



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

BIOSÍNTESIS DE FICOCIANINA EN LA MICROALGA *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 BAJO CONDICIONES HETEROTRÓFICAS Y MIXOTRÓFICAS UTILIZANDO XILOSA COMO PRINCIPAL FUENTE DE CARBONO Y EXPOSICIÓN A FOTOPERIODOS CONTROLADOS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. FRANCISCO VERA LÓPEZ PORTILLO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

IBt-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Sergio Revah Moiseev, UAM-Cuajimalpa

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, IBt-UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 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.

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: 516484). 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los resultados presentados en este trabajo son el producto de un esfuerzo colaborativo, por lo tanto, deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, mi asesor, por haberme brindado la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo y por toda su ayuda, orientación y conocimientos compartidos durante este tiempo.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Rosario Vera Estrella, el Dr. Octavio Tonatiuh Ramirez Reivich y el Dr. Sergio Revah Moiseev, quienes a lo largo de mi posgrado me han ofrecido valiosas palabras y enseñanzas.

A los miembros del jurado, a la Dra. Helena Porta Ducoing, la Dra. Katy Juárez López, el Dr. Ramon Alberto Batista Garcia, la Dra. Dulce María Arias Lizarraga y el Dr. Paul Rosas Santiago , les agradezco sinceramente por su tiempo, dedicación y por sus enriquecedores comentarios.

A la M. en C. Georgina Teresa Hernandez Chavez, Q.I. Luz Maria Martínez Mejia y a la Dra. Noemi Flores Mejia por su invaluable apoyo técnico.

Al personal de la planta piloto, el Q. Mario Alberto Caro Bermudez, la Ing. Veronica Albiter Hernandez y el M.B. Jose Raunel Tinoco Valencia, por su generosa asistencia y valiosos consejos.

A la unidad de docencia, representada por el Ing. Jalil Saab Hassanille, el Lic. J. Antonio Bolaños Guillen y la Lic. Gloria Villa Herrera, por facilitar todos los trámites necesarios de manera eficiente.

Agradezco sinceramente el apoyo brindado por el Programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

## RESUMEN

En condiciones mixotróficas y heterotróficas, se evaluó el crecimiento celular y producción de ficocianina (FC) de la microalga extremófila *Galdieria sulphuraria* 2919 en medios suplementados con glucosa, xilosa, mezcla de ambos azúcares e hidrolizados hemicelulósicos y celulósicos de rastrojo de maíz. Los valores del rendimiento de masa celular y la tasa de crecimiento específico mostraron que el metabolismo de la xilosa en condiciones heterotróficas tiene un aporte energético menor que el de la glucosa; sin embargo, en condiciones mixotróficas esta deficiencia se redujo por la producción de NADPH derivada de la presencia de luz. La producción de FC se vio afectada por la presencia de xilosa en comparación con la FC acumulada en presencia de la glucosa, lo que sugiere que la deficiencia energética por parte de la xilosa inhibe la biosíntesis de este pigmento. El uso de hidrolizados hemicelulósicos de rastrojo de maíz no permitió el crecimiento de la microalga, ya que el ácido acético en bajas concentraciones ( $0.6 \text{ g L}^{-1}$ ) inhibe el crecimiento de *G. sulphuraria*. Sin embargo, esta microalga acumuló FC heterotróficamente en hidrolizados de glucano de rastrojo de maíz con una eficiencia similar a la obtenida con glucosa.

La productividad de FC es dependiente de la luz, ya que estudios en autotrofia mostraron que limitando la exposición a la luz con: fotoperiodos, alta concentración de biomasa celular o uso de intensidades luminosas menores a  $140 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  afecta la acumulación de FC. Los estudios con fotoperiodos mostraron que la productividad de biomasa y FC presentan una relación lineal con el tiempo de exposición a la luz. En comparación con experimentos a menor biomasa, una concentración de biomasa inicial alta ( $1.4 \text{ g L}^{-1}$ ) generó la inhibición del crecimiento celular debido al efecto de sombreado y un incremento del 30% del contenido de FC, alcanzando una productividad volumétrica de FC de  $4.28 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Esta productividad equivale a un aumento de 18 veces en

comparación con los cultivos autótrofos con baja concentración de inóculo (1 g L<sup>-1</sup>). Esta estrategia mejora considerablemente la producción de FC en cultivos en lote con *G. sulphuraria* 2919.

## ABSTRACT

Under mixotrophic and heterotrophic conditions, cell growth and phycocyanin (PC) production of the extremophile microalga *Galdieria sulphuraria* 2919 were evaluated with glucose, xylose, a mixture of both sugars, and hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from corn stover. The values of the yield of cell mass and the specific growth rate showed that the metabolism of xylose has a lower energy contribution compared to glucose under heterotrophic conditions; however, this deficiency was reduced under mixotrophic conditions by the production of NADPH derived from the presence of light. PC production was affected by the presence of xylose compared to PC accumulated in the presence of glucose, suggesting that xylose inhibits the biosynthesis of this pigment. The use of corn stover hemicellulosic hydrolysates hinders the growth of *G. sulphuraria* since acetic acid in low concentrations ( $0.6 \text{ g L}^{-1}$ ) inhibits the growth. However, this microalga accumulated PC using the glucan hydrolysates from the corn stover with an efficiency similar to that obtained with glucose.

Since PC productivity is light-dependent, autotrophy studies have shown that techniques that limit light exposure, such as photoperiods, high concentration of cell biomass, and the use of light intensities lower than  $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  photons have an impact on the production of PC. Photoperiods showed that biomass and PC productivity have a linear relationship with light exposure time. A high initial biomass concentration ( $1.4 \text{ g L}^{-1}$ ) inhibits cell growth by a shading effect and resulted in a 30% increase in PC content compared to cells without inhibition, reaching volumetric productivity PC of  $4.28 \text{ mg}_{\text{PC}} \text{ L}^{-1}\text{day}^{-1}$ . This productivity is equivalent to an 18-fold increase compared to autotrophic cultures with low inoculum concentration ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). This strategy improves PC production in *G. sulphuraria* 2919 batch cultures with.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>FICOBILIPROTEÍNAS</b>	<b>9</b>
<b>FICOCIANINA, ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD</b>	<b>12</b>
<b><i>GALDIERIA SULPHURARIA</i></b>	<b>13</b>
<b>CULTIVOS DE MICROALGAS</b>	<b>16</b>
<b>CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO Y MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS</b>	<b>21</b>
<b>PRODUCCIÓN DE FC EN LA MICROALGA ROJA <i>G. SULPHURARIA</i></b>	<b>22</b>
<b>LIMITACIÓN DE LA LUZ COMO ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS</b>	<b>24</b>
<b>BIOMASA LIGNOCELULÓSICA COMO FUENTE DE CARBONO</b>	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>CEPA Y MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>31</b>
<b>CULTIVOS EN LOTE</b>	<b>31</b>
<b>HIDRÓLISIS TERMOQUÍMICA Y ENZIMÁTICA DEL RASTROJO DE MAÍZ</b>	<b>32</b>
<b>MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>33</b>
<b>PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL TRASPORTADOR DE AZÚCAR DE <i>G. SULPHURARIA</i></b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>

<b>SECCIÓN I: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE FC EN <i>GALDIERIA SULPHURARIA</i> 2919 UTILIZANDO GLUCOSA Y XILOSA EN CONDICIONES HETERO- Y MIXOTRÓFICAS.</b>	<b>37</b>
<i>G. SULPHURARIA</i> 2919 UTILIZA LA GLUCOSA EFICIENTEMENTE EN CONDICIONES HETERÓTROFAS Y MIXOTRÓFICAS.	37
LA XILOSA ES METABOLIZADA EFICIENTEMENTE POR <i>G. SULPHURARIA</i> 2919	43
<i>G. SULPHURARIA</i> 2919 ACUMULA CANTIDADES SEMEJANTES DE FC BAJO CONDICIONES HETERO- Y MIXOTRÓFICAS	47
LA GLUCOSA REPRIME EL CONSUMO DE XILOSA EN <i>G. SULPHURARIA</i> 2919	53
CONCLUSIONES DEL USO DE XILOSA COMO FUENTE DE CARBONO Y SU EFECTO EN LA ACUMULACIÓN DE FC.	56
<b>SECCIÓN II: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE FC UTILIZANDO JARABES PROVENIENTES DE LA HIDRÓLISIS DEL RASTROJO DE MAÍZ.</b>	<b>57</b>
LA MICROALGA <i>G. SULPHURARIA</i> NO PUEDE UTILIZAR EL HIDROLIZADO HEMICELULÓSICO COMO FUENTE DE CARBONO.	57
EL ÁCIDO ACÉTICO REPRIME EL CONSUMO DE GLUCOSA EN <i>G. SULPHURARIA</i> 2919	61
EL HIDROLIZADO CELULÓSICO DERIVADO DEL RASTROJO DE MAÍZ SE PUEDE UTILIZAR PARA LA ACUMULACIÓN DE FC.	63
CONCLUSIONES DE LA EVALUACIÓN DE JARABES PROVENIENTES DE LA HIDRÓLISIS TERMOQUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ COMO FUENTE DE CARBONO EN <i>G. SULPHURARIA</i> .	67
<b>SECCIÓN III: LIMITACIÓN DE LUZ EN CULTIVOS AUTÓTROFOS COMO ESTRATEGIA PARA INCREMENTAR LA ACUMULACIÓN DE FC EN <i>G. SULPHURARIA</i> 2919</b>	<b>68</b>
EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE FC SON PROPORCIONALES AL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LA LUZ.	68
EL EFECTO DE SOMBREADO, PROVOCADO POR UNA ALTA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BIOMASA, GENERA UN INCREMENTO EN EL CONTENIDO DE FC.	73
INTENSIDADES DE LUZ MENORES A 140 MMOL FOTONES M <sup>-2</sup> S <sup>-1</sup> NO PRESENTARON CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN LA ACUMULACIÓN DE FC	83
CONCLUSIONES DE LAS ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE FC MEDIANTE CULTIVOS AUTÓTROFOS EN <i>G. SULPHURARIA</i> UTEX 2919	86
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>87</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>89</b>
<b><u>ANEXO I: PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES DE 5 Y 10 L</u></b>	<b>96</b>
ESTUDIO DE LA LIMITACIÓN DE NUTRIENTES EN EL CRECIMIENTO DE <i>G. SULPHURARIA</i> 2919	96
EL BAJO OXÍGENO DISUELTO LIMITA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA <i>G. SULPHURARIA</i> BAJO CONDICIONES HETEROTRÓFICAS Y ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (>10 G <sub>GLU</sub> L <sup>-1</sup> )	105
CONCLUSIONES DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES DE 3 Y 5L	111
<b><u>ANEXO II: PRODUCCIÓN ACADÉMICA</u></b>	<b>112</b>

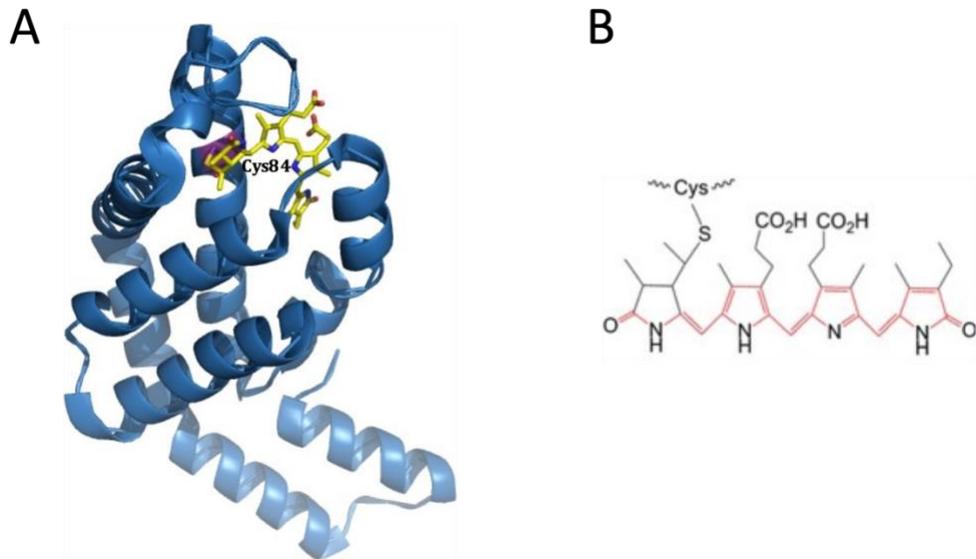
## INTRODUCCIÓN

Dentro del ámbito del laboratorio de vías metabólicas, una de las áreas de estudio prioritarias se enfoca en la utilización de residuos agroindustriales como fuente para la producción de metabolitos de gran interés. En este contexto, hemos tomado la decisión de aprovechar el potencial del hidrolizado de rastrojo de maíz como un recurso altamente prometedor. Además, en el seno de nuestro grupo de investigación, se encuentra un campo aún poco explorado relacionado con el estudio de microalgas. En este sentido, hemos optado por investigar el potencial de la microalga *Galdieria sulphuraria*. Esta elección se basa en su capacidad para prosperar en condiciones heterótrofas, lo que nos brinda la oportunidad de utilizar el rastrojo de maíz como fuente de carbono. El objetivo fundamental de este estudio es explorar la producción de ficocianina, un compuesto de alto valor agregado y gran relevancia en diversas industrias, mediante esta innovadora combinación de recursos y organismos.

### Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas (FBP) son proteínas pigmentadas presentes en cianobacterias y en las microalgas rodofitas, criptofitas y glaucofitas. Estas proteínas se encuentran formadas por dos unidades (**Fig. 1A**): una apoproteína y un pigmento denominado ficobilina, el cual se encuentra unido de manera covalente a un aminoácido cisteína. La ficobilina (**Fig. 1B**) está compuesta por grupos prostéticos tetrapirrólicos, los cuales presentan un sistema conjugado de enlaces dobles y sencillos alternados, permitiendo deslocalizar electrones en respuesta a una excitación luminosa [1].

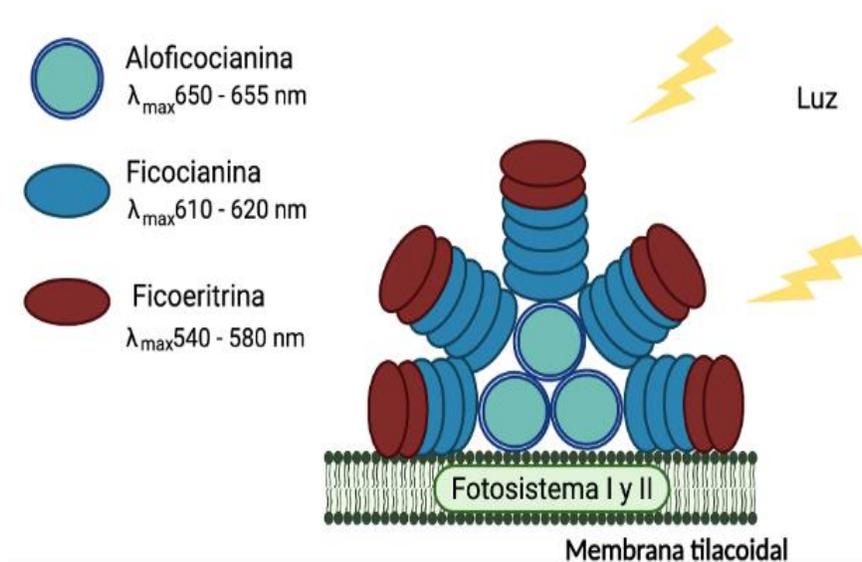
La ficobilina (**Fig. 1B**) está compuesta por grupos prostéticos tetrapirrólicos, los cuales presentan un sistema conjugado de enlaces dobles y sencillos alternados, permitiendo la deslocalización de electrones en respuesta a la excitación luminosa [1].



**Figura 1.** Componentes de las ficobiliproteínas. A) Ficobiliproteína de *Phormidium rubidum*; B) ficobilina representada por la ficocianobilina (C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>): grupo prostético tetrapirrólico de la FC. (estructura tomada de <https://en.wikipedia.org/wiki/> /junio 2022).

Las FBP constituyen complejos supramoleculares recolectores de luz altamente organizados denominados ficobilisomas (**Fig. 2**) [2]. Estos complejos se encuentran presentes en la membrana externa de los tilacoides y desempeñan un papel crucial en la captación de fotones durante el proceso de fotosíntesis. Las principales FBP presentes en los ficobilisomas son: la aloficocianina, la ficocianina y la ficoeritrina. Cada una de estas proteínas pigmentadas tiene una longitud de onda de absorción característica que determina su coloración: la aloficocianina ( $\lambda_{\text{max}}$  650-655 nm; azul claro), la ficocianina ( $\lambda_{\text{max}}$  610-620 nm; azul) y la ficoeritrina ( $\lambda_{\text{max}}$  540-580 nm; rojo) [3]. Cabe mencionar que los ficobilisomas además de contener FBP (aproximadamente 80% del peso seco del ficobilisoma), también cuentan con proteínas no pigmentadas, las cuales confieren la capacidad de estabilizar el

complejo, además de unirlo a la membrana tilacoidal [3].



**Figura 2.** Diagrama del ficobilisoma situado en la membrana tilacoidal (modificada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Ficobilisoma\\_junio/2022](https://es.wikipedia.org/wiki/Ficobilisoma_junio/2022)).

Las FBP tienen diversas aplicaciones entre las que destacan: agentes antioxidantes, neuroprotectores, anticancerígenos, colorantes (cosméticos y alimentos) y suplementos alimenticios; esto debido a su pigmentación fluorescente, naturaleza no tóxica y capacidad antioxidante [4]. Además, son empleadas como marcadores en diagnósticos histoquímicos y en la síntesis de conjugados con moléculas de interés biológico [5]. Actualmente existen más de 30 patentes sobre la producción de ficobiliproteínas, y su utilización en las diferentes industrias [6].

## Ficocianina, estructura y estabilidad

La ficocianina (FC; **Fig. 1A**) extraída de la cianobacteria *Arthrospira* es un heterodímero compuesto por las subunidades  $\alpha$  (~18 kDa) y  $\beta$  (~20 kDa); mientras que la subunidad  $\beta$  cuenta con dos moléculas del cromóforo ficocianobilina la subunidad  $\alpha$  sólo presenta una. La conformación cuaternaria de la proteína depende del pH en el que se encuentra. En un rango de pH de 5 a 6, la conformación mayoritariamente se encuentra como un hexámero  $(\alpha\beta)_6$ , mientras que a pH de 7 se encuentra principalmente formando un trímero  $(\alpha\beta)_3$  [3].

La FC es un pigmento presente en diversas especies de microalgas y cianobacterias. Aunque la FC comparte el mismo cromóforo, llamado ficocianobilina, entre estos microorganismos, se ha demostrado que existen diferencias en la estabilidad de esta molécula. Estas diferencias se atribuyen a la composición aminoacídica de la parte proteica de la FC, especialmente al mayor número de residuos de cisteína presentes.

Mediante el alineamiento de las secuencias proteicas de la FC provenientes de diferentes microorganismos, se ha observado que la composición de aminoácidos está altamente conservada, con un nivel de identidad del 70%. Además, se ha encontrado que las FC presentan una alta proporción de cadenas alfa hélices en su estructura secundaria. A nivel de estructura terciaria, también se han observado similitudes significativas entre las FC de distintas fuentes [7].

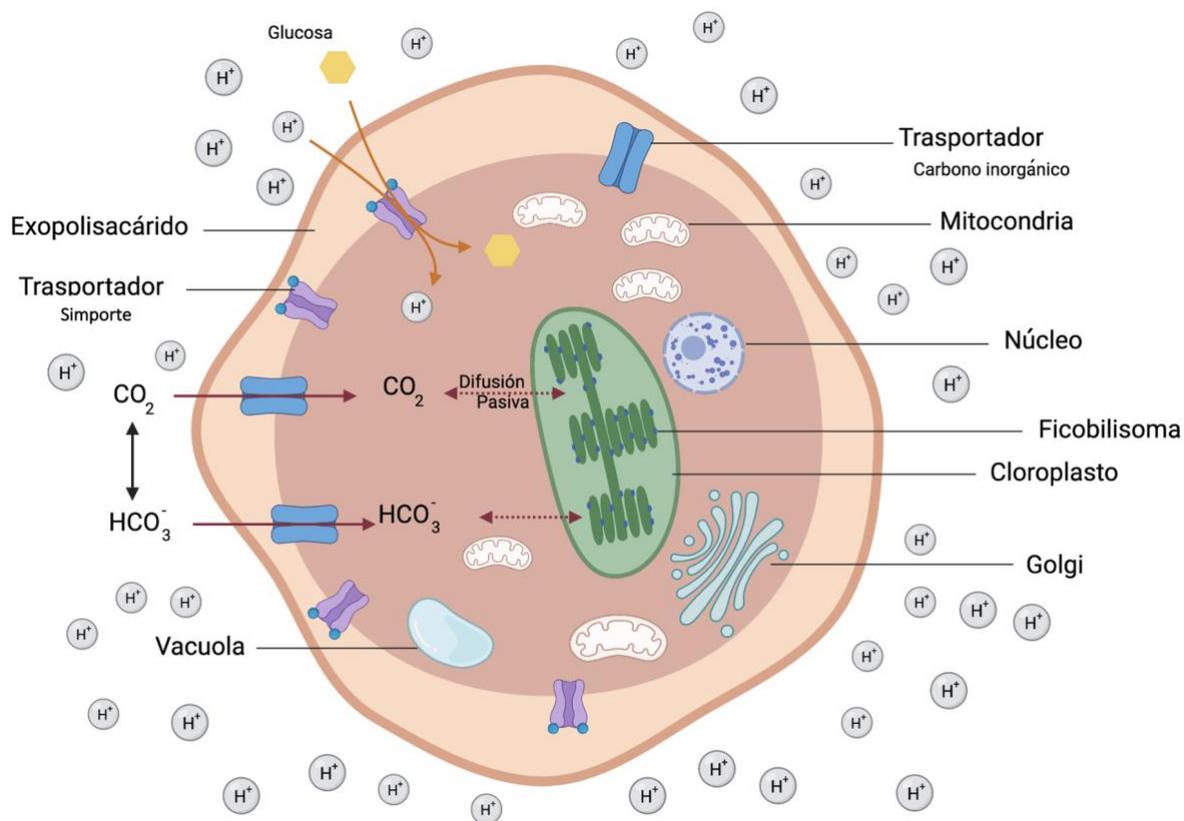
Actualmente la FC más comercializada es la obtenida de la cianobacteria *Arthrospira platensis* (Espirulina); sin embargo, la necesidad por utilizar colorantes naturales ha incrementado la demanda de esta proteína, y debido a esto se buscan nuevas técnicas de producción y fuentes de extracción. Aunque existen diversas microalgas que producen esta proteína [7], la obtención de FC de

la microalga roja *Galdieria sulphuraria* es muy atractiva debido a sus características metabólicas y extremófilas [8].

### *Galdieria sulphuraria*

La microalga *G. sulphuraria* pertenece a la familia *Cyanidiophyceae*, que se encuentra dentro del filo *Rhodophyta* (algas rojas). Estas microalgas tienen la capacidad de crecer en ambientes extremos como lo son las fuentes termales; usualmente asociadas a localidades donde existe actividad volcánica [8]. Estas condiciones derivan en un ambiente hostil para la mayoría de los organismos, como un pH menor a tres y temperaturas por encima de los 40 °C [8]. Las microalgas de la familia *Cyanidiophyceae* pertenecen al filo *Rhodophyta* (algas rojas); que junto con las plantas verdes (*Viridiplantae*), glaucofitas (*Glaucophyta*) y cianobacterias son organismos fotosintéticos [9].

La clase *Cyanidiophyceae* incluye en su mayoría microalgas extremófilas, las cuales se dividen en tres géneros: *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* [10]. De estos tres géneros, el único género capaz de crecer en ausencia de una fuente luminosa es *Galdieria*, esto derivado de su capacidad de metabolizar diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono [11]. Algunas características de este género de algas eucariotas unicelulares incluyen: una morfología esférica, reproducción por medio de endosporas (4-8 endosporas), no presenta pared celular; sin embargo, cuenta con una cubierta de exopolisacáridos [12]. Se ha observado que *G. sulphuraria* cuenta de un solo cloroplasto; no obstante, presenta varias mitocondrias (> 3 por célula; **Fig. 3**), esto difiere de las demás microalgas rojas hasta la fecha reportadas, ya que éstas solo presentan una mitocondria [10,12].



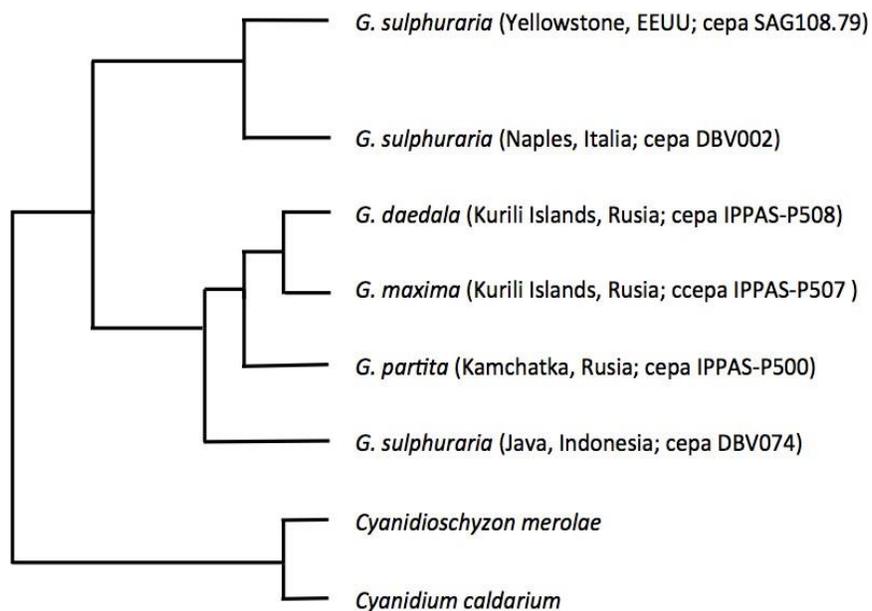
**Figura 3.** Esquema general de la microalga roja *G. sulphuraria* (modificado de Gagnard *et al.*, 2019).

Entre sus características presentan la capacidad de utilizar más de 30 diferentes biomoléculas como fuente de carbono (**Tabla 1**), tales como hexosas, pentosas y polioles entre otros. Cabe mencionar que la caracterización del crecimiento y producción de FC en estas fuentes no ha sido evaluada en su totalidad, ya que únicamente se ha caracterizado su crecimiento con glucosa, glicerol, fructosa y sacarosa.

**Tabla 1.** Fuentes de carbono reportadas como sustratos utilizados por cepas de *Galdieria sulphuraria*

Sustrato	Referencia /cepa	Sustrato	Referencia /cepa	Sustrato	Referencia/cepa
D-Glucosa		L-Fucosa		Dulcitol	<i>G. sulphuraria</i> MBI [11]
D-Manosa		L-Ramnosa		Ribitol	
D-Galactosa		D- Arabinosa		D- Arabinosa	<i>G. sulphuraria</i> 074G [13]
D- Fructosa	<i>G. sulphuraria</i> MBI [11]	D-Sorbitol	<i>G. sulphuraria</i> MBI [11]		[14]
6-Deoxi-glucosa		D-Manitol			
D-Sorbosa		D-Arabitol			
D-Xilosa		L-Arabitol			
D-Ribosa		Xilitol			

Con el objetivo de reforzar la clasificación taxonómica de la clase *Cyanidiophyceae* [15], 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 gen *rbcL* de diferentes microalgas recolectadas en diversas localidades del mundo y 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 (**Fig. 4**) [15].



