuada para la extracción (R. Sarada et al., 1999). Existen otras técnicas como extracción acuosa en dos fases (Narayan A.V. and Raghavarao K.S.M.S., 2007) o la técnica de adsorción de lecho fluidizado agitado (Kuei-Hsiang Chen et al., 2019), pero que requieren mucho tiempo y varios equipos para completar la extracción.

Justificación

Uno de los factores más importantes durante el cultivo de cianobacterias es la luz, ya que los pigmentos capturan esta forma de energía para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Atta et al., 2013). La intensidad de luz y la longitud de onda juegan un rol crítico en la actividad fotosintética, lo cual es consecuentemente reflejada en su crecimiento, debido a que los fotosistemas catalizan la reacción de conversión de energía lumínica capturada por las moléculas excitadas de la clorofila en forma de energía utilizable (Cheirsilp B. y Torpee S., 2012).

En este sentido, varios estudios se han desarrollado para mejorar la eficiencia de utilización de la luz y reducir los costos de sistemas de iluminación artificial. Los cultivos de laboratorio normalmente utilizan tubos fluorescentes, los que consumen alta energía comparada con los diodos emisores de luz, abreviados LED en inglés. (Carvalho A.P. et al., 2011).

Recientemente, varios investigadores han informado sobre la aplicación de LED como fuente de luz en cultivos de microalgas y cianobacterias. Los LED azul y rojo aumentaron la productividad de la biomasa en sus cultivos (Das P., 2011; Baba M., 2012). Una longitud de onda de 600 a 700 nm es más eficiente para la fotosíntesis e irradiancias entre 400 y 500 nm pueden incrementar la tasa de crecimiento (Carvalho A.P. et al., 2011).

Ya que ningún autor ha puesto en un mismo cultivo primero la luz LED roja (620–630 nm) que aumenta el crecimiento de *Arthrospira maxima* y después cambiar a luz LED azul (465–475 nm) o verde (522–532 nm) que potencializan la producción de ficobiliproteínas (Das P. et al., 2011; Baba M. et al., 2012), se hace este proyecto.

Y debido a que la luz LED azul es la más usada para potencializar la producción de ficobiliproteínas, pero se sabe que los Sólidos Suspendidos Totales bajan menos al usar luz LED verde, por esta razón se usarán las dos para identificar cuál es mejor.

Objetivo general

Evaluar la producción de ficobiliproteínas a partir de *Arthrospira maxima* utilizando una variación de rango de longitud de onda, de 620–630 a 465–475 y 522–532 nm con iluminación artificial para obtener un incremento en la concentración de ficobiliproteínas.

Objetivos particulares

- I.** Operar reactores biológicos de *Arthrospira maxima* en condiciones de luz visible para obtener un cultivo fresco.
- II.** Exponer a un rango de longitud de onda de 620–630 nm (luz roja) un cultivo fresco de *Arthrospira maxima* para acelerar su crecimiento.
- III.** Exponer el cultivo de luz roja a un rango de longitud de onda de 465–475 nm (luz azul) y 522–532 nm (luz verde) para incrementar la concentración de ficobiliproteínas.
- IV.** Estimar la producción de ficobiliproteínas durante la experimentación de cambio de rango de longitud de onda cuantificando la concentración de ficobiliproteínas.

Hipótesis

Si en un cultivo de *Arthrospira maxima* hay una variación de rango de longitud de onda, de 620–630 (luz roja) a 465–475 y 522–532 nm (luz azul y verde respectivamente) se potencializará la producción de ficobiliproteínas.

ANTECEDENTES

Cianobacterias

Las cianobacterias son un filo del dominio bacteria, son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, convierten la energía lumínica en energía química, el donador de electrones es el agua y como consecuencia se desprende el oxígeno. Como todos los organismos, están influenciadas por varios factores, tanto abióticos como bióticos, y estos factores pueden influir en el crecimiento y la producción de metabolitos. En términos de factores abióticos, la luz, la temperatura, la concentración de nutrientes, el pH, la salinidad y la composición química del medio pueden cambiar el metabolismo del organismo. La mayoría de las cianobacterias pueden cambiar la concentración y la composición de sus pigmentos de antena fotosintéticos en respuesta a la irradiación y el espectro de luz alterados, una estrategia para optimizar su capacidad de captación de luz (Grossman et al., 2001; Ojit, 2015). Por otro lado, los factores bióticos pueden ser patógenos (bacterias, hongos, virus) y también otras formas de competencia intra/interespecífica, lo que desencadena un cambio en la respuesta del organismo al medio ambiente (Mata T. M. et al., 2010).

Las cianobacterias se han aprovechado en la biorremediación de ambientes contaminados, como productoras de energía, fertilizantes, metabolitos secundarios de interés farmacológico y muy especialmente como alimento para el consumo humano y animal (Lolymar Romero, 2017).

Las cianobacterias y las algas poseen una amplia gama de componentes coloreados que incluyen carotenoides, clorofila y ficobiliproteínas. La creciente conciencia de la importancia de los colores naturales, especialmente los colorantes alimentarios y cosméticos, ha puesto una gran demanda en las fuentes biológicas de colores naturales (R. Sarada et al., 1999).

Arthrospira maxima

Arthrospira es un género de cianobacterias del orden *Oscillatoriales*, antes llamada *Spirulina* que es del mismo género, pero de orden *Chroococcales* por lo que ahora se diferencian desde hace 30 años. La especie *maxima* es exclusiva de América central; *Arthrospira maxima* es una espiral de algas filamentosas verde azul con un tricoma de filamento y morfología helicoidal, tiene aproximadamente un diámetro de espiral de 10 μm y una longitud de a 200–400 μm (Weng-ging Shi, 2016).

Se puede cultivar gracias a su alta eficacia fotosintética, rápido crecimiento y adaptabilidad al medio ambiente. Se divide en dos cada 7 horas por lo que es fácil de multiplicar y económica de producir. Puede crecer en medios adversos y es capaz de absorber los elementos necesarios para sobrevivir, siendo una de las primeras algas en realizar fotosíntesis, tiene una enorme capacidad de almacenar nutrientes (Ernesto Ponce, 2013).

El consumo de microalgas azuladas se inicia en el pasado en diferentes lugares del mundo. Según las crónicas de los conquistadores españoles, los antiguos aztecas las recolectaban en la superficie del lago de Tenochtitlán, luego eran secadas y comercializadas en el mercado de la ciudad. Se considera un superalimento, es consumida por atletas de nivel olímpico y es el alimento de los astronautas. Sesenta gramos bastan para alimentar a una persona por día, con 10 gramos diarios se puede sobrevivir (Ernesto Ponce, 2013).

Actualmente es la cianobacteria más cultivada en fotobiorreactores (Weng-ging Shi, et al., 2016). Los principales productores son EUA, Japón, India, China, entre otros. Estudios y producciones importantes se realizan en Rusia, Francia, Alemania, Israel, Italia y España, por mencionar algunos (Ernesto Ponce, 2013). Esta alga es de gran interés para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica debido a su composición química (A. Paula R. F. et al., 2002). Se comercializa por su alto contenido en proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas (Weng-ging Shi et al., 2016).

Las especies en el género *Arthrospira* se cultivan a gran escala en todo el mundo principalmente para los complementos alimenticios para dietas humanas y animales. Estas especies son valoradas por la rica composición de su biomasa, que contiene minerales, antioxidantes, proteínas y aminoácidos esenciales. Esta biomasa también se puede utilizar para la extracción de productos de alto valor, por ejemplo, los pigmentos clorofila, β -caroteno y ficocianina, así como los ácidos grasos esenciales (Gustavo M. Lima et al., 2018).

Arthrospira maxima contiene de su peso en seco 65 % de proteínas las cuales tienen aminoácidos esenciales, 5 % de lípidos, 7 % de minerales, 20 % de hidratos de carbono y 3 % de humedad (Henrikson R., 1994). Los complementos sintéticos de vitaminas y minerales suelen no ser reconocidos por el organismo, al faltar los agentes capaces de fijar los iones metálicos y no-metálicos.

Con *Arthrospira maxima* la absorción es muy eficiente por parte del sistema digestivo, entre 85 y 95 % (Henrikson R., 1994). Esto guarda relación con el sentido de giro de su espiral, compatible con el giro del ADN humano (efecto de quiralidad, que se empieza a usar en medicamentos de tecnología avanzada) (Ernesto Ponce, 2013).

Arthrospira maxima tiene propiedades antifatiga, antirradiación y antiviral que puede ayudar a evitar el crecimiento de tumores. Sus efectos benéficos se han atribuido a sus componentes antioxidantes que reducen la intensidad del estrés (Weng-ging Shi et al., 2016), tiene cualidades inmunológicas, protector contra el cáncer y retiene metales pesados por lo que es un antitóxico. Se ha demostrado que es un regulador contra la hiperglicemia y la hiperlipidemia (Belay A., 2002) por lo que tiene futuro prometedor en diferentes ámbitos.

Con respecto al consumo de agua en litros por kilogramo producido y al porcentaje de proteína aportada, *Arthrospira maxima* tiene un 65 % de proteínas y consume 2.499 litros; la soja tiene 34 % de proteínas consumiendo 8.860 litros; el maíz tiene 9 % de proteínas y consume 12.416 litros; una res en establo alimentada con grano tiene 20 % de proteínas y consume 104.000 litros (Eartrise Farms, 1998). Los

últimos valores y el contenido nutritivo de las proteínas de algas son comparables siendo superiores a los alimentos mencionados y en muchos casos también son superiores al de la mayoría de los suplementos alimenticios de proteínas convencionales. Además de que es eficaz al consumir menos agua para su producción.

El sistema más conocido y económico para producirla es un estanque abierto de poca profundidad, 20 cm, de forma rectangular con terminaciones de semicírculo en los extremos (Jourdan J. P., 2002). Las superficies pueden variar desde 3 hasta 5.000 m². El agua circula mediante agitadores de rueda con paletas; es necesaria la agitación para que todas las microalgas reciban igual cantidad de luz para la fotosíntesis y los nutrientes puedan mezclarse homogéneamente en el agua. Los cambios deben realizarse gradualmente, no se debe olvidar que son seres vivos y pueden perecer por estrés. Las algas deben ser alimentadas después de cada cosecha. Debe realizarse la cosecha antes de alcanzar el límite, de lo contrario se corre el riesgo de perder todo el cultivo por sobrepoblación (Ernesto Ponce, 2013).

Debido al alto costo de *Arthrospira maxima*, es importante la investigación de ésta, así como las condiciones ideales para su cultivo; por ejemplo, la temperatura, el pH, la fuente de luz y el tiempo necesario de exposición, ya que la influencia de la longitud de onda de la iluminación se refleja en la tasa de crecimiento de esta alga (Weng-ging Shi et al., 2016). De *Arthrospira maxima* se pueden extraer ficobiliproteínas como la ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. Las ficobiliproteínas son de mayor valor económico que la propia alga, por lo cual es importante su estudio (Lolymer Romero et al., 2017).

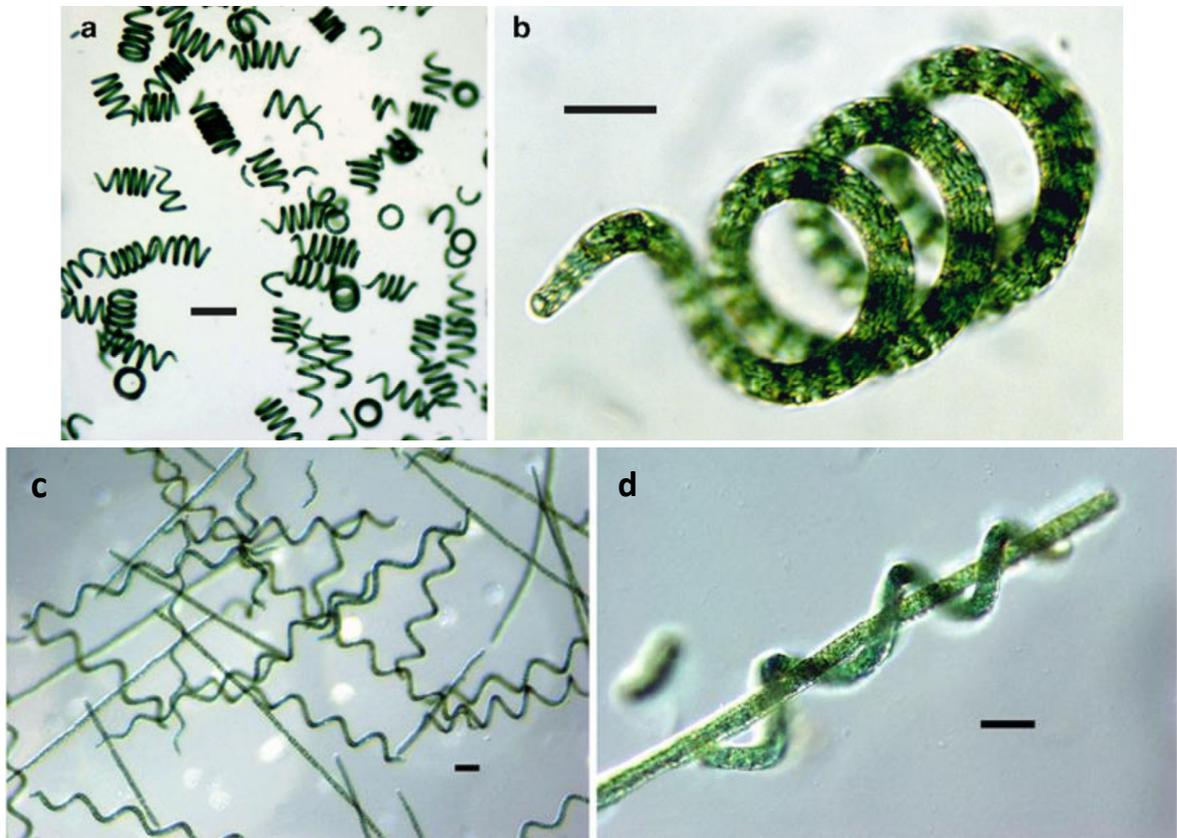


Ilustración 1. Morfología de *Arthrospira maxima*

(a) Aspectos morfológicos de tricomas clonales regulares de *Arthrospira maxima* aislada del evaporador solar del lago de Texcoco Estado de México. (b) Tricoma típico enrollado regularmente en forma de tornillo con un diámetro de células gradualmente atenuado en los extremos. Los marcadores de barras corresponden a 40 μm en **a** y 20 μm en **b**. Marcadores de barra: (c) = 40 μm , (d) = 20 μm . Fotos Sili Claudio (2013).

Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas constituyen aproximadamente el 40 % de la proteína soluble total de la célula y están recibiendo atención mundial debido a sus propiedades no tóxicas y no cancerígenas (Jihae Park y Thai Binh Dinh, 2019). Las ficobiliproteínas

de las cianobacterias se han descrito como posibles compuestos bioactivos y se han reconocido como productos naturales de gran valor para aplicaciones biotecnológicas (Fernando Pagelsa et al., 2018). Se han utilizado ampliamente en reactivos analíticos, inmunodiagnósticos y desempeñaron un papel importante como sondas de fluorescencia en sistemas de detección basados en fluorescencia, especialmente en citometría de flujo. Se pueden utilizar como biomarcadores para métodos electroforéticos debido a su bajo peso molecular y visibilidad en todos los pasos de la purificación. Igual se usan como marcadores fluorescentes de células y macromoléculas en la investigación biomédica y las técnicas de fluorescencia altamente sensibles. Las ficobiliproteínas también pueden emplearse como colorantes naturales para alimentos y cosméticos debido a su propiedad de coloración no tóxica; sin embargo, el uso de ficobiliproteínas es costoso debido a ciertas limitaciones, como su bajo rendimiento, el largo tiempo de procesamiento y la dificultad para implementar la producción a gran escala. Un enfoque innovador para superar tales limitaciones es aumentar el contenido de productos valiosos en las células (Zahra Zahra et al., 2018). Por lo tanto, para producir ficobiliproteínas a partir de cianobacterias para aplicación industrial, es necesario optimizar todo el bioprocesamiento, incluidos los parámetros de procesamiento (como la fuente de luz, nitrógeno y carbono, pH, temperatura y salinidad) que afectan el crecimiento y la acumulación de ficobiliproteína. Así como la optimización de la extracción y purificación de ficobiliproteínas (Fernando Pagelsa et al., 2018).

El precio de las ficobiliproteínas varía de 3 USD (por 25 mg de pigmentos de grado alimenticio/cosmético) a 1500 USD (por 1 mg de marcadores moleculares altamente

purificados etiquetados con anticuerpos u otras moléculas fluorescentes) (Ojit, 2015). En 2018, se estimó que el valor de estos pigmentos en el sector comercial alcanzaría los 1830 USD para 2023 (Market Research Reports Inc., 2018).

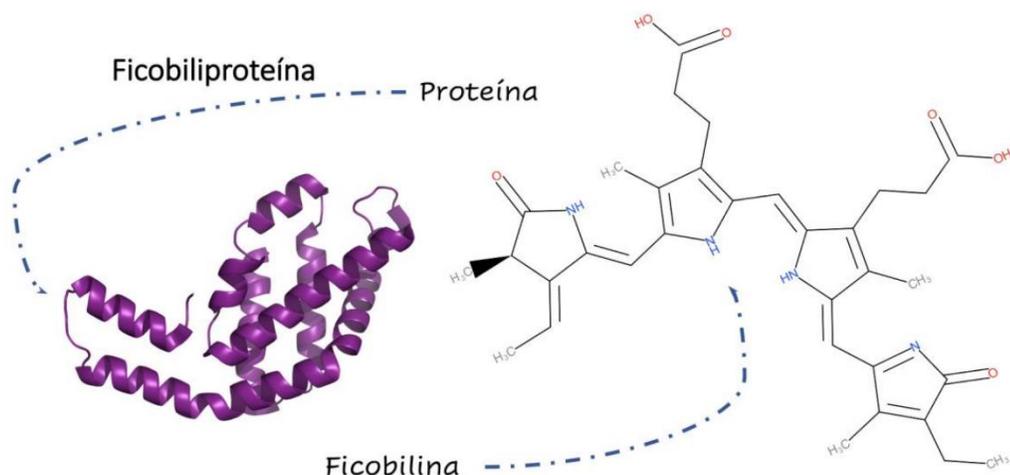
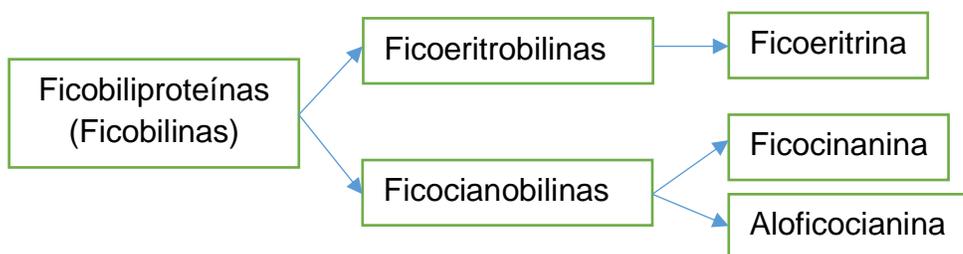


Ilustración 2. Ficobiliproteína (López Portillo y Martínez Jiménez, 2021)

Las ficobiliproteínas son proteínas pigmentadas que se encuentran presentes en cianobacterias y algas rojas. Estas proteínas se encuentran formadas por dos unidades: una proteica y un pigmento denominado ficobilina. Dichas unidades se encuentran unidas mediante enlace covalente a un aminoácido cisteína (López Portillo y Martínez Jiménez 2021).

Clasificación de las Ficobiliproteínas



Ficocianina, Aloficocianina y Ficoeritrina

Las principales ficobiliproteínas son la ficocianina, la aloficocianina y la ficoeritrina, que están formadas por diferentes subunidades de polipéptidos α y β . Las ficobiliproteínas se ensamblan en partículas llamadas ficobilisomas que se unen en forma regular a la superficie externa de la membrana de los tilacoides y actúan como los principales pigmentos de recolección de luz en las cianobacterias. Los ficobilisomas consisten en núcleos de aloficocianina rodeados de ficocianina en la periferia. La ficocianina es el componente principal, mientras que la aloficocianina funciona como el pigmento puente entre los ficobilisomas y la lámina fotosintética. (McColl R, 1998).

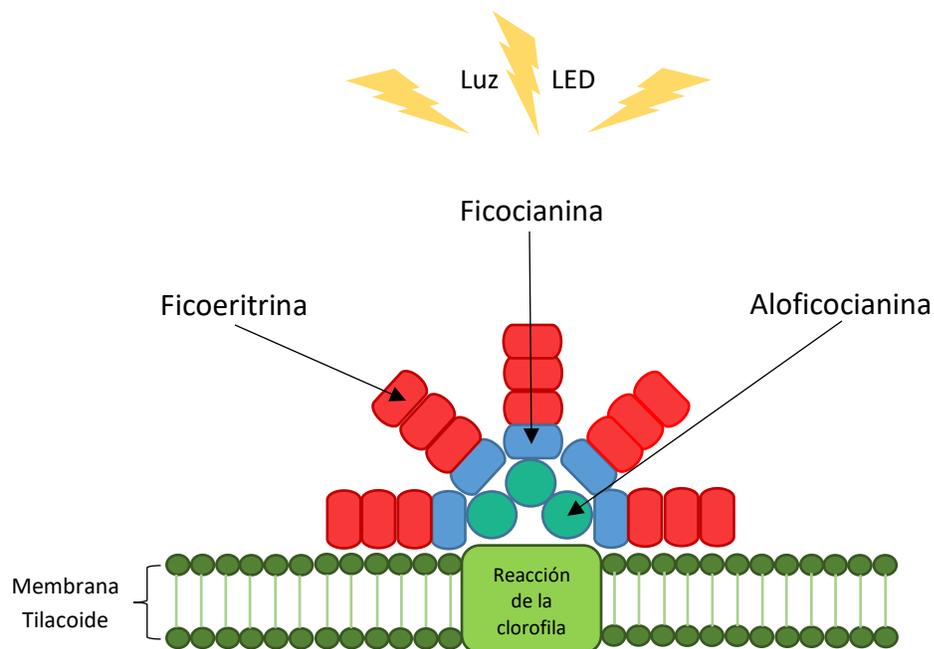


Ilustración 3. Modelo del ficobilisoma con el ordenamiento fundamental de las ficobiliproteínas. Adaptada de Gantt (1981)

La ficocianina se usa como colorante en los alimentos (gomas de mascar, productos lácteos, baños de hielo, gelatinas, etc.) y cosméticos como lápices labiales y

delineadores de ojos en Japón, Tailandia y China. También se demostró que tiene valor terapéutico (actividad inmunomoduladora y actividad anticancerígena).

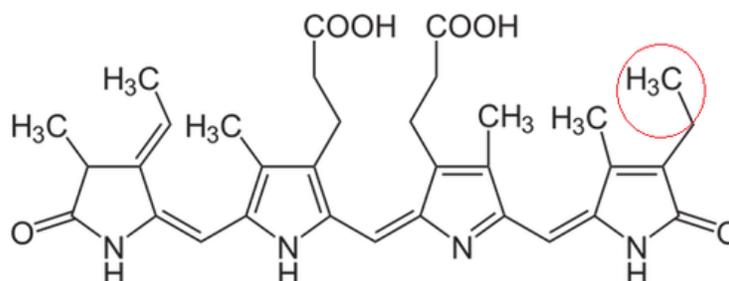
Debido a sus propiedades de fluorescencia, ha ganado importancia en el desarrollo de sondas de phycofluor para inmunodiagnósticos (R. Sarada et al., 1999). La ficocianina y la aloficocianina tienen un color azul particular que es un pigmento fotosintético, se han utilizado como nutrientes para el consumo humano y animal, en productos farmacéuticos y como colorantes naturales para alimentos y cosméticos.

La ficocianina es la principal ficobiliproteína en *Arthrospira maxima*, tiene alto contenido nutricional que pueden ayudar a estimular el sistema inmunológico, aumentar la energía y mejorar la digestión. También se ha descrito como un compuesto natural antioxidante, antiinflamatorio y muestra un efecto reductor del colesterol. Se ha demostrado que la antioxidante ficocianina previene el desarrollo temprano de la aterosclerosis, caracterizada por el depósito de lípidos en la aorta y la formación de células espumosas. Como los expertos de la Organización Mundial de la Salud descubrieron que *Arthrospira maxima* es un agente para mejorar la salud, y teniendo en cuenta su uso como suplemento nutricional en muchos países, es concebible que la ficocianina se pueda usar potencialmente como un suplemento dietético, convirtiéndose en un agente terapéutico potencial útil en enfermedades inducidas por el estrés oxidativo.

Hoy en día, existe un interés explosivo en el uso de suplementos nutricionales antioxidantes. La ingesta de algunas vitaminas, minerales y otros componentes alimenticios puede ayudar a proteger contra las enfermedades cardíacas, el cáncer,

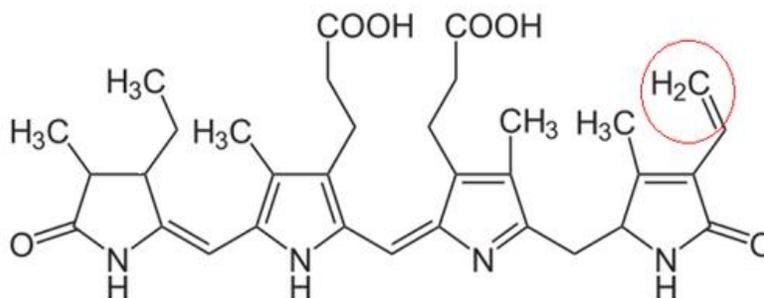
el proceso de envejecimiento y que los antioxidantes pueden tener un efecto protector, ya sea para prevenir estas enfermedades o disminuyendo la severidad de las enfermedades en su inicio. La investigación y desarrollo de todo lo anterior tiene impacto en la sociedad especialmente por el alto valor nutricional de la ficocianina y todo lo relacionado con las propiedades de las que se ha hablado ampliamente (J erome Riss et al., 2017).

Así como es importante el estudio del crecimiento de *Arthrospira maxima*, lo es más el estudio de la producción de ficobiliproteínas, por lo cual es importante saber cómo potencializar su producción, tomando en cuenta su alto valor económico.



Ilustración 4. Estructura química ficocianobilina (De la Cruz José, 2018)

La ficocianobilina es una ficobilina azul, está presente solo en la aloficocianina y ficocianina. Fórmula: $C_{33}H_{40}N_4O_6$



Ilustración 5. Estructura química ficeoritrobilina (De la Cruz José, 2018)

La ficeoritrobilina es una ficobilina roja, está presente solo en la ficeoritrina. Fórmula: $C_{33}H_{38}N_4O_6$

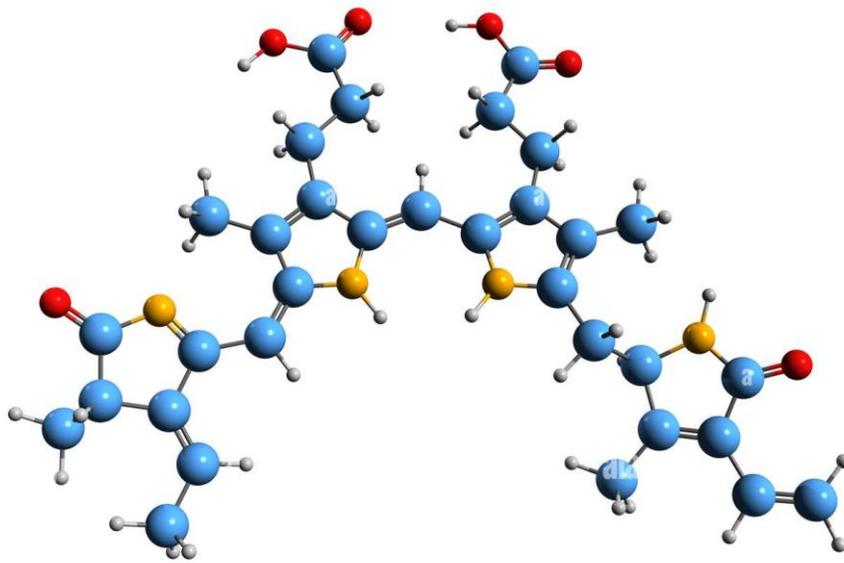


Ilustración 6. Estructura Molecular Ficoeritrobilina (Omega, 2021)

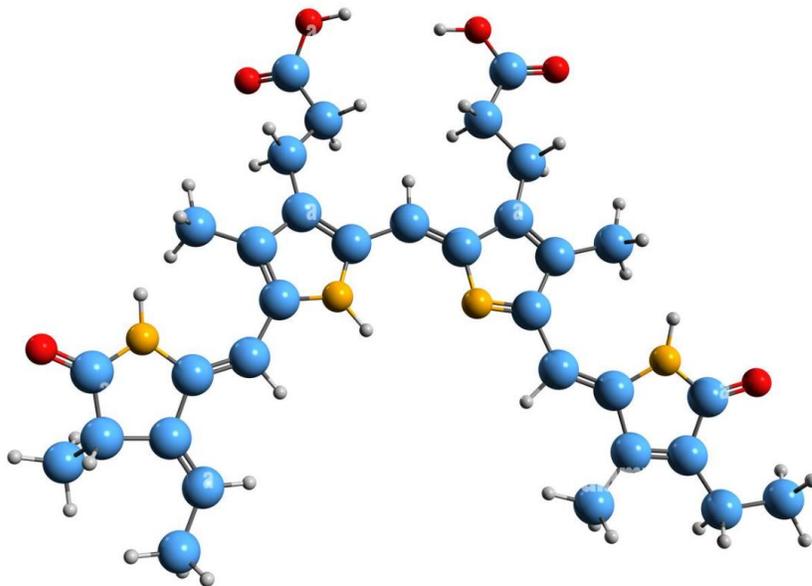


Ilustración 7. Estructura Molecular Ficocianobilina (Omega, 2021)

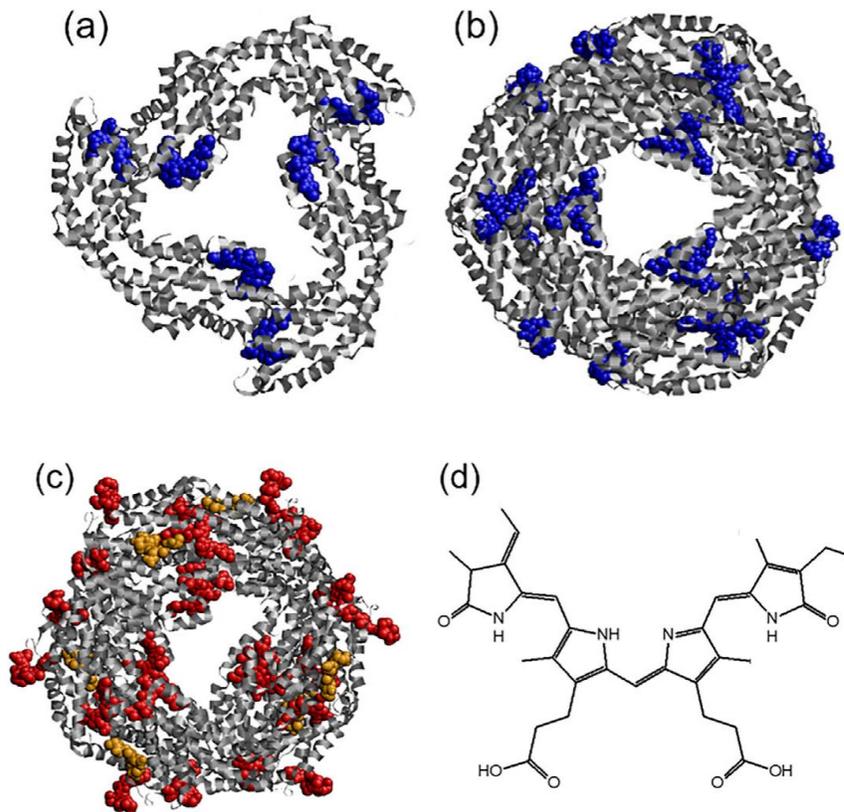


Ilustración 8. Estructura tridimensional de las ficobiliproteínas

(a) Estructura de las subunidades de polipéptidos α y β de aloficocianina. **(b)** Ficocianina. **(c)** Ficoeritrina. **(d)** Estructura molecular de ficobilina, ficocianobilina.