**Figura 4.** Fenograma donde se representa la relación dentro de la clase Cyanidiophyceae. Modificado de Cozzolino *et al.* (2000) [15].

Debido a las características extremófilas de las microalgas *Cyanidiophyceae*, se ha evaluado la estabilidad térmica de la FC producida de esta clase de microalgas, demostrándose que la estabilidad de la FC se pierde a temperaturas superiores a los 60 °C, mientras que la FC obtenida de *A. platensis* pierde su estabilidad a los 47 °C [16,17]. Así mismo se evaluó la capacidad antioxidante de ambas moléculas y se encontró que su poder antioxidante es similar, por estas razones se concluye que la FC extraída de la microalga *G. sulphuraria* es un producto competitivo en el mercado [18].

### Cultivos de microalgas

El cultivo de microalgas a gran escala es usado para la producción de diversos productos entre los que destacan biomasa, y metabolitos específicos, p. ej. carotenoides, lípidos, ficobiliproteínas, toxinas específicas, entre otros. La producción de estos metabolitos, así como su biomasa, está directamente

relacionada con las condiciones del cultivo, las cuales se pueden clasificar en cuatro tipos [19]:

- i. Fotoautotrofia: Donde la luz se usa como fuente de energía (fotosíntesis) y la fuente de carbono proviene de la asimilación del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).
- ii. 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.
- iii. Mixotrofia: El crecimiento se da tanto por fotosíntesis como por heterotrofia y por lo tanto la fuente de carbono es de origen orgánico e inorgánico.
- iv. 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 orgánico la mayoría de éstas se cultiva en condiciones fotótrofas, utilizando 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 ( $\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ ); derivada de la escasa difusión de luz dentro del cultivo y transferencia de dióxido de carbono, lo que limita el proceso de fotosíntesis. Así mismo los cultivos abiertos están expuestos a contaminaciones, y dado que no es posible controlar la temperatura del cultivo, conlleva a que la productividad de biomasa se vea afectada por las estaciones del año y la localidad geográfica en que se trabaje. Los fotobiorreactores son una alternativa para evitar estos inconvenientes en cultivos bajo autotrofia, ya que en los fotobiorreactores es posible controlar algunas condiciones de cultivo, tales como: la intensidad de luz,

temperatura y pH, además se puede garantizar la esterilidad del medio. Por estas razones, los foto-reactores se emplean preferentemente para la producción de metabolitos dirigidos a las industrias farmacéutica y alimentaria [20]. El mayor inconveniente de los foto-reactores, en comparación con los cultivos abiertos, es su elevado costo de fabricación, debido a que el material debe ser transparente y resistente a químicos abrasivos, además del alto costo de mantenimiento del cultivo ya que es necesario mantener iluminados los reactores durante gran parte del día.

Interesantemente, existen microalgas capaces de crecer en condiciones heterotróficas, ya que estas cuentan con la maquinaria metabólica necesaria para poder translocar la fuente de carbono del medio de cultivo al interior de la célula y posteriormente realizar su catabolismo. El metabolismo heterotrófico de las microalgas se puede llevar a cabo en diferentes compartimientos celulares como lo son: cloroplasto, citoplasma, mitocondria y glioxisomas [4]. En la figura 5 se muestran las principales rutas metabólicas que conllevan a la producción de las moléculas base, las cuales a partir de diversas reacciones enzimáticas convergen en la producción de biomasa. Cabe puntualizar que, aunque las microalgas cuentan con algunas vías metabólicas necesarias para utilizar biomoléculas como fuente de energía, la presencia de transportadores específicos es una de las principales limitantes de este metabolismo; ya que para poder utilizar las fuentes de carbono estas deben atravesar la membrana plasmática [21].



**Tabla 2.** Comparación de velocidades específicas de crecimiento de algunas microalgas evaluadas en cultivos foto-, hetero- y autotróficos (modificado de Lee, 2001 [22] )

Especie	Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )				Referencia	
	Autotrófico	Heterotrófico		Mixotrófico		
		Glucosa	Acetato	Glucosa		Acetato
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.082	0.038		NR	[25]	
	0.11	0.098		0.198	[26]	
	0.8	0.91		0.61	[27]	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0.081	0.05		0.131	[28]	
	NR		0.014			
	0.013		0.009	0.037	[25] [29]	
				0.024		
<i>Scenedesmus acutus</i>	0.061	0.04		0.048	[26]	
<i>Spirulina plantensis</i>	0.028	0.008		0.026	[20]	
<i>Neochloris oleoabundans</i>	-	0.045	-	-	[24]	
<i>Galdieria sulphuraria</i>	0.1	1.1		NR	[30]	

- NR: No se encuentra reportado.

## Crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico de microalgas

Yan y colaboradores (2016) describieron algunas características necesarias para que una microalga pueda crecer en condiciones heterótrofas dentro de un biorreactor:

- i. Capacidad de realizar la división celular y mantener su metabolismo activo en ausencia de luz
- ii. Capacidad para utilizar sustratos orgánicos
- iii. Capacidad para adaptarse a cambios ambientales
- iv. Resistencia a estrés hidromecánico

La mayoría de las microalgas en heterotrofia pueden utilizar diferentes sustratos como fuente de carbono, algunos ejemplos son: azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, entre otros. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que en presencia de glucosa el crecimiento se ve favorecido, ya que se observa un aumento en su velocidad de crecimiento y respiración [25]. Este fenómeno puede explicarse debido a que la glucosa posee un mayor contenido energético ( $2.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) y por lo tanto, en comparación con otros sustratos, se genera más energía mediante el catabolismo de este azúcar; por ejemplo, en comparación con el ácido acético ( $0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [26]. Un ejemplo evidente del bajo requerimiento energético para el catabolismo de la glucosa es su proceso de asimilación oxidativa, el cual se inicia con la fosforilación de la glucosa para formar glucosa-6-P. Esta molécula no solo sirve como almacenamiento de energía, sino también como sustrato clave para la síntesis y el crecimiento de biomasa celular.

Además de las fuentes de carbono (orgánica e inorgánica), en las microalgas la producción de metabolitos y biomasa, aun utilizando la misma cepa, ha demostrado estar ligada a diversos factores ambientales, entre los que destacan el pH, temperatura, edad del cultivo, tamaño del inóculo, fuentes

nutricionales (fuente de nitrógeno, fósforo, etc.), régimen de crecimiento (autotrófico, mixotrófico y heterotrófico), y exposición a la luz (intensidad, longitud de onda, periodos de exposición), por mencionar algunos [4,27,28].

### Producción de FC en la microalga roja *G. sulphuraria*

Los ficobilisomas actúan como antenas accesorias que están estrechamente vinculadas a la presencia de luz. Es común observar que las microalgas que crecen en ausencia de luz no presenten pigmentos accesorios como las ficobiliproteínas y los carotenoides [29].

La producción de FC 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 [13,29,30]. No obstante, la acumulación de FC en cultivos heterotróficos es baja. Gross y Schnarrenberger (1995), observaron que en algunas cepas se puede reprimir la producción de este pigmento en condiciones heterótrofas.

Estos autores evaluaron las cepas de *G. sulphuraria* 074G y 074W, aisladas del mismo nicho ecológico en Indonesia, ambas cepas presentaron el mismo crecimiento 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 [13]. También, es por esto que la mayoría de los trabajos realizados con *G. sulphuraria* para la producción de FC utilizan la cepa 074G [13].

Actualmente no existe información suficiente sobre la síntesis de FC en cepas de *G. sulphuraria*, bajo diferentes condiciones de cultivo; pero se ha demostrado que existen condiciones donde se favorece su acumulación (**Tabla 3**). Esta información ha permitido conocer algunos factores que están directamente relacionados con la producción de FC:

- i. Disponibilidad de nitrógeno: se ha demostrado que un cultivo heterotrófico en inanición por fuente de carbono y con exceso de nitrógeno promueve la acumulación de FC, por lo que este pigmento es considerado un reservorio de nitrógeno [29].
- ii. Intensidad de luz: a baja intensidad ( $< 200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) aumenta la producción de FC, ya que al ser un pigmento accesorio cuando existe una insuficiencia de fotones la microalga genera esta proteína para aprovechar mejor la energía luminosa [29,31].
- iii. Nivel de oxígeno disuelto: durante el crecimiento heterótrofo, bajas concentraciones de oxígeno inhiben a la enzima coproporfirinógeno oxidasa, la cual es necesaria para la producción de los intermediarios en la biosíntesis de clorofila y ficobilinas [32].

**Tabla 3.** Rendimientos de biomasa y FC obtenidos con la microalga *G. sulphuraria* 074G usando diferentes fuentes de carbono y condiciones de cultivo

Cultivo	Temp. (°C)	Fuente de carbono	Vel. crecimiento (días <sup>-1</sup> )	Rendimiento (g <sub>ps</sub> g <sub>azúcar</sub> <sup>-1</sup> )	FC (mg <sub>FC</sub> g <sub>ps</sub> <sup>-1</sup> )	Referencias
Heterotrófico (lote)	42	glucosa	1.1	0.48	3.6	[33]
		fructosa	1.08	0.54	3.4	
		sacarosa	1.01	0.46	4.3	
		melaza de remolacha	1.44	0.42	11.2	
Mixotrófico (lote)	42	glucosa	1.2	0.84	28.1	[29]
		glicerol	1.2	1	20	
Autotrófico (lote)		-	0.1	0.1 g L <sup>-1</sup>	4	
Heterotrófico (alimentado)	42	glucosa	0.6	0.43	26.7	[23]
Heterotrófico (continuo)			0.6	0.52	15.6	
Mixotrófico (2 fases; primera heterotrófica, segunda autotrófica)	40	glucosa	0.51	Productividad de biomasa 103.1 mg <sub>ps</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	320	[30]

-ps: peso seco

### Limitación de la luz como estrategia para la producción de pigmentos

Graverholt y Eriksen (2007) compararon la producción de FC entre una cepa de *A. platensis* y *G. sulphuraria*. Mientras que *A. platensis* se cultivó autotróficamente en cultivos abiertos, *G. sulphuraria* se cultivó 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 cantidad específica de FC en *G. sulphuraria* (16.2 mg<sub>FC</sub> g<sup>-1</sup>) fue menor a la encontrada en la cianobacteria (73.5 mg<sub>FC</sub> g<sup>-1</sup>; cultivo autótrofo), la producción de biomasa fue 13 veces mayor comparada con la producida por *A. platensis* [23]. Estas características hacen de *G. sulphuraria* una candidata potencial para la

producción de FC en condiciones heterótrofas, donde la productividad de la biomasa es al menos un orden de magnitud mayor en comparación con *A. platensis*. Sin embargo, las células de cultivos heterótrofos de *G. sulphuraria* presentan una baja concentración de FC ya que este compuesto es foto-dependiente [30].

Una estrategia utilizada para aumentar la producción de pigmentos en microalgas capaces de crecer en heterotrofia con altos rendimientos es el uso de cultivos en dos fases, en las cuales cada fase tiene un objetivo específico. En la primera fase, las condiciones de cultivo se diseñan para lograr una alta concentración de biomasa mediante el crecimiento heterótrofo. En la segunda fase, las microalgas se someten a condiciones autotróficas, donde se exponen a la luz y/o se inducen condiciones de estrés celular. Esto provoca un aumento en la producción de pigmentos debido a respuestas adaptativas de las microalgas [30,34,35].

La luz presenta los efectos más importantes en la producción de pigmentos en las microalgas [36], ya que la mayoría de los pigmentos se utilizan como colectores de energía para realizar la fotosíntesis. Por lo tanto, las estrategias de limitación de la luz, como bajas intensidades, tiempos cortos de exposición y el efecto de sombreado, conducen a cambios en la acumulación de pigmentos. Los tiempos cortos de exposición a la luz o la baja intensidad de la luz conllevan a una baja disponibilidad de energía; por lo tanto, las células se ven obligadas a aumentar la cantidad de antenas o pigmentos accesorios con el fin de incrementar la captura de fotones, siendo la clorofila y las ficobiliproteínas los pigmentos más influenciados por la baja exposición a la luz [29,37]. Por otro lado, el efecto de sombreado también genera una limitación a la luz, debido a que una alta concentración celular en los cultivos impide el paso de la luz y por lo tanto la intensidad

luminosa promedio que reciben las células se encuentra limitada, lo que afecta el crecimiento celular y la producción de pigmentos [38,39]

### Biomasa lignocelulósica como fuente de carbono

Una estrategia prometedora para la producción de pigmentos en microalgas es combinar la limitación de la luz con el uso de biomasa lignocelulósica como fuente de carbono. La limitación de la luz puede promover la acumulación de pigmentos, ya que las microalgas responden a la falta de luz aumentando la producción de pigmentos para maximizar la captación de energía. Además, el uso de biomasa lignocelulósica como fuente de carbono no solo puede ayudar a reducir los costos de producción, sino que también proporciona una alternativa sostenible y renovable.

Una de las características reportadas para la microalga *G. sulphuraria*, es su potencial capacidad para utilizar diferentes fuentes de carbono en su crecimiento, esta característica ha sido evaluada a nivel cuantitativo con pocas fuentes de carbono, específicamente, glucosa, fructosa y glicerol. Por lo cual parte de este proyecto se centra en utilizar hidrolizados de residuos agroindustriales (materiales lignocelulósicos) como lo es el rastrojo de maíz, para evaluar el crecimiento, generación de macromoléculas y producción de FC utilizando la cepa 2919 de *G. sulphuraria*, y como fuente de carbono glucosa, xilosa, mezclas de glucosa – xilosa y jarabes de azúcares obtenidos de hidrolizados termoquímicos y enzimáticos del rastrojo de maíz.

Los materiales lignocelulósicos están constituidos mayoritariamente de paredes celulares de plantas, las cuales se encuentran formadas principalmente por celulosa (38-50%), hemicelulosa (23-32%) y lignina (10-25%) [40]. La celulosa es una molécula lineal de tamaño variable

formada por moléculas de  $\beta$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídicos, estas moléculas al unirse mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals forman una estructura cristalina resistente a la hidrólisis química y enzimática [41]. Por otro lado, la hemicelulosa es un heteropolisacárido no lineal formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3, además contiene grupos acetilo formando parte de la estructura del polímero. Finalmente, la lignina es un heteropolímero amorfo y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que da soporte a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa). Además, la lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica [42].

Ya que los materiales lignocelulósicos son recalcitrantes a hidrólisis química y biológica, para poder realizar la hidrólisis de estos compuestos, y así obtener carbohidratos simples, se realizan tratamientos de hidrólisis ácida a temperaturas elevadas; lo cual genera un debilitamiento de las estructuras celulósicas y la concomitante hidrólisis de una fracción importante de la hemicelulosa. Se ha demostrado que utilizando estos pretratamientos se logra la liberación de mezclas de carbohidratos simples como: xilosa, mayoritariamente, y en menor proporción glucosa, arabinosa, manosa, y galactosa [43]. Posterior a este tratamiento es posible realizar una sacarificación enzimática del residuo sólido para liberar los glucanos que no fueron liberados en el tratamiento termoquímico lo cual genera un jarabe enriquecido en glucosa.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en el conocimiento sobre consumo de diferentes fuentes de carbono por parte de la microalga *G. sulphuraria*, actualmente no existen estudios sistemáticos acerca del uso de otras fuentes como xilosa, mezclas de xilosa-glucosa e hidrolizados de maíz, y su impacto en la acumulación de FC. Asimismo, no se ha explorado el efecto de la limitación de luz en la acumulación de dicho pigmento. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar el potencial de la xilosa, las mezclas de xilosa y glucosa, así como de hidrolizados de los polímeros de monosacáridos del rastrojo de maíz como fuentes de carbono para el crecimiento de *G. sulphuraria* y la acumulación de FC.

La influencia crucial de la luz en la producción de ficocianina es un conocimiento previo en este campo de estudio. Con el propósito de aumentar la concentración de este pigmento, se evaluaron condiciones que limitaban la disponibilidad de luz, tales como el uso de fotoperiodos, la baja intensidad lumínica y la alta concentración celular.

## HIPÓTESIS

Los jarabes provenientes de la hidrólisis termoquímica y enzimática del rastrojo de maíz (fuente de carbono rica en xilosa y glucosa) pueden ser utilizados como fuente de carbono por la microalga *Galdieria sulphuraria* 2919 y se pueden obtener velocidades parámetros de crecimiento y acumulación de FC comparables al utilizar glucosa o xilosa. Considerando que el azúcar xilosa es uno de los principales componentes de los jarabes derivados de la hidrólisis de la lignocelulosa, se plantea que esta puede ser empleada como fuente de carbono en los cultivos de la microalga *Galderia sulphuraria* 2919. Sin embargo, se espera que los rendimientos de crecimiento de la microalga y la acumulación de FC varíen significativamente en comparación con el uso de glucosa debido a las diferencias en el metabolismo de estos azúcares.

La manipulación de variables de luz, como los fotoperiodos, la baja intensidad de luz y el incremento en la concentración inicial de biomasa resultará en un aumento en la acumulación de FC en la microalga roja *G. sulphuraria* 2919.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilización de xilosa, mezclas xilosa-glucosa y de los hidrolizados del rastrojo de maíz como fuentes de carbono para la producción de FC en cultivos hetero- y mixotróficos con la microalga roja *G. sulphuraria* 2919 y evaluar diferentes técnicas que limitan el acceso a la luz con el fin de aumentar la acumulación de FC en autotrofia.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la utilización de xilosa como fuente de carbono y su efecto en la producción de FC en cultivos hetero- y mixotróficos.
- Estudiar la producción de FC y biomasa utilizando jarabes provenientes de la hidrólisis de la fracción hemicelulósica y celulósica del rastrojo de maíz como fuente de carbono.
- Evaluar la acumulación de FC bajo condiciones que limitan la exposición a la luz, tales como fotoperiodos controlados, bajas intensidades de luz y alta concentración de biomasa en cultivos autotróficos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa y medio de cultivo

Para este estudio se utilizó la microalga roja *Galdieria sulphuraria* 2919 (UTEX), la cual fue obtenida de la colección de algas de la Universidad de Austin, Texas [17]. El mantenimiento de la cepa se realizó mediante cultivos autotróficos con una intensidad de luz constante de  $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH inicial de 2 y temperatura de  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  [29] en matraces de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo mineral ( $11.4 \text{ mM } (\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $1.22 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $2.2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.14 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $0.34 \text{ mM NaCl}$ ,  $68.1 \mu\text{M FeSO}_4$ ,  $47.7 \mu\text{M EDTA}$ ,  $92.5 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ ,  $18.4 \mu\text{M MnCl}_2$ ,  $1.5 \mu\text{M ZnSO}_4$ ,  $0.4 \mu\text{M NaVO}_3$  y  $0.3 \mu\text{M CoCl}$ ) fue ajustado a un pH de 2 utilizando ácido sulfúrico 1 N [13]. La fuente de carbono orgánica se esterilizó de forma independiente.

### Cultivos en lote

Los cultivos (heterótrofos, mixotróficos y autótrofos) se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer “bafleados” de 500 ó 250 mL con un volumen de trabajo de 300 ó 150 mL, respectivamente, pH inicial de 2,  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  y 200 rpm. Los cultivos autótrofos y mixotróficos se realizaron en presencia de luz constante a una intensidad luminosa de  $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (al menos que se indique lo contrario). Mientras que, para los cultivos heterótrofos los matraces fueron forrados con papel aluminio y envueltos en cinta adhesiva con el fin de evitar la iluminación a las microalgas. El pre-inóculo se tomó a partir de cultivos con 1 gramo de peso seco de biomasa sobre litro de cultivo ( $1 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ ) en condiciones autótrofas. Los cultivos utilizados para inóculos se realizaron en la fuente de carbono orgánica a evaluar en una concentración inicial de  $10 \text{ g}_{\text{AZÚCAR}} \text{ L}^{-1}$ , y el inóculo se tomó cuando los cultivos se

encontraban al final de la fase exponencial (aproximadamente 4 días de cultivo).

Los cultivos sometidos a fotoperiodos controlados se realizaron en dos incubadoras, una iluminada ( $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a menos que se indique lo contrario) y una en obscuridad a una temperatura de  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  y agitación de 200 rpm. Los cultivos en biorreactor se realizaron en jarras de vidrio de 5 L con un volumen de trabajo de 3 L, con agitación inicial de 400 rpm, 1 vvm (volumen de aire volumen de medio por minuto<sup>-1</sup>) y a pH constante de 2, el cual fue controlado con KOH (4N), la evaluación de oxígeno disuelto se realizó mediante un electrodo, y su control durante el cultivo se realizó modificando la agitación (300-450 rpm).

### Hidrólisis termoquímica y enzimática del rastrojo de maíz

El rastrojo de maíz se procesó según lo reportado por Vargas-Tah *et al.* (2015), para esto el rastrojo se molió y tamizó en una malla de 20 f (abertura de malla 0.841 mm). Posteriormente 3.14 g de peso seco de esta biomasa se colocó en frascos Schott Duran (Karter Scientific) de 100 mL con 16.86 g de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% (para tener una concentración de 15% p p<sup>-1</sup>); la reacción de hidrólisis termoquímica se llevó a cabo a  $129 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 8 minutos utilizando una autoclave (Felisa FE-399, Guadalajara Jalisco, México). El jarabe resultado de la hidrólisis de la hemicelulosa se ajustó a pH 2 utilizando carbonato de calcio en polvo, mientras que los sólidos restantes fueron recolectados y lavados con agua destilada para su subsecuente sacarificación. Para la sacarificación se agregaron 20 g de estos sólidos secos y se llevó a 200 mL con 50 mM de citrato de sodio pH 5; a esta solución se agregaron 15 unidades de papel filtro(FPU)  $\text{g}_{\text{glucano}}^{-1}$  de un cóctel enzimático de celulasas (NS22086, Novozymes) y se realizó la liberación de glucosa durante 24 h a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y 150

rpm, el jarabe obtenido de la hidrólisis de la celulosa se ajustó a pH 2 con ácido sulfúrico para su posterior utilización en los cultivos con *G. sulphuraria* 2919.

## Métodos analíticos

La concentración de biomasa se obtuvo mediante una correlación entre absorbancia ( $DO_{800}$ ) y una curva de peso seco. Para la realización de esta curva se centrifugaron diferentes concentraciones de biomasa a 13,000 rpm (Eppendorf centrifuge 5410, Alemania); el pellet obtenido se secó a 60 °C (en horno portátil) hasta alcanzar un peso contante. La pendiente de la relación absorbancia vs peso seco (ps) fue de 0.8708  $DO_{800nm} \text{ g}_{ps}^{-1}$  con un  $R^2$  de 0.946.

Los monosacáridos consumidos se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC; Waters, Millipore, Milford, MA), equipado con una columna de exclusión iónica HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA) y usando una fase móvil de  $H_2SO_4$  (5mM) con un flujo de  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$  a 60 °C. Así mismo, la glucosa se determinó con un analizador bioquímico (YSI model 2700, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA).

La extracción y cuantificación de lípidos, carbohidratos y proteínas se realizó a partir de una muestra de biomasa liofilizada. Para la cuantificación de lípidos se realizó una variante de la extracción reportada por Folch (1957). A 50 mg de biomasa seca se agregaron 6 mL de una mezcla cloroformo:metanol 2:1, posteriormente la muestra fue incubada con sonicación para mejorar la ruptura de las células (sonicador, Branson Model B200 Ultrasonic, USA) durante una hora a temperatura ambiente (25° C), una vez terminado el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a 10,000 rpm (Eppendorf centrifuge 5410, Alemania). Al sobrenadante obtenido se le agregaron 2 mL de una solución de cloruro de sodio

(10 g L<sup>-1</sup>), provocando la separación de fases. Los lípidos fueron cuantificados por gravimetría (balanza OHAUS, USA) después de que se evaporara la fase orgánica.

Para la determinación de carbohidratos, a 50 mg de biomasa liofilizada se agregaron 500 µL de ácido sulfúrico al 72%, las muestras se incubaron a 30 °C en baño maría durante una hora, agitando cada 5 minutos en vortex. Posteriormente se agregaron 14 mL de agua destilada para llegar a una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4% y las muestras resultantes fueron tratadas térmicamente en autoclave a 121 °C durante una hora. Se realizó la neutralización (pH 7) de las muestras con carbonato de calcio en polvo y el sobrenadante fue caracterizado mediante HPLC [43], utilizando como estándares los monosacáridos de glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa, además de ácido acético. El análisis de proteínas se llevó a cabo utilizando 5 mg de biomasa liofilizada, la cual se trató con ácido tricloroacético (TCA; 24% p v<sup>-1</sup>) a 90 °C por 15 min [44]. Tras la hidrólisis, se realizó la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Folin y utilizando albúmina de suero bovino como referencia [45].

La determinación de FC, a partir de biomasa húmeda, se realizó centrifugando a 3400 rpm (VELAB, México). La muestra obtenida (aprox. 30 mg<sub>ps</sub>), fue lavada con amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7). La muestra fue congelada utilizando nitrógeno líquido y posteriormente se realizó una ruptura mecánica utilizando mortero y pistilo. Posteriormente se realizó una segunda ruptura mecánica con 100 µL de perlas de vidrio (450 - 500 micrones) en tubos cónicos de 1.5 mL y agitación en vórtex (Daigger Scientific vortex mixer Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) durante 1 min. Para las muestras liofilizadas, a 10 mg de biomasa se agregó 1 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7) y 0.1 mL de perlas de vidrio, posteriormente se agitaron en vórtex durante 1 min a máxima velocidad. Después de la ruptura mecánica todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 horas en agitación a 300 rpm y la FC se cuantificó mediante espectrofotometría en el sobrenadante (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer,

Thermo Scientific™, MA, USA) según Moon *et al.* [17] (**ecuación 1**). Por otro lado, la cuantificación de FC en células completas se realizó por espectrofotometría de acuerdo a lo reportado por Nagarajan *et al.* [46] (**ecuación 2**), la muestra tomada directamente del cultivo se diluyó hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 a 800 nm.

$$[A_{620} - 0.474(A_{652})](5.34^{-1}) = mg_{FC} mL^{-1} \quad \text{ecuación 1}$$

$$139(A_{620} - A_{800}) - 0.0355(A_{678} - A_{800}) = mg_{FC} mL^{-1} \quad \text{ecuación 2}$$

Los experimentos y análisis se llevaron a cabo en triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Los valores promedio y su desviación estándar se presentan en los gráficos y tablas correspondientes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con un nivel de significancia establecido en  $p = 0.05$  para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los factores evaluados. Este análisis permitió identificar posibles variaciones significativas en los datos obtenidos.

### Predicción de la estructura del transportador de azúcar de *G. sulphuraria*

Para construir el modelo teórico, primero se alineó la secuencia de aminoácidos del transportador de azúcares de la microalga *G. sulphuraria* 074W con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), solicitando se buscara una secuencia aminoacídica con alta identidad en las secuencias y cobertura.

Posteriormente se realizó una búsqueda en la base de datos *Protein Data Bank* a abreviado: PDB [47], empleando la herramienta *Blastp* de NCBI, en donde se identificaron las *plantillas (templates)* que podrían ser utilizadas para la generación de un modelo tridimensional basado en la secuencia aminoacídica del

transportador.