El cromóforo presente en la aloficocianina y la ficocianina es la ficocianobilina **(d)** que se destaca en las estructuras **(a y b)** en azul, mientras que los cromóforos presentes en la ficoeritrina son la ficoeritrobilina y la ficourobilina que se destacan en la estructura cristalina **(c)** en rojo y naranja, respectivamente. (Pulvis et al., 2019)

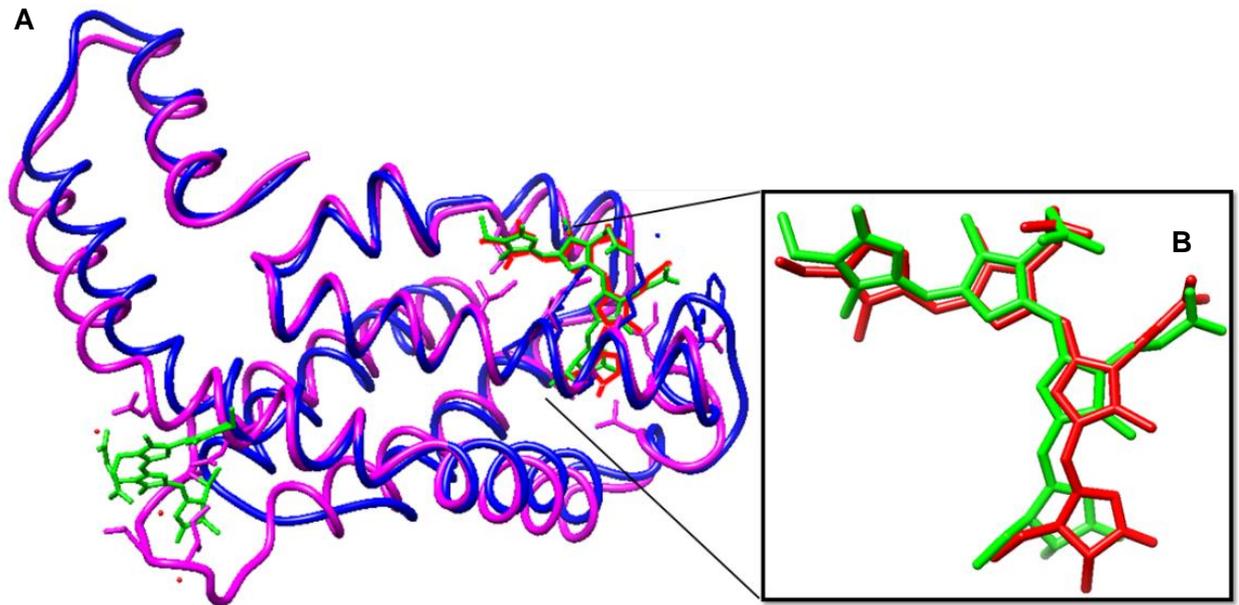


Ilustración 9. Estructuras de las cadenas α y β

(A) Alineamiento de las secuencias de las cadenas alfa y beta. Superposición de las estructuras tridimensionales de las cadenas alfa (azul) y beta (magenta) de la ficocianina.

(B) En la ampliación de la superposición de la estructura de los cromóforos de la cadena alfa (mostrado en rojo) y de la cadena beta (mostrado en verde) se observa que ocupan básicamente la misma posición espacial. (Llopiz et al., 2016).

Uso de luz LED en microalgas

La luz emitida por un diodo emisor de luz tiene una longitud de onda específica y por lo tanto un color específico. La luz azul se produce si se libera un elevado nivel de energía, y la luz es roja si el nivel de energía emitido es más bajo, por lo que el verde queda en un nivel intermedio entre el azul y rojo.

Los LED tienen varias ventajas como menor consumo de energía, menor emisión de calor y mayor duración por lo que son de mayor eficiencia de conversión comparados a las lámparas fluorescentes e incandescentes (Chen et al., 2011).

Las diferentes especies de microalgas requieren distintos espectros de luz, dependiendo de los principales pigmentos presentes en ellas, lo que aunado a la intensidad lumínica constituyen parámetros importantes para el crecimiento y metabolismo (Carvalho et al., 2011).

Las ficobiliproteínas son un grupo de proteínas solubles en agua con un cromóforo asociado, responsable de la recolección de luz en las cianobacterias. La ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, se caracterizan por su estructura y absorción de calidad de luz (Fernando Pagelsa et al., 2018).

La luz es uno de los parámetros de crecimiento más importantes; puede provenir de fuentes naturales (sol) o artificiales (lámparas). La irradiación de luz en los sistemas con luz artificial debe proporcionarse con cuidado, ya que el exceso de ésta provoca un fenómeno llamado fotooxidación o fotoinhibición donde se produce daños del aparato fotosintético de la célula (Pedrosa-Bezerra et al., 2012).

Aunque la luz artificial cuesta más que la luz solar, permite un control estricto de la bioquímica y el crecimiento de las microalgas, lo que aumenta la fiabilidad de los procesos industriales para la producción de biomoléculas de alto valor (Blanken, W., 2013; Schulze P.S.C. et al., 2014); sin embargo, la competitividad de cualquier producción artificial de microalgas impulsada por la luz depende del consumo de energía. La disminución de los costos de energía requiere mejoras en la recolección

de fotones por microalgas y la eficiencia de conversión de fotones de las fuentes de luz. Se puede lograr un mejor uso de la energía lumínica por los fotótrofos adaptando los espectros de emisión de fuentes de luz artificial específicos de la especie (Schulze P.S.C. et al., 2014; Peter Schulze et al., 2016).

El uso de LED es una solución para optimizar la productividad y la composición bioquímica de la biomasa producida por microalgas (Gustavo M. Lima et al., 2018). La iluminación artificial no solo es necesaria para la consistencia de la producción, la iluminación con diodos de emisión de luz (LED) es particularmente atractiva, ya que es más eficiente energéticamente, tiene una vida útil más larga y genera menos calor que las fuentes de luz tradicionales, como las lámparas incandescentes y las luces fluorescentes (Glemser et al., 2016; Yeh y Chung, 2009; Schulze P.S.C et al., 2014) de las que gran parte de la energía consumida por ese tipo de iluminación se desperdicia en calor o en un espectro de luz que no es beneficioso para la fotosíntesis (Morrow, 2008). Los LED permiten un mejor control del crecimiento y en comparación con otro tipo de iluminación que puede causar estrés térmico, las lámparas LED tienen una temperatura superficial más baja y generan mucho menos calor radiante (Gomez et al., 2013). Los LED se pueden seleccionar para proporcionar luz de una longitud de onda específica, o un rango estrecho de longitudes de onda, para influir en la producción de metabolitos (Schulze P.S.C et al., 2014). Además, en general, la iluminación basada en LED tiene un impacto ambiental menor que la iluminación convencional (Zhang et al., 2016).

Las longitudes de onda del espectro de emisión de luz fluorescente tienen una baja actividad fotosintética para ciertas especies de microalgas y cianobacterias

(Carvalho et al., 2011). Por otro lado, los LED tienen bandas de longitudes de onda específicas, que pueden causar un mayor uso energético de estos microorganismos y, en consecuencia, una mayor actividad fotosintética de la célula (Schulze P.S.C. et al., 2014).

Los diodos emisores de luz se convertirán en una de las fuentes de luz más importantes del mundo y debe considerarse su integración en sistemas de producción de microalgas (fotobiorreactores). Los LED pueden mejorar la calidad y cantidad de la biomasa de microalgas cuando se aplican durante fases de crecimiento específicas; sin embargo, las microalgas necesitan una combinación equilibrada de longitudes de onda para un crecimiento normal, y responden a la luz de manera diferente según los pigmentos adquiridos o perdidos durante su historia evolutiva. El número de fotones en longitudes de onda azul o roja que pueden ser capturadas por una molécula de clorofila en un alga depende de la arquitectura celular, la composición del pigmento y la disposición del cloroplasto. Curiosamente, la historia evolutiva de las microalgas parece explicar la preferencia de las microalgas a crecer bajo la luz azul o roja. Esta preferencia se correlaciona bien con el mega grupo evolutivo de cada microalga, que a su vez parece reflejar la composición de pigmento de los complejos de captación de luz en sus cloroplastos (Peter Schulze et al., 2014).

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales

- Agitador
- Bureta

- Embudo Buchner
- Matraz Aforado
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz Kitasato
- Paño marca Scotch
- Pinzas
- Pipetas graduadas
- Soporte Universal
- Tubos cónicos para centrífuga marca Falcon de 50 mL
- Vasos de precipitados

Reactivos

- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Agua desmineralizada (H₂O)
- Coagulante polielectrolito líquido catiónico marca SNF Floerger

Reactivo	Nomenclatura	Cantidad (g/L)
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	16.00
Cloruro de sodio	NaCl	1.00
Nitrato de sodio	NaNO ₃	2.50
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	0.05
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	1.00
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.20
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0.08
Cloruro de calcio	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.04
Sulfato de hierro	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0.01

Tabla 1. Composición del medio mineral semejante al de Zarrouk (1996)

Equipos

- Balanza de Humedad (OHAUS Analizadores de humedad estándar MB35).
- Luces LED (Adesi Pro modelo CE-0008-BL de 30 W).
- Potenciómetro (OHAUS Starter 300, medidor portátil para pH).
- Prueba de Jarras (Phipps & Bird modelo PB-700 con seis paletas).
- Turbidímetro (HI 98703 Hanna Instruments).
- Vortex (Scientific Industries modelo G-560).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama de flujo describe la metodología en general para producir ficobiliproteínas a partir de *Arthrospira maxima* con una técnica de extracción nueva empleando un coagulante polielectrolito líquido catiónico.

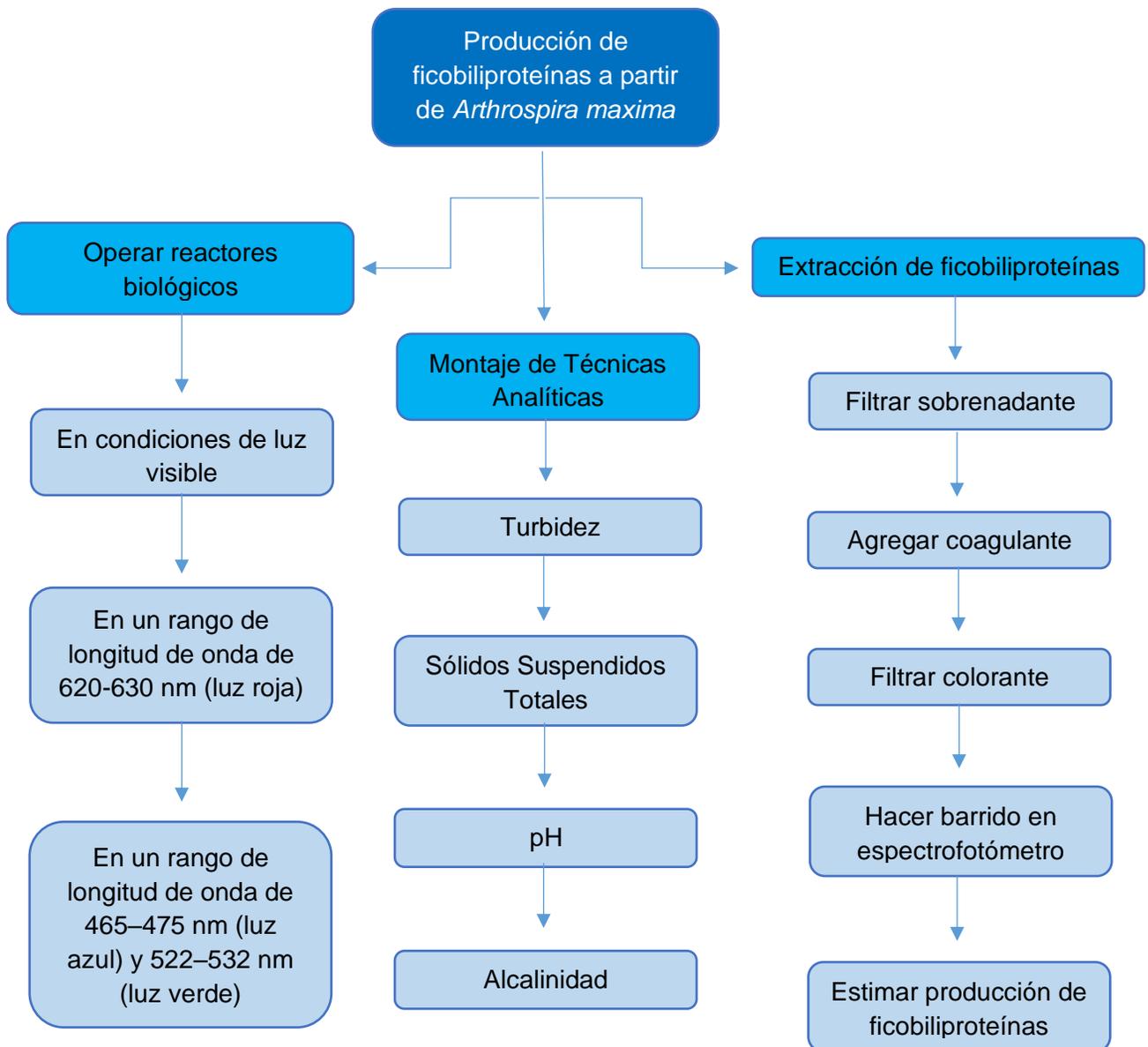


Ilustración 10. Diagrama de flujo de producción de ficobiliproteínas

Montaje de técnicas analíticas Turbidez, SST, pH y Alcalinidad

Se hicieron por triplicado los siguientes pasos para cada reactor.

-Turbidez:

En un vaso de precipitados se tomó una muestra de 55 mL del cultivo de *Arthrospira maxima*, con una pipeta graduada se tomó una alícuota de 5 mL de ella y se vertieron en un matraz aforado de 50 mL, se aforó con agua destilada y se agitó para posteriormente llenar la celda del turbidímetro previamente calibrado, modelo HI 98703 marca Hanna Instruments; la medición se multiplicó por diez ya que únicamente contenía el 10 % de biomasa.

-Sólidos Suspendidos Totales (SST):

Se pesó un papel filtro en la balanza de humedad modelo MB35 marca OHAUS y en un matraz Kitasato se filtró al vacío una alícuota de 50 mL restantes de la muestra. Se pesó el papel filtro con la biomasa filtrada en la balanza de humedad y con el proceso de calentamiento se determinó el agua contenida con el porcentaje de humedad que da junto con la masa final. Se calcularon los Sólidos Suspendidos Totales restando la masa final del peso del papel filtro, lo resultante se dividió entre 0.05 y se multiplicó por 1000 para convertirlo en mg/L.

-pH:

Con un potenciómetro previamente calibrado modelo Starter 300 marca OHAUS se midió el pH del sobrenadante que quedó después de filtrar en el matraz Kitasato.

-Alcalinidad:

Con el mismo sobrenadante se hizo una titulación con HCl 0.1 M usando fenolftaleína hasta que se tornó incoloro el sobrenadante y posteriormente se usó naranja de metilo hasta que se tornó en un color canela.

Inoculación y Operación de biorreactores

El alga se obtuvo de un cultivo comercial, al cual se le mandó a hacer una prueba proteómica para determinar que fuera *Arthrospira maxima*; el inóculo se fue adaptando al medio mineral de crecimiento con el que se alimentó, es un medio nutritivo semejante al medio de Zarrouk (1996), contiene nueve nutrientes disueltos en agua desmineralizada descritos en la tabla 1.

Se operaron 3 reactores biológicos Batch en condiciones de luz visible para cultivar *Arthrospira maxima* y hacer recambios semanales del 40 % de medio mineral durante 3 semanas para obtener un cultivo fresco en buenas condiciones. Diario se midieron Turbidez, Sólidos Suspendidos Totales, pH y Alcalinidad. Al término de las 4 técnicas analíticas se midió el pH de cada reactor con el potenciómetro modelo Starter 300 marca OHAUS, se agregó medio mineral y se ajustó el pH con HCl 1 M hasta llegar al pH correspondiente de cada uno. En la ilustración 11 se observan dos reactores de 2 litros con agitación constante de 70 RPM, uno con pH de 9 a 70°C, el otro con pH de 8.5 a 65°C. En la ilustración 12 se observa el reactor de 20 litros con agitación constante de 60 RPM, pH de 9 y temperatura ambiente de 20-23 °C.



Ilustración 11. Reactores de 2 litros de pH 9 y 8.5 con luz visible



Ilustración 12. Reactor de 20 litros de pH 9 con luz visible

Operación de las pruebas de jarras a longitud de onda 620–630 nm (luz roja)

En un equipo de prueba de jarras modelo PB-700 con seis paletas marca Phipps & Bird, se llenaron las 6 jarras con sobrenadante de baja concentración de 20 mg/L de Sólidos Suspendidos Totales tomados del reactor de 20 L que operaba con luz visible. Las seis se expusieron durante 4 semanas a luz LED roja y 63 RPM, se midieron diariamente Turbidez, Sólidos Suspendidos Totales, pH y Alcalinidad con el fin de observar que hubiera aumento de biomasa. Durante 19 días se tomaron alícuotas de 50 mL para analizar, el primer día una alícuota de la jarra 1, 3 y 5, al otro día se tomaba de la 2, 4 y 6, con el propósito de evitar una cosecha diaria de la misma jarra y permitir que tuvieran un día para recuperar su biomasa. Al término de las 4 técnicas analíticas se midió el pH de cada jarra con el potenciómetro modelo Starter 300 marca OHAUS, se agregó medio mineral para completar el litro de la jarra y se ajustó el pH con HCl 1 M hasta llegar a un pH de 8.5 en cada jarra.



Ilustración 13. Inicio de prueba de jarras con solo 20 mg/L de SST

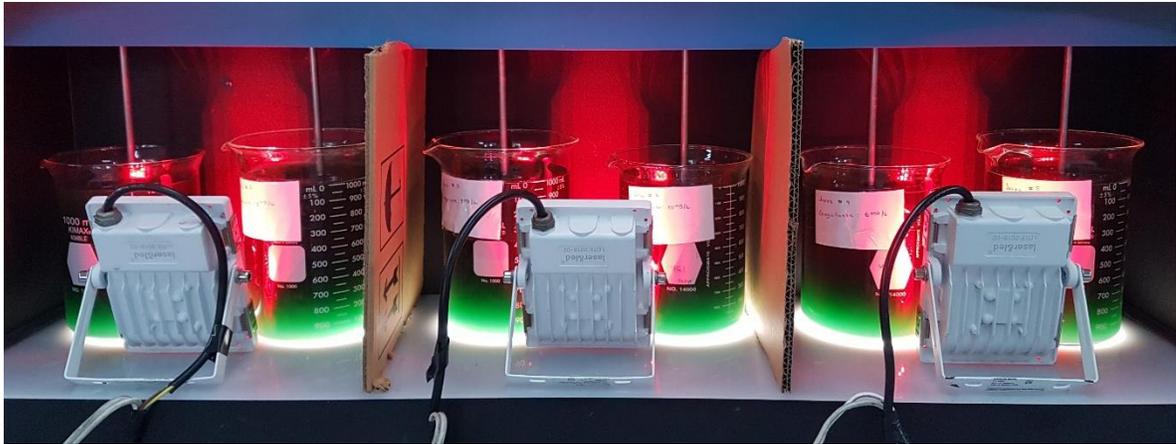


Ilustración 14. Prueba de jarras con luz LED roja

Operación a longitud de onda 465–475 nm (luz azul) y 522–532 nm (luz verde)

A la prueba de jarras modelo PB-700 con seis paletas marca Phipps & Bird se le variaron las condiciones de luz y se expuso *Arthrospira maxima* a fuentes de luz LED azul y verde a 63 RPM durante 10 días. En la ilustración 15 se puede observar de izquierda a derecha, que las cuatro primeras jarras están iluminadas con luz LED azul y las últimas dos jarras con luz LED verde. Diario se tomó una alícuota de 50 mL de cada jarra. El primer día de la jarra 1, 3 y 5 para medir ficobiliproteínas y de la jarra 2, 4 y 6 para medir técnicas analíticas, al otro día se intercalaba el número de jarras, es decir, la 1, 3 y 5 para medir técnicas analíticas y 2, 4 y 6 para medir ficobiliproteínas (así sucesivamente hasta completar los 10 días).

Se midieron los mismos parámetros analíticos como Turbidez, Sólidos Suspendedos Totales, pH y Alcalinidad. Al término de las 4 técnicas analíticas se midió el pH de cada jarra con el potenciómetro modelo Starter 300 marca OHAUS, se agregó medio mineral y se ajustó el pH con HCl 1 M hasta llegar un pH de 8.5 en cada jarra.



Ilustración 15. Prueba de jarras con luz LED azul y verde

Pruebas de extracción con coagulante

Se tomaron 18 alícuotas de 50 mL del reactor de 20 L, se utilizó un paño absorbente marca Scotch para filtrar el sobrenadante en un matraz Kitasato, el paño con la biomasa filtrada se metió a un tubo cónico para centrífuga marca Falcon con 50 mL de agua destilada y por triplicado se agregó a cada tubo cónico una dosis de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mL del coagulante polielectrolito líquido catiónico marca SNF Floerger. Se agitó cada uno en un Vortex marca Scientific Industries modelo G-560 durante un minuto, se dejaron reposar por 10 minutos y se volvieron a agitar en el Vortex un minuto más. Al otro día se metieron los tubos cónicos a la centrífuga modelo C-600 marca Solbat. Se filtró el colorante en un papel filtro y con el sobrenadante se hizo un barrido en el espectrofotómetro de 800 a 200 nm para saber cuál de las 6 diferentes dosis de coagulante podía extraer más ficobiliproteínas; resultó ser la dosis de 2.5 mL de coagulante y esta fue la que se utilizó para la extracción.

Extracción de ficobiliproteínas

Se filtró cada alícuota con un paño absorbente marca Scotch en un matraz Kitasato, se metió el paño con biomasa extraída a un tubo cónico para centrífuga marca Falcon y se lavó el paño con 50 mL de agua destilada, se agregó 2.5 mL de coagulante polielectrolito líquido catiónico al tubo cónico y se dejó reposar durante 10 minutos para después agitar el tubo en Vortex marca Scientific Industries modelo G-560 durante un minuto, se dejó reposar 10 minutos y se volvió a agitar en el Vortex un minuto más. Al día siguiente se metió el tubo a la centrífuga modelo C-600 marca Sobat, se filtró con un papel filtro en un matraz Kitasato y se tomó el sobrenadante o colorante líquido para hacer un barrido en el espectrofotómetro de 800 a 200 nm.



Ilustración 16. Colorante listo para ser pasado por el espectrofotómetro

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de algas con luz visible

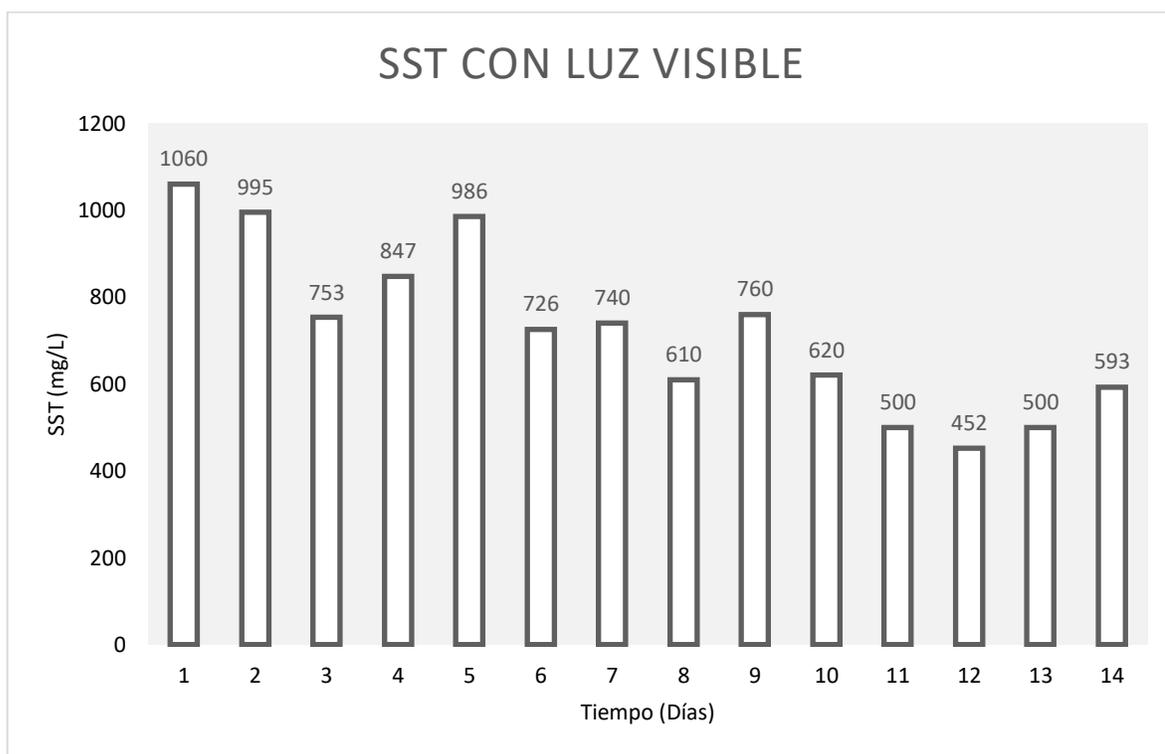
Para cultivar algas es de suma importancia que se den las condiciones adecuadas además de alimentarlas para lograr mantenerlas, de lo contrario pueden dejar de reproducirse y morir.

Dos reactores biológicos de alga *Arthrospira maxima* mostrados en la ilustración 11, se operaron con agitación constante a 70 RPM en matraces de 2 litros en condiciones de luz visible a 65-70 °C las 24 horas durante 3 semanas a un pH de 8.5 y 9. El reactor de pH 9 consiguió mejores resultados en base a las técnicas analíticas como Turbidez y Sólidos Suspendidos Totales. La Turbidez promedio del reactor de pH 9 fue de 369 NTU y la del reactor de pH 8.5 de 288 NTU. Los Sólidos Suspendidos Totales promedio del reactor de pH 9 fueron de 193 mg/L y en el reactor de pH 8.5 de 168 mg/L. En ambos reactores diario se alcanzó un pH entre 8.7 y 9.4 antes de ser ajustados a su pH correspondiente. La cosecha se realizaba cada semana, es importante hacerla antes de alcanzar un límite de sobrepoblación porque se correría el riesgo de perder el cultivo.

El reactor de 20 litros mostrado en la ilustración 12, fue operado con agitación constante a 60 RPM para evitar sedimentación en el fondo del reactor, se expuso a luz visible a temperatura ambiente durante 3 semanas, a un pH de 9 porque dio mejores resultados en los reactores de dos litros y se usó el mismo medio acuoso alcalino y salobre que presentó pocas probabilidades de contaminarse. Obtuvo un promedio de 724 mg/L de Sólidos Suspendidos Totales y un promedio de 691 NTU de Turbidez.

Las algas acuáticas son autótrofas y requieren solo luz, dióxido de carbono del aire y nutrientes inorgánicos para sostener el crecimiento (Ioannis S. Chronakis, 2001); sin embargo, en la gráfica 1 se observa un descenso de Sólidos Suspendidos Totales debido a la realización de cosechas excesivas, por lo que cada cuatro o cinco días se dejaban de hacer y enseguida subían los SST.

De este reactor se tomó *Arthrospira maxima* para la prueba de jarras, los otros dos reactores de 2 litros se utilizaban de repuestos como prevención por si se llegaba a perder la cosecha del reactor de 20 litros.



Gráfica 1. Promedio de SST en reactor de 20 L con luz visible

Crecimiento de algas con luz LED roja

Se partió de una concentración inicial de 20 mg/L de Sólidos Suspendidos Totales que se tomó del sobrenadante que quedó de una filtración realizada al reactor de 20 L, por lo que en la ilustración 13 se ve un color verde claro debido a la baja concentración de *Arthrospira maxima*. La prueba de jarras mostrada en la ilustración 14 se expuso a un rango de longitud de onda de 620–630 nm (luz roja) con una agitación constante de 63 RPM, después de cuatro semanas una de las jarras logró llegar hasta 1184 mg/L de SST. Las 6 jarras obtuvieron 1155 mg/L de SST

aproximadamente, que resulta del promedio de los dos últimos días, porque 3 jarras se midieron en el penúltimo día y las otras 3 en el último día. En la gráfica 2 se puede ver el crecimiento diario de *Arthrospira maxima*.

De la técnica de Alcalinidad, el sobrenadante que se obtiene en el proceso de filtración se titula con fenolftaleína para los carbonatos y naranja de metilo para los bicarbonatos, se realiza en dos fases por su pH mayor a 8.3, ya que las aguas con algas en crecimiento son alcalinas debido a las cantidades apreciables de hidróxidos y carbonatos, lo cual indica que las algas toman para su fotosíntesis el dióxido de carbono, esa reducción hace que el pH aumente de tal forma que la Alcalinidad en los reactores alcanzaba diario un pH entre 8.7 y 9.4, indicando el favorable crecimiento de las algas. Debido a lo anterior la preparación del medio mineral de crecimiento que consumieron las algas fue adecuada en los nutrientes necesarios.

En la gráfica 3 se muestra que la cinética de reacción de la luz LED roja se ajusta a orden 1 debido a que la rapidez de reacción depende de la concentración de *Arthrospira maxima*, al igual que la cinética de reacción con luz visible tomada de la gráfica de una colega de un proyecto anterior al presente estudio. La pendiente de 0.0188 de la luz LED roja es claramente más pronunciada que la pendiente de 0.0059 de la luz visible, lo cual demuestra que la luz LED roja potencializa más el crecimiento de *Arthrospira maxima*. La gráfica se realizó tomando en cuenta únicamente los primeros 7 días (168 h) de crecimiento con la luz LED roja para compararlos con los 7 días con luz visible que realizaron en el proyecto anterior al actual.

1. Ecuación de concentración contra tiempo para orden 1

$$\ln [A] = \ln [A]_0 - kt$$

Debido a que es de orden 1 se graficó $\ln [A]$ contra tiempo en horas, dando como resultado una función lineal creciente.

2. Ecuación de rapidez

$$v = - d[A]/dt = k [A]$$

Donde:

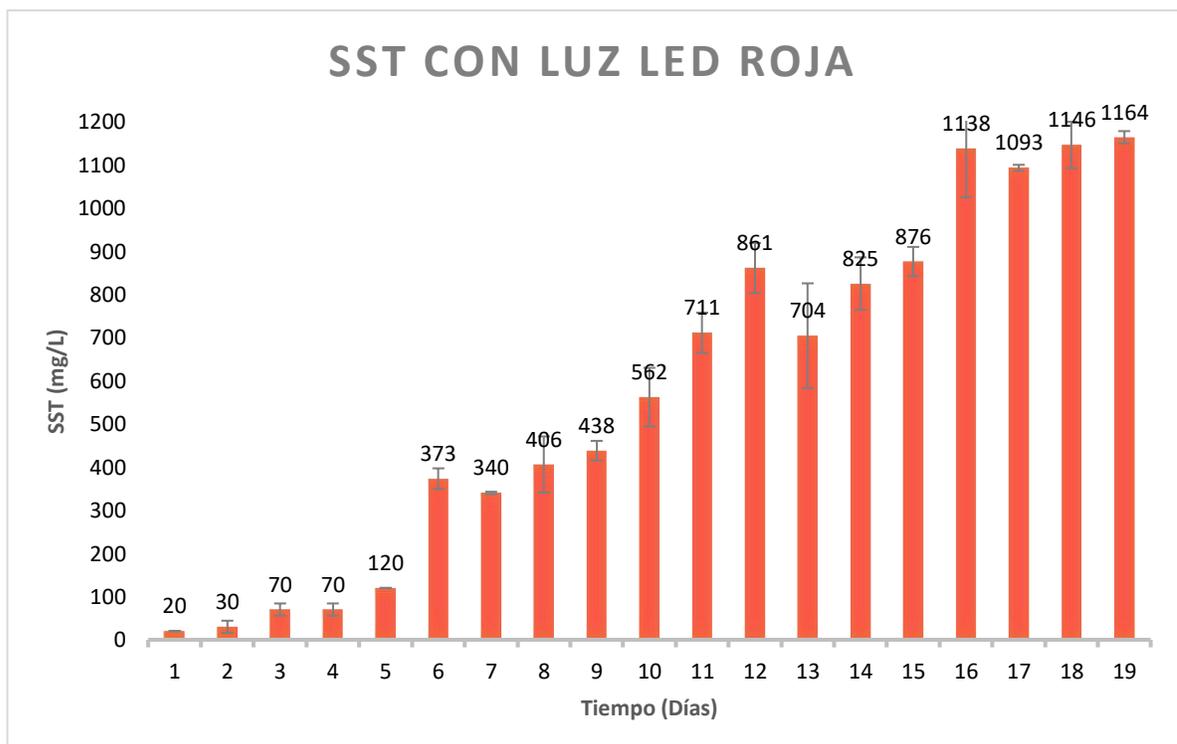
v = rapidez de reacción

$k = m$ (la pendiente)

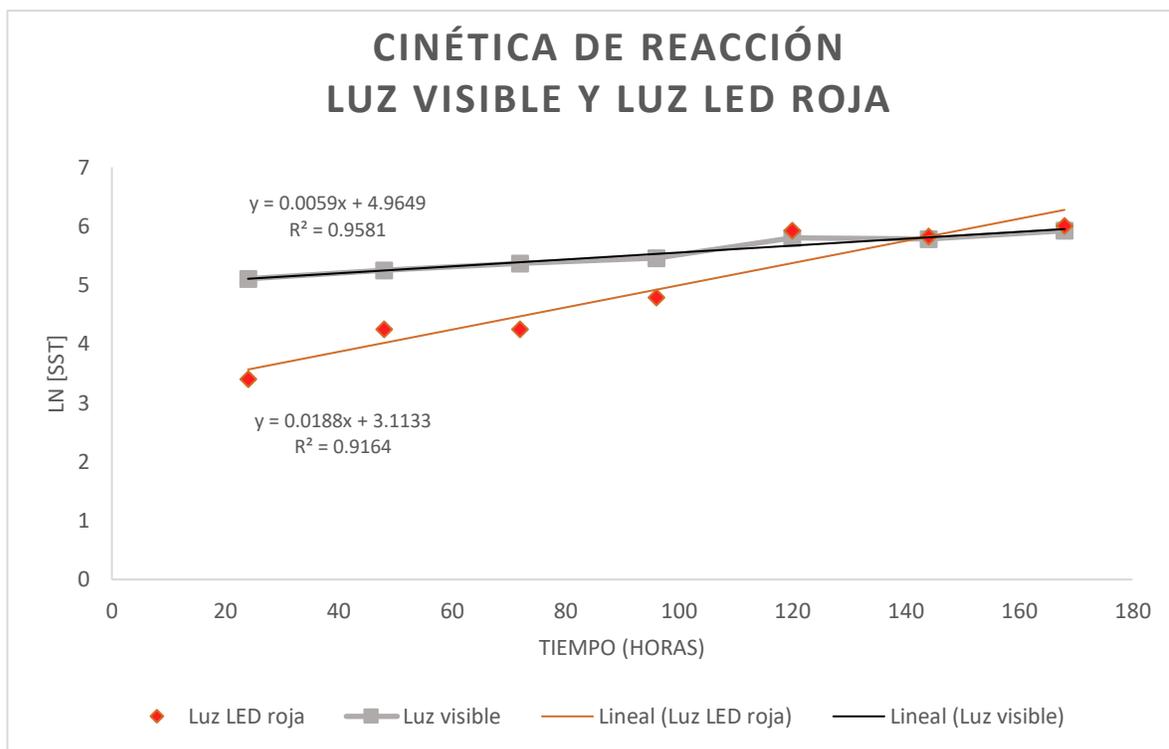
A = la concentración de Sólidos Suspendidos Totales

3. Sustitución de Ec. 2 para obtener la rapidez de reacción de la luz LED Roja

A las 168 horas la rapidez de reacción = $(0.0188 \text{ h}^{-1}) (406 \text{ mg/L}) = 7.63 \text{ mg/L} \cdot \text{h}$



Gráfica 2. Promedio de SST de las jarras con luz LED roja



Gráfica 3. Cinética de reacción luz visible y luz LED roja

Producción de pigmento con luz LED azul y verde

Después de la exposición a la luz LED roja, la prueba de jarras mostrada en la ilustración 15 se expuso a un rango de longitud de onda de 465–475 nm (luz LED azul) y 522–532 nm (luz LED verde) con una agitación constante de 63 RPM e inició con un promedio de 1155 mg/L en cada jarra, el cual es el promedio aproximado de la mezcla generada los días 18 y 19 para que todas las jarras con luz LED azul y verde iniciaran con la misma concentración.