El alineamiento de secuencias y la identificación de posibles *plantillas*, permitió identificar al transportador de azúcares de planta *Arabidopsis thaliana* STP10 [48] como posible candidato para la construcción del modelo tridimensional. Esta *plantilla* fue seleccionada con base en los parámetros establecidos por el módulo *Blastp*, los cuales demostraron que esta plantilla poseía la capacidad de representar la mayor parte de la secuencia de interés (cobertura), también de presentar una nula probabilidad de haber sido seleccionado de forma azarosa (valor  $E = 0.00$ ) y, con similitud en la composición aminoacídica (ID) de 47%.

Con base en la identificación de la *plantilla* se evaluaron las técnicas de modelado comparativo de macromoléculas para la predicción de la estructura terciaria, abordando de forma particular el modelado por homología, dada la alta similitud secuencial entre la secuencia de interés y la plantilla identificada ( $40\% < ID < 90\%$ ). Se decidió implementar la técnica de modelado por homología usando el servidor Swiss-Model. Para la generación del modelo tridimensional final, se seleccionó al mejor modelo generado, de acuerdo a los resultados de validación obtenidos con el servidor *PROCHECK* [49]

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sección I: Evaluación del crecimiento y contenido de FC en *Galdieria sulphuraria* 2919 utilizando glucosa y xilosa en condiciones hetero- y mixotróficas.

*G. sulphuraria* 2919 utiliza la glucosa eficientemente en condiciones heterótrofas y mixotróficas.

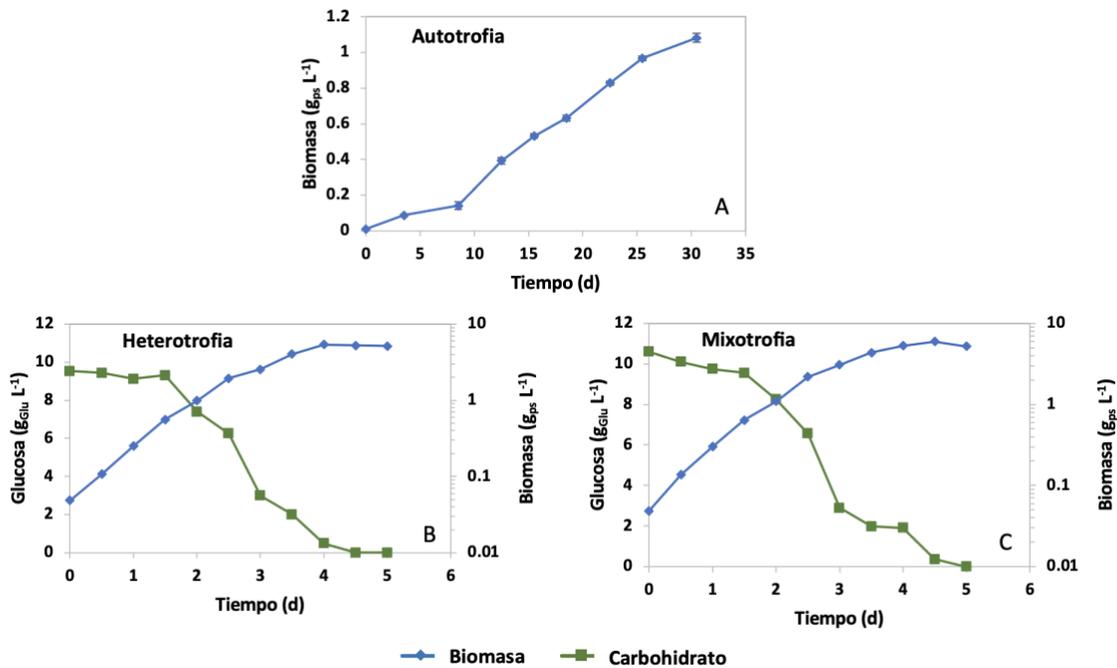
El principal objetivo de esta sección del estudio fue utilizar el hidrolizado de la fracción hemicelulósica y celulósica del rastrojo de maíz como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal y evaluar el efecto en la producción de FC utilizando la microalga *G. sulphuraria* 2919. Dado que este material lignocelulósico está principalmente conformado por los monosacáridos glucosa y xilosa, se decidió realizar la caracterización del crecimiento de la microalga utilizando glucosa, xilosa y una mezcla xilosa-glucosa como fuente de carbono en cultivos hetero- y mixotróficos.

En la actualidad, se han documentado varios estudios que investigan el uso de la glucosa como fuente de carbono en la microalga *G. sulphuraria* [13,29]. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado investigaciones que utilicen la xilosa como fuente de carbono, ni tampoco se han evaluado mezclas de xilosa y glucosa, para analizar su efecto en el crecimiento, la composición macromolecular y la acumulación de ficocianina (FC) en esta microalga. Además, no se han realizado estudios en condiciones mixo- o heretróficas usando la cepa UTEX 2919. Por lo que este estudio permitió comparar los resultados de crecimiento y acumulación de FC con las cepas previamente evaluadas.

En primera instancia, se comparó el crecimiento hetero-, mixo- y autotrófico de *G. sulphuraria* 2919 utilizando glucosa ( $10 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ ) y  $\text{CO}_2$  atmosférico (400 ppm) como fuente de carbono orgánico e inorgánico,

respectivamente. Las cinéticas obtenidas en autotrofia mostraron un crecimiento lineal, con un tiempo de duplicación celular de 10.5 días (**Fig. 6A**). Este crecimiento con tendencia lineal es característico de los cultivos autótrofos [50]; en comparación con los cultivos heterotróficos (**Fig. 6B y C**), donde por lo general se observa un crecimiento exponencial. Esta reportado que esta tendencia lineal en cultivos autotróficos puede afectarse si los cultivos de microalgas se complementan con una fuente externa de carbono inorgánico, tal como se describe para los cultivos de *G. sulphuraria* suplementados con una corriente gaseosa conteniendo 2% de CO<sub>2</sub> [28].

Bajo condiciones heterotróficas y mixotróficas, se observó un crecimiento exponencial de la microalga, con un tiempo de duplicación de 0.5 días, y el cultivo alcanzó la fase estacionaria una vez que la glucosa se agotó (**Fig. 6B y 6C**). En contraste, en el cultivo autotrófico, no se observó una fase estacionaria en un período de 30 días, lo que indica que las células continúan creciendo al no existir un nutriente limitante en el medio. Al comparar los parámetros estequiométricos y cinéticos de los cultivos en condiciones heterotróficas y mixotróficas utilizando glucosa, se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), productividad volumétrica de la biomasa ( $Q_p$ ), rendimiento de masa celular en el azúcar consumido ( $Y_{x/s}$ ) y la tasa específica de consumo de glucosa ( $q_s$ ) (**Tabla 4**). Cabe destacar que los valores de crecimiento específico en heterotrófica y mixotrofia son similares a los reportados para la cepa 074G de *G. sulphuraria* ( $\mu$  1.2 d<sup>-1</sup>) cultivada en heterotrofia con glucosa como fuente de carbono [29].



**Figura 6.** Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa de la microalga *G. sulphuraria* 2919 en: A) autotrofia, B) heterotrofia y C) mixotrofia; utilizando glucosa (10 g<sub>glu</sub> L<sup>-1</sup>) para B y C. Condiciones de cultivo: pH 2, 42°C, 200 rpm, 140 mM fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> los cultivos heterotróficos se realizaron en ausencia de iluminación), volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL.

El uso de glucosa como fuente de carbono permitió incrementar la productividad de biomasa, ya que esta aumentó 21 veces en comparación con el cultivo autótrofo (0.038 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). La productividad y biomasa final en las microalgas con metabolismo heterotrófico generalmente son bajas, siendo equiparables a las obtenidas bajo condiciones autotróficas, tal es el caso con: *Botryococcus braunii* [51], *Isochrysis galbana* [52], *Nostoc flagelliforme* [53], *Scenedesmus obliquus* [54], *Desmodesmus* sp. [55], entre otras.

Así mismo, se ha observado que el crecimiento de ciertas microalgas en condiciones mixotróficas exhibe velocidades específicas de crecimiento similares a la suma de las velocidades obtenidas en condiciones heterotróficas y autotróficas. Esta relación se puede representar comúnmente mediante la

siguiente ecuación:  $\frac{\mu M}{\mu H + \mu A} = 1$  [23, 53]. No obstante, los resultados obtenidos muestran un  $\mu$ , rendimiento y productividad de biomasa, similar en condiciones hetero- y mixotróficas (**Tabla 4**), probablemente debido a que en los cultivos heterotróficos se obtuvo un crecimiento un orden de magnitud mayor en comparación con los autotróficos, por lo que el aporte derivado de la fotosíntesis no fue estadísticamente significativo para la cepa 2919 en las condiciones evaluadas.

**Tabla 4.** Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de *G. sulphuraria* 2919 utilizando glucosa o xilosa en condiciones heterotróficas y mixotróficas

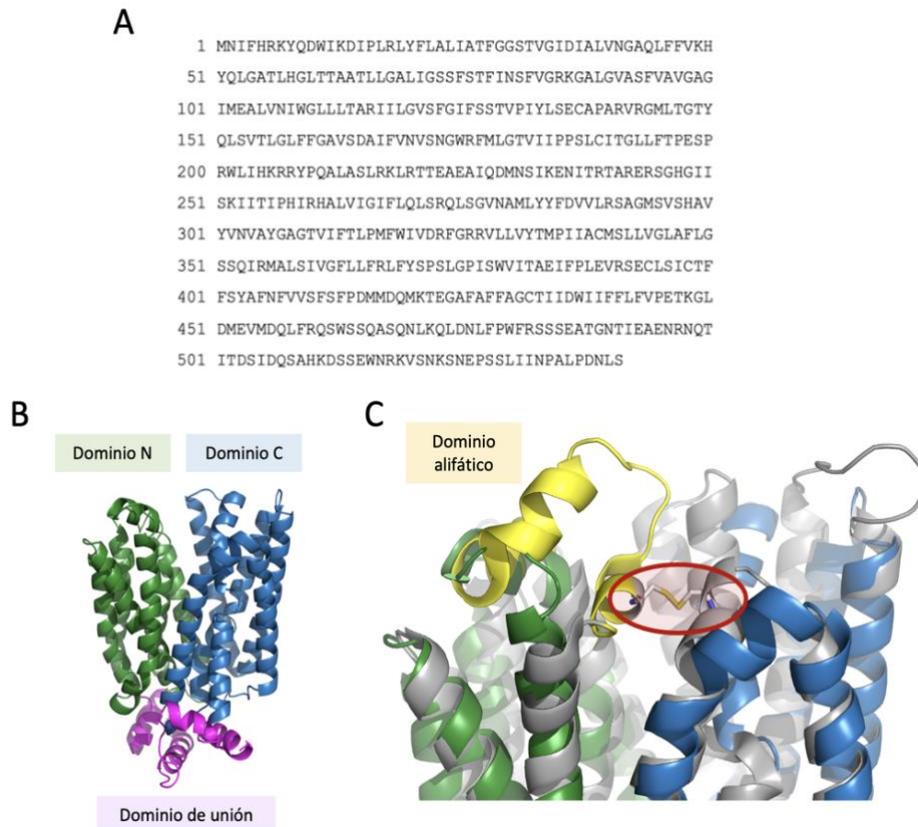
	Glucosa		Xilosa	
	Heterotrófico	Mixotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	1.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.08 <sup>b</sup>
$Y_{x/s}$ (g <sub>ps</sub> g <sub>Azúcar</sub> <sup>-1</sup> )	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>c</sup>
$q_s$ (g <sub>Azúcar</sub> g <sub>ps</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	2.45 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.16 <sup>a</sup>
$Q_p$ (g <sub>ps</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1.35 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.05 <sup>b</sup>

\* ANOVA unidireccional (p = 0,05); letras iguales = sin diferencia entre medias.

Los parámetros cinéticos obtenidos en condiciones heterotróficas mostraron un  $\mu$  de 1.46 ± 0.03 d<sup>-1</sup> y una  $Q_p$  de 1.35 ± 0.05 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Estos valores son mayores en comparación con los reportados para otras microalgas como *Chlorella* y *Neochloris oleoabundans*, que son conocidas por su alta productividad de biomasa. Éstas se encuentran dentro de las cepas reportadas con mayor productividad de biomasa, y en condiciones heterótroficas presentan un incremento equivalente al 300% en comparación con cultivos autótrofos (0.3 - 0.9 d<sup>-1</sup> y 0.2 - 0.6 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) [4,58,59]. Incluso, los valores obtenidos en este estudio son superiores a los reportados para la cepa *G. sulphuraria* 074G ( $\mu$  de 1.2 d<sup>-1</sup>) [29], que es una de las cepas más estudiadas de *Galdieria* y fue cultivada bajo las mismas condiciones de trabajo.

Debido a la inusual capacidad que presenta *G. sulphuraria* 2919 de alcanzar productividades de biomasa por encima de las microalgas reportadas bajo condiciones heterotróficas, y aunado a que la tasa de crecimiento en condiciones heterótroficas es 21 veces mayor que en el crecimiento autótrofo; se plantea la hipótesis de que esta cepa tiene una capacidad excepcional para transportar y metabolizar la glucosa. Por esta razón se decidió llevar a cabo un estudio para analizar el transportador de glucosa presente en *G. sulphuraria*, para esto se realizó una búsqueda mediante similitud de secuencia de transportadores de glucosa descritos y caracterizados en el género *Chlorella*, específicamente la proteína HUP1; como resultado se obtuvo una proteína putativa la cual se encuentra presente en el genoma de la cepa *G. sulphuraria* 074W y la cual se identificó como HUP1\_Gs con el número de acceso XP\_005707000.1 (**Fig. 7A**). Una vez determinada la secuencia proteínica se realizó un modelado por homología de esta proteína utilizando como “templado” la estructura cristalográfica del transportador simport de glucosa (STP10) presente en la planta *Arabidopsis thaliana* [48].

El modelo de la proteína HUP1<sub>Gs</sub> de *G. sulphuraria* reveló la presencia de 12 hélices transmembranales (M1-M12), las cuales están divididas en los dominios N y C y se conectan mediante un dominio de unión helicoidal (**Fig. 7B**). Esta organización estructural se encuentra conservada en una superfamilia de transportadores de azúcar [60]. Sin embargo, se observó que la proteína HUP1<sub>Gs</sub> carece de un dominio “Lid” compuesto por aminoácidos aromáticos, así como de un par de residuos de cisteína que forman un puente disulfuro entre los dominios N y C (**Fig. 7C**). Es importante mencionar que estos elementos se encuentran altamente conservados en los transportadores de diversos mono- y disacáridos [61].



**Figura 7.** Proteína transportadora de azúcar simport de *G. sulphuraria* 2919 (HUP1Gs). A) Secuencia de la proteína HUP1Gs, B) Modelo del transportador, C) Superposición del modelo HUP1Gs y del transportador STP10 (*A. thaliana*), mostrando el dominio alifático “Lid”.

Los transportadores tipo simport translocan dos moléculas simultáneamente (azúcar y  $H^+$ ), por lo que requieren de protones disponibles para internalizarlos [62]. Normalmente, los organismos que presentan estos transportadores crecen a pH cercano a 7, donde la concentración de protones es baja. Para contrarrestar este efecto, los transportadores cuentan con un dominio denominado “Lid” (**Fig. 7C**), el cual está ausente en la proteína HUP1<sub>Gs</sub>. Este dominio tiene como función aislar el protón dentro de la proteína para ser importado del medio externo en conjunto con la glucosa; además, los transportadores presentan un par de cisteínas las cuales forman un puente

disulfuro entre los dominios N y C que estabiliza estos dominios y permite que el dominio "Lid" pueda aislar el protón dentro del transportador.

Estudios en el transportador STP10 de *A. thaliana* mostraron, mediante mutagénesis de estos residuos cisteína, que al intercambiar los residuos cisteína por alanina su actividad disminuía a pH de 7; sin embargo, esta actividad se recuperó cuando se trabajó a pH 4 [61]. Esto indica que la disponibilidad de protones es un factor limitante en el transporte de azúcares, y que en presencia de una alta concentración de protones, el puente disulfuro y el dominio "Lid" no son necesarios. Con base en esto se sugiere que la alta tasa de crecimiento observada en este trabajo puede asociarse a la actividad del transportador HUP1<sub>Gs</sub>, que al transportar el protón del medio extracelular (pH 2; alta concentración de protones) al interior de la célula (pH 7) hace al proceso muy eficiente en comparación con las microalgas que habitan en pH cercanos a 7 [11]. Los resultados también sugieren que esta ventaja se combina con un catabolismo eficaz de la glucosa.

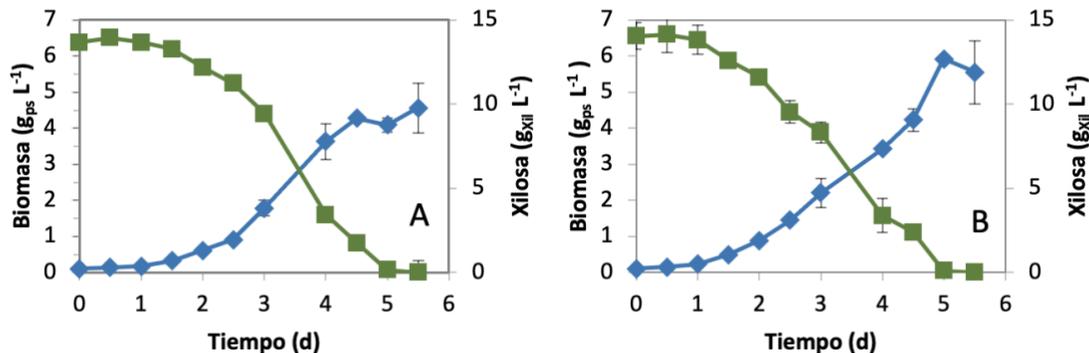
### La xilosa es metabolizada eficientemente por *G. sulphuraria* 2919

Una vez finalizado el estudio del cultivo de control utilizando glucosa, se procedió a evaluar el uso de la xilosa ( $14_{xil} \text{ g L}^{-1}$ ) como fuente de carbono para el crecimiento celular de la cepa 2919 en condiciones hetero- y mixotróficas (**Fig. 8**). Los resultados mostraron que esta cepa es capaz de metabolizar xilosa con una  $\mu$  de 0.97 y  $1.10 \text{ d}^{-1}$ , y un rendimiento de 0.36 y  $0.43 \text{ g}_{ps} \text{ g}_{xilosa}^{-1}$  en condiciones hetero- y mixotróficas, respectivamente (**Tabla 4**). El tiempo de duplicación en heterotrofia fue de 0.71 d; el cual es 16.6 veces menor al reportado por Oesterhelt *et al.* (1999), quienes, al evaluar diferentes fuentes de carbono, determinaron que el tiempo de duplicación de la cepa de *G. sulphuraria* MBI es de  $11.8 \text{ d}^{-1}$  utilizando xilosa ( $25 \text{ mM}$ ;  $3.8 \text{ g L}^{-1}$ ) [11]. Estos resultados también indican que el

metabolismo de la xilosa, y posiblemente de otras fuentes de carbono, varía entre las diferentes cepas de *G. sulphuraria*.

Los resultados obtenidos mostraron que *G. sulphuraria* 2919 presenta un mejor aprovechamiento de la glucosa en comparación con la xilosa, esto se evidencia en una tasa de crecimiento más alta, así como en una productividad volumétrica y un rendimiento de biomasa superiores, al utilizar glucosa (42% y 66%, respectivamente). No obstante, las tasas de consumo de sustrato específico ( $q_s$ ) fueron similares para ambos azúcares (2.5 y 2.7  $\text{g}_{\text{Azúcar}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1} \text{d}^{-1}$  para glucosa y xilosa, respectivamente); lo cual indica que las diferencias observadas en las tasas de crecimiento y los rendimientos de biomasa no están relacionadas con la velocidad específica de consumo de los azúcares, sino al metabolismo de estos monosacáridos, por lo que el aprovechamiento de glucosa es superior al de la xilosa.

Es importante destacar que, aunque los valores de los parámetros obtenidos con xilosa en la cepa 2919 son menores en comparación con los obtenidos con glucosa, siguen siendo significativamente altos. Estos valores son comparables e incluso superiores a los reportados en otras microalgas que utilizan glucosa como fuente de carbono [4,58,59]. Esto indica que *G. sulphuraria* 2919 tiene la capacidad de aprovechar eficientemente la xilosa como fuente de carbono, aunque su desempeño sea inferior en comparación con la glucosa.

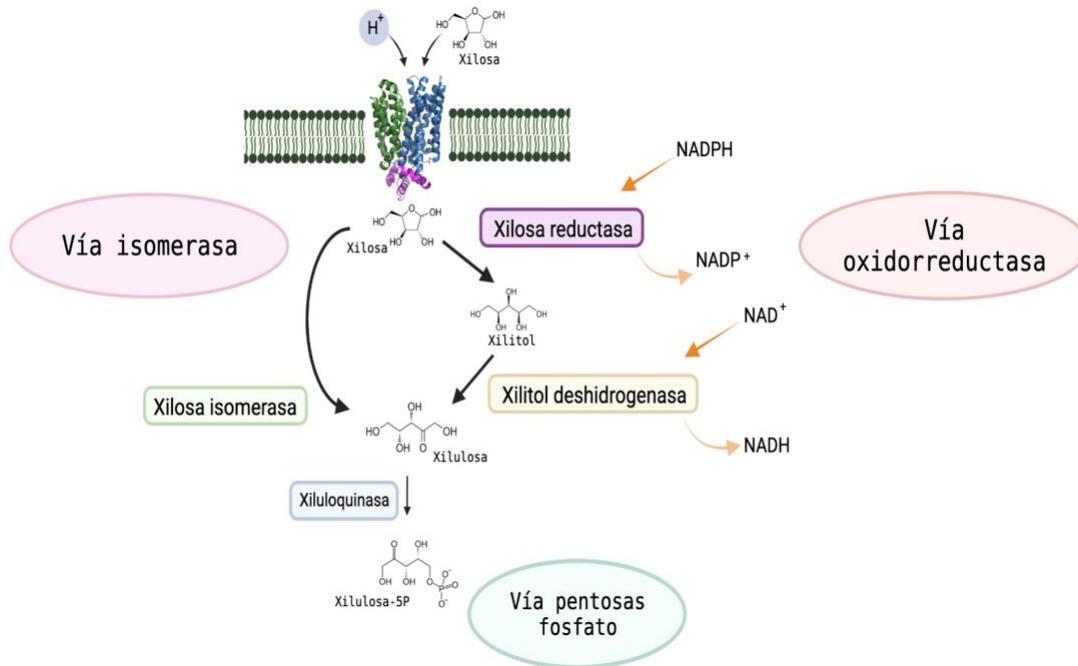


**Figura 8.** Cinéticas de crecimiento en condiciones: A) heterotróficas y B) mixotróficas utilizando xilosa ( $14 \text{ g}_{\text{xil}} \text{ L}^{-1}$ ). Condiciones de cultivo: pH 2,  $42^\circ\text{C}$ , 200 rpm,  $140 \text{ mM fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (los cultivos heterotróficos se realizaron en ausencia de iluminación), volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL.

Finalmente, se realizó la comparación entre el crecimiento de la cepa 2919 utilizando xilosa en condiciones hetero- y mixotróficas. Esta comparación mostró que contrario a los resultados con glucosa; el  $Q_p$  y el  $Y_{x/s}$  obtenidos en cultivos mixotróficos con xilosa presentaron un aumento del 20% en comparación con los cultivos heterótrofos con xilosa. Este hallazgo sugiere que la presencia de luz tuvo un efecto significativo en el crecimiento de *G. sulphuraria* 2919 cuando metaboliza xilosa. Este efecto podría explicarse como consecuencia a la generación de NADPH, ya que el primer paso para metabolizar la xilosa es su isomerización a xilulosa, la cual entra a la vía de las pentosas para ser metabolizada.

La generación de la xilulosa a partir de la xilosa se puede dar por dos vías (**Fig. 9**): (1) vía isomerasa, reportada principalmente en bacterias; esta vía se lleva a cabo mediante la enzima xilosa isomerasa (XI); mientras que (2) la vía oxidorreductasa, reportada en levaduras principalmente se realiza a través de la actividad acoplada de la xilosa reductasa (XR) y xilosa deshidrogenasa (XDH), cabe destacar que estas enzimas ocupan los factores NADPH y  $\text{NAD}^+$ , respectivamente [63]. Por lo tanto, la presencia de luz en los cultivos mixotróficos con xilosa puede favorecer la generación de NADPH, lo cual potencialmente

mejora el metabolismo de la xilosa y contribuye al aumento en la productividad y rendimiento de biomasa observados en estos cultivos.



**Figura 9.** Modelo de las posibles vías para la producción de xilulosa en el metabolismo de la xilosa (Adaptada de Zhao *et al.* 2020).

Para investigar si el NADPH generado en la fotosíntesis contribuye al metabolismo de la xilosa, específicamente en el proceso de isomerización de la xilosa, se llevó a cabo un análisis utilizando el genoma de *G. sulphuraria* 074W. Este análisis reveló que el metabolismo de la xilosa ocurre a través de la vía oxidorreductasa, ya que se encontraron las secuencias que codifican para las enzimas putativas XR (XP\_005705628.1) y XDH (XP\_005706696.1), además de que no se encontró la secuencia para la XI. En conjunto, estos hallazgos indican que el NADPH generado durante la fotosíntesis en *G. sulphuraria* puede desempeñar un papel crucial en el metabolismo de la xilosa, específicamente en la vía oxidorreductasa.

Así mismo, Zheng *et al.* en 2014 observaron en la microalga verde *C. sorokiniana* un aumento del 100% en el rendimiento de biomasa por xilosa consumida bajo condiciones mixotróficas en comparación con cultivos heterotróficos. También reportaron que al utilizar un desacoplante de la cadena de transporte de electrones (diurón), el cual inhibe la producción de NADPH, provocó que el rendimiento de biomasa por xilosa consumida fuera equiparable al heterotrófico [64], demostrando que al inhibir la producción de NADPH hay un decaimiento en la producción de biomasa. Estos resultados permiten sugerir que el efecto obtenido en los cultivos mixotróficos con *G. sulphuraria* se debe a una sinergia de la fotosíntesis, específicamente a la producción del cofactor NADPH durante la fotosíntesis, y el uso de este cofactor en el metabolismo de la xilosa. Esta información proporciona una base para comprender mejor el metabolismo de la xilosa en *G. sulphuraria* y su relación con la fotosíntesis, lo que podría tener implicaciones importantes en la optimización de la producción de biomasa utilizando diferentes fuentes de carbono.

#### *G. sulphuraria* 2919 acumula cantidades semejantes de FC bajo condiciones hetero- y mixotróficas

La FC es un producto de alto valor agregado y se sabe que algunas cepas del género *G. sulphuraria* son capaces de acumular esta proteína inclusive en condiciones de ausencia de luz, por lo que una vez evaluado el crecimiento celular de la microalga se determinó el contenido de esta proteína. La cuantificación de la FC se llevó a cabo posterior al agotamiento de la fuente de carbono (inicio de la fase estacionaria), la cuantificación de esta proteína pigmentada se realizó mediante espectrofotometría, utilizando como referencia la cantidad de proteína soluble total presente (**Fig. 10**).

Al inicio de la fase estacionaria, indicada como tiempo 0 en la **Fig. 10**, se detectó una concentración cercana a  $50 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  de FC, tanto en las condiciones hetero-

como en las mixotróficas, independientemente de la fuente de carbono utilizada y sin que la presencia de luz tuviera un impacto significativo. Esto sugiere la existencia de una concentración basal de FC en la microalga, que no está relacionada con la fuente de carbono ni con la disponibilidad de luz.

Una vez alcanzadas las 24 h después del término de la fuente de carbono (durante la fase estacionaria) se observó una acumulación equivalente al 300% y 82% de FC con base a la concentración basal para los cultivos de glucosa y xilosa, respectivamente. Este aumento en la concentración de FC se observó tanto en condiciones heterótrofas y mixotróficas.

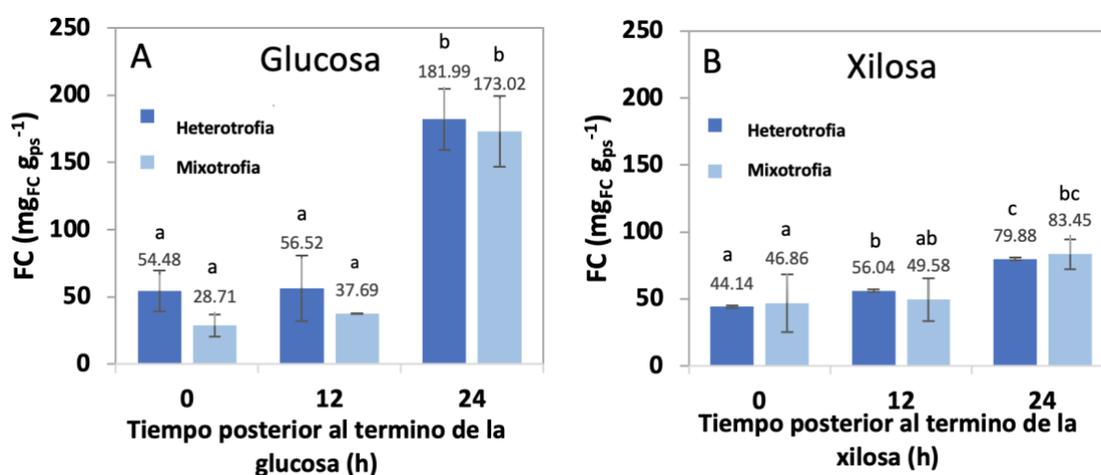


Figura 10. Contenido de FC determinada en cultivos hetero y mixotróficos utilizando (A) Glucosa y (B) Xilosa.

La acumulación de FC observada, posterior a que se agotó la fuente de carbono ya había sido previamente reportada por Schmidt *et al.* (2005) Graverholt y Eriksen (2007) y Wan *et al.* (2016) en cultivos heterotróficos con la cepa 074G [23,30,33]. Este comportamiento de acumulación de FC se explica como una respuesta al estrés durante la falta de carbono, en la cual se acumula

nitrógeno en forma de FC [29], esto siempre y cuando exista un exceso de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo ( $\text{NH}_4$ ) y se presente un recambio de macromoléculas, p. ej. carbohidratos y/o otras proteínas, para acumular FC.

En nuestro estudio con *G. sulphuraria* UTEX 2919, se encontró un contenido de FC dos veces mayor cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono en comparación con la xilosa, lo que indica que la fuente de carbono afecta la acumulación de esta proteína. Resultados similares fueron observados por Sloth *et al.* (2006), quienes encontraron una mayor acumulación de FC en cultivos heterotróficos con glicerol como fuente de carbono en comparación con glucosa y fructosa [29]. Estos hallazgos sugieren que existe una producción basal de FC, pero que hay un mecanismo regulador complejo que interviene en la acumulación de FC durante la fase de inanición.

Aunque aún se desconocen las implicaciones metabólicas relacionadas con la acumulación de esta proteína en el agotamiento de diferentes fuentes de carbono, sugerimos que es debido a la diferencia en la composición de metabolitos de reserva, ya que son estos metabolitos los utilizados para la síntesis de FC. Por esta razón se decidió estudiar la concentración de lípidos, carbohidratos y proteínas, presentes en las células, de igual forma a las 0, 12 y 24 h posterior al agotamiento de la fuente de carbono (**Tabla 5**).

La biosíntesis de la FC observada en la fase estacionaria se da como respuesta a la ausencia de una fuente de carbono, lo cual podría indicar que la energía y materia orgánica para la producción de esta proteína proviene de los metabolitos de reserva. Sin embargo, los resultados mostrados en la tabla 5 indican que, a las 24 horas, donde se da la acumulación de FC, los valores de lípidos, carbohidratos y proteínas no presenta variación; por lo cual no es posible determinar con las técnicas evaluadas qué macromoléculas son metabolizadas

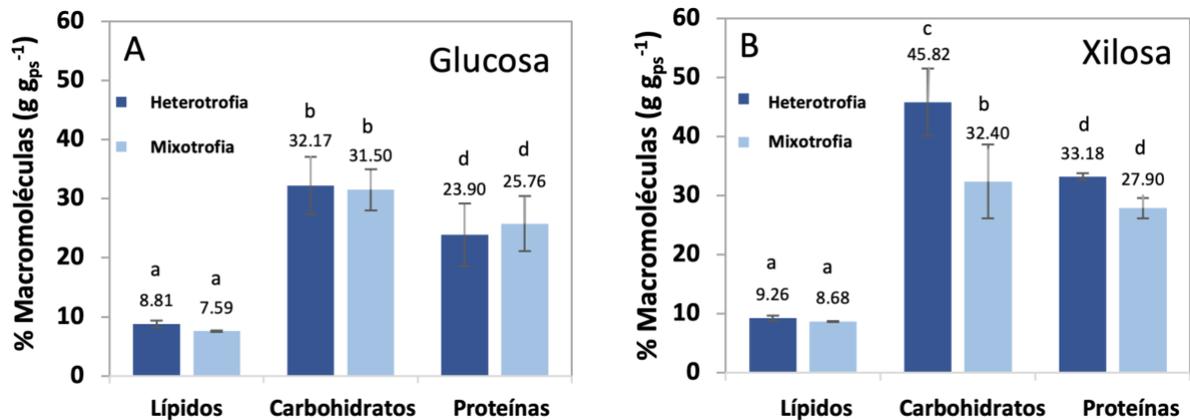
para la síntesis de este pigmento. Esto es debido a la baja concentración de FC acumulada, la cual se encuentra en valores de mg.

**Tabla 5.** Evaluación en la composición de la biomasa con respecto al tiempo posterior al agotamiento de las fuentes de carbono

Macromoléculas (%)	Tiempo posterior al agotamiento de la fuente de carbono					
	Glucosa heterotrófico			Glucosa mixotrófico		
	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h
Proteína	22.6 ± 2.14 <sup>a</sup>	23.6 ± 4.21 <sup>a</sup>	23.9 ± 5.28 <sup>a</sup>	25.0 ± 1.04 <sup>a</sup>	24.3 ± 2.57 <sup>a</sup>	25.8 ± 4.65 <sup>a</sup>
Lípidos	9.19 ± 1.01 <sup>a</sup>	8.00 ± 1.15 <sup>a</sup>	8.81 ± 0.57 <sup>a</sup>	8.76 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.16 ± 0.67 <sup>a</sup>	7.59 ± 0.13 <sup>a</sup>
Carbohidratos	34.53 ± 4.64 <sup>a</sup>	ND	32.17 ± 4.85 <sup>a</sup>	33.97 ± 1.84 <sup>a</sup>	ND	31.50 ± 3.47 <sup>a</sup>
	Xilosa heterotrófico			Xilosa mixotrófico		
Proteína	27.27 ± 2.67 <sup>a</sup>	29.23 ± 3.30 <sup>a</sup>	33.18 ± 0.60 <sup>a</sup>	31.81 ± 3.04 <sup>a</sup>	31.65 ± 6.39 <sup>a</sup>	27.90 ± 1.72 <sup>a</sup>
Lípidos	9.26 ± 1.37 <sup>a</sup>	8.75 ± 1.07 <sup>a</sup>	9.26 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.05 ± 2.64 <sup>a</sup>	8.99 ± 2.57 <sup>a</sup>	8.68 ± 0.06 <sup>a</sup>
Carbohidratos	41.87 ± 3.71 <sup>a</sup>	42.42 ± 3.91 <sup>a</sup>	45.82 ± 5.70 <sup>a</sup>	34.68 ± 3.44 <sup>ab</sup>	35.57 ± 3.28 <sup>b</sup>	32.40 ± 6.26 <sup>ab</sup>

ND: Valor no determinado

\* ANOVA unidireccional (p = 0,05); letras iguales = sin diferencia entre medias.



**Figura 11.** Composición de la biomasa 24 horas después del consumo de la fuente de carbono en cultivos heterotróficos y mixotróficos utilizando glucosa y xilosa.

En la figura 11 se expone de manera comparativa la composición macromolecular en las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. El contenido de lípidos y proteínas mostró valores promedio de 8.9% ( $\text{g g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) para lípidos y de 25 a 31% ( $\text{g g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) para proteínas, sin variaciones en los cultivos con glucosa, xilosa hetero- y mixotróficos. Estos valores concuerdan con los reportados por Graziani *et al.* en 2012 de 11.4% para lípidos y 26% para proteínas utilizando la cepa 064/309 de *G. sulphuraria* y glicerol como fuente de carbono bajo condiciones heterótrofas [65]. Considerando que las fuentes de carbono evaluadas fueron una hexosa y una pentosa, y además el glicerol es un alcohol, permite sugerir que la naturaleza de la fuente de carbono tiene poco efecto en el porcentaje de lípidos y proteínas en la composición macromolecular de la biomasa.

Al evaluar los carbohidratos totales, representados como la suma de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa, se determinó que los resultados provenientes de los cultivos hetero- y mixotróficos suplementados con glucosa, no mostraron diferencias en la composición total de carbohidratos, sugiriendo nuevamente que la presencia de luz en estas condiciones no tiene un efecto significativo. Sin embargo, los cultivos heterotróficos suplementados con xilosa presentan una fracción mayor de carbohidratos totales equivalente al 25% en comparación con el obtenido en condiciones mixotróficas con xilosa, y también con los encontrados con glucosa en condiciones hetero- y mixotróficas. Dicha acumulación de carbohidratos se puede explicar por la baja tasa de crecimiento debida posiblemente a la concentración limitada de NADPH. Se ha reportado que bajas tasas de crecimiento conllevan a la acumulación de metabolitos.

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que la composición de los carbohidratos almacenados en las células de *G. sulphuraria* 2919 varió en función de la fuente de carbono utilizada (**Fig. 12**). En los cultivos heterotróficos y mixotróficos con glucosa, se observó una composición similar de carbohidratos de almacenamiento, con glucosa como el principal componente en mayor

proporción ( $40.0 \pm 3.6\%$ ). Los otros azúcares determinados fueron galactosa ( $37.6 \pm 5.1\%$ ), arabinosa ( $10.4 \pm 2.8\%$ ) y xilosa ( $12.0 \pm 1.6\%$ ).

Sin embargo, cuando se utilizó xilosa como fuente de carbono, *G. sulphuraria* 2919 no acumuló xilosa como carbohidrato de reserva (**Fig. 12C y D**), tanto en condiciones mixotróficas como heterotróficas. En cambio, la proporción de xilosa se compensó con una mayor proporción de glucosa (58.1%). La proporción de galactosa (35%) y arabinosa (6.5%) no mostró cambios significativos entre los cultivos heterótrofos y mixotróficos.

Estos resultados sugieren que *G. sulphuraria* 2919 regula negativamente la síntesis de polímeros de xilosa en presencia de xilosa como fuente de carbono. Además, esta diferencia en la composición de los carbohidratos de reserva podría ser una explicación para las variaciones en la acumulación de FC. Se ha observado que la biosíntesis de la FC ocurre posterior al agotamiento de la fuente de carbono, (fase estacionaria) utilizando los metabolitos de reserva como materia prima. Por lo tanto, la composición de estos metabolitos, incluyendo la proporción de glucosa y xilosa, podría influir en la acumulación de FC.

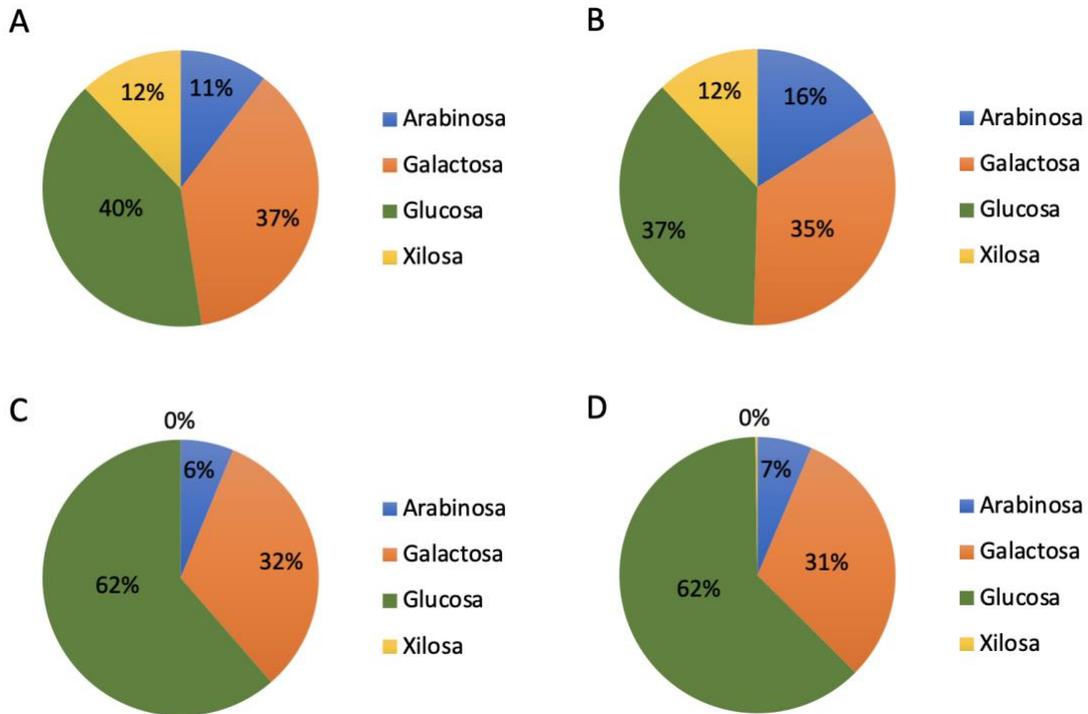


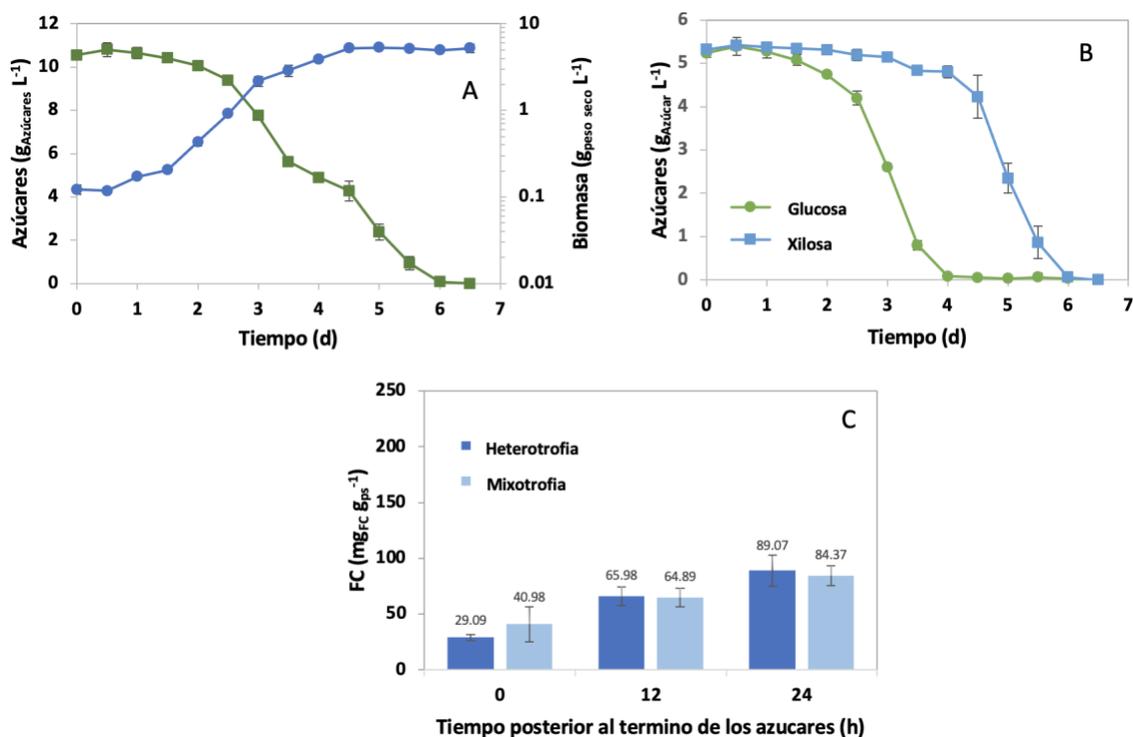
Figura 12. Composición de los azúcares, en carbohidratos de almacenamiento, evaluados en la cepa de *G. sulphuraria* 2919, 24 h después del agotamiento de la fuente de carbono con diferentes fuentes de carbono y condiciones de cultivo: A) glucosa - heterotrófico, B) glucosa - mixotrófico, C) xilosa - heterotrófico y D) xilosa - mixotrófico.

### La glucosa reprime el consumo de xilosa en *G. sulphuraria* 2919

La caracterización con xilosa mostró variaciones en el crecimiento y contenido de FC con respecto a la glucosa y debido a que la hidrólisis de la fracción hemicelulósica del rastrojo de maíz genera un jarabe rico en xilosa y glucosa; se realizaron cultivos heterótrofos y mixotróficos de *G. sulphuraria* 2919 utilizando una mezcla de xilosa y glucosa ( $5 \text{ g}_{\text{Azúcar}} \text{ L}^{-1}$  cada una), para evaluar el efecto de la mezcla de estos monosacáridos sobre el crecimiento celular, consumo de azúcares y acumulación de FC (**Fig. 13**).

Es interesante notar que la velocidad de crecimiento alcanzada ( $1.08 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ ) fue similar a la observada con xilosa en condiciones mixotróficas ( $1.10 \text{ d}^{-1}$ ), y el rendimiento de biomasa ( $0.56 \pm 0.05 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{azúcares}}^{-1}$ ) similar al obtenido con

glucosa ( $0.54 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{azúcares}}^{-1}$ ) en condiciones hetero- o mixotróficas; no obstante, la tasa de consumo volumétrico de la mezcla de azúcares ( $1.64 \pm 0.06 \text{ g}_{\text{Azúcar}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) fue menor que las obtenidas de forma independiente con glucosa y xilosa ( $2.26$  y  $2.65 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente). Sugiriendo que la asimilación de azúcares totales se afecta negativamente en presencia de ambos monosacáridos. El efecto observado en la  $Q_s$ , (**Fig. 13B**), muestra que la cepa 2919 tiene una clara preferencia por metabolizar glucosa sobre xilosa. Esta evidencia sugiere que existe una inhibición en el transporte de xilosa ejercido por la glucosa, lo cual ha sido previamente documentado para el transportador HPU1 en la microalga *Chlorella* [64]. Cabe señalar que para estos experimentos los inóculos se desarrollaron con glucosa o xilosa y en ambos casos se observó el mismo comportamiento en condiciones heterotróficas y mixotróficas.



**Figura 13.** Cultivos lote de *G. sulphuraria* 2919 en condiciones heterotróficas y mixotróficas utilizando una mezcla de glucosa - xilosa ( $5 \text{ g}_{\text{Azúcar}} \text{ L}^{-1}$  cada una). (A) Crecimiento celular y azúcares residuales, (B) Glucosa y xilosa residual y (C) Acumulación específica de FC.

El contenido de FC se cuantificó a las 0, 12 y 24 h después del agotamiento de las fuentes de carbono (**Fig. 13C**). Los resultados muestran que la concentración de FC, obtenida con la mezcla de azúcares a las 24 h ( $86.7 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ), es similar con la cantidad observada con xilosa como única fuente de carbono ( $81.6 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) y, por tanto, un 52% inferior a los valores obtenidos en los cultivos con glucosa. En las condiciones heterótrofas y mixotróficas utilizando mezclas de glucosa-xilosa, se observaron concentraciones similares de FC, lo que indica que la luz no tiene un efecto en la acumulación de esta ficobiliproteína en cultivos con una fuente de carbono orgánica. Sin embargo, es importante destacar que en estos cultivos con alta concentración de biomasa, se genera un efecto de sombreado significativo, lo cual limita la disponibilidad de luz dentro de los cultivos mixotróficos, lo cual puede afectar la biosíntesis de la proteína.

Los resultados obtenidos, junto con los ensayos anteriores, sugieren que la xilosa tiene un efecto inhibitor sobre la acumulación de FC. Esto se evidencia en el hecho de que la xilosa fue el último monosacárido en ser consumido durante el crecimiento de la microalga. La presencia de xilosa parece tener un impacto negativo en la biosíntesis de FC, lo cual puede deberse a diversas razones, como la composición de los metabolitos de reserva.

## Conclusiones del uso de xilosa como fuente de carbono y su efecto en la acumulación de FC.

- La cepa 2919 de *G. sulphuraria* presenta rendimientos de biomasa al utilizar glucosa como fuente de carbono superiores a los de otras microalgas, incluso dentro del mismo género.
- *G. sulphuraria* 2919 es capaz de metabolizar xilosa con un buen rendimiento de biomasa. Sin embargo, se observó que este rendimiento es aproximadamente un 40% menor en comparación con el obtenido con glucosa. Esto sugiere que el metabolismo de la xilosa puede requerir un mayor gasto energético en comparación con la glucosa.
- Se observó que la microalga *G. sulphuraria* 2919, presenta una preferencia al consumo de glucosa sobre la xilosa y la asimilación de xilosa se observa inhibida en presencia de glucosa.
- Se determinó que las células de *G. sulphuraria* 2919 cultivadas en mixotrofia con xilosa mostraron un incremento del 20% en la productividad de biomasa con respecto a los cultivos heterotróficos con ese azúcar. Se sugiere que este comportamiento se debe a la contribución que tiene el NADPH generado en la fotosíntesis.
- Se corroboró que la acumulación de FC depende de la fuente de carbono, ya que con el uso de glucosa se obtiene 2.2 veces mayor acumulación de FC que con xilosa. Esto conlleva a sugerir que la fuente de carbono repercute en la producción de metabolitos de reserva los cuales influyen en la biosíntesis de FC.

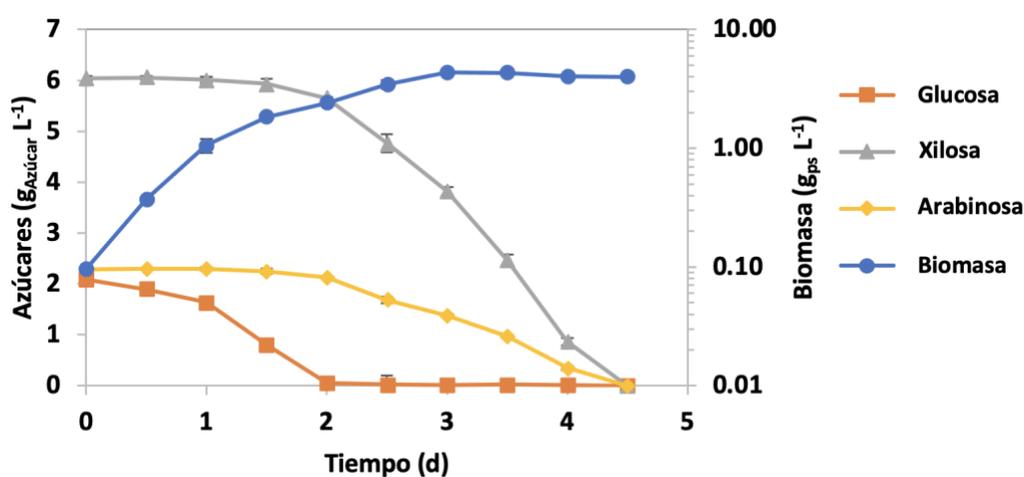
## Sección II: Evaluación del crecimiento y producción de FC utilizando jarabes provenientes de la hidrólisis del rastrojo de maíz.

La microalga *G. sulphuraria* no puede utilizar el hidrolizado hemicelulósico como fuente de carbono.

Para evaluar el rastrojo de maíz como materia prima en el crecimiento de *G. sulphuraria* 2919 y la producción de FC, se realizó un tratamiento termoquímico al rastrojo de maíz para liberar los azúcares contenidos en la fracción hemicelulósica, de acuerdo con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Como resultado de esta hidrólisis termoquímica se generó un jarabe compuesto por xilosa ( $12.14 \pm 2.75 \text{ g}_{\text{Xil}} \text{ L}^{-1}$ ), arabinosa ( $4.94_{\text{Ara}} \pm 0.64 \text{ g L}^{-1}$ ) y glucosa ( $5.22_{\text{Glu}} \pm 0.91 \text{ g L}^{-1}$ ). La cantidad total de pentosas fue de  $17.08 \text{ g L}^{-1}$  (principalmente xilosa) y el contenido de glucosa correspondió al 24% del total de azúcares. También se analizó la concentración de furfural ( $0.08 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{Fur}} \text{ L}^{-1}$ ), hidroximetilfurfural (HMF;  $0.14 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{HMF}} \text{ L}^{-1}$ ) y ácido acético ( $2.21 \pm 0.37 \text{ g}_{\text{Ac. Acético}} \text{ L}^{-1}$ ), los cuales, además de compuestos fenólicos que no se cuantificaron (derivados de la hidrólisis parcial de la lignina), se sabe que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos [66].

En la sección anterior, se demostró que la mezcla de glucosa y xilosa en el medio de cultivo resulta en una disminución en la velocidad de consumo de azúcares totales en comparación con el consumo de los monosacáridos por separado. Con el objetivo de investigar el efecto de los azúcares presentes en el jarabe obtenido de la hidrólisis termoquímica del rastrojo de maíz, se realizó un cultivo utilizando una mezcla proporcional de los azúcares (xilosa, arabinosa y glucosa) ajustada a una concentración total de  $10 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1}$ . Esta mezcla fue utilizada para comparar los resultados obtenidos en la sección anterior, donde se utilizaron alrededor de  $10 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1}$  de una mezcla de glucosa y xilosa.

Por lo tanto, al medio mineral se adicionaron los monosacáridos: xilosa ( $6 \text{ g}_{\text{Xil}} \text{ L}^{-1}$ ), arabinosa ( $2.3 \text{ g}_{\text{Ara}} \text{ L}^{-1}$ ) y glucosa ( $2.0 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ ) para obtener  $10 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1}$  de azúcares totales. Debido a que este cultivo se usó como control para evaluar el consumo de azúcares, los furanos y el ácido acético se excluyeron en este experimento. La cinética obtenida (**Fig. 14**) muestra que *G. sulphuraria* 2919 es capaz de consumir los tres monosacáridos, con consumo preferencial por la glucosa.