En la prueba de jarras con la luz LED roja se obtuvo un incremento diario de biomasa de *Arthrospira maxima*, pero en los resultados experimentales mostrados en las

gráficas 4 y 5 se puede observar que al hacer el cambio a la luz azul y verde los contenidos de biomasa fueron disminuyendo, pues estas dos no funcionan mejor que la luz LED roja para acelerar el crecimiento, sino solo para potencializar la producción de ficobiliproteínas.

Se decidió exponer las jarras a luz azul y verde ya que en la literatura estaba reportado un incremento en la producción de ficobiliproteínas con ambas longitudes de onda (Jihae Park y Thai Binh Dinh, 2019), y de experiencia propia se sabía que con la luz LED verde bajan menos los SST que con luz LED azul.

En esta prueba de jarras los SST de la jarra número 6 con la luz LED verde dio los mejores resultados con 898 mg/L en el primer y tercer día, pero la jarra 5 en el segundo día obtuvo 784 mg/L. En la jarra 6 habían más SST, pero se obtuvieron menos ficobiliproteínas y en la jarra 5 habían menos SST, pero más ficobiliproteínas, lo cual vuelve un poco impredecible usar luz LED verde. A diferencia de esto, las 4 jarras azules tenían una cantidad de SST similar entre ellas, al igual que una concentración similar de ficobiliproteínas.

En general con luz LED azul en el tercer día se produjo el máximo de ficobiliproteínas, pero con una disminución de SST a 759 mg/L y el de luz LED verde alcanzó el máximo en el segundo día, con una disminución de SST a 782 mg/L. Tienen una diferencia de 23 mg/L por lo que con la luz LED azul los SST bajan un 2.94 % más que con la luz LED verde.

Los LEDs ayudan a mejorar la calidad y cantidad de la biomasa de microalgas; sin embargo, se necesita una combinación equilibrada de longitudes de onda ya que responden a la luz de manera diferente según los pigmentos adquiridos o perdidos

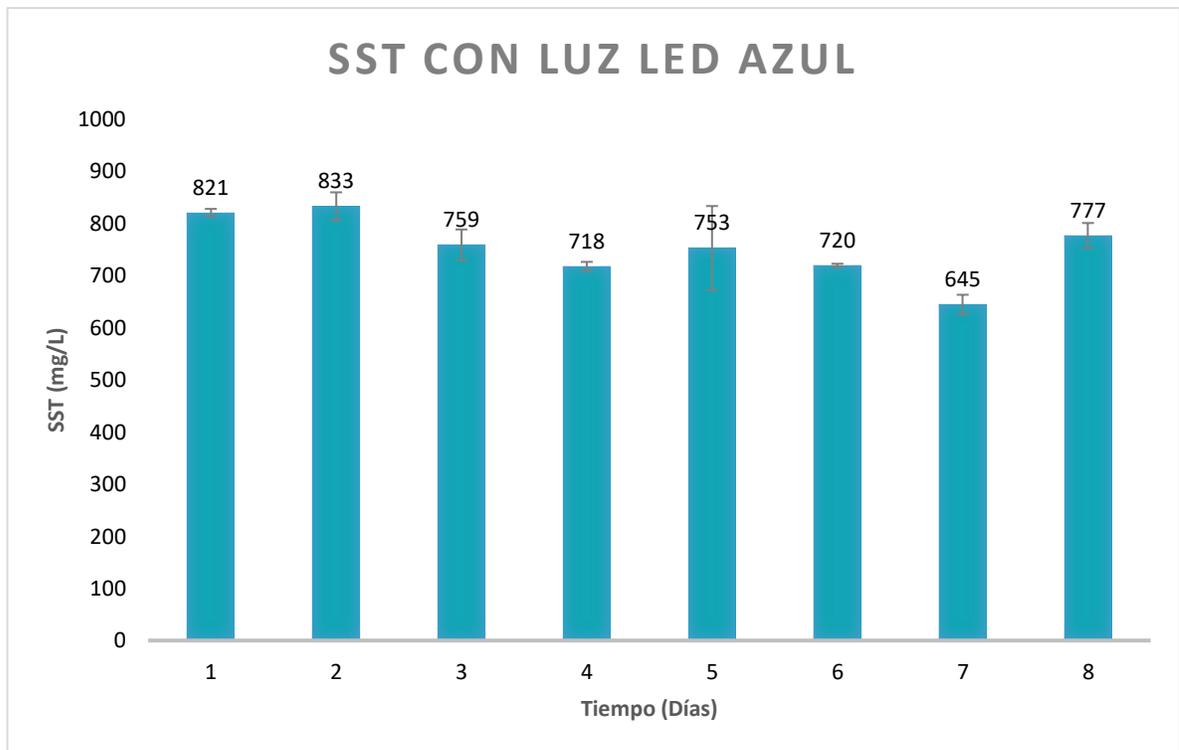
durante su evolución y es así como la luz LED verde y azul efectúan un cambio en la producción de la ficobiliproteína después de haberla hecho crecer con la luz LED roja. Las ficobiliproteínas forman complejos de antenas de captación de luz y actúan como pigmentos accesorios fotosintéticos en microalgas, la fuente habitual de estos compuestos (García et al., 2021).

En la gráfica 6 se muestra que la cinética de reacción de la luz LED azul y verde en 15 días (360 h) se ajusta a orden 1 debido a que la rapidez de reacción depende de la concentración de *Arthrospira maxima*, al igual que la cinética de reacción con luz LED roja, pero a diferencia de ésta, la pendiente de -0.0005 es negativa debido a que la luz LED azul y verde únicamente potencializan la producción de ficobiliproteínas y no el crecimiento del cultivo.

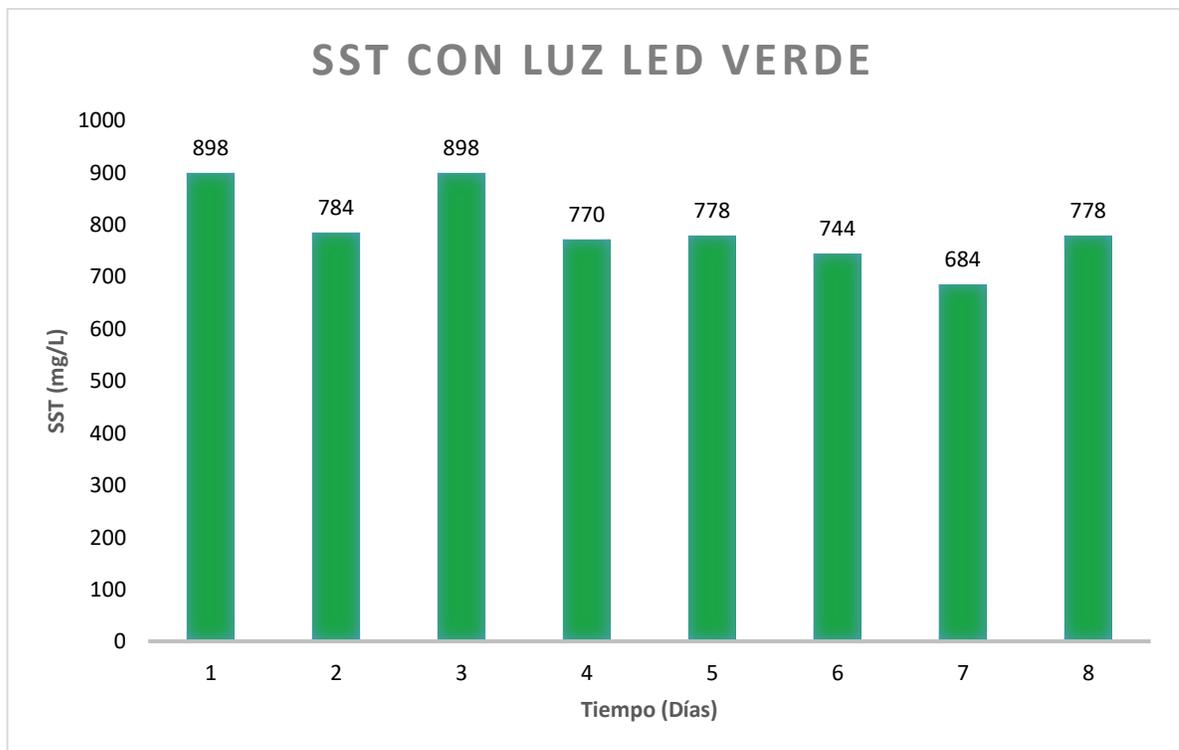
4. Sustitución de Ec. 2 para obtener la rapidez de reacción de la luz LED azul y verde

A las 360 horas la rapidez de reacción = $(-0.0005 \text{ h}^{-1}) (778 \text{ mg/L}) = -0.389 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$

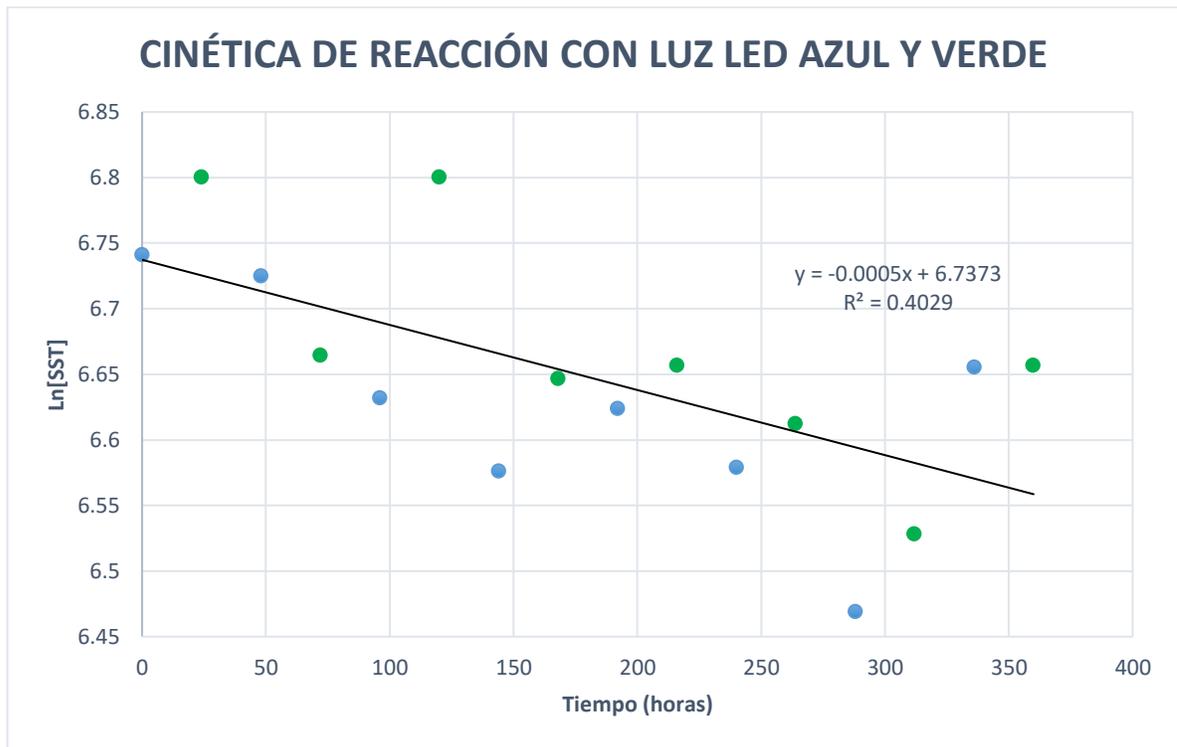
La rapidez de reacción de la luz LED visible y roja es positiva, la de la luz LED azul y verde es negativa, debido a que la generación de SST con luz LED visible y roja crece conforme al tiempo, por lo cual tiene pendiente positiva, dando como resultado una función lineal creciente, pero con luz LED azul y verde sucede lo contrario, sin embargo, aunque sus SST no aumentan, si aumentan las ficobiliproteínas.



Gráfica 4. Promedio de SST con luz LED azul



Gráfica 5. Promedio de SST con luz LED verde



Gráfica 6. Cinética de reacción con luz LED azul y verde

Función de los ficobilisomas

Los ficobilisomas son antenas recolectoras de luz que están organizadas en forma de triángulo equilátero conformado por cilindros de pigmento rojo que son la ficoeritrina y de ellas emanan estructuras periféricas de pigmento azul y verde azul que son la ficocianina y la aloficocianina respectivamente.

La función principal del ficobilisoma es transferir la energía lumínica absorbida por las ficobiliproteínas, las cuales son pigmentos accesorios que absorben la luz que la clorofila es incapaz de absorber (la de longitudes de onda más cortas) y la llevan hacia el centro de reacción de la clorofila α en la membrana fotosintética para convertirla en energía química. (McColl R, 1998)

La clorofila juega un papel importante en la fotosíntesis y las ficobiliproteínas ayudan a la clorofila a ampliar la longitud de onda de absorción de los pigmentos de la antena de fotosíntesis (Zahra Zahra, 2018). La luz LED artificial absorbida por las antenas recolectoras de las pruebas de jarras con luz roja, verde y azul está entre los rangos de longitud de onda que la clorofila no logra recolectar, pues la absorbe muy poco y por esto necesita de dichas antenas (MacColl R, 1998). A pesar de ello es importante resaltar que la luz LED verde sí potencializa la producción de clorofila (Jihae Park y Thai Binh Dinh, 2019) y que después de la extracción de ficobiliproteínas, se puede extraer clorofila de la biomasa gastada (Tavanandi, H.A., Raghavarao, K.S.M.S., 2019).

Las ficobiliproteínas que contienen *Arthrospira maxima* se obtienen como producto de la disociación de los ficobilisomas. Cuando las células de estos organismos se lisan, los componentes celulares escapan al medio acuoso y los ficobilisomas se disocian en sus componentes, por lo que las ficobiliproteínas se pueden encontrar libres (MacColl R, 1998).

La ilustración 3 muestra las tres ficobiliproteínas en la estructura del ficobilisoma; estas proteínas las contiene la membrana tilacoide que hay dentro de un cloroplasto de una célula de cianobacteria.