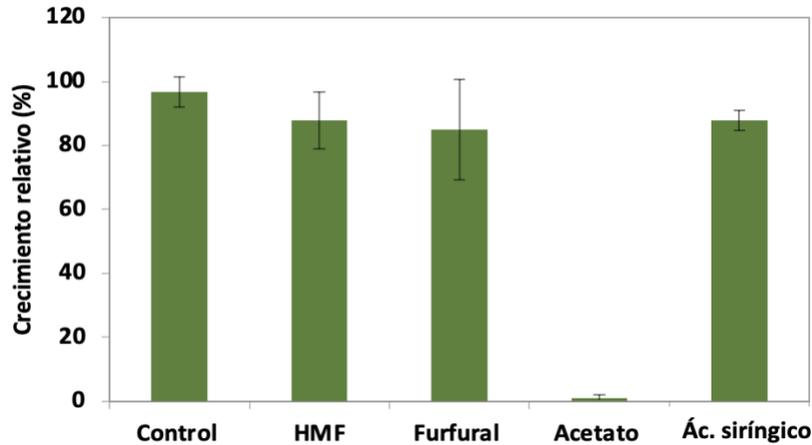


**Figura 14.** Cultivo heterotrófico con mezcla de monosacáridos equivalente a los presentes en la hidrólisis termoquímica del rastrojo de maíz. Condiciones de cultivo: pH 2,  $42^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL.

El resultado obtenido indica que la presencia de glucosa inhibe el consumo de las dos pentosas (xilosa y arabinosa); sin embargo, posterior al agotamiento de la glucosa, las pentosas se consumen al mismo tiempo, lo que sugiere que ambas pentosas pueden ser internalizadas por el mismo transportador. Al evaluar los parámetros cinéticos se observó que los valores de  $\mu$  y  $Y_{X/S}$  obtenidos son de  $1.1 \text{ d}^{-1}$  y  $0.54 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{Azúcares}}^{-1}$ , respectivamente; estos valores son cercanos a los observados con la mezcla de glucosa-xilosa. Además, al cuantificar la FC en las células provenientes de este cultivo se observó que el valor alcanzado de  $86 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ , a las 24 h posterior al agotamiento de las pentosas, es similar al obtenido con

la mezcla de xilosa-glucosa en condiciones heterotróficas. Este resultado permite sugerir que el contenido de FC está vinculado al último carbohidrato metabolizado; ya que, las pentosas (xilosa y arabinosa) fueron los últimos carbohidratos en ser consumidos.

La evaluación del hidrolizado termoquímico de rastrojo de maíz se realizó mediante la dilución de este en 2.22 veces, obteniendo una concentración inicial en el cultivo de  $10 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1}$  de azúcares totales, a este jarabe diluido se le adicionaron las sales del medio de cultivo mineral. Sin embargo, después de 7 días de cultivo bajo condiciones heterótrofas y mixotróficas no se detectó crecimiento (datos no mostrados), y posterior a los 7 días de cultivo se observó que las células perdieron la capacidad de reproducirse, ya que al colocar las células en medio mineral con glucosa no se observó crecimiento. Este resultado sugirió que el jarabe contiene uno o más componentes que inhiben el crecimiento de las microalgas. Debido al potencial efecto inhibitorio del furfural, HMF, ácido acético y polifenoles [67,68], estos compuestos se evaluaron por separado en condiciones heterótrofas, utilizando glucosa ( $10 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ ) y añadiendo  $1 \text{ g}_{\text{Ac. Acético}} \text{ L}^{-1}$  de ácido acético,  $0.03 \text{ g}_{\text{Fur}} \text{ L}^{-1}$  de furfural,  $0.05 \text{ g}_{\text{HMF}} \text{ L}^{-1}$  de HMF y  $0.5 \text{ g}_{\text{Ac, sir}} \text{ L}^{-1}$  de ácido siríngico (como compuesto fenólico de referencia; **Fig. 15**), estas concentraciones usadas corresponden a las concentraciones encontradas en el jarabe posterior a su dilución de 2.2 veces.



**Figura 15.** Ensayos de inhibición utilizando compuestos tóxicos presentes en el jarabe proveniente del hidrolizado del rastrojo de maíz. El eje “y” representa a las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) siendo  $1.5 \text{ d}^{-1}$  el 100%. Todos los ensayos se llevaron a cabo en condiciones heterotróficas utilizando una concentración de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa.

No se encontró efecto de inhibición drástica por la presencia de furfural, HMF o ácido siríngico, ya que las tasas de crecimiento específicas son similares a la obtenida con el medio de control suplementado sólo con glucosa.

Sin embargo, se encontró que el ácido acético a una concentración de  $1 \text{ g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$  inhibió el crecimiento de *G. sulphuraria* 2919. Además, se diluyó el hidrolizado de rastrojo de maíz 10 veces para evaluar el crecimiento en presencia de  $0.3 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético y  $2.3 \text{ g L}^{-1}$  de azúcares totales (datos no mostrados). En estas condiciones, la microalga logró crecer con una tasa de crecimiento específica de  $0.83 \text{ d}^{-1}$  y un rendimiento de biomasa en relación con el sustrato de  $0.44 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{Azúcares}}^{-1}$ . Aunque la concentración total de azúcares fue baja, se logró acumular  $92 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  24 horas después del agotamiento de los azúcares. Estos resultados indican que hay un umbral de inhibición para el ácido acético entre  $0.3\text{-}1.0 \text{ g L}^{-1}$  y que *G. sulphuraria* 2919 es capaz de producir FC a partir de una mezcla compleja de azúcares, obteniendo valores similares a los observados en cultivos heterotróficos con xilosa.

## El ácido acético reprime el consumo de glucosa en *G. sulphuraria* 2919

La inhibición en el crecimiento previamente observada, ha sido estudiada para diversos microorganismos, esta inhibición se explica porque algunos ácidos orgánicos en su forma no disociada pueden translocarse al interior de la célula por difusión pasiva y, si el pH intracelular está por encima del valor pKa del ácido orgánico, el ácido se desprotona provocando una disminución del pH intracelular [69]. En particular el pKa del ácido acético es 4.75 y 4.77 a 25 y 42°C, respectivamente [70]. Dado que el pH inicial de los cultivos es de 2, el ácido acético no se encuentra disociado y puede penetrar al interior de las células. Además, se ha reportado que el pH intracelular en *G. sulphuraria* es cercano a 7 [11], por lo tanto, el ácido acético dentro de la célula se desprotona, provocando la acidificación del citosol e inhibiendo el crecimiento de microalgas.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria del ácido acético sobre el crecimiento de *G. sulphuraria*, se realizó un estudio a concentraciones inferiores a 1 g<sub>Ac. acético</sub> L<sup>-1</sup> de ácido acético (utilizando el medio mineral con glucosa a 10 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup>; **Fig. 16**). Se observó que la concentración mínima inhibitoria de ácido acético sobre el crecimiento celular fue de 0.6 g L<sup>-1</sup>. Además, por debajo de este valor, se observó que *G. sulphuraria* 2919 es capaz de asimilar y metabolizar ácido acético (**Fig. 16**). Así mismo, a pesar de la baja masa celular producida con ácido acético, en las cinéticas se observa que este ácido fue utilizado como fuente de carbono por la microalga aun en presencia de glucosa. Aunque no existen estudios del metabolismo de ácido acético por esta microalga, es posible que lo metabolice utilizando la vía del glioxilato. Cabe mencionar que, hasta ahora, no existe evidencia en la literatura que informe sobre el uso de ácido acético como fuente de carbono por *G. sulphuraria*.

En la figura 16, se observa que la glucosa se consume después de que el ácido acético se agota en concentraciones de 0.15 a 0.5 g<sub>Ac. acético</sub> L<sup>-1</sup>. Esto indica una represión en el consumo de glucosa causada por el ácido acético, lo que resulta en un aumento en el tiempo de crecimiento retardado, que coincide con el tiempo en el que se consume el ácido acético. Este efecto se observó hasta concentraciones de 0.5 g<sub>Ac. acético</sub> L<sup>-1</sup> de ácido acético, ya que concentraciones más altas no permitieron el crecimiento de la microalga. Estos resultados sugieren que el ácido acético inhibe el consumo de glucosa y, como se mencionó anteriormente, la glucosa inhibe el consumo de arabinosa y xilosa. Es necesario realizar más estudios para comprender el mecanismo molecular detrás de esta jerarquía en el consumo de diferentes fuentes de carbono por parte de la microalga *G. sulphuraria*.

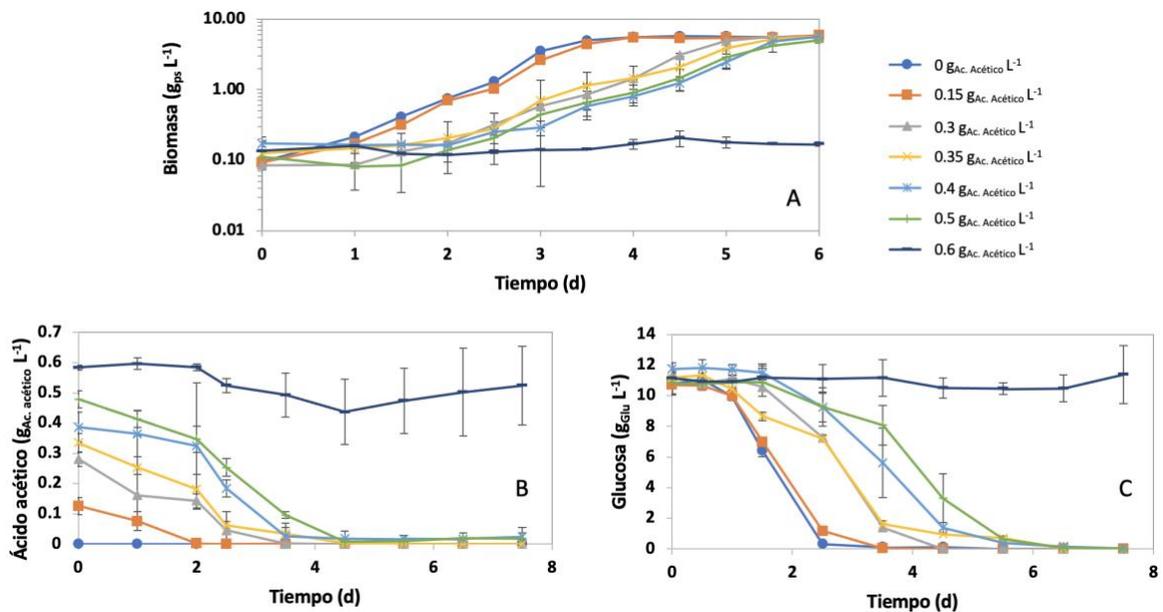


Figura 16. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de ácido acético A) Cinéticas en cultivos heterotróficos, B) Consumo de ácido acético y C) Consumo de glucosa. Usando concentraciones de ácido acético de 0.0, 0.15, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5 y 0.6 g<sub>Ac. acético</sub> L<sup>-1</sup>.

En estos experimentos, se determinaron los valores de rendimiento de biomasa en relación con la glucosa consumida y la tasa de crecimiento específico durante la fase exponencial. Los resultados obtenidos mostraron que estos valores fueron de  $0.53 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{Glu}}^{-1}$  y  $1.18 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente (**Tabla 6**). Se observó que estos valores fueron muy similares en los experimentos con ácido acético en concentraciones menores a  $0.6 \text{ g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$ , incluyendo el experimento control sin adición de ácido acético. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de ácido acético en concentraciones inferiores a  $0.6 \text{ g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$  no afecta la viabilidad celular.

**Tabla 4.** Efecto de la presencia de ácido acético en los parámetros cinéticos

Concentración inicial de ácido acético ( $\text{g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$ )	0	0.15	0.3	0.35	0.4	0.5	0.6
Rendimiento ( $\text{g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{sustrato}}^{-1}$ )	$1.06 \pm 0.07$	$1.31 \pm 0.01$	$1.10 \pm 0.03$	$0.86 \pm 0.14$	$1.13 \pm 0.26$	$0.95 \pm 0.16$	ND
Vel. de crecimiento ( $\text{d}^{-1}$ )	$0.54 \pm 0.01$	$0.55 \pm 0.04$	$0.50 \pm 0.02$	$0.55 \pm 0.03$	$0.47 \pm 0.07$	$0.50 \pm 0.07$	ND

ND = no se detectó crecimiento.

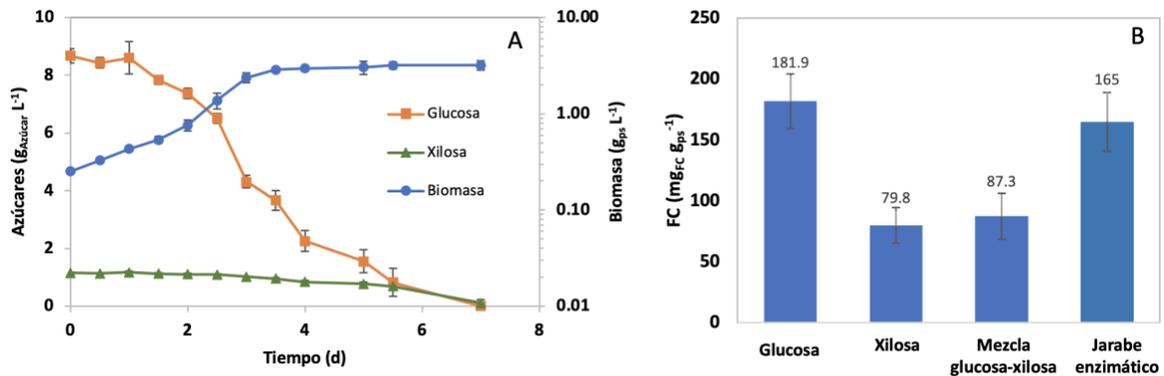
El hidrolizado celulósico derivado del rastrojo de maíz se puede utilizar para la acumulación de FC.

Dado que el ácido acético en concentraciones consideradas bajas ( $0.6 \text{ g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$ ) inhibió el crecimiento de *G. sulphuraria*, se decidió utilizar la fracción celulósica (glucano) resultante de la previa hidrólisis termoquímica. Cabe mencionar que dicho pretratamiento es necesario, ya que ayuda en el proceso de sacarificación de la fracción sólida (no acetilada), debilitando la estructura cristalina de la celulosa y por lo tanto provocando susceptibilidad a la hidrólisis

enzimática. Además, en el caso de un tratamiento termoquímico en el que el proceso de desacetilación es completo durante la sacarificación enzimática del glucano, no se genera ácido acético.

Como resultado de la sacarificación del glucano se obtuvo un jarabe enriquecido en glucosa y otros monosacáridos en cantidades menores, cabe mencionar que este jarabe no presentó furanos ni ácido acético. La caracterización del jarabe obtenido por hidrólisis enzimática mostró un contenido de  $65.7 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$  de glucosa y  $8.72 \text{ g}_{\text{Xil}} \text{ L}^{-1}$  de xilosa, la glucosa liberada en este proceso aunada a la obtenida en el procesos de hidrólisis termoquímica representa una conversión del 95% de los glucanos descrito para el rastrojo de maíz [43].

Este jarabe se diluyó con el medio mineral para obtener un medio de cultivo con un equivalente a  $10 \text{ g}_{\text{Azúcares}} \text{ L}^{-1}$  de azúcares totales. Con este medio se realizaron cultivos heterotróficos (**Fig. 17 A; Tabla 7**) y 24 horas posteriores al término de las fuentes de carbono se determinó el contenido de FC (**Fig. 17 B**), el cual se comparó con el obtenido en los experimentos heterotróficos presentados en las secciones anteriores.



**Figura 17.** Crecimiento heterotrófico de *G. sulphuraria* 2919 utilizando el hidrolizado enzimático del rastrojo de maíz A) Cinética de crecimiento y consumo de azúcares B) Comparativo del contenido de FC cuantificado 24 horas posterior al consumo de las diferentes fuentes de carbono.

**Tabla 5.** Comparativo del crecimiento celular y contenido de FC en los diferentes cultivos realizados bajo condiciones heterotróficas

	Glucosa	Xilosa	Glu-Xil	Jarabe enzimático
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	1.38 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.15 <sup>b</sup>
Y <sub>x/s</sub> (g <sub>ps</sub> g <sub>Azúcar</sub> <sup>-1</sup> )	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>b</sup>
FC (mg <sub>FC</sub> mg <sub>ps</sub> <sup>-1</sup> )	181.9 ± 22.5 <sup>a</sup>	79.8 ± 14.5 <sup>b</sup>	87.3 ± 18.7 <sup>b</sup>	165 ± 24 <sup>a</sup>

Los resultados cinéticos y estequiométricos del cultivo muestran un valor de  $\mu$  de  $0.99 \pm 0.15$  d<sup>-1</sup> y un Y<sub>x/s</sub> de  $0.40 \pm 0.03$  g<sub>ps</sub> g<sub>azúcares</sub><sup>-1</sup>, mostrando una disminución estadísticamente significativa en la velocidad de crecimiento en comparación con cultivos en medio mineral con glucosa. Se obtuvo una Q<sub>s</sub> de 1.68 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, el cual es un 30% menor que el obtenido con los cultivos realizados en medios minerales con glucosa o xilosa. Sin embargo, este valor es similar al cultivo con ambas fuentes de carbono (mezcla glucosa-xilosa), lo que sugiere que el efecto sobre la tasa de crecimiento en la mezcla del jarabe se debe a la presencia de las pentosas existentes en el jarabe y sales derivadas del proceso de sacarificación del glucano.

Finalmente, se encontró que el contenido de FC en los cultivos utilizando el jarabe enzimático fue de  $165 \pm 24 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ , lo cual es estadísticamente comparable a los resultados obtenidos utilizando  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa en condiciones heterotróficas. Este hallazgo sugiere que la fuente de carbono y su proporción tienen un impacto en la regulación de la producción de FC. Debido a que la FC se acumula en la fase estacionaria (término de la fuente de carbono), su acumulación está influenciada por los metabolitos de reserva presentes en la microalga, los cuales varían según la fuente de carbono utilizada. Estas diferencias se observaron en la figura 17, donde se muestran los perfiles de metabolitos de reserva en función de la fuente de carbono. Esta parte del estudio indica que es posible acumular una concentración de FC equiparable a la obtenida en cultivos con glucosa, utilizando un jarabe derivado de la hidrólisis enzimática de la fracción celulósica de los residuos lignocelulósicos.

Conclusiones de la evaluación de jarabes provenientes de la hidrólisis termoquímica del rastrojo de maíz como fuente de carbono en *G. sulphuraria*.

- El jarabe de rastrojo de maíz obtenido mediante hidrólisis termoquímica con ácido diluido inhibe el crecimiento de la microalga debido a la presencia de ácido acético.
- Se determinó que el crecimiento de *G. sulphuraria* se inhibe a concentraciones de ácido acético mayores de 0.5 g L<sup>-1</sup>.
- El jarabe proveniente de la hidrólisis enzimática del glucano del rastrojo de maíz es aprovechado por *G. sulphuraria* como fuente de carbono, con rendimientos de crecimiento y acumulación de FC equiparables a los cultivos con glucosa.
- Estos resultados destacan la importancia de la selección adecuada de la fuente de carbono en el cultivo de microalgas y sugieren la posibilidad de aprovechar los residuos lignocelulósicos para obtener jarabes que puedan ser utilizados como sustratos en la producción de biomasa y compuestos de interés como la FC.

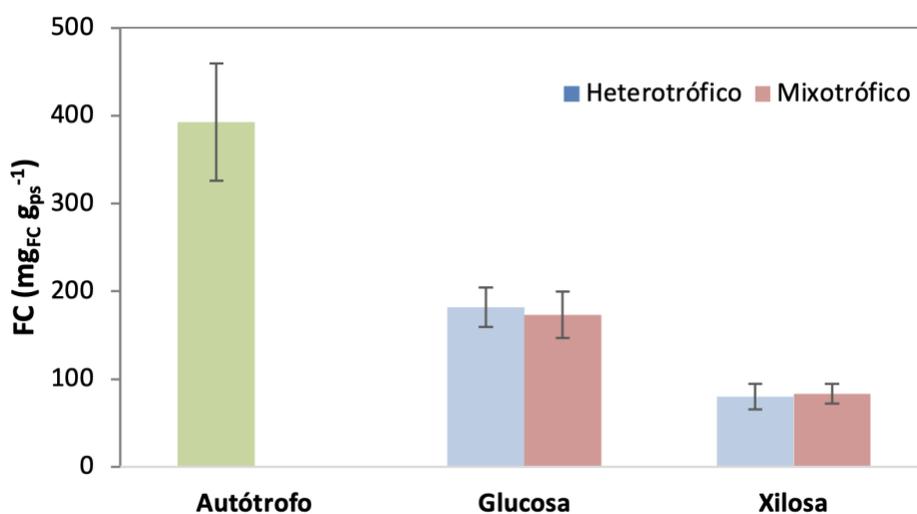
### Sección III: Limitación de luz en cultivos autótrofos como estrategia para incrementar la acumulación de FC en *G. sulphuraria* 2919

El crecimiento y el contenido de FC son proporcionales al tiempo de exposición a la luz.

La biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, los carotenoides y las ficobiliproteínas, depende en gran medida de la luz. Por lo tanto, el contenido de estos pigmentos en las células se ve directamente influenciado por factores como la longitud de onda de la luz, su intensidad y la duración de la exposición a la misma [36,71,72]. Por esta razón se decidió estudiar los parámetros de intensidad de luz, y tiempo de exposición a la luz, este último mediante el uso de fotoperiodos.

El estudio de los fotoperiodos, ciclos controlados de exposición a la luz, se llevó a cabo bajo condiciones autótrofas esto derivado de los resultados obtenidos en la primera sección, los cuales muestran que las células obtenidas de los cultivos heterótrofos y mixótrofos no muestran una diferencia significativa en su contenido de FC final, ya que cultivos expuestos a una intensidad de luz de  $140 \text{ mM fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante todo el cultivo (6 días) alcanzaron valores de FC equiparables a los cultivos que crecieron en oscuridad total (**Fig. 13**). Estos hallazgos indican que la presencia o ausencia de luz en los cultivos que utilizan una fuente de carbono orgánica no tiene un impacto en la biosíntesis de esta proteína, al menos en las condiciones específicas utilizadas en esta investigación. Resultados similares fueron observados para la cepa 074G, donde los cultivos con glucosa en condiciones hetero- y mixotróficas presentaron un contenido de FC equiparable [29].

Así mismo, células provenientes de cultivos autótrofos (reportados en la primera sección, **Fig. 6A**) después de 35 días de exposición a una intensidad de luz de  $140 \text{ mM fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  acumularon una concentración de FC de  $494 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ , la cual es 2.7 veces mayor a la encontrada en los cultivos hetero- y mixotróficos (**Fig. 18**); sin embargo, considerando el tiempo de cultivo, la productividad de FC alcanzada en condiciones autótrofas es de  $14.11 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  siendo 50% menor a la alcanzada utilizando glucosa como fuente de carbono. Esta disminución en la productividad es debida a que la biomasa alcanzada es 21 veces mayor en heterotrofia o mixotrofia en comparación con la autotrofia. Con base en estos resultados se decidió realizar la evaluación de los fotoperiodos en condiciones autótrofas, y utilizar biomasa proveniente de cultivos heterótrofos con el propósito de utilizar una concentración de biomasa alta y por consiguiente aumentar la productividad de FC.

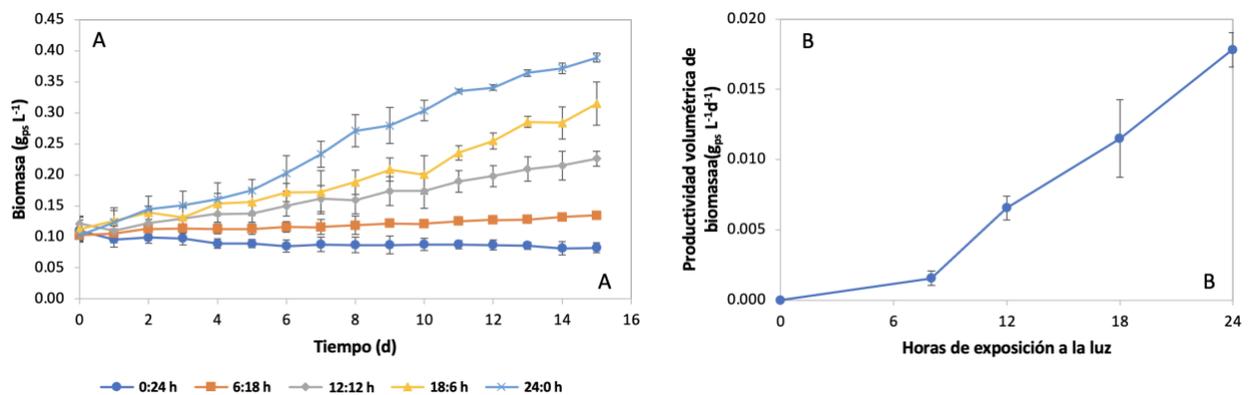


**Figura 18.** Contenido de FC en células provenientes de cultivos auto- hetero y mixotróficos.

El objetivo de esta sección del estudio es alcanzar una alta productividad de FC, la cual está relacionada tanto con el contenido específico de la proteína ( $\text{mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) como con la productividad de biomasa ( $\text{g}_{\text{ps}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Para lograr esto, se evaluó el crecimiento de la microalga en diferentes fotoperiodos. Se probaron cinco tiempos de exposición a la luz: 0, 6, 12, 18 y 24 horas de luz por día ( $h_{\text{luz}} \text{d}^{-1}$ ). Estos fotoperiodos se denominaron como 0:24, 6:18, 12:12, 18:6 y 24:0, que representan las horas de luz y oscuridad respectivamente.

La intensidad de luz inicialmente evaluada fue de  $140 \mu\text{mol} \text{ fotones } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Esta elección se basó en estudios previos que han demostrado que a intensidades luminosas superiores a  $200 \mu\text{mol} \text{ fotones } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  se observa un contenido de FC más menor en comparación con intensidades de luz bajas [29].

Las cinéticas de crecimiento (**Fig. 19<sup>a</sup>, Tabla 8**) de los cultivos se iniciaron utilizando un inóculo de  $0.1 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  de biomasa, la cual fue obtenida de cultivos heterótrofos. Estos cultivos se realizaron utilizando glucosa a una concentración de  $10 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ , durante 5 días de cultivo, con un pH inicial de 2, a una temperatura de  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  y una agitación de 200 rpm.



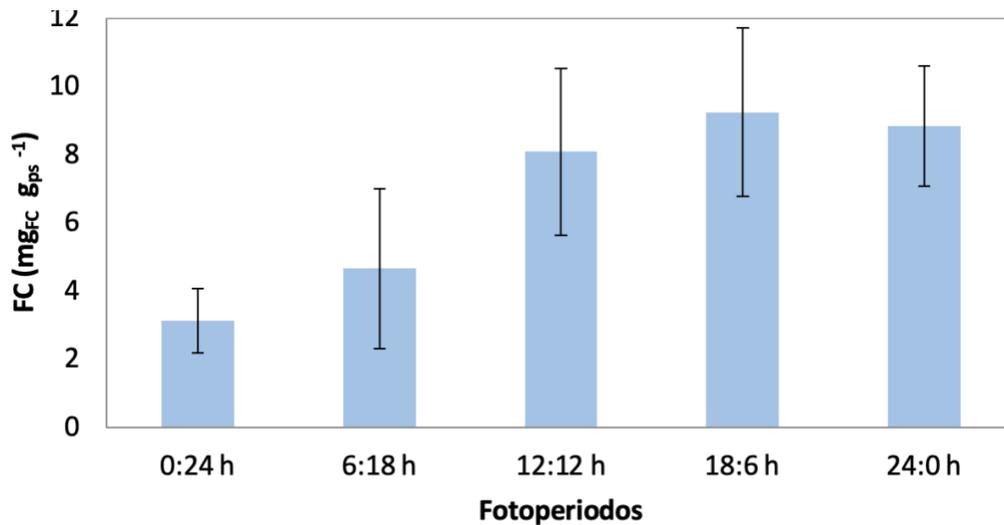
**Figura 19.** Evaluación de fotoperiodos en el A) Crecimiento celular y B) Relación entre el tiempo de exposición a la luz y el crecimiento celular.