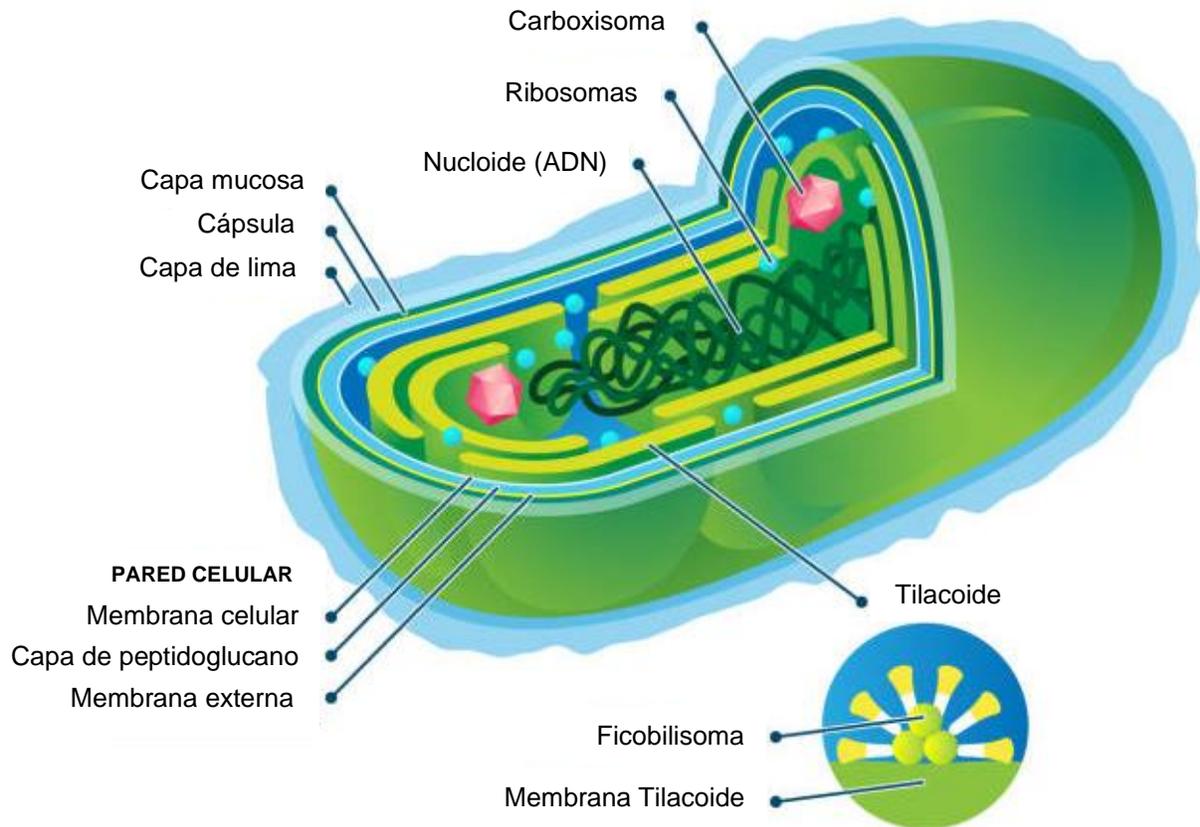


Ilustración 17. Estructura interna de una cianobacteria (VectorMine)

En la membrana tilacoide se sitúan diversas proteínas y enzimas, entre ellas los conocidos como pigmentos fotosintéticos, que son capaces de absorber la energía. A diferencia de los tilacoides vegetales, los tilacoides de las cianobacterias no se organizan en granas que son sacos apilados, sino en láminas paralelas cerca de la membrana celular.

Función del coagulante

El coagulante utilizado es una poliamina de alto peso molecular en forma líquida con excelentes aplicaciones en tratamiento de agua potable, industrial, municipal, textil, papelera, minera, así como en aplicaciones directas en la fabricación de diversas clases de papeles. Es un coagulante polielectrolito catiónico no tóxico que

cumple con normas de la FDA (Food and Drugs Administration). Su aplicación combinada a la acción de un floculante ofrece excelentes resultados de remoción de Sólidos Suspendidos Totales, Turbidez y color, así como material coloidal en suspensión.

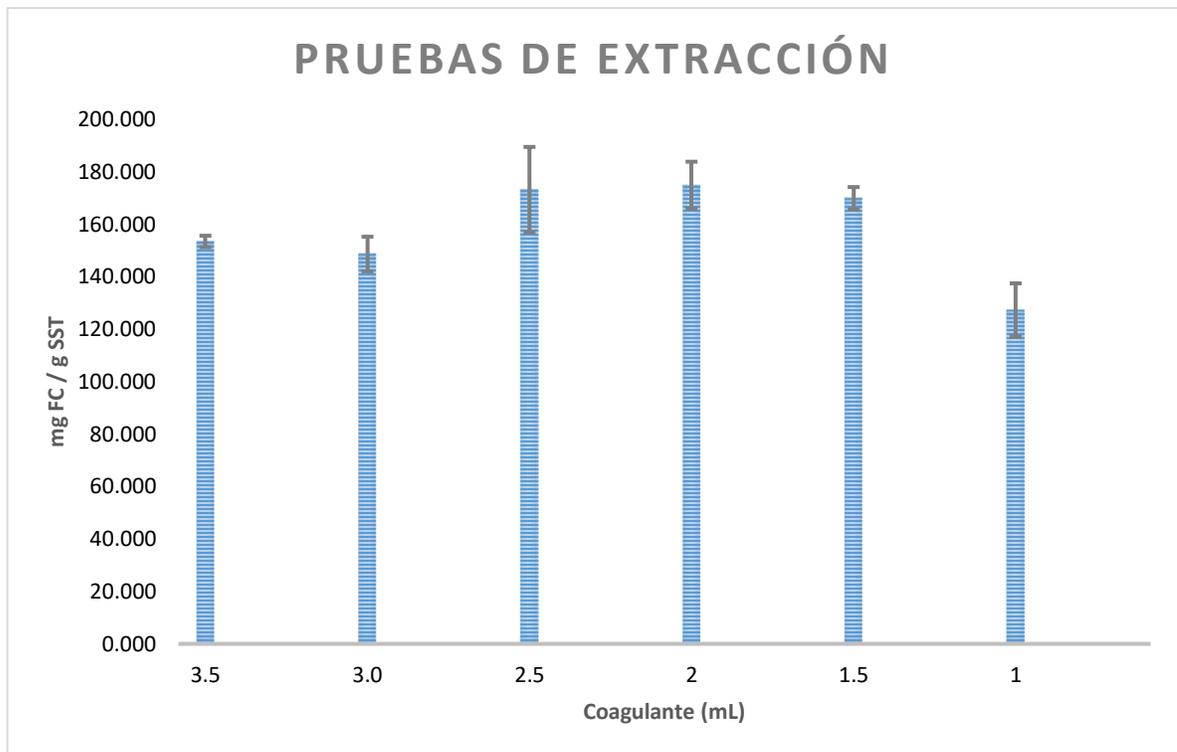
Un coagulante catiónico tiene la naturaleza policatiónica de poder unirse y estabilizar a polímeros ricos en cargas negativas como las proteínas. Las ficobiliproteínas tienen cadenas de polipéptidos (los cuales también son polielectrolitos como el coagulante catiónico, pero cargados negativamente) que por ser grandes se convierten en proteínas. La ficobiliproteína tiene un punto isoeléctrico de 3 (Anusuya Devi M. et al., 1981) y es de carga negativa ya que a valores de pH por debajo del pH isoeléctrico la carga neta de la proteína es positiva, y a valores de pH por encima del pH isoeléctrico, la carga neta de la proteína es negativa. Por lo tanto, el coagulante policatiónico y las ficobiliproteínas polianiónicas, son polielectrolitos que podrían tener una interacción entre sí y provocar la ruptura de la pared celular para extraer los pigmentos ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina.

Extracción de ficobiliproteínas con coagulante

Se implementó una nueva técnica para extraer las ficobiliproteínas de una forma más rápida, sencilla y con un buen rendimiento. Se empleó un coagulante y una energía complementaria que fue la agitación con el Vortex. El tipo de coagulación es por adsorción ya que es agua turbia, debido a que la biomasa de *Arthrospira maxima* es parte de una disolución en el medio mineral y por eso forma los flóculos casi instantáneamente.

La nueva técnica analítica de extracción de ficobiliproteínas fue desarrollada a partir de la prueba de diferentes concentraciones de coagulante polielectrolito líquido catiónico por triplicado de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mL como se muestra en la gráfica 7, para encontrar la cantidad óptima con el fin de desestabilizar las partículas para favorecer su aglomeración, ya que de lo contrario un exceso de coagulante puede estabilizar de nuevo la molécula.

Al ser notable la mayor coloración azul en los tubos Falcon de 2.5 mL en el menor tiempo después de la agitación en el Vortex y al calcular la concentración de mg de ficocianina por g de Sólidos Suspendidos Totales, tomando en cuenta el rango de desviación estándar que se puede ver en la gráfica 7, la concentración de 2.5 mL de coagulante fue la más alta y se usó como el volumen estándar necesario para extraer las ficobiliproteínas que a simple vista tienen una coloración entre azul y roja, como se muestra en la ilustración 16, esto debido a la presencia de ficocianina en mayor cantidad que la aloficocianina y ficoeritrina. Lo anterior se vio reflejado en el barrido que se realizó en el espectrofotómetro UV-visible mediante el cual se determinó la identificación y cuantificación de las ficobiliproteínas con ayuda de ecuaciones teóricas. La ilustración 18 es de algunas muestras después de hacer el barrido, en la cual se puede apreciar un azul especial con rojo.



Gráfica 7. Pruebas de extracción con coagulante polielectrolito líquido catiónico

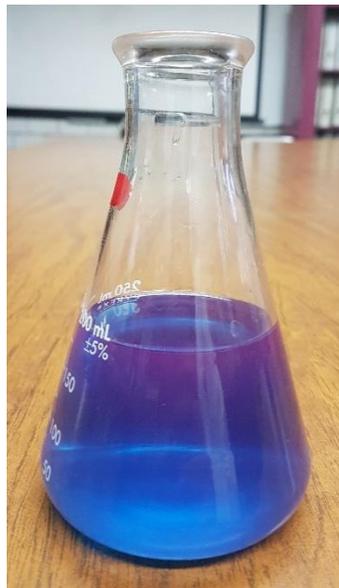


Ilustración 18. Matraz con filtrado color azul y fluorescencia roja

Cálculo de ficobiliproteínas

En términos de sus propiedades de absorción, las ficobiliproteínas se dividen en tres clases principales: ficocianina (FC) a una longitud de onda aproximada de absorción de 615 nm, aloficocianina (AFC) a 652 nm y ficoeritrina (FE) a 562 nm.

La concentración de ficobiliproteínas se calcula utilizando las ecuaciones basadas en los coeficientes de extinción específicos para pigmentos en cianobacterias, propuestas por Siegelman & Kycia (1978):

5. Ecuación Ficocianinas (color azul)

$$FC (mg/ml) = \frac{A_{615} - 0.474 (A_{652})}{5.34}$$

6. Ecuación Aloficocianinas (color verde azulado)

$$AFC (mg/ml) = \frac{A_{652} - 0.208 (A_{615})}{5.09}$$

7. Ecuación Ficoeritrinas (color rojo)

$$FE (mg/ml) = \frac{A_{562} - 2.4 (FC) - 0.849 (AFC)}{9.62}$$

Donde A₆₁₅, A₆₅₂ y A₅₆₂ representan las absorbancias medidas a 615, 652 y 562 nm. Si los valores se multiplican por el volumen de extracto y se dividen por el número total de células presentes en dicho volumen, se obtiene el contenido de ficobiliproteínas (Betancourt, 1997).

Las gráficas 8 a la 13 muestran la evaluación de la producción de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina con luz LED azul y verde por separado. En cada gráfica

se agregó el día 0 en color rojo para identificar la cantidad de SST con la que iniciaron con luz LED roja antes de ser expuestas a la luz LED azul o verde.

-Ficocianina:

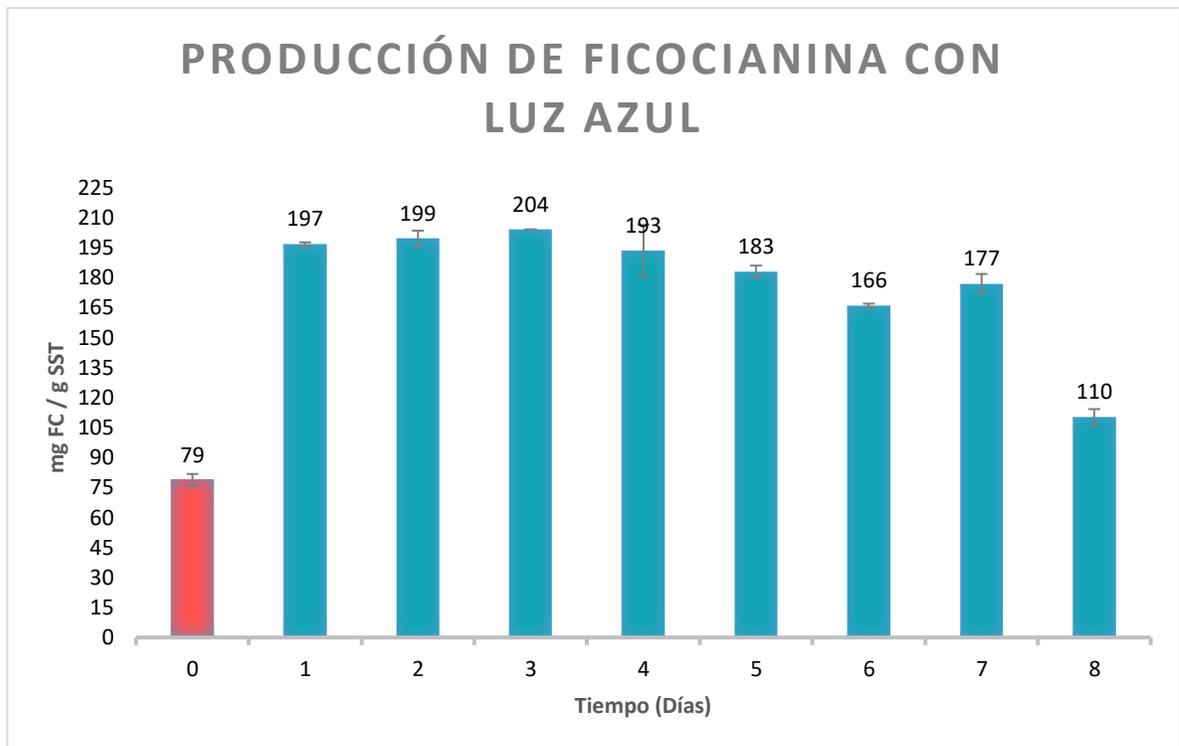
En el tercer día con luz LED azul se produjeron 204 mg FC/g SST, que fue el máximo de ficocianina producido. De luz LED verde se alcanzó el máximo en el segundo día, pero con una producción de 196 mg FC/g SST. Tienen una diferencia de 8 mg FC/g SST por lo que con la luz LED verde la producción de ficocianina baja 3.92 % más que con la luz LED azul.

-Aloficocianina:

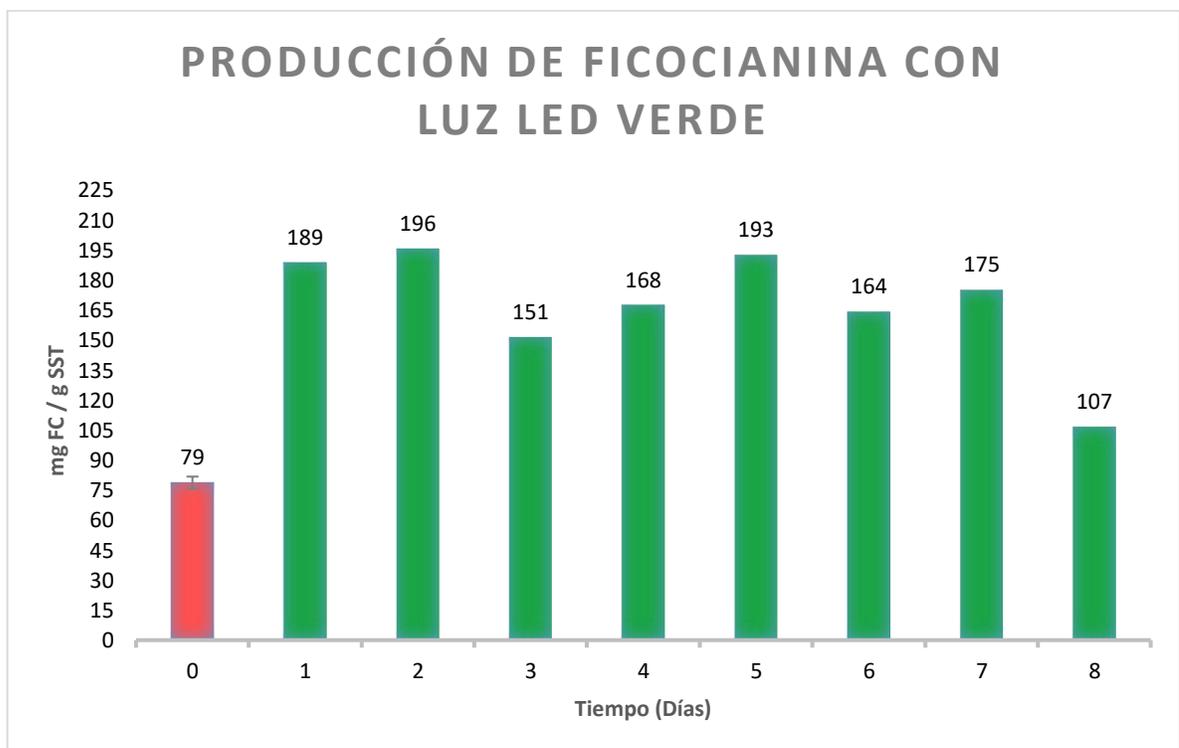
En el segundo día con luz LED azul se produjeron 66 mg AFC/g SST, que fue el máximo de aloficocianina producido. De luz LED verde también se alcanzó el máximo en el segundo día con una producción de 64 mg AFC/g SST. Tienen una diferencia de 2 mg AFC/g SST por lo que con la luz LED verde la producción de aloficocianina baja 3.03 % más que con la luz LED azul.