El crecimiento de las microalgas en todos los fotoperiodos evaluados muestra cinéticas lineales, lo cual es característico de las microalgas en condiciones autótrofas [19,73]. Además, al comparar las cinéticas se observa un aumento en la velocidad de crecimiento a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz. Este resultado expone una relación lineal entre el crecimiento celular y el tiempo de exposición a la luz, ya que al evaluar la productividad de biomasa con base en el tiempo de exposición de luz en los fotoperiodos (**Fig. 15B**), se obtuvo una pendiente de  $0.0008 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1} \text{ h}_{\text{luz}}^{-1}$  ( $R^2$  de 0.97); este valor equivale a una productividad de biomasa de  $0.8 \text{ ps mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  por hora luz, llegando a una productividad máxima de  $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , considerando que el cultivo se encuentre bajo un régimen de iluminación continua (24 hs).

Es importante tener en cuenta que el resultado obtenido considera únicamente la intensidad de luz utilizada ( $140 \text{ mM fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sin embargo, sí incrementamos la intensidad el resultado podría no ser lineal debido a un efecto de fotoinhibición. Tal es el caso reportado para la cepa *Chlorella pyrenoidosa* donde observó un incremento en la producción de biomasa dependiente al tiempo de exposición a la luz en los fotoperiodos evaluados, este estudio se realizó con una intensidad de 2000 y 4000 luxes ( $\sim 62$  y  $124 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); no obstante, al incrementar la intensidad de luz a 8000 luxes ( $\sim 256 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se observó una disminución en la productividad de biomasa, derivada a un exceso de radiación, la cual inhibe el proceso de fotosíntesis de *C. pyrenoidosa* [74]. Específicamente para *G. sulphuraria* se ha reportado que en condiciones autótrofas esta microalga es capaz de crecer sin inhibición a una intensidad luminosa de  $1,092 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  [75], por lo cual incrementando la intensidad de luz en el rango de 140 y  $1000 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se podrían aumentar los valores de crecimiento celular y productividad de biomasa. No obstante, probablemente repercutiría

negativamente en el contenido de la FC, ya que la biosíntesis de esta proteína se encuentra ligada a bajas intensidades luminosas.

Para evaluar el efecto de los fotoperiodos sobre el contenido de FC a los 15 días del cultivo, se recuperó la biomasa, se realizó la ruptura celular y espectrofotométricamente se cuantificó el contenido de esta proteína soluble (**Fig. 20; Tabla 8**).



**Figura 20.** Efecto de los fotoperiodos en la concentración de FC evaluada al final del cultivo (15 días).

**Tabla 6.** Efecto de los fotoperiodos en la productividad de biomasa y contenido de FC

Fotoperiodo	$Q_p$ (mg <sub>ps</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Biomasa final (g <sub>ps</sub> L <sup>-1</sup> )	FC (mg <sub>FC</sub> g <sub>ps</sub> <sup>-1</sup> )	FC (mg <sub>FC</sub> L <sup>-1</sup> )
0:24 h	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.01	3.12 ± 0.94	0.25 ± 0.07
6:18 h	1.82 ± 0.42	0.13 ± 0.00	4.66 ± 2.34	0.63 ± 0.31
12:12 h	7.57 ± 0.67	0.23 ± 0.01	8.09 ± 2.44	1.85 ± 0.64
18:6 h	12.83 ± 2.8	0.31 ± 0.03	9.24 ± 2.47	2.86 ± 0.46
24:0 h	20.26 ± 1.01	0.39 ± 0.01	8.84 ± 1.77	3.44 ± 0.72

En primera instancia los resultados muestran que partiendo de células provenientes de cultivos heterótrofos es posible incrementar la concentración de FC al exponer la biomasa a condiciones autótrofas; así mismo, se puede observar que similar al crecimiento celular, la acumulación de FC es proporcional al fotoperiodo. Al graficar el contenido de FC ( $\text{mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) presente en las células y compararlos con el tiempo de exposición a la luz ( $h_{\text{luz}}$ ) se puede obtener una línea recta con una  $R^2$  de 0.96 con un valor de pendiente de  $2.179 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1} h_{\text{luz}}^{-1}$ ; para este gráfico no se consideró la concentración obtenida en el fotoperiodo 24:0, ya que las células obtenidas de los cultivos expuestos a 18 y 24 horas de luz alcanzaron la misma concentración de FC ( $9 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1}$ ; **Fig. 20**).

Este resultado sugiere que, en las condiciones evaluadas, la concentración máxima específica de FC alcanzada es de  $9 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1}$ . Para aumentar este valor, será necesario explorar otras estrategias de cultivo. Es importante destacar que la productividad volumétrica de FC está directamente relacionada con la concentración de biomasa, por lo que una estrategia adicional para incrementar la concentración de este pigmento sería lograr una mayor concentración celular.

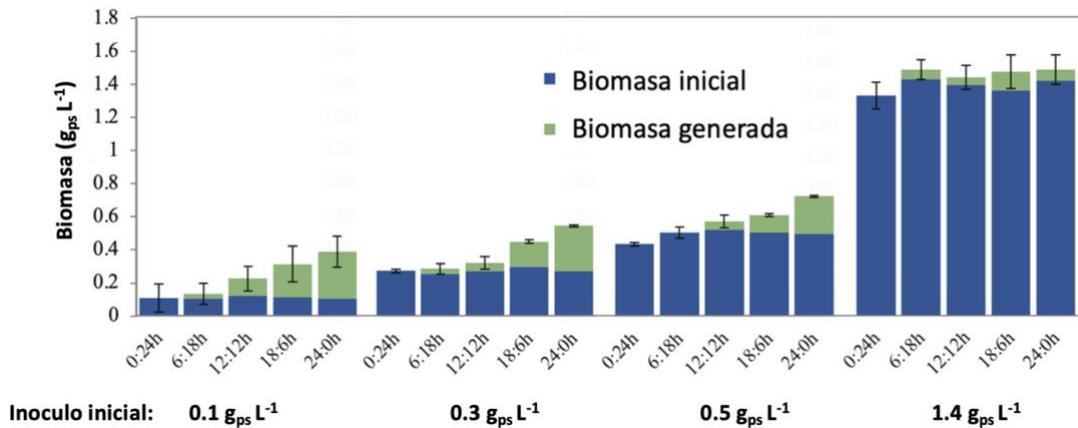
**El efecto de sombreado, provocado por una alta concentración inicial de biomasa, genera un incremento en el contenido de FC.**

El incremento en la concentración de FC en microalgas y cianobacterias ha sido objeto de numerosas investigaciones. Estudios anteriores han demostrado que el uso de baja intensidad luminosa favorece la acumulación de esta proteína. Esto se debe a que la FC forma parte de un complejo accesorio que se acumula en condiciones de limitación de luz (ficobilisoma), con el fin de captar fotones que no son absorbidos por la clorofila [76,77]. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado utilizando intensidades de luz bajas.

En este trabajo, se exploró una estrategia diferente al enfocarse en el uso de altas concentraciones celulares. La hipótesis planteada fue que al generar un cultivo con una carga celular elevada, se limitaría el acceso a la luz debido al efecto de sombreado. De esta manera, se esperaba incrementar la concentración de FC en las células.

En este estudio, se llevó a cabo la evaluación del efecto de sombreado utilizando tres diferentes concentraciones de biomasa inicial: 0.3, 0.5 y 1.4 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>. Estas concentraciones se combinaron con los regímenes de luz previamente mencionados: 0:24, 6:18, 12:12, 18:6 y 24:0 h:h. Los cultivos utilizados como inóculo para estos experimentos se obtuvieron a partir de cultivos heterótrofos que crecieron en un medio con glucosa a una concentración de 10 g<sub>glu</sub> L<sup>-1</sup>.

En una primera etapa, se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de biomasa y fotoperiodos en el crecimiento celular (**Fig. 21**).



**Figura 21.** Efecto de la concentración inicial de biomasa de *G. sulphuraria* y fotoperiodos en la generación de biomasa. Condiciones de cultivo: 140 mM fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, pH 2, 200 rpm, volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL, 15 días de cultivo.

En la figura 21 se pueden observar las concentraciones de biomasa iniciales (azul) y finales (verde), estas últimas cuantificadas a los 15 días de cultivo. La comparación de los resultados revela que un incremento en la concentración inicial de la microalga tiene un impacto negativo en la formación de biomasa, ya que se observa que a una concentración inicial de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  no se obtiene un crecimiento de la microalga.

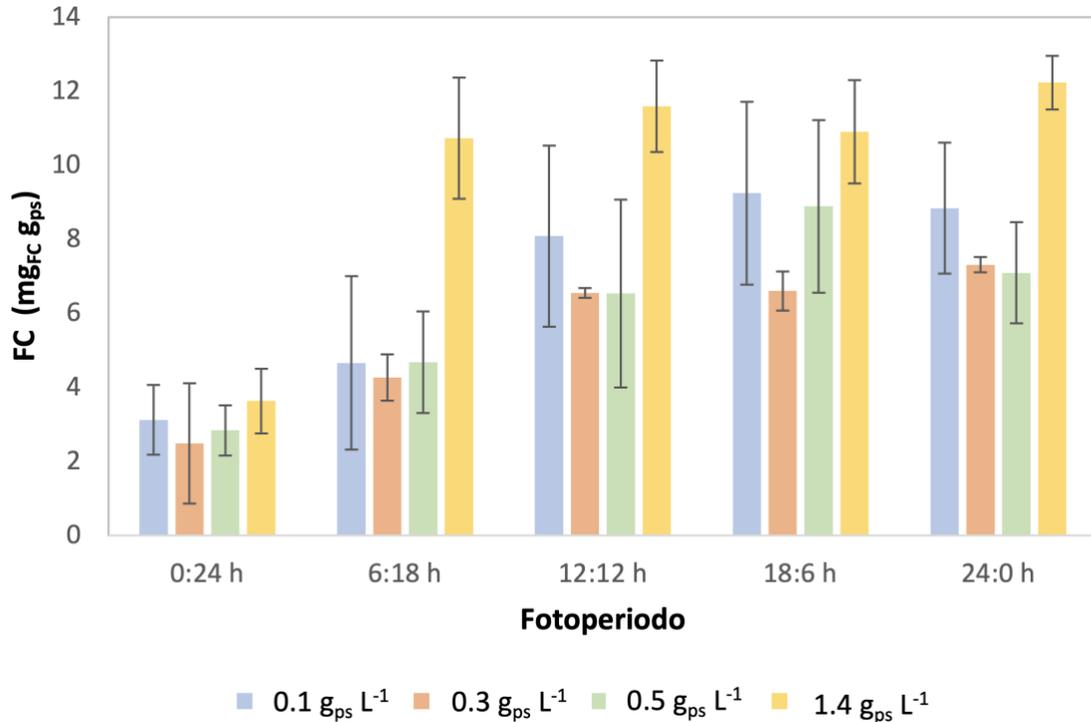
Los cultivos con biomasa inicial de  $0.3 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  y  $0.5 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  exhibieron un crecimiento que mostró una clara dependencia del tiempo de exposición a la luz. Este efecto también se reflejó en la productividad de biomasa, la cual se incrementó proporcionalmente al aumento en el tiempo de exposición. Estos hallazgos son consistentes con los resultados previamente descritos al utilizar una biomasa inicial de  $1 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ .

Al comparar los resultados obtenidos con concentraciones iniciales de  $0.1 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ ,  $0.3 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  y  $0.5 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  de biomasa, se observó una disminución en la productividad de biomasa a medida que aumentaba la concentración del inóculo. Esto indica que la velocidad de crecimiento se ve afectada por la concentración de biomasa. Por otro lado, el cultivo que inició con una concentración de biomasa de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  no presentó un incremento significativo en la biomasa durante los 15 días de cultivo.

Estos resultados sugieren la presencia de un factor limitante para el crecimiento celular. Aunque no se realizó una cuantificación de nutrientes en el medio de cultivo, todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando medio fresco que contiene todos los nutrientes necesarios para alcanzar un crecimiento de biomasa superior a  $6 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, como se ha demostrado en la sección I de esta tesis.

Con base en estos resultados, se puede proponer que la disminución en el crecimiento celular está relacionada con el efecto de sombreado. El efecto de sombreado ha sido previamente evaluado en la microalga *G. sulphuraria*, y se ha observado que la intensidad de luz dentro del cultivo disminuye de manera logarítmica, siguiendo el modelo propuesto por Cornet [78]. Este fenómeno está directamente relacionado con la presencia de una alta concentración celular, lo cual genera una obstrucción a la penetración uniforme de la luz en el cultivo. Como consecuencia, la intensidad de luz expuesta disminuye progresivamente a medida que penetra en el cultivo, afectando así el proceso de fotosíntesis y limitando la disponibilidad de energía necesaria para el crecimiento celular.

Una vez completados los 15 días de cultivo, las células fueron cosechadas y lavadas para posteriormente extraer y cuantificar la FC; la comparación del contenido específico de FC en las condiciones evaluadas se expone en la figura 22. Aunque el crecimiento se vio limitado en las diferentes concentraciones de densidad celular inicial, se logró incrementar la concentración de FC, alcanzando valores por encima a los obtenidos en cultivos sin exposición a la luz ( $9 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ).



**Figura 22.** Efecto de sombreado sobre el contenido de FC aunado al uso de fotoperiodos. Biomasa inicial 0.1, 0.3, 0.5 y 1.4 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos en los cultivos con una concentración inicial de 0.3 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> y 0.5 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> de inóculo muestran una acumulación de FC que está estrechamente relacionada con el tiempo de exposición a la luz. Este mismo efecto fue observado y explicado previamente en los cultivos con un inóculo de 0.1 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>. Además, todas estas variantes de cultivo alcanzaron una concentración máxima de FC.

Estos resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas (140 mM fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 15 días de cultivo y concentraciones iniciales inferiores a 0.5 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>), la concentración máxima de FC alcanzada se acerca a 9 mg<sub>FC</sub> g<sub>ps</sub><sup>-1</sup>. Estos resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente y proporcionan

información importante sobre el potencial de acumulación de FC en las microalgas bajo estas condiciones específicas.

Sin embargo, se observó un comportamiento diferente en los cultivos que comenzaron con una concentración inicial de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ . Estos cultivos lograron alcanzar un contenido de FC un 30% mayor ( $12 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) en comparación con las condiciones evaluadas previamente ( $0.1$ ,  $0.3$  y  $0.5 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ ) donde el contenido máximo alcanzado fue de  $9 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  en cultivos que fueron expuestos durante 24 horas continuas a la luz (régimen 24:0).

Este aumento en el contenido de FC presente en los cultivos con biomasa inicial de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  se encuentran relacionados con la presencia de luz, ya que los cultivos no iluminados presentaron un contenido de FC basal ( $3.63 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ), el cual corresponde al determinado para las muestras que no fueron expuestas a la luz. Esto indica que este incremento de FC no está influenciado únicamente por la alta concentración celular, sino que también está ligado a la presencia de luz.

Cabe resaltar que, todos los cultivos que iniciaron con  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  de biomasa y que fueron expuestos a la luz desde el régimen 6:18 hasta 24:0 (luz:obscuridad) presentaron una concentración de FC similar ( $12 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ). Por lo que se puede concluir que la limitación en el crecimiento tiene un impacto significativo sobre el contenido de FC; este efecto se ha observado en cultivos heterótrofos, donde una limitación en la fuente de carbono orgánica aunado a una alta concentración de sulfato de amonio (fuente de nitrógeno) conlleva a un incremento en la concentración de este pigmento con la concomitante disminución en la biomasa, tal como se describió en la sección I de esta tesis.

La producción volumétrica de FC ( $\text{mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1}$ ) se determinó mediante el cálculo de la biomasa final presente en los cultivos (Tabla 10). Al analizar los datos

obtenidos, se observó que los cultivos con un inóculo de 1.4 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> mostraron los valores más altos en cuanto a concentración volumétrica (mg<sub>FC</sub> L<sup>-1</sup>). Estos cultivos alcanzaron una concentración volumétrica 3, 4 y 5 veces mayor en comparación con los cultivos que iniciaron con una concentración de biomasa de 0.5, 0.3 y 0.1 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabla 7.** Efecto de los fotoperiodos en la concentración volumétrica de FC

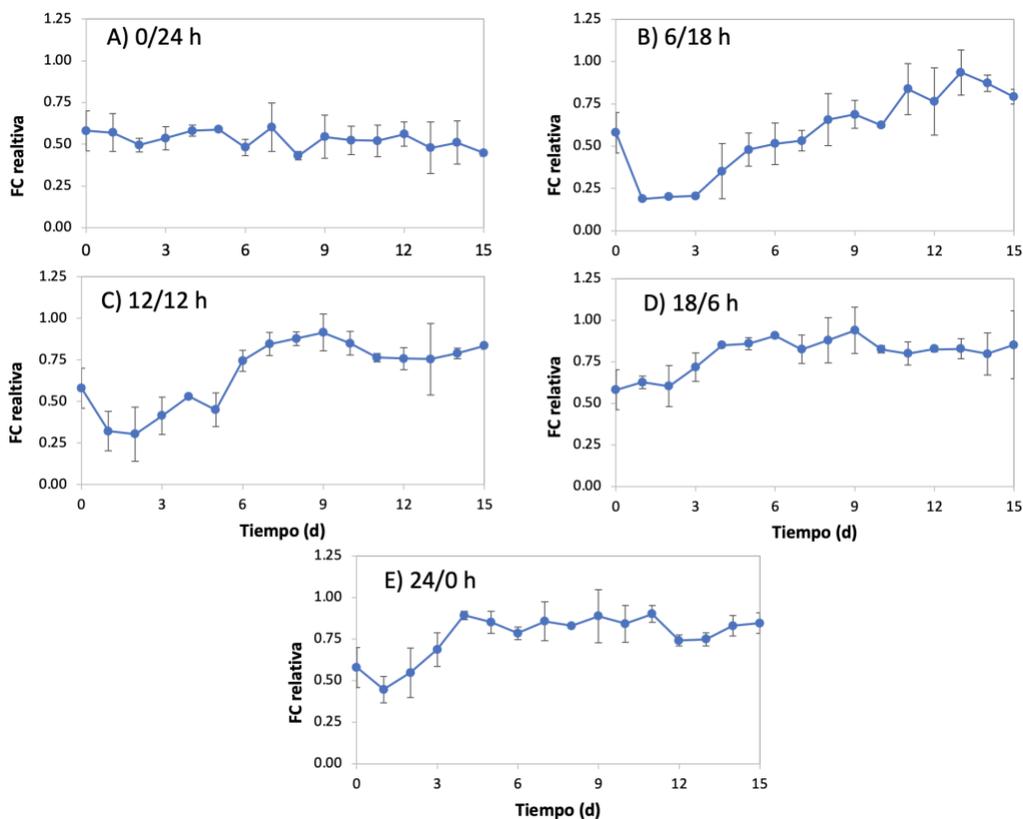
Inoculo	FC (mg <sub>FC</sub> L <sup>-1</sup> )				
	0:24 h	6:18 h	12:12 h	18:6 h	24:0 h
0.1 g L <sup>-1</sup>	0.27	0.63	1.88	2.75	3.47
0.3 g L <sup>-1</sup>	0.53	1.24	2.07	2.96	3.91
0.5 g L <sup>-1</sup>	1.01	2.08	3.74	5.41	5.11
1.4 g L <sup>-1</sup>	4.61	15.63	17.76	17.53	20.02

En contraste, en los cultivos que iniciaron con una concentración de biomasa de 1.4 g L<sup>-1</sup> mostraron que la concentración de FC no presentaba una relación directa con los intervalos de exposición a la luz (fotoperiodos), lo cual difiere del comportamiento observado anteriormente, donde se reportó una relación lineal entre la concentración de FC y el tiempo de exposición a la luz. Una posible explicación para este comportamiento es que la velocidad de acumulación de FC pudo haber sido afectada por la alta densidad celular. Además, debido a que solo se realizaron mediciones al inicio y después de 15 días de cultivo, no fue posible observar cambios significativos en relación con los regímenes de luz evaluados. En consecuencia, para evaluar la velocidad de acumulación de FC de manera más precisa, se llevaron a cabo experimentos en los que se cuantificó la concentración de FC en células completas cada 24 horas, en lugar de realizar mediciones únicamente a los 15 días.

La cinética de acumulación de FC se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa de FC contenida en las células completas utilizando técnicas espectrofotométricas [46].

En este estudio, se evaluaron los fotoperiodos mencionados anteriormente, pero se enfocó exclusivamente en la concentración inicial de biomasa de 1.4 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>, ya que los valores más altos de FC se obtuvieron en este grupo. La Figura 23 muestra la acumulación de FC a lo largo del tiempo. La concentración de FC se determinó mediante un método de célula completa, del cual se obtienen valores de “FC relativa”. Es importante tener en cuenta que esta cuantificación no es exacta debido a las interferencias ocasionadas por otros compuestos absorbentes de luz dentro de la célula. De este modo, la concentración de FC relativa fue calculada mediante la **ecuación 3**, para la cual se tomó como referencia la concentración máxima en el método de cuantificación de FC en célula completa.

$$FC \text{ relativa} = \frac{\text{Concentración de FC de la muestra}}{\text{Concentración de FC máxima}} \quad \text{ecuación 3}$$



**Figura 23.** Cinéticas de acumulación relativa de FC con base en su tiempo de exposición a la luz ( $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  biomasa inicial). Condiciones de cultivo:  $140 \text{ m}^2 \text{ fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH inicial de 2, volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL, 15 días de cultivo.

Es importante destacar que al final del cultivo de 15 días, se llevó a cabo un procedimiento de ruptura celular para extraer y cuantificar la ficocianina (FC). Este método de extracción y cuantificación de FC ha sido utilizado de manera consistente en todo el trabajo previo. Los resultados mostraron una concentración máxima de FC similar de entre  $11$  y  $12 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  en todos los fotoperiodos expuestos a la luz. Sin embargo, en las cinéticas de acumulación los resultados se comportan de manera diferente para cada fotoperiodo. En los cultivos iluminados de forma continua (24:0) alcanzaron su concentración máxima a los 4 días, mientras que en los fotoperiodos 18:6, 12:12 y 6:18 h, la concentración máxima se alcanzó a los 6, 9 y 13 días, respectivamente (**Fig. 23**),

cabe destacar que el cultivo sin exposición a la luz (0:24) no presentó una variación en el contenido de FC.

Los resultados indican que existe una tendencia lineal entre la acumulación de FC y el tiempo de exposición a la luz. Indicando nuevamente que la biosíntesis de FC en *G. sulphuraria* se encuentra íntimamente ligada a la presencia de la luz.

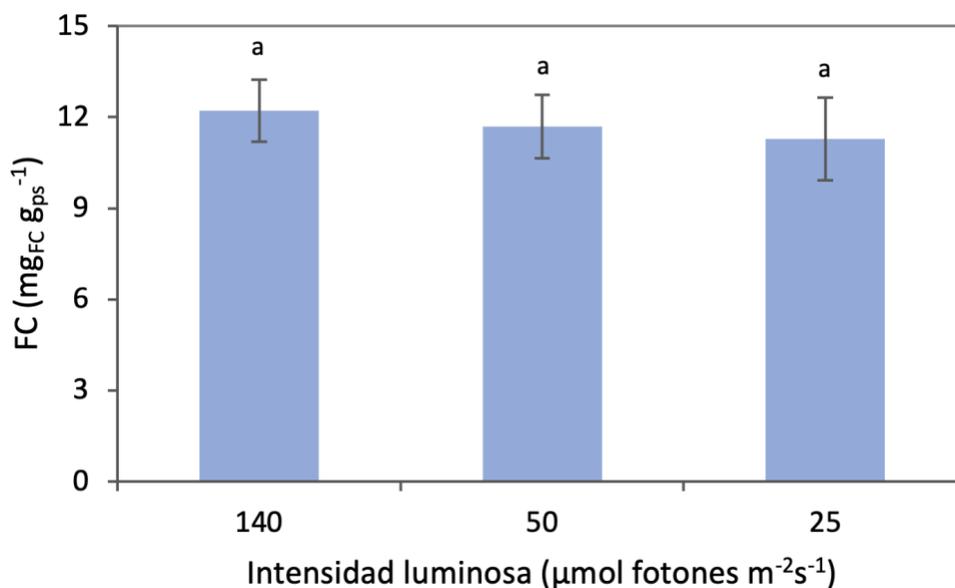
Teniendo en cuenta estos datos, es posible calcular la productividad de FC (**Tabla 10**) y podemos concluir que la acumulación de FC es dependiente de la luz, ya que se llega a una concentración máxima cercana a  $12 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  en la condición de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  de biomasa inicial en todos los cultivos expuestos a la luz con una contracción volumétrica promedio de  $16.9 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1}$ , partiendo de un cultivo heterotrófico saturado de biomasa y posteriormente incubado en lote bajo condiciones autótrofas con una intensidad de luz constante de  $140 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Estos resultados respaldan la dependencia de la acumulación de FC con respecto a la luz, lo cual demuestra la capacidad de obtener altas concentraciones de FC a través de la estrategia de incrementar la biomasa a partir de cultivos heterótrofos y posteriormente aumentar la concentración de FC en las células.

**Tabla 8.** Efecto de los fotoperiodos en la productividad volumétrica de FC

Fotoperiodo (Luz:oscuridad)	FC ( $\text{mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1}$ )	Tiempo en que llega a la concentración máxima (d)	$Q_{\text{p}} \text{ FC}$ ( $\text{mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )
0:24 h	5.08	15	0.34
6:18 h	15.62	13	1.20
12:12 h	16.24	8	2.03
18:6 h	15.27	6	2.55
24:0 h	17.12	4	4.28

## Intensidades de luz menores a $140 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no presentaron cambios significativos en la acumulación de FC

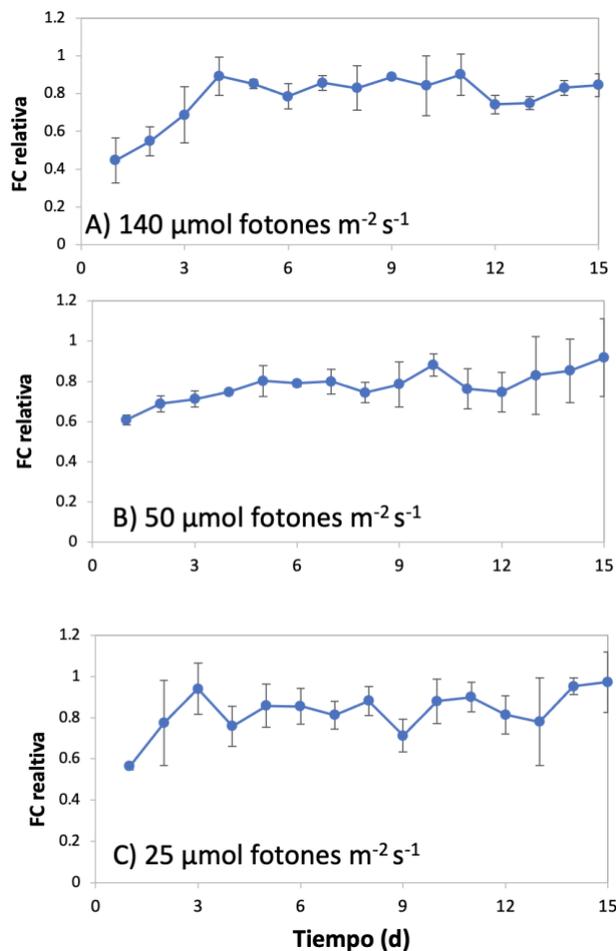
Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la acumulación de FC relativa utilizando diferentes intensidades de luz ( $25$  y  $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), una concentración inicial de biomasa de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  y un régimen de iluminación continua (24:0). Estos resultados se compararon con los obtenidos previamente a una intensidad de  $140 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los datos revelan que no hubo un crecimiento significativo de biomasa en las tres intensidades de luz evaluadas. Además, se observó que se alcanzó la misma concentración de FC en un plazo de 3 a 4 días (**Fig. 24**).



**Figura 24.** Efecto de la intensidad luminosa en el contenido de FC utilizando una concentración de biomasa de  $1.4 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$  expuesto a luz continua durante 15 días de cultivo.

Al no observarse una diferencia en la productividad de FC entre las 3 intensidades de luz estudiadas, se concluye que el efecto de sombreado y limitación de crecimiento son los factores críticos, ya que limitan el acceso a la luz y generan un estrés en la célula lo cual provoca la acumulación de esta proteína. Actualmente no se

conoce el mecanismo por el cual se incrementa la biosíntesis de FC bajo condiciones de estrés; sin embargo, existen reportes donde muestran que la limitación de crecimiento en cultivos heterótrofos [13,29] y en este estudio bajo condiciones autótrofas generan un impacto positivo en la acumulación de la FC.



**Figura 25.** Cinéticas de acumulación de FC en cultivos autótrofos iluminado permanentemente con A) 140, B) 50 y C) 25 μmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (concentración inicial de 1.4 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>).

En los cultivos evaluados, no se observó un crecimiento significativo debido al efecto de sombreado descrito anteriormente. Sin embargo, se encontró que el contenido de FC a los 15 días de cultivo fue de 12.22, 11.69 y 11.28  $\text{mg}_{\text{FC}} \text{g}_{\text{ps}}^{-1}$  para las intensidades de luz de 140, 50 y 25  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente (**Fig. 25**). Estos resultados indican que la intensidad luminosa no tuvo un efecto en la acumulación de FC al realizar la cuantificación a los 15 días de cultivo. En términos de productividad, se obtuvo una tasa constante y sostenible de FC, con valores que oscilaron entre 4 y 5.45  $\text{mg}_{\text{FC}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Estos hallazgos sugieren que es posible lograr una acumulación eficiente de FC a tasas constantes, incluso a intensidades de luz más bajas.

## Conclusiones de las estrategias para incrementar el contenido de FC mediante cultivos autótrofos en *G. sulphuraria* UTEX 2919

- Se demostró que el crecimiento de *G. sulphuraria* en condiciones autotróficas está directamente relacionado con el tiempo de exposición a la luz, observándose una correlación positiva entre el tiempo de exposición a la luz y el crecimiento de la microalga. Esta relación proporcional permite mejorar la productividad biomasa y FC con *G. sulphuraria*.
- Se encontró que la implementación de estrategias de limitación de luz basadas en el efecto de sombreado, derivado de una alta concentración celular inicial, tiene un impacto significativo en la producción de FC. Esta estrategia resultó en un incremento del 30% en el contenido final de FC, con una productividad volumétrica ( $Q_p$ ) de FC de  $4.28 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Este  $Q_p$  equivale a un aumento de 18 veces en comparación con los cultivos autótrofos con baja concentración de inóculo ( $1 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}$ ).

## Conclusiones generales

*Galdieria sulphuraria* presenta una preferencia en el uso de sustratos, consumiendo preferentemente el ácido acético, seguido por la glucosa y posteriormente las pentosas (xilosa y arabinosa). Sin embargo, el ácido acético puede ser metabolizado solo cuando hay concentraciones iniciales menores a  $0.6 \text{ g}_{\text{Ac. acético}} \text{ L}^{-1}$ . Por otro lado, el metabolismo de la xilosa presenta un aporte energético menor en comparación con el aportado por la glucosa. Sin embargo, en comparación con la heterotrofia, en condiciones mixotróficas existe un aumento de la productividad de biomasa usando xilosa, posiblemente debido a la producción de NADPH derivado de la fotosíntesis. Dado que los cultivos de glucosa acumularon un 120% más de FC en comparación con la xilosa, se puede concluir que la acumulación de FC está ligada a la fuente de carbono, la cual tiene un impacto sobre los metabolitos de reserva que comprenden la biomasa. Finalmente, *G. sulphuraria* 2919 puede crecer utilizando los hidrolizados glucano-enzimáticos del rastrojo de maíz como fuente de carbono, y acumular FC en concentración similar a las obtenidas con la glucosa como única fuente de carbono.

Los resultados utilizando fotoperiodos mostraron que a medida que se aumenta el tiempo de exposición a la luz, tanto el crecimiento celular como la acumulación de FC aumentan. Por otro lado, se encontró que una intensidad de luz inferior a  $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  no tuvo efecto en el contenido de FC. Sin embargo, el efecto de sombreado generado por una alta concentración celular inicial resultó en un incremento del 30% en la acumulación de FC en comparación con las células sin limitación de luz ( $12 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$  vs  $7.75 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ , respectivamente). Estos resultados indican que es posible utilizar biomasa de cultivos heterótrofos como

inóculo para producir FC en cultivos autótrofos, logrando una productividad ( $Q_p$ ) de  $4.28 \text{ mg}_{\text{FC}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] K.J.M. Mulders, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.H. Wijffels, Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities, *J. Phycol.* 50 (2014) 229–242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>.
- [2] A.N. Glazer, J.H. Clark, Phycobilisomes: Macromolecular structure and energy flow dynamics, *Biophys. J.* 49 (1986) 115–116. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83616-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83616-5).
- [3] D.A. Bryant, G. Guglielmi, N.T. de Marsac, A.M. Castets, G. Cohen-Bazire, The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model, *Arch. Microbiol.* 123 (1979) 113–127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>.
- [4] D. Morales-Sánchez, O.A. Martínez-Rodríguez, J. Kyndt, A. Martínez, Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>.
- [5] R.R. Sonani, Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins, *World J. Biol. Chem.* 7 (2016) 100. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>.
- [6] S. Sekar, M. Chandramohan, Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization, *J. Appl. Phycol.* 20 (2008) 113–136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>.
- [7] N.T. Eriksen, Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>.
- [8] T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, *Brock biology of microorganisms*, 10th ed., Prentice-Hall, 2003.
- [9] A. Reyes-Prieto, A.P.M. Weber, D. Bhattacharya, The origin and establishment of the plastid in algae and plants, *Annu. Rev. Genet.* 41 (2007) 147–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>.
- [10] P. Albertano, C. Ciniglia, G. Pinto, A. Pollio, The taxonomic position of Cyanidium, Cyanidioschyzon and Galdieria: An update, *Hydrobiologia.* 433 (2000) 137–143. <https://doi.org/10.1023/A:1004031123806>.
- [11] C. Oesterhelt, C. Schnarrenberger, W. Gross, Characterization of a sugar / polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*, *Eur. J. Phycol.* 34 (1999) 271–277. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736322>.
- [12] C. Gaignard, N. Gargouch, P. Dubessay, C. Delattre, G. Pierre, C. Laroche, I. Fendri, S. Abdelkafi, P. Michaud, New horizons in culture and valorization of red microalgae, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 193–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>.
- [13] W. Gross, C. Schnarrenberger, Heterotrophic growth of two strains of the acidothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Plant Cell Physiol.* 36 (1995) 633–638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>.

- [14] C. Rigano, A. Fuggi, V.D.M. Rigano, G. Aliotta, Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*, Arch. Microbiol. 107 (1976) 133–138. <https://doi.org/10.1007/BF00446832>.
- [15] S. Cozzolino, P. Caputo, O. De Castro, A. Moretti, G. Pinto, Molecular variation in *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) merola and its bearing on taxonomy, Hydrobiologia. 433 (2000) 145–151. <https://doi.org/10.1023/A:1004035224715>.
- [16] D.Y. Rahman, F.D. Sarian, A. van Wijk, M. Martinez-Garcia, M.J.E.C. van der Maarel, Thermostable phycocyanin from the red microalga *Cyanidioschyzon merolae*, a new natural blue food colorant, J. Appl. Phycol. 29 (2017) 1233–1239. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1007-0>.
- [17] M. Moon, S.K. Mishra, C.W. Kim, W.I. Suh, M.S. Park, J.W. Yang, Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*, Korean J. Chem. Eng. 31 (2014) 490–495. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0239-9>.
- [18] S. Carfagna, V. Landi, F. Coraggio, G. Salbitani, V. Vona, G. Pinto, A. Pollio, C. Ciniglia, Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic *Galdieria phlegrea*, Algal Res. 31 (2018) 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.030>.
- [19] K. Chojnacka, A. Noworyta, Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures, Enzyme Microb. Technol. 34 (2004) 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.002>.
- [20] G.Q. Chen, F. Chen, Growing phototrophic cells without light, Biotechnol. Lett. 28 (2006) 607–616. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0025-4>.
- [21] A. Fiechter, W. Seghezzi, Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, J. Biotechnol. 27 (1992) 27–45. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90028-8).
- [22] K.Y. Lee, Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential, Eur. J. Pharmacol. 12 (2001) 307–315. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01417-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01417-9).
- [23] O.S. Graverholt, N.T. Eriksen, Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (2007) 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>.
- [24] D. Morales-Sánchez, R. Tinoco-Valencia, M.A. Caro-Bermúdez, A. Martinez, Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation, Algal Res. 5 (2014) 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.05.006>.
- [25] A. Patel, L. Matsakas, U. Rova, P. Christakopoulos, Heterotrophic cultivation of *Auxenochlorella protothecoides* using forest biomass as a feedstock for sustainable biodiesel production, Biotechnol. Biofuels. 11 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1173-1>.
- [26] N.R. Boyle, J.A. Morgan, Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, BMC Syst. Biol. 3 (2009) 1–14. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-4>.
- [27] S. Babuskin, K. Radhakrishnan, P.A.S. Babu, M. Sivarajan, M. Sukumar, Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*, Biotechnol. Lett. 36 (2014) 1653–1660. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1517-2>.

- [28] C. Oesterhelt, E. Schmäzlin, J.M. Schmitt, H. Lokstein, Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Plant J.* 51 (2007) 500–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>.
- [29] J.K. Sloth, M.G. Wiebe, N.T. Eriksen, Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>.
- [30] M. Wan, Z. Wang, Z. Zhang, J. Wang, S. Li, A. Yu, Y. Li, A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*, *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>.
- [31] M. Raeisossadati, N.R. Moheimani, D. Parlevliet, Red and blue luminescent solar concentrators for increasing *Arthrospira platensis* biomass and phycocyanin productivity in outdoor raceway ponds, *Bioresour. Technol.* 291 (2019) 121801. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121801>.
- [32] F.D. Sarian, D.Y. Rahman, O. Schepers, M.J.E.C. Van Der Maarel, Effects of oxygen limitation on the biosynthesis of photo pigments in the red microalgae *Galdieria sulphuraria* strain 074G, *PLoS One.* 11 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148358>.
- [33] R.A. Schmidt, M.G. Wiebe, N.T. Eriksen, Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*, *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005) 77–84. <https://doi.org/10.1002/bit.20417>.
- [34] M. Azizi, M.A. Hejazi, M. Hashemi, Supplementation with polyalcohols and sequential mixotrophy dilution photoinduction strategy boost the accumulation of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*, *Aquaculture.* 511 (2019) 734225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734225>.
- [35] J.C. Park, S.P. Choi, M.E. Hong, S.J. Sim, Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (2014) 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>.
- [36] H. Begum, F.M.D. Yusoff, S. Banerjee, H. Khatoun, M. Shariff, Availability and utilization of pigments from microalgae, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 (2016) 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>.
- [37] D. da F. Prates, E.M. Radmann, J.H. Duarte, M.G. de Morais, J.A.V. Costa, Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production, *Bioresour. Technol.* 256 (2018) 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>.
- [38] R. Dineshkumar, G. Subramanian, S.K. Dash, R. Sen, Development of an optimal light-feeding strategy coupled with semi-continuous reactor operation for simultaneous improvement of microalgal photosynthetic efficiency, lutein production and CO<sub>2</sub> sequestration, *Biochem. Eng. J.* 113 (2016) 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.011>.
- [39] R. Ma, X. Zhao, Y. Xie, S.H. Ho, J. Chen, Enhancing lutein productivity of *Chlamydomonas* sp. via high-intensity light exposure with corresponding carotenogenic genes expression profiles, *Bioresour. Technol.* 275 (2019) 416–420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.109>.

- [40] Y. Pu, N. Jiang, A.J. Ragauskas, Ionic liquid as a green solvent for lignin, *J. Wood Chem. Technol.* 27 (2007) 23–33. <https://doi.org/10.1080/02773810701282330>.
- [41] P. Béguin, A. Jean-Paul, The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994) 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>.
- [42] V.K. Ponnusamy, D.D. Nguyen, J. Dharmaraja, S. Shobana, J.R. Banu, R.G. Saratale, S.W. Chang, G. Kumar, A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential, *Bioresour. Technol.* 271 (2019) 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>.
- [43] A. Vargas-Tah, C.L. Moss-Acosta, B. Trujillo-Martinez, A. Tiessen, E. Lozoya-Gloria, M. Orenco-Trejo, G. Gosset, A. Martinez, Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.036>.
- [44] S.P. Slocombe, M. Ross, N. Thomas, S. McNeill, M.S. Stanley, A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass, *Bioresour. Technol.* 129 (2013) 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>.
- [45] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L.A. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 191 (1951) 265–275.
- [46] A. Nagarajan, M. Zhou, A.Y. Nguyen, M. Liberton, K. Kedia, T. Shi, P. Piehowski, A. Shukla, T.L. Fillmore, C. Nicora, R.D. Smith, D.W. Koppelaar, J.M. Jacobs, H.B. Pakrasi, Proteomic insights into phycobilisome degradation, a selective and tightly controlled process in the fast-growing cyanobacterium *synechococcus elongatus* UTEX 2973, *Biomolecules.* 9 (2019) 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom9080374>.
- [47] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J.B. Williams, E.F. Meyer, M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures, *Eur. J. Biochem.* 80 (1977) 319–324. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x>.
- [48] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. De Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- [49] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>.
- [50] Y.R. Li, W.T. Tsai, Y.C. Hsu, M.Z. Xie, J.J. Chen, Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production, *Energy Procedia.* 52 (2014) 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.088>.
- [51] C. Yeesang, B. Cheirsilp, Low-cost production of green *microalga Botryococcus braunii* biomass with high lipid content through mixotrophic and photoautotrophic cultivation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174 (2014) 116–129. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1041-9>.

- [52] G.H. Gim, J. Ryu, M.J. Kim, P. Il Kim, S.W. Kim, Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43 (2016) 605–616. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1741-y>.
- [53] H. Yu, S. Jia, Y. Dai, Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation, *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 127–133. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9341-5>.
- [54] G.H. Gim, J.K. Kim, H.S. Kim, M.N. Kathiravan, H. Yang, S.H. Jeong, S.W. Kim, Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (2014) 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0920-8>.
- [55] Z. Zhao, S. Ma, A. Li, P. Liu, M. Wang, Effects of trophic modes, carbon sources, and salinity on the cell growth and lipid accumulation of tropic ocean oilgae strain *Desmodesmus* sp. WC08, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180 (2016) 452–463. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2109-5>.
- [56] T. Ogawa, S. Aiba, Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 1121–1132. <https://doi.org/10.1002/bit.260230519>.
- [57] G. Lalibertè, J. de la Nouïe, Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Cmloroimiyckak) on acetate, *J. Phycol.* 29 (1993) 612–620. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00612.x>.
- [58] A. Guldhe, F.A. Ansari, P. Singh, F. Bux, Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation, *Ecol. Eng.* 99 (2017) 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>.
- [59] Y. Liang, N. Sarkany, Y. Cui, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>.
- [60] E.M. Quistgaard, C. Löw, F. Guettou, P. Nordlund, Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 123–132. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>.
- [61] P.A. Paulsen, T.F. Custódio, B.P. Pedersen, Crystal structure of the plant symporter STP10 illuminates sugar uptake mechanism in monosaccharide transporter superfamily, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08176-9>.
- [62] R. Stadler, K. Wolf, C. Hilgarth, W. Tanner, N. Sauer, Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter and cloning of a co-induced galactose-H<sup>+</sup> symporter, *Plant Physiol.* 107 (1995) 33–41. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.33>.
- [63] Z. Zhao, M. Xian, M. Liu, G. Zhao, Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms, *Biotechnol. Biofuels.* 13 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>.
- [64] Y. Zheng, X. Yu, T. Li, X. Xiong, S. Chen, Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP<sup>+</sup>-linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous

- microalga *Chlorella sorokiniana*, *Biotechnol. Biofuels.* 7 (2014) 1–8.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-014-0125-7>.
- [65] G. Graziani, S. Schiavo, M.A. Nicolai, S. Buono, V. Fogliano, G. Pinto, A. Pollio, Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*, *Food Funct.* 4 (2013) 144–152. <https://doi.org/10.1039/c2fo30198a>.
- [66] A. Avci, B.C. Saha, B.S. Dien, G.J. Kennedy, M.A. Cotta, Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresour. Technol.* 130 (2013) 603–612.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.104>.
- [67] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification, *Bioresour. Technol.* 74 (2000) 17–24.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1).
- [68] A. Martinez, M.E. Rodriguez, M.L. Wells, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram, Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime, *Biotechnol. Prog.* 17 (2001) 287–293. <https://doi.org/10.1021/bp0001720>.
- [69] M.E. Pampulha, M.C. Loureiro-Dias, Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) 547–550.  
<https://doi.org/10.1007/BF00270792>.
- [70] E.J. Cohn, F.F. Heyroth, M.F. Menkin, The dissociation constant of acetic acid of the ions in certain acetate solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 50 (1927) 696.  
<https://doi.org/10.1021/ja01390a012>.
- [71] S.K. Mishra, A. Shrivastav, R.R. Maurya, S.K. Patidar, S. Haldar, S. Mishra, Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India, *Protein Expr. Purif.* 81 (2012) 5–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.011>.
- [72] M. Morançais, J.L. Mouget, J. Dumay, *Proteins and pigments*, Elsevier Inc., 2018.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00007-4>.
- [73] A.K. Patel, J.M. Joun, M.E. Hong, S.J. Sim, Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae, *Bioresour. Technol.* 282 (2019) 245–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.024>.
- [74] T.J. Gunawan, Y. Ikhwan, F. Restuhadi, U. Pato, Effect of light Intensity and photoperiod on growth of *Chlorella pyrenoidosa* and CO<sub>2</sub> Biofixation, *E3S Web Conf.* 31 (2018) 1–7.  
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183103003>.
- [75] H. Wang, Z. Zhang, M. Wan, R. Wang, J. Huang, K. Zhang, J. Guo, W. Bai, Y. Li, Comparative study on light attenuation models of *Galdieria sulphuraria* for efficient production of phycocyanin, *J. Appl. Phycol.* 32 (2020) 165–174. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01982-8>.
- [76] E. Manirafasha, T. Murwanashyaka, T. Ndikubwimana, N. Rashid Ahmed, J. Liu, Y. Lu, X. Zeng, X. Ling, K. Jing, Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch, *Bioresour. Technol.* 255 (2018) 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.068>.

- [77] D. McGee, L. Archer, G.T.A. Fleming, E. Gillespie, N. Touzet, Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae, *Photosynth. Res.* 143 (2020) 67–80. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00686-x>.
- [78] J.F. Cornet, C.G. Dussap, J.B. Gros, Conversion of radiant light energy in photobioreactors, *AIChE J.* 40 (1994) 1055–1066. <https://doi.org/10.1002/aic.690400616>.
- [79] T.R. Ahammad, S. Z.; Gomes, J.; Sreekrishnan, Wastewater treatment for production of H<sub>2</sub>S-free biogas, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 1163–1169. <https://doi.org/10.1002/jctb.1927>.
- [80] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, S. Ying-xue, Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5494–5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.
- [81] V. Koch, H.M. Rüffer, K. Schügerl, E. Innertsberger, H. Menzel, J. Weis, Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors, *Process Biochem.* 30 (1995) 435–446. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00029-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00029-8).

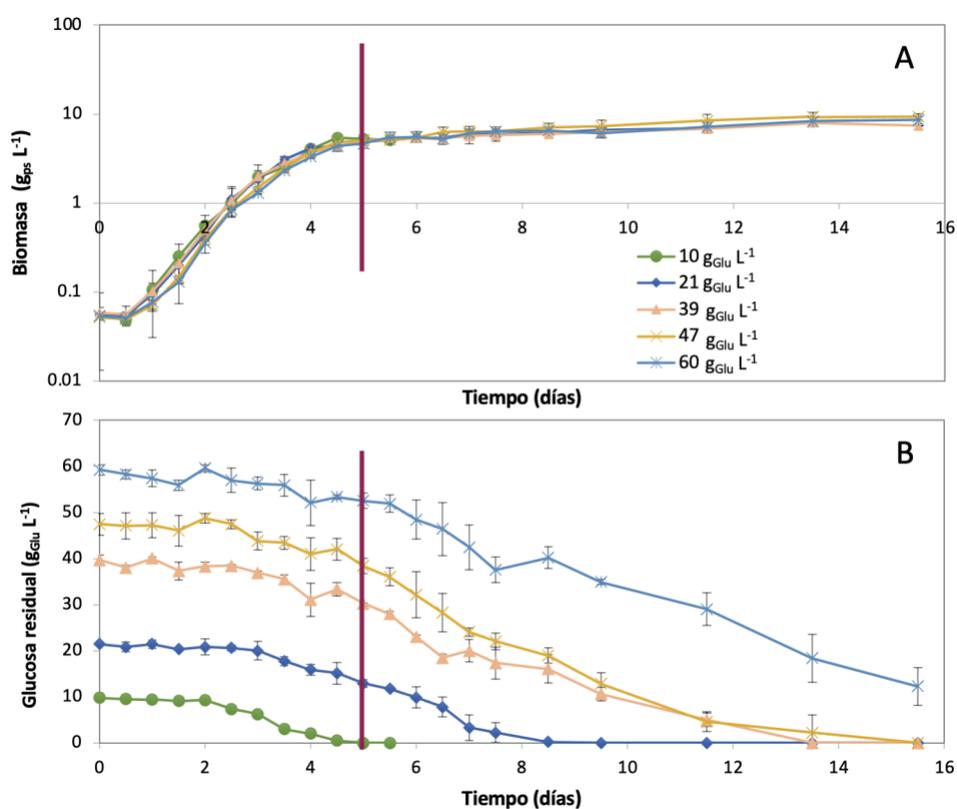
## ANEXO I: Producción de biomasa en biorreactores de 5 y 10 L

### Estudio de la limitación de nutrientes en el crecimiento de *G. sulphuraria 2919*

Con el objetivo de aumentar la concentración de biomasa en cultivos heterótrofos, se llevó a cabo una evaluación de concentraciones de glucosa en el rango de 10 a 60 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup>. Esta evaluación se realizó utilizando el mismo medio mineral basal descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos (**Fig. A1, Tabla A1**), revelan que la microalga experimentó un crecimiento exponencial desde el inicio y hasta el quinto día de cultivo. En este punto, se observó que la biomasa promedio alcanzó un valor de  $5.5 \pm 0.32$  g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup>, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de glucosa evaluadas, según se confirmó mediante pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. Estos resultados sugieren que el crecimiento de la microalga no está influenciado por la concentración de glucosa utilizada, tanto en términos de la cantidad de biomasa formada como en la velocidad de crecimiento.

Después de los cinco días de cultivo, se observó una fase estacionaria en el crecimiento de la microalga, lo cual indica la presencia de un nutriente limitante a pesar de que aún haya glucosa en el medio de cultivo. En este sentido, es importante destacar que la concentración de nitrógeno utilizada (1.5 g<sub>Sulf. amonio</sub> g L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio) en relación a 10 g<sub>Glu</sub> g L<sup>-1</sup> de glucosa resulta en una relación molar de C:N de 14.4:1. Esto sugiere con base en reportes con esta microalga que el nitrógeno no puede ser el sustrato limitante en el crecimiento de la microalga [13,29].

Después de los cinco días de cultivo, independientemente de la concentración inicial de glucosa, se observó que la microalga continuó consumiendo glucosa (en concentraciones de 20-50  $\text{g}_{\text{Glu}} \text{L}^{-1}$ ) y la biomasa incrementó a una velocidad lineal de 0.2-0.43  $\text{g}_{\text{ps}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Al mismo tiempo, la glucosa fue consumida a una velocidad volumétrica de 2.7-3.6  $\text{g}_{\text{Glu}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Estos resultados indican que la microalga sigue utilizando la glucosa disponible en el medio como fuente de carbono.



**Figura A 1.** Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento heterotrófico de la microalga *G. sulphuraria* 2919. A) crecimiento celular, B) glucosa residual. Condiciones de cultivo: pH inicial 2, 42 °C, 200 rpm, volumen de trabajo 300 mL en matraces con mamparas con un volumen nominal de 500 mL.

Tabla A 1. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos heterótrofos obtenidos en la fase exponencial evaluando diferentes concentraciones iniciales de glucosa

Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>ps</sub> g <sub>Glc</sub> <sup>-1</sup> )	$q_{Glc}$ (g <sub>Glu</sub> g <sub>bio</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$Q_{Glc}$ (g <sub>Glc</sub> d <sup>-1</sup> )
10	1.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.06
21	1.41 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.59 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.09
39	1.43 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.67 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.11
47	1.45 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.56 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02
60	1.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.04

Aunque se observó una limitación en la velocidad de crecimiento debido a la posible presencia de un nutriente limitante, los resultados sugieren que la microalga pudo utilizar la glucosa para mantener su viabilidad a través de la generación de ATP y CO<sub>2</sub>, o posiblemente para acumular metabolitos de reserva como lípidos o carbohidratos. Sin embargo, en esta parte del estudio no se realizaron análisis específicos para determinar la acumulación de estos metabolitos ya que el enfoque principal de estas evaluaciones fue incrementar la concentración de biomasa de la microalga con un rendimiento similar al obtenido cuando se utilizan 10 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup> de glucosa en condiciones heterotróficas ( $Y_{X/S} \sim 0.6$  g<sub>ps</sub> g<sub>glucosa</sub><sup>-1</sup>).

En el estudio realizado por Wan *et al.* en 2016, se logró producir 18 g<sub>ps</sub> L<sup>-1</sup> de biomasa utilizando la cepa 074G de *G. sulphuraria* y una concentración de 35 g L<sup>-1</sup> de glucosa, con condiciones de cultivo similares a las utilizadas en la presente tesis, como matraces de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL y el mismo medio mineral. Sin embargo, en ese estudio se empleó una concentración de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 2.25 g<sub>Sulf. amonio</sub> L<sup>-1</sup>, mayor a los 1.5 g<sub>Sulf. amonio</sub> L<sup>-1</sup> utilizados en esta tesis.