-Ficoeritrina:

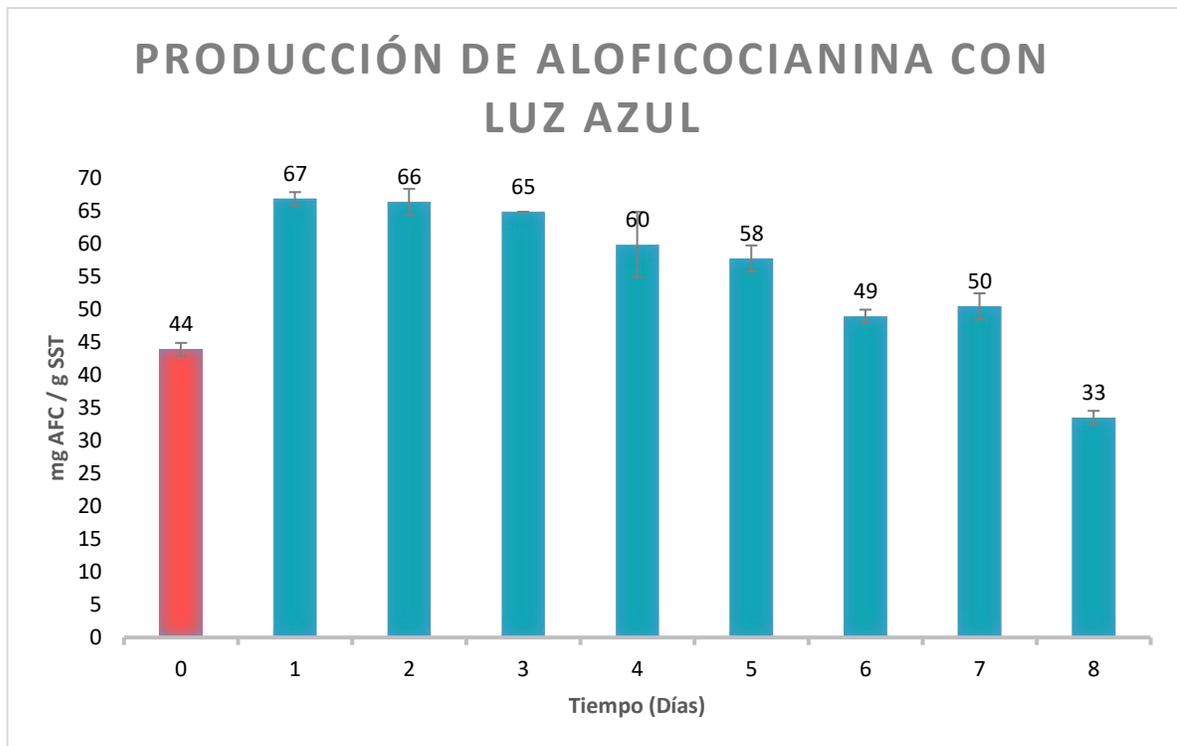
En el primer día con luz LED azul se produjeron 22 mg FE/g SST, que fue el máximo de ficoeritrina producido. De luz LED verde se alcanzó el máximo en el segundo día, con una producción de 19 mg FE/g SST. Tienen una diferencia de 3 mg FE/g SST por lo que con la luz LED verde la producción de aloficocianina baja 13.63 % más que con la luz LED azul.



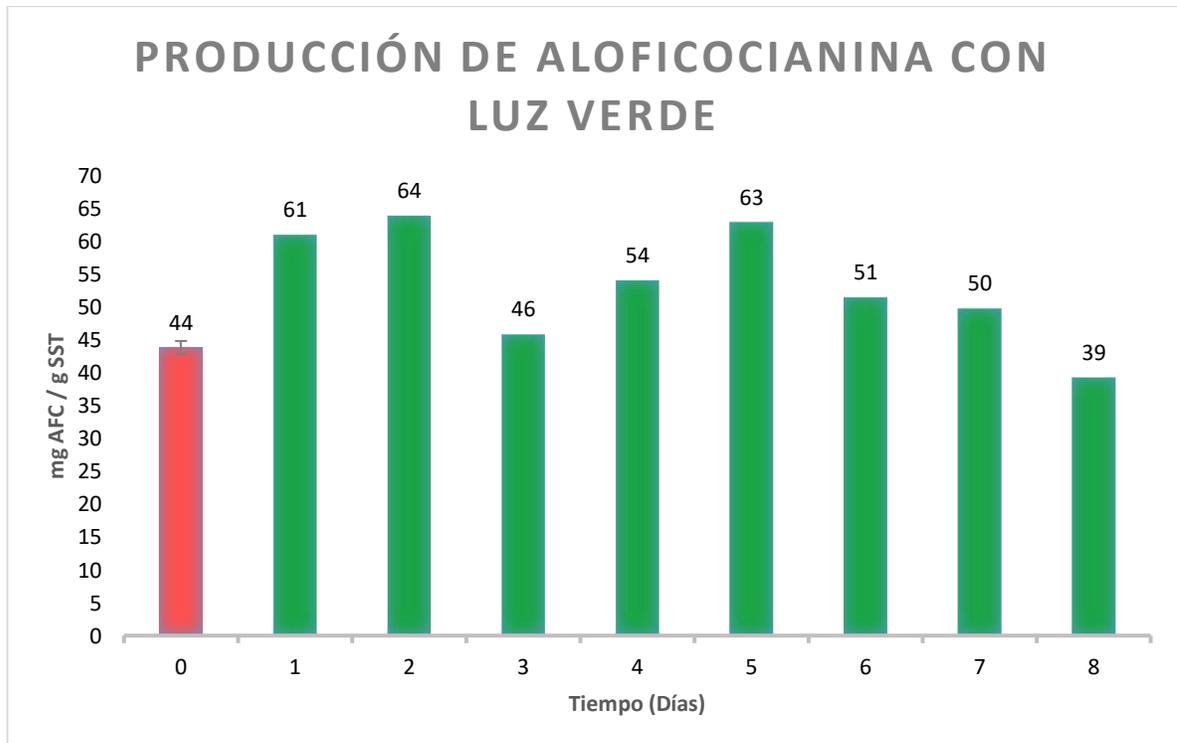
Gráfica 8. Producción de Ficocianina con luz LED azul



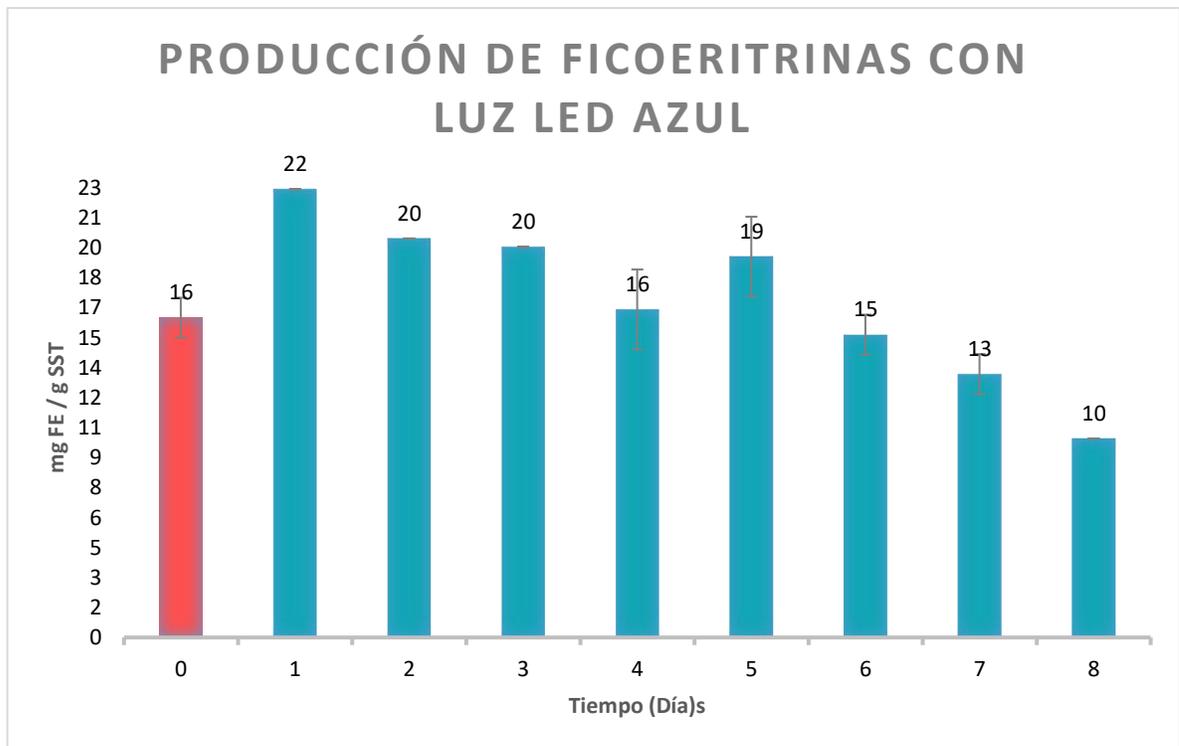
Gráfica 9. Producción de Ficocianina con luz LED verde



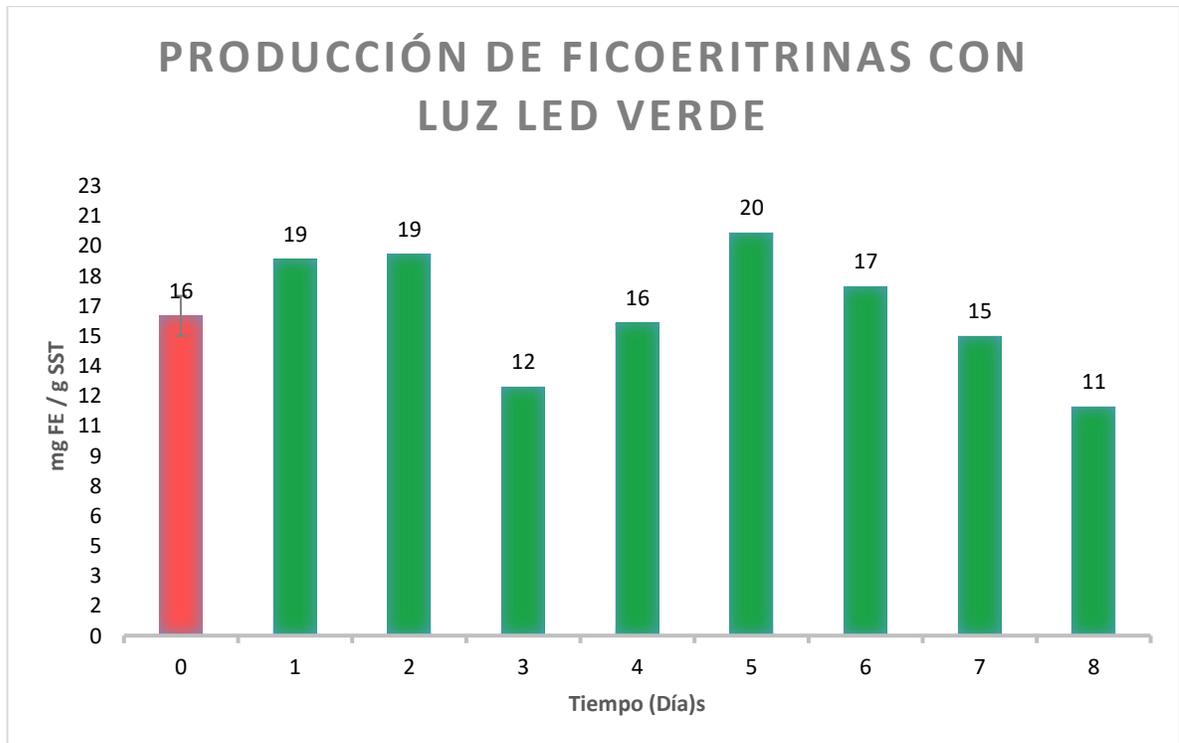
Gráfica 10. Producción de Alococianina con luz LED azul



Gráfica 11. Producción de Alococianina con luz LED verde



Gráfica 12. Producción de Ficoeritrina con luz LED azul



Gráfica 13. Producción de Ficoeritrina con luz LED verde

Comparación de producción de ficobiliproteínas

De Ficocianina con luz LED roja se obtuvieron 79 mgFC/gSST y al hacer el cambio a luz LED azul se obtuvo un máximo de 204 mgFC/gSST en el tercer día, por lo que hubo un aumento de producción del 158 % y logrando un rendimiento de 20.4 % por cada gramo de *Arthrospira maxima*.

De Aloficocianina con luz LED roja se obtuvieron 44 mgAFC/gSST y al hacer el cambio a luz LED azul se obtuvo un máximo de 65 mgAFC/gSST en el tercer día, por lo que hubo un aumento de producción del 47.8 % y logrando un rendimiento del 6.5 % por cada gramo de *Arthrospira maxima*.

De la Ficoeritrina con luz roja se obtuvieron 16 mgFE/gSST y al hacer el cambio a luz azul se obtuvo un máximo de 20 mgFE/gSST en el tercer día, por lo que hubo un aumento de producción del 25 % y logrando un rendimiento del 2 % por cada gramo de *Arthrospira maxima*.

En general se obtuvo un rendimiento del 28.9 % de ficobiliproteínas por cada gramo de biomasa fresca de *Arthrospira máxima* al extraer con el coagulante polielectrolito líquido catiónico.

En uno de los artículos más recientes, la luz LED azul les produjo los siguientes niveles de ficobiliproteínas: ficocianina 3.20 mg/g, aloficocianina 0.19 mg/g y ficoeritrina 0.97 mg/g, mediante un método de extracción con congelación y descongelación usando tampón fosfato de sodio (Jihae Park y Thai Binh Dinh, 2019) el cual es sencillo, pero muy bajo en cuanto a su producción en comparación con la nueva técnica usando el coagulante polielectrolito líquido catiónico.

Varios métodos de secado estudiados para el procesamiento de *Arthrospira maxima* (secado por flujo cruzado, secado por aspersion y secado al horno) dan como resultado una pérdida de aproximadamente 50 % de ficocianina. Por lo tanto, la biomasa fresca es más adecuada para la extracción de ficocianina (R. Sarada et al., 1999).

Algunos ejemplos de otros artículos con datos de extracción que nos ayudan a comparar la eficiencia de la nueva técnica de extracción con el coagulante son:

- Método de extracción congelación, descongelación y células tratadas con HCl 0.02 N (R. Sarada et al., 1999).
176.6 mg de FC por g de biomasa de *Arthrospira maxima*.
- Método de extracción homogenización con mortero y células tratadas con HCl 0.02 N (R. Sarada et al., 1999).
175.8 mg de FC por g de biomasa de *Arthrospira maxima*.
- Método de extracción con agua y células tratadas con HCl 0.02 N (R. Sarada et al., 1999).
14.68 mg de FC por g de biomasa de *Arthrospira maxima*.
- Producción de ficobiliproteínas con nanopartículas de TiO₂ (Zahra Zahra et al., 2018).
Aumento de ficocianina en 33 % y producción de 29.3 mg/mL y aumento de AFC en 55 % y producción de 6.2 mg/mL
- Recuperación de ficocianina usando cromatografía de intercambio iónico de lecho fluidizado agitado (Kuei-Hsiang Chen et al., 2019).
59.42 % de rendimiento de recuperación de FC con 7.52 mg/mL

- Cromatografía de adsorción para recuperar ficocianina (R. Bermejo, 2006).
80 % de rendimiento de FC con 0.97 mg/mL y 95 % de rendimiento de AFC con 81 mg/mL
- Sistema acuoso de dos fases. Sistema PEG 4000/fosfato de potasio (Narayan A.V. and Raghavarao K.S.M.S., 2007)
90.34 % de rendimiento de FC con 0.26 mg/mL

CONCLUSIONES

El método propuesto de intercambiar la longitud de onda a lo largo de la experimentación permitió por un lado el crecimiento acelerado de *Arthrospira maxima* en el cultivo expuesto a la luz LED roja, y por otro la producción de ficobiliproteínas en el cultivo expuesto a la luz LED azul y verde.

Se operaron 3 reactores biológicos de *Arthrospira maxima* en condiciones de luz visible para obtener un cultivo fresco y poder iniciar la prueba de jarras que resultó una excelente manera de simular un proceso en reactores Batch a nivel laboratorio.

Se expuso a un rango de longitud de onda de 620–630 nm (luz roja) un cultivo fresco de *Arthrospira maxima* para acelerar su crecimiento. En 19 días se lograron aumentar los Sólidos Suspendidos Totales de 20 a 1164 mg/L. La cinética de reacción de la luz LED roja se ajustó a orden 1 debido a que la rapidez de reacción depende de la concentración de *Arthrospira maxima*, dando como resultado una función lineal creciente. La rapidez de reacción a las 168 horas con luz LED roja fue de 7.63 mg/L*h.

Se expuso el cultivo de luz LED roja a un rango de longitud de onda de 465–475 nm (luz azul) y 522–532 nm (luz verde) para incrementar la concentración de ficobiliproteínas. Con luz LED roja se extrajo de Ficocianina 79 mgFC/gSST, de Aloficocianina 44 mgAFC/gSST y de Ficoeritrina 16 mgFE/gSST. Al hacerse el cambio a luz LED azul la Ficocianina aumentó 159 % en concentración para el 3er día, la Aloficocianina 47.8 % y la Ficoeritrina 25 %, ambas en el 1er día. Con luz LED verde aumentó en concentración la Ficocianina 148.7 % y la Aloficocianina 45.7 % para el 2do día, la Ficoeritrina 19.3 % en el 5to día.

Se estimó la producción de ficobiliproteínas durante la experimentación de cambio de rango de longitud de onda cuantificando la concentración de ficobiliproteínas.

Con luz LED azul se alcanzó un máximo de producción de Ficocianinas de 204 mgFC/gSST en el 3er día de exposición, de Aloficocianina 66 mgAFC/gSST y de Ficoeritrinas 22 mgFE/gSST en el 1er día. Con luz LED verde se alcanzó un máximo de producción de Ficocianinas de 196 mgFC/gSST y de Aloficocianina 64 mgAFC/gSST en el 2do día de exposición, de Ficoeritrinas 20 mgFE/gSST en el 5to día. Por lo tanto, para la producción de ficobiliproteínas el uso de la luz LED azul se considera más eficaz y predecible en cuanto a la tendencia de la biomasa.

Se encontró una nueva forma de extraer las ficobiliproteínas mediante un coagulante catiónico; este método permite obtener los compuestos sin requerir de métodos de congelación o equipos especializados, tiene efecto en un día y libera más colorante azul.

Analizando los resultados a nivel laboratorio se prevé que el proyecto es rentable con las condiciones de pH, luz y medio mineral, ya que los reactores y pruebas de jarras operaron de manera correcta dando los resultados esperados en cuanto a biomasa y colorante.

El desarrollo de este proyecto permite ver a futuro qué tan viable es hacer a grande escala la producción de ficobiliproteínas a partir de *Arthrospira maxima*, y por supuesto con el objetivo de comercializarla como materia prima o suplemento alimenticio, pues este color azul actualmente es un pigmento de alto valor comercial.

Si se busca producir únicamente Ficocianina se debe dejar crecer al máximo con luz LED roja por dos semanas y exponer a luz LED azul por tres días; si se quiere producir Aloficocianina se debe exponer dos días y si se quiere producir Ficoeritrina se debe exponer solo un día. Si se quiere producir Ficobiliproteínas en general, lo mejor es exponerlas tres días, porque la Ficocianina es la de mayor valor económico y alimenticio. Por lo anterior es importante hacer la cosecha antes de los 3 días mencionados, de lo contrario bajarán considerablemente los SST y las ficobiliproteínas.

Con la exposición a la luz LED azul o verde, los Sólidos Suspendidos Totales bajan mientras las Ficobiliproteínas aumentan. Esto sucede al contrario con la luz LED roja, pues al presentar altos Sólidos Suspendidos Totales tiene bajas concentraciones de Ficobiliproteínas.

Recomendaciones para dar continuidad al trabajo:

En las pruebas de jarras con luz LED azul y verde las ficobiliproteínas aumentan, pero los Sólidos Suspendidos Totales bajan, lo cual podría evitarse usando luz intermitente en la que los destellos de luz serían más fuertes periódicamente para que ayuden a absorber más la luz (Peter S.C. Schulze, 2017). Podría usarse luz LED roja con destellos de luz LED azul o verde para que se siga potencializando el crecimiento y a la vez se incremente la concentración de ficobiliproteínas.

En general, las luces intermitentes son herramientas de próxima generación para mitigar la atenuación de la luz y aumentar la eficiencia fotosintética de los sistemas de cultivo de microalgas iluminados por diodos emisores de luz (LED). Las condiciones óptimas de luz intermitente dependen de la cinética de reacción y las propiedades de la cadena lineal de transferencia de electrones, la disipación de energía y los mecanismos de almacenamiento de un fotótrofo (Peter S.C Schulze, 2017).

Como otra recomendación las ficobiliproteínas se deben almacenar a 20 ° C al vacío en bolsas de plástico que contengan por dentro papel de aluminio, para evitar la fotodegradación ya que incluso en disolución se degrada y pierde el pigmento en dos meses.

REFERENCIAS

- A. Paula R. F. Canela, Paulo T. V. Rosa, Marcia O. M. Marques and M. Angela A. Meireles. (2002). *Supercritical Fluid Extraction of Fatty Acids and Carotenoids from the Microalgae Spirulina maxima*. Ind. Eng. Chem. Res, Vol. 41, No. 12. De Scopus Base de datos.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., Wahidin, S., (2013). *Intensity of blue light: a potential stimulus for biomass and lipid content in freshwater microalgae Chlorella vulgaris*. Bioresour. Technol. 148, 373–378.
- Anusuya Devi M., Subbulakshmi G., Madhavi Devi K., and Venkataraman L. V. (1981). *Studies on the Proteins of Mass-Cultivated, Blue-Green Algae (Spirulina platensis)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29, 522-525. De Crossref Base de datos.
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M.M., Shiraiwa, Y., (2012). *Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil producing green algae Botryococcus braunii*. Bioresource Technology.109, 266–270. De Elsevier Base de datos.
- Belay, A. (2002) *The potential application of Spirulina as a nutritional and therapeutic supplement in health management*. JANA, 5, 27-48. De Scielo Base de datos.
- Betancourt, Liliana (1997). *Producción, purificación y caracterización de ficocianina de Synechococcus sp. 109201 aislada en aguas de Cuba*. Tesis para optar al grado de Doctora. Universidad de Coruña. <https://core.ac.uk/download/pdf/61897856.pdf>

- Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M., Malcata, F.X., (2011). *Light requirements in microalgae photobioreactors: an overview of biophotonic aspects*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1275–1288.
- Cheirsilp, B., Torpee, S., (2012). *Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch*.
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S., (2011). *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review*. Bioresour. Technol. 102, 71–81.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obbard, J.P., (2011). *Enhanced algae growth in both photo-trophic and mixotrophic culture under blue light*. Bioresour. Technol. 102, 3883–3887.
- De la Cruz José (2018). *Ficobilinas: entre rojo y azul*. Página web: <https://steemit.com/steempress/@josedelacruz/ficobilinasentroyazul-31fka0uvkk>
- Earthrise Farms (1988) *Five years testing of heavy metals in Spirulina: 1983-1987*.
- Ernesto Ponce López. (2013, abril). *Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo*. IDESIA (Chile) , 31, 135-139. De Scielo Base de datos.
- Fernando Pagelsa, A. Catarina Guedesa, Helena M. Amaroa, Anake Kijjoaa, Vitor Vasconcelosa. (2018). *Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications*. Elsevier, 1-22.
- Gantt, E. (1981). *Phycobilisomes*. Journal of Plant Physiology. 32, 327-347. De Elsevier Base de datos.

- García, A. B., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 3059–3070. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z>
- Gianluca Tosini, Ian Ferguson, Kazuo Tsubota. (2016). *Effects of blue light on the circadian system and eye physiology*. *Molecular Vision Biology and Genetics in Vision Research*, 22, 61–72. De PubMed Central Base de datos.
- Glemser, M., Heining, M., Schmidt, J., Becker, A., Garbe, D., Buchholz, R., Brück, T., (2016). *Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (3), 1077–1088.
- Gomez, C., Morrow, R.C., Bourget, C.M., Massa, G.D., Mitchell, C.A., (2013). *Comparison of intracanopy light-emitting diode towers and overhead high-pressure sodium lamps for supplemental lighting of greenhouse-grown tomatoes*. *Horttechnology* 23, 93-98.
- Grossman, A.R., Bhaya, D., He, Q., (2001). *Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting*. *Journal Biological Chemistry*. 276, 11449–11452.
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev.* 1993 Sep;57(3):725-49. doi: 10.1128/mr.57.3.725-749.1993. PMID: 8246846; PMCID: PMC372933.
- Gustavo M. Lima, Pedro C.N. Teixeira, Claudia M.L.L. Teixeira, Diego Filócomo, Celso L.S. Lage. (2018). *Influence of spectral light quality on the*

pigment concentrations and biomass productivity of Arthrospira platensis.
Elsevier, 1, 1-10.

- Hao Zhang, John Burr and Fu Zhao. (2017). *A comparative life cycle assessment (LCA) of lighting technologies for greenhouse crop production.* Elsevier, 140, 705-713. De Crossref Base de datos.
- Henrikson, R. (1994). *Microalga Spirulina - Superalimento del futuro,* Ed.Urano S.A., Barcelona, Spain.
- Ioannis S. Chronakis. (2001). *Gelation of Edible Blue-Green Algae Protein Isolate (Spirulina platensis Strain Pacifica): Thermal Transitions, Rheological Properties, and Molecular Forces Involved.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 49, 888–898. De Sci-Hub Base de datos.
- Jérôme Riss, Kelly Décordé, Thibault Sutra, Martine Delage, Jean-Claude Baccou, Nicolas Jouy, Jean-Pierre Brune, Henri Oréal, Jean-Paul Cristol, And Jean-Max Rouanet. (2007). *Phycobiliprotein C-Phycocyanin from Spirulina platensis Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 55, 1-6. 20. De Scopus Base de datos.
- Jihae Park y Thai Binh Dinh. (2019). *Contrasting effects of monochromatic LED lighting on growth, pigments and photosynthesis in the commercially important cyanobacterium Arthrospira maxima.* Elsevier, 291, 121846.
- Jourdan J.P. (2002). *Cultivez Votre Spiruline Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline,* Le Castanet, Mialet, 30140 Anduz, France. Pub. by Antenna Technologie,.

- Khatoon, H., Kok Leong, L., Abdu Rahman, N., Mian, S., Begum, H., Banerjee, S., Endut, A., (2018). *Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria*. *Bioresour. Technol.* 249, 652–658.
- Kuei-Hsiang Chen, Steven S.-S. Wang, Pau-Loke Show, Shih-Long Hsu, Yu-Kaung Chang. (2019). *Rapid and efficient recovery of C-phycoerythrin from highly turbid Spirulina platensis algae using stirred fluidized bed ion exchange chromatography*. *Elsevier Separation and Purification Technology*, 209, 636-645.
- Llopiz Alexey, Milián Ariadna, Díaz Domínguez Gabriela (2016). *Purificación y caracterización de la ficocianobilina*. *Bionatura*. Volumen 1 / Número 4.
- Lolymar Romero, Miguel Guevara, Bladimir Gómez, Bertha Arredondo-Vega, Roraisy Cortez, Berenice Licet. (2017). *Production of pigments from Arthrospira maxima cultivated in photobioreactors*. *Rev. Colomb. Biotecnol*, XIX, 1-7.
- López Portillo Francisco Vera y Martínez Jiménez Alfredo (2021). *Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción*. *BioTecnología*, Vol. 25 No.5.
- Market Research Reports Inc., (2018). <https://www.researchandmarkets.com/reports/4595723/global-and-chinese-phycobiliprotein-industry#pos-1>.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review*. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217–232.

- MacColl Robert. (1998). *Cyanobacterial Phycobilisomes*. Journal of structural biology, 124, 311–334. De Sci-Hub Base de datos.
- Morrow, R.C. (2008). *Led Lighting in Horticulture*. Hortscience 43, 1947-1950
- Nakamura Shuji, Chichibu Shigefusa F. (2000). *Introduction to Nitride Semiconductor Blue Lasers and Light Emitting Diodes*. CRC Press, 1, 386.
- Narayan, A.V. and Raghavarao, K.S.M.S. (2007). Extraction and purification of c-phycoyanin from *Spirulina platensis* employing aqueous two phase systems. International Journal of Food Engineering. Vol: 3. Artículo 16.
- Ojit, S.K., (2015). *The response of phycobiliproteins to light qualities in Anabaena circinalis*. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 3, 1–6.
- Omega Ksenya (2021). *3D image of Phycocyanobilin skeletal formula*. Página web: <https://www.alamy.com/3d-image-of-phycocyanobilin-skeletal-formula-molecular-chemical-structure-of-blue-phycobilin-isolated-on-white-background-image500348230.html?imageid=28EA48B6-5998-4665-9E65-4ADB39B81CBD&p=1244771&pn=1&searchId=29273946abdcf297e7f6ccb99aeae9d4&searchtype=0>
- Pedrosa-Bezerra, R.; Chuei-Matsudo, M.; Sato, S.; Perego, P.; Converti, A.; Monteiro de Carvalho, J. (2012). *Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis*. Bioenergetic aspects. Biomass and Bioenergy. 37, 309-317.
- Percy M. Gault, Harris J. Marler. (2009). *Handbook on Cyanobacteria. Biochemistry, Biotechnology and Applications*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

- Peter S.C. Schulze, Hugo G.C. Pereira, Tamára F.C. Santos, Lisa Schuelera, Rui Guerra, Luísa A.Barreira, José A.Perales, João C.S.Varela. (2016). *Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of Nannochloropsis oculata and Tetraselmis chuii*. Algal Res. 16, 387–398.
- Peter S.C. Schulze, Rui Guerra, Hugo Pereira, Lisa M. Schüler, João C.S. Varela. (2017). *Flashing LEDs for Microalgal Production*. Cell Press, 35, 1-14. De Elsevier Base de datos.
- Purvis Katherine, Brittain Kennedy, Joseph Ariana, Cisek Richard, Tokarz Danielle (2019). *Third-order nonlinear optical properties of phycobiliproteins from cyanobacteria and red algae*, Chemical Physics Letters, Volume 731, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136599>.
- R. Bermejo, M. A. Felipe, E. M. Talavera, J. M. Alvarez-Pez. (2006). *Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalgae Spirulina Platensis*. Chromatographia, 63, 59–66.
- R. Sarada, Manoj G. Pillai, G.A. Ravishankar, (1999). *Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin*. Process Biochemistry, 34, 795–801.
- Sasseville Alexandre, Paquet Nathalie, Sevigny Jean, Hebert Marc, (2006). *Blue blocker glasses impede the capacity of bright light to suppress melatonin production*. Journal of Pineal Research, 41, 73–8.

- Sili Claudio, Torzillo Giuseppe & Vonshak Avigad. (2013). *Arthrospira* (*Spirulina*). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. 677-705. DOI: 10.1007/978-94-007-3855-3_25.
- Steven W. Lockley, George C. Brainard, Charles A. Czeisler, (2003). *High Sensitivity of the Human Circadian Melatonin Rhythm to Resetting by Short Wavelength Light*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 4502–4505.
- Schulze, P.S.C., Barreira, L.A., Pereira, H.G.C., Perales, J.A., Varela, J.C.S., (2014) *Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production*. *Trends Biotechnol.* 32, 422–430.
- Siegelman, H.W. & Kycia, J.H. (1978). Algal biliproteins. In: Hellebust, J.A. & Craigie, J.S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 71-79.
- Tavanandi, H.A., Raghavarao, K.S.M.S. (2019). *Recovery of chlorophylls from spent biomass of Arthrospira platensis obtained after extraction of phycobiliproteins*. *Bioresource Technology*, 271, 391-401.
- Tomaselli, L., (1997). *Morphology, ultrastructure and taxonomy of Arthrospira (Spirulina)*. In: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis, London, pp. 01–16.1, De Elsvier Base de datos.
- VectorMine. *Cyanobacteria vector illustration. Labeled bacteria internal structure scheme*. ID 176019705. Página web: <https://www.dreamstime.com/cyanobacteria-vector-illustration-labeled->

educational-bacteria-internal-structure-scheme-biological-blue-green-algae-
diagram-image176019705. Consulta 19 de marzo 2023.

- Wen-qing Shi, Si-dong Li, Gao-rong Li, Wen-hua Wang, Qing-xiang Chen, Yong-qiang Li, Xu-wei Ling. (2016). *Investigation of main factors affecting the growth rate of Spirulina*. Elsevier, 1-7. De www.elsevier.de/ijleo Base de datos.
- Yeh, N., Chung, J.P., (2009). *High-brightness leds-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation*. *Renewable & sustainable energy reviews*, 13, 2175-2180.
- Zahra Zahra, Seok-Young Kim, Hye-Youn Kim, Hwanhui Lee, Heayyeon Lee, JunYeong Jeon, Dong-Min Kim, Dong-Myung Kim, Seong-Joo Hong, Byung-Kwan Cho, Hookeun Lee, Choul-Gyun Lee, Muhammad Arshad, and Hyung-Kyoon Choi. (2018). *Phycobiliproteins production enhancement and lipidomic alteration by titanium dioxide nanoparticles in Synechocystis sp. PCC 6803 culture*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1-34. De ACS publications Base de datos.