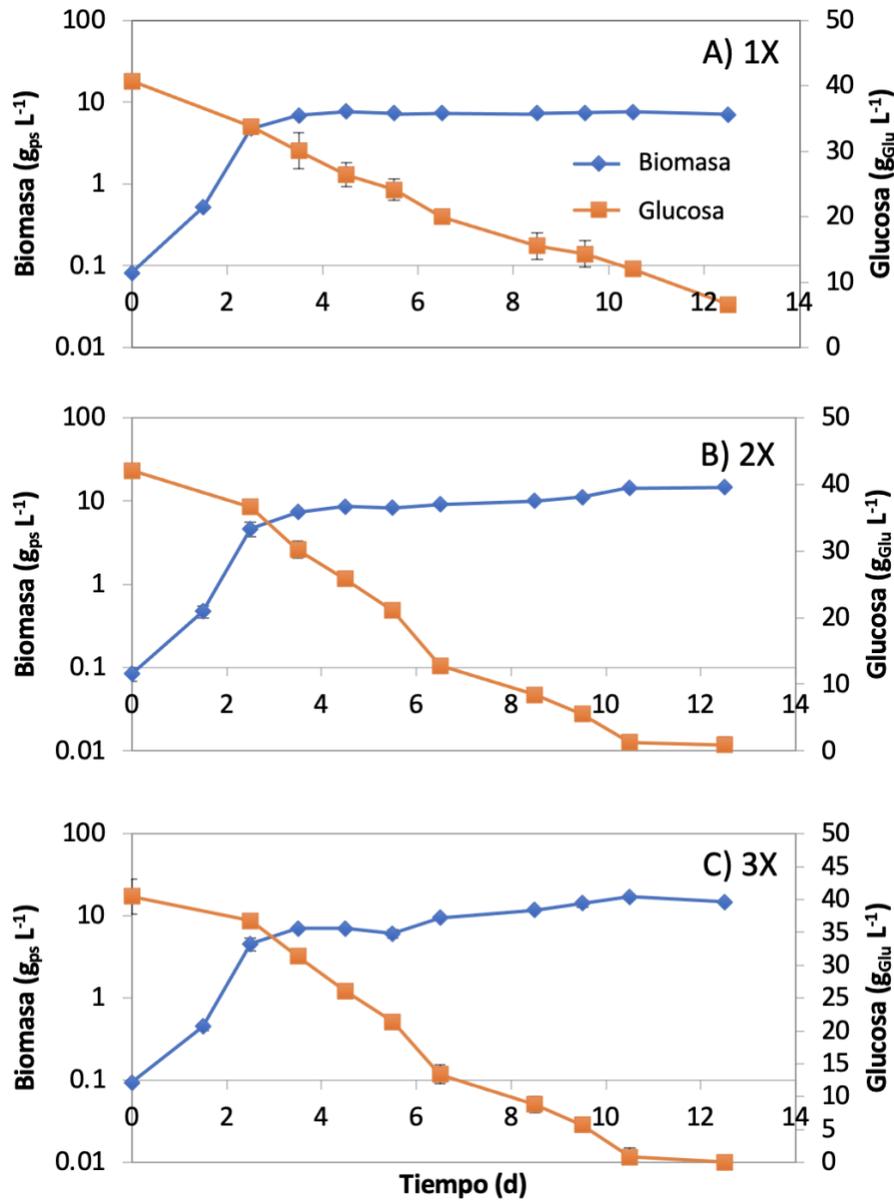
Además, la relación molar N:P en el medio de cultivo basal utilizado en esta tesis era de 11.4:2.2 mM para  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente, lo que equivale a un valor de 10.33:1. Estudios previos indican que la relación molar N:P necesaria en cultivos heterotróficos varía entre 8:1 para *Chlorella vulgaris* [79] y de 5:1 a 8:1 para *Scenedesmus* sp [80].

Con el objetivo de determinar si el fósforo era el nutriente limitante para el crecimiento, se incrementó la concentración de fosfatos de 2.2 mM a 6.6 mM, lo que generó una relación molar N:P de 3.44:1. Sin embargo, los resultados obtenidos en las cinéticas con diferentes concentraciones de glucosa (20, 30, 35, 40 y 50 g L<sup>-1</sup>) y las relaciones C:N (10:1) y N:P (3.44:1) fueron similares a los mostrados en la Figura A1 (datos no mostrados). De tal manera que se puede concluir que los fosfatos, a una concentración inicial de 2.2 mM a 6.6 mM, no limitan el crecimiento de *G. sulphuraria* 2919.

Otros autores han reportado la glucosa como un inhibidor del crecimiento en *G. sulphuraria* [29]; no obstante, al determinar las velocidades de crecimiento y el rendimiento de biomasa con respecto al inicio de la fase estacionaria (**Tabla A1**), se observó que no existe una diferencia significativa entre estos valores, ya que con 60 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup> de glucosa se tuvo una reducción del 5.6% en la velocidad de crecimiento comparado con el promedio de los valores de  $\mu$  cuando se utilizó glucosa de 10 a 47 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup>, lo cual indica que en el intervalo de 10 a 60 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup> de glucosa no existe un efecto de inhibición y tampoco se percibe un efecto de osmolaridad causado por el incremento en la concentración de este monosacárido. Estos resultados permiten sugerir que la limitación observada en la formación de biomasa, después del quinto día de cultivo heterotrófico, es causada por alguna limitación o agotamiento de alguno de los nutrientes del medio de cultivo (diferente a los fosfatos). Por esta razón se decidió realizar cinéticas de crecimiento (**Fig. 2A**)

incrementando los valores de todos los nutrientes del medio de cultivo dos (2X) y tres veces (3X).

Las concentraciones del medio mineral utilizadas fueron: 1X, 2X y 3X, cabe mencionar que se respetó la relación de C:N de 10:1 para todas las concentraciones evaluadas, utilizando  $40 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$  de glucosa (8.8 g de sulfato de amonio).



**Figura A 2.** Efecto del incremento las sales del medio de cultivo en cultivo heterotrófico: A) 1X; B) 2X; y C) 3X; utilizando 40 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup> de glucosa y 8.8 g<sub>Sulf. amonio</sub> L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio (relación C:N 10:1). Condiciones de cultivo: pH inicial 2, 42°C, 200 rpm, volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL.

Al comparar las cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa en las diferentes condiciones de cultivo (**Tabla A2**), se puede observar que las concentraciones de biomasa alcanzadas al agotarse la glucosa (o a los 13 días

en el caso del cultivo 1x) fueron diferentes obteniendo, respectivamente 7, 14 y 16 g L<sup>-1</sup>, para las condiciones con 1X, 2X y 3X de sales. Esta diferencia en la biomasa obtenida, y en combinación con el análisis de la **Figura A1**, permite concluir que las sales basales del medio del cultivo limitan en parte el crecimiento cuando se usan concentraciones de glucosa mayores a 10 g L<sup>-1</sup>, y que la composición de sales 1X permite alcanzar una concentración máxima de 7 g L<sup>-1</sup> de biomasa. No obstante que en los cultivos 2X y 3X se generó un mayor crecimiento, el incremento de biomasa observado en estas condiciones mostró un crecimiento diaúxico, ya que se observaron dos etapas de crecimiento; la primera del día 0 al 6 y la segunda del día 6 al término del cultivo. Dado que estas etapas presentan un crecimiento diferente entre ellas, en la **Tabla A3** se presentan los parámetros cinéticos de ambas etapas.

**Tabla A 2.** Parámetros cinéticos obtenidas en los cultivos 1, 2 y 3X, considerando las dos fases de crecimiento observado

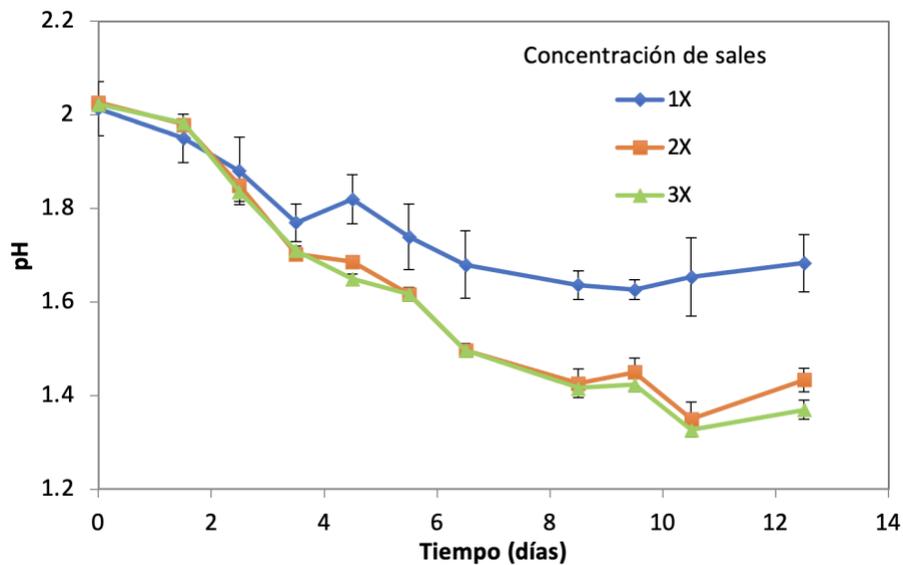
Concentración de sales		$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g <sub>ps</sub> g <sub>Glc</sub> <sup>-1</sup> )	$q_s$ (g <sub>Glc</sub> d <sup>-1</sup> g <sub>ps</sub> <sup>-1</sup> )
1x	Primera etapa	1.59 ± 0.05	0.65 ± 0.08	2.46 ± 0.26
	Segunda etapa	0.2 ± 0.09	0.1 ± 0.06	0.24 ± 0.03
2x	Primera etapa	1.82 ± 0.37	0.53 ± 0.06	3.43 ± 0.27
	Segunda etapa	0.17 ± 0.03	0.62 ± 0.09	0.27 ± 0.03
3x	Primera etapa	1.83 ± 0.60	0.55 ± 0.06	3.32 ± 0.36
	Segunda eta	0.14 ± 0.04	0.66 0.11	0.22 ± 0.11

El crecimiento celular utilizando la concentración de sales 1X (**Fig. A2**) (40 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup> de glucosa y 8.8 g<sub>Sulf. amonio</sub> L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio) presentó una fase de crecimiento exponencial con una  $\mu$  de 1.59 días<sup>-1</sup>, un rendimiento de 0.65

$\text{g}_{\text{ps}} \text{g}_{\text{glucosa}}^{-1}$  y una velocidad específica de consumo de glucosa de  $2.46 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ d}^{-1} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ . En la fase estacionaria de los triplicados de estos cultivos no se observó un aumento de la densidad óptica lo que indica que no hay producción de biomasa y/o acumulación de lípidos o carbohidratos; no obstante, existe un consumo específico de glucosa ( $0.24 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ d}^{-1} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) un orden de magnitud menor que en la primera fase (**Tabla A2**). Por lo que la glucosa consumida en la fase ya no está contribuyendo a la formación de biomasa, sino a un aporte energético el cual mantiene a las células vivas, ya que al encontrarse en ausencia de luz su única fuente de energía es la glucosa.

Por otro lado, en los cultivos en los que se duplicó (2X) y triplicó (3X) la concentración de sales se obtuvo un mayor crecimiento de biomasa en comparación con el cultivo base (1X). Sin embargo, se observaron dos etapas de crecimiento distintas en estos cultivos (**Fig. A2**). Este patrón de crecimiento en dos fases podría atribuirse a la producción de metabolitos de reserva, como lípidos, carbohidratos y pigmentos, o posiblemente a la limitación de un sustrato.

Otra posible explicación es el efecto del pH en el crecimiento celular (**Fig. 3A**). La disminución del pH a medida que aumenta la biomasa podría indicar una acidificación del medio de cultivo debido a la acumulación de productos de desecho o metabolitos ácidos. Un pH más bajo puede ser perjudicial para el crecimiento celular y contribuir a la observación de dos etapas de crecimiento.



**Figura A 3.** Valores de pH para los cultivos heterotróficos con diferentes concentraciones de sales del medio de cultivo: 1X, 2X y 3X; utilizando  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa y  $8.8 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio. Condiciones de cultivo: pH inicial 2,  $42^\circ\text{C}$ , 200 rpm, volumen de trabajo 300 mL en matraces “bafleados” con un volumen nominal de 500 mL.

Los resultados muestran que existe una correlación proporcional entre el crecimiento de esta microalga (**Fig. A2**) y la disminución del pH en el medio de cultivo (**Fig. A3**). La microalga al consumir sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) como fuente de nitrógeno libera protones al medio de cultivo, provocando un incremento en la concentración de protones, lo cual se observa como un decaimiento en el pH [33]. Esta disminución del pH podría afectar la viabilidad de la célula; sin embargo, actualmente no existen suficientes reportes que muestren el efecto de pH en *G. sulphuraria*.

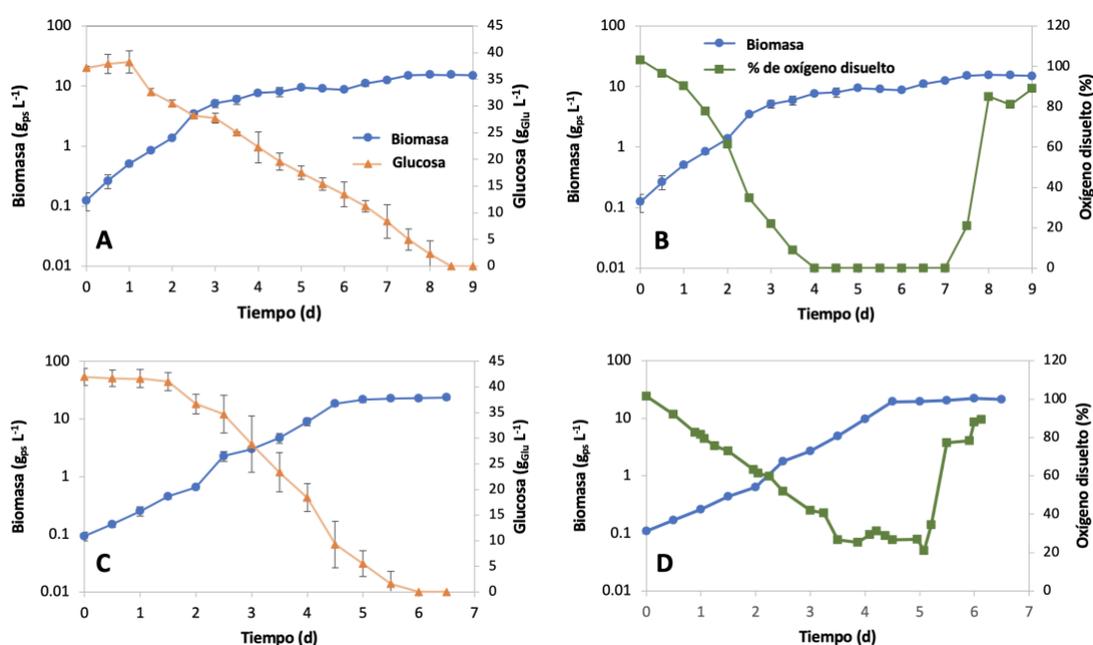
Por lo tanto, se llevó a cabo una investigación para determinar si el pH era el factor responsable del crecimiento en dos etapas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el pH no es el factor limitante en este patrón de crecimiento. Estos resultados se presentarán más adelante en el trabajo.

El bajo oxígeno disuelto limita el crecimiento de la microalga *G. sulphuraria* bajo condiciones heterotróficas y altas concentraciones de glucosa ( $>10 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ )

Para evaluar el efecto del oxígeno disuelto y pH, se llevaron a cabo cultivos heterotróficos en fermentadores de 5 L. Se establecieron dos condiciones: cultivos sin control de oxígeno disuelto y cultivos con control de oxígeno disuelto mediante la variación en la velocidad de agitación para mantenerlo por encima del 20% de la saturación en oxígeno. Ambos experimentos comenzaron con una velocidad de agitación de 200 rpm. Los cultivos se iniciaron con una concentración de glucosa de  $40 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$ , una concentración de sales 3X previamente evaluada, y  $8.8 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio. La aireación se estableció a 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Además, el pH se mantuvo constante en pH 2 utilizando KOH (4N) con el propósito de eliminar el efecto del pH en los cultivos y poder observar únicamente el efecto del oxígeno disuelto. En la figura A4 se presentan las curvas de crecimiento, el consumo de glucosa y el porcentaje de oxígeno disuelto.

El crecimiento observado en el cultivo donde no se controló el nivel de oxígeno disuelto muestra un comportamiento diaúxico (**Fig. A 4A**) (igual al que se presentó en los matraces) Este efecto se correlaciona con la disponibilidad de oxígeno, ya que la fase exponencial del cultivo se termina en el día 4 que es cuando el oxígeno disuelto presente en el cultivo alcanzó un valor de 0% (**Fig. A 4B**), este valor se mantuvo hasta el día 8, que es cuando se termina la fuente de carbono y por lo tanto las células detienen el catabolismo de la glucosa y los requerimientos de oxígeno disminuyen. Durante esta segunda fase se observó un crecimiento lineal con una menor velocidad de crecimiento ( $0.37 \text{ días}^{-1}$ ) en comparación con la obtenida en condiciones donde el oxígeno disuelto fue mayor al 0% ( $1.1 \text{ días}^{-1}$ ;

día 0 al 4). Esto indica que existe un cambio en el metabolismo de la microalga derivada de las condiciones deficientes de oxígeno. Este comportamiento no se ha reportado anteriormente para microalgas, por lo que será necesario realizar estudios que permitan evaluar cuales son los cambios metabólico que se presentan. Por otro lado, el cultivo que mantuvo en valores superiores al 20% de oxígeno disuelto presentó un crecimiento exponencial (**Fig. A 4C**) con una  $\mu$  y rendimiento de  $1.17 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$  y  $0.56 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ g}_{\text{Glu}}^{-1}$ , respectivamente; estos valores son equiparables a los obtenidos en los matraces (10  $\text{g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$  de glucosa inicial), lo cual expone nuevamente que la limitación observada en los cultivos en matraces es debida a la baja disponibilidad de oxígeno (**Fig. A 4D**).



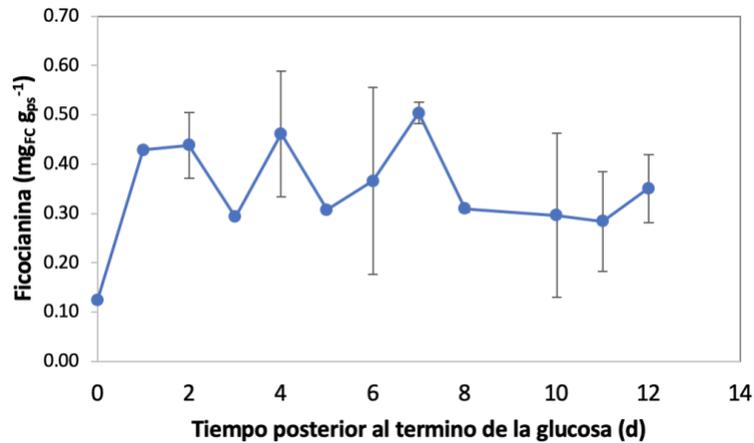
**Figura A 4.** Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y oxígeno disuelto utilizando fermentadores. Con una velocidad agitación constante de 200 rpm (A, B), y con velocidad de agitación variable (una vez que el oxígeno disuelto bajo al 20% de la saturación en aire, la velocidad de agitación se incrementó de manera manual para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto alrededor del 20%) (C, D). Condiciones de cultivo: pH controlado a 2, 42°C, 1 vvm, volumen de trabajo 3.5 en jarras de vidrio con un volumen nominal de 5 L. Nota: los cultivos reportados en los paneles C y D se iniciaron con una velocidad de agitación de 200 rpm y después de la etapa de control manual al 20% de oxígeno disuelto, cuando se terminó la glucosa la velocidad de agitación se reestableció en 200 rpm.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los descritos por Wan *et al.* (2016), quienes informaron que utilizando el mismo medio de cultivo mencionado en este trabajo (1X) y una concentración de glucosa de 35 g L<sup>-1</sup>, observaron una única fase de crecimiento exponencial con una biomasa alcanzando los 18 g L<sup>-1</sup> en matraces de 500 mL y 300 mL de volumen de trabajo [30]. Según los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que el resultado reportado por Wan *et al.* (2016) no es alcanzable, ya que, como se ha demostrado en los párrafos anteriores, existen al menos dos limitaciones en el crecimiento. La primera se debe a las bajas concentraciones de sales y la segunda se debe a la limitación causada por el nivel de oxígeno disuelto en el medio.

Como parte de la caracterización del cultivo una vez terminada la fuente de carbono se realizaron muestreos cada 24 horas durante 13 días con el propósito de medir la acumulación de FC. Las células provenientes de los cultivos donde no se mantuvo el oxígeno disuelto por arriba del 20% no produjeron FC (datos no mostrados). Probablemente este efecto es debido a que dentro de la síntesis de la FC y clorofila hay un intermediario denominado coproporfirinógeno III el cual debe ser oxidado por la enzima coproporfirinógeno III oxidasa; esta enzima necesita oxígeno para realizar su función; y debido a que el oxígeno se encuentra limitado, no le es posible realizar esta reacción, lo que podría detener la biosíntesis de la porfirina derivando en la ausencia de FC [32]. No obstante, los cultivos con nivel de oxígeno disuelto mayor al 20% acumularon una concentración de FC equiparable a la obtenida en matraces (0.4 mg<sub>FC</sub> g<sub>ps</sub><sup>-1</sup>; **Fig. A5**). Es importante resaltar que esta concentración se mantuvo aproximadamente constante 13 días después de que se agotó la glucosa. Este resultado sugiere que la FC presente intracelularmente en *G. sulphuraria* es estable, ya que aparentemente no fue utilizada como fuente de carbono (en condiciones donde la

glucosa ya se había agotado) y que el nivel de oxígeno disuelto es importante para generar FC en condiciones heterotróficas.

*Acumulación de la FC en cultivo aireado posterior al término de la glucosa.*



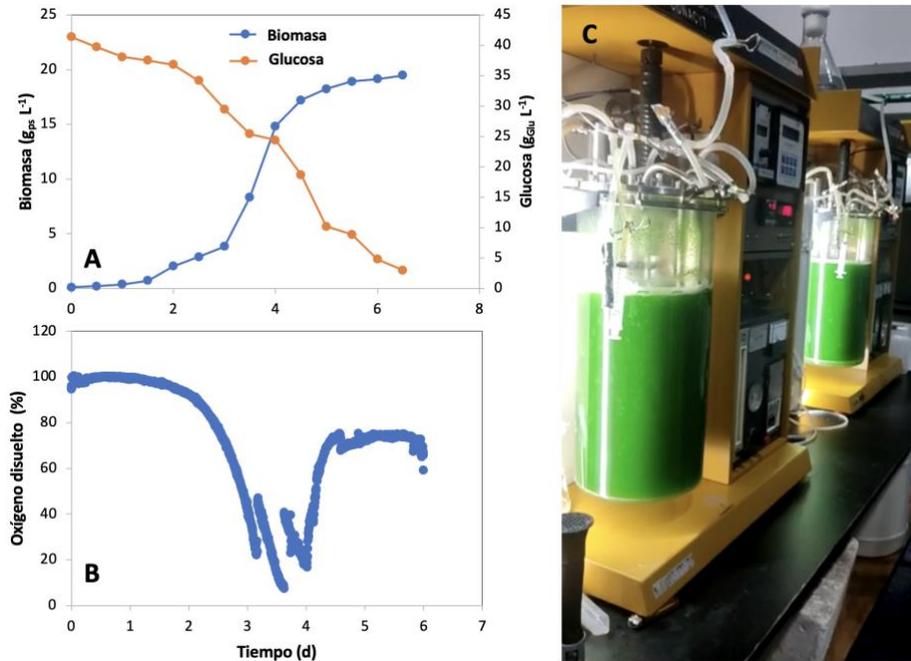
*Figura A 5. Acumulación de la FC en cultivo aireado posterior al término de la glucosa.*

Finalmente, se llevaron a cabo cultivos en fermentadores de 10 L utilizando una concentración de  $40 \text{ g}_{\text{Glu}} \text{ L}^{-1}$  de glucosa, una aireación con un flujo de 1 vvm, una concentración de sales 3X y  $8.8 \text{ g}_{\text{Sul. amonio}} \text{ L}^{-1}$  de sulfato de amonio. Además, el pH se mantuvo constante en un valor de 2 mediante el uso de KOH (4N) como regulador, y se utilizó una solución de silicona como antiespumante. Los resultados de las cinéticas (**Fig. A6**) indican que la velocidad de crecimiento ( $1.14 \text{ d}^{-1}$ ) es comparable a la obtenida en experimentos previos (**Fig. A4C**). Sin embargo, el rendimiento obtenido fue de 0.51 g de biomasa por gramo de glucosa consumida, lo cual es menor que el obtenido en los reactores de menor volumen analizados en este estudio.

El cultivo se inició con una velocidad de agitación de 160 rpm, pero debido al descenso en el porcentaje de oxígeno disuelto, se incrementó la agitación a 250 rpm, lo que provocó la generación de espuma en el cultivo, posiblemente debido a la ruptura de células y liberación de proteínas al medio de cultivo. Para contrarrestar la formación de espuma, se agregó un antiespumante, que tiene un

efecto negativo ya que al cambiar la tensión superficial del medio, disminuye la transferencia de oxígeno [81], dificultando el control del oxígeno disuelto a valores superiores al 20%.

Sin embargo, los resultados demuestran que es posible producir biomasa con una productividad de  $3.25 \text{ g}_{\text{ps}} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  utilizando la cepa 2919 de *G. sulphuraria* en fermentadores de 10 L, obteniendo concentraciones de biomasa comparables a las obtenidas en matraces.



**Figura A 6.** Producción de biomasa en reactores. A) Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y b) oxígeno disuelto utilizando C) fermentadores de 10L. Condiciones de cultivo: pH 2, 42°C, 160 rpm iniciales con incremento manual para mantener el valor por arriba del 0%, volumen de trabajo 8 L en jarras de vidrio con un volumen nominal de 10 L.

## Conclusiones de la producción de biomasa en biorreactores de 3 y 5L

- A pesar de elevar la presión osmótica, la alta concentración de glucosa no afecta el crecimiento de la microalga *G. sulphuraria* 2919. Sin embargo, se observó que la baja concentración de sales en el medio de cultivo limita parcialmente su crecimiento a concentraciones de glucosa superiores a 10 g<sub>Glu</sub> L<sup>-1</sup>.
- Se observó que la insuficiencia de oxígeno disuelto a altas concentraciones de sales afecta el crecimiento microalgal. Este problema fue resuelto al implementar aireación al sistema.
- La acumulación de FC está regulada por la presencia de oxígeno en el medio. La cual además presenta una alta estabilidad en un ambiente de inanición de carbono orgánico.
- Estos descubrimientos sobre el comportamiento de *G. sulphuraria* a mayor escala pueden tener implicaciones significativas para su implementación a nivel industrial.

## ANEXO II: Producción académica

### Artículos científicos

- a) Vera-López Portillo F. *et al.* (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>
  
- b) Montenegro-Herrera C. *et al.* (2022) Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization. *Journal of Applied Phycology*, 34:1341-1352. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02733-y>

### Artículos de divulgación

- a) Vera-López-Portillo,F., Martínez-Jimenez,A. (2021). Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción. *BioTecnología. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 25 (5), 35-51.
  
- b) Vera-López-Portillo,F., Montenegro-Herrera,C.A., Alvarado-Cosío,R.A., Martínez-Jimenez,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.
  
- c) Montenegro-Herrera,C., 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), 52-64